



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Fabiani Fernanda Triches

**Atracamento molecular dos antidepressivos ao transportador de dopamina da  
*Drosophila melanogaster*: estudos *in silico***

Florianópolis  
2023

Fabiani Fernanda Triches

**Atracamento molecular dos antidepressivos ao transportador de dopamina da  
*Drosophila melanogaster*: estudos *in silico***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestra em Farmacologia.

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Cilene Lino de Oliveira

Florianópolis

2023

Triches, Fabiani Fernanda

Atracamento molecular dos antidepressivos ao transportador de dopamina da *Drosophila melanogaster*: estudos in silico / Fabiani Fernanda Triches ; orientadora, Cilene Lino de Oliveira, 2023.  
107 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Docking molecular. 3. 3Rs. 4. Substituição . 5. Neuropsicofarmacologia. I. Oliveira, Cilene Lino de. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Fabiani Fernanda Triches

**Atracamento molecular dos antidepressivos ao transportador de dopamina da  
*Drosophila melanogaster*: estudos *in silico***

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 27 de junho de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Lilian S. C. Bernardes, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Juliano Ferreira, Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof.(a) Aurea Elizabeth Linder, Dr.(a)

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Guilherme Razzera, Dr.

Instituição Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof.(a) Cilene Lino de Oliveira, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2023

Este trabalho é dedicado à toda minha família, meu companheiro, minha orientadora, meus colegas de laboratório, as minhas amigas e amigos, a sociedade e a todas as pessoas, que direta ou indiretamente, me ajudaram neste processo.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Cilene Lino de Oliveira, por todo apoio, correções, conhecimento, paciência e oportunidades que me deu, sem você este trabalho não teria sido construído. Agradecimento especial a toda ajuda externa que recebi: ao suporte na matemática, gostaria de agradecer a minha irmã e colaboradora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Francieli Triches, que ajudou a construir e entender os cálculos do consenso da ancoragem no desenvolvimento da automatização da coleta de dados usando o Python, gostaria de agradecer ao meu cunhado Dr<sup>o</sup> Helder Geovane e ao meu companheiro Candinho Luiz Dalla Brida Jr, que ouviram minha demanda e construíram o código para mim; e por fim, agradecer a todas as pessoas que desprenderam seu tempo para postar vídeos no YouTube e fazer cursos sobre docking molecular, definitivamente esse trabalho não teria saído sem todo o aprendizado adquirido.

Quero também, fazer um agradecimento a minha família, minha mãe Maria Lurdes, ao meu pai Ari Triches e a minha irmã por terem sempre me apoiado, acreditado em mim e me ajudado tanto neste processo. Aos pais e irmãos do Candinho, Marcia, Candinho, Pedro, Nádia e Rafaela, por me acolherem como parte da sua família, pelas risadas, passeios e comidas gostosas. Aos meus colegas de laboratório, Tamires Martins, Johnny Erick, Fabiola Boz Eckert e Juliana Bolzan, nós já viajamos juntos, trabalhamos, demos risadas, bebemos cerveja, fizemos jantadas deliciosas, falamos mal do governo, vocês fizeram deste processo mais fácil. As amizades que fiz ao longo do mestrado, em especial a Isabel Werle, minha parceira de seminários. Posso dizer que consegui aproveitar a Universidade e que sairei daqui com muito orgulho de tudo o que vivi e todas as experiências que tive porque vocês fazem parte dela.

Agradecer as Professoras e Professores pelo conhecimento técnico, a Universidade por possibilitar tantas oportunidades de crescimento pessoal e acadêmico. As instituições financeiras, CAPES e CNPq, que com todos os cortes que passam, continuam incentivando a pesquisa e a ciência.

## RESUMO

A *Drosophila melanogaster* é um organismo que surge como alternativa aos roedores em pesquisas. O estudo dos mecanismos de ação dos fármacos antidepressivos neste organismo reforça seu uso como modelo animal na área da neuropsicofarmacologia. Em vertebrados, os antidepressivos interagem com transportadores de monoaminas. Nas moscas, atualmente, o transportador de dopamina é o único transportador de monoaminas cristalizado (dDAT). Neste estudo se investigou a afinidade entre os antidepressivos e o complexo cristalográfico dDAT para se criar uma lista de classificação dos antidepressivos. Para atingir este objetivo, usou diferentes métodos de ancoragem molecular. Primeiramente foram padronizados os procedimentos para ancoragem através do re-ancoramento usando inúmeras estratégias em diferentes programas. Com a melhor estratégia definida, foi usado um método conhecido para o consenso entre os resultados dos ancoramentos (ECR) e dois novos cálculos de consenso desenvolvidos neste projeto (ECR+MS e FL+ECR+MS). Além destes consensos, foi também padronizado um cálculo de constante de inibição ( $K_i$ ) a partir dos resultados de ancoragem *in silico*. A partir da ordenação dos resultados consensuais ou  $K_i$  foram criadas as listas de classificação. As listas criadas a partir dos resultados consensuais ECR ou ECR+MS posicionaram os ligantes em escala ordinal (1º, 2º, 3º...;) e o consenso FL+ECR+MS em escalar linear (valores de 0 a 1). Após todas as padronizações, foi realizado a ancoragem molecular de cada um dos 26 antidepressivos com 11 dDATs, nos programas *Autodock Vina*, *DockThor* e *Gold*. Um método de validação dos cálculos de consensos usando os *decoys* e um cálculo ROC foi aplicado para conhecer a quantidade de antidepressivos classificados nos primeiros 1%, 2%, 5%, 10%, 20% e 50% dos dados de cada lista. As primeiras posições das listas criadas a partir dos consensos foram ocupadas pela vilazodona e nefazodona. Na lista criada a partir da ordenação do  $K_i$  *in silico* as primeiras posições foram ocupadas pela amitriptilina e mirtazapina. As últimas posições em todas as listas foram ocupadas pela levomilnacipram e bupropiona. O padrão de classificação da do  $K_i$  *in silico* foi semelhante a uma lista criada pela ordenação de valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro* obtidos da literatura. O cálculo ROC indicou que, em todas as listas, a quantidade de antidepressivos presentes nas faixas de 1%, 2%, 5%, 10% dos dados era inferior a 10%. O consenso FL+ECR+MS classificou mais antidepressivos nos subconjuntos de dados 20% e 50% do que as outras formas de consenso. De forma geral, os ligantes com mais anéis aromáticos ficaram melhores posicionados nas listas de classificação evidenciando que o padrão de afinidade dos antidepressivos com o dDAT foi diferente quando comparado ao DAT humano. O aminoácido fenilalanina (PHE319) teve maior frequência no ancoramento da vilazodona com o dDAT, aminoácido importante para interação dos ligantes no sítio de ligação do dDAT. Em estudos futuros é preciso analisar a frequência dos aminoácidos nos outros antidepressivos, em especial os últimos colocados. Em resumo, o presente estudo mostra que, a estimativa de afinidade dos antidepressivos pelo dDAT feita por ancoragem molecular é variável e dependente da metodologia empregada.

**Palavras-chave:** afinidade; *docking* molecular; transportadores de monoaminas.

## ABSTRACT

*Drosophila melanogaster* is an organism that appears as an alternative to rodents in research. The study of the mechanisms of action of antidepressants in this organism reinforces its use as an animal model in neuropsychopharmacology. In vertebrates, antidepressants interact with monoamine transporters. In flies, the dopamine transporter is currently the only crystallized one (dDAT). In this study, we investigated the affinity between antidepressants and the dDAT to create a ranking list of antidepressants. To achieve this goal, different methods of molecular docking were used. First, docking and re-docking procedures were standardized using numerous strategies in different programs. With the best strategy defined, a known method for consensus between docking results (ECR) and two new consensus calculations developed in this project (ECR+MS and FL+ECR+MS) were used. In addition to these consensus, a calculation of the inhibition constant ( $K_i$ ) was also standardized based on *in silico* docking results. Classification lists were created based on ordering the consensual results or  $K_i$ . The lists created from the ECR or ECR+MS consensus results positioned the ligands on an ordinal scale (1st, 2nd, 3rd...;) and the FL+ECR+MS consensus on a linear scale (values from 0 to 1). After all the standardizations, the molecular docking of each of the 26 antidepressants was performed with 11 dDATs, in the Autodock Vina, DockThor and Gold programs. A validation method of consensus calculations using decoys and a ROC calculation was applied to know the number of antidepressants classified in the first 1%, 2%, 5%, 10%, 20% and 50% of the data in each list. The first positions on the lists created based on the consensus were occupied by vilazodone and nefazodone. In the list created from ordering  $K_i$  *in silico*, the first positions were occupied by amitriptyline and mirtazapine. The last positions in all lists were occupied by levomilnacipram and bupropion. The *in silico*  $K_i$  classification pattern was similar to a list created by ordering *in vitro*  $K_i$  and  $IC_{50}$  values obtained from the literature. The ROC calculation indicated that, in all lists, the amount of antidepressants in the 1%, 2%, 5%, 10% ranges of the data was less than 10%. The FL+ECR+MS consensus ranked more antidepressants in the 20% and 50% data subsets than the other consensus forms. In general, the ligands with more aromatic rings were better positioned in the ranking lists, showing that the affinity pattern of antidepressants with dDAT differed from human DAT. The amino acid phenylalanine (PHE319) was the amino acid more frequent in docking vilazodone with dDAT, an essential amino acid for the interaction of ligands at the dDAT binding site. In future studies, it is necessary to analyze the frequency of amino acids in other antidepressants, especially the last positions. In summary, the present study shows that the estimate of the affinity of antidepressants by dDAT made by molecular docking is variable and dependent on the methodology employed.

**Keywords:** affinity; molecular docking; monoamine transporters.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação do re-ancoramento .....	26
Figura 2. Representação do ancoramento cruzado .....	28
Figura 3. Transportador de dopamina da <i>Drosophila melanogaster</i> .....	29
Figura 4. Obtenção das coordenadas X, Y e Z para os dDATs do PDB .....	32
Figura 5. RMSD com valor abaixo de 2Å .....	33
Figura 6. RMSD com valor acima de 2Å .....	33
Figura 7. <i>Grid box</i> pequena .....	35
Figura 8. <i>Grid box</i> grande.....	36
Figura 9. Obtenção das coordenadas X, Y e Z para o dDAT do <i>Alpha Fold</i> .....	43
Figura 10. Representação da etapa 1 para o consenso de Palacio-Rodríguez et al., (2019).....	46
Figura 11. Valor de ECR obtido do cálculo de consenso de Palacio-Rodríguez et al., (2019)	46
Figura 12. Representação da etapa 1 para o consenso ECR+MS .....	47
Figura 13. Representação da etapa 1 para o consenso FL+ECR+MS .....	48
Figura 14. Representação da etapa 2 dos consensos ECR+MS e FL+ECR+MS .....	49
Figura 15. Representação da etapa 3 dos consensos .....	50
Figura 16. Valores de $K_i$ <i>in silico</i> por dDAT .....	50
Figura 17. Valor final de $K_i$ <i>in silico</i> .....	51
Figura 18. Representação do ancoramento múltiplo .....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. dDATs depositados no PDB.....	29
Tabela 2. Ligante co-cristalizado com seu dDAT .....	30
Tabela 3. Coordenadas X, Y e Z .....	31
Tabela 4. Estratégias para o <i>Autodock 4</i> .....	36
Tabela 5. Estratégias para o <i>Autodock Vina</i> .....	38
Tabela 6. Estratégias para o <i>DockThor</i> .....	39
Tabela 7. Estratégias para o <i>Gold</i> .....	41
Tabela 8. dDAT depositado no <i>Alpha Fold</i> .....	43
Tabela 9. Coordenada X, Y e Z.....	44
Tabela 10. Valores de RMSD obtido no <i>Autodock 4</i> .....	52
Tabela 11. Valores de RMSD obtido no <i>Autodock Vina</i> .....	52
Tabela 12. Valores de RMSD obtido no <i>DockThor</i> .....	53
Tabela 13. Valor de RMSD obtido no <i>Gold</i> .....	54
Tabela 14. Lista de classificação ECR para o ancoramento cruzado .....	54
Tabela 15. Lista de classificação ECR+MS para o ancoramento cruzado .....	55
Tabela 16. Lista de classificação FL+ECR+MS para o ancoramento cruzado .....	57
Tabela 17. Lista de classificação da constante de inibição ( $K_i$ ) <i>in silico</i> : primeira rodada.....	58
Tabela 18. Lista de classificação da constante de inibição ( $K_i$ ) <i>in silico</i> : segunda rodada .....	58
Tabela 19. Representação química dos ligantes .....	60
Tabela 20. Valor de $K_i$ / $CI_{50} \pm SEM$ <i>in vitro</i> dos ligantes obtidos na literatura.....	63
Tabela 21. Comparação das classificações dos ligantes do ancoramento cruzado .....	64
Tabela 22. Comparação das classificações dos ligantes do ancoramento cruzado .....	66
Tabela 23. Lista dos antidepressivos .....	68
Tabela 24. Lista de classificação ECR para o ancoramento múltiplo .....	74
Tabela 25. Lista de classificação ECR+MS para o ancoramento múltiplo .....	75
Tabela 26. Lista de classificação FL+ECR+MS para o ancoramento múltiplo .....	77
Tabela 27. $K_i$ <i>in silico</i> do ancoramento múltiplo .....	79
Tabela 28. Ordenação dos antidepressivos na análise de sensibilidade .....	81
Tabela 29. Classificações dos consensos e $K_i$ <i>in silico</i> para o ancoramento com os <i>decoys</i> ....	86
Tabela 30. Resultados do ROC.....	88
Tabela 31. Dados de $K_i$ e $CI_{50}$ dos antidepressivos pelo dDAT <i>in vitro</i> .....	92
Tabela 32. Comparação das classificações <i>in silico</i> e <i>in vitro</i> dos antidepressivos .....	93

Tabela 33. Aminoácidos mais frequentes na interação vilazodona-dDAT .....	95
Tabela 34. Representação química dos ligantes <i>decoys</i> .....	99

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**$\Delta G$**  = delta G

**dDAT** = transportador de dopamina da *Drosophila melanogaster*

**dSERT** = transportador de serotonina da *Drosophila melanogaster*

**ECR** = *exponencial consensus ranking*

**ECR+MS** = *exponencial consensus ranking* + média simples

**FL** = função linear

**FL+ECR+MS** = função linear + *exponencial consensus ranking* + média simples

**hDAT** = transportador de dopamina humana

**hNET** = transportador de noradrenalina humano

**hSERT** = transportador de serotonina humano

**$K_i$**  = constante de inibição

**MS** = média simples

**PDB** = *Protein Data Bank*

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	<i>DROSOPHILA MELANOGASTER</i> COMO ORGANISMO MODELO EM PSICOFARMACOLOGIA.....	15
1.2	TRANSPORTADORES DE DOPAMINA DA <i>D. MELANOGASTER</i> .....	18
1.3	INTERAÇÃO LIGANTE-MACROMOLÉCULA.....	20
1.4	ANCORAMENTO MOLECULAR .....	21
1.5	CONSENSO DO ANCORAMENTO MOLECULAR .....	23
<b>2.</b>	<b>HIPÓTESE.....</b>	<b>24</b>
<b>3.</b>	<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>24</b>
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>24</b>
<b>5.</b>	<b>ESTRATÉGIA DE AÇÃO.....</b>	<b>25</b>
<b>6.</b>	<b>CAPÍTULO 1: PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DO ANCORAGEM MOLECULAR.....</b>	<b>26</b>
6.1	RE-ANCORAMENTO .....	26
6.2	ANCORAMENTO CRUZADO .....	27
<b>7.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
7.1	RE-ANCORAMENTO.....	28
7.1.1	Macromolécula.....	28
7.1.2	Ligantes.....	30
7.1.3	Programas .....	31
7.1.4	Sítio de Ligação.....	31
7.1.5	Estratégias do re-ancoramento.....	32
7.2	ANCORAMENTO CRUZADO .....	42
7.2.1	Consenso do ancoramento .....	44
7.2.2	Constante de inibição ( $K_i$ ) <i>in silico</i> .....	50
<b>8.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
8.1	RE-ANCORAMENTO .....	51
8.1.1	Re-ancoramento no Autodock 4.....	51
8.1.2	Re-ancoramento no <i>Autodock Vina</i> .....	52
8.1.3	Re-ancoramento no <i>DockThor</i> .....	53
8.1.4	Re-ancoramento no <i>Gold</i> .....	53
8.2	ANCORAMENTO CRUZADO .....	54

8.2.1	Lista de classificação ECR.....	54
8.2.2	Lista de classificação ECR+MS.....	55
8.2.3	Lista de classificação FL+ECR+MS .....	56
8.2.4	Lista de classificação da constante de inibição ( $K_i$ ) <i>in silico</i> .....	57
9.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	59
9.1	RE-ANCORAMENTO.....	59
9.2	ANCORAMENTO CRUZADO .....	59
10.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
6.	<b>CAPÍTULO 2: CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS POR ORDEM DE AFINIDADE PELO DDAT</b> .....	67
7.	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	67
7.1	ANCORAMENTO MÚLTIPLO COM OS ANTIDEPRESSIVOS.....	67
7.1.1	<b>Consenso do ancoramento e constante de inibição (<math>K_i</math>) <i>in silico</i></b> .....	70
7.2	ANÁLISE DA SENSIBILIDADE .....	71
7.3	VALIDAÇÃO DO CÁLCULO DO CONSENSO DO ANCORAMENTO .....	71
7.3.1	<b>Métrica de validação do consenso</b> .....	72
8.	<b>RESULTADOS</b> .....	73
8.1	ANCORAMENTO MÚLTIPLO COM OS ANTIDEPRESSIVOS.....	73
8.1.1	<b>Consenso do ancoramento</b> .....	73
8.1.2	<b>Constante de inibição (<math>K_i</math>) <i>in silico</i></b> .....	78
8.2	ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS PROGRAMAS .....	80
8.3	VALIDAÇÃO DO CÁLCULO DE CONSENSO DO ANCORAMENTO.....	85
8.3.1	<b>Métricas de validação</b> .....	87
9.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	89
9.1	LISTA DE CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS .....	89
9.2	ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS PROGRAMAS .....	97
9.3	VALIDAÇÃO DO CÁLCULO DE CONSENSO .....	97
10.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	100
11.	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	102

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 *DROSOPHILA MELANOGASTER* COMO ORGANISMO MODELO EM PSICOFARMACOLOGIA

Organismos modelo são animais não-humanos usados na pesquisa científica com objetivo de entender fenômenos biológicos (LEONELLI; ANKENY, 2013). Na psicofarmacologia, existem diversas opções de organismos modelos que podem ser usados, porém, os mais populares são os ratos e os camundongos. No esforço de criar alternativas para melhorar o bem-estar animal na pesquisa científica, Russel e Burch em 1959 publicaram o livro intitulado “The principles of humane experimental technique”, dando origem ao que hoje é conhecido por princípios dos “3Rs”: redução (*reduction*), refinamento (*refinement*) e substituição (*replacement*). Dentro dos 3Rs, novas técnicas estão sendo propostas para substituir o uso de animais vertebrados por metodologias que não usem organismos vivos (substituição total), como experimento *in silico* ou, quando estes são necessários, animais invertebrados (substituição parcial) (THE 3Rs). No contexto de substituição parcial encontra-se estudos com, por exemplo, zebrafish (*Danio rerio*) (KOSITSYN et al, 2022), *Caenorhabditis elegans* (NAß; KAMPF; EFFERTH, 2021), *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*) (NARAYANAN; ROTHENFLUH, 2016), entre outros.

A *D. melanogaster*, conhecida popularmente como mosca-da-fruta ou mosca-da-banana, devido a sua atração por frutas no geral, em especial a banana, em estágios avançados de amadurecimento (NARAYANAN; ROTHENFLUH, 2016; JENNINGS, 2011; THE 3Rs), é estudada há mais de um século, principalmente na área da genética e herança, mas também em áreas como desenvolvimento embrionário, comportamento, envelhecimento e diversas doenças humanas (JENNINGS, 2011; UGUR; CHEN; BELLEN, 2016). O uso da mosca em pesquisas apresenta vantagens quando comparado aos roedores. Por exemplo, o ciclo de vida mais rápido facilita a produção de inúmeros embriões em uma única geração (JENNINGS, 2011). Portanto, o número de moscas disponíveis para experimentação é maior que o de roedores em um mesmo período de tempo, permitindo um número amostral maior em cada experimento, conferindo maior poder estatístico às análises. Por serem menores que os roedores, as moscas demandam menos espaço para reprodução, manutenção e manuseio (JENNINGS, 2011). Estas características diminuem os gastos financeiros com a pesquisa.

A *D. melanogaster* compartilha um último ancestral comum com os humanos com um sistema nervoso complexo (O’KANE, 2011; PÖRZGEN et al., 2001). Assim como os humanos, elas possuem capacidade de memória, aprendizagem e plasticidade sináptica (O’KANE, 2011; MARTIN, KRANTZ, 2014). Além disso, exibem comportamentos sociais

elaborados como corte e agressividade (KAZAMA, 2015; O'KANE, 2011; MARTIN, KRANTZ, 2014). Os humanos e as moscas compartilham diversos neurotransmissores, sendo eles a acetilcolina, o glutamato, a dopamina e a serotonina e também os transportadores de monoaminas serotonina e dopamina (JOSEPH et al., 2019; MARTIN, KRANTZ, 2014; O'KANE, 2011). Estes sistemas são conservados entre as espécies, bem como a interação entre eles, e dão suporte ao uso da *D. melanogaster* como organismo modelo para estudos de processos biológicos, em pesquisas de desordens como esquizofrenia, autismo, bipolaridade, doença de Parkinson e depressão (KASTURE et al., 2018). Não somente, também dão suporte para estudos na busca por novos fármacos com potencial farmacológico e no entendimento dos mecanismos dos fármacos psicotrópicos (KASTURE et al., 2018; VAN ALPHEN, VAN SWINDEREN, 2013).

O sistema noradrenérgico é ausente na *D. melanogaster*, porém, o sistema dopaminérgico e serotoninérgico é conservado (KASTURE et al., 2018). O sistema dopaminérgico das moscas é composto por cerca de 127 neurônios no *mushroom body* e possui papel crucial no controle de diversos fatores de sobrevivência da espécie, como sono, excitação, fototropismo, ciclo circadiano, fome, agressão, aprendizado e corte (KASTURE et al., 2018). Assim como nos humanos, a dopamina nas moscas-da-fruta também é derivada da L-dopa numa reação catalisada pela tirosina hidroxilase (KASTURE et al., 2018). Nestes organismos, o sistema serotoninérgico é composto por cerca de 80 neurônios no *mushroom body* que modulam fatores como sono, memória, ciclo circadiano, fome, agressão e nocicepção (KASTURE et al., 2018). A serotonina é sintetizada em duas etapas, primeiro a triptofano hidroxilase converte a L-triptofano em 5-hidroxitriptofano, em seguida, é clivado pela descarboxilase gerando a serotonina (KASTURE et al., 2018).

Dentre os transportadores de monoaminas, somente o transportador de noradrenalina (NET) é ausente na *D. melanogaster* (JOSEPH et al., 2019, MARTIN; KRANTZ, 2014, PIDATHALA et al., 2021). Os transportadores de dopamina e serotonina da *D. melanogaster*, dDAT e dSERT, tem sequência gênica similares aos três transportadores de monoaminas nos humanos (hDAT, hNET, hSERT) (JOSEPH et al., 2019, PÖRZGEN, et al. 2001). A similaridade nas regiões transmembranas - onde se encontra o sítio de ligação (JOSEPH et al., 2019, PÖRZGEN, et al. 2001) - chega a 55% de identidade quando comparado ao hDAT e 58%-59% quando comparado ao hNET (ORTORE et al., 2020). A maior variação está na região extracelular (JOSEPH et al., 2019).

Atualmente, as principais classes de fármacos usados para tratamento de transtornos psíquicos em humanos são as classes dos antidepressivos monoaminérgicos, como os

inibidores da monoamina oxidase (iMAO), os antidepressivos tricíclicos, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina, os inibidores seletivos da recaptação de noradrenalina, os inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina e os inibidores seletivos da recaptação de dopamina (WANG; LEWIS, 2010). Todas estas classes de antidepressivos aumentam os níveis de monoaminas (dopamina, noradrenalina e serotonina) na fenda sináptica entre os neurônios (WANG; LEWIS, 2010). Com exceção dos iMAO, que inibem a enzima de degradação das monoaminas, os demais têm por alvos farmacológicos os transportadores de dopamina, serotonina e noradrenalina (ANDERSEN et al., 2015, JOSEPH et al., 2019, PIDATHALA et al., 2021, WANG; LEWIS, 2010).

Os antidepressivos de classes farmacológicas diversas se ligam ao DAT deste animal (PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2013; PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015; PIDATHALA et al., 2021; WANG; PENMATSA; GOUAUX, 2015; PÖRZGEN, et al. 2001). Além disso, os antidepressivos afetam alguns comportamentos das moscas (ARAUJO et al., 2020; NAZARI, 2011; RAMOS-HRYB et al., 2020). Por exemplo, Araujo e colaboradores (2020), analisaram os comportamentos da *D. melanogaster* após exposição crônica a uma sequência de fatores potencialmente estressores, sendo eles frio, calor, privação de sono e comida, em sequência, fizeram a administração do fármaco antidepressivo fluoxetina (ARAUJO et al., 2020). Como resultado do estudo, os autores viram que as moscas expostas ao protocolo de estresse tiveram comportamentos diferentes do controle, como diminuição da preferência pela sacarose e eclosão dos machos. Além disso, observaram que a fluoxetina conseguiu reverter o efeito do estresse sobre os comportamentos dos animais (ARAUJO et al., 2020).

Outra pesquisa similar é de Ramos-Hryb e colaboradores (2020). Neste estudo o protocolo de estresse, mais curto que em Araújo et al., (2020), aplicou nas moscas uma combinação de estímulos, como isolamento social, privação de comida, choque e calor, seguido da administração do antidepressivo fluoxetina ou diazepam (RAMOS-HRYB et al., 2020). Como resultado, viram que as moscas estressadas, e em seguida tiveram a administração dos antidepressivos, aumentaram o tempo de caminhada no aparato campo aberto, quando comparada às moscas do grupo que sem administração dos fármacos (RAMOS-HRYB et al., 2020). Por fim, Nazari (2011) administrou a fluoxetina com o intuito de investigar como o antidepressivo afetaria o comportamento sexual das moscas. Neste estudo o fármaco não alterou os comportamentos sexuais expressos pelos animais (NAZARI, 2011).

## 1.2 TRANSPORTADORES DE DOPAMINA DA *D. MELANOGASTER*

O dDAT é o único transportador das monoaminas da *D. melanogaster* que possui sua estrutura resolvida utilizando a técnica de cristalografia de raio-x (PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2013; PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015; PIDATHALA et al., 2021; WANG; PENMATSA; GOUAUX, 2015). Cristalografia de raio-x é uma técnica usada para determinar as estruturas cristalinas tridimensionais em alta resolução de átomos de uma molécula ou macromolécula, podendo ser proteínas, ácidos nucleicos, pequenas moléculas, entre outros (AMBROSIO; FRANCHINI, 2017). Os complexos cristalográficos dDAT foram depositadas no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB).

Além da molécula do transportador, um complexo cristalográfico dDAT contém um ligante de interesse e alguns cofatores. Dentre os ligantes de interesse estão o antidepressivo da classe dos tricíclicos, nortriptilina (código PDB 4M48, PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2013), a nisoxetina (código PDB 4XNU) e a reboxetina (código PDB 4XNX) (PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015) que são inibidores da recaptação de noradrenalina. Também foram cristalizados com dDAT, os neurotransmissores noradrenalina (código PDB 6M2R, PIDATHALA et al., 2021), a dopamina (código PDB 4XP1) e seu análogo, o 3,4-dicloro fenetilamina (código PDB 4XPA, WANG; PENMATSA; GOUAUX, 2015) e os psicoestimulantes D-anfetamina (código PDB 4XP6), metanfetamina (código PDB 4XP9), cocaína (código PDB 4XP4), e o análogo da cocaína, RTI-55 (código PDB 4XP5, WANG; PENMATSA; GOUAUX, 2015).

O dDAT possui 12 hélices transmembranas, sendo as hélices 1,3, 6 e 8, as regiões do sítio de ligação dos ligantes (NEPAL et al., 2023). Os aminoácidos considerados os mais importantes no sítio de ligação, i.e., responsáveis pela ligação com o ligante, os aminoácidos: fenilalanina (PHE43), alanina (ALA44), ácido aspártico (ASP46), alanina (ALA117), valina (VAI120), ácido aspártico (ASP121), tirosina (TYR123), tirosina (TYR124), fenilalanina (PHE319), serina (SER320), glicina (GLY322), fenilalanina (PHE325), serina (SER421), serina (SER422), glicina (GLY425), serina (SER426), alanina (ALA428), alanina (ALA479) (PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2013; PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015; PIDATHALA et al., 2021; WANG; PENMATSA; GOUAUX, 2015).

Na literatura de interesse farmacológico, encontramos trabalhos que usaram os complexos cristalográficos dDAT com objetivos diversos. Por exemplo, usou-se os complexos cristalográficos dDAT para se compreender como uma série de 11 novos triazolobenzodiazepínicos se ligavam ao transportador, uma vez que essas novas moléculas podem ter atividade ansiolítica (BELHASSAN et al., 2019). Para tal, realizaram estudos de ancoragem

molecular e estudos *in silico* de ADMET (administração, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) entre o dDAT de código PDB 4M48 e as 11 novas moléculas (BELHASSAN et al., 2019). Encontraram que a maioria das moléculas teve interações de hidrogênio e PI-PI com os aminoácidos do sítio de ligação, uma absorção de 96% no intestino e uma baixa toxicidade quando comparada ao ligante co-cristalizado com o dDAT, a nortriptilina (BELHASSAN et al., 2019).

O complexo cristalográfico dDAT também foi usado como base para construir computacionalmente um modelo para outros transportadores ainda não resolvidos experimentalmente, num processo conhecido como modelos homólogos. Usando o processo de modelos homólogos, os complexos cristalográficos dDAT (código PDB 4XP9) foi usado para prever a estrutura do dSERT (HIDALGO et al., 2017). Nesta pesquisa, os autores investigaram a afinidade do ligante *4-methylthioamphet-amine* (4-MTA) com o transportador o dSERT (HIDALGO et al., 2017). Identificaram que o 4-MTA interage com aminoácidos do dSERT descritos como importantes em ligações no transportador de serotonina humano (hSERT) (HIDALGO et al., 2017). Identificaram que o 4-MTA interage com aminoácidos do dSERT descritos como importantes em ligações no transportador de serotonina humano (hSERT) (HIDALGO et al., 2017).

Também usaram os complexos cristalográficos dDAT também foi usado para construir o modelo homólogo do SERT em humanos (hSERT) (ANDERSON et al. 2015; YANG et al. 2017). Anderson e colaboradores (2015), investigaram a razão pela qual o antidepressivo vortioxetina possui uma alta afinidade pelo hSERT. Yang e colaboradores (2017), compararam o modelo homólogo do hSERT, a partir do dDAT, com a estrutura de hSERT resolvida por difração de raio-X, concluindo que o modelo homólogo o hSERT consegue reproduzir o hSERT resolvido experimentalmente. Além disso, identificaram que ao atracar o escitalopram no hSERT criado por homologia, o encaixe gerado foi consistente com o hSERT resolvido (YANG et al., 2017).

Não somente para os transportadores de serotonina, mas os complexos cristalográficos dDAT (código PDB 4XPG) foi usado para gerar o DAT humano (hDAT), que os autores empregaram para estudaram as propriedades da interação com a cocaína, a anfetamina e a orfenadrina e a dopamina com o hDAT (CHENG et al., 2015). Por fim, foi realizada a construção por homologia de dois transportadores de noradrenalina humano (hNET) a partir dos complexos cristalográficos dDAT, uma de código PDB 4XPG e outra de código PDB 4M48 (GÓRAL; ŁĄTKA; BAJDA, 2020). Neste trabalho, os autores compararam a afinidade

de diversos antidepressivos, como bupropiona, duloxetina, nortriptilina, reboxetina e venlafaxina com os dois hNETs (GÓRAL; ŁĄTKA; BAJDA, 2020).

### 1.3 INTERAÇÃO LIGANTE-MACROMOLÉCULA

A comunidade científica está interessada na substituição total ou parcial dos roedores em pesquisas científicas. As pesquisas que buscam validar a mosca como organismo modelo se inserem no contexto da substituição parcial (ARAUJO et al., 2020; NAZARI, 2011; RAMOS-HRYB et al., 2020; THE 3Rs). Além de redução do uso de vertebrados, a padronização de métodos empregando invertebrados pode também resultar no desenvolvimento e aprimoramento de novos compostos úteis para o tratamento da depressão e ansiedade (KOLDSØ; GROULEFF; SCHIØTT, 2015). Identificar as características estruturais e físico-químicas das interações entre as moléculas antidepressivas e o dDAT, reforça o uso deste organismo como modelo experimental (KOLDSØ; GROULEFF; SCHIØTT, 2015).

As características estruturais definem os arranjos espaciais entre um ligante e uma macromolécula, i.e., orientação, posicionamento espacial e rotações do ligante (VERLI, 2014, p. 191). As características físico-químicas estão relacionadas ao grau de afinidade do ligante pela macromolécula e quais ligações intermoleculares existem nesta interação, podendo ser de hidrogênio, van der Waals, eletrostáticas e as ligações covalentes (VERLI, 2014, p. 191). Por causa da dificuldade de se medir as características químicas das interações moleculares *in vivo*, métodos *in vitro* e *in silico* são valiosos para caracterizar e entender a interação entre ligantes e macromoléculas.

Métodos *in vitro* podem ser usados para a determinação do grau de interação e um fármaco e um receptor, por exemplo. A partir destes ensaios se podem calcular valores de constante de inibição ( $K_i$ ) e concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ) (NOEL, 2017, p. 38-39). O valor de  $K_i$  e de  $CI_{50}$  são inversamente proporcionais a afinidade que o fármaco possui pelo receptor (NOEL, 2017, p. 38-39). O  $CI_{50}$  é encontrado mediante estudos de *binding*, onde tem-se um ligante competindo com um ligante radioativo pela ligação no receptor, sendo que o valor de  $CI_{50}$  é determinado pela concentração do ligante necessário para diminuir pela metade a ligação do ligante radioativo pelo receptor (NOEL, 2017, p. 38). Já o  $K_i$  é definido de maneira muito similar ao  $CI_{50}$ , com a diferença de ser um ensaio de inibição e é determinado através do  $CI_{50}$  usando a equação de Cheng-Prussoff (NOEL, 2017, p. 39).

O valor de  $K_i$  também pode ser determinado a partir de estudos *in silico*. A ancoragem molecular, metodologia *in silico* usada para triagem de potenciais novos fármacos, dá

resultados que podem ser transformados em valores de  $K_i$  (NOEL, 2017, p. 44). Ao obtermos o valor de  $K_i$  *in silico*, se faz necessário a comparação com os dados obtidos por *binding*, a fim de validar o quanto os programas puderam reproduzir o que é visto no sistema biológico *in vitro* (NOEL, 2017, p. 44).

#### 1.4 ANCORAMENTO MOLECULAR

O ancoramento molecular, do inglês *molecular docking*, pode ser empregado para identificar as características estruturais e físico-químicas para avaliar as interações moleculares do ligantes e seu alvo (DU et al., 2016, GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014). É caracterizado por ser um método computacional que permite prever a posição, orientação, conformação e em alguns casos, afinidade do ligante e uma macromolécula (DU et al., 2016, GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014, p. 189-190). Este método comumente empregado na triagem virtual de novos fármacos, assim como na descoberta de novos alvos farmacológicos para fármacos já existentes, i.e., no reposicionamento de fármacos, e na compreensão da interação entre a molécula e seu receptor (JAROŃCZYK; WALORY, 2022; PINZI; RASTELLI, 2019).

Existem diversos programas utilizados para fazer ancoragem molecular, cada qual com seu algoritmo de busca e função de pontuação únicos (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 196). A combinação desses dois fatores é responsável por encontrar (algoritmo de busca) e avaliar (função de pontuação) as conformações que o ligante fez na macromolécula (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 196-200). O algoritmo de busca tem por papel encontrar a melhor conformação experimental/conformação bioativa do ligante na macromolécula, como exemplo de algoritmo de busca, pode-se apontar o estocástico (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 196). Este algoritmo gera movimentos aleatórios do ligante na macromolécula, por mais que seja dado ao programa os mesmos parâmetros de entrada, os resultados sempre serão diferentes (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 197).

A função de pontuação, por sua vez, avalia e classifica as conformações geradas pelo algoritmo de busca do ligante na macromolécula, atribuindo um valor a essa interação, e é classificada em três grandes grupos: campo de força, empíricas e baseada em conhecimento (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 199). A função de pontuação campo de força usa as interações atômicas, como van de Waals, eletrostáticas, para avaliar cada interação ligante-macromolécula (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010). Já a função

de pontuação empírica tem por objetivo reproduzir a afinidade do par ligante-macromolécula definida experimentalmente, para tal usa como parâmetro o delta G ( $\Delta G$ ) e o  $W_i$  (GUEDES; PEREIRA; DARDENNE, 2018). Se entende por “par ligante-macromolécula” a ancoragem realizada entre um ligante específico com uma macromolécula específica. O  $\Delta G$  representa a energia da ligação eletrostática, interação de hidrogênio, hidrofobicidade, entre outros, e o  $W_i$  é determinado a partir do conjunto de dados ligante-macromolécula resolvidos experimentalmente (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010). A última função é a baseada em conhecimento, que para estimar o valor da interação da ancoragem, recorre à análise estatística da geometria preferida dos pares de átomos da interação ligante-macromolécula de estruturas tridimensionais resolvidas experimentalmente (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010).

Exemplos de programas de ancoragem molecular são o *Autodock 4*, *Autodock Vina*, *DockThor* e *Gold*. Entre estes os mais populares são o *Autodock 4* e *Autodock Vina*, programas gratuitos e de código aberto (CHEN, 2015). *Autodock 4* usa a função de pontuação empírica (GUEDES; PEREIRA; DARDENNE, 2018). O *Autodock Vina* mistura a função de pontuação baseada em conhecimento com a empírica (TROTT; OLSON, 2010). Também é encontrado o *DockThor*, programa *web* e gratuito, desenvolvido no Brasil, que usa a função de pontuação de campo de força (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Por fim, há o *Gold*, de uso comercial, porém, através do portal CAPES é possível baixá-lo de forma gratuita, e este usa a função de pontuação baseada em conhecimento e campo de força (ELDRIDGE et al., 1977; HUANG; GRINTER; ZOU, 2010). Todos os quatro programas usam o algoritmo de busca estocástico (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014).

Algumas estratégias podem ser adotadas visando aumentar a confiança dos dados obtidos no processo de ancoragem molecular. A primeira delas é usar programas com função de pontuação diferentes, uma vez que cada programa estima o valor da interação ligante-macromolécula de maneiras diferentes (DU et al., 2016, PINZI; RASTELLI, 2019). A segunda estratégia é o ancoramento múltiplo, ou do inglês *ensemble docking*, definido como a ancoragem molecular realizada entre um ligante com todas as macromoléculas cristalizadas de uma mesma estrutura, e tem por objetivo trazer a flexibilidade a macromolécula (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Cada nova cristalização ou resolução de uma macromolécula, gera uma conformação distinta, por mais que se trate da mesma estrutura biológica. Isso ocorre porque no sistema biológico as macromoléculas estão em ambientes fluidos como a membrana plasmática, citoplasma, organelas e, portanto, podem assumir posições diversas no espaço. Além disso, cada cristalização foi realizada com um ligante diferente, ocorrendo uma adaptação da macromolécula pro seu ligante (GUEDES; DE

MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). E por fim, a terceira estratégia é indicada ao se usar programas que possuem algoritmo de busca estocástico, que consiste em repetir a ancoragem mais de uma vez, ou seja, fazer uma amostragem de ancoramentos (VERLI, 2014, p. 197).

### 1.5 CONSENSO DO ANCORAMENTO MOLECULAR

Construir um cenário de múltiplas repetições do ancoramento múltiplo e ainda em múltiplos programas, gera uma grande quantidade de resultados da interação ligante-macromolécula comparada a somente uma ancoragem, com somente uma macromolécula, em somente um programa. Por conta disso, se faz necessário o uso da técnica de consenso do ancoramento, do inglês *consensus docking*, para sintetizar ou combinar essa massa de resultados em um único resultado que represente a interação entre o ligante e a macromolécula (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019). Este valor combinado de resultados de ancoragem molecular para cada interação ligante-macromolécula pode representar a afinidade do ligante pela molécula. Estes valores podem ser usados para se criar, por exemplo, *rankings* ou listas de classificação que representem a ordem e afinidade de uma série de ligantes pela macromolécula (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019).

Na literatura encontramos o cálculo de consenso para o ancoramento múltiplo em múltiplos programas (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019). Para fazer este cálculo, é selecionado um valor da interação ligante-macromolécula por programa, que é o valor que representa a melhor interação, i.e., a maior afinidade, independentemente de qual macromolécula este ancoramento foi realizado (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019). Neste cálculo, os demais valores obtidos são excluídos (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019), eliminando assim, um número grande de dados potencialmente relevantes. Se faz necessário, portanto, um cálculo de consenso que considere todos os dados gerados sem excluir nenhuma macromolécula.

Ao se desenvolver uma nova estratégia de cálculo de consenso da ancoramento, é necessário validá-la (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019). A literatura traz o ancoramento com os falsos ligantes (*decoys*) como método de validação. Este método consiste em ordenar os resultados do ancoramento dos *decoys* e dos ligantes interesses (ligantes verdadeiros) e avaliar se os ligantes verdadeiros são encontrados nas melhores posições da classificação quando comparado aos *decoys* (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019, OCHOA et al., 2021). *Decoys* são estruturas químicas teóricas de substâncias não sintetizadas ou que não foram isoladas de alguma fonte conhecida. Existem programas de computador que podem criar *decoys* a partir do código SMILE dos ligantes verdadeiros (MYSINGER et al., 2012).

Portanto, as estruturas dos *decoys* podem ser semelhantes às dos compostos reais ou conhecidos (MYSINGER et al., 2012). Este método de validação consiste em ordenar os resultados do ancoramento dos *decoys* e dos ligantes interesses (ligantes verdadeiros) e avaliar se os ligantes verdadeiros são encontrados nas melhores posições da classificação quando comparado aos *decoys* (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019, OCHOA et al., 2021). A *receiver-operator-characteristic* (ROC) é uma métrica matemática utilizada para avaliar a capacidade do cálculo de consenso do ancoramento em diferenciar os ligantes de interesse dos *decoys* (JAIN, 2008). Determinada a fração do conjunto de dados que se deseja analisar, é levantada a quantidade dos ligantes de interesse e de *decoys* nesta porção, em posse desse número, aplica-se a fórmula do ROC (HAJIAN-TILAKI, 2013).

## 2. HIPÓTESE

As moléculas de fármacos antidepressivos, independente da classe farmacológica, interagem com o transportador de dopamina da *Drosophila melanogaster*. Porém, os fármacos classificados como inibidores seletivos da recaptação de dopamina têm maior afinidade pelo transportador de dopamina da *Drosophila melanogaster* do que os fármacos de outras classes farmacológicas.

## 3. OBJETIVO GERAL

Descrever as formas e o grau da interação entre as moléculas antidepressivas de várias classes farmacológicas com o transportador de dopamina da *Drosophila melanogaster*.

## 4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.1 Padronizar a metodologia de ancoragem molecular do transportador de dopamina da *D. melanogaster* (dDAT) nos programas *Autodock 4*, *Autodock Vina*, *DockThor* e *Gold*.

4.2 Padronizar a metodologia para combinar os resultados do ancoramento múltiplo em um resultado consensual.

4.3 Padronizar o cálculo de constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico* a partir dos resultados do ancoramento molecular.

4.4 Classificar as moléculas antidepressivas em ordem de afinidade pelo dDAT usando a metodologia de consenso padronizada.

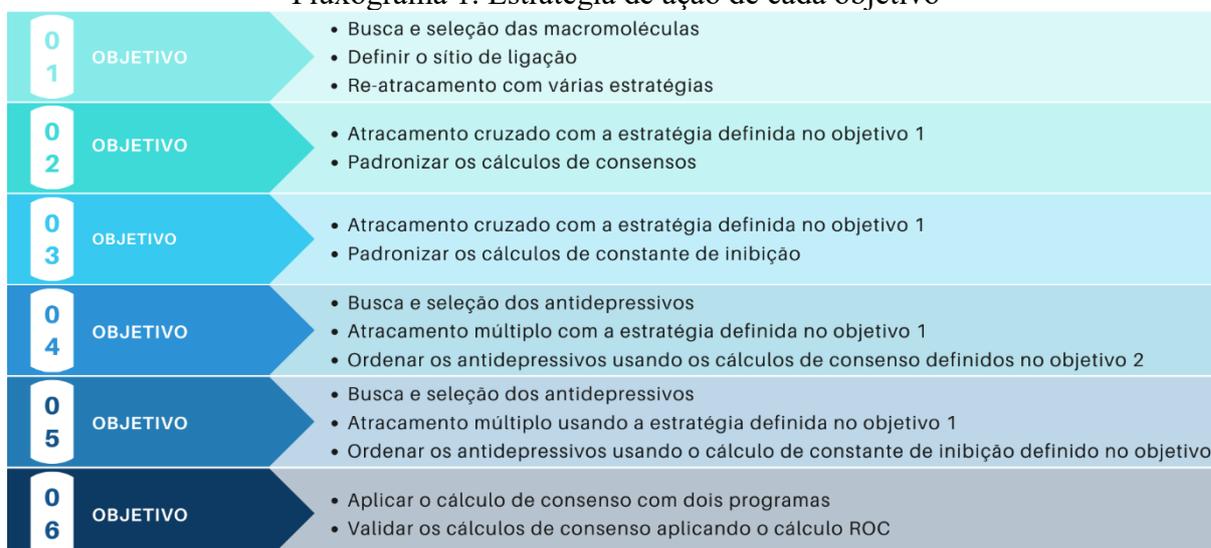
4.5 Classificar as moléculas antidepressivas em ordem de afinidade pelo dDAT usando o cálculo padronização de  $K_i$  *in silico*.

4.6 Validar a metodologia de classificação das moléculas antidepressivas em ordem de afinidade pelo dDAT identificando a contribuição de cada programa de ancoragem e das metodologias de consenso para os resultados.

## 5. ESTRATÉGIA DE AÇÃO

Para cada objetivo, foi usado uma estratégia de ação diferente (Fluxograma 1). No objetivo 1, foi realizado a busca e seleção das macromoléculas (dDATs), definição do sítio de ligação de cada macromolécula, e o teste de diferentes estratégias de ancoragem em cada programa para encontrar a melhor metodologia. A estratégia de ancoragem selecionada no objetivo 1 foi usada para os ancoramentos realizados no objetivo 2, 3, 4 e 5. No objetivo 2 foi padronizado os cálculos de consenso do ancoramento desenvolvidos no presente trabalho, e no objetivo 3 o cálculo da constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*. No objetivo 4 e 5 os cálculos de consenso e o cálculo de  $K_i$  *in silico* padronizado foram usados para ordenar os antidepressivos. No objetivo 6 validou-se a metodologia de classificação das moléculas antidepressivas em ordem de afinidade pelo dDAT identificando a contribuição de cada programa de ancoragem, usando da análise de sensibilidade, e das metodologias de consenso para os resultados, aplicando o cálculo *receiver-operator-characteristic* (ROC). Os métodos, resultados e discussão referentes as etapas de padronização, isto é, objetivos 1-3 estão descritos no Capítulo 1. Os métodos, resultados e discussão referentes as etapas dos testes de hipótese do estudo, isto é, objetivos 4-6 estão descritas no Capítulo 2.

Fluxograma 1. Estratégia de ação de cada objetivo



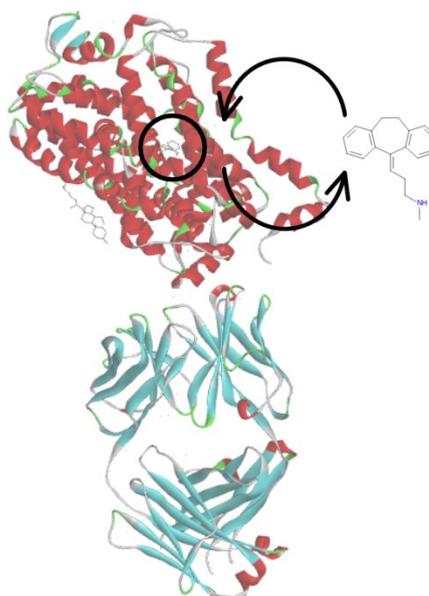
## 6. CAPÍTULO 1: PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DO ANCORAGEM MOLECULAR

O primeiro capítulo é dedicado a padronização do método de ancoragem molecular através do re-ancoramento, do inglês *re-docking*. A padronização do cálculo de consenso e o cálculo de  $K_i$  *in silico*, para ambos será usado no ancoramento cruzado, do inglês *cross-docking*. Portanto, neste capítulo relata-se métodos, resultados e conclusões referentes aos objetivos específicos 1 a 3. Estas etapas são usadas para validação de ancoramentos futuros.

### 6.1 RE-ANCORAMENTO

No re-ancoramento os complexos cristalográficos dDAT e o ligante co-cristalizado são separados e em seguida atracados novamente (MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004) (Figura 1). Apenas os complexos cristalográficos dDATs baixados do PDB foram usados, pois somente eles foram resolvidos juntamente com ligantes.

Figura 1. Representação do re-ancoramento



Legenda: representação do re-ancoramento entre o dDAT, de código PDB 4M48, com o ligante co-cristalizado nortriptilina. O dDAT é a estrutura maior em vermelho e azul. A nortriptilina é a molécula pequena ao lado direito. A seta inferior, que sai do dDAT e chega na nortriptilina, representa o ligante sendo removido, e a seta superior, que sai da nortriptilina e chega ao dDAT, representa o ligante sendo recolocado na macromolécula. Imagem feita pela autora.

O re-ancoramento é comumente usado com o objetivo de padronizar quais serão as configurações usadas na preparação da macromolécula e do ligante antes da ancoragem, e os comandos dados ao programa (MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004). Espera-se

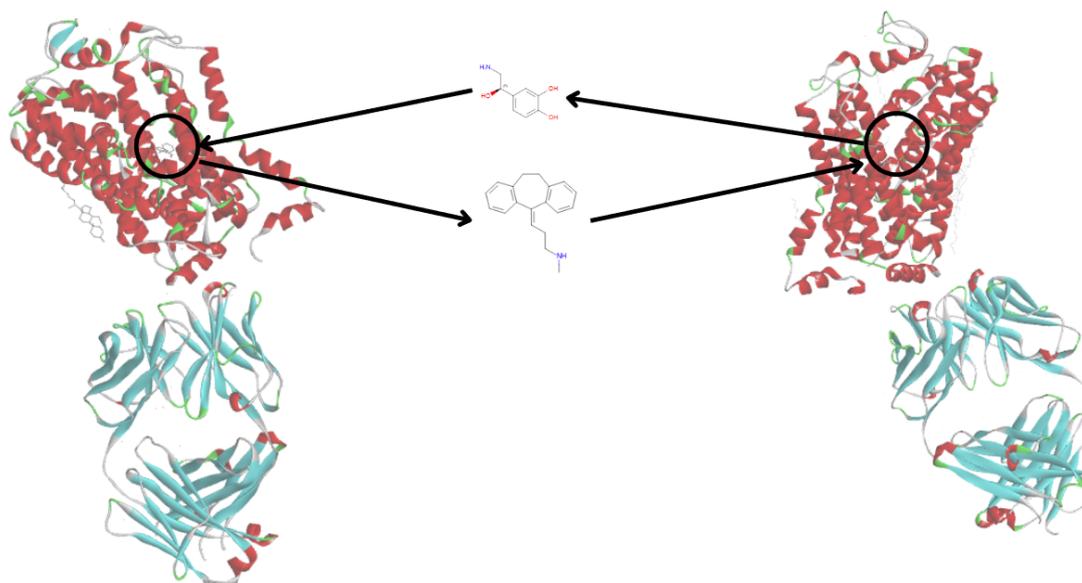
que durante o re-ancoramento o programa consiga posicionar o ligante com conformação similar e no mesmo sítio de ligação em que foi cristalizado com a macromolécula (MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004). Se o programa, com todas as configurações dadas a macromolécula, ao ligante e os comandos do próprio programa, não conseguir reproduzir a conformação original do ligante, esperasse que ele também não conseguirá fazer uma boa ancoragem molecular com ligantes novos (MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004). O processo de re-ancoramento será considerado mais exitoso quanto mais próximo da conformação original for o encaixe do ligante na macromolécula no re-ancoramento (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010). Uma vez padronizada, entende-se que a metodologia é adequada para a ancoragem de ligantes novos, ou seja, ligantes que originalmente não foram cristalizados com aquela macromolécula (MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004).

Ao realizar qualquer ancoragem molecular, é solicitado ao programa que faça várias tentativas de conformação do ligante na macromolécula (VERLI, 2014, p. 189-190). Conformação faz referência a orientação do ligante na macromolécula (VERLI, 2014, p. 189-190). Como resultado, os programas fornecem um valor dessa interação, que pode ser o valor de delta G ( $\Delta G$ ) para os programas *Autodock Vina*, *Autodock 4* e *DockThor*, ou o valor de *fitness* para o programa *Gold*. O  $\Delta G$  é apresentado em valor negativo e o *fitness* em valor positivo, independentemente, quão mais distante de 0 for o valor, melhor é a conformação encontrada (por exemplo:  $\Delta G$  de -10 é melhor que -8, assim como, um *fitness* de 50 é melhor que 40). Com isso, para cada ancoragem ligante-dDAT, foi selecionado a ancoragem que obteve o valor mais distante de 0.

## 6.2 ANCORAMENTO CRUZADO

O método de ancoramento cruzado, consiste em fazer ancoragens entre ligante e macromoléculas não nativas, isto é, consiste em ancorar um ligante de um complexo cristalográfico com a macromolécula de um outro complexo (HUANG; ZOU, 2007) (Figura 2). Esta técnica foi aplicada para obter os dados usados na padronização do novo cálculo de consenso para os ancoramentos múltiplos (explicado mais a diante) e do cálculo de  $K_i$  *in silico*.

Figura 2. Representação do ancoramento cruzado



Legenda: do lado esquerdo da figura está representado o ancoramento cruzado entre o complexo cristalográfico dDAT, de código PDB 4M48, com o ligante noradrenalina (co-cristalizado com o dDAT de código PDB 6M2R). E do lado direito da figura está representado o ancoramento cruzado entre o dDAT, de código PDB 6M2R, com o ligante noradrenalina (co-cristalizado com o dDAT de código PDB 4M48). O dDAT é a estrutura maior em vermelho e azul. A nortriptilina e a noradrenalina são as moléculas pequenas no centro da figura. As setas saem do círculo, representando o dDAT que o ligante foi co-cristalizado, e seguem para o local que será realizado o ancoramento cruzado. Imagem feita pela autora.

## 7. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 RE-ANCORAMENTO

#### 7.1.1 Macromolécula

Os complexos cristalográficos dDATs (Figura 3) foram baixados do banco de dados [RCSB Protein Data Bank](https://www.rcsb.org/) (PDB). Espaço destinado para depósito de complexos cristalográficos de proteínas, DNA, RNA entre outras já resolvidas (cristalizadas).

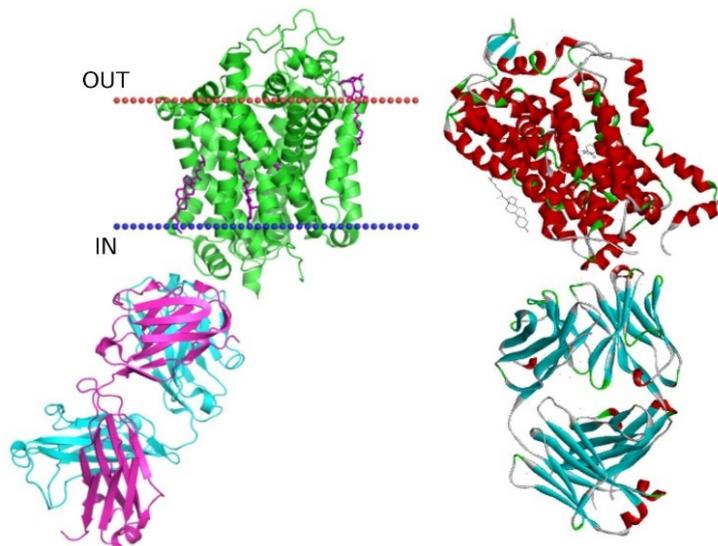
Para encontrar todas os dDATs, foi realizada uma busca avançada na data de 22 de novembro de 2021, no PDB com os seguintes termos de busca: *(Full Text = "dopamine transporter" OR Full Text = "dDAT") AND (Scientific Name of the Source Organism = "Drosophila melanogaster" OR Scientific Name of the Source Organism = "Drosophila")*.

A busca encontrou 1129 os complexos cristalográficos. Destas, apenas os complexos cristalográficos do dDAT sem mutação no sítio de ligação dos ligantes foram selecionadas, resultando em 10 dDATs (Tabela 1). A seleção foi realizada na análise individual de todos os 1129 complexos cristalográficos obtidos na busca.

Uma inspeção visual foi realizada a fim de checar se todos os resíduos de aminoácidos no sítio de ligação dos complexos cristalográficos selecionados estavam presentes. Com isso,

foi confirmado que estava tudo correto com todos os complexos cristalográficos dDATs usados.

Figura 3. Transportador de dopamina da *Drosophila melanogaster*



Legenda: Transportador de dopamina da *D. melanogaster*. No lado esquerdo da figura é representado o dDAT com a linha vermelha representado o lado de fora da membrana (OUT) e na linha azul o lado interno da membrana (IN). Fonte: <https://opm.phar.umich.edu/proteins/6328>. No lado direito o dDAT depositado no PDB de código 4M48, imagem gerada utilizando o *software Discovery Studio*. A parte superior dos dDATs, representado em verde na figura a esquerda e em vermelho na figura da direita, é o transportador propriamente dito. A parte inferior, representado em azul e rosa na figura a esquerda e azul na figura a direita, é o fragmento do anticorpo (Fab).

Tabela 1. dDATs depositados no PDB

Título do dDAT no PDB	Código PDB	Resolução
<i>X-ray structure of dopamine transporter elucidates antidepressant mechanism</i>	<a href="#">4M48</a>	2.96 Å
<i>X-ray structure of a functional <u>Drosophila</u> dopamine transporter in L-norepinephrine bound form</i>	<a href="#">4XNU</a>	2.98 Å
<i>X-ray structure of <u>Drosophila</u> dopamine transporter in complex with reboxetine</i>	<a href="#">4XNX</a>	3.00 Å
<i>X-ray structure of <u>Drosophila</u> dopamine transporter bound to neurotransmitter dopamine</i>	<a href="#">4XP1</a>	2.89 Å
<i>X-ray structure of <u>Drosophila</u> dopamine transporter in complex with cocaine</i>	<a href="#">4XP4</a>	2.80 Å
<i>X-ray structure of <u>Drosophila</u> dopamine transporter bound to cocaine analogue-RTI55</i>	<a href="#">4XP5</a>	3.30 Å
<i>X-ray structure of <u>Drosophila</u> dopamine transporter bound to psychostimulant methamphetamine</i>	<a href="#">4XP6</a>	3.10 Å

<i>X-ray structure of <u>Drosophila</u> dopamine transporter bound to psychostimulant D-amphetamine</i>	<a href="#">4XP9</a>	2.80 Å
<i>X-ray structure of <u>Drosophila</u> dopamine transporter bound to 3,4dichlorophenethylamine</i>	<a href="#">4XPA</a>	2.95 Å
<i>X-ray structure of a functional <u>Drosophila</u> dopamine transporter in L-norepinephrine bound form</i>	<a href="#">6M2R</a>	2.80 Å

Legenda: Transportadores de dopamina da *D. melanogaster* (dDAT) depositados no banco de dados PDB. Na primeira coluna está o título de cada dDAT no PDB, na segunda coluna o código dado pelo PDB para cada dDAT, ao clicar no código você será redirecionado para a página *web* de cada dDAT no PDB.

### 7.1.2 Ligantes

Os ligantes selecionados foram aqueles que vieram originalmente co-cristalizados com os complexos cristalográficos dDAT (Tabela 2). Estes foram baixados com o auxílio do programa *Discovery Studio 2021 client*. O dDAT baixado do PDB, foi aberto no programa *Discovery Studio*, os aminoácidos do transportador e demais moléculas que vieram co-cristalizados foram deletadas e apenas o ligante foi mantido, com isso foi possível salvá-lo em formato .mol.2.

Tabela 2. Ligante co-cristalizado com seu dDAT

<b>Código PDB</b>	<b>Ligante co-cristalizado</b>
<a href="#">4M48</a>	Nortriptilina
<a href="#">4XNU</a>	Nisoxetina
<a href="#">4XNX</a>	Reboxetina
<a href="#">4XP1</a>	Dopamina
<a href="#">4XP4</a>	Cocaína
<a href="#">4XP5</a>	RTI-55
<a href="#">4XP6</a>	Metanfetamina
<a href="#">4XP9</a>	D-anfetamina
<a href="#">4XPA</a>	3,4-dicloro fenetilamina
<a href="#">6M2R</a>	Norepinefrina

Legenda: lista de ligantes co-cristalizados com os dDATs utilizando a técnica de difração de Raio X. Na primeira coluna está o código PDB, ao clicar você terá acesso a página *web* onde pode obter mais informações sobre o dDAT e o ligante. A segunda coluna é o nome do ligante co-cristalizado com o respectivo dDAT.

### 7.1.3 Programas

Os programas selecionados para esta etapa foram: *Autodock 4* v.1.5.6 (MORRIS et al., 2009) e *Autodock Vina* (TROTT; OLSON, 2010), baixados do site: [AutoDock \(scripps.edu\)](http://autodock.scripps.edu). Para facilitar a visualização e configurações aplicadas na macromolécula (dDAT) e nos ligantes, foi utilizado o *Autodock Tools*, que é uma interface gráfica desenvolvida para auxiliar no ancoramento com esses dois programas. Também foi usado o programa *DockThor* (DE MAGALHÃES; BARBOSA; DARDENNE, 2004) - programa *web* gratuito. Por fim, o quarto *software* utilizado foi o *Gold* v. 2021.1.0 (JONES et al., 1997), programa comercial, mas que pode ser baixado via CAPES (acesso CAFE). [Neste vídeo](#) é possível assistir todo processo de instalação dos programas descritos acima.

Para auxiliar na visualização dos resultados gráficos, bem como para auxiliar no *download* dos ligantes e na definição do sítio de ligação, o programa *BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021* foi utilizado, este pode ser adquirido através do *link*: <https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>.

### 7.1.4 Sítio de Ligação

Antes de realizar o ancoramento molecular, é necessário definir o sítio de ligação de interesse, ou seja, local onde os ligantes poderão se ligar na macromolécula. O sítio de ligação foi definido baseado nas coordenadas X, Y e Z do ligante co-cristalizado com seu dDAT, sendo que cada par ligante-dDAT tem uma coordenada única (Tabela 3). Para auxiliar essa busca, o programa *BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021* foi utilizado, porque fornece as coordenadas exatas do ligante na macromolécula.

Para toda molécula que veio co-cristalizado com o dDAT é dado um código, é possível encontrar esse código na página PDB do dDAT na seção “*small molecules*”. Após aberto o dDAT no *Discovery Studio* e encontrado o ligante, com um clique no botão direito do mouse em cima do código do ligante, é possível selecionar a opção “*attributes of* (código do ligante)”. Depois disso, é aberto uma caixa de diálogo com as coordenadas exatas do ligante no dDAT (Figura 4). Clique neste [link](#) para assistir um vídeo no YouTube explicando todo processo de definição do sítio de ligação descrito acima.

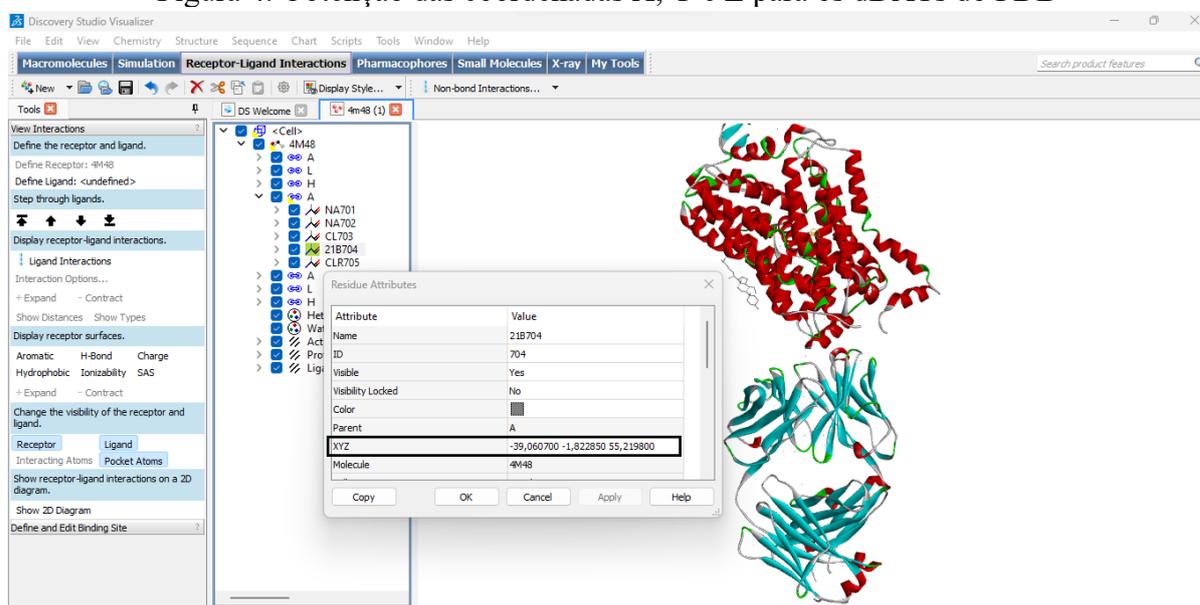
Tabela 3. Coordenadas X, Y e Z

Código PDB - Ligante	Coordenada X	Coordenada Y	Coordenada Z
4M48 - Nortriptilina	-39,060	-1,822	55,219

4XNU - Nisoxetina	-8,939	-1,799	25,790
4XNX - Reboxetina	-9,431	-2,158	27,719
4XP1 - Dopamina	-10,297	3,463	25,513
4XP4 - Cocaína	202,935	283,538	27,466
4XP5 - RTI55-Cocaína	198,814	277,689	27,055
4XP6 - Metanfetamina	-154,392	-143,708	193,219
4XP9 - D-anfetamina	-153,996	-143,080	195,325
4XPA - 3,4-dicloro fenetilamina	-56,880	-142,573	27,657
6M2R - L-norepinefrina	-9,334	2,517	-28,034

Legenda: coordenadas X, Y e Z do sítio de ligação para cada dDAT. Na primeira coluna o código PDB do dDAT – nome do ligante. Nas três colunas subsequentes é o valor da coordenada X, Y e Z, respectivamente.

Figura 4. Obtenção das coordenadas X, Y e Z para os dDATs do PDB



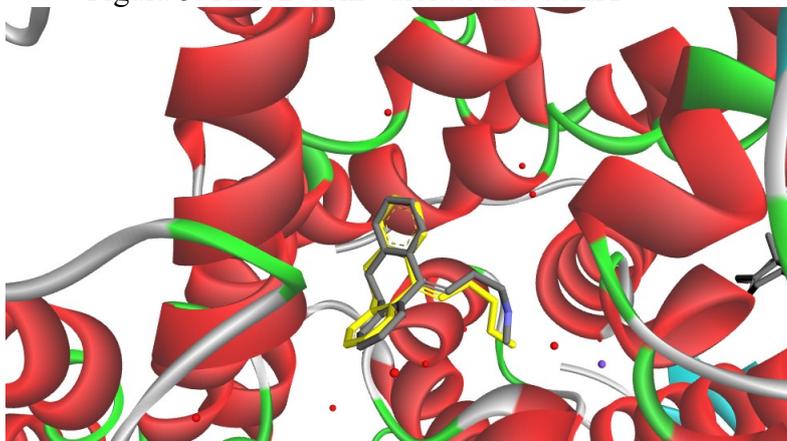
Legenda: captura da tela do programa *Discovery Studio Visualizer*. Uma vez encontrado o código do ligante co-cristalizado no dDAT (na figura o código do ligante é 21B704) e com auxílio do programa, foi realizado um comando simples da busca dos atributos do ligante, gerando a caixa de diálogo “*residue attributes*”, nela é encontrado os valores de X, Y e Z, destacado com o retângulo preto.

### 7.1.5 Estratégias do re-ancoramento

O RMSD foi o parâmetro utilizado para prever a “melhor conformação” de um ligante no sítio de ligação na macromolécula. Quanto maior a similaridade da posição do ligante dentro do sítio na macromolécula no re-ancoramento com a posição de referência, menor o valor o RMSD, conseqüentemente, melhor a conformação (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010). RMSD do inglês significa “*Root Mean Square deviation*”, que é o valor médio

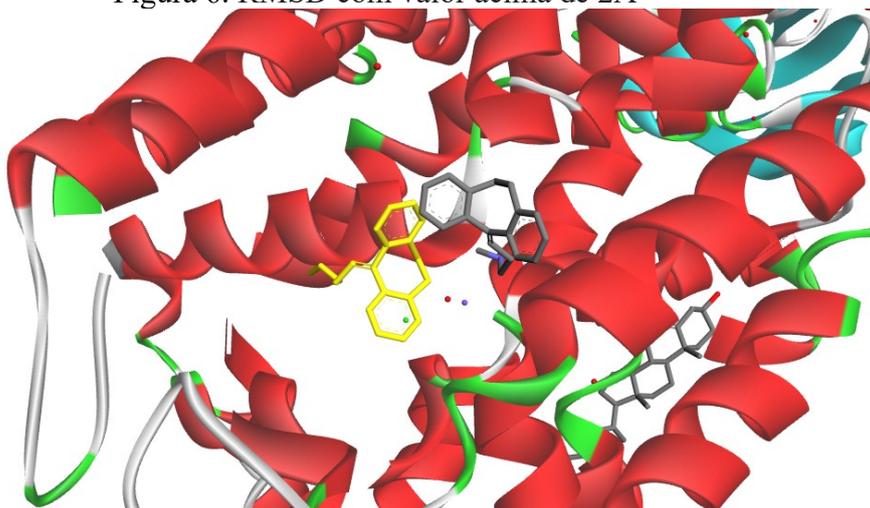
da distância entre os átomos de duas estruturas diferentes (estrutura “A” e estrutura “B”) (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010). A estrutura “A” faz referência a tentativa de conformação do ligante encontrada pelo programa, e a estrutura “B” é a conformação de referência, isto é, a conformação que o ligante veio na cristalização. Quando o valor do RMSD está abaixo de 2 *angstrom* (Å) significa que o programa conseguiu posicionar o ligante na macromolécula de maneira bastante similar à conformação de referência (Figura 5) (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010). E o inverso é verdade para RMSD acima de 2Å (HUANG; GRINTER; ZOU, 2010), como mostrado na figura 6, que o ligante na conformação encontrada no re-ancoramento está em cinza escuro e o ligante na sua conformação originalmente cristalizada em amarelo.

Figura 5. RMSD com valor abaixo de 2Å



Legenda: representação de um RMSD abaixo de 2Å. Em verde, vermelho, azul e branco claro está o dDAT, os cofatores são bolinhas vermelhas, verdes, roxas e a estrutura química cinza ligeiramente escondida no dDAT. No centro, em cinza escuro, o ligante nortriptilina originalmente cristalizado com o dDAT, em amarelo também a nortriptilina, porém, após o re-ancoramento. Re-ancoramento realizado entre o dDAT de código PBD 4M48 no programa *Autodock Vina*. Imagem gerada pela autora.

Figura 6. RMSD com valor acima de 2Å



Legenda: representação de um RMSD acima de 2Å. Em verde, vermelho, azul e branco claro está o dDAT, os cofatores são bolinhas vermelhas, verdes, roxas e a estrutura química cinza ligeiramente escondida no dDAT. No centro, em cinza escuro, o ligante nortriptilina originalmente cristalizado com o dDAT, em amarelo também a nortriptilina, porém, após o re-ancoramento. Re-ancoramento realizado entre o dDAT de código PBD 4M48 no programa *Autodock Vina*. Imagem gerada pela autora.

Nas próximas sessões, é detalhada as estratégias usadas em todos os quatro programas e quais foram as configurações obrigatórias. Clicando sobre o nome de cada documento a seguir, encontra-se os documentos em PDF com o passo-a-passo do ancoramento em cada um dos programas: [Passo-a-Passo \(Re\)Ancoramento \*Autodock Vina\*](#), [Passo-a-Passo \(Re\)Ancoramento \*DockThor\*](#), [Passo-a-Passo \(Re\)Ancoramento \*Gold\*](#). E no *link* a seguir encontrasse uma série de vídeo do YouTube com o passo-a-passo para realizar re-ancoramento em todos os quatro programas: <https://youtube.com/playlist?list=PLGsxz-vlEj3QioZywK5BZzyznLSSazKHB>

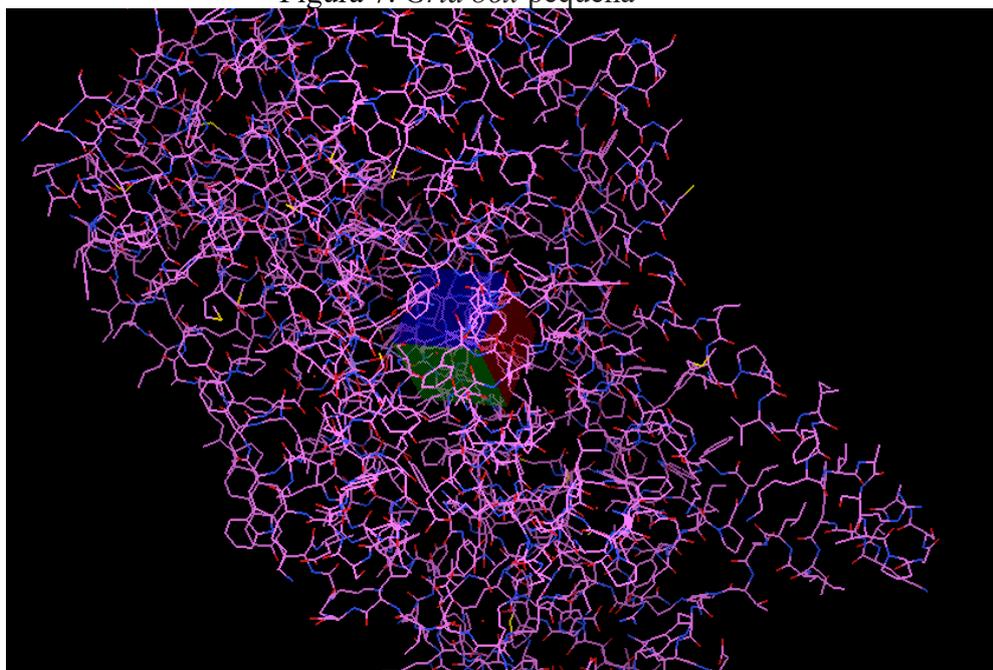
#### 7.1.5.1 *Autodock 4*

Neste programa, os parâmetros usados para modificar a macromolécula, o dDAT foram testados: adição ou não de hidrogênios (uma vez que a proteína vem sem hidrogênios), e das cargas de *Kollman Charges*, remoção ou não das águas de cristalização e demais cofatores que vieram com a cristalização (cloro e colesterol, o sódio foi mantido pois é obrigatório para dar continuidade ao ancoramento). Para os ligantes, foram testadas: manutenção ou remoção das torções (todos os ligantes apresentam torções entre cada molécula química). Foi necessário delimitar na macromolécula o espaço para que o programa posicionasse o ligante, este espaço é denominado *grid box* e possui coordenadas X, Y e Z. Uma *grid box* muito pequena (por exemplo, X=20, Y=20 e Z=20) limita geograficamente as chances do programa em encontrar a “melhor conformação” entre o ligante e a proteína (Figura 7). E uma *grid box* muito grande (por exemplo, X=100, Y=100 e Z=100) aumentam as chances de encontrar a “melhor conformação”, porém, o custo computacional e o tempo necessário para isso aumentam proporcionalmente (Figura 8). Quanto maior é a *grid box* maior também é a quantidade de corridas necessárias para se encontrar a “melhor conformação”. Com isso, o tamanho da *grid box* e a quantidade de corridas dadas ao programa, também foram configurações alteradas. Na tabela 4 encontra-se listada quais estratégias de configuração cada tentativa adotou.

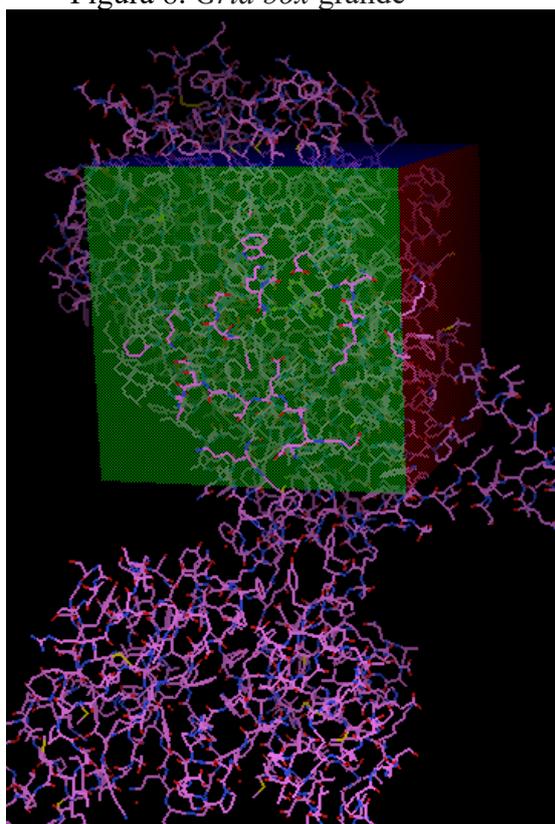
O *Autodock 4* não calcula o RMSD. Então, o cálculo de RMSD dos re-ancoramento foram obtidos com o auxílio do programa *Discovery Studio*. Primeiramente, o par do complexo cristalográfico dDAT-ligante obtido do re-ancoramento foi aberto no programa. Em

seguida, na mesma janela do programa, foi feita a sobreposição ao par anterior com o par dDAT-ligante de referência, i.e., apenas baixado do PDB, sem nenhuma preparação prévia. Para a sobreposição seguiu-se as seguintes etapas: 1- na opção da barra de ferramentas “*Structure*”, clicou-se em “*Suporimpose*”, após em 2- “*Molecule Overlay*”, uma caixa de diálogo é aberta informando que o processo pode demorar um tempo, foi confirmado 3- “*ok*” e esperou-se terminar a sobreposição. 4- Uma vez terminado, na opção “*Structure*” da barra de ferramentas, foi selecionado a opção “*RMSD*” em seguida “*Heavy Metals*”. O valor do RMSD é apresentado com nome de “*RSMD Report*”.

Figura 7. *Grid box* pequena



Legenda: representação de uma *grid box* pequena, com coordenadas X (lado vermelho do cubo), Y (lado verde do cubo) e Z (lado azul do cubo) em 20. Em rosa, azul e vermelho está o dDAT (PDB 4M48). Imagem gerada pela autora.

Figura 8. *Grid box* grande

Legenda: representação de uma *grid box* grande, com coordenadas X (lado vermelho do cubo), Y (lado verde do cubo) e Z (lado azul do cubo) em 100. Em rosa, azul e vermelho está o dDAT (PDB 4M48). Imagem gerada pela autora.

Tabela 4. Estratégias para o *Autodock 4*

Tentativa	Alvo da configuração	Descrição da configuração
1ª tentativa	dDAT	Sem os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	Ligantes	Sem as torções
	Cofatores	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	Outras configurações	<i>Grid box</i> X=100, Y= 100 e Z=100 e 100 corridas
2ª tentativa	dDAT	Com os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	Ligantes	Sem as torções
	Cofatores	Com as águas e sem demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	Outras configurações	<i>Grid box</i> X=100, Y= 100 e Z=100 e 100 corridas
3ª tentativa	dDAT	Sem os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	Ligantes	Sem as torções
	Cofatores	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e

		carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box X=100, Y= 100 e Z=100 e 100 corridas</i>
<b>4ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Com os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	<b>Ligantes</b>	Sem as torções
	<b>Cofatores</b>	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box X=100, Y= 100 e Z=100 e 100 corridas</i>
<b>5ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Com os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	<b>Ligantes</b>	Sem as torções
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (cloro e carboidratos) (a retirada do sódio foi obrigatória)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box X=100, Y= 100 e Z=100 e 100 corridas</i>
<b>6ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Com os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	<b>Ligantes</b>	Com as torções, com a carga <i>Compute Gasteiger</i> e carbono aromático em 7.5°
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box X=100, Y= 100 e Z=100 e 100 corridas</i>

Legenda: listagens das configurações usadas em cada estratégia no programa *Autodock 4*. Na primeira coluna está a numeração da tentativa, na segunda coluna o alvo da configuração e na terceira coluna a descrição da estratégia.

#### 7.1.5.2 *Autodock Vina*

Neste programa, as modificações dos seguintes parâmetros da macromolécula foram testadas: adição ou não dos hidrogênios e adição das cargas de *Kollman Charges*. Para os ligantes, foram mantidas as torções, adicionado as cargas de *Compute Gasteiger* e mantido o carbono aromático em 7.5° (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012). Demais configurações testadas foram manutenção ou remoção das águas de cristalização e dos demais cofatores que vieram com a cristalização (sódio, cloro e colesterol). A *grid box* foi com tamanho de 50 nas três coordenadas (X, Y e Z) e apenas 20 corridas de conformações (limite máximo do programa). Na tabela 5 encontra-se listada quais estratégias de configuração cada tentativa adotou.

O valor do RSMD foi obtido dentro do programa *Autodock Tools* v. 1.7. Como resultado do re-ancoramento é criado um documento de saída com todas as tentativas conformações geradas. Por padrão, o programa *Autodock Vina* sempre ordena as

conformações do melhor valor de delta G para o pior valor de delta G, com isso, apenas a primeira conformação é mantida e as demais excluídas. Em seguida, é adicionado apenas o ligante de referência, que foi apenas baixado do dDAT, sem nenhuma preparação prévia. Ao clicar com o botão direito em qualquer um dos dois ligantes, uma lista de opção é dada, e entre elas está o RMSD. O programa *Autodock Tools* sobrepõe e calcula o valor automaticamente.

Tabela 5. Estratégias para o *Autodock Vina*

Tentativa	Alvo da configuração	Descrição da configuração
1ª tentativa	dDAT	Com os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	Ligantes	Com as torções, com a carga <i>Compute Gasteiger</i> e carbono aromático em 7.5°
	Cofatores	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	Outras configurações	<i>Grid box X=50, Y= 50 e Z=50 e 20 corridas</i>
2ª tentativa	dDAT	Sem os hidrogênios, com a carga <i>Kollman Charges</i>
	Ligantes	Com as torções, com a carga <i>Compute Gasteiger</i> e carbono aromático em 7.5°
	Cofatores	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	Outras configurações	<i>Grid box X=50, Y= 50 e Z=50 e 20 corridas</i>
3ª tentativa	dDAT	Com hidrogênios, carga <i>Kollman Charges</i>
	Ligantes	Com as torções, com a carga <i>Compute Gasteiger</i> e carbono aromático em 7.5°
	Cofatores	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	Outras configurações	<i>Grid box X=50, Y= 50 e Z=50 e 20 corridas</i>

Legenda: listagens das configurações usadas em cada estratégia no programa *Autodock Vina*. Na primeira coluna está a numeração da tentativa, na segunda coluna o alvo da configuração e na terceira coluna a descrição da estratégia.

### 7.1.5.3 DockThor

Neste programa, as modificações dos seguintes parâmetros da macromolécula (dDAT) foram feitas automaticamente pelo programa: adição dos hidrogênios, remoção das moléculas de água, do ligante e dos demais cofatores que vieram com a cristalização. Neste programa, como a remoção de tudo que não é aminoácido na macromolécula é automático, é necessário

adicionar novamente o que se chama por cofator, aqui no caso, águas e demais elementos que vieram co-cristalizados, como sódio, cloro, colesterol e água. A forma de obtenção desses cofatores foi realizada da mesma forma que a obtenção dos ligantes usando o programa *BIOVIA Discovery Studio Visualizer 2021*.

Em relação a preparação dos ligantes, foram feitas tentativas de adicionar ou não os hidrogênios e manter ou remover as torções. Para os ligantes 3,4-Dicloro fenetilamina e D-anfetamina só foi possível seguir com o re-ancoramento sem adicionar os hidrogênios. Por causa disso, o re-ancoramento para esses ligantes não foram feitos sem os hidrogênios. Portanto, a presença dos hidrogênios se tornou uma configuração obrigatória para todos os ligantes neste programa. A *grid box* inicial é de 20Å, tendo sido aumentada para 40Å. A quantidade de corridas (1.000.000) permaneceu a sugerida pelo programa. Na tabela 6 encontra-se listada quais estratégias de configuração cada tentativa adotou.

O valor de RMSD foi obtido no próprio programa *DockThor*. Após o re-ancoramento, na janela de resultados, na opção “*select the parameters for analyses of docking results*”, encontra-se a opção de comparar o resultado com uma conformação de referência (“*Compare docking poses with a reference conformation?*”). Ao selecionar essa opção, basta encontrar o complexo cristalográfico dDAT que deseja comparar e pedir para analisar na caixa “*Analyse*”. Com isso, o programa fará a sobreposição e o cálculo de RMSD automaticamente.

Tabela 6. Estratégias para o *DockThor*

Tentativa	Alvo da configuração	Descrição da configuração
1ª tentativa	dDAT	Sem alteração
	Ligantes	Sem torções, sem hidrogênios
	Cofatores	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	Outras configurações	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas
2ª tentativa	dDAT	Sem alteração
	Ligantes	Sem torções, com hidrogênios
	Cofatores	Com as águas e sem demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	Outras configurações	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas
3ª tentativa	dDAT	Sem alteração
	Ligantes	Sem torções, sem hidrogênios

	<b>Cofatores</b>	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas
<b>4ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Sem alteração
	<b>Ligantes</b>	Sem torções, sem hidrogênios
	<b>Cofatores</b>	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> X=40, Y= 40 e Z=40 e 1.000.000 corridas
<b>5ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Sem alteração
	<b>Ligantes</b>	Sem torções, com hidrogênios
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas
<b>6ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Sem alteração
	<b>Ligantes</b>	Com torções, com hidrogênios
	<b>Cofatores</b>	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas
<b>7ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Sem alteração
	<b>Ligantes</b>	Sem torções, com hidrogênios
	<b>Cofatores</b>	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas
<b>8ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Sem alteração
	<b>Ligantes</b>	Com torções, sem hidrogênios
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas
<b>9ª tentativa</b>	<b>dDAT</b>	Sem alteração
	<b>Ligantes</b>	Sem torções, sem hidrogênios
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras</b>	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas

configurações		
10 <sup>a</sup> tentativa	<b>dDAT</b>	Sem alteração
	<b>Ligantes</b>	Com torções, com hidrogênios
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> X=20, Y= 20 e Z=20 e 1.000.000 corridas

Legenda: listagens das configurações usadas em cada estratégia no programa *DockThor*. Na primeira coluna está a numeração da tentativa, na segunda coluna o alvo da configuração e na terceira coluna a descrição da estratégia.

#### 7.1.5.4 Gold

Neste programa, a modificação dos seguintes parâmetros do complexo cristalográfico dDAT foram feitas: adição ou remoção das moléculas de água, do ligante e dos demais cofatores que vieram com a cristalização. A adição dos hidrogênios foi obrigatória neste programa, pois estes são utilizados para o cálculo do *fitness* (GOLD User Guide). Assim, esta configuração passou a ser obrigatória em todos os programas. Para os ligantes foi usada a estratégia de manter ou remover as torções. Diferentemente do *Autodock 4* e *Autodock Vina*, no *Gold* a *grid box* é medida em angstrom (Å), a medida padrão é 10Å, foi aumentado para 35Å. Os cofatores e as águas foram mantidos ou removidos. Por fim, o cálculo do *fitness* depende do *score* escolhido, para o re-ancoramento o *score* utilizado foi o *ChemScore*, como sugerido no manual. Na tabela 7 encontra-se listada quais estratégias de configuração cada tentativa adotou.

O valor de RMSD foi calculado dentro do programa *Gold*. Durante o processo de re-ancoramento, na etapa de adicionar o ligante, encontra-se a opção “*Reference ligand*”, aqui, é possível adicionar o ligante de referência. O programa fará a sobreposição e o cálculo de RMSD automaticamente.

Tabela 7. Estratégias para o *Gold*

Tentativa	Alvo da configuração	Descrição da configuração
1 <sup>a</sup> tentativa	<b>dDAT</b>	Com hidrogênios, sem torção
	<b>Ligantes</b>	Sem torção
	<b>Cofatores</b>	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> em 35Å e 20 corridas

2 <sup>a</sup> tentativa	<b>dDAT</b>	Com hidrogênios, sem torção
	<b>Ligantes</b>	Sem torção
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e sem demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> em 35Å e 20 corridas
3 <sup>a</sup> tentativa	<b>dDAT</b>	Com hidrogênios, sem torção
	<b>Ligantes</b>	Sem torção
	<b>Cofatores</b>	Sem as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> em 10Å e 20 corridas
4 <sup>a</sup> tentativa	<b>dDAT</b>	Com hidrogênios, sem torção
	<b>Ligantes</b>	Sem torção
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> em 35Å e 20 corridas
5 <sup>a</sup> tentativa	<b>dDAT</b>	Com hidrogênios, sem torção
	<b>Ligantes</b>	Com torção
	<b>Cofatores</b>	Com as águas e demais cofatores (sódio, cloro e carboidratos)
	<b>Outras configurações</b>	<i>Grid box</i> em 35Å e 20 corridas

Legenda: listagens das configurações usadas em cada estratégia no programa *Gold*. A primeira coluna é a numeração da tentativa, na segunda coluna o alvo da configuração e na terceira coluna a descrição da estratégia.

## 7.2 ANCORAMENTO CRUZADO

Nesta etapa, além complexos cristalográficos dDATs baixadas do PDB, fez-se uso também uma estrutura do dDAT construída computacionalmente e depositada no banco de dados [Alpha Fold Protein Structure Database](#), espaço destinado para depósito de predição de estruturas ainda não resolvidas ou construídas por meio de homologia. Para isso, foi realizada uma busca no *Alpha Fold* com a frase “*dopamine transporter drosophila melanogaster*”, na data de 05 de janeiro de 2022, retornando 26985 estruturas. A primeira opção foi a selecionada (Tabela 8). Todos os 10 dDATs baixados do PDB foram usados nesta etapa, totalizando 11 estruturas de dDATs.

Tabela 8. dDAT depositado no *Alpha Fold*


---

**Título do transportador de dopamina no *AlphaFold***

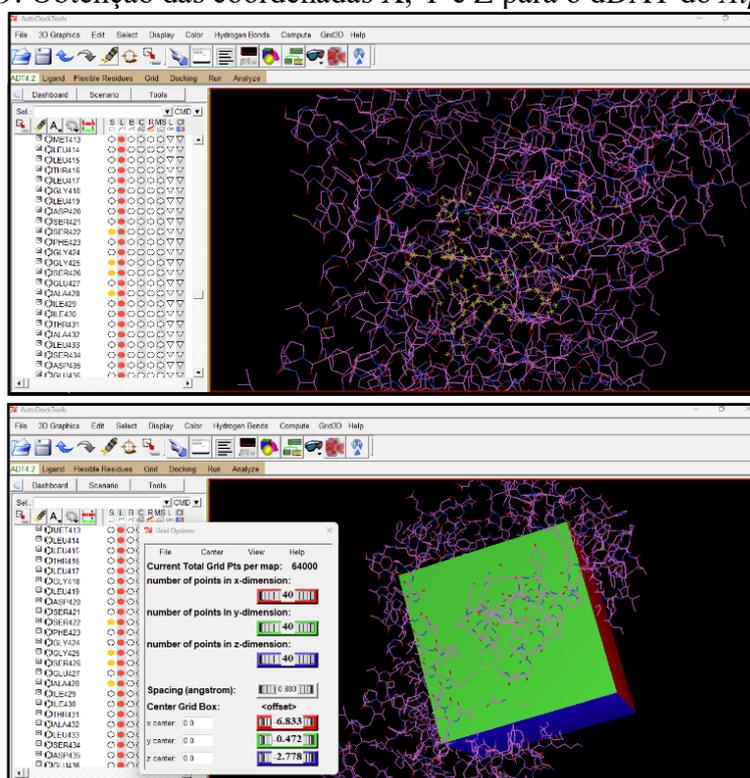

---

[Sodium-dependent dopamine transporter](#)

---

Legenda: Transportador de dopamina da *D. melanogaster* (dDAT) depositado no *Alpha Fold Protein Structure Database*. Ao clicar no título você será redirecionado a página *web* do dDAT do *AlphaFold*.

Para encontrar o sítio de ligação do dDAT baixado do *AlphaFold*, foi utilizada uma metodologia diferente daquelas usadas para as macromoléculas cristalizadas. Em posse dos aminoácidos mais frequentes no sítio de ligação dos 10 dDAT baixados do PDB, de maneira visual e com o auxílio do *Autodock Tools*, delimitamos a região do sítio de ligação selecionando os aminoácidos (Figura 9). Sendo os aminoácidos selecionados: PHE43, ALA44, ASP46, ALA117, VAL120, ASP121, TYR123, TYR124, PHE319, SER320, GLY322, PHE325, SER421, SER422, GLY425, SER426, ALA428, ALA479.

Figura 9. Obtenção das coordenadas X, Y e Z para o dDAT do *Alpha Fold*

Legenda: captura das telas do programa *Autodock Tools* representando da obtenção das coordenadas X, Y e Z do sítio de ligação do dDAT baixado do *Alpha Fold*. O dDAT é a estrutura em rosa com fundo preto. Os aminoácidos mais frequentes estão destacados pela bolinha amarela selecionada no canto esquerdo da figura e pelos sinais de + no dDAT. A parte superior da figura representa a seleção dos aminoácidos mais frequentes no sítio de ligação dos dDATs baixados do PDB. Na parte inferior estão as coordenadas exatas, bem como o tamanho da *grid box*, representada pela caixa de diálogo “*grid Options*”. Ainda na parte inferior da figura, no dDAT é possível ver a *grid box* em verde, azul e vermelha. Imagem gerada pela autora.

Tabela 9. Coordenada X, Y e Z

dDAT	Coordenada X	Coordenada Y	Coordenada Z
<i>AlphaFold</i>	-6,833	-0,472	-2,778

Legenda: coordenadas X, Y e Z do sítio de ligação do dDAT baixado do *Alpha Fold*.

O sítio de ligação dos dDATs resolvidos permaneceu o mesmo definido no re-ancoramento. Como na etapa anterior, foram usados todos os 10 ligantes co-cristalizados (Tabela 2). Os programas usados, assim como as configurações aplicadas na macromolécula, no ligante e no programa, foram definidas na etapa anterior de re-ancoramento. Sendo os programas usados *Autodock Vina*, com a tentativa escolhida 3, *DockThor* com a tentativa escolhida 10 e *Gold* com a tentativa escolhida 5.

### 7.2.1 Consenso do ancoramento

Na metodologia de consenso do ancoramento, do inglês *consensus docking*, se aplica fórmulas matemáticas para combinar os resultados de múltiplos ancoramentos em um único resultado. Este resultado consensual ou consenso, pode ser usado para classificar os ligantes em ordem de afinidade pela macromolécula (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019).

#### 7.2.1.1 Consenso do ancoramento e lista de classificação ECR

Palacio-Rodríguez et al. (2019) desenvolveram a fórmula *exponencial consensus ranking* (ECR) (Fórmula 1) como uma alternativa para os cálculos de consenso até então utilizados para estudos que fazem ancoramentos com mais de uma macromolécula (*ensemble-docking*), em mais de um programa. Com esta forma de cálculo de consenso, é possível combinar os resultados dos ancoramentos relatados em unidades de medida diferentes, como por exemplo,  $\Delta G$  e *fitness*.

$$\text{Fórmula 1: } P_{i,\lambda} = \frac{1}{\sigma} \sum_{j=1}^p \exp\left(-\frac{P_{i,\lambda}^j}{\sigma}\right) = a_{i,\lambda}$$

Sendo que:

- $P(i, \lambda)$  é a posição final da interação entre um ligante ( $i$ ) e uma macromolécula ( $\lambda$ ) específicas;
- sigma ( $\sigma$ ) tem valor fixo de 10, como sugerido no artigo de Palacio-Rodríguez et al. (2019);

- “exp” tem valor de 2,718, que tem papel de equilibrar resultados de  $\Delta G$  ou *fitness* muitos discrepantes;
- os índices “ $\lambda$ ”, “ $i$ ”, “ $j$ ”, indicam a macromolécula, o ligante, e o programa respectivamente;
- o elemento “ $P_{i,\lambda}^j$ ” faz referência a posição ( $P$ ) que um ligante ( $i$ ) específico obteve da interação com a macromolécula ( $\lambda$ ) específico, em um programa ( $j$ ) específico;
- Por fim, o “ $a_{i,\lambda}$ ” é o valor final de ECR da que cada par de interação ligante-dDAT.

No método apresentado pelos autores Palacio-Rodríguez et al., (2019), o cálculo é feito em duas etapas. Na primeira, construiu-se uma tabela por programa, onde se anota o valor de  $\Delta G$  ou *fitness* obtido do ancoramento de cada par ligante-dDAT (Figura 10). A partir do valor de  $\Delta G$  ou *fitness*, os ligantes foram ordenados em uma lista de classificação de acordo com o grau de interação com cada complexo cristalográfico dDAT específico (Figura 10). Neste caso, a 1ª posição na lista representa a melhor interação e a última posição a pior interação.

Na segunda etapa usa-se o “*ranking* mínimo”, ou seja, a melhor interação que cada ligante obteve, independentemente de qual macromolécula foi feito o ancoramento que encontrou a melhor interação, para aplicar na fórmula ECR (Fórmula 1) (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019) (Figura 10). Como exemplo, é possível ver na figura 10 o ligante cocaína-RTI55. A cocaína-RTI55 foi atracado com os 11 dDATs no programa *Gold*, e obteve a 1ª, 3ª, 6ª, 8ª, 9ª e 10ª posição. Nota-se que, a 1ª posição aconteceu somente uma vez, sendo que em quatro ancoramentos o ligante esteve na 10ª posição - a 10ª posição teve maior frequência. Mesmo assim, a 1ª posição foi selecionada para o cálculo ECR. Desta maneira, o cálculo de consenso ECR é aplicado para cada ligante com três valores, cada valor extraído de um programa.

O valor final do cálculo de ECR reflete a afinidade que o ligante possui pela macromolécula (Figura 11). Daqui em diante neste texto, ao se referir ao cálculo de consenso ECR da Palacio-Rodríguez et al., (2019), usa-se o termo “consenso ECR”. Também neste texto, a lista de classificação final obtida usando o cálculo de consenso ECR é chamada de “lista de classificação ECR”. A lista de classificação ECR tem escala ordinal (1, 2, 3, 4...), isto é, representa simplesmente a força das interações entre ligante e macromolécula (melhor para pior interação) e não o tamanho da diferença entre cada uma destas interações.

Figura 10. Representação da etapa 1 para o consenso de Palacio-Rodríguez et al., (2019)

	4M48		4XNU		4XNX		4XPI		4XPJ		4XP5		4XP6		4XP9		4XPV		6M2R		AlphaFold		Ranking
	Fitness	Ranking	Fitness	Ranking	Minimum																		
3,4dicloro fenetilamina	48,2	6	47,2	9	48,2	5	53,2	7	55,5	6	59,5	4	62,4	1	55,8	3	67,3	1	47,2	7	51,6	5	1
Cocaína	49,9	5	47,6	8	49,1	4	58,4	1	65,1	3	50,7	10	51,0	8	49,1	7	12,9	10	48,2	5	56,3	4	1
Cocaína RTI55	43,8	8	48,9	6	42,9	10	43,7	10	65,6	1	62,0	3	47,2	10	43,4	10	19,8	9	43,6	9	51,0	6	1
D-anfetamina	42,0	10	42,6	10	43,2	9	53,0	9	49,8	10	51,9	9	48,3	9	49,0	8	54,5	6	42,5	10	46,6	10	6
Dopamina	52,7	4	52,5	4	47,3	6	53,3	6	51,9	8	56,2	6	57,7	3	50,3	6	60,4	3	47,3	6	46,9	9	3
L-norepinefrina	42,2	9	51,3	5	45,7	7	55,4	3	54,1	7	55,0	8	52,3	7	46,5	9	62,8	2	49,4	4	50,4	7	2
Metanfetamina	47,2	7	48,0	7	45,7	8	54,1	5	51,7	9	55,7	7	56,8	4	54,2	4	57,4	4	45,0	8	49,3	8	4
Nixosetina	53,6	3	63,8	2	54,3	3	55,1	4	62,6	5	62,4	2	61,8	2	58,6	2	51,1	7	58,9	2	64,4	2	2
Nortriptilina	61,2	2	62,9	3	64,6	1	53,1	8	65,2	2	64,8	1	56,6	5	53,9	5	54,6	5	64,1	1	61,0	3	1
Reboxetina	67,2	1	69,6	1	63,8	2	55,7	2	64,1	4	58,6	5	55,0	6	59,9	1	34,9	8	57,3	3	67,0	1	1

Legenda: captura da tela da tabela com os resultados do ancoramento no programa *Gold*. Na primeira coluna estão os ligantes, seguido pelo valor de *fitness* e a classificação com a posição que os ligantes obtiveram da interação com cada dDAT. No fim da tabela, na última coluna, está o valor mínimo obtido pelo ligante com os dDATs.

Figura 11. Valor de ECR obtido do cálculo de consenso de Palacio-Rodríguez et al., (2019)

dDAT/Ligand	ECR	
	ECR	Ranking
3,4dicloro fenetilamina	0,218	4
Cocaína	0,263	2
Cocaína RTI55	0,271	1
D-anfetamina	0,170	8
Dopamina	0,196	6
L-norepinefrina	0,213	5
Metanfetamina	0,191	7
Nixosetina	0,246	3
Nortriptilina	0,271	1
Reboxetina	0,271	1

Legenda: captura da tela da tabela com o resultado do cálculo de ECR (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019). Na primeira coluna estão os ligantes, seguido pelo valor de ECR e o classificação que o ligante obteve da interação com o dDAT. Essa classificação expressa afinidade dos ligantes pelos dDATs, sendo o número 1 a melhor afinidade.

### 7.2.1.2 Consenso do ancoramento e lista de classificação ECR+MS

Quando se escolhe fazer o ancoramento múltiplo, se quer adicionar variabilidade nas macromoléculas para tornar o ancoramento mais similar a um contexto *in vivo* (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Entretanto, no cálculo de consenso ECR (PALACIO-RODRÍGUEZ et al., 2019), essa variabilidade é diminuída ao selecionar apenas a melhor posição que cada ligante obteve por programa para o cálculo de consenso.

Diante disso, foi desenvolvido dois novos cálculos de consenso descritos a seguir (consenso ECR+MS) e na seção seguinte (consenso FL+ECR+MS). Estas variações de cálculo ECR foi para aumentar a variabilidade buscada ao escolher o método de ancoramento múltiplo. A seguir, explica-se o cálculo em três etapas: 1- a primeira etapa é a tabulação dos dados, feita de duas formas diferentes; 2- a segunda etapa é a aplicação do cálculo ECR usando os dados tabulados na etapa 1; 3- e a terceira etapa é a aplicação da média simples (MS) com os resultados obtidos na etapa 2 para encontrar a lista de classificação final dos ligantes pelo dDAT.

Na primeira etapa, a tabulação dos resultados, testou-se duas formas de classificar os ligantes.

A primeira forma de classificar os ligantes é praticamente idêntica à etapa 1 do cálculo de consenso ECR, e usa a ordenação ordinal (Figura 12). Note que, há uma diferença entre o cálculo ECR para o que está sendo apresentado, a diferença está em não criar o “*ranking* mínimo”, ou seja, não é do interesse saber qual a melhor posição obtida pelo ligante quando interagido com os dDATs.

Daqui em diante neste texto, ao se referir a este novo cálculo de consenso, usa-se o termo “consenso ECR+MS”. ECR+MS são as fórmulas usadas e sua sequência, primeiro é usado a fórmula ECR dada por Palacio-Rodríguez et al., (2019), após a fórmula da MS. Também neste texto, a lista de classificação final obtida usando o cálculo de consenso ECR+MS é chamada de “lista de classificação ECR+MS”. A lista de classificação ECR+MS tem escala ordinal, isto é, representa simplesmente a ordem das interações entre o ligante com a macromolécula (melhor para pior interação) e não o tamanho da diferença entre cada uma destas conformações médias.

Figura 12. Representação da etapa 1 para o consenso ECR+MS

	4M48		4XNU		4XNX		4XPI		4XP4		4XP5		4XP6		4XP9		4XPA		6M2R		AlphaFold	
	Delta G	Ranking	Delta G	Ranking																		
3,4-dicloro fenetilamina	-6.0	7	-6.0	7	-6.1	7	-5.6	8	-6.8	4	-6.8	7	-6.7	3	-5.3	3	-6.5	6	-6.1	8	-6.6	4
Cocaína	-8.4	3	-8.4	2	-8.5	3	-7.9	2	-9.0	2	-8.7	2	-8.0	2	-6.9	2	-7.3	2	-8.2	3	-8.1	1
Cocaína RT155	-7.6	5	-7.7	4	-7.5	5	-7.1	3	-9.6	1	-7.9	4	-7.7	3	-6.5	3	-6.9	4	-7.9	4	-7.6	2
D-alfetamina	-6.0	7	-5.9	8	-5.9	9	-6.2	6	-6.4	7	-6.7	8	-6.2	8	-5.3	7	-6.8	5	-5.8	10	-6.2	5
Dopamina	-6.3	6	-6.1	6	-6.2	6	-6.9	4	-6.5	6	-6.9	6	-6.5	7	-5.5	5	-5.9	8	-6.2	7	-5.9	7
L-norepinefrina	-6.3	6	-6.2	5	-6.1	7	-6.8	5	-6.6	5	-6.9	6	-6.6	6	-5.4	6	-7.5	1	-6.3	6	-6.2	5
Metanfetamina	-6.0	7	-6.0	7	-6.0	8	-6.1	7	-6.4	7	-6.6	9	-6.1	9	-5.3	7	-7.0	3	-6.0	9	-6.1	6
Nicossatina	-8.1	4	-7.7	4	-8.1	4	-7.1	3	-6.6	5	-7.6	5	-8.0	2	-6.4	4	-6.3	7	-7.7	5	-6.2	5
Nortriptilina	-10.1	1	-9.6	1	-9.9	1	-8.2	1	-8.7	3	-8.1	3	-8.3	1	-7.3	1	-7.5	1	-9.7	1	-7.0	3
Reboxetina	-8.7	2	-8.3	3	-8.8	2	-7.1	3	-6.6	5	-8.8	1	-7.5	4	-6.9	2	-6.9	4	-8.7	2	-7.0	3

Legenda: captura da tela da tabela com os resultados do ancoramento no programa *Autodock Vina*. Na primeira coluna estão os ligantes, seguido pelo valor de *fitness* ou  $\Delta G$  (para esta figura) e a posição que os ligantes obtiveram da interação com cada dDAT.

### 7.1.2.3 Consenso do ancoramento e lista de classificação FL+ECR+MS

Usando a maneira de ranqueamento ordinal apresentado no consenso ECR e ECR+MS, são perdidas as diferenças que existem entre os valores dos elementos ordenados. No ranqueamento ordinal, entende-se que o tamanho do intervalo entre os elementos X e Y é igual ao intervalo entre os elementos Y e Z, e assim por diante. Porém, essa norma nem sempre é verdadeira, distorcendo a interpretação dos dados. Para corrigir esta distorção, testou-se uma segunda forma de classificar os ligantes, usando uma função linear (FL). Desta maneira, se o elemento X tiver uma afinidade muito maior que o elemento Y, a distância entre os elementos será maior, assim como, se a afinidade entre o elemento Y e Z for baixa, a diferença do resultado da função linear, será menor. Os cálculos com a função linear geram

resultados que escala linear que variam entre 0 e 1, sendo o 0 o resultado de melhor valor (maior afinidade) e o 1 o de pior valor (menor afinidade) (Figura 13).

Neste texto, esta maneira de cálculo de consenso foi nomeada como “consenso FL+ECR+MS”. Também neste texto, a lista de classificação obtida usando o cálculo de consenso FL+ECR+MS é chamada de “lista de classificação FL+ECR+MS”. A lista de classificação FL+ECR+MS tem escala linear, isto é, uma escala numérica com a ordem e o tamanho das diferenças entre as interações entre o ligante e a macromolécula (melhor para pior interação) conhecidas.

A fórmula da FL é apresentada a seguir. Para os programas *Autodock Vina* e *DockThor* que expressam o  $\Delta G$  em valor negativo, foi aplicado a seguinte fórmula (Fórmula 2):

$$\text{Fórmula 2: } f(x) = \frac{x - \min}{\max - \min}$$

Para o programa *Gold* que apresenta valor de *fitness* positivo, foi aplicado a seguinte fórmula (Fórmula 3):

$$\text{Fórmula 3: } f(x) = \frac{x - \max}{\min - \max}$$

Considerando como “x” o resultado ( $\Delta G$  ou *fitness*) obtido da interação. O “min” é o  $\Delta G$  ou *fitness* de menor valor, e o “max” o  $\Delta G$  ou *fitness* de maior valor.

Figura 13. Representação da etapa 1 para o consenso FL+ECR+MS

	4M48		4XNU		4XNX		4XP1		4XP4		4XP5		4XP6		4XP9		4XPA		6M2R		AlphaFold	
	Delta G	Ranking	Delta G	Ranking																		
3,4-dicloro fenetilamina	-6.0	1.000	-6.0	0.973	-6.1	0.950	-5.6	1.000	-6.8	0.875	-6.8	0.909	-6.7	0.727	-5.5	0.900	-6.5	0.625	-6.1	0.923	-6.6	0.682
Cocaina	-8.4	0.415	-8.4	0.324	-8.5	0.350	-7.9	0.115	-9.0	0.188	-8.7	0.045	-8.0	0.136	-6.9	0.200	-7.3	0.125	-8.2	0.385	-8.1	0.000
Cocaina RT155	-7.6	0.610	-7.7	0.514	-7.5	0.600	-7.1	0.423	-9.6	0.000	-7.9	0.409	-7.7	0.273	-6.5	0.400	-6.9	0.375	-7.9	0.462	-7.6	0.227
D-anfetamina	-6.0	1.000	-5.9	1.000	-5.9	1.000	-6.2	0.769	-6.4	1.000	-6.7	0.955	-6.2	0.955	-5.3	1.000	-6.8	0.438	-5.8	1.000	-6.2	0.864
Dopamina	-6.3	0.927	-6.1	0.946	-6.2	0.925	-6.9	0.500	-6.5	0.969	-6.9	0.864	-6.5	0.818	-5.5	0.900	-5.9	1.000	-6.2	0.897	-5.9	1.000
L-norepinefrina	-6.3	0.927	-6.2	0.919	-6.1	0.950	-6.8	0.538	-6.6	0.938	-6.9	0.864	-6.6	0.773	-5.4	0.950	-7.5	0.000	-6.3	0.872	-6.2	0.864
Metanfetamina	-6.0	1.000	-6.0	0.973	-6.0	0.975	-6.1	0.808	-6.4	1.000	-6.6	1.000	-6.1	1.000	-5.3	1.000	-7.0	0.313	-6.0	0.949	-6.1	0.909
Nitrosetina	-8.1	0.488	-7.7	0.514	-8.1	0.450	-7.1	0.423	-6.6	0.938	-7.6	0.545	-8.0	0.136	-6.4	0.450	-6.3	0.750	-7.7	0.513	-6.2	0.864
Nortriptilina	-10.1	0.000	-9.6	0.000	-9.9	0.000	-8.2	0.000	-8.7	0.281	-8.1	0.318	-8.3	0.000	-7.3	0.000	-7.5	0.000	-9.7	0.000	-7.0	0.500
Reboxetina	-8.7	0.341	-8.3	0.351	-8.8	0.275	-7.1	0.423	-6.6	0.938	-8.8	0.000	-7.5	0.364	-6.9	0.200	-6.9	0.375	-8.7	0.256	-7.0	0.500

Legenda: captura da tela da tabela com os resultados do ancoramento no programa *Autodock Vina*. Na primeira coluna estão os ligantes, seguido pelo valor de *fitness* ou  $\Delta G$  (para esta figura) e a classificação que varia de 0,00 a 1,000 que os ligantes obtiveram da interação com cada dDAT.

Após ordenados os ligantes, a segunda e terceira etapa foram idênticas para as duas formas de consenso ECR+MS e FL+ECR+MS. Na segunda etapa se faz o consenso entre os programas sobre o valor da interação de cada par ligante-dDAT. Para tal, foi usado a fórmula *exponential consensus ranking* (ECR), apresentada por Palacio-Rodríguez et al. (2019)

(Fórmula 1). Para a fórmula ECR usa-se a posição que o ligante obteve, independentemente da forma como eles foram ordenados (ordinal ou linear). O objetivo é fazer uma média exponencial entre as posições obtidas da interação de cada par ligante-dDAT mudando apenas o programa que fornece o resultado entre essa interação. O cálculo será feito com três valores, um valor extraído de cada programa. Aplicada a fórmula ECR, o produto final é um valor da interação entre cada par ligante-dDAT (Figura 14). O elemento “programa” é resolvido.

Figura 14. Representação da etapa 2 dos consensos ECR+MS e FL+ECR+MS

dDAT/Ligand	4M48	4XNU	4XNX	4XP1	4XP4	4XP5	4XP6	4XP9	4XPA	6M2R	AlphaFold
	ECR										
3,4dicloro fenetilamina	0,165	0,151	0,171	0,144	0,183	0,172	0,212	0,195	0,200	0,155	0,188
Cocaína	0,209	0,194	0,215	0,239	0,238	0,201	0,182	0,186	0,193	0,209	0,212
Cocaína RTI55	0,187	0,212	0,179	0,185	0,271	0,215	0,193	0,185	0,168	0,190	0,204
D-anfetamina	0,136	0,131	0,131	0,140	0,136	0,135	0,135	0,144	0,165	0,123	0,152
Dopamina	0,167	0,167	0,155	0,177	0,137	0,150	0,169	0,160	0,164	0,149	0,135
L-norepinefrina	0,132	0,158	0,136	0,175	0,151	0,137	0,145	0,136	0,209	0,163	0,151
Metanfetamina	0,140	0,140	0,131	0,147	0,135	0,135	0,144	0,153	0,182	0,122	0,149
Nixosetina	0,196	0,204	0,196	0,202	0,176	0,203	0,231	0,216	0,166	0,197	0,224
Nortriptilina	0,239	0,239	0,248	0,217	0,223	0,232	0,225	0,233	0,242	0,248	0,222
Reboxetina	0,263	0,246	0,254	0,246	0,202	0,242	0,212	0,263	0,194	0,246	0,255

Legenda: captura da tela da tabela com os resultados ao aplicar a fórmula do ECR (Fórmula 1) para cada par ligante-dDAT. Na primeira coluna estão os ligantes, seguido pelo resultado da fórmula ECR que os ligantes obtiveram da interação com cada dDAT.

Na terceira e última etapa, se faz o consenso entre os dDATs para encontrar a classificação final do ligante (Figura 15). Para tal, a partir dos valores encontrados na fórmula ECR é possível aplicar uma MS (Fórmula 4). O elemento “macromolécula” é resolvido.

$$\text{Fórmula 4: } L_i : \frac{1}{m} \left( \sum_{\lambda=1}^m M_{\lambda} (a_{i,\lambda}) \right) = P_i$$

Sendo que:

- “ $L_i$ ” corresponde a um ligante específico;
- “ $\frac{1}{m}$ ” é o número 1 dividido pelo número total de macromoléculas;
- “ $\sum_{\lambda=1}^m M_{\lambda} (a_{i,\lambda})$ ” é a somatória de todos os valores de  $(a_{i,\lambda})$ . Cada macromolécula ( $M_{\lambda}$ ) fornece um valor de  $a_{i,\lambda}$ ;
- “ $P_i$ ” corresponde a posição final do ligante.

Figura 15. Representação da etapa 3 dos consensos

dDAT/Ligand	4M48	4XNU	4XNX	4XP1	4XP4	4XP5	4XP6	4XP9	4XPA	6M2R	AlphaFold	Média Final	Ranking
	ECR												
3,4dicloro fenetilamina	0,165	0,151	0,171	0,144	0,183	0,172	0,212	0,195	0,200	0,155	0,188	0,176	6
Cocaína	0,209	0,194	0,215	0,239	0,238	0,201	0,182	0,186	0,193	0,209	0,212	0,207	3
Cocaína RTI55	0,187	0,212	0,179	0,185	0,271	0,215	0,193	0,185	0,168	0,190	0,204	0,199	5
D-anfetamina	0,136	0,131	0,131	0,140	0,136	0,135	0,135	0,144	0,165	0,123	0,152	0,139	10
Dopamina	0,167	0,167	0,155	0,177	0,137	0,150	0,169	0,160	0,164	0,149	0,135	0,157	7
L-norepinefrina	0,132	0,158	0,136	0,175	0,151	0,137	0,145	0,136	0,209	0,163	0,151	0,154	8
Metanfetamina	0,140	0,140	0,131	0,147	0,135	0,135	0,144	0,153	0,182	0,122	0,149	0,144	9
Nixosetina	0,196	0,204	0,196	0,202	0,176	0,203	0,231	0,216	0,166	0,197	0,224	0,201	4
Nortriptilina	0,239	0,239	0,248	0,217	0,223	0,232	0,225	0,233	0,242	0,248	0,222	0,233	2
Reboxetina	0,263	0,246	0,254	0,246	0,202	0,242	0,212	0,263	0,194	0,246	0,255	0,239	1

Legenda: captura da tela da tabela com os resultados ao aplicar a fórmula MS (Fórmula 4) para cada ligante. Na primeira coluna estão os ligantes, seguido pelo resultado da fórmula ECR que cada obteve com cada dDAT, na penúltima coluna tem-se a média final, seguido do ranking.

## 7.2.2 Constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*

É possível calcular o  $K_i$  *in silico*, através do valor de  $\Delta G$  obtido dos programas *Autodock Vina* e *DockThor*. Para realização deste cálculo será usado a fórmula fornecida pelo programa *Autodock Vina* (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012) (Fórmula 5) (Figura 16). Como temos dois programas geradores de  $K_i$  *in silico*, foi aplicada uma média simples com todos os valores de  $K_i$  *in silico* calculados (Figura 17).

$$\text{Fórmula 5: } K_i = (\exp(\Delta G \times 1000) \div Rcal \times TK) \times 1000000$$

Sendo que:

- “exp” tem valor fixo de 2,718;
- “Rcal” é a constante de gás de valor fixo de 1,9879;
- “TK” é a temperatura em Kelvin, valor padrão de 298,15 K;
- “ $\Delta G$ ” valor obtido como resultado do ancoramento entre cada ligante-macromolécula.

Figura 16. Valores de  $K_i$  *in silico* por dDAT

	4M48		4XNU		4XNX		4XP1		4XP4		4XP5		4XP6		4XP9		4XPA		6M2R		Alpha Fold	
	Delta G	Ki	Delta G	Ki	Delta G	Ki	Delta G	Ki														
3,4dicloro fenetilamina	-5,0	0,000039888	-6,0	0,000039888	-6,1	0,000033782	-5,6	0,0000785463	-6,8	0,0000103641	-6,7	0,0000122686	-5,5	0,0000629915	-6,5	0,0000171962	-6,1	0,000033782	-6,6	0,0000145255		
Cocaína	-8,4	0,000006962	-8,4	0,000006962	-8,5	0,000005880	-7,9	0,0000016189	-9,0	0,000002529	-8,7	0,000004196	-8,0	0,0000013675	-6,9	0,0000087544	-7,3	0,000004568	-8,2	0,000009757	-8,1	0,0000011551
Cocaína RTI55	-7,6	0,0000026861	-7,7	0,0000022689	-7,5	0,0000031800	-7,1	0,0000062464	-9,6	0,0000009819	-7,9	0,0000016189	-7,7	0,0000022689	-6,5	0,0000171962	-6,9	0,0000087544	-7,9	0,0000016189	-7,6	0,0000026861
D-anfetamina	-6,0	0,000039888	-5,9	0,0000473412	-5,9	0,0000473412	-6,2	0,0000285322	-6,4	0,000023579	-6,7	0,0000122686	-6,2	0,0000285322	-5,3	0,0000130302	-6,8	0,0000103641	-5,8	0,0000560454	-6,2	0,0000285322
Dopamina	-6,3	0,0000241010	-6,1	0,000033782	-6,2	0,0000285322	-6,9	0,0000087544	-6,3	0,0000171962	-6,9	0,0000087544	-6,5	0,0000171962	-5,5	0,0000929915	-5,9	0,0000473412	-6,2	0,0000285322	-5,9	0,0000473412
L-norepinefrina	-6,3	0,0000241010	-6,2	0,0000285322	-6,1	0,000033782	-6,8	0,0000103641	-6,6	0,0000145255	-6,9	0,0000087544	-6,6	0,0000145255	-5,4	0,00001100891	-7,5	0,0000031800	-6,3	0,0000241010	-6,2	0,0000285322
Metanfetamina	-6,0	0,000039888	-6,0	0,000039888	-6,0	0,000039888	-6,1	0,000033782	-6,4	0,0000203579	-6,6	0,0000145255	-6,1	0,000033782	-5,3	0,0000130302	-7,0	0,0000073948	-6,0	0,000039888	-6,1	0,000033782
Nixosetina	-8,1	0,0000011551	-7,7	0,0000022689	-8,1	0,0000011551	-7,1	0,0000062464	-6,6	0,0000145255	-7,6	0,0000026861	-8,0	0,0000013675	-6,4	0,0000203579	-6,3	0,0000241010	-7,7	0,0000022689	-6,2	0,0000285322
Nortriptilina	-10,1	0,0000000395	-9,6	0,0000000919	-9,9	0,0000000554	-8,2	0,0000009757	-8,7	0,000004196	-8,1	0,0000011551	-8,3	0,0000008242	-7,3	0,0000044568	-7,5	0,0000031800	-9,7	0,0000000776	-7,0	0,0000073948
Reboxetina	-8,7	0,0000004196	-8,3	0,0000008242	-8,8	0,0000003544	-7,1	0,0000062464	-6,6	0,0000145255	-8,8	0,0000003544	-7,5	0,0000031800	-6,9	0,0000087544	-6,9	0,0000087544	-8,7	0,0000004196	-7,0	0,0000073948

Legenda: captura da tela dos valores de  $K_i$  *in silico* gerados a partir do  $\Delta G$  no programa *Autodock Vina*. Na primeira coluna são os ligantes, nas colunas seguintes estão os valores do  $\Delta G$  seguido pelo valor de  $K_i$  *in silico* encontrado, para todos os dDATs.

Figura 17. Valor final de  $K_i$  *in silico*

	Média	Desvio Padrão	Ranking
3,4dicloro fenetilamina	395,157	25,898	6
Cocaina	28,146	1,897	2
Cocaina RTI55	53,091	3,938	3
D-anfetamina	468,629	30,379	9
Dopamina	416,747	21,714	8
L-norepinefrina	406,756	22,339	7
Metanfetamina	527,851	27,448	10
Nixosetina	114,733	8,440	5
Nortriptilina	24,913	1,746	1
Reboxetina	53,340	4,028	4

Legenda: captura da tela dos valores de  $K_i \pm$  Desvio Padrão (SEM). Na primeira coluna são os ligantes, na segunda e terceira colunas é a média de todos os valores  $K_i$  *in silico* encontrado  $\pm$  desvio padrão. Na última coluna é a posição (classificação) que cada ligante obteve.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 RE-ANCORAMENTO

Diferentes estratégias foram usadas nos quatro programas com objetivo de encontrar o melhor valor de RMSD para as re-ancoramento. Cada uma das estratégias busca modificar o dDAT, e/ou o ligante, e/ou os parâmetros de ancoragem do próprio programa. Como ponto de partida, foi usado o manual de uso de cada programa (GOLD User Guide; HUEY; MORRIS; FORLI, 2012). Uma estratégia era selecionada quando o valor de RMSD entre o ligante na conformação de referência e na conformação após o re-ancoramento era menor que 2Å, e o oposto acontecia para quando o valor de RMSD era maior que 2Å, essa estratégia era excluída.

As moléculas que vieram co-cristalizadas com o dDAT, como sódio, carboidratos, águas, entre outros, não foram excluídas do re-ancoramento, como sugerido pelos manuais. Em alguns programas, eram obrigatórias algumas configurações na macromolécula, ligante e/ou parâmetros de ancoragem. Estas obrigações vinham de regras individuais de ancoragem de cada programa, uma vez detectada em um programa, essa obrigação era adotada para o processo em todos os programas. As configurações obrigatórias são: adição de hidrogênio no dDAT para o *DockThor* e *Gold*, adição de hidrogênio nos ligantes para o *DockThor*, uso dos cofatores no *Autodock Vina*, dDAT rígido para o *DockThor* e *Autodock Vina* e por fim, ligante flexível (com torções) para o *Autodock Vina*.

#### 8.1.1 Re-ancoramento no Autodock 4

Para o *Autodock 4*, foram testadas 6 estratégias de configurações diferentes do dDAT ou/e dos ligantes e/ou os parâmetros de ancoragem do próprio programa (Tabela 4).

Independentemente de qual método utilizado, o re-ancoramento dos dDATs 4XNU (dDAT-nisoxetina), 4XP9 (dDAT-D-anfetamina) e 6M2R (dDAT-L-norepinefrina) sempre tiveram RMSD acima de 2Å (Tabela 10). Para os demais dDATs, os valores de RSMD foram abaixo de 2Å em várias tentativas (Tabela 10). Por conta da ineficiência do *Autodock 4* em reproduzir a conformação dos ligantes originalmente cristalizados para os dDATs 4XNU, 4XP9 e 6M2R, o programa foi excluído de futuros ancoramentos moleculares.

Tabela 10. Valores de RMSD obtido no *Autodock 4*

Tentativa	4M48	4XNU	4XNX	4XP1	4XP4	4XP5	4XP6	4XPA	4XP9	6M2R
1 <sup>a</sup>	1.120	5.711	0.406	0.839	0.477	0.534	1.667	0.000	5.495	8.344
2 <sup>a</sup>	1.107	5.736	0.414	0.862	0.453	-	1.733	0.000	5.492	8.740
3 <sup>a</sup>	1.118	5.734	0.000	0.866	0.480	0.514	1.703	0.000	5.492	4.799
4 <sup>a</sup>	1.107	5.735	0.429	0.857	0.480	0.513	1.663	0.000	5.488	4.785
5 <sup>a</sup>	1.134	5.733	0.393	0.864	0.473	0.507	1.660	0.712	5.497	8.731
6 <sup>a</sup>	1.247	5.693	5.649	1.127	1.129	1.679	1.477	2.173	0.759	8.308

Legenda: valor de RMSD em angstrom (Å) obtido do re-ancoramento entre o PDB-ligante em cada tentativa de configuração no programa *Gold*. Na primeira coluna é a numeração da tentativa (descrição da tentativa na tabela 4), na demais colunas é o valor de RMSD em Å obtido para cada PDB-ligante. Reboxetina-4XNX, Nisoxetina-4XNU, Nortriptilina-4M48, L-norepinefrina-6M2R, Dopamina-4XP1, Cocaína-4XP4, Cocaína-RTI 55-4XP5, Metanfetamina-4XP6, 3,4dicloro fenetilamina-4XPA, D-anfetamina-4XP9. Valores em vermelho representam RSMD maior que 2Å, valores em preto representam RSMD menor que 2Å. Se a célula está com o hífen (-), o programa não foi capaz de fazer o re-ancoramento.

### 8.1.2 Re-ancoramento no *Autodock Vina*

Para o *Autodock Vina* foram 3 tentativas (Tabela 5). Destas, a estratégia 1 e 2 tiveram mais de um re-ancoramento com RMSD maior que 2Å (Tabela 11). Como somente a terceira tentativa conseguiu encontrar valores de RMSD abaixo de 2Å, esta estratégia foi para futuros ancoramentos.

Tabela 11. Valores de RMSD obtido no *Autodock Vina*

Tentativa	4M48	4XNU	4XNX	4XP1	4XP4	4XP5	4XP6	4XPA	4XP9	6M2R
1 <sup>a</sup>	0.696	0.656	>3	0.970	>3	>4	1.057	0.772	1.733	1.312
2 <sup>a</sup>	>3	1.254	>3	0.764	1.143	>4	1.743	>17	>9	1.348
3 <sup>a</sup>	0.614	0.651	1.117	0.811	0.574	1.092	1.735	0.766	1.779	1.314

Legenda: valor de RMSD em angstrom (Å) obtido do re-ancoramento entre o PDB-ligante em cada tentativa de configuração no programa *Gold*. Na primeira coluna é a numeração da tentativa (descrição da tentativa na tabela 5), na demais colunas é o valor de RMSD em Å obtido para cada PDB-ligante. Reboxetina-4XNX, Nisoxetina-4XNU, Nortriptilina-4M48, L-norepinefrina-6M2R, Dopamina-4XP1, Cocaína-4XP4, Cocaína-RTI 55-4XP5, Metanfetamina-4XP6, 3,4dicloro fenetilamina-4XPA, D-anfetamina-4XP9. Valores em vermelho representam RSMD maior que 2Å, valores em preto representam RSMD menor que 2Å. Se a célula está com o hífen (-), o

programa não foi capaz de fazer o re-ancoramento. Em negrito é a estratégia escolhida para futuros ancoramentos.

### 8.1.3 Re-ancoramento no *DockThor*

No *DockThor* foram usadas 10 estratégias diferentes (Tabela 6). Na terceira estratégia o objetivo era não adicionar os hidrogênios nos ligantes, porém, o *DockThor* só permitiu dar sequência ao re-ancoramento se adicionasse os hidrogênios nos ligantes para o dDAT 4XPA (3,4-diclorofenetilamina) e 4XP9 (D-anfetamina). Por conta disso, esta configuração passou a ser obrigatória para todos os ligantes no *DockThor*. De todas as estratégias usadas, a única que capaz de reproduzir a conformação dos ligantes originalmente cristalizados, encontrando RMSD menor que 2Å, foi a décima (Tabela 12).

Tabela 12. Valores de RMSD obtido no *DockThor*

Tentativa	4M48	4XNU	4XNX	4XP1	4XP4	4XP5	4XP6	4XPA	4XP9	6M2R
1 <sup>a</sup>	0.254	0.216	0.115	0.495	0.228	0.460	0.479	0.751	0.592	<b>3.368</b>
2 <sup>a</sup>	0.247	0.216	0.115	0.493	0.228	-	0.479	0.752	0.592	<b>3.370</b>
3 <sup>a</sup>	<b>4.875</b>	<b>4.510</b>	0.714	0.490	0.259	0.327	<b>7.342</b>	*	*	1.258
4 <sup>a</sup>	0.318	0.276	0.231	0.552	0.223	0.604	0.421	0.607	0.608	<b>3.540</b>
5 <sup>a</sup>	0.255	0.214	0.115	0.480	0.229	0.456	0.479	0.750	0.598	<b>3.371</b>
6 <sup>a</sup>	0.722	<b>3.082</b>	1.049	<b>8.986</b>	0.287	1.231	1.012	0.914	0.568	<b>2.895</b>
7 <sup>a</sup>	0.253	<b>2.281</b>	0.115	0.488	0.229	0.456	0.479	0.754	0.598	<b>3.371</b>
8 <sup>a</sup>	<b>5.087</b>	<b>4.983</b>	<b>3.795</b>	0.533	0.165	0.205	<b>7.606</b>	0.911	0.554	1.474
9 <sup>a</sup>	<b>4.880</b>	<b>4.535</b>	0.713	0.486	0.241	0.266	<b>7.337</b>	0.750	0.595	1.259
10 <sup>a</sup>	<b>0.718</b>	<b>0.214</b>	<b>1.050</b>	<b>0.599</b>	<b>0.284</b>	<b>1.231</b>	<b>1.026</b>	<b>0.911</b>	<b>0.554</b>	<b>1.755</b>

Legenda: valor de RMSD em angstrom (Å) obtido do re-ancoramento entre o PDB-ligante em cada tentativa de configuração no programa *Gold*. Na primeira coluna é a numeração da tentativa (descrição da tentativa na tabela 6), na demais colunas é o valor de RMSD em Å obtido para cada PDB-ligante. Reboxetina-4XNX, Nisoxetina-4XNU, Nortriptilina-4M48, L-norepinefrina-6M2R, Dopamina-4XP1, Cocaína-4XP4, Cocaína-RTI 55-4XP5, Metanfetamina-4XP6, 3,4dicloro fenetilamina-4XPA, D-anfetamina-4XP9. Valores em vermelho representam RMSD maior que 2Å, valores em preto representam RMSD menor que 2Å. Se a célula está com o hífen (-), o programa não foi capaz de fazer o re-ancoramento. Se a célula está com asterisco (\*), o programa não foi capaz de realizar o re-ancoramento sem adicionar os hidrogênios ao ligante. Em negrito é a estratégia escolhida para futuros ancoramentos.

### 8.1.4 Re-ancoramento no *Gold*

Neste programa foram 5 estratégias diferentes (Tabela 7). Todas elas apresentaram bons resultados de RMSD (Tabela 13). Porém, devido às configurações obrigatórias nos outros programas, a quinta estratégia foi escolhida.

Tabela 13. Valor de RMSD obtido no *Gold*

Tentativa	4M48	4XNU	4XNX	4XP1	4XP4	4XP5	4XP6	4XPA	4XP9	6M2R
1 <sup>a</sup>	0.256	0.616	0.270	0.384	0.186	0.257	1.463	0.503	0.559	1.463
2 <sup>a</sup>	0.171	0.247	0.655	0.717	0.253	-	1.030	0.504	0.474	1.082
3 <sup>a</sup>	0.259	0.450	0.348	0.580	0.137	0.185	0.362	0.317	0.345	1.211
4 <sup>a</sup>	0.145	0.206	0.355	0.381	0.101	0.454	0.800	0.590	0.512	1.224
5 <sup>a</sup>	<b>1.005</b>	<b>0.756</b>	<b>0.369</b>	<b>0.429</b>	<b>0.344</b>	<b>0.657</b>	<b>1.242</b>	<b>0.497</b>	<b>0.374</b>	<b>1.526</b>

Legenda: valor de RMSD em angstrom (Å) obtido do re-ancoramento entre o PDB-ligante em cada tentativa de configuração no programa *Gold*. Na primeira coluna é a numeração da tentativa (descrição da tentativa na tabela 8), na demais colunas é o valor de RMSD em Å obtido para cada PDB-ligante. Reboxetina-4XNX, Nisoxetina-4XNU, Nortriptilina-4M48, L-norepinefrina-6M2R, Dopamina-4XP1, Cocaína-4XP4, Cocaína-RTI 55-4XP5, Metanfetamina-4XP6, 3,4dicloro fenetilamina-4XPA, D-anfetamina-4XP9. Valores em preto representam RMSD menor que 2Å. Se a célula está com o hífen (-), o programa não foi capaz de fazer o re-ancoramento. Em negrito é a estratégia escolhida para futuros ancoramentos.

## 8.2 ANCORAMENTO CRUZADO

Para visualizar os valores individuais de desfecho de ancoragem para cada par ligante-dDAT, em cada programa, para cada repetição, bem como o cálculo dos três consensos (ECR, ECR+MS e FL+ECR+MS) e o cálculo de  $K_i$  *in silico*, basta clicar no *link* com nome de “[Resultados do Cross-docking \(consenso 3 tipos +  \$K\_i\$ \)](#)”, você terá acesso a uma planilha Excel com todos os resultados.

### 8.2.1 Lista de classificação ECR

Para a lista de classificação ECR, em ambas as repetições, o ligante mais bem posicionado foi a nortriptilina e em segundo lugar a reboxetina (Tabela 14, Gráfico 1). Também em ambas as repetições, o pior colocado foi a d-anfetamina, e o penúltimo lugar a metanfetamina (Tabela 14, Gráfico 1).

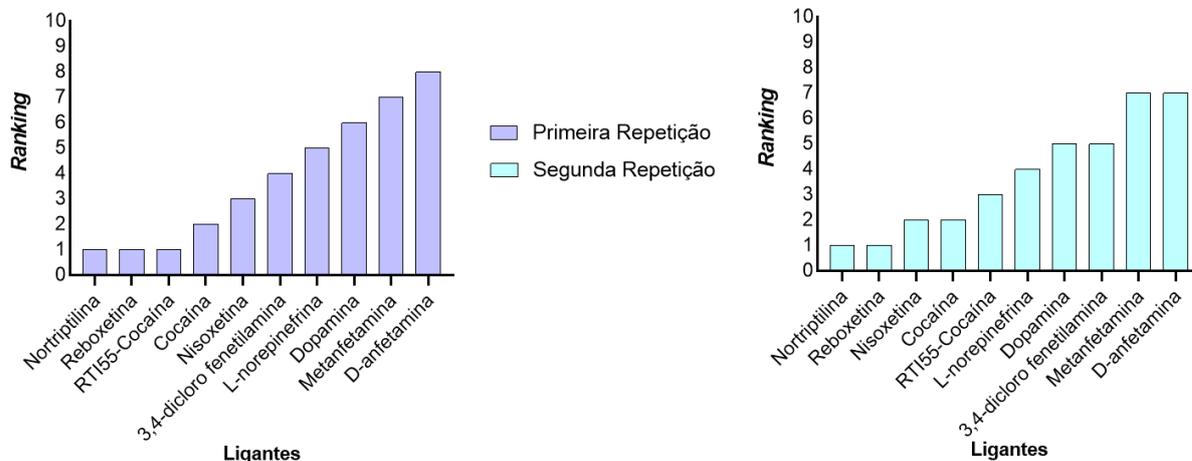
Tabela 14. Lista de classificação ECR para o ancoramento cruzado

Ligante	Classificação 1 <sup>a</sup> repetição	Classificação 2 <sup>a</sup> repetição
3,4-dicloro fenetilamina	4	5
Cocaína	2	2
D-anfetamina	8	7
Dopamina	6	5
L-norepinefrina	5	4
Metanfetamina	7	7
Nisoxetina	3	2

Nortriptilina	1	1
Reboxetina	1	1
RTI55-Cocaína	1	3

Legenda: tabela com a lista de classificação ECR da interação entre os 11 dDATs com os 10 ligantes na primeira e segunda repetição de ancoramento cruzado em ordem alfabética. Na primeira coluna está o nome de cada ligante, na segunda coluna a classificação na repetição 1 e na terceira coluna a classificação na 2 repetição.

Gráfico 1. Lista de classificação ECR para o ancoramento cruzado



Legenda: lista de classificação ECR entre os 11 dDAT e os 10 ligantes. Classificação crescente de afinidade da primeira (roxo claro) e segunda repetição (azul claro) do ancoramento cruzado. No eixo Y é a classificação de 1 a 10, no eixo X são os ligantes. A barra representa a posição que o ligante obteve, podendo variar entre 1 a 10.

## 8.2.2 Lista de classificação ECR+MS

Para a lista de classificação ECR+MS gerada na primeira repetição, o ligante mais bem posicionado foi a reboxetina e em segundo lugar a nortriptilina. Na segunda repetição a nortriptilina foi a melhor colocada, seguido da reboxetina (Tabela 15, Gráfico 2). Em ambas as repetições, o pior colocado foi a d-anfetamina, e o penúltimo lugar a metanfetamina (Tabela 15, Gráfico 2).

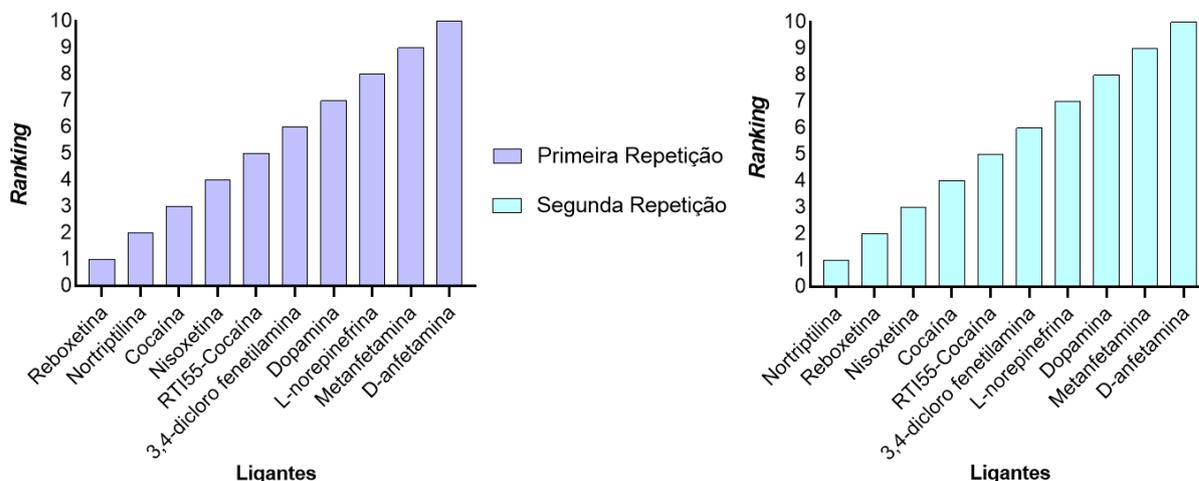
Tabela 15. Lista de classificação ECR+MS para o ancoramento cruzado

Ligante	Classificação 1ª repetição	Classificação 2ª repetição
3,4-dicloro fenetilamina	6	6
Cocaína	3	4
D-anfetamina	10	10
Dopamina	7	8
L-norepinefrina	8	7
Metanfetamina	9	9
Nisoxetina	4	3

Nortriptilina	2	1
Reboxetina	1	2
RTI55-Cocaína	5	5

Legenda: tabela com a lista de classificação ECR+MS da interação entre os 11 dDATs com os 10 ligantes na primeira e segunda repetição de ancoramento cruzado em ordem alfabética. Na primeira coluna está o nome de cada ligante, na segunda coluna a classificação na repetição 1 e na terceira coluna a classificação na 2 repetição.

Gráfico 2. Lista de classificação ECR+MS para o ancoramento cruzado



Legenda: lista de classificação ECR+MS entre os 11 dDAT e os 10 ligantes. Classificação crescente de afinidade da primeira (roxo claro) e segunda repetição (azul claro) do ancoramento cruzado. No eixo Y é a classificação de 1 à 10, no eixo X são os ligantes. A barra representa a posição que o ligante obteve, podendo variar entre 1 à 10.

### 8.2.3 Lista de classificação FL+ECR+MS

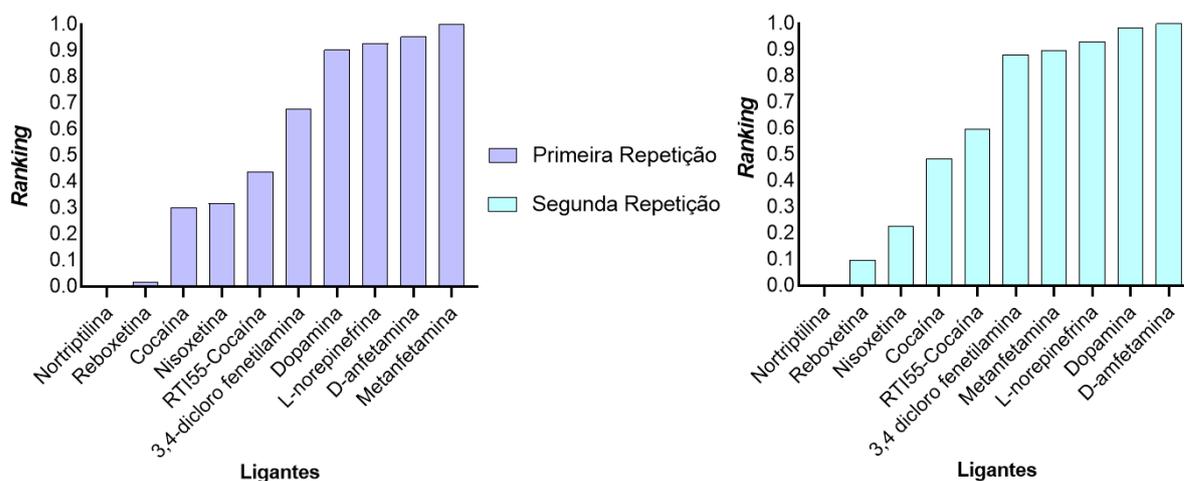
Para a lista de classificação FL+ECR+MS, a repetição mudou a posição dos ligantes (Tabela 16, Gráfico 3). Na primeira e segunda repetição, os dois primeiros colocados são a nortriptilina e a reboxetina. Os últimos dois colocados foram a d-anfetamina e metanfetamina, enquanto na segunda repetição as últimas posições foram ocupadas pela dopamina e d-anfetamina. Em ambas as repetições se nota que a distância do 1º colocado para o 2º é menor se comparado a distância do 2º colocado para o 3º. Na primeira repetição, os últimos quatro ligantes obtiveram valores muito próximos, já na segunda repetição, isso ocorreu com os últimos 5 colocados. Percebe-se que entre a 3ª posição e 6ª, na primeira repetição, e entre a 3ª posição e 5ª na segunda repetição, os valores são mais próximos (Tabela 16).

Tabela 16. Lista de classificação FL+ECR+MS para o ancoramento cruzado

Ligante	Classificação 1ª repetição	Classificação 2ª repetição
3,4-dicloro fenetilamina	0,676	0,881
Cocaína	0,301	0,484
D-anfetamina	0,954	1,000
Dopamina	0,904	0,983
L-norepinefrina	0,928	0,931
Metanfetamina	1,000	0,897
Nisoxetina	0,318	0,229
Nortriptilina	0,000	0,000
Reboxetina	0,016	0,097
RTI55-Cocaína	0,436	0,597

Legenda: tabela com a lista de classificação FL+ECR+MS da interação entre os 11 dDATs com os 10 ligantes na primeira e segunda repetição de ancoramento cruzado em ordem alfabética. Na primeira coluna está o nome de cada ligante, na segunda coluna a classificação na repetição 1 e na terceira coluna a classificação na 2 repetição.

Gráfico 3. Lista de classificação FL+ECR+MS para o ancoramento cruzado



Legenda: lista de classificação FL+ECR+MS entre os 11 dDAT e os 10 ligantes. Classificação crescente de afinidade da primeira (roxo claro) e segunda repetição (azul claro) do ancoramento cruzado. No eixo Y é a classificação de 1 à 10, no eixo X são os ligantes. A barra representa a posição que o ligante obteve, podendo variar entre 1 à 10.

### 8.2.4 Lista de classificação da constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*

A partir dos dados obtidos nos programas *Autodock Vina* e *DockThor* foi calculado para cada ligante um valor de  $K_i$  *in silico* em micro molar ( $\mu\text{M}$ ). Os valores de  $K_i$  *in silico* serão apresentados na forma de média  $\pm$  erro padrão da média (SEM) dos ancoramentos entre todos os dDATs.

Na classificação feita a partir do valor de  $K_i$  *in silico* (Tabela 17, Gráfico 4) obtidas na primeira rodada de ancoramentos, a nortriptilina foi a mais bem posicionada, seguida da cocaína. O penúltimo e último colocados nesta lista foram, respectivamente, d-anfetamina e metanfetamina. Na segunda rodada de ancoramentos (Tabela 18, Gráfico 4), o primeiro posto na lista de classificação também é ocupado pela nortriptilina, seguido da reboxetina. O último posto está a dopamina e em penúltimo lugar a 3,4-dicloro fenetilamina.

Tabela 17. Lista de classificação da constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*: primeira rodada

<b>Classificação</b>	<b>Ligante</b>	<b>Média</b>	<b>SEM</b>
1	Nortriptilina	24,912	0,552
2	Cocaína	28,146	0,600
3	RTI55-Cocaína	53,091	1,245
4	Reboxetina	53,340	1,273
5	Nisoxetina	114,733	2,668
6	3,4-dicloro fenetilamina	395,156	8,189
7	L-norepinefrina	406,756	7,064
8	Dopamina	416,747	6,866
9	D-anfetamina	468,628	9,606
10	Metanfetamina	527,851	8,679

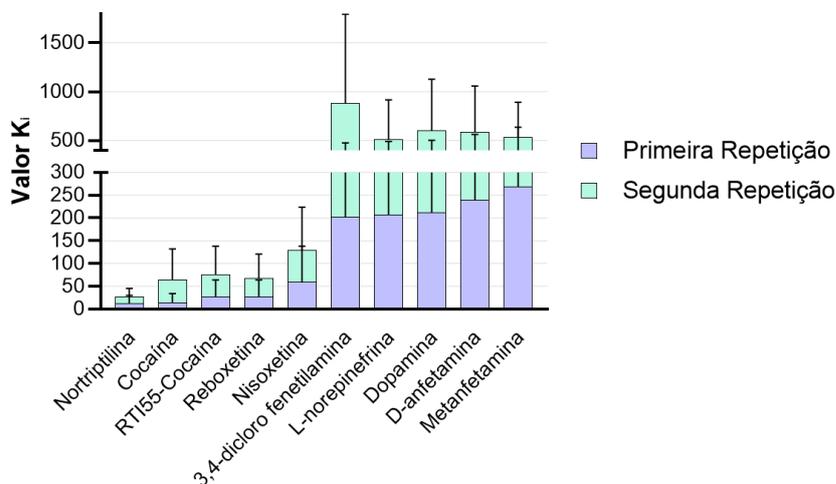
Legenda: Valores da média e erro padrão da média (SEM) do valor da constante de inibição ( $K_i$ ) dos ligantes com o dDAT, obtidos a partir do  $\Delta G$  do *Autodock Vina* e *DockThor* para repetição 1. Dados apresentados em micro molar ( $\mu M$ ). A ordem dos ligantes está do mais baixo valor de  $K_i$  (maior afinidade) para o mais alto valor de  $K_i$  (pior afinidade).

Tabela 18. Lista de classificação da constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*: segunda rodada

<b>Classificação</b>	<b>Ligante</b>	<b>Média</b>	<b>SEM</b>
1	Nortriptilina	26,809	0,496
2	Reboxetina	77,731	1,521
3	RTI55-Cocaína	92,547	3,289
4	Cocaína	98,025	2,261
5	Nisoxetina	137,214	2,992
6	Metanfetamina	517,184	10,064
7	L-norepinefrina	588,769	13,764
8	D-anfetamina	680,106	13,232
9	Dopamina	762,391	15,706
10	3,4-dicloro fenetilamina	1324,076	35,204

Legenda: Valores da média e erro padrão da média (SEM) do valor da constante de inibição ( $K_i$ ) dos ligantes com o dDAT, obtidos a partir do  $\Delta G$  do *Autodock Vina* e *DockThor* para repetição 2. Dados apresentados em micro molar ( $\mu\text{M}$ ). A ordem dos ligantes está do mais baixo valor de  $K_i$  (maior afinidade) para o mais alto valor de  $K_i$  (pior afinidade).

Gráfico 4.  $K_i$  *in silico* do ancoramento cruzado



Legenda: Valores da média e erro padrão da média (SEM) do valor da constante de inibição ( $K_i$ ) para o ancoramento cruzado entre os ligantes e o dDAT obtidos no *Autodock Vina* e no *DockThor* para primeira repetição, em roxo claro, e para segunda repetição, em azul claro. Dados apresentados em micro molar ( $\mu\text{M}$ ). No eixo Y é o valor de  $K_i$  e no eixo X os ligantes. A ordem dos ligantes está do mais baixo valor de  $K_i$  para primeira repetição para o mais alto valor de  $K_i$  nas barras da frente. A barra representa o valor de  $K_i$  que o ligante obteve.

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1 RE-ANCORAMENTO

O re-ancoramento no programa *Autodock 4* foi ineficaz em encontrar um valor de RMSD abaixo de 2Å para os dDATs 4XNU (dDAT-nisoxetina), 4XP9 (dDAT-D-anfetamina) e 6M2R (dDAT-L-norepinefrina). Esse resultado pode ser justificado pela taxa de erro que todo programa possui, para o *Autodock 4* é 51% de erro para 49% de acerto (TROTT; OLSON, 2010). Os demais programas, conseguiram encontrar RMSD abaixo de 2Å em pelo menos 1 estratégia, sendo, portanto, esta estratégia escolhida para os próximos ancoramentos. Para o programa *Autodock Vina* a 3ª estratégia foi selecionada, para o programa *DockThor* a 10ª estratégia foi selecionada e para o programa *Gold*, a 5ª estratégia foi selecionada.

### 9.2 ANCORAMENTO CRUZADO

Ao realizar a ancoramento cruzado, foi possível notar que o resultado é diferente a cada vez que se repete a ancoragem, mesmo que as configurações sejam idênticas. Isso pode ser explicado devido os programas usarem o algoritmo de busca estocástico, em que as conformações do ligante na macromolécula é gerada de maneira aleatória, gerando resultados diferentes (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). Dessa maneira, para se incorporar a variabilidade dos resultados a estimativa de afinidade de cada ligante pela

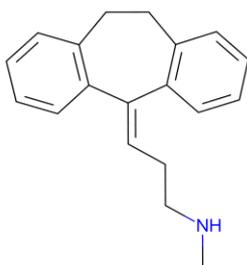
macromolécula, se faz necessário repetir as ancoragens várias vezes (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). No presente estudo foi escolhido, arbitrariamente, repetir o processo de ancoragem 2 vezes para cada par ligante-macromolécula. Por esta razão, independentemente de qual cálculo de consenso aplicado, a lista de classificação dos ligantes foi sempre diferente, variando com os resultados dos ancoramentos.

A estrutura química da reboxetina e a nortriptilina, os dois ligantes mais bem classificados nas três formas de consenso, possuem dois anéis aromáticos, bem como, uma quantidade maior de carbonos e hidrogênios se comparado aos demais ligantes (Tabela 19). Conforme diminui a classificação dos ligantes, a complexidade do ligante também diminui. A metanfetamina e a d-anfetamina possuem apenas um anel aromático cada, com poucos elementos químicos (Tabela 19). Para o reconhecimento dos ligantes no dDAT, é necessário que o grupo amina interaja com os aminoácidos fenilalanina (PHE) de número 43 (PHE43) e 319 (PHE319) e o ácido aspártico (ASP) 46 (ASP46) (WANG et al., 2015). A interação do ASP46 facilita a interação com os ligantes por formar uma ponte salina com o grupo  $\text{NH}_3^+$  (CHENG; BAHAR, 2019). Assim como, para ação inibitória dos antidepressivos nos transportadores, é apontado que as porções aromáticas e os grupos aminas são importantes (PENMATSU; WANG; GOUAUX, 2015, WANG et al., 2015). A reboxetina não possui grupamentos aminas, porém, a nortriptilina, assim como os últimos colocados, possuem um grupo amina. Esse padrão trás evidências que as porções aromáticas pode ser mais importantes para aumentar a afinidade, e que, em associação com os grupos aminas a afinidade seria ainda maior.

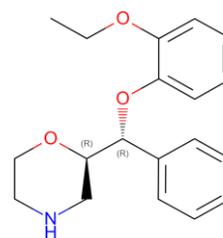
Wang e colaboradores (2015) apontam em seu estudo que a diferença da afinidade entre os melhores classificados, nortriptilina e reboxetina, e os piores classificados, dopamina, metanfetamina e d-anfetamina, é dada pela forma como os ligantes interagem no sítio de ligação. A nortriptilina e reboxetina exploram melhor a flexibilidade do sítio de ligação do transportador (WANG et al., 2015). Outro dado que pode explicar a baixa afinidade da metanfetamina e d-anfetamina é a presença dos aminoácidos ácido aspártico 121 (ASP121) e serina (SER) 426 (SER426), presentes no sítio de ligação do dDAT e ausente no DAT de mamíferos, estes criam um ambiente polar que pode contribuir pela baixa afinidade dos ligantes (WANG et al., 2015).

Tabela 19. Representação química dos ligantes

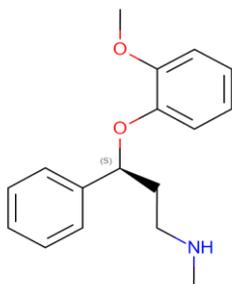
<b>Ligante:</b> Nortriptilina <b>Fórmula:</b> $\text{C}_{19} \text{H}_{21} \text{N}$	<b>Ligante:</b> Reboxetina <b>Fórmula:</b> $\text{C}_{19} \text{H}_{23} \text{N O}_3$
---	--



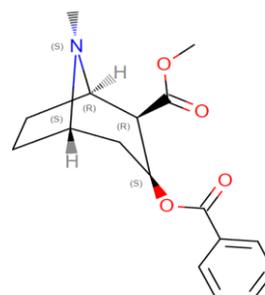
**Ligante: Nisoxetina**  
**Fórmula: C<sub>17</sub> H<sub>21</sub> N O<sub>2</sub>**



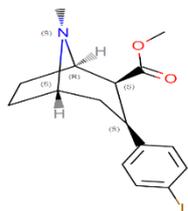
**Ligante: Cocaína**  
**Fórmula: C<sub>17</sub> H<sub>21</sub> N O<sub>4</sub>**



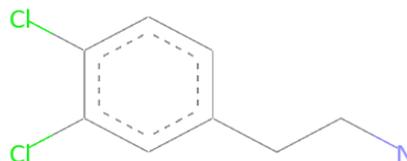
**Ligante: RTI55**  
**Fórmula: C<sub>16</sub> H<sub>20</sub> I N O<sub>2</sub>**



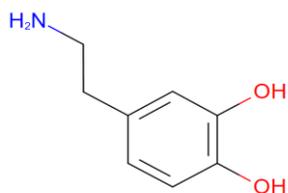
**Ligante: 3,4-dicloro fenetilamina**  
**Fórmula: C<sub>8</sub> H<sub>9</sub> Cl<sub>2</sub> N**



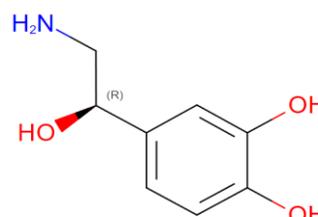
**Ligante: Dopamina**  
**Fórmula: C<sub>8</sub> H<sub>11</sub> N O<sub>2</sub>**



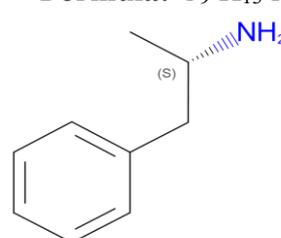
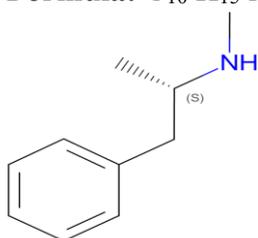
**Ligante: L-norepinefrina**  
**Fórmula: C<sub>8</sub> H<sub>11</sub> N O<sub>3</sub>**



**Ligante: Metanfetamina**  
**Fórmula: C<sub>10</sub> H<sub>15</sub> N**



**Ligante: D-anfetamina**  
**Fórmula: C<sub>9</sub> H<sub>13</sub> N**



Legenda: imagem 2D das estruturas químicas dos ligantes utilizados nos procedimentos de *docking* e sua fórmula química. Em preto são os átomos de carbono, o “N” em azul é o nitrogênio, o “O” em vermelho é o oxigênio, o “Cl” em verde claro é o cloro, o “I” em marrom é o átomo de iodo, o “H” é o hidrogênio, que dependendo em qual átomo está se ligando muda a cor, se for no N é azul e se for no O é em vermelho.

Para saber se o cálculo do  $K_i$  *in silico* é semelhante ao do  $K_i$  *in vitro*, comparamos a classificação gerada do  $K_i$  *in silico* com os dados de  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro* encontrados na literatura. Os valores de  $K_i$  *in silico* são apresentados em  $\mu\text{M}$ . Assim, os valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  apresentados em unidade de medida nano molar ( $\eta\text{M}$ ) foram multiplicados por 0,001 para serem convertidos em micro molar ( $\mu\text{M}$ ).

A comparação entre os valores de  $K_i$  *in silico* com os  $K_i$  *in vitro* fornecidos pelos artigos que realizaram a cristalização do dDAT, indica o mesmo padrão de classificação dos ligantes. A ordenação dos valores de  $K_i$  *in vitro* a seguinte lista em ordem de maior para menor afinidade: reboxetina (20  $\eta\text{M}$  ou 0,02  $\mu\text{M}$ ), nortriptilina (156 $\pm$ 12  $\eta\text{M}$  ou 0,156 $\pm$ 0,12  $\mu\text{M}$ ), RTI55-Cocaína (371 $\pm$ 25  $\eta\text{M}$  ou 0,371 $\pm$ 0,25  $\mu\text{M}$ ), 3,4-Dicloro fenetilamina (4,5 $\pm$ 0,3  $\mu\text{M}$ ), dopamina (8,3  $\mu\text{M}$ ), L-norepinefrina (19,1 $\pm$ 1,7  $\mu\text{M}$ ), metanfetamina (31  $\mu\text{M}$ ), cocaína (33 $\pm$ 3  $\mu\text{M}$ ) e d-anfetamina (86  $\mu\text{M}$ ) (PENMATSU; WANG; GOUAUX, 2013; PENMATSU; WANG; GOUAUX, 2015; PIDATHALA et al., 2021; WANG et al., 2015) (Tabela 20).

Pugh et al. (2022) utilizaram a técnica *binding* para prever o valor  $K_i$  de diferentes ligantes, encontraram um padrão de afinidade bastante semelhantes aos dados de consenso e  $K_i$  *in silico*. Os ligantes os valores de  $K_i \pm \text{SEM}$  com unidade de medida original em  $\eta\text{M}$  ou convertidos para  $\mu\text{M}$  são apresentados para cada ligante, em ordem da maior para menor afinidade pelo dDAT está: nisoxetina (31 $\pm$ 28-34  $\eta\text{M}$  ou 0,031 $\pm$ 0,028-0,034  $\mu\text{M}$ ), RTI55-cocaína (130 $\pm$ 95-187  $\eta\text{M}$  ou 0,13 $\pm$ 0,095-0,187  $\mu\text{M}$ ), nortriptilina (292 $\pm$ 255-355  $\eta\text{M}$  ou 0,292 $\pm$ 0,255-0,355  $\mu\text{M}$ ), cocaína (2.000 $\pm$ 18.000-23.000  $\eta\text{M}$  ou 2 $\pm$ 18-23  $\mu\text{M}$ ), dopamina (6.900 $\pm$ 4.500-10.500  $\eta\text{M}$  ou 6,9 $\pm$ 4,5-10,5  $\mu\text{M}$ ), metanfetamina (13.000 $\pm$ 10.000-16.000  $\eta\text{M}$  ou 13 $\pm$ 10-16  $\mu\text{M}$ ), d-anfetamina (18.000 $\pm$ 16.000-21.000  $\eta\text{M}$  ou 18 $\pm$ 16-21  $\mu\text{M}$ ) e L-norepinefrina (184.000 $\pm$ 141.000-239.000  $\eta\text{M}$  ou 184 $\pm$ 141-239  $\mu\text{M}$ ) (Tabela 20) (PUGH et al., 2022).

Outro estudo com os mesmos ligantes de Pugh et al. (2022) foi realizado por Pörzgen et al. (2001). Os autores utilizaram a técnica *binding* para prever o valor  $CI_{50}$  de diferentes ligantes, e assim como nos estudos anteriores, também encontraram um padrão de afinidade bastante similar aos dados de consenso e  $K_i$  *in silico*.  $K_i$  e  $CI_{50}$  são métricas diferentes, porém, podem ser comparadas uma vez que a concentração de ligante amina (3H) usadas foram abaixo de 10% de seus respectivos valores de transporte de afinidade (PÖRZGEN et al., 2001). Os ligantes serão apresentados com valor de  $CI_{50} \pm \text{SEM}$  com unidade de medida original em  $\eta\text{M}$  ou convertidos para  $\mu\text{M}$ . Em ordem da maior para menor afinidade pelo dDAT está: nisoxetina (5,66 $\pm$ 2,2  $\eta\text{M}$  ou 0,0056 $\pm$ 0,0022  $\mu\text{M}$ ), RTI55-cocaína (66 $\pm$ 10  $\eta\text{M}$  ou 0,066 $\pm$ 0,01  $\mu\text{M}$ ), cocaína (2.600 $\pm$ 230  $\eta\text{M}$  ou 2,66 $\pm$ 0,23  $\mu\text{M}$ ), dopamina (2.900 $\pm$ 500  $\eta\text{M}$  ou

2,9±0,5 µM), d-anfetamina (6.600±900 ηM ou 6,6±0,9 µM) e L-norepinefrina (49.000±9,000 ηM ou 49±0,009 µM) (Tabela 20) (PÖRZGEN et al., 2001).

O trabalho de Pugh et al. (2022) e Pörzgen et al. (2001) apresentaram a ordenação dos ligantes bastante similar entre eles, mesmo sendo expresso em  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*, respectivamente. Para ambos, o primeiro colocado na classificação do  $CI_{50}$  *in vitro* (PÖRZGEN et al., 200) e  $K_i$  *in vitro* (PUGH et al., 2022) foi a nisoxetina. Uma comparação entre a lista de classificação baseada na ordenação dos valores de do  $K_i$  *in silico* e do  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro* está na (Tabela 21). Como foram realizadas duas repetições dos ancoramentos cruzados, os valores dos postos apresentados na tabela são as médias das posições obtidas em cada repetição (Tabela 21).

Tabela 20. Valor de  $K_i / CI_{50} \pm SEM$  *in vitro* dos ligantes obtidos na literatura

$K_i / CI_{50} \pm SEM$			
Ligante	Valor original (µM / ηM)	Valor convertido para µM	Referência
3,4-Dicloro fenetilamina	4,5±0.3 µM	-	WANG et al., 2015
Cocaína	33 ± 3 µM	-	WANG et al., 2015
	2.000±18.000-23.000 ηM	2±18-23	PUGH et al., 2022
	2.660 ± 230 ηM	2,66 ± 0,23	PÖRZGEN et al., 2001
Dopamina	8,3 µM	-	WANG et al., 2015
	6.900±4.500-10.500 ηM	6,9±4,5-10,5	PUGH et al., 2022
	2.900 ± 500 ηM	2,9 ± 0,5	PÖRZGEN et al., 2001
D-anfetamina	86 µM	-	WANG et al., 2015
	18.000±16.000-21.000 ηM	18±16-21	PUGH et al., 2022
	6.600±900 ηM	6,6 ± 0,9	PÖRZGEN et al., 2001
L-norepinefrina	19,1±1.7 µM	-	PIDATHALA et al., 2021
	184.000±141.000-239.000 ηM	184±141-239	PUGH et al., 2022
	49.000 ± 9,000 ηM	49 ± 0,009	PÖRZGEN et al., 2001
Metanfetamina	31 µM	-	WANG et al., 2015
	13.000±10.000-16.000 ηM	13±10-16	PUGH et al., 2022
Nisoxetina	31±28-34 ηM	0,031±0,028- 0,034	PUGH et al., 2022
	5,6 ± 2,2 ηM	0,0056 ± 0,0022	PÖRZGEN et al., 2001
Nortriptilina	156 ± 12 ηM	0,156 ± 0,12	PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2013
	292±255-355 ηM	0,292±0,255- 0,355	PUGH et al., 2022
Reboxetina	20 ηM	0,02	PENMATSA; WANG;

			GOUAUX, 2015
RTI55-Cocaína	371 ± 25 ηM	0,371 ± 0,25	WANG et al., 2015
	66±10 ηM	0,066±0,01	PUGH et al., 2022
	66 ± 10 ηM	0,066 ± 0,01	PÖRZGEN et al., 2001

Legenda: valor de  $K_i$  /  $CI_{50} \pm$  erro padrão da média (SEM) dos ligantes usados no ancoramento cruzado. Na primeira coluna encontre o nome dos ligantes em ordem alfabética, seguido pelo valor de  $K_i$  /  $CI_{50} \pm$  SEM unidade de medida, que pode ser em  $\mu\text{M}$  ou  $\eta\text{M}$ . Na segunda coluna os valores apresentados em  $\eta\text{M}$  foram convertidos para  $\mu\text{M}$  para torná-los todos na mesma unidade de medida. E na última coluna a referência do artigo que foi extraído o valor. Os dados em  $\eta\text{M}$  foram multiplicados por 0,001 para serem convertidos em  $\mu\text{M}$ . O trabalho de Pörzgen et al. (2001) apresenta os valores de afinidade em  $CI_{50}$ . O  $K_i$  é apresentado para Pugh et al., (2022) e para os artigos que realizaram a cristalização dos ligantes (PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2013; PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015; PIDATHALA et al., 2021; WANG et al., 2015).

Tabela 21. Comparação das classificações dos ligantes do ancoramento cruzado

Ligantes	$K_i$ <i>in silico</i>	$K_i$ e $CI_{50}$ <i>in vitro</i>		
		A	B	C
3,4-Dicloro fenetilamina	8	4	NA	NA
Cocaína	3	8	4	3
D-anfetamina	8,5	9	7	5
Dopamina	8,5	5	5	4
L-norepinefrina	7	6	8	6
Metanfetamina	8	7	6	NA
Nisoxetina	5	NA	1	1
Nortriptilina	1	2	3	NA
Reboxetina	3	1	NA	NA
RTI55-Cocaína	3	3	2	2

Legenda: tabela comparativa com as posições que cada ligante obteve no  $K_i$  *in silico*, no  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*. Os **valores de A** são dados de  $K_i$  obtidos dos trabalhos que realizaram a cristalização dos ligantes (PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2013; PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015; PIDATHALA et al., 2021; WANG et al., 2015). Os **valores de B** são dados de  $K_i$  extraídos do trabalho de Pugh et al. (2022). Os **valores de C** são dados de  $CI_{50}$  extraídos do trabalho de Pörzgen et al. (2001). NA = não aplicável.

Na tabela 22 são apresentadas e comparadas as posições que cada ligante obteve na classificação das três formas de consenso, do  $K_i$  *in silico* e do  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*. A diferença na forma de expressar os dados pode impactar a interpretação, de qualquer forma, independentemente de qual cálculo de consenso usado e a classificação  $K_i$  *in silico*, nota-se um padrão similar a ordem da afinidade dos ligantes quando comparado com valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*.

O trabalho de Pugh et al. (2022) e Pörzgen et al. (2001) apresentaram a ordenação dos ligantes bastante similar entre eles, mesmo sendo expresso em  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*, respectivamente. Para ambos, o primeiro colocado na classificação do  $CI_{50}$  *in vitro*

(PÖRZGEN et al., 2000) e  $K_i$  *in vitro* (PUGH et al., 2022) foi a nisoquetina. Para as listas de classificação ECR, ECR+MS e FL+ECR+MS e, especialmente para o  $K_i$  *in silico*, a nisoquetina esteve em posições intermediárias. Para a lista de classificação ECR, ficou com posição média de 2,5 (na primeira repetição ocupou a 3ª posição e na segunda repetição a 2ª posição), para a lista de classificação ECR+MS ficou com posição média de 3,5 (na primeira repetição ocupou a 4ª posição e na segunda repetição a 3ª posição), para a lista de classificação FL+ECR+MS ficou com posição média de 3,5 (na primeira repetição ocupou a 4ª posição e na segunda repetição a 3ª posição) e para o  $K_i$  *in silico* com média de 5 (em ambas as repetições a nisoquetina esteve na 5ª posição).

Já o primeiro colocado nos artigos que realizaram a cristalização dos ligantes, foi a reboxetina (PENMATSU; WANG; GOUAUX, 2015), que também está na primeira posição da lista de classificação ECR (em ambas as repetições esteve na 1ª posição), para o ECR+MS esteve com posição média de 1,5 (na primeira repetição ocupou a 1ª posição e na segunda repetição a 2ª posição), para a lista de classificação FL+ECR+MS ficou com posição média de 2 (em ambas as repetições esteve na 2ª posição) e para a lista de classificação  $K_i$  *in silico* esteve com posição média de 3 (na primeira repetição ocupou a 4ª posição e na segunda repetição a 3ª posição).

O último colocado no  $K_i$  *in vitro* para os artigos que realizaram a cristalização, foi a d-anfetamina (WANG et al., 2015), padrão também encontrado nos três cálculos de consenso e no  $K_i$  *in silico*. Para o  $K_i$  *in vitro* (PUGH et al., 2022) e para o  $CI_{50}$  *in vitro* (PÖRZGEN et al., 2001) a d-anfetamina ficou em penúltima colocação. Para esses autores, o último colocado foi a l-norepinefrina (PÖRZGEN et al., 2001; PUGH et al., 2022). Nas listas de classificação ECR+MS e FL+ECR+MS, a l-norepinefrina também ocupa as últimas posições. Na lista de classificação ECR+MS a l-norepinefrina tem a média de posição de 7,5 (na primeira repetição ocupou a 8ª posição e na segunda repetição a 7ª posição), para a lista de classificação FL+ECR+MS a l-norepinefrina tem a média de posição de 8 (em ambas as repetições esteve na 8ª posição). Na lista de classificação  $K_i$  *in silico* e ECR, a l-norepinefrina ocupa posições intermediárias. Para o  $K_i$  *in silico* tem a média de posição de 5 (em ambas as repetições esteve na 5ª posição), e para a lista de classificação ECR, tem a média de posição de 4,5 (na primeira repetição ocupou a 5ª posição e na segunda repetição a 4ª posição).

No mais, todos os outros ligantes tiveram posições intermediárias em todas as classificações. De modo geral, não foi encontrada grande diferença na lista de classificação dos ligantes entre os três cálculos de consenso, com exceção da l-norepinefrina que na lista de classificação ECR ordenou o ligante no meio da classificação.

Tabela 22. Comparação das classificações dos ligantes do ancoramento cruzado

Ligantes	ECR	ECR+MS	FL+ECR+MS	K <sub>i</sub> <i>in silico</i>	<i>In vitro</i>		
					A	B	C
3,4-Dicloro fenetilamina	4,5	6	6	8	4	NA	NA
Cocaína	2	3,5	3,5	3	8	4	3
D-anfetamina	7,5	10	9,5	8,5	9	7	5
Dopamina	5,5	7,5	8	8,5	5	5	4
L-norepinefrina	4,5	7,5	8	7	6	8	6
Metanfetamina	7	9	8,5	8	7	6	NA
Nisoxetina	2,5	3,5	3,5	5	NA	1	1
Nortriptilina	1	1,5	1	1	2	3	NA
Reboxetina	1	1,5	2	3	1	NA	NA
RTI55-Cocaína	2	5	5	3	3	2	2

Legenda: tabela comparativa com as posições que cada ligante obteve nos consensos ECR, ECR+MS e FL+ECR+MS, no K<sub>i</sub> *in silico*, no K<sub>i</sub> e CI<sub>50</sub> *in vitro*. Os **valores de A** são dados de K<sub>i</sub> obtidos dos trabalhos que realizaram a cristalização dos ligantes (PENMATSU; WANG; GOUAUX, 2013; PENMATSU; WANG; GOUAUX, 2015; PIDATHALA et al., 2021; WANG et al., 2015). Os **valores de B** são dados de K<sub>i</sub> extraídos do trabalho de Pugh et al. (2022). Os **valores de C** são dados de CI<sub>50</sub> extraídos do trabalho de Pörzgen et al. (2001). NA = não aplicável.

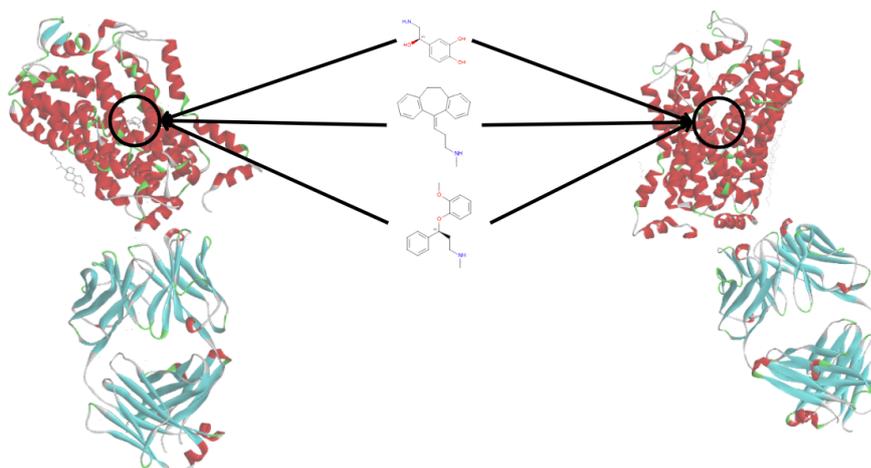
## 10. CONCLUSÃO

Nesta etapa, um dos objetivos era validar a metodologia do ancoramento molecular, para tal, usou-se o método do re-ancoramento. Para cada programa foi aplicada várias estratégias de configurações do re-ancoramento diferentes, a fim de encontrar o melhor valor de RMSD de cada ligante com seu par dDAT. O programa *Autodock 4*, foi excluído dos ancoramentos futuros devido sua incapacidade de encontrar o valor de RMSD abaixo de 2Å. A estratégia mais eficaz encontrada para cada programa foi selecionada para ancoramentos futuros. Para o ancoramento cruzado, os objetivos eram padronização do consenso do ancoramento e K<sub>i</sub> *in silico*. Foi comparada a lista de classificação dos ligantes nos consensos ECR, ECR+MS, FL+ECR+MS e K<sub>i</sub> *in silico*, com dados de K<sub>i</sub> e CI<sub>50</sub> *in vitro*. Além disso, foram realizadas duas repetições dos ancoramentos, sendo visto que os resultados mudaram entre as repetições. Por conta disso, foi definido a necessidade de repetir os ancoramentos mais de uma vez, isto é, fazer uma amostragem, nas etapas subsequentes deste estudo.

## 6. CAPÍTULO 2: CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS POR ORDEM DE AFINIDADE PELO DDAT

Neste capítulo se apresenta os métodos e resultados relacionados aos objetivos específicos 4.4, 4.5 e 4.6. Nesta etapa foi feita a classificação dos antidepressivos por ordem de afinidade pelos complexos cristalográficos dDAT usando o método de ancoramento múltiplo (do inglês *ensemble docking*). Nesta abordagem todos os ligantes de interesse são ancorados com todos os complexos cristalográficos de uma mesma macromolécula (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014) (Figura 18). Os resultados consensuais nesta etapa serão obtidos com os cálculos de consenso e de  $K_i$  *in silico* padronizados no capítulo anterior. Além disso, foi feita uma análise de sensibilidade para identificar o impacto que cada programa exerce sobre os cálculos de consenso. Por fim, para validar os cálculos de consensos ECR+MS e FL+ECR+MS comparado com o consenso ECR, foi feito o cálculo *receiver operating characteristics* (ROC) (Fórmula 6) (JAIN, 2008).

Figura 18. Representação do ancoramento múltiplo



Legenda: do lado esquerdo da figura está representado o ancoramento múltiplo entre o dDAT, de código PDB 4M48, com três ligantes. E do lado direito da figura está representado o ancoramento múltiplo entre o dDAT, de código PDB 6M2R com três ligantes. O dDAT é a estrutura maior em vermelho e azul. As setas saem dos ligantes e seguem para o local onde será realizado o ancoramento múltiplo. Imagem feita pela autora.

## 7. MATERIAL E MÉTODOS

### 7.1 ANCORAMENTO MÚLTIPLO COM OS ANTIDEPRESSIVOS

Nesta etapa, todos os 11 dDATs (baixados do PDB e *Alpha Fold*) foram atracados com os antidepressivos descritos na tabela 22 (CIPRIANI et al., 2018). Os valores de  $\Delta G$  e *fitness* da interação antidepressivo-dDAT foram usados para fazer os três cálculos do

consenso, gerando uma classificação final da interação. Por fim, o valor de  $\Delta G$  dos programas *Autodock Vina* e *DockThor*, foram usados para o cálculo da constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*. Assim, as estratégias e os programas usados nesta etapa do estudo foram definidos na etapa de padronização.

A seleção dos ligantes foi baseada no trabalho de Cipriani et al (2018) (Tabela 23). Os ligantes foram baixados em formato .mol2 do banco de dados [ZINC](#) (IRWIN; SHOICHET et al., 2005) e a busca deles se deu usando o código *InChI* retirado do *PubChem*. Cipriani et al (2018) lista 21 antidepressivos em seu trabalho, porém, ao colocar o código *InChI* no ZINC, alguns antidepressivos retornaram duas moléculas quirais, em que a diferença entre esses dois exemplares está na orientação de algumas moléculas. Com isso, terminou-se com 26 antidepressivos para este estudo. Os antidepressivos com moléculas quirais são: bupropiona, citalopram, desvenlafaxina, fluoxetina e venlafaxina. Eles foram nomeados como “nome do antidepressivo\_a” e “nome do antidepressivo\_b” (Tabela 23).

Uma vez que a cada repetição do ancoramento o resultado obtido é diferente, na etapa do ancoramento múltiplo, de forma arbitrária, os experimentos foram repetidos dez vezes (n=10) para cada par antidepressivo-dDAT, em cada programa (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 197).

Tabela 23. Lista dos antidepressivos

Antidepressivos	Código <i>InChI</i>	Link ZINC
Agomelatina	1S/C15H17NO2/c1-11(17)16-9-8-13-5-3-4-12-6-7-14(18-2)10-15(12)13/h3-7,10H,8-9H2,1-2H3,(H,16,17)	<a href="#">ZINC5608 (S20098) (docking.org)</a>
Amitriptilina	1S/C20H23N/c1-21(2)15-7-12-20-18-10-5-3-8-16(18)13-14-17-9-4-6-11-19(17)20/h3-6,8-12H,7,13-15H2,1-2H3	<a href="#">ZINC968257 (Amitriptyline) (docking.org)</a>
Bupropiona	1S/C13H18ClNO/c1-9(15-13(2,3)4)12(16)10-6-5-7-11(14)8-10/h5-9,15H,1-4H3	a- <a href="#">ZINC20228 (Bupropion) (docking.org)</a>
		b- <a href="#">ZINC57206 (Bupropion) (docking.org)</a>
Citalopram	1S/C20H21FN2O/c1-23(2)11-3-10-20(17-5-7-18(21)8-6-17)19-9-4-15(13-22)12-16(19)14-24-20/h4-9,12H,3,10-11,14H2,1-2H3	a- <a href="#">ZINC3794601 (Citalopram) (docking.org)</a>
		b- <a href="#">ZINC22055003 (Citalopram N-Oxide) (docking.org)</a>
Clomipramina	1S/C19H23ClN2/c1-21(2)12-5-13-22-18-	<a href="#">ZINC20248 (Clomipramine)</a>

	7-4-3-6-15(18)8-9-16-10-11-17(20)14-19(16)22/h3-4,6-7,10-11,14H,5,8-9,12-13H2,1-2H3	<a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Desvenlafaxina	1S/C16H25NO2/c1-17(2)12-15(13-6-8-14(18)9-7-13)16(19)10-4-3-5-11-16/h6-9,15,18-19H,3-5,10-12H2,1-2H3	a- <a href="http://ZINC9342">ZINC9342</a> <a href="http://Desvenlafaxine">(<a href="http://Desvenlafaxine">Desvenlafaxine</a>)</a> <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
		b- <a href="http://ZINC2525885">ZINC2525885</a> <a href="http://Desvenlafaxine">(<a href="http://Desvenlafaxine">Desvenlafaxine</a>)</a> <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Duloxetina	1S/C18H19NOS/c1-19-12-11-17(18-10-5-13-21-18)20-16-9-4-7-14-6-2-3-8-15(14)16/h2-10,13,17,19H,11-12H2,1H3/t17-/m0/s1	<a href="http://ZINC1536779">ZINC1536779</a> ( <a href="http://Duloxetine">Duloxetine</a> ) <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Escitalopram	1S/C20H21FN2O/c1-23(2)11-3-10-20(17-5-7-18(21)8-6-17)19-9-4-15(13-22)12-16(19)14-24-20/h4-9,12H,3,10-11,14H2,1-2H3/t20-/m0/s1	<a href="http://ZINC3800706">ZINC3800706</a> ( <a href="http://Citalopram">Citalopram</a> ) <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Fluoxetina	1S/C17H18F3NO/c1-21-12-11-16(13-5-3-2-4-6-13)22-15-9-7-14(8-10-15)17(18,19)20/h2-10,16,21H,11-12H2,1H3	a- <a href="http://ZINC1530637">ZINC1530637</a> <a href="http://Fluoxetine">(<a href="http://Fluoxetine">Fluoxetine</a>)</a> ( <a href="http://docking.org">docking.org</a> )
		b- <a href="http://ZINC1530638">ZINC1530638</a> <a href="http://Fluoxetine">(<a href="http://Fluoxetine">Fluoxetine</a>)</a> ( <a href="http://docking.org">docking.org</a> )
Fluvoxamina	1S/C15H21F3N2O2/c1-21-10-3-2-4-14(20-22-11-9-19)12-5-7-13(8-6-12)15(16,17)18/h5-8H,2-4,9-11,19H2,1H3/b20-14+	<a href="http://ZINC3872605">ZINC3872605</a> <a href="http://Fluvoxamine">(<a href="http://Fluvoxamine">Fluvoxamine</a>)</a> ( <a href="http://docking.org">docking.org</a> )
Levomilnacipram	1S/C15H22N2O/c1-3-17(4-2)14(18)15(10-13(15)11-16)12-8-6-5-7-9-12/h5-9,13H,3-4,10-11,16H2,1-2H3/t13-,15+/m0/s1	<a href="http://ZINC506">ZINC506</a> ( <a href="http://Milnacipran">Milnacipran</a> ) <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Milnaciprano	1S/C15H22N2O/c1-3-17(4-2)14(18)15(10-13(15)11-16)12-8-6-5-7-9-12/h5-9,13H,3-4,10-11,16H2,1-2H3	<a href="http://ZINC14037">ZINC14037</a> ( <a href="http://Milnacipran">Milnacipran</a> ) <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Mirtazapina	1S/C17H19N3/c1-19-9-10-20-16(12-19)15-7-3-2-5-13(15)11-14-6-4-8-18-17(14)20/h2-8,16H,9-12H2,1H3	<a href="http://ZINC509">ZINC509</a> ( <a href="http://Mirtazapine">Mirtazapine</a> ) <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Nefazodona	1S/C25H32ClN5O2/c1-2-24-27-31(25(32)30(24)18-19-33-23-10-4-3-5-11-23)13-7-12-28-14-16-29(17-15-28)22-9-6-8-21(26)20-22/h3-6,8-11,20H,2,7,12-19H2,1H3	<a href="http://ZINC538065">ZINC538065</a> ( <a href="http://Nefazodone">Nefazodone</a> ) <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>
Paroxetina	1S/C19H20FNO3/c20-15-3-1-13(2-4-15)17-7-8-21-10-14(17)11-22-16-5-6-18-19(9-16)24-12-23-18/h1-6,9,14,17,21H,7-8,10-12H2/t14-,17-/m0/s1	<a href="http://ZINC527386">ZINC527386</a> ( <a href="http://Paroxetine">Paroxetine</a> ) <a href="http://docking.org">(<a href="http://docking.org">docking.org</a>)</a>

Reboxetina	1S/C19H23NO3/c1-2-21-16-10-6-7-11-17(16)23-19(15-8-4-3-5-9-15)18-14-20-12-13-22-18/h3-11,18-20H,2,12-14H2,1H3/t18-,19-/m0/s1	<a href="https://docking.org/ZINC3996032">ZINC3996032</a> (Reboxetine) (docking.org)
Sertralina	1S/C17H17Cl2N/c1-20-17-9-7-12(13-4-2-3-5-14(13)17)11-6-8-15(18)16(19)10-11/h2-6,8,10,12,17,20H,7,9H2,1H3/t12-,17-/m0/s1	<a href="https://docking.org/ZINC1853550">ZINC1853550</a> (Sertraline) (docking.org)
Trazodona	1S/C19H22ClN5O/c20-16-5-3-6-17(15-16)23-13-11-22(12-14-23)8-4-10-25-19(26)24-9-2-1-7-18(24)21-25/h1-3,5-7,9,15H,4,8,10-14H2	<a href="https://docking.org/ZINC538483">ZINC538483</a> (Trazodone) (docking.org)
Venlafaxina	1S/C17H27NO2/c1-18(2)13-16(17(19)11-5-4-6-12-17)14-7-9-15(20-3)10-8-14/h7-10,16,19H,4-6,11-13H2,1-3H3	a- <a href="https://docking.org/ZINC6016">ZINC6016</a> (Effexor) (docking.org)
		b- <a href="https://docking.org/ZINC896698">ZINC896698</a> (Effexor) (docking.org)
Vilazodona	1S/C26H27N5O2/c27-16-18-4-6-23-22(13-18)19(17-29-23)3-1-2-8-30-9-11-31(12-10-30)21-5-7-24-20(14-21)15-25(33-24)26(28)32/h4-7,13-15,17,29H,1-3,8-12H2,(H2,28,32)	<a href="https://docking.org/ZINC1542113">ZINC1542113</a> (Vilazodone) (docking.org)
Vortioxetina	1S/C18H22N2S/c1-14-7-8-17(15(2)13-14)21-18-6-4-3-5-16(18)20-11-9-19-10-12-20/h3-8,13,19H,9-12H2,1-2H3	<a href="https://docking.org/ZINC34051848">ZINC34051848</a> (Vortioxetine) (docking.org)

Legenda: lista de ligantes antidepressivos baseando no artigo do Cipriani et al (2018). Na primeira coluna temos os antidepressivos por ordem alfabética, na segunda coluna o código *InChI* retirado do *PubChem*, na terceira coluna o *link* para o ZINC, plataforma onde foi baixado os ligantes. Quando o código *InChI* retornou mais de uma estrutura, foi baixado todas as moléculas encontradas. Os antidepressivos com mais de um representante são: bupropiona, citalopram, desvenlafaxina, fluoxetina e venlafaxina.

### 7.1.1 Consenso do ancoramento e constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*

Visando comparar a classificação gerada por cada cálculo de consenso, é aplicada as três formas: ECR, ECR+MS e FL+ECR+MS.

Tanto para os cálculos de consenso quanto para o  $K_i$  *in silico*, foi aplicado uma média entre as 10 repetições. Uma vez que foram realizadas 10 repetições dos ancoramento, tem-se 10 listas de classificação da afinidade dos antidepressivos pelo dDAT. Por conta disso, as 10 listas foram unidas em uma única classificação usando a análise de tendência central média simples e a análise de dispersão erro padrão da média (SEM). Como produto final, foi gerada uma única classificação da afinidade dos antidepressivos pelo dDAT para cada forma de consenso.

## 7.2 ANÁLISE DA SENSIBILIDADE

Com os mesmos dados obtidos no ancoramento múltiplo, foram realizados os três cálculos de consenso – ECR, ECR+MS e FL+ECR+MS – usando dois programas de cada vez. Com isso, foi gerado três cenários: 1- consenso entre os programas *Autodock Vina* e *DockThor* (*Gold* ausente); 2- consenso entre os programas *Autodock Vina* e *Gold* (*DockThor* ausente); 3- consenso entre os programas *Gold* e *DockThor* (*Autodock Vina* ausente).

## 7.3 VALIDAÇÃO DO CÁLCULO DO CONSENSO DO ANCORAMENTO

As macromoléculas e os parâmetros de configuração do ancoramento continuam sendo os mesmos empregados nas outras etapas e definido no re-ancoramento. Nesta etapa, estão presentes os mesmos antidepressivos usados na etapa anterior (os 26 antidepressivos), entretanto, é adicionado os *decoys*. *Decoys*, ou falsos ligantes, foram usados para validar o cálculo de consenso desenvolvido. Os *decoys* foram gerados usando o banco de dados [DUD-E](#) (MYSINGER et al., 2012), através do código SMILE de cada um dos 26 ligantes antidepressivos. O código SMILE foi retirado do *PubChem*.

Por mais que foram usados apenas 26 códigos SMILES, o DUD-E retornou 31 arquivos, i.e., para alguns antidepressivos, o DUD-E gerou mais de um arquivo com *decoys*. Sendo que dentro de cada arquivo continha 50 *decoys*, totalizando 1550 *decoys*. Estes arquivos vieram em formato *picked*, sendo necessário preparar os *decoys* antes do ancoramento molecular. A preparação consistiu em basicamente converter os *decoys* em formato *.pdbqt* para o programa *Autodock Vina* e *.mol* para os programas *DockThor* e *Gold*. A conversão iniciou na troca da extensão de cada um dos 31 arquivos de *picked* para *sdf*, após, com ajuda do programa *Open Babel*, os arquivos foram convertidos de *.sdf* para *.pdbqt* ou *.mol*. Por fim, o último passo foi retirar os 50 *decoys* de dentro do arquivo, ou seja, transformar os 31 arquivos em 1550 arquivos. No [link](#) encontrasse o passo a passo detalhado do preparo dos *decoys*.

Com intuito de rastrear qual código SMILE gerou cada *decoy*, nomeamos os *decoys* iniciando com a numeração de 1 a 31, referenciando os 31 arquivos, seguindo por “*decoys*” e terminado pela numeração de 1 a 50, o que se refere aos 50 *decoys* que vieram dentro de cada arquivo. Como exemplo o *decoy* “*1decoys10*”, esse *decoy* é o ligante de número 10 do arquivo 1.

Para o programa *Autodock Vina*, foram realizadas duas repetições de ancoragem molecular. Após a obtenção do resultado da primeira repetição, foi realizada uma análise visual do valor de  $\Delta G$  (para os programas *Autodock Vina* e *DockThor*) e *fitness* (para o

programa *Gold*) de cada par antidepressivo-dDAT do ancoramento molecular com os *decoys*. Essa análise mostrou que os valores de  $\Delta G$  para o *Autodock Vina* estavam bastante distintos dos valores obtidos nas 10 repetições realizadas na etapa de ancoramento múltiplo somente com os antidepressivos. Por conta disso, foi decidido realizar mais uma repetição do ancoramento múltiplo com os *decoys* para o programa *Autodock Vina*.

Antes de iniciar a análise dos resultados da segunda repetição, decidiu-se usar para validação dos cálculos de consenso os resultados da segunda repetição, independentemente de qual valor seria obtido.

Devido a quantidade massiva de resultados, a coleta dos dados foi realizada de maneira automatizada. No programa *Autodock Vina*, usou-se um *script* do *Python* de coleta de dados, e para os demais programas, foi usado ferramentas do próprio *Excel*. No [link](#) encontrasse o detalhamento e o passo-a-passo usado.

Após o ancoramento molecular, foram aplicados os três cálculos do consenso, ECR, ECR+MS, FL+ECR+MS. Como produto final, foi gerado três classificações da afinidade dos antidepressivos e *decoys* pelo dDAT.

### 7.3.1 Métrica de validação do consenso

Para o ROC foram usados 5 níveis de porcentagens diferentes de dados, foi analisado quantos ligantes antidepressivos e quantos *decoys* foram posicionados nos primeiros 1%, 2%, 5%, 10%, 20% e 50% do banco de dados.

Na fórmula do ROC, o valor de  $y$  indica os verdadeiros positivos, i.e., esperasse que no subconjunto (1%, 2%, 5%, 10%, 20% ou 50%) escolhido do banco de dados, 100% dos ligantes sejam os ligantes de interesse, neste caso, os antidepressivos (JAIN, 2008). O inverso é para o valor de  $x$ , que representa os falsos positivos, e espera-se que no subconjunto escolhido (1%, 2%, 5%, 10%, 20% ou 50%), 0% seja falso positivo (JAIN, 2008) (Fórmula 6).

$$y = \frac{L_t}{N_L}$$

**Fórmula 6:**

$$x = \frac{D_t}{N_D}$$

Sendo que:

- $L_t$  é a quantidade de ligantes verdadeiros, os antidepressivos, do subconjunto selecionado (1%, 2%, 5%, 10%, 20% ou 50%);
- $N_L$  é a quantidade total de ligantes verdadeiros (26 antidepressivos);
- $D_t$  é o número de *decoys* do subconjunto selecionado (1%, 2%, 5%, 10%, 20% ou 50%);
- $N_D$  é a quantidade total de *decoys* (1550 *decoys*).

O banco de dados tem no total de 1576 ligantes, sendo 26 antidepressivos e 1550 *decoys*. 1% do banco de dados é igual a 15,76%, sendo arredondado para 16 ligantes. 2% é igual a 31,52%, sendo arredondado para 32 ligantes. 5% é igual a 78,8, sendo arredondado para 79 ligantes. 10% é igual 157,6, sendo arredondado para 158 ligantes. 20% é igual a 315,2, sendo arredondado para 315 ligantes. E por fim, 50% do banco de dados é 788 ligantes. Com isso, foi contado quantos antidepressivos e quantos *decoys* havia nas primeiras 16, 32, 79, 158 e 788 colocações.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 ANCORAMENTO MÚLTIPLO COM OS ANTIDEPRESSIVOS

#### 8.1.1 Consenso do ancoramento

Para visualizar os valores individuais obtidos do ancoragem de cada par antidepressivo-dDAT, nos três programas, bem como o cálculo detalhado dos três consensos, basta clicar no *link* para acessar os valores da repetição [1](#), [2](#), [3](#), [4](#), [5](#), [6](#), [7](#), [8](#), [9](#), [10](#).

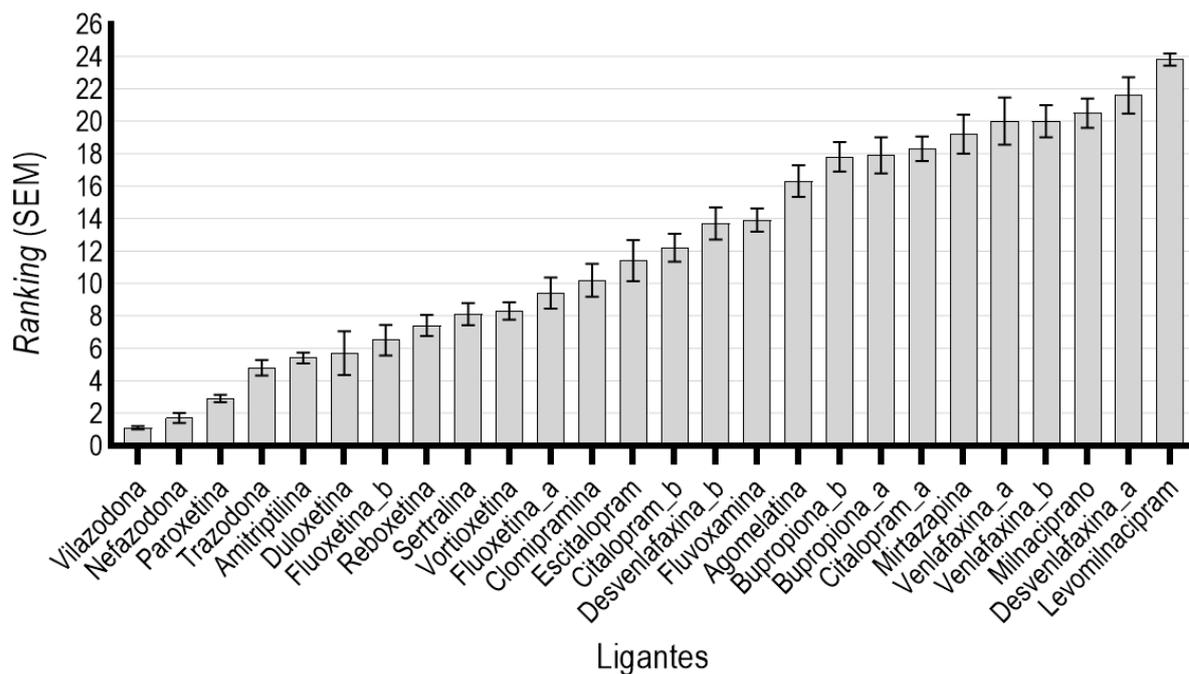
Na lista de classificação ECR, nas três primeiras posições está a vilazodona (1,1±0,005), nefazodona (1,7±0,300) e paroxetina (2,9±0,233). Nas três últimas posições está o antidepressivo milnaciprano (20,5±0,898), na penúltima colocação está a desvenlafaxina\_a (21,6±1,127) e na ECR+MS na 21ª posição, e em último colocado o levomilnacipram (23,8±0,359) (Tabela 24 e Gráfico 5).

Tabela 24. Lista de classificação ECR para o ancoramento múltiplo

<b>Antidepressivos</b>	<b>Média</b>	<b>Erro padrão da média</b>
Vilazodona	1,1	0,100
Nefazodona	1,7	0,300
Paroxetina	2,9	0,233
Trazodona	4,8	0,467
Amitriptilina	5,4	0,340
Duloxetina	5,7	1,350
Fluoxetina_b	6,5	0,934
Reboxetina	7,4	0,653
Sertralina	8,1	0,690
Vortioxetina	8,3	0,539
Fluoxetina_a	9,4	0,957
Clomipramina	10,2	1,020
Escitalopram	11,4	1,267
Citalopram_b	12,2	0,854
Desvenlafaxina_b	13,7	0,989
Fluvoxamina	13,9	0,706
Agomelatina	16,3	0,978
Bupropiona_b	17,8	0,904
Bupropiona_a	17,9	1,120
Citalopram_a	18,3	0,761
Mirtazapina	19,2	1,200
Venlafaxina_a	20,0	1,453
Venlafaxina_b	20,0	0,978
Milnaciprano	20,5	0,898
Desvenlafaxina_a	21,6	1,127
Levomilnacipram	23,8	0,359

Legenda: classificação da afinidade entre os antidepressivos pelo dDAT usando como forma de consenso ECR. Na primeira coluna estão os antidepressivos, na segunda coluna a classificação que cada antidepressivo ocupa, sendo o primeiro colocado o antidepressivo de maior afinidade pelo dDAT e o último colocado de menor afinidade, na terceira coluna é o erro padrão da média.

Gráfico 5. Lista de classificação ECR para o ancoramento múltiplo



Legenda: Lista de classificação ECR. Classificação média  $\pm$  erro padrão da média das 10 repetições de ancoramento múltiplo entre os 27 antidepressivos e os 11 dDATs. No eixo Y é a classificação de 0 à 24, no eixo X são os ligantes. A barra representa a posição que o antidepressivo obteve, podendo variar entre 1 à 24.

Para a lista de classificação ECR+MS, as três primeiras posições são ocupadas pelos antidepressivos vilazodona ( $1,0 \pm 0,000$ ), nefazodona ( $2,0 \pm 0,000$ ) e paroxetina ( $3,4 \pm 0,221$ ), e as três últimas pelos antidepressivos levomilnacipram ( $23,5 \pm 0,269$ ), bupropiona\_a ( $24,9 \pm 0,379$ ) e bupropiona\_b ( $25,6 \pm 0,221$ ) (Tabela 25, Gráfico 6).

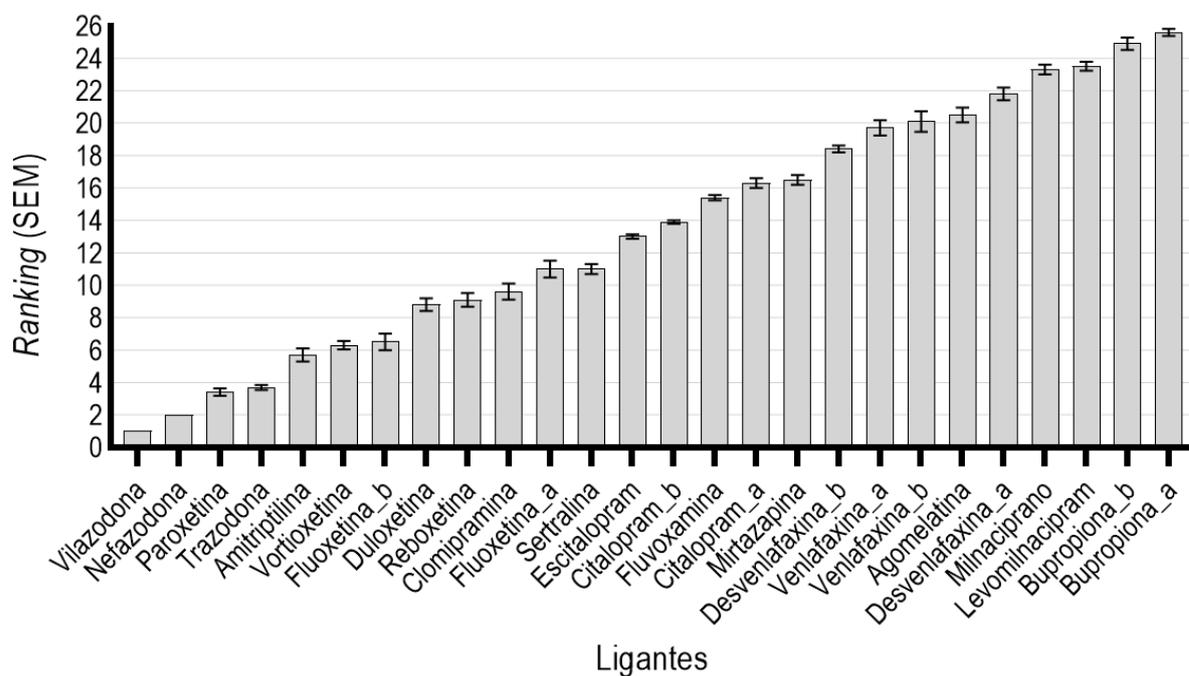
Tabela 25. Lista de classificação ECR+MS para o ancoramento múltiplo

Antidepressivos	Classificação Média	Erro padrão da média
Vilazodona	1,0	0,000
Nefazodona	2,0	0,000
Paroxetina	3,4	0,221
Trazodona	3,7	0,153
Vortioxetina	5,7	0,396
Amitriptilina	6,3	0,260
Fluoxetina_b	6,5	0,500
Duloxetina	8,8	0,389
Reboxetina	9,1	0,433
Clomipramina	9,6	0,499

Fluoxetina_a	11,0	0,516
Sertralina	11,0	0,298
Escitalopram	13,0	0,149
Citalopram_b	13,9	0,100
Fluvoxamina	15,4	0,163
Citalopram_a	16,3	0,300
Mirtazapina	16,5	0,307
Desvenlafaxina_b	18,4	0,221
Venlafaxina_a	19,7	0,473
Venlafaxina_b	20,1	0,623
Agomelatina	20,5	0,453
Desvenlafaxina_a	21,8	0,389
Milnaciprano	23,3	0,300
Levomilnacipram	23,5	0,269
Bupropiona_b	24,9	0,379
Bupropiona_a	25,6	0,221

Legenda: classificação da afinidade entre os antidepressivos pelo dDAT usando como forma de ECR+MS. Na primeira coluna estão os antidepressivos, na segunda coluna a posição que cada antidepressivo ocupa, sendo o primeiro colocado o antidepressivo de maior afinidade pelo dDAT e o último colocado de menor afinidade, na terceira coluna é o erro padrão da média.

Gráfico 6. Lista de classificação ECR+MS para o ancoramento múltiplo



Legenda: Consenso ECR+MS. Classificação média  $\pm$  erro padrão da média das dez repetições de ancoramento múltiplo entre os 27 antidepressivos e os 11 dDATs. No eixo Y é a classificação de 1 à 27, no eixo X são os ligantes. A barra representa a posição que o antidepressivo obteve, podendo variar entre 1 à 26.

Para a lista de classificação FL+ECR+MS, nas três primeiras posições também estão a vilazodona (0,07 $\pm$ 0,005), nefazodona (0,038 $\pm$ 0,013) e paroxetina (0,311 $\pm$ 0,013). Nas três últimas posições, está o milnaciprano (0,841 $\pm$ 0,011), e as últimas duas posições são idênticas ao consenso anterior bupropiona\_b (0,949 $\pm$ 0,014) e bupropiona\_a (0,997 $\pm$ 0,003) (Tabela 26 e Gráfico 7).

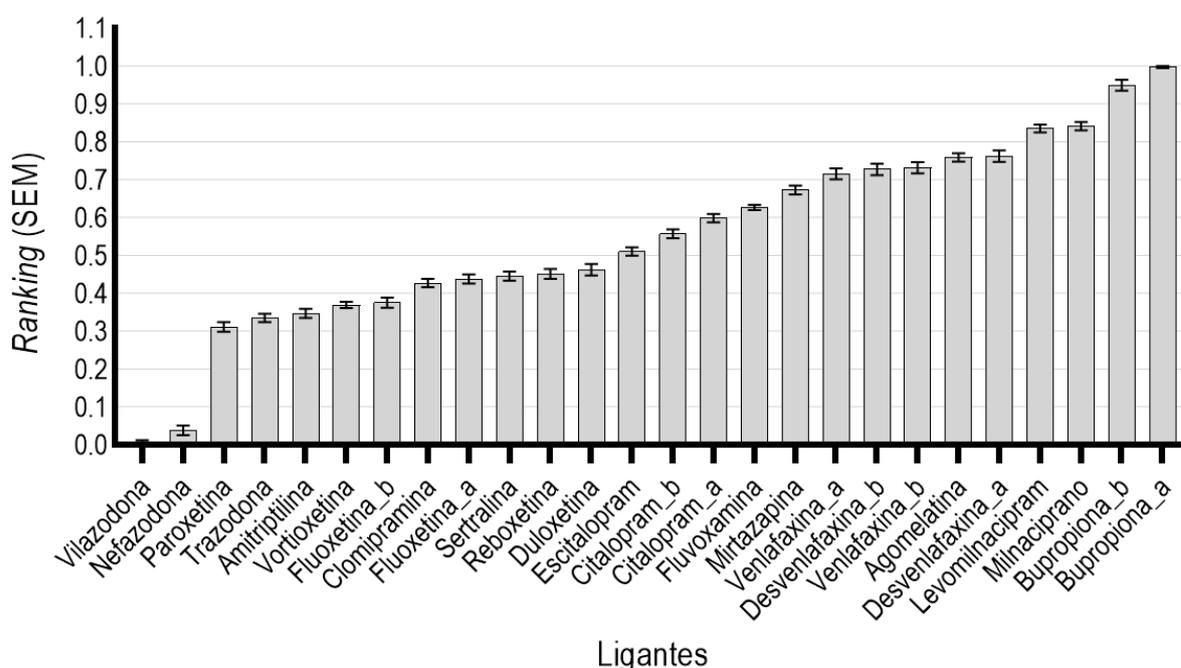
Tabela 26. Lista de classificação FL+ECR+MS para o ancoramento múltiplo

<b>Antidepressivos</b>	<b>Média</b>	<b>Erro padrão da média</b>	<b>Classificação</b>
Vilazodona	0,007	0,005	1
Nefazodona	0,038	0,013	2
Paroxetina	0,311	0,013	3
Trazodona	0,335	0,011	4
Amitriptilina	0,347	0,012	5
Vortioxetina	0,369	0,008	6
Fluoxetina_b	0,375	0,013	7
Clomipramina	0,427	0,011	8
Fluoxetina_a	0,438	0,012	9
Sertralina	0,445	0,012	10
Reboxetina	0,451	0,013	11
Duloxetina	0,462	0,015	12
Escitalopram	0,510	0,011	13
Citalopram_b	0,557	0,012	14
Citalopram_a	0,598	0,011	15
Fluvoxamina	0,626	0,007	16
Mirtazapina	0,672	0,012	17
Venlafaxina_a	0,715	0,014	18
Desvenlafaxina_b	0,727	0,015	19
Venlafaxina_b	0,731	0,015	20
Agomelatina	0,759	0,011	21
Desvenlafaxina_a	0,762	0,015	22
Levomilnacipram	0,835	0,010	23

Milnaciprano	0,841	0,011	24
Bupropiona_b	0,949	0,014	25
Bupropiona_a	0,997	0,003	26

Legenda: classificação da afinidade entre os antidepressivos pelo dDAT usando como forma de consenso FL+ECR+MS. Na primeira coluna estão os antidepressivos, na segunda e quarta coluna a posição que cada antidepressivo ocupa, sendo o primeiro colocado o antidepressivo de maior afinidade pelo dDAT e o último colocado de menor afinidade, na terceira coluna é o erro padrão da média.

Gráfico 7. Lista de classificação FL+ECR+MS para o ancoramento múltiplo



Legenda: Consenso FL+ECR+MS. Classificação média  $\pm$  erro padrão da média das 10 repetições de ancoramento múltiplo entre os 27 antidepressivos e os 11 dDATs. No eixo Y é a classificação de 0 à 1.0, no eixo X são os ligantes. A barra representa a posição que o antidepressivo obteve, podendo variar entre 0 à 1.0.

### 8.1.2 Constante de inibição ( $K_i$ ) *in silico*

O cálculo de  $K_i$  *in silico* foi produzido usando os valores de  $\Delta G$  dos programas *Autodock Vina* e *DockThor*. Os dados são apresentados em micro molar ( $\mu M$ ) da média  $\pm$  erro padrão da média das dez repetições de ancoragem. Para acessar os valores individuais obtidos de cada par de ancoragem antidepressivo-dDAT, nos programas, para cada uma das repetições, bem como o cálculo detalhado do  $K_i$  *in silico*, basta clicar neste [link](#).

Retirar o resultado dos ancoramentos gerados pelo *Gold* do cálculo de  $K_i$  *in silico* impactou na ordenação dos antidepressivos, quando comparado com as classificações dos consensos. Aqui, a primeira posição é ocupada pela amitriptilina, que ocupa a 5ª na lista de classificação ECR e FL+ECR+MS e 6ª na lista de classificação ECR+MS. A vilazodona, primeira colocada em todos os consensos, está na terceira posição, com uma diferença de 4

$\mu\text{M}$  para a amitriptilina. A colocação dos antidepressivos nas últimas posições é mais similar com a classificação dos consensos, sendo milnaciprano na 24<sup>a</sup> posição, bupropiona\_a na 25<sup>a</sup> posição e levomilnacipram na 26<sup>a</sup> posição (Tabela 27, Gráfico 8).

Da 1<sup>a</sup> (amitriptilina) posição a 14<sup>a</sup> (nefazodona), a diferença em  $\mu\text{M}$  entre os antidepressivos não passa de 10  $\mu\text{M}$ . A diferença em  $\mu\text{M}$  entre os antidepressivos começa a aumentar da 14<sup>a</sup> posição à 17<sup>a</sup> posição (desvenlafaxina), com uma distância de 22-25  $\mu\text{M}$ . Entre a 17<sup>a</sup> colocada e a 18<sup>a</sup> (desvenlafaxina\_b) a distância é de 66  $\mu\text{M}$ . Da 18<sup>a</sup> posição à 22<sup>a</sup> posição (fluvoxamina), novamente é possível ver uma baixa diferença, não passando de 25  $\mu\text{M}$ . A maior diferença no valor de  $K_i$  *in silico* está da 22<sup>a</sup> posição (fluvoxamina) a 23<sup>a</sup> posição (bupropiona\_b), com uma distância de 232  $\mu\text{M}$ . Da 23<sup>a</sup> posição à última, 26<sup>a</sup> (levomilnacipram), novamente nota-se uma pequena variação no  $K_i$  *in silico*, com diferença de no máximo 19  $\mu\text{M}$  (Tabela 27, Gráfico 8).

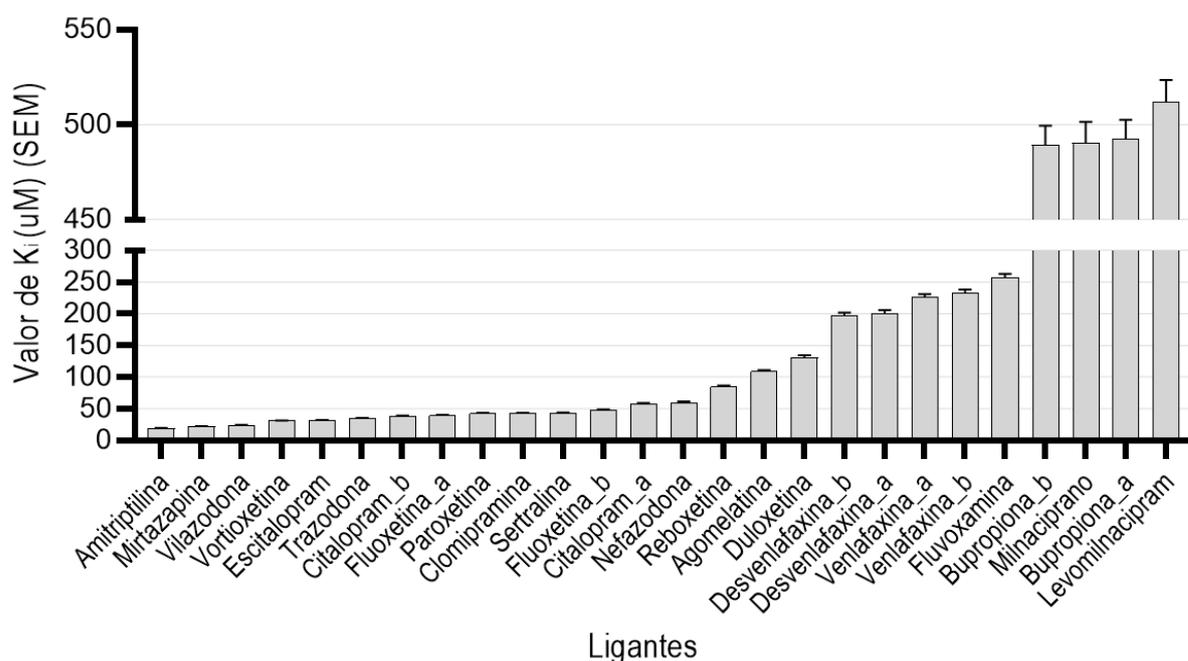
Tabela 27.  $K_i$  *in silico* do ancoramento múltiplo

<b>Antidepressivos</b>	<b>Média <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Desvio padrão <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>Classificação</b>
Amitriptilina	19,112	0,582	1
Mirtazapina	21,904	0,430	2
Vilazodona	23,950	0,837	3
Vortioxetina	30,972	0,818	4
Escitalopram	31,753	0,613	5
Trazodona	34,447	0,789	6
Citalopram_b	38,399	0,677	7
Fluoxetina_a	39,364	1,010	8
Paroxetina	42,362	1,056	9
Clomipramina	42,629	0,998	10
Sertralina	43,186	0,948	11
Fluoxetina_b	47,589	1,236	12
Citalopram_a	57,734	1,208	13
Nefazodona	59,729	1,655	14
Reboxetina	84,760	2,128	15
Agomelatina	109,059	2,154	16
Duloxetina	131,315	3,095	17
Desvenlafaxina_b	197,647	4,474	18
Desvenlafaxina_a	201,001	4,673	19

Venlafaxina_a	225,641	5,305	20
Venlafaxina_b	233,005	5,295	21
Fluvoxamina	257,147	5,967	22
Bupropiona_b	489,227	10,305	23
Milnaciprano	490,437	10,967	24
Bupropiona_a	492,509	9,995	25
Levomilnacipram	511,888	11,478	26

Legenda: classificação  $K_i$  da afinidade entre os antidepressivos pelo dDAT. Na primeira coluna estão os antidepressivos, na segunda coluna a média do  $K_i$   $\mu\text{M}$ , sendo o antidepressivo de maior afinidade pelo dDAT aquele com menor valor de  $K_i$ , e o de menor afinidade o com maior valor de  $K_i$ , na terceira está a métrica de dispersão dos dados e na quarta coluna a classificação.

Gráfico 8.  $K_i$  *in silico* do ancoramento múltiplo



Legenda: Valores da média±erro padrão da média do valor da constante de inibição ( $K_i$ ) para o ancoramento múltiplo entre os 26 antidepressivos e os 11 dDAT obtidos no *Autodock Vina* e no *DockThor*. Dados apresentados em micro molar (uM). No eixo Y é o valor de  $K_i$  e no eixo X os antidepressivos. A ordem dos ligantes está do mais baixo valor de  $K_i$  para o mais alto valor de  $K_i$ . A barra representa o valor de  $K_i$  que o ligante obteve.

## 8.2 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS PROGRAMAS

Quando se olha a classificação do  $K_i$  *in silico* - que foi realizado com somente os programas *Autodock Vina* e *DockThor* -, a amitriptilina e mirtazapina estão na primeira e segunda posição, respectivamente. Ao retirar os dados do *Autodock Vina* do cálculo dos três consensos, estes antidepressivos caem na classificação nas três formas de consenso, ficando piores colocadas na afinidade com o dDAT (Tabela 28). Bem como, ao conduzir os cálculos

dos três consensos retirando o *Gold* ou o *DockThor*, esses mesmos antidepressivos sobem de posição. Em suma, independentemente se é retirado o *Gold* ou o *DockThor*, se os dados do *Autodock Vina* estiverem presentes, este programa será responsável por subir de posição a amitriptilina e mirtazapina na classificação (Tabela 28).

Nas últimas duas posições da classificação  $K_i$  *in silico* temos o levomilnacipram e a bupropiona\_a. Para o levomilnacipram, ao comparar com o consenso conduzido com os três programas, remover o programa *Autodock Vina* deixou o antidepressivo mais bem posicionado em qualquer um dos três consensos (Tabela 28). Para a lista de classificação ECR, remover qualquer um dos três programas do cálculo melhorou a posição do levomilnacipram, também subiu de posição na lista de classificação ECR+MS ao remover o programa *DockThor*. Para os demais, o antidepressivo permaneceu na mesma posição na classificação (Tabela 28, Gráfico 9, 10 e 11). Para a bupropiona\_a, na lista de classificação ECR e ECR+MS, o efeito de retirar qualquer programa foi similar ao levomilnacipram, o antidepressivo subiu de posição, sendo que para a lista de classificação ECR mais pronunciado a mudança na classificação que para a lista de classificação ECR+MS (Tabela 28, Gráfico 9, 10 e 11). Diferente para a lista de classificação FL+ECR+MS, que com exceção da remoção do *Autodock Vina*, que subiu uma posição, para os demais programas o antidepressivo permaneceu com a mesma classificação ou piorou (Tabela 28, Gráfico 9, 10 e 11).

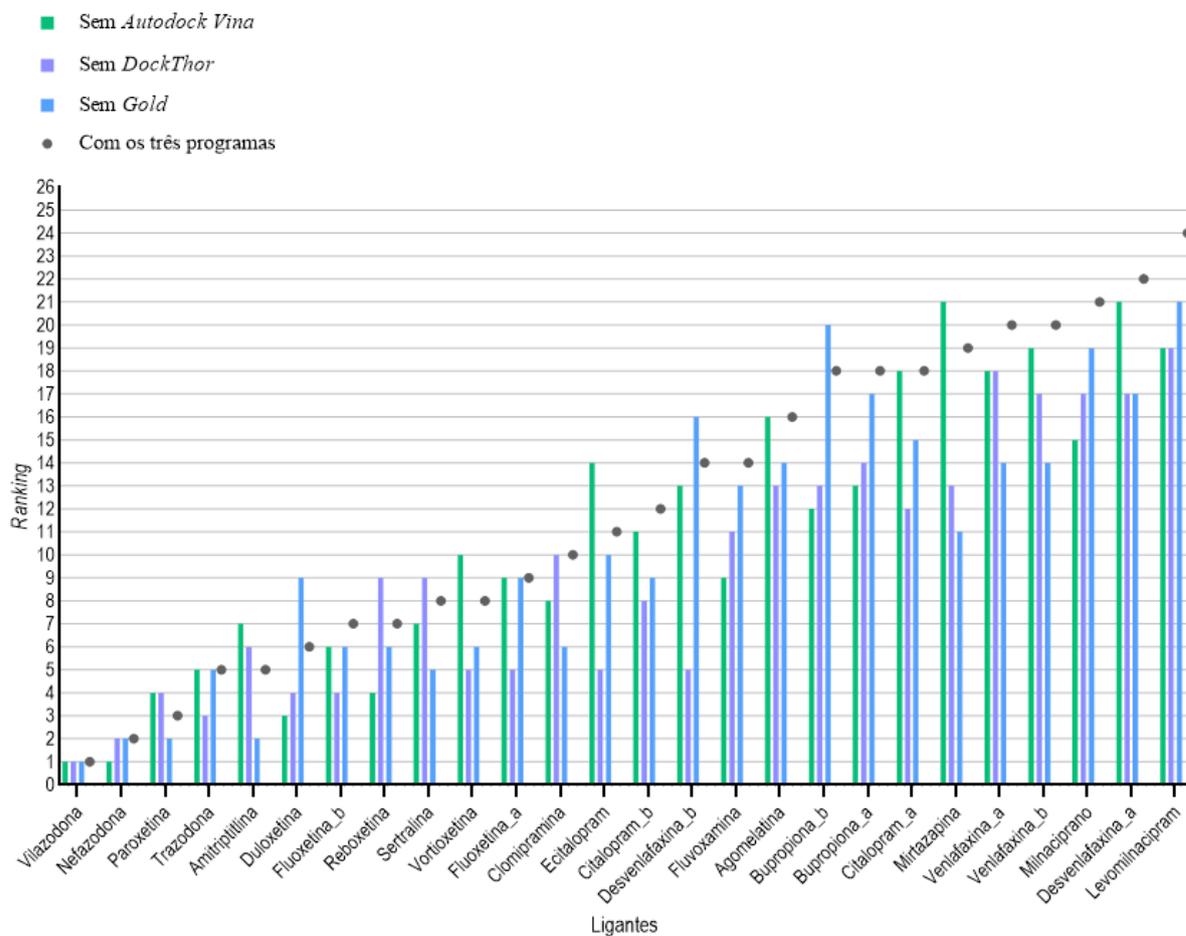
Tabela 28. Ordenação dos antidepressivos na análise de sensibilidade

Consensos		ECR				ECR+MS				FL+ECR+MS			
Antidepressivos/Programas	$K_i$ <i>in silico</i>	3	A	D	G	3	A	D	G	3	A	D	G
		<b>Agomelatina</b>	16	16	16	13	14	21	22	20	20	21	23
<b>Amitriptilina</b>	1	5	7	6	2	6	10	5	4	5	12	3	4
<b>Bupropiona_a</b>	25	18	13	14	17	26	25	25	25	26	26	25	26
<b>Bupropiona_b</b>	23	18	12	13	20	25	23	25	24	25	24	26	25
<b>Citalopram_a</b>	13	18	18	12	15	16	17	14	16	15	17	13	16
<b>Citalopram_b</b>	7	12	11	8	9	14	15	12	14	14	15	12	14
<b>Clomipramina</b>	10	10	8	10	6	10	9	10	9	8	9	11	9
<b>Desvenlafaxina_a</b>	19	22	21	17	17	22	22	20	22	22	22	19	22
<b>Desvenlafaxina_b</b>	18	14	13	5	16	18	18	18	20	19	20	18	21
<b>Duloxetina</b>	17	6	3	4	9	9	6	6	14	12	5	10	15
<b>Escitalopram</b>	5	11	14	5	10	13	14	9	12	13	14	8	12

<b>Fluoxetina_a</b>	8	9	9	5	9	11	11	9	11	9	11	7	11
<b>Fluoxetina_b</b>	12	7	6	4	6	7	6	8	8	7	6	9	8
<b>Fluvoxamina</b>	22	14	9	11	13	15	13	17	18	16	13	17	19
<b>Levomilnacipram</b>	26	24	19	19	21	24	20	24	23	23	19	23	23
<b>Milnaciprano</b>	24	21	15	17	19	23	20	23	23	24	21	24	24
<b>Mirtazapina</b>	2	19	21	13	11	17	24	14	12	17	25	16	13
<b>Nefazodona</b>	14	2	1	2	2	2	1	2	3	2	1	2	2
<b>Paroxetina</b>	9	3	4	4	2	3	3	7	3	3	3	6	3
<b>Reboxetina</b>	15	7	4	9	6	9	7	13	10	11	7	14	10
<b>Sertralina</b>	11	8	7	9	5	11	10	15	7	10	10	15	6
<b>Trazodona</b>	6	5	5	3	5	4	5	4	6	4	4	4	7
<b>Venlafaxina_a</b>	20	20	18	18	14	20	17	22	18	18	16	21	17
<b>Venlafaxina_b</b>	21	20	19	17	14	20	18	22	18	20	18	22	18
<b>Vilazodona</b>	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1
<b>Vortioxetina</b>	4	8	10	5	6	6	8	6	5	6	8	5	5

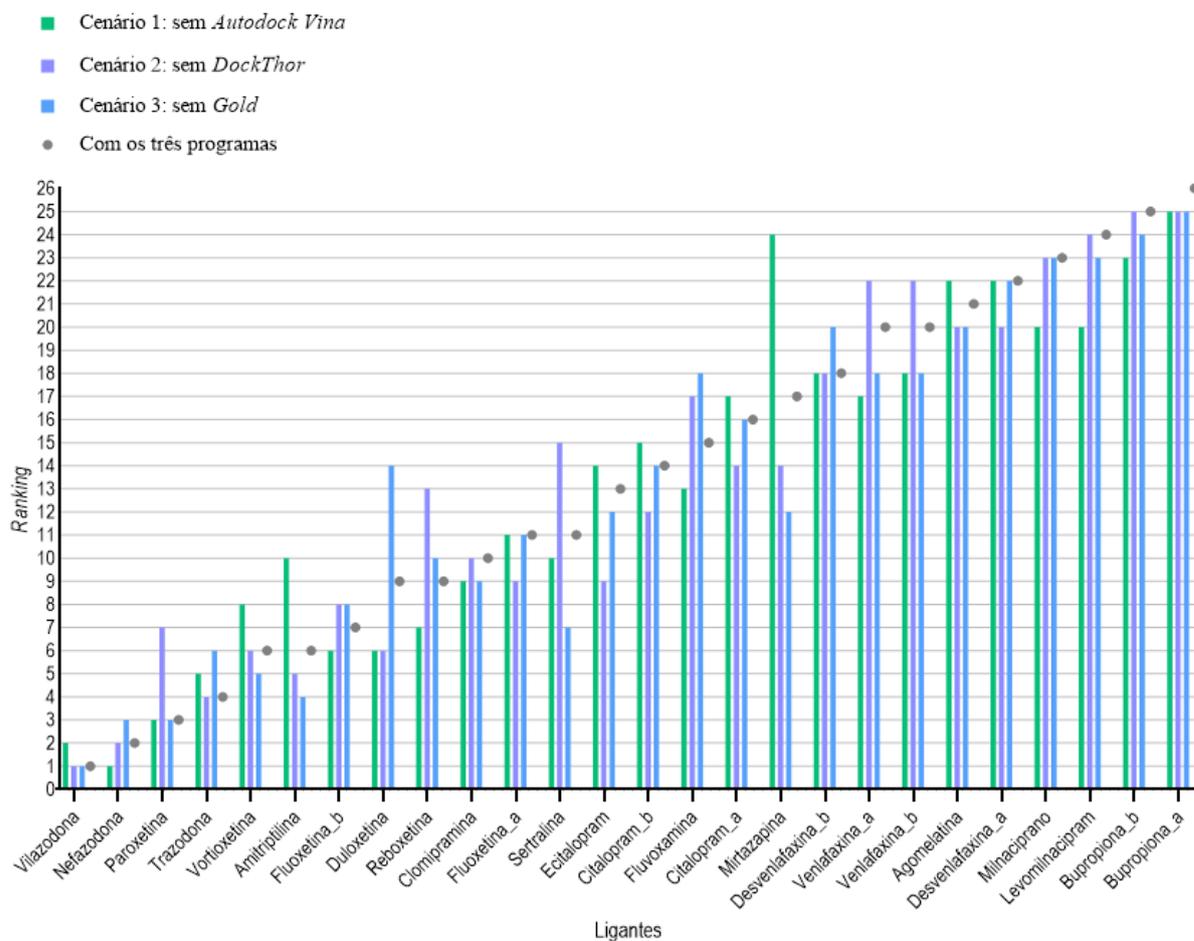
Legenda: análise de sensibilidade da classificação dos antidepressivos usando as três formas de consenso. Na primeira coluna são os antidepressivos em ordem alfabética. 3= cálculo de consenso realizado com os três programas. A = remoção do programa *Autodock Vina*, D = remoção do programa *DockThor*, G = remoção do programa *Gold*. Em sequência, a segunda coluna são os valores de  $K_i$  *in silico*, as três próximas colunas é a posição que os antidepressivos obtiveram no consenso ECR sem um dos três programas, em seguida, o consenso ECR+MS sem um dos três programas e por fim, as últimas três colunas é a classificação do consenso FL+ECR+MS sem um dos três programas.

Gráfico 9. Análise sensibilidade consenso ECR



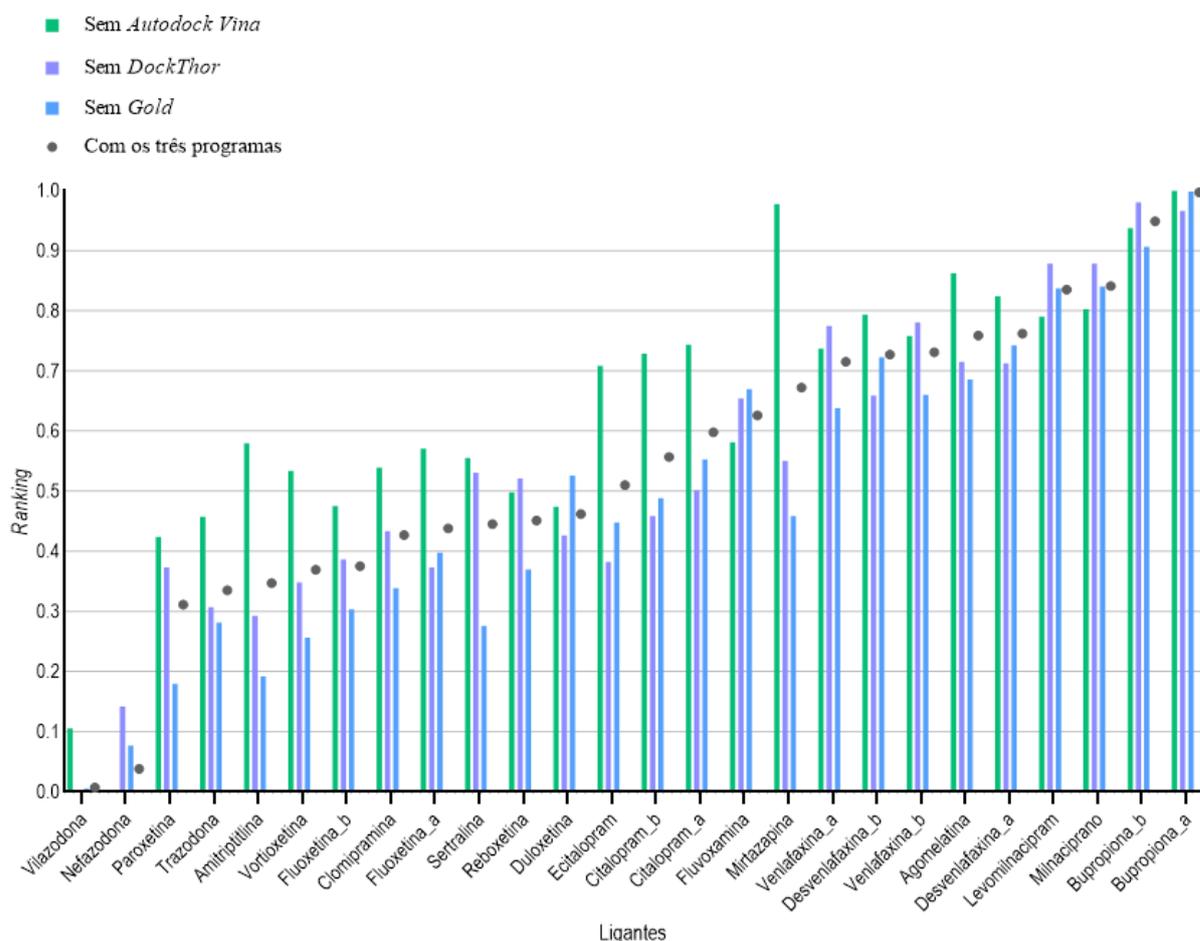
Legenda: gráfico da análise de sensibilidade do consenso ECR. No eixo Y é a classificação que os antidepressivos, no eixo X, obtiveram. As barras iniciam na posição 1, como melhor afinidade, e terminam na posição 24 como pior afinidade. Em verde é a classificação do consenso sem os valores do *Autodock Vina*, em roxo sem o *DockThor*, em azul sem o *Gold*, e a bolinha cinza é o consenso com os três programas.

Gráfico 10. Análise sensibilidade consenso ECR+MS



Legenda: gráfico da análise de sensibilidade do consenso ECR+MS. No eixo Y é a classificação que os antidepressivos, no eixo X, obtiveram. As barras iniciam na posição 1, como melhor afinidade, e terminam na posição 26 como pior afinidade. Em verde é a classificação do consenso sem os valores do *Autodock Vina*, em roxo sem o *DockThor*, em azul sem o *Gold*, e a bolinha cinza é o consenso com os três programas.

Gráfico 11. Análise sensibilidade consenso FL+ECR+MS



Legenda: gráfico da análise de sensibilidade do consenso FL+ECR+MS. No eixo Y é a classificação que os antidepressivos, no eixo X, obtiveram. As barras iniciam na posição 0, como melhor afinidade, e terminam na posição 1 como pior afinidade. Em verde é a classificação do consenso sem os valores do *Autodock Vina*, em roxo sem o *DockThor*, em azul sem o *Gold*, e a bolinha cinza é o consenso com os três programas.

### 8.3 VALIDAÇÃO DO CÁLCULO DE CONSENSO DO ANCORAMENTO

Para visualizar os valores individuais obtidos do ancoragem de cada par ligante-dDAT, nos três programas, bem como o cálculo detalhado dos três consensos, basta clicar no *link* para acessar os valores da repetição [1](#) e [2](#).

Os 5 primeiros colocados nas classificações dos três consensos e do  $K_i$  *in silico* são *decoys* (Tabela 29). Dentre eles, os *decoys* com início em “6” foram gerados a partir do código SMILE da trazodona, os com início em “28” do levomilnacipram, com início em “29” da paroxetina e por fim, com início em “30” e “31” da nefazodona. Com exceção do levomilnacipram, todos os outros antidepressivos foram classificados dentre as 5 primeiras posições das listas de classificação elaboradas a partir dos consensos e do  $K_i$  *in silico* das ancoragens sem os *decoys*. O ligante mais bem posicionado em todas as listas de classificação no ensaio de validação *29decoys32* (Tabela 29), portanto, gerado a partir da paroxetina, que

nos estudos sem os *decoys*, ficou na 3ª posição na lista de classificação ECR, ECR+MS e FL+ECR+MS e da lista de classificação  $K_i$  *in silico* na 9ª posição.

No ensaio de validação, nas últimas posições das classificações dos três consensos e do  $K_i$  *in silico* são *decoys*, temos *decoys* com início em “4”, “8”, “11”, “16”, “19”, “24”, “26”, gerados a partir dos antidepressivos, reboxetina, venlafaxina, bupropiona, clomipramina, desvenlafaxina, levomilnacipram e mirtazapina, respectivamente (Tabela 29). Estes antidepressivos que ocuparam posições intermediárias ou as últimas posições nas classificações dos cálculos de consenso e  $K_i$  *in silico*. Na lista de classificação ECR e ECR+MS, os últimos colocados foram os *24decoys33* e *24decoys27*, ambos foram gerados do levomilnacipram. Na etapa sem os *decoys*, o levomilnacipram ficou na 24ª posição na lista de classificação ECR e ECR+MS, na 25ª posição lista de classificação FL+ECR+MS e na 26ª posição da classificação  $K_i$  *in silico*.

Na lista de classificação FL+ECR+MS, o *decoys* pior colocado foi o *decoy* de nome *26decoys42*, gerado a partir do antidepressivo mirtazapina, que para a lista de classificação FL+ECR+MS e ECR+MS esteve na 17ª posição, para a lista de classificação ECR ficou na 19ª posição e na classificação  $K_i$  *in silico* na 2ª posição. Na lista de classificação do  $K_i$  *in silico* o pior colocado foi o *19decoys21*, gerado pela desvenlafaxina (Tabela 29). A desvenlafaxina\_a e desvenlafaxina\_b estiveram, respectivamente nas: 21ª e 13ª posições na lista de classificação ECR; 21ª e 18ª posições na lista de classificação ECR+MS; 22ª e 19ª posições na lista de classificação FL+ECR+MS; 18ª e 18ª posições no  $K_i$  *in silico* (Tabela 29).

Tabela 29. Classificações dos consensos e  $K_i$  *in silico* para o ancoramento com os *decoys*

ECR		ECR+MS		FL+ECR+MS		$K_i$ <i>in silico</i>	
Ligante	R	Ligante	R	Ligante	R	Ligante	R
29decoys32	1	29decoys32	1	29decoys32	1	29decoys32	1
31decoys47	2	31decoys28	2	30decoys28	2	31decoys4	2
29decoys45	3	30decoys28	3	30decoys47	3	6decoys36	3
29decoys10	4	31decoys47	4	30decoys24	4	6decoys2	4
29decoys25	5	30decoys47	5	31decoys24	5	28decoys28	5
Vilazodona	47	Vilazodona	60	Nefazodona	60	Vortioxetina	71
Nefazodona	82	Nefazodona	112	Vilazodona	81	Vilazodona	85
Trazodona	219	Mirtazapina	141	Trazodona	183	Amitriptilina	99
Mirtazapina	223	Amitriptilina	162	Paroxetina	192	Mirtazapina	100
Paroxetina	244	Vortioxetina	172	Fluoxetina_b	209	Escitalopram	107

Amitriptilina	280	Clomipramina	199	Sertralina	228	Trazodona	139
Clomipramina	285	Escitalopram	203	Vortioxetina	234	Sertralina	199
Vortioxetina	286	Trazodona	238	Clomipramina	251	Clomipramina	201
Reboxetina	306	Citalopram_a	286	Amitriptilina	264	Citalopram_a	202
Citalopram_a	316	Paroxetina	296	Duloxetina	269	Fluoxetina_b	225
Escitalopram	337	Fluoxetina_b	300	Fluoxetina_a	280	Fluoxetina_a	327
Agomelatina	341	Sertralina	325	Reboxetina	304	Citalopram_b	343
Milnaciprano	386	Fluoxetina_a	334	Escitalopram	376	Paroxetina	345
Sertralina	438	Citalopram_b	347	Fluvoxamina	406	Nefazodona	406
Citalopram_b	446	Reboxetina	415	Citalopram_a	468	Reboxetina	442
Fluoxetina_a	476	Desvenlafaxina_b	454	Citalopram_b	502	Agomelatina	506
Fluoxetina_b	477	Agomelatina	472	Venlafaxina_a	504	Duloxetina	579
Duloxetina	582	Duloxetina	503	Mirtazapina	262	Desvenlafaxina_b	623
Desvenlafaxina_b	663	Desvenlafaxina_a	643	Desvenlafaxina_b	569	Desvenlafaxina_a	745
Desvenlafaxina_a	665	Milnaciprano	701	Venlafaxina_b	615	Venlafaxina_a	802
Venlafaxina_b	699	Venlafaxina_b	739	Desvenlafaxina_a	727	Venlafaxina_b	896
Bupropiona_a	1021	Venlafaxina_a	875	Milnaciprano	742	Fluvoxamina	948
Venlafaxina_a	1056	Fluvoxamina	1124	Levomilnacipram	824	Milnaciprano	1058
Fluvoxamina	1226	Bupropiona_a	1271	Agomelatina	873	Levomilnacipram	1319
Bupropiona_b	1309	Levomilnacipram	1276	Bupropiona_b	1205	Bupropiona_a	1336
Levomilnacipram	1378	Bupropiona_b	1425	Bupropiona_a	1273	Bupropiona_b	1442
25decoys25	1514	11decoys7	1572	26decoys6	1572	25decoys31	1572
4decoys33	1515	16decoys7	1572	25decoys2	1573	24decoys33	1573
24decoys39	1516	4decoys28	1573	25decoys31	1574	16decoys19	1574
24decoys35	1517	11decoys5	1574	8decoys16	1575	25decoys2	1575
24decoys27	1518	24decoys33	1575	26decoys42	1576	19decoys21	1576

Legenda: Classificação dos consensos e  $K_i$  do ancoramento com os *decoys*. As duas primeiras colunas é a classificação do consenso ECR+MS, com posições que variam de 1 a 1576. As duas próximas colunas é a classificação do consenso FL+ECR+MS com posições que variam de 1 a 1576. As duas seguintes são do consenso ECR, com posição que variam de 0 a 1517. A as últimas duas colunas é a classificação do  $K_i$ , com posições que variam de 1 a 1576. Os ligantes estão ordenados pela afinidade, iniciando pelos 5 primeiros colocados, após a posição que os antidepressivos ocuparam e por fim, os últimos 5 colocados. R = posição na classificação.

### 8.3.1 Métricas de validação

Nenhum antidepressivo foi ordenado nos primeiros 1% e 2% de todo o banco de dados nas três formas de consenso. Também nas três formas de consenso, 1 antidepressivo foi

ordenado nos primeiros 5% de todo banco de dados. A diferença começa a aparecer no subconjunto de 10%, em que o consenso ECR+MS ordenou 3 antidepressivos e para os outros dois consensos, ordenou 2 antidepressivos. Em 20%, o consenso ECR ordenou 9, o consenso ECR+MS ordenou 11 antidepressivos e o consenso FL+ECR+MS ordenou 12. Em 50%, o consenso ECR ordenou 21, o consenso ECR+MS ordenou 21 antidepressivos e o consenso FL+ECR+MS ordenou 22 (Tabela 30, Gráfico 12).

No subconjunto 1%, 2%, 5% e 10% a diferença entre as três formas de consenso é praticamente imperceptível, o que nos mostra que independente de qual é escolhido, todas possuem a mesma capacidade de ordenação dos antidepressivos nas primeiras posições da classificação. Já para 20%, o consenso FL+ECR+MS foi mais eficaz quando comparado aos outros cálculos, com um valor de verdadeiros positivos de 46,15% e falsos positivos de 19,55%, em comparação com o consenso ECR+MS (42,31% e 19,61%) ou ECR (34,62% e 19,74%). Na primeira metade do subconjunto (50%), o consenso que mais classificou antidepressivos foi a FL+ECR+MS, com 84,62% e 49,42%, comparado o consenso ECR+MS com 80,77% e 49,48% e ECR com 80,77% e 49,48% (Tabela 30, Gráfico 12). As quantidades de falsos ligantes no subconjunto 50% foram similares entre as diferentes formas de consenso: FL+ECR+MS com 49,42%; ECR+MS com 49,48%; ECR com 49,48% (Tabela 30).

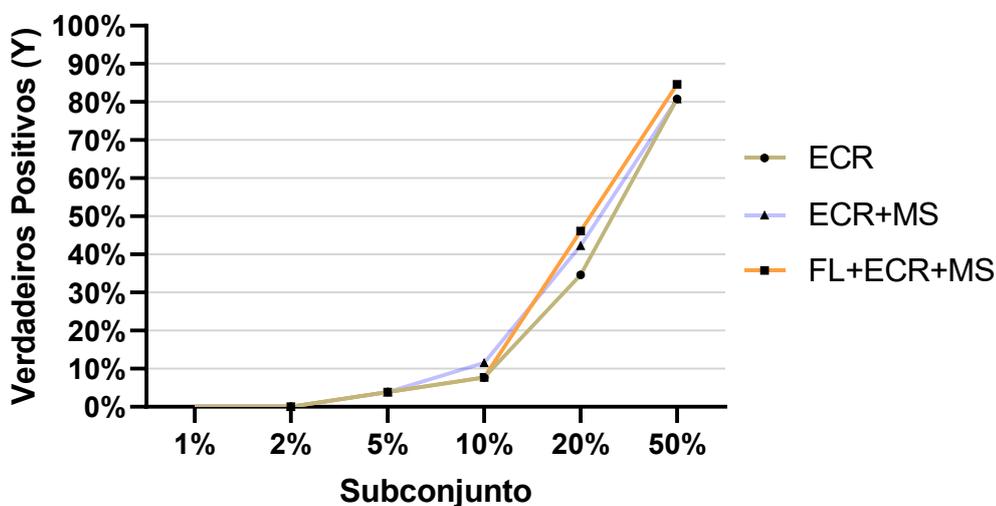
Tabela 30. Resultados do ROC

		ECR		ECR+MS		FL+ECR+MS	
<b>1%</b>							
Y	$L_t$	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	$N_L$	26		26		26	
X	$D_t$	16	1,03%	16	1,03%	16	1,03%
	$N_D$	1550		1550		1550	
<b>2%</b>							
Y	$L_t$	0	0,00%	0	0,00%	0	0,00%
	$N_L$	26		26		26	
X	$D_t$	32	2,06%	32	2,06%	32	2,06%
	$N_D$	1550		1550		1550	
<b>5%</b>							
Y	$L_t$	1	3,85%	1	3,85%	1	3,85%
	$N_L$	26		26		26	
X	$D_t$	78	5,03%	78	5,03%	78	5,03%
	$N_D$	1550		1550		1550	
<b>10%</b>							
Y	$L_t$	2	7,69%	3	11,54%	2	7,69%
	$N_L$	26		26		26	
X	$D_t$	156	10,06%	155	10,00%	156	10,06%
	$N_D$	1550		1550		1550	

20%							
Y	$L_t$	9	34,62%	11	42,31%	12	46,15%
	$N_L$	26		26		26	
X	$D_t$	306	19,74%	304	19,61%	303	19,55%
	$N_D$	1550		1550		1550	
50%							
Y	$L_t$	21	80,77%	21	80,77%	22	84,62%
	$N_L$	26		26		26	
X	$D_t$	767	49,48%	767	49,48%	765	49,42%
	$N_D$	1550		1550		1550	

Legenda: tabela com os resultados do cálculo ROC (fórmula 5). Na primeira coluna representa o valor de Y ou valor de X do cálculo e na segunda coluna o elemento da fórmula. Nas demais colunas é o resultado obtido em cada um dos três tipos de consenso.  $L_t$  é a quantidade de ligantes antidepressivos do subconjunto selecionado (1%, 2%, 5%, 10%, 20% ou 50%);  $N_L$  é a quantidade total de ligantes verdadeiros (26 antidepressivos);  $D_t$  é o número de decoys do subconjunto selecionado (1%, 2%, 5%, 10%, 20% ou 50%);  $N_D$  é a quantidade total de decoys (1550 decoys). O resultado é o valor apresentado em porcentagem. Para o valor de Y representa o verdadeiro positivo e para o valor de X o falso positivo.

Gráfico 12. Resultado verdadeiro positivos (eixo Y)



Legenda: resultado dos verdadeiros positivos (valor de Y) da fórmula do ROC (fórmula 5). No eixo X estão os subconjuntos analisados (1%, 2%, 5%, 10%, 20% e 50%) e no eixo Y os valores obtidos em cada cálculo de consenso. Consenso FL+ECR+MS, laranja claro com símbolo representando o valor exato em quadrado, consenso ECR+MS, roxo claro com símbolo representando o valor exato em triângulo e consenso ECR em amarelo queimado com símbolo representando o valor exato em círculo.

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1 LISTA DE CLASSIFICAÇÃO DOS ANTIDEPRESSIVOS

Neste estudo, antidepressivos com vários mecanismos de ação foram organizados em listas de classificação baseadas em suas afinidades pelo dDAT. Os parâmetros de afinidade de cada antidepressivo pelo dDAT foram obtidos a partir de ancoragem molecular múltipla. Os múltiplos valores de afinidade de cada par antidepressivo-dDAT foram sintetizados em único valor consensual. Quando aplicados a todos os pares antidepressivo-dDAT, os cálculos de

consenso (FL+ECR+MS, ECR, ECR+MS) geraram listas de classificação nas quais os primeiros postos representam os antidepressivos com mais afinidade e os últimos com menos afinidade pelo dDAT.

É interessante notar que expressar as listas de classificação com divisões em uma escala de linear (consenso FL+ECR+MS) trouxe mais informações a respeito da lista de classificação em comparação com as outras formas de ordenação (consenso ECR e ECR+MS). Na lista de classificação FL+ECR+MS foi possível enxergar melhor as distâncias entre os postos da lista, i.e., quanto cada antidepressivo se distancia um do outro. Por exemplo, a distância entre a vilazodona (1ª posição) e a nefazodona (2ª posição) foi pequena refletindo valores muito próximos dos postos. Já a distância entre a nefazodona (2ª posição) e a paroxetina (3ª posição) foi grande, representando a maior diferença entre os valores dos postos ocupados pelos dois antidepressivos. Outros dois antidepressivos que têm seus valores de consenso mais espaçados são o milnaciprano (24ª posição) e a bupropiona\_b (25ª posição). Para os demais antidepressivos, a distância foi menor quando comparado aos citados anteriormente.

Além das listas baseadas nos consensos, foi criada uma lista de classificação dos antidepressivos com base na ordenação dos valores de  $K_i$  *in silico*. Estes valores foram calculados a partir de valores de  $\Delta G$  dados pelos programas de ancoragem molecular. Assim, como nas listas de classificação criadas a partir dos valores de consenso, os valores de  $K_i$  mais baixos também representam maior afinidade entre o par antidepressivo-dDAT. Independente do cálculo de consenso, as listas de classificação trouxeram a vilazodona, nefazodona, paroxetina e amitriptilina nas primeiras posições. Estes compostos são moléculas com vários anéis aromáticos, o que lhes confere uma estrutura maior e mais rígida, se comparado com os últimos colocados (desvenlafaxina, levomilnacipram, milnaciprano, bupropiona). Na literatura já se observou que a associação dos grupamentos aminas com as porções aromáticas aumentam a afinidade dos ligantes com o dDAT (WANG; PENMATSA; GOUAUX, 2015). Assim, outro dado potencialmente relevante é a presença dos grupamentos aminas na estrutura das moléculas dos antidepressivos. Neste estudo, observou-se que tanto a amitriptilina (primeiro colocado no cálculo  $K_i$  *in silico*) quanto a vilazodona (primeiro colocado nos cálculos de consenso) possuem mais de um anel aromático com um ou dois grupamentos amina, respectivamente. Já dentre os últimos colocados, o levomilnacipram (último colocado no consenso ECR e  $K_i$  *in silico*) e a bupropiona (último colocado no consenso ECR+MS e FL+ECR+MS), possuem apenas um anel aromático e um ou nenhum grupamento amina, respectivamente.

Na literatura encontra-se os valores de  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* de 07 dos 21 antidepressivos investigados no presente estudo. Estes valores foram obtidos *in vitro* usando a técnica de *binding* entre os antidepressivos e o dDAT (ARTAIZ et al., 2005; PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015; PÖRZGEN et al., 2001; PUGH et al., 2022) (Tabela 31). Com estes valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  da literatura criou-se uma lista de classificação dos ligantes com 07 postos para se comparar as listas criadas no presente estudo. Foi feito pareamento entre estas listas para avaliar se a classificação dos antidepressivos usando o  $K_i$  *in silico* e os cálculos de consenso, se assemelham as de  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*.

O antidepressivo com menor valor de  $K_i$ , ou seja, com maior afinidade pelo dDAT na classificação do  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* foi a reboxetina (PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015) (Tabela 31 e 32), que ocupa posições intermediárias nas demais classificações. A reboxetina está na 15ª posição na classificação  $K_i$  *in silico*, 7ª posição na lista de classificação ECR, 9ª posição na lista de classificação ECR+MS e na 11ª posição na lista de classificação FL+ECR+MS.

Os antidepressivos nas 2ª e 3ª posições, na lista de classificação gerada pela ordenação de  $K_i$  *in vitro*, foram diferentes dependendo do trabalho que fez o ensaio de *binding*. No trabalho de Pugh et al. (2022), o 2º lugar é ocupado pela amitriptilina e o 3º pela paroxetina. No artigo de Pörzgen et al. (2001), é ao contrário, em 2º lugar está a paroxetina e em 3º lugar a amitriptilina (Tabela 31 e 32). A paroxetina ocupa uma posição intermediária na classificação  $K_i$  *in silico* (9ª posição), entretanto, na classificação dos três consensos está entre as primeiras colocadas, 3ª posição. Já a amitriptilina, ocupa o 1º lugar na classificação  $K_i$  *in silico*, 4ª na lista de classificação ECR+MS, 5ª na lista de classificação ECR e FL+ECR+MS.

A fluoxetina, que ocupou a 4ª posição na classificação do  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* (ARTAIZ et al., 2005; PÖRZGEN et al., 2001; PUGH et al., 2022) (Tabela 31 e 32). No  $K_i$  *in silico* a fluoxetina\_a e fluoxetina\_b ocuparam a 8ª e 12ª posição, respectivamente. Na lista de classificação ECR+MS ocuparam a 12ª e 6ª posições, enquanto que no FL+ECR+MS e ECR as posições foram 9ª e 7ª posição, respectivamente.

Na 5ª posição da classificação do  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* está a venlafaxina, entretanto, o valor de  $K_i$  que está relatado no artigo não é exato ( $>1.000$ ), o que torna mais difícil a comparação com os outros antidepressivos (ARTAIZ et al., 2005) (Tabela 31 e 32). De qualquer maneira, assim como no  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro*, a venlafaxina também está entre os últimos colocados na lista de classificação de afinidade com o dDAT determinada *in silico*. Na classificação do  $K_i$  *in silico* a venlafaxina\_a e venlafaxina\_b ocuparam a 20ª e 21ª

posições, respectivamente, na lista de classificação ECR+MS e ECR ambas ocuparam a 20ª posição e na lista de classificação FL+ECR+MS a 18ª e 20ª posições, respectivamente.

Na 6ª posição na lista de classificação do  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* está o citalopram (PÖRZGEN et al., 2001; PUGH et al., 2022) (Tabela 31 e 32). Na classificação pelo valor de  $K_i$  *in silico* o citalopram\_a e citalopram\_b ficaram na 13ª e 7ª colocação, respectivamente. Na lista de classificação ECR+MS, o citalopram\_a e citalopram\_b ocuparam a 16ª e 14ª posições, respectivamente. Os ligantes citalopram\_a e citalopram\_b ocuparam, respectivamente, 15ª e 14ª posições na lista de classificação FL+ECR+MS e 18ª e 12ª posições na lista de classificação ECR.

Por fim, o antidepressivo com maior valor de  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro*, ou seja, menor afinidade pelo dDAT foi a bupropiona (PÖRZGEN et al., 2001; PUGH et al., 2022) (Tabela 31 e 32), que também teve a menor afinidade na classificação  $K_i$  *in silico*. Nesta última lista, a bupropiona\_a e bupropiona\_b ocuparam a 25ª e 23ª posições. Essas posições foram similares as das listas obtidas na lista de classificação ECR+MS e FL+ECR+MS, 26ª e 25ª posições, respectivamente. Para a classificação baseada na lista de classificação ECR ambos ligantes ocupam a 18ª posição, posição no meio da lista de classificação.

Tabela 31. Dados de  $K_i$  e  $CI_{50}$  dos antidepressivos pelo dDAT *in vitro*

<b><math>K_i/ CI_{50} \pm SEM</math></b>			
<b>Antidepressivo</b>	<b>Valor original <math>\eta M</math></b>	<b>Valor convertido para <math>\mu M</math></b>	<b>Referência</b>
Fluoxetina	>1.000	>1	ARTAIZ et al., 2005 ( $K_i$ )
Venlafaxina	>1.000	>1	
Reboxetina	20	0,02	PENMATSA; WANG; GOUAUX, 2015 ( $K_i$ )
Amitriptilina	97± 0-117	0,097±0,08-0,117	
Bupropiona	7.500±7.400-7.700	7,5±7,4-7,7	
Citalopram	2.400±1.900-29.000	2,4±1,9-29	PUGH et al., 2022 ( $K_i$ )
Fluoxetina	512±438-599	0,512±0,438-0,599	
Paroxetina	322±242-428	0,322±0,242-0,428	
Amitriptilina	30	0,03	
Bupropiona	48.000±5.00	48±0,05	
Citalopram	8.100±2,100	8,1± ,1	PÖRZGEN et al., 2001 ( $IC_{50}$ )
Fluoxetina	240	0,24	
Paroxetina	22	0,022	

Legenda: valores de  $K_i$  ou  $CI_{50}$  dos antidepressivos extraídos da literatura através de *binding* com o dDAT. Na primeira coluna são os antidepressivos, na segunda coluna os valores de  $K_i$  ou  $CI_{50} \pm$  valor do erro padrão da média (SEM), se aplicável, em  $\eta$ M (valores originais extraídos da literatura). Na terceira coluna os valores de  $K_i$  ou  $CI_{50}$  são convertidos para  $\mu$ M. Na quarta coluna é a referência dos artigos e entre parênteses se os dados estão em  $K_i$  ou  $CI_{50}$ . > = maior que.

Tabela 32. Comparação das classificações *in silico* e *in vitro* dos antidepressivos

<b>Antidepressivos</b>	<b>ECR</b>	<b>ECR+MS</b>	<b>FL+ECR+MS</b>	<b><math>K_i</math> <i>in silico</i></b>	<b><math>K_i</math> e <math>CI_{50}</math> <i>in vitro</i></b>
Agomelatina	16	21	21	16	NA
Amitriptilina	5	6	5	1	2 ou 3
Bupropiona_a	18	26	26	25	7
Bupropiona_b	18	25	25	23	7
Citalopram_a	18	16	15	13	6
Citalopram_b	12	14	14	7	6
Clomipramina	10	10	8	10	NA
Desvenlafaxina_a	22	22	22	19	NA
Desvenlafaxina_b	14	18	19	18	NA
Duloxetina	6	9	12	17	NA
Escitalopram	11	13	13	5	NA
Fluoxetina_a	9	11	9	8	4
Fluoxetina_b	7	7	7	12	4
Fluvoxamina	14	15	16	22	NA
Levomilnacipram	24	24	23	26	NA
Milnaciprano	21	23	24	24	NA
Mirtazapina	19	17	17	2	NA
Nefazodona	2	2	2	14	NA
Paroxetina	3	3	3	9	2 ou 3
Reboxetina	7	9	11	15	1
Sertralina	8	11	10	11	NA
Trazodona	5	4	4	6	NA
Venlafaxina_a	20	20	18	20	5
Venlafaxina_b	20	20	20	21	5
Vilazodona	1	1	1	3	NA
Vortioxetina	8	6	6	4	NA

Legenda: tabela comparativa da classificação dos antidepressivos obtidas nas três formas de consenso,  $K_i$  *in silico* e  $K_i$  e  $CI_{50}$  extraído dos dados da literatura. Na primeira coluna são os antidepressivos, seguido da classificação do consenso ECR+MS, classificação consenso FL+ECR+MS, consenso ECR,  $K_i$  extraído *in silico* e  $K_i$  e  $CI_{50}$  extraído da literatura.

Em resumo, na classificação do  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* os antidepressivos com maior afinidade são a reboxetina, paroxetina e amitriptilina. A reboxetina, na classificação das três formas de consenso e na classificação  $K_i$  *in silico* ocupa posições intermediárias, fugindo do padrão do  $K_i$  ou  $IC_{50}$  *in vitro*. Já a paroxetina e amitriptilina, nos dados *in silico* apresentaram maior afinidade pelo dDAT, respeitando o que foi encontrado por meio de *binding*. Na 4ª e 6ª posição do valor de  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* está a fluoxetina e o citalopram, que também ocupam posições intermediárias na classificação dos consensos e  $K_i$  *in silico*. O antidepressivo com pior afinidade pelo dDAT no  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* é a bupropiona, que também está nas últimas colocações no  $K_i$  *in silico* e na classificação dos consensos, com exceção do consenso ECR. Na 5ª posição está a venlafaxina, porém, a forma que foi apresentado o valor de  $K_i$  *in vitro* dificulta a comparação com os demais antidepressivos (Tabela 31 e 32). Desta maneira, parece que a ocupação das extremidades das listas de classificação é mais estável que das posições intermediárias. O presente estudo é incapaz de indicar a razão para tal padrão de afinidade relativa, porém, alguns fatores relevantes podem ser discutidos.

Fato relevante é o perfil farmacológico do dDAT. Os antidepressivos que possuem alta afinidade pelo hDAT, como a bupropiona, por exemplo, são os mesmos que apresentaram baixa afinidade pelo dDAT. Os valores de  $K_i$  *in silico* e *in vitro* e o  $CI_{50}$  *in vitro* dos antidepressivos pelo dDAT são mais similares com o que é encontrado no hNET (PIDATHALA et al., 2021; PORZENG et al., 2001). Por mais que o NET seja ausente nas moscas (PIDATHALA et al., 2021), o sítio de ligação do dDAT e do hNET são bastante similares, diferentemente do sítio de ligação do hDAT (PIDATHALA et al., 2021). No sítio de ligação do dDAT estão presentes os aminoácidos alanina (ALA117), serina (SER422) e alanina (ALA428), que estão ausentes no hDAT (PIDATHALA et al., 2021).

Neste estudo, foi feita uma análise visual da interação 2D da vilazodona, ligante mais bem posicionado nas listas de classificação de todos os consensos, com o dDAT. Para cada par vilazodona-dDAT, em cada programa, para cada repetição foi feito um levantamento dos aminoácidos presentes na interação. Ao acessar este [link](#) é possível ter acesso a uma planilha em que está listado todos os aminoácidos e qual o tipo de interação química de todas as possíveis interações. Nesta análise, buscou-se identificar quais os aminoácidos mais frequentes e a porcentagem de aparecimento de cada um.

A vilazodona foi atracada com 11 dDATs, em três programas, repetindo esse processo 10 vezes, totalizando 330 ancoramentos, portanto, cada aminoácido pode aparecer no máximo 330 vezes, sendo este 100% de aparição. Os aminoácidos PHE319, ASP46 e PHE43 são apontados como os mais importantes para o reconhecimento dos ligantes no

dDAT (WANG et al., 2015). Na presente análise, estes aminoácidos tiveram frequência de 37,88%, apareceram em 125 ancoramentos (aminoácido mais frequente), 17,27%, apareceu em 57 ancoramentos (décima primeira posição) e 9,39%, apareceu em 31 ancoramentos, respectivamente. A PHE319, juntamente com a PHE325, com frequência de 24,85%, apareceu em 82 ancoramentos (décima sexta posição), são importantes para acomodar ligantes de variados tamanhos, em grande parte porque estes aminoácidos conseguem ajustar suas orientações no sítio de ligação (WANG et al., 2015) (Tabela 33). Em estudos futuros, se faz necessário uma análise mais detalhada da interação entre a vilazodona com o dDAT, assim como, uma análise dos aminoácidos presentes na interação dos demais antidepressivos com o transportador. Em especial, uma análise dos últimos colocados, ajudaria a entender as razões que fazem com que ligantes como a bupropiona, que possui alta afinidade pelo hDAT, tem baixa afinidade pelo dDAT. Essa análise também buscaria identificar outros padrões, como quais aminoácidos dos transportadores e elementos químicos do ligantes estão presentes na interação, e quais os tipos de ligações.

Cabe ressaltar que não está definido em qual sítio a bupropiona se liga no hDAT (NEPAL et al., 2023). A existência do sítio alostérico, com ou sem ocupação simultânea do sítio ortostérico, já foi descrita na literatura para o hSERT (COLEMAN; GOUAUX, 2018) e para o hDAT (NEPAL et al., 2023). Porém, não está claro na literatura se o dDAT possui sítio alostérico (CHENG, BAHAR, 2019; NEPAL et al., 2023). Estudos de dinâmica molecular precisam ser realizados a fim de investigar se o dDAT possui sítio alostérico, e se este fator influencia ou não na afinidade dos ligantes pelo transportador da mosca.

Em conjunto, os dados sugerem que os valores de  $K_i$  são dependentes da metodologia usada para seu cálculo. Para um mesmo ligante, os valores de  $K_i$  obtidos *in vitro* variam de estudo para estudo (por exemplo fluoxetina em PÖRZGEN et al., 2001; ARTAIZ et al., 2005; PUGH et al., 2022). Da mesma forma, os valores de  $K_i$  obtidos *in silico* são diferentes dos valores obtidos *in vitro* para um mesmo ligante. Além disso, as afinidades relativas, isto é, se um ligante tem mais ou menos afinidade pelo dDAT do que um outro ligante depende do método usado para criar a lista de classificação. Neste estudo, a lista de classificação baseada no  $K_i$  *in silico* foi mais semelhante a lista de  $K_i$  ou  $CI_{50}$  *in vitro* do que as demais classificações.

Tabela 33. Aminoácidos mais frequentes na interação vilazodona-dDAT  
Aminoácidos    Quantidade    Porcentagem

<b>PHE 319</b>	125	37,88%
<b>VAL 120</b>	114	34,55%
<b>VAL 96</b>	100	30,30%
<b>ALA 24</b>	90	27,27%
<b>TYR 124</b>	90	27,27%
<b>PHE 325</b>	82	24,85%
<b>ALA 48</b>	81	24,55%
<b>ASP 22</b>	64	19,39%
<b>PHE 254</b>	64	19,39%
<b>ASP 475</b>	58	17,58%
<b>ASP 46</b>	57	17,27%
<b>ALA 117</b>	56	16,97%
<b>ARG 52</b>	49	14,85%
<b>ASP 97</b>	49	14,85%
<b>SER 421</b>	48	14,55%
<b>TYR 100</b>	46	13,94%
<b>ALA 479</b>	40	12,12%
<b>TRP 27</b>	39	11,82%
<b>ASP 410</b>	39	11,82%
<b>ASP 121</b>	37	11,21%
<b>PHE 260</b>	34	10,30%
<b>PHE 319</b>	125	37,88%
<b>VAL 120</b>	114	34,55%
<b>VAL 96</b>	100	30,30%
<b>ALA 24</b>	90	27,27%
<b>TYR 124</b>	90	27,27%
<b>PHE 325</b>	82	24,85%
<b>ALA 48</b>	81	24,55%
<b>ASP 22</b>	64	19,39%
<b>PHE 254</b>	64	19,39%
<b>ASP 475</b>	58	17,58%
<b>ASP 46</b>	57	17,27%
<b>ALA 117</b>	56	16,97%
<b>ARG 52</b>	49	14,85%
<b>ASP 97</b>	49	14,85%
<b>SER 421</b>	48	14,55%
<b>TYR 100</b>	46	13,94%
<b>ALA 479</b>	40	12,12%
<b>TRP 27</b>	39	11,82%
<b>ASP 410</b>	39	11,82%
<b>ASP 121</b>	37	11,21%

Legenda: lista dos 20 aminoácidos com mais frequência de aparição da interação entre a vilazodona e o dDAT. Na primeira coluna estão os aminoácidos, na segunda coluna a quantidade de ancoramentos que estes aminoácidos aparecem e na última coluna, a porcentagem.

## 9.2 ANÁLISE DE SENSIBILIDADE DOS PROGRAMAS

Repetir o ancoramento do par ligante-macromolécula em vários programas é apontado como estratégia para aumentar a confiança dos dados (VERLI, 2014, p. 197). Em programas que possuem algoritmo de busca estocástico – todos os programas de ancoramentos usados têm por base este algoritmo de busca – cada conformação do ligante na macromolécula é aleatória, gerando resultados diferentes a cada nova repetição (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 197). Assim como no ancoramento cruzado, os resultados obtidos do ancoragem de cada par antidepressivo-dDAT em cada repetição foi diferente, como pode ser visto nas tabelas com os dados brutos: [1](#), [2](#), [3](#), [4](#), [5](#), [6](#), [7](#), [8](#), [9](#), [10](#).

A escolha de 10 repetições foi feita de forma arbitrária, uma vez que não foram encontradas na literatura informações sobre qual a quantidade de repetições seria necessária para minimizar o efeito que o algoritmo de busca estocástico exerce sobre as ancoragens. Se faz necessário um novo estudo estatístico para encontrar a quantidade ideal de repetições. Neste novo estudo será repetido a ancoragem do par ligante-macromolécula inúmeras vezes, a cada nova repetição, o resultado obtido será adicionado a uma classificação média deste ligante com a macromolécula. A cada nova repetição da ancoragem a posição do ligante pode mudar, porém, em uma dada quantidade de repetição, adicionar ou não os resultados obtidos se tornam irrelevante na posição final deste ligante. Neste estado estável, a adição de novos resultados deixa de interferir na classificação média destes ligantes. Além da média, seria útil também calcular a margem de erro das medidas.

Para o cálculo de consenso foram usados três programas, cada um com sua função de pontuação, que tornou os resultados supostamente mais confiáveis (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 196-200). Para o cálculo do  $K_i$  *in silico* converteu-se as funções de pontuação delta G originadas de apenas dois programas de ancoragem. Uma vez que classificação dos antidepressivos baseado no  $K_i$  *in silico* diferiu da classificação obtidas nos três cálculos de consenso, se fez necessário entender o impacto que cada programa exerceu na classificação dos antidepressivos nos cálculos de consensos. Em suma observou-se nesta análise de sensibilidade que, ao se retirar os dados obtidos com o programa *Gold* do cálculo de consenso, as listas de classificação dos consensos se aproximam mais do que foi visto na lista ordenada pelo  $K_i$  *in silico*. Isto sugere que os resultados obtidos no programa *Gold* diminuíram a similaridade entre os dados obtidos *in silico* e *in vitro*.

## 9.3 VALIDAÇÃO DO CÁLCULO DE CONSENSO

Os cálculos de consenso desenvolvidos no presente trabalho, geraram classificações dos antidepressivos similares ao encontrado na ordenação dos valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*.

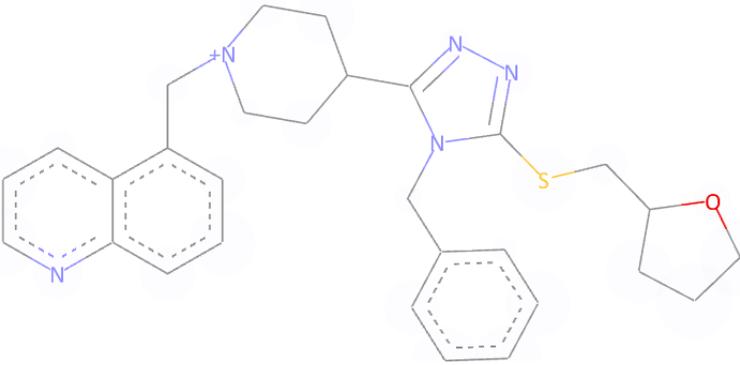
Porém, a comparação com dados *in vitro* pode não ser suficiente para validação de um novo cálculo de consenso. Na literatura é descrita a importância do cálculo ROC para tal fim. O cálculo ROC revela qual a quantidade de ligantes verdadeiros, em contraste aos falsos, que estão bem classificados em uma dada lista de classificação. De acordo com o cálculo ROC, a maioria dos antidepressivos apareceram na lista de classificação somente quando 50% dos ligantes foram ordenados, independente do cálculo de consenso empregado.

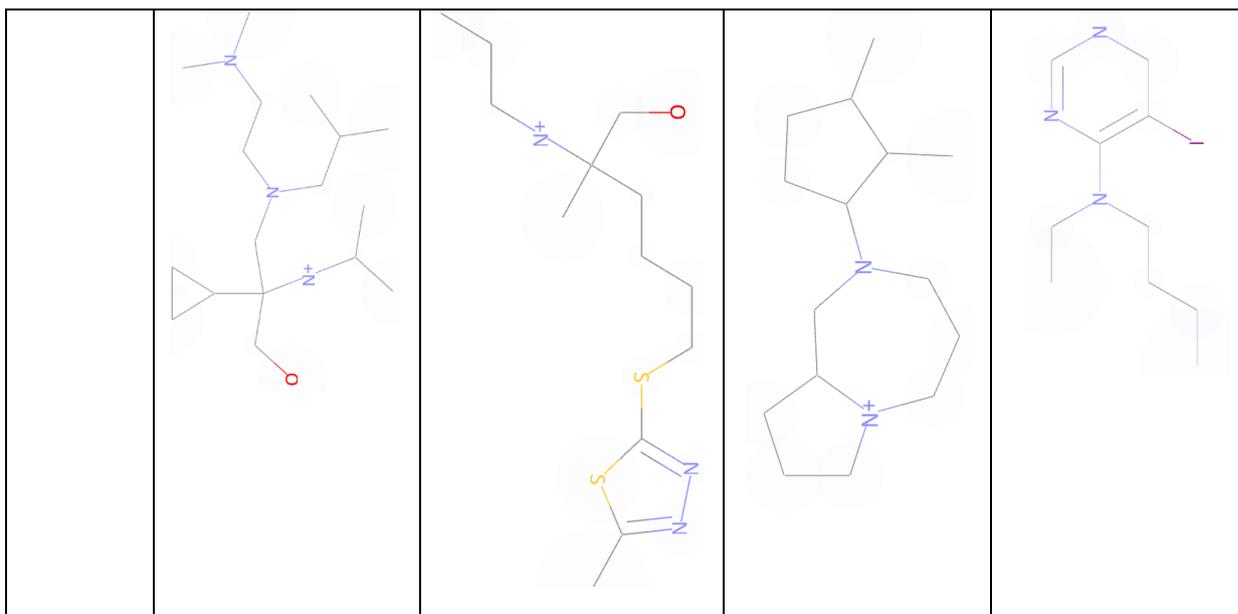
O ligante melhor posicionado nas três classificações de consenso e do  $K_i$  *in silico*, foi um *decoy* derivado da paroxetina. Os *decoys* foram construídos baseados no código SMILE dos antidepressivos, por isso é esperado que *decoys* derivados de antidepressivos que apresentam maior afinidade pelo dDAT, também apresentem afinidade maior pelo transportador quando comparados a *decoys* derivados de antidepressivos com baixa afinidade, como a bupropiona. Um estudo detalhado seria necessário para avaliar a razão pela qual o *decoys* de nome *29decoys32* teve maior afinidade pelo dDAT, em que seria analisado as interações químicas e quais aminoácidos pertencem a essa ligação. Com esse estudo detalhado também será possível investigar se este *decoy* é um ligante com potencial efeito antidepressivo. Independentemente, novamente é possível ver a influência dos anéis aromáticos e do tamanho do ligante na interação com o dDAT (Tabela 34). O *decoys 29decoys32* é maior quando comparado aos *decoys* de menor afinidade pelo dDAT (Tabela 34).

Os resultados dos ensaios com ou sem *decoys* foram similares nos programas *DockThor* e *Gold*. Por causa de uma incoerência entre os resultados obtidos no *Autodock Vina* nos ensaios com e sem os *decoys*, foram realizadas duas repetições de ancoragem molecular com *decoys* neste programa. Exemplo da discrepância dos dados é a amitriptilina. No ancoramento múltiplo com somente os antidepressivos, a amitriptilina esteve na 5ª posição na lista de classificação FL+ECR+MS e ECR, 6ª posição na lista de classificação ECR+MS e na 1ª posição na classificação do  $K_i$  *in silico*. Em contrapartida, na primeira repetição ao ser adicionado os *decoys* no ancoramento, a posição que a amitriptilina ocupou em uma lista de classificação com somente os 26 antidepressivos, i.e., retirar os *decoys*, foi muito diferente. Na lista de classificação FL+ECR+MS caiu para 14ª posição, na lista de classificação ECR e ECR+MS caiu para 26ª posição e na classificação  $K_i$  *in silico* caiu para a 26ª posição. Na segunda repetição, a posição da amitriptilina foi mais similar ao ancoramento múltiplo com somente os antidepressivos. O antidepressivo ocupou a 4ª posição na lista de classificação ECR+MS, 6ª posição na lista de classificação ECR e 11ª posição na lista de classificação FL+ECR+MS e na classificação  $K_i$  *in silico* ficou na 3ª posição.

A razão da incoerência entre os resultados do *Autodock Vina* é desconhecida, mas, suspeitou-se de algum erro de procedimento. Por causa disso, antes de proceder a repetição, estabeleceu-se a regra que, independentemente do resultado obtido, os resultados da repetição seriam considerados na análise. Uma outra explicação simples do que ocorreu com o *Autodock Vina* se dá ao dizer que o programa realizou o ancoramento de maneira bastante distinta os ligantes na etapa com os *decoys* quando comparada com a etapa com somente os antidepressivos. Tendo isso ocorrido por causa do algoritmo de busca estocástico realizar as conformações do ligante na macromolécula de forma aleatória, o programa pode ter gerado conformações em locais diferentes da etapa anterior (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 197). O *DockThor* também usa o algoritmo de busca estocástico, entretanto, são usadas características específicas que buscam minimizar o efeito da aleatoriedade na ancoragem (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENN, 2014; VERLI, 2014, p. 198). De qualquer forma, não se pode excluir o fato de que essas conformações geradas na primeira repetição da ancoragem com os *decoys* realmente sejam possíveis.

Tabela 34. Representação química dos ligantes *decoys*

Posição	ECR	ECR+MS	FL+ECR+MS	K <sub>i</sub> <i>in silico</i>
Primeiro colocado				
Últimos colocados				



Legenda: tabela com a representação 2D dos *decoys* com melhor e pior classificação nos três consensos e no  $K_i$  *in silico*.

## 10. CONCLUSÃO

O principal objetivo deste trabalho foi classificar os compostos antidepressivos a partir da afinidade pelo dDAT. Foi realizado o ancoramento múltiplo de 26 antidepressivos com 11 dDATs em três programas diferentes. Foram aplicados quatro tipos de cálculos para combinar os múltiplos resultados, três destes cálculos, foram desenvolvidos neste estudo (ECR+MS, FL+ECR+MS,  $K_i$  *in silico*). Encontrou-se um padrão de afinidade dos antidepressivos pelo dDAT distinto dos mesmos fármacos pelo hDAT. De modo geral, os três tipos de consensos forneceram dados parecidos, com exceção do consenso ECR que posicionou a bupropiona no meio da classificação, destoando da classificação do  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*. A lista de classificação ordenada pelo  $K_i$  *in silico* diferiu das listas obtidas pelos consensos e foi similar a lista de ordenação dos valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*. A quantidade de antidepressivos com dados de  $K_i$  e  $CI_{50}$  disponíveis na literatura são baixos, necessitando-se de mais dados para dar suporte as comparações. Foi avaliado quão sensível os cálculos de consenso são ao retirarmos um dos programas da fórmula. Viu-se também que calcular o consenso usando somente os dados do *Autodock Vina* e *DockThor*, retirando o programa *Gold*, resultou em uma lista de classificação que se assemelha mais à classificação do  $K_i$  *in silico*. Além disso, foi feita a validação do consenso desenvolvidos usando os antidepressivos e os *decoys* através do cálculo de ROC. Em especial no subconjunto 20% e 50% dos dados, o consenso FL+ECR+MS fez uma classificação mais confiável que o consenso ECR e ECR+MS. Encontrou-se um padrão de afinidade dos antidepressivos pelo dDAT distinto daquele que os mesmos fármacos têm pelo hDAT. O ensaio de validação usando os *decoys*

mostrou que todos os antidepressivos apareciam listados quando 50% dos dados eram examinados. Além disso, este ensaio revelou que os *decoys* originados da paroxetina tiveram mais afinidade pelo dDAT que todos os antidepressivos. Estes falsos ligantes podem ser candidatos a verdadeiros ligantes do dDAT e, em última instância, seriam compostos com potencial antidepressivo.

## 11. CONCLUSÃO GERAL

A hipótese deste trabalho se embasava na expectativa que os antidepressivos classificados como inibidores seletivos da recaptação de dopamina têm maior afinidade pelo dDAT do que os fármacos de outras classes farmacológicas. Entretanto, baseada na classificação obtida através dos cálculos de consenso e do  $K_i$  *in silico*, encontramos o contrário. Um fármaco como a bupropiona, da classe de inibidores de recaptação de dopamina, que em humanos tem alta afinidade por DAT, teve baixa afinidade pelo dDAT. Esses dados foram validados pela comparação com os valores de  $K_i$  e  $CI_{50}$  *in vitro*. Entre os objetivos do trabalho estava a padronização do método de ancoragem molecular para o dDAT, método validado através do re-ancoramento. Além disso, validou-se o cálculo do  $K_i$  *in silico* e o cálculo de consenso da ancoragem. Propôs-se duas novas formas de consenso entre os resultados. Uma em que a maneira de classificação se dá de forma ordinal (ECR+MS) e a outra linear (FL+ECR+MS). Retirar do cálculo do consenso os dados obtidos com o programa *Autodock Vina*, fez a classificação dos ligantes ser mais semelhante a classificação obtida do  $K_i$  *in silico*. Isto indica que a lista de classificação não reflete apenas a natureza biológica da interação do ligante com a macromolécula, mas também, o funcionamento de cada programa. Finalmente, a validação do cálculo de consenso também foi realizada com o uso dos *decoys*, sendo os resultados aplicados no cálculo ROC. Além de apresentar melhor desempenho no ROC, o consenso FL+ECR+MS facilitou a apresentação e a interpretação dos resultados das listas de classificação.

## REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, André Luis Berteli; FRANCHINI, Kleber Gomes. Cristalografia macromolecular: a biologia sob a ótica dos raios X. **Ciência e Cultura**, v. 69, n. 3, p. 29-36, 2017.
- ANDERSEN, Jacob et al. Binding of the multimodal antidepressant drug vortioxetine to the human serotonin transporter. **ACS chemical neuroscience**, v. 6, n. 11, p. 1892-1900, 2015.
- ARTAIZ, Inés et al. Preclinical pharmacology of F-98214-TA, a novel potent serotonin and norepinephrine uptake inhibitor with antidepressant and anxiolytic properties. **Psychopharmacology**, v. 182, p. 400-413, 2005.
- ARAUJO, Stéfani Machado et al.  $\gamma$ -Oryzanol produces an antidepressant-like effect in a chronic unpredictable mild stress model of depression in *Drosophila melanogaster*. **Stress**, p. 1-12, 2020.
- BELHASSAN, Assia et al. Study of novel triazolo-benzodiazepine analogues as antidepressants targeting by molecular docking and ADMET properties prediction. **Heliyon**, v. 5, n. 9, p. e02446, 2019.
- CIPRIANI, Andrea et al. Comparative efficacy and acceptability of 21 antidepressant drugs for the acute treatment of adults with major depressive disorder: a systematic review and network meta-analysis. **Focus**, v. 16, n. 4, p. 420-429, 2018.
- CHEN, Yu-Chian. Beware of docking!. **Trends in pharmacological sciences**, v. 36, n. 2, p. 78-95, 2015.
- CHENG, Mary Hongying et al. Insights into the modulation of dopamine transporter function by amphetamine, orphenadrine, and cocaine binding. **Frontiers in neurology**, v. 6, p. 134, 2015.
- CHENG, Mary Hongying; BAHAR, Ivet. Monoamine transporters: structure, intrinsic dynamics and allosteric regulation. **Nature structural & molecular biology**, v. 26, n. 7, p. 545-556, 2019.
- DE MAGALHÃES, Camila S.; BARBOSA, Helio JC; DARDENNE, Laurent E. Selection-insertion schemes in genetic algorithms for the flexible ligand docking problem. In: Genetic and Evolutionary Computation Conference. **Springer**, Berlin, Heidelberg, p. 368-379, 2004.
- DU, Xing et al. Insights into protein–ligand interactions: mechanisms, models, and methods. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 2, p. 144, 2016.
- ELDRIDGE, Matthew D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 11, n. 5, p. 425-445, 1997.
- GUEDES, Isabella A.; DE MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-87, 2014.

GUEDES, Isabella A.; PEREIRA, Felipe SS; DARDENNE, Laurent E. Empirical scoring functions for structure-based virtual screening: applications, critical aspects, and challenges. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1089, 2018.

GÓRAL, Izabella; ŁĄTKA, Kamil; BAJDA, Marek. Structure Modeling of the Norepinephrine Transporter. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, p. 102, 2020.

HAJIAN-TILAKI, Karimollah. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for medical diagnostic test evaluation. **Caspian journal of internal medicine**, v. 4, n. 2, p. 627, 2013.

HIDALGO, Sergio et al. Characterization of a novel Drosophila SERT mutant: insights on the contribution of the serotonin neural system to behaviors. **ACS chemical neuroscience**, v. 8, n. 10, p. 2168-2179, 2017.

HUANG, Sheng-You; GRINTER, Sam Z.; ZOU, Xiaoqin. Scoring functions and their evaluation methods for protein–ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 12, n. 40, p. 12899-12908, 2010.

HUEY, Ruth; MORRIS, Garrett M.; FORLI, Stefano. Using AutoDock 4 and AutoDock vina with AutoDockTools: a tutorial. **The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory**, v. 10550, p. 92037, 2012.

IRWIN, John J.; SHOICHET, Brian K. ZINC– a free database of commercially available compounds for virtual screening. **Journal of chemical information and modeling**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005

KASTURE, Ameya Sanjay et al. Big lessons from tiny flies: Drosophila melanogaster as a model to explore dysfunction of dopaminergic and serotonergic neurotransmitter systems. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1788, 2018.

KAZAMA, H. Systems neuroscience in Drosophila: conceptual and technical advantages. **Neuroscience**, v. 296, p. 3-14, 2015.

KOLDSØ, Heidi; GROULEFF, Julie; SCHIØTT, Birgit. Insights to ligand binding to the monoamine transporters—from homology modeling to LeuBAT and dDAT. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, p. 208, 2015.

KOSITSYN, Yuriy MHB et al. Towards translational modeling of behavioral despair and its treatment in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v. 430, p. 113906, 2022

LEONELLI, Sabina; ANKENY, Rachel A. What makes a model organism?. **Endeavour**, v. 37, n. 4, p. 209-212, 2013

JAIN, Ajay N. Bias, reporting, and sharing: computational evaluations of docking methods. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 22, p. 201-212, 2008.

JAROŃCZYK, Małgorzata; WALORY, Jarosław. Novel molecular targets of antidepressants. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 533, 2022.

JENNINGS, Barbara H. *Drosophila* - a versatile model in biology & medicine. **Materials Today**, v. 14, n. 5, p. 190-195, 2011.

JONES, Gareth et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of molecular biology**, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

JOSEPH, Deepthi et al. Structure and gating dynamics of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-coupled neurotransmitter transporters. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 6, p. 80, 2019.

MARTIN, Ciara A.; KRANTZ, David E. *Drosophila melanogaster* as a genetic model system to study neurotransmitter transporters. **Neurochemistry international**, v. 73, p. 71-88, 2014.

MYSINGER, Michael M. et al. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): better ligands and decoys for better benchmarking. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6582-6594, 2012.

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

NAß, Janine; KAMPF, Christopher J.; EFFERTH, Thomas. Increased stress resistance and lifespan in *Chaenorhabdites elegans* wildtype and knockout mutants—Implications for depression treatment by medicinal herbs. **Molecules**, v. 26, n. 7, p. 1827, 2021

NARAYANAN, Anjana S.; ROTHENFLUH, Adrian. I believe I can fly!: use of *Drosophila* as a model organism in neuropsychopharmacology research. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 6, p. 1439-1446, 2016.

NAZARI, Mansour. Effect of fluoxetine on the sexual behaviour of *Drosophila melanogaster*. **Journal of Postgraduate Medical Institute**, v. 25, n. 4, p. 298-303, 2011.

NEPAL, Binod et al. Overview of the structure and function of the dopamine transporter and its protein interactions. **Frontiers in Physiology**, v. 14, p. 1150355, 2023.

NOEL, FRANCOIS GERMAIN. **Ensaio de Binding: Fundamentos Teóricos, Aspectos Práticos e Aplicações no Desenvolvimento de Fármacos**. 2017.

OCHOA, Rodrigo et al. dockECR: Open consensus docking and ranking protocol for virtual screening of small molecules. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 109, p. 108023, 2021.

ORTORE, Gabriella et al. Focus on human monoamine transporter selectivity. New human DAT and NET models, experimental validation, and SERT affinity exploration. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 20, p. 3214-3232, 2020.

O'KANE, Cahir J. *Drosophila* as a model organism for the study of neuropsychiatric disorders. In: **Molecular and functional models in neuropsychiatry**. Springer, Berlin, Heidelberg, v. 7, p. 37- 60, 2011.

THE 3Rs. Disponível em: [The RepRefRed Society | Replacement](#). Acesso em: 20 jan. 2021.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

PALACIO-RODRÍGUEZ, Karen et al. Exponential consensus ranking improves the outcome in docking and receptor ensemble docking. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2019.

PENMATSA, Aravind; WANG, Kevin H.; GOUAUX, Eric. X-ray structure of the dopamine transporter in complex with tricyclic antidepressant. **Nature**, v. 503, n. 7474, p. 85, 2013.

PENMATSA, Aravind; WANG, Kevin H.; GOUAUX, Eric. X-ray structures of Drosophila dopamine transporter in complex with nisoxetine and reboxetine. **Nature structural & molecular biology**, v. 22, n. 6, p. 506, 2015.

PIDATHALA, Shabareesh et al. Structural basis of norepinephrine recognition and transport inhibition in neurotransmitter transporters. **Nature communications**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

PINZI, Luca; RASTELLI, Giulio. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PÖRZGEN, Peter et al. The antidepressant-sensitive dopamine transporter in *Drosophila melanogaster*: a primordial carrier for catecholamines. **Molecular pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 83-95, 2001.

PUGH, Ciara Frances et al. Pharmacological Characterization of Purified Full-Length Dopamine Transporter from *Drosophila melanogaster*. **Cells**, v. 11, n. 23, p. 3811, 2022.

RAMOS-HRYB, Ana Belén et al. Stress-mediated hyperactivity and anhedonia resistant to diazepam and fluoxetine in *Drosophila*. **Stress**, p. 1-11, 2020.

THE 3Rs. Disponível em: . Acesso em: 20 jan. 2022.

UGUR, Berrak; CHEN, Kuchuan; BELLEN, Hugo J. *Drosophila* tools and assays for the study of human diseases. **Disease models & mechanisms**, v. 9, n. 3, p. 235-244, 2016.

VAN ALPHEN, Bart; VAN SWINDEREN, Bruno. *Drosophila* strategies to study psychiatric disorders. **Brain research bulletin**, v. 92, p. 1-11, 2013.

VERLI, Hugo. Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular. cap 09, 2014.

WANG, Ching-I. Anderson; LEWIS, Richard J. Emerging structure–function relationships defining monoamine NSS transporter substrate and ligand affinity. **Biochemical pharmacology**, v. 79, n. 8, p. 1083-1091, 2010.

WANG, Kevin H.; PENMATSA, Aravind; GOUAUX, Eric. Neurotransmitter and psychostimulant recognition by the dopamine transporter. **Nature**, v. 521, n. 7552, p. 322-327, 2015.

YANG, Fengyuan et al. Comparison of computational model and X-ray crystal structure of human serotonin transporter: potential application for the pharmacology of human monoamine transporters. **Molecular Simulation**, v. 43, n. 13-16, p. 1089-1098, 2017.