



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS FLORIANÓPOLIS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

César Cunha

**Análise computacional da interação molecular entre o nucleosídeo  
neuroprotetor guanosina e o canal de Potássio de alta condutância ativado por  
cálcio (BK)**

FLORIANÓPOLIS

2023

César Cunha

**Análise computacional da interação molecular entre o nucleosídeo neuroprotetor guanosina e o canal de Potássio de alta condutância ativado por cálcio (BK)**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Inês Tasca  
Coorientador Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel

FLORIANÓPOLIS

2023

Cunha, César

Análise computacional da interação molecular entre o nucleosídeo neuroprotetor guanosina e o canal de Potássio de alta condutância ativado por cálcio (BK) / César Cunha ; orientadora, Carla Inês Tasca, coorientador, Guilherme Razzera Maciel, 2023.

44 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Neuroproteção. 3. Guanosina. 4. Canal BK. I. Tasca, Carla Inês. II. Maciel, Guilherme Razzera. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

César Cunha

**Análise computacional da interação molecular entre o nucleosídeo neuroprotetor guanosina e o canal de Potássio de alta condutância ativado por cálcio (BK)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharel e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas

Florianópolis, 06 de dezembro de 2023

---

Coordenação do Curso

**Banca examinadora:**

---

Profa. Carla Inês Tasca, Dra.  
Orientadora

---

Karin dos Santos Brighenti, Ma.  
UFSC

---

Glorister Alves Altê, Ma.  
UFSC

Florianópolis, 2023.



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais, Valberto e Vera, que me apoiaram durante todo esse trajeto cheio de percalços. Que, apesar do tempo, apesar da troca de curso, estiveram do meu lado, permitindo que eu pudesse trilhar o caminho que eu escolhi.

Agradeço também a minha namorada que esteve junto em todos os momentos desde antes do preparo para o primeiro vestibular. Por todo o amor e companheirismo, por ser a alegria que fez com que todo esse trajeto fosse possível.

Agradeço também à minha orientadora, a Profa Dra Carla Inês Tasca por toda a ajuda, por todo o conhecimento, por toda a paciência e compreensão em todos os momentos, especialmente quando eu precisei de um empurrãozinho a mais. Da mesma forma agradeço ao meu coorientador Prof Dr Guilherme Razzera e aos meus colegas do Laboratório de Neuroquímica IV que me ajudaram e me guiaram durante todo este trajeto.

Não posso deixar de agradecer aos amigos que esse curso me deu, por toda ajuda, todas as conversas, risadas e experiências que fizeram essa caminhada melhor.

Por fim agradeço à UFSC e ao CNPQ por fornecer auxílio e estrutura para que eu pudesse estudar e me formar.

## RESUMO

Com o aumento da longevidade humana, as doenças neurodegenerativas (DNs) vêm se tornando mais prevalentes, tornando urgente o estudo dos mecanismos fisiológicos envolvidos e a busca por moléculas neuroprotetoras. A guanosina (GUO) é uma molécula endógena e no sistema nervoso central a sua liberação aumenta durante eventos patológicos. GUO possui efeitos neuroprotetores em modelos *in vivo* e *in vitro* de DNs como as doenças de Alzheimer, Parkinson, epilepsia, isquemia e depressão. Porém, o mecanismo deste efeito ainda não está elucidado e uma das hipóteses é a atuação da GUO ativando o canal de potássio de alta condutância dependente de cálcio (BK). GUO promove a abertura do canal BK quando adicionada no meio extracelular e seu efeito neuroprotetor é abolido por bloqueadores do BK. O BK é uma proteína formada por um tetrâmero de subunidades- $\alpha$  que pode ou não possuir subunidades auxiliares (beta). Diversas moléculas modulam a atividade deste canal, porém o sítio de interação da maioria desses ligantes é desconhecido. Para corroborar a evidência da interação molecular entre GUO e BK e buscar um possível sítio de interação, este trabalho usou as seguintes análises *in silico*: identificação de possíveis cavidades hidrofóbicas na estrutura cristalizada do BK humano em suas conformações aberta e fechada, com e sem a subunidade auxiliar  $\beta$ 4; simulação da interação da GUO nestas cavidades por *molecular docking*, analisando os aminoácidos envolvidos nesta interação; e alinhamento da sequência de aminoácidos do BK humano com outras espécies. A mesma análise de interação foi feita com dois ativadores sintéticos do BK, que também não se conhece o sítio de interação, o NS1619 e o NS11021. Foram encontradas possíveis cavidades hidrofóbicas que poderiam ser sítios de interação e a análise de *docking* encontrou uma conformação com energia livre baixa (alta afinidade) comparada às obtidas com ligantes naturais para todas as conformações, indicando que essa é uma interação possível. Foram encontrados também os seguintes possíveis aminoácidos-chave para esta interação: ASN136, PHE144, TYR145, LEU150, VAL193 e SER202. O alinhamento de aminoácidos do BK de diferentes espécies mostrou que estes aminoácidos são conservados entre os vertebrados e, portanto, podem ser alvos de estudos futuros que confirmem os resultados deste trabalho. Conclui-se que há um possível sítio de interação para GUO, NS1619 e NS11021 na porção extracelular do canal e foram destacados aminoácidos essenciais para esta interação, sendo que sua conservação sugere potenciais alvos para futuras investigações.

## ABSTRACT

With the increase in human longevity, neurodegenerative diseases (NDs) are becoming more prevalent, making it urgent to study the physiological mechanisms involved and the search for neuroprotective molecules. Guanosine (GUO) is an endogenous molecule and in the central nervous system its release increases during pathological events. GUO has neuroprotective effects in in vivo and in vitro models of NDs such as Alzheimer's, Parkinson's, epilepsy, ischemia and depression. However, the mechanism of this effect is not yet elucidated and one of the hypotheses is the action of GUO activating the high conductance calcium-dependent potassium channel (BK). GUO promotes the opening of the BK channel when added to the extracellular medium and its neuroprotective effect is abolished by BK blockers. BK is a protein formed by a tetramer of  $\alpha$ -subunits that may or may not have auxiliary subunits (beta). Several molecules modulate the activity of this channel, but the interaction site of most of these ligands is unknown. To corroborate the evidence of the molecular interaction between GUO and BK and to search for a possible binding site, this work used the following in silico analyses: identification of possible hydrophobic cavities in the crystallized structure of human BK in its open and closed conformations, with and without the auxiliary subunit  $\beta_4$ ; simulation of the interaction of GUO in these cavities by molecular docking, analyzing the amino acids involved in this interaction and alignment of the amino acid sequence of human BK with other species. The same interaction analysis was done with two synthetic BK activators, which also do not know the binding site, NS1619 and NS11021. Possible hydrophobic cavities were found that could be binding sites, in these the docking analysis found a conformation with low free energy (high affinity) compared to those obtained with natural ligands for all conformations, indicating that this is a possible interaction. The following possible key amino acids for this interaction were also found: ASN136, PHE144, TYR145, LEU150, VAL193 and SER202. The alignment with BK from different species showed that these amino acids are conserved among vertebrates and, therefore, can be targets of future studies that confirm the results of this work. It is concluded that there is a possible interaction site for GUO, NS1619 and NS11021 in the extracellular portion of the channel, essential amino acids were highlighted for this interaction and their conservation suggests potential targets for future investigations.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	Doença de Alzheimer
A $\beta$	Peptídeo beta-amilóide
BK	Canal de potássio de alta condutância dependente de cálcio
Ca <sup>2+</sup>	Íon cálcio
DN	Doença neurodegenerativa
Glu	Glutamato
GUO	Guanosina
K <sup>+</sup>	Íon potássio
NMDAR	Receptor de N-metil-D-aspartato
PD	Doença de Parkinson
PDA	Purinas derivadas da adenina
PDG	Purinas derivadas da guanina
PGO	Privação de glicose e oxigênio
PKB	Proteína kinase B
RCK	Região reguladora da condutância de potássio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>8</b>
1.1	NEURODEGENERAÇÃO	8
1.2	GUANOSINA	9
1.3	CANAL BK	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>19</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>20</b>
3.1	OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS MOLÉCULAS	20
3.2	CAVIDADES E <i>DOCKING</i>	21
3.3	ANÁLISE DOS RESULTADOS	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
4.1	BUSCA POR CAVIDADES NO CANAL BK	23
4.2	<i>DOCKING</i> DA GUO, DO NS1619 E DO NS11021 COM O CANAL BK	25
4.3	INTERAÇÕES DA GUO, DO NS1619 E DO NS11021 COM O BK	28
4.4	ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO BK EM DIFERENTES ESPÉCIES	32
4.5	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	34
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>35</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 NEURODEGENERAÇÃO

O aumento da longevidade da população humana, aliado à diminuição na taxa de natalidade vêm trazendo novos desafios para sistemas públicos, como a previdência social e a saúde pública. Conforme envelhecemos há o aumento de fatores de risco associados às doenças neurodegenerativas (DNs), estima-se que o custo mundial anual apenas da doença de Alzheimer (AD), seja de 1 trilhão de dólares (Breijyeh et al., 2020), evidenciando a necessidade de estudar os processos fisiológicos associados ao envelhecimento e às DNs.

As DNs são enfermidades que causam a perda progressiva de função ou estrutura neural, chamada neurodegeneração. Em 2019, cerca de 50 milhões de pessoas sofriam de algum tipo de DN, sendo as mais comuns a AD, a doença de Parkinson (PD), a doença de Huntington e a esclerose lateral amiotrófica. A neurodegeneração também pode ser causada por danos agudos como traumas, isquemia ou hemorragia cerebral (Donnan et al., 2008; Yamagata, 2021, Chojdak-Lukasiewicz et al., 2021). As DNs são multifatoriais e suas causas ainda são objeto de discussão (Armstrong, 2020), diferentes condições são associadas ao seu desenvolvimento, como o fatores genéticos, envelhecimento, doenças vasculares, exposição a metais e infecções, traumas, consumo de álcool, etc (Armstrong, 2020; Dugger et al., 2017). Estas condições podem levar aos vários processos relacionados ao desenvolvimento das DNs, como acúmulos de agregados anormais de proteínas, disfunção vascular, disfunção mitocondrial, estresse oxidativo, desbalanço iônico e a excitotoxicidade glutamatérgica, entre outros. A excitotoxicidade é desencadeada por uma excessiva ativação dos receptores de glutamato, o principal neurotransmissor excitatório do Sistema Nervoso Central (SNC), e ocasiona um desbalanço iônico e metabólico que pode estar envolvido no processo de neurodegeneração (Armstrong, 2020; Dugger et al., 2017).

A busca por tratamentos para neurodegeneração geralmente é direcionado para modular algum destes processos, porém devido a complexidade destas patologias, o avanço tem sido lento. Para a AD, por exemplo, existem três classes de fármacos aprovados para o seu tratamento, eles possuem eficiência terapêutica limitada, pois nenhum evita a progressão da doença nem trata sua causa. Assim, a

busca por outras moléculas ou mecanismos que possam melhorar o tratamento, evitar a progressão ou promover a remissão da doença para a AD e outras DNs se faz extremamente necessária. O alvo dessa pesquisa será avaliar a guanosina (GUO, FIGURA-1), uma dessas moléculas que poderá ser evidenciada como estratégia terapêutica frente à neurodegeneração.

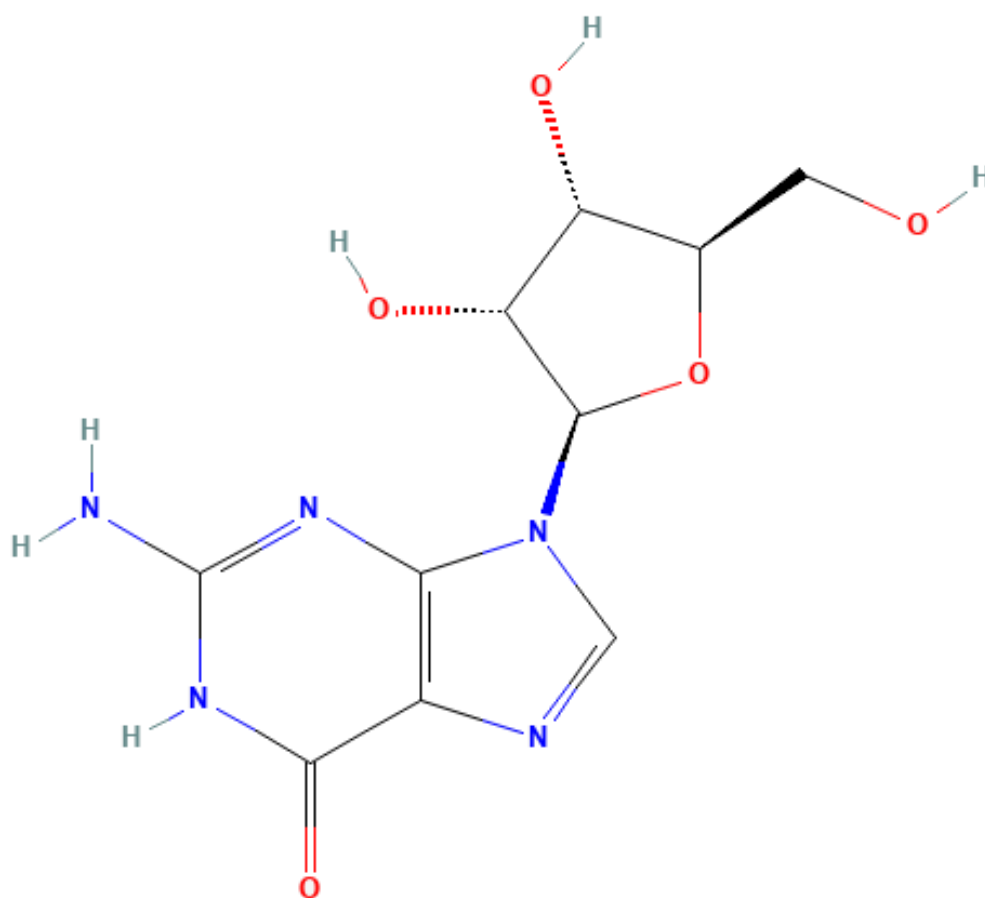


Figura 1. Estrutura química da Guanosina. Fonte: PubChem.

## 1.2 GUANOSINA

As purinas são moléculas endógenas, presentes no meio intracelular como constituintes dos ácidos nucleicos e da estrutura de coenzimas e também agem como segundos mensageiros na sinalização intracelular (Lanznaster et al., 2016;

Tasca et al., 2018). As purinas são constituídas pelas bases nitrogenadas da adenina e guanina e seus derivados, os nucleosídeos adenosina e guanosina (derivados da adenina e da guanina respectivamente) e os nucleotídeos (nucleosídeos fosforilados) AMP, ADP e ATP (derivados da adenina) e GMP, GDP e GTP (derivados da guanina; Lanznaster et al., 2016; Tasca et al., 2018).

No meio extracelular, a maioria das purinas são liberadas na forma de nucleotídeos que podem ser metabolizados em nucleosídeos por ecto-nucleotidases, nucleosídeos também podem ser liberados por transportadores específicos de nucleosídeos (Tasca et al., 2018; Mancinelli et al., 2016). No SNC as purinas são liberadas tanto por neurônios quanto por células gliais, acontecendo principalmente nas sinapses podendo ser através da exocitose de vesículas sinápticas, como também liberadas por transportadores (Di Liberto, 2016). A principal fonte das purinas no SNC são os astrócitos, tanto das purinas derivadas de adenina (PDAs) quanto das purinas derivadas da guanina (PDGs; Ciccarelli, 2001). Os efeitos protetores das PDAs foram primeiramente demonstrados por Drury e Szent-Györgyi (1929) na isquemia cardíaca, provocando dilatação arterial e reduzindo o ritmo cardíaco (Lanznaster et al., 2016; Tasca et al., 2018). Nos anos 70s Geoffrey Burnstock introduziu a ideia de neurotransmissão purinérgica e hoje a adenosina e o ATP estão consolidados como neurotransmissores e neuromoduladores do SNC, respectivamente (Burnstock, 1972, 2013; Lanznaster et al., 2016; Tasca et al., 2018).

Diferente das PDAs, as PDGs são classicamente associadas apenas a sua função intracelular de modulação da atividade das proteínas G (Tasca et al., 2018). Porém, a identificação de efeitos extracelulares vêm sugerindo que também as PDGs possam agir como neuromoduladores. Foi demonstrado que o GTP é co-armazenado com o ATP em vesículas sinápticas e que os nucleosídeos de adenina e de guanina competem pelas mesmas ecto-nucleotidases, ou seja são metabolizados no meio extracelular (Di Liberto, 2016). Também já foi observado um aumento dos níveis extracelulares de PDG em modelos animais após dano isquêmico, níveis que se mantêm elevados por até 7 dias (Uemura et al., 1991). Astrócitos em cultura também aumentam a liberação de PDGs em uma proporção maior do que as PDAs após serem submetidos à hipóxia ou hipoglicemia (Ciccarelli et al., 1999).



O estudo dos efeitos neuroprotetores dos PDGs já foram desenvolvidos em diversos modelos. A administração aguda *in vivo* de GMP e guanossina leva redução de 50% à 80% de convulsões induzidas por ácido quinolínico, um agonista do receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDAR; Schmidt et al., 2000; Lara et al., 2001; Soares et al., 2004; Tavares et al., 2008). Este efeito é revertido quando os animais são tratados com um inibidor da enzima 5'-ectonucleotidase, impedindo a conversão de GMP para guanossina, sugerindo que o efeito anticonvulsivante se deve à GUO (Soares et al., 2004).

Em um modelo *in vivo* de hipóxia-isquemia perinatal, que reduz a captação de glutamato (Glu) pelas células hipocâmpais, a guanossina foi capaz de restaurar essa captação de Glu para os níveis do controle (Moretto et al., 2005). Em outro modelo de dano neuronal, através da oclusão da artéria cerebral média, a administração de GUO reduziu significativamente a área do infarto (Chang et al., 2008; Rathbone et al., 2011; Connell et al., 2013). Assim como com a oclusão bilateral permanente das carótidas comuns, o tratamento crônico com GUO administrada oralmente levou a reversão da perda de neurônios piramidais do hipocampo (Ganzella et al., 2012). A GUO também foi demonstrada como neuroprotetora em um modelo *in vivo* de isquemia focal cortical, onde ela reduziu o volume do infarto, preveniu o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) e reverteu a redução do transportador de Glu, GLUT1 (Hansel et al., 2014, 2015). Também já foi demonstrado efeito neuroprotetor do tratamento com GMP em fatias hipocâmpais (Molz et al., 2005). Porém estes efeitos são menos proeminentes que tratamento com GUO e visto que o GMP pode ser rapidamente hidrolisado, o efeito observado do tratamento com GMP pode ser devido à produção de GUO (Oleskovicz et al., 2008), semelhante ao que foi demonstrado por Soares et al. 2004 quanto ao efeito anticonvulsivante da GUO.

Em modelos de PD também já foram demonstrados efeitos neuroprotetores da administração de GUO. Em um modelo *in vitro* de PD, a administração de *1-methyl-4-phenylpyridinium* (MPP<sup>+</sup>) resulta em apoptose, porém o tratamento com GUO iniciado até 48 horas depois da aplicação da toxina é capaz de prevenir a apoptose em neuroblastomas SH-SY5Y (Pettifer et al., 2007). Em um modelo *in vivo* induzido com um inibidor de proteassoma, a GUO foi capaz de não só reduzir a apoptose em neurônios da substância negra *pars compacta*, como induziu uma proliferação de neurônios dopaminérgicos (Su et al., 2009).

A GUO também tem efeitos neuroprotetores em modelos de AD. Em modelos *in vitro* de AD com células SH-SY5Y, GUO protegeu contra a apoptose e o estresse oxidativo induzido pelo peptídeo beta-amilóide (A $\beta$ ) (Pettifer et al., 2004; Tarozzi et al., 2010). Em um modelo *in vivo* de AD, com camundongos submetidos à infusão intracerebroventricular de peptídeo A $\beta$ , o déficit de memória de curto prazo foi prevenido pela administração de GUO. Além disso, a infusão de A $\beta$  leva a um aumento da captação de Glu em fatias hipocâmpais *ex vivo*, este efeito também é revertido pela GUO (Lanznaster et al., 2017). GUO também previne a produção de estresse oxidativo hipocâmpal induzido pelo A $\beta$  (Coelho et al., 2022).

Além dos efeitos protetores em modelos de patologias, também já foram demonstrados efeitos na proliferação e diferenciação celular no SNC. Em camundongos com medula espinhal lesionada, a GUO foi capaz de aumentar a mielinização na região da lesão, também aumentou a proliferação de células progenitoras de oligodendrócitos além de estimular a proliferação de astrócitos (Jiang et al., 2003; Jiang et al., 2008). A GUO também estimula a proliferação celular em um modelo de PD, como citado anteriormente (Su et al., 2009). Em camundongos adultos saudáveis tratados com GUO, há um aumento da neurogênese no giro denteado do hipocampo, verificado através da medição de doblecortina, uma proteína expressa em células precursoras neuronais (Piermartiri et al., 2020). Por fim, a proliferação, diferenciação e migração celular induzida por purinas, sendo as PDAs as mais estudadas, já foi demonstrada tanto em adultos quanto durante o desenvolvimento embrionário (Ribeiro et al., 2019).

Apesar dos efeitos neuroprotetores dos PDGs serem estudados em diversos modelos, o mecanismo pelo qual este efeito acontece ainda não está elucidado. As suas ações neuroprotetores são associadas a três principais efeitos: reduzindo a excitotoxicidade glutamatérgica, modulando a neuroinflamação e reduzindo o estresse oxidativo (Di Liberto et al., 2019; Tasca et al., 2018). Porém a GUO é capaz de ativar vias de sinalização que levam à redução da apoptose e ao aumento do efeito neuritogênico do fator de crescimento derivado do encéfalo (BDNF; Di Liberto et al. 2016; Gysbers e Rathbone, 1992; Bau et al., 2005) e à proliferação celular (Jiang et al., 2008; Su et al., 2009; Piermartiri et al., 2020). Por exercer a maioria dos efeitos tróficos e protetores avaliados em diferentes modelos de enfermidades, o estudo dos mecanismos de ação dos PDGs geralmente está focado na GUO.

Os PDGs parecem modular a transmissão glutamatérgica por diferentes caminhos. Já foi demonstrado que o GTP, GDP e GMP deslocam a união de Glu com os seus receptores (Sharif e Roberts, 1981), porém a GUO não gera o mesmo resultado, ou seja, não parece ter um efeito direto como antagonista de receptores glutamatérgicos (Souza e Ramírez, 1991). Os efeitos tóxicos induzidos pelos dois agonistas de receptores glutamatérgicos, NMDA e kainato, também são inibidos apenas pelo GTP, GDP e GMP e não pela GUO (Morciano, 2004). Porém a GUO aumenta a captação de Glu em fatias do córtex de camundongos (Frizzo et al., 2002). GUO também restaura a captação de Glu em fatias hipocâmpais submetidas à privação de glicose e oxigênio (PGO; Dal-Cim et al., 2013), aumenta a captação de Glu em fatias hipocâmpais submetidas a altos níveis (tóxicos) de Glu (Nonose et al., 2020) e em cultura de astrócitos (Quincozes-Santos et al. 2013; Dal-Cim et al., 2019). Além disso, a GUO reduz a liberação de Glu (Molz et al., 2011), restaura os níveis de ATP intracelular e a liberação de lactato em fatias hipocâmpais submetidas à PGO (Thomaz et al. 2020). Ainda, a GUO reduz o aumento da produção de ROS induzida pelo Glu (Dalla Corte et al, 2012) e reduz o estresse oxidativo mitocondrial (Dal-Cim et al., 2012).

O mecanismo de ação da GUO ainda não está completamente elucidado, mas diversos dos efeitos já estudados como a proteção contra a apoptose, estresse oxidativo mitocondrial e modulação do receptor NMDA são mediados pela enzima fosfatidilinositol-3-cinase (Oleskovicz et al., 2008; Molz et al., 2011; Bettio et al., 2012; Dal-Cim et al, 2012, 2019), proteína cinase B (PKB ou Akt) e glicogênio sintase cinase  $3\beta$  (Molz et al., 2011; Dal-Cim et al, 2012).

Ainda não está claro qual o receptor responsável pela atividade dos PDGs. Porém a existência de um sítio de interação de alta afinidade para [ $^3\text{H}$ ]-GUO, com a constante de dissociação ( $K_D$ ) de  $95,4 \pm 11.9$  nM já foi identificado, essa interação é saturável, reversível e não é deslocada por outras purinas como a adenosina, ATP, hipoxantina, xantina, cafeína, entre outros, sugerindo que este receptor não é um dos receptores de PDAs (Di Liberto et al., 2016; Traversa et al, 2002).

Apesar disso, muitos dos efeitos da GUO são revertidos por ligantes de receptores de adenosina: a cafeína é capaz de reverter os efeitos tipo ansiolíticos; o DPCPX, um antagonista seletivo do receptor de adenosina  $A_1$ , reverte os efeitos antinociceptivos (Schmidt et al., 2008); o aumento da adesão neuronal em neurônios cerebelares em cultura é bloqueado pelo antagonista seletivo do receptor  $A_{2A}$

ZM241385 (Decker et al., 2019); os efeitos protetores em cultura de células SH-SY5Y, sujeitas a estresse oxidativo mitocondrial, são bloqueado tanto pelo DPCPX quanto pelo ZM241385 (Dal-Cim et al., 2012). Em fatias hipocâmpais de ratos submetidas à PGO, a redução da formação de ROS e a redução da perda do potencial de membrana mitocondrial são inibidas pelo DPCPX e pelo agonista do receptor  $A_{2A}$  CGS21680, mas não pelo antagonista do receptor  $A_{2A}$  ZM241385, sugerindo que a interação com os receptores de adenosina  $A_1$  e  $A_{2A}$  aconteçam de forma diferente neste modelo (Dal-Cim et al., 2013). Considerando esses resultados, surgiu a hipótese de que a GUO age através de oligômeros de  $A_1$  e  $A_{2A}$ , ou seja, modulando o heterômero  $A_1/A_{2A}$ . De fato, em fatias hipocâmpais de camundongos que não expressam o receptor  $A_{2A}$  sujeitas à PGO, a GUO não apresenta seu efeito neuroprotetor. Além disso, a GUO não é capaz de modificar a interação do antagonista do receptor  $A_{2A}$  MRS7396 em células expressando apenas o receptor  $A_{2A}$ , porém bloqueia parcialmente essa interação em células expressando tanto os receptores  $A_1$  quanto o  $A_{2A}$  (Lanznaster et al., 2019), apontando para um efeito da GUO dependente da presença dos receptores  $A_1$  e  $A_{2A}$ .

No entanto, outras proteínas também parecem ser um possível alvo da GUO e mediar seus efeitos neuroprotetores. A primeira evidência sugerindo a interação de GUO com canais de potássio ( $K^+$ ), foi a demonstração de que o tratamento de astrócitos com GUO promovia uma corrente de  $K^+$  e o aumento nos níveis de um canal de  $K^+$  retificador de voltagem (Benfenati et al., 2006). Estudos de nosso laboratório demonstraram que a 4-aminopiridina, um bloqueador de canais de  $K^+$ , reverte o efeito neuroprotetor da GUO em fatias hipocâmpais de rato sujeitas à PGO (Oleskovicz et al., 2008). Também em fatias hipocâmpais sujeitas à PGO, o uso de glibenclamida, um inibidor seletivo de canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP, ou o uso de apamina, um inibidor seletivo de canais de  $K^+$  de baixa condutância ativados por cálcio ( $Ca^{2+}$ ), não alteram o efeito protetor da GUO. Porém o tratamento com caribdotoxina, um bloqueador seletivo do canal de  $K^+$  de alta condutância dependente de  $Ca^{2+}$  (BK), leva a uma inibição do efeito da GUO (Dal-Cim et al., 2011). Vale destacar que nenhum dos inibidores de canais de  $K^+$  leva a uma alteração do efeito da PGO sozinhos. Também observamos que, na presença de GUO extracelular em células HEK293 transfectadas com o canal BK, há um efluxo de  $K^+$  gerado pela abertura do canal, indicando que a GUO interage e provoca a abertura do canal (Tasca, 2018b).

### 1.3 CANAL BK

O canal BK (FIGURA-2) é um canal de potássio de alta condutância que possui um sítio ativo para  $\text{Ca}^{2+}$  na região intracelular. É um tetrâmero formado por quatro subunidades- $\alpha$  iguais, codificadas pelo gene *KCNMA1* (ou *Slo1*). Cada subunidade contém sete domínios transmembrana (S0-S6), sendo um deles o domínio de poro com a sequência assinatura TVGYGD, típica de canais de potássio. Além disso, a parcela C-Terminal, voltada para o citosol, contém dois domínios reguladores de condutância de potássio (RCK), onde está o sítio de interação com o  $\text{Ca}^{2+}$  de alta afinidade, além desse também há um sítio para cátions bivalentes, estudado majoritariamente pela interação com o  $\text{Mg}^{2+}$  (Latorre et al., 2017; Kshatri et al., 2018).

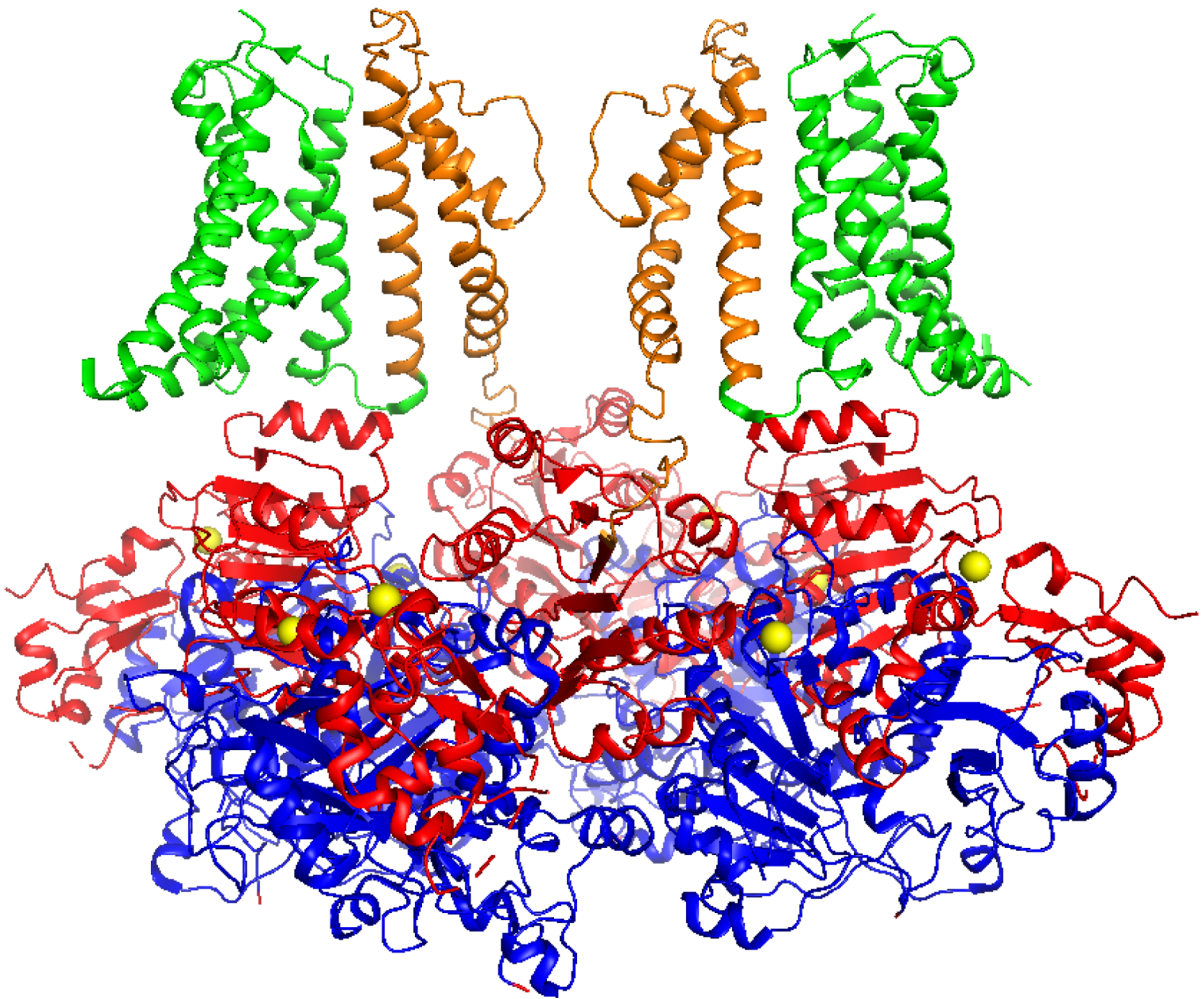


Figura 2. Estrutura do canal BK (subunidades- $\alpha$  que formam o poro). Em vermelho e azul estão as regiões sensíveis ao  $\text{Ca}^{2+}$ , voltadas para o meio intracelular. Em verde e laranja estão os domínios transmembrana de apenas duas das subunidades- $\alpha$ . Fonte: (Cui, 2020).

Em vertebrados sabe-se que o BK pode estar expresso com uma das subunidades auxiliares (regulatórias)  $\beta 1-4$  e  $\gamma 1-4$ . Como o canal é distribuído ubiquamente pelo corpo, a presença destas subunidades, assim como o splicing alternativo, confere ao BK suas diferentes funções em diferentes tecidos. O BK expresso na musculatura lisa está majoritariamente associado à subunidade- $\beta 1$  e sua função está relacionada ao controle do tônus muscular, importante, por exemplo, para regulação da pressão arterial. Nas células intercaladas dos túbulos renais, o BK é expresso majoritariamente com a subunidade- $\beta 4$  e sua função está associada à redução do volume celular em resposta ao aumento de estresse causado pelo aumento do fluxo nos túbulos renais, reduzindo a pressão neles (Latorre et al., 2017). Outros tipos celulares ou tecidos possuem suas especificidades quanto a expressão do BK, sendo o SNC o mais importante para este trabalho.

No SNC o BK está presente majoritariamente com a subunidade- $\beta 4$ , com a sua distribuição geralmente coincidindo com a da subunidade- $\alpha$ , a subunidade- $\beta 2$  também está presente, embora menos comum (Behrens et al., 2000). A subunidade- $\beta 1$  no cérebro está presente praticamente apenas na musculatura lisa dos vasos. Uma das principais funções do BK em neurônios é a de regulação do potencial de ação, sendo que a ativação do BK pode tanto aumentar quanto diminuir o disparo a depender do tipo celular. Isso se dá por conta da cinética complexa do canal, envolvendo as diferentes subunidades reguladoras e outros canais, fazendo com que a ativação do BK possa ser o principal componente ou da fase de repolarização do potencial de ação, ou do período refratário (Contet et al., 2016). Por exemplo, nos neurônios do núcleo vestibular que disparam o potencial de ação de forma mais rápida, a fase de repolarização é dominada pelos canais de potássio dependentes de voltagem Kv3, porém nos neurônios GABAérgicos de disparo mais lento, a mesma fase é dominada pelo BK (Gittis et al., 2010). Além disso, o BK pode regular outras funções do neurônio, como a liberação de neurotransmissores, excitabilidade dendrítica, e o BK astrocitário regula a vasodilatação dos vasos próximos (Contet et al., 2016).

Alguns fenótipos patológicos estão associados a alteração da atividade do BK, assim como a sua modulação pode reduzir sintomas patológicos. Em um modelo de epilepsia *in vivo*, o tratamento com paxilina, um antagonista do BK, foi capaz de reverter ou reduzir a atividade epiléptica induzida pela aplicação de picrotoxina ou pentilenotetrazol (Sheehan et al., 2009). Em um modelo *in vivo*

triplo-transgênico de AD, a administração de ácido isopimárico, um ativador do BK, leva a uma redução no déficit cognitivo e à redução da concentração do peptídeo A $\beta$ 1-42 no hipocampo (Wang et al., 2015). O ativador do BK, BMS-204352, administrado de forma intravenosa duas horas após a oclusão da artéria cerebral média em um modelo de isquemia, leva a uma redução do volume de infarto (Gribkoff et al., 2011).

Embora se conheça diversos efeitos associados à modulação do BK, principalmente levando em conta as diferentes subunidades auxiliares, e muitas moléculas diferentes interajam com o canal, pouco se sabe sobre o mecanismo de interação da grande maioria delas. Já foi demonstrado um sítio de interação para 17 $\beta$ -Estradiol, que interage com a subunidade- $\beta$ 1 e é dependente dos resíduos Trp163 e Phe166 (Granados et al., 2019). Outros casos como o fármaco Clorzoxazona, um relaxante muscular, sabe-se que interage na parcela intracelular (Liu et al., 2003) e a Zonisamida, uma droga antiepiléptica, também interage na parcela intracelular (Huang et al., 2007). Com as moléculas NS1619 e Cym04, foi demonstrado que também ativam o canal quando colocados no meio intracelular e que essa ativação é dependente de uma sequência conectora da região RCK e S6 do BK (Gessner et al., 2012).

Porém ainda muitas outras moléculas, como a BMS-204352 citada anteriormente, tetrahydroquinolina, alguns flavonoides, o ácido docosahexaenóico, ácido araquidônico e a própria GUO ainda não possuem um local de interação descrito. Um estudo eletrofisiológico de ativação de BK por GUO em células HEK293 transfectadas com a subunidade alfa (funcional) do canal e que não expressam transportadores de nucleosídeos ou receptores de adenosina mostrou que a administração extracelular de GUO induz correntes de K<sup>+</sup> (Tasca et al., 2018b). Em células de neuroblastoma SHSY-5Y também foi demonstrado que GUO induz uma corrente de K<sup>+</sup> quando aplicada no meio extracelular (Gambino et al., 2022) e que o efeito protetor da GUO frente ao estresse oxidativo mitocondrial é prevenido pela adição do peptídeo caribdotoxina, um bloqueador do BK (Dal-Cim et al., 2012). Outros estudos *in vitro* também utilizam ligantes do BK no meio, possibilitando que interajam com a parcela extracelular do canal. Desta forma, esse trabalho tem o intuito de analisar se existe um possível sítio de interação da GUO na parcela extracelular do BK.

Para isto, este trabalho usou de uma técnica computacional chamada *molecular docking* (atracamento molecular) para analisar a interação entre a GUO e o BK. O processo de *docking* envolve a predição da orientação e da conformação de um ligante em um local-alvo de uma proteína, designado pelo pesquisador (Kitchen et al., 2004). A partir destas conformações são calculadas a energia de interação de cada uma e assim possibilitar a análise e escolha das predições mais prováveis de acontecerem biologicamente (Kitchen et al., 2004). Este trabalho também testou outros dois ligantes seletivos sintéticos do canal BK, o NS1619 (FIGURA-3.A; Olesen et al., 1994) e o NS11021 (FIGURA-3.B; Bentzen et al., 2007), sendo feita a mesma análise usada com a guanosina e tendo o objetivo de comparar ativadores conhecidos do canal. Não se sabe o sítio exato de interação nem do NS1619 nem do NS11021, portanto testar possíveis sítios de interação destas moléculas também é um dos alvos deste trabalho. Além disso, foram feitas análises dos aminoácidos envolvidos na interação a fim de buscar os aminoácidos chave para que a interação ligante-alvo molecular possa acontecer.

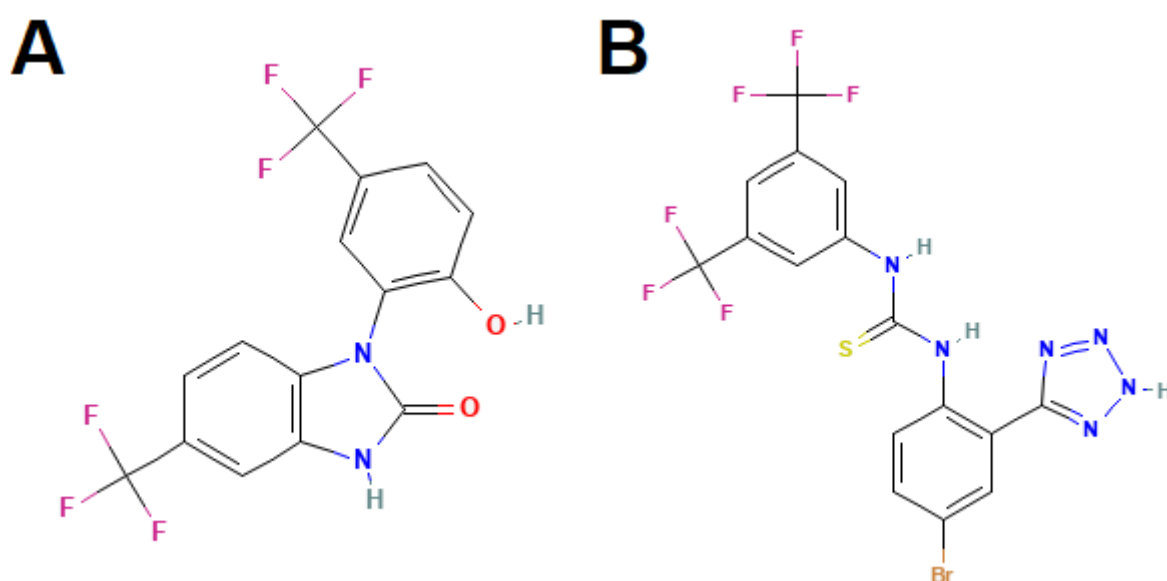


Figura 1. A: Estrutura química do NS1619; B: Estrutura química do NS11021. Fonte: PubChem.



## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Predizer a interação entre a Guanosina e o canal iônico BK, e desvendar os possíveis sítios de interação acessíveis para ligantes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a proteína do canal iônico BK e identificar possíveis cavidades na sua superfície compatíveis com o tamanho da Guanosina;
- Avaliar a capacidade de interação das cavidades encontradas e do domínio de poro do canal BK via *molecular docking* e estimativa de energia livre;
- Analisar os aminoácidos possivelmente envolvidos na interação da conformação do ligante com menor energia livre (maior afinidade) pelo BK, buscando os aminoácidos chave, que participem da interação com todos os ligantes em todas as conformações do canal (canal aberto ou canal fechado);
- Comparar a sequência de aminoácidos do BK humano com o de outras espécies através de um alinhamento, buscando verificar se os aminoácidos chave encontrados são conservados evolutivamente.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS MOLÉCULAS

As estruturas terciárias cristalizadas do BK usadas neste trabalho foram obtidas através do banco de dados RCSB - Protein Data Bank (PDB) sob os códigos 6V3G, que correspondem à conformação em que o canal está fechado e apenas com as subunidades- $\alpha$  (subunidade obrigatória); 6V35, correspondente à conformação em que o canal está fechado e com as subunidades- $\alpha+\beta$ 4 (subunidade regulatória expressa no sistema nervoso central); 6V38, correspondente à conformação em que o canal está aberto e apenas com as subunidades- $\alpha$  e 6V22, correspondente à conformação em que o canal está fechado e com as subunidades- $\alpha+\beta$ 4 (FIGURA-4; Tao et al., 2019.). Foram usadas três moléculas como ligantes: Guanosina, NS11021 e o NS1619. E suas estruturas foram obtidas no banco de dados PubChem sob os códigos 135398635, 24825677 e 4552 respectivamente.

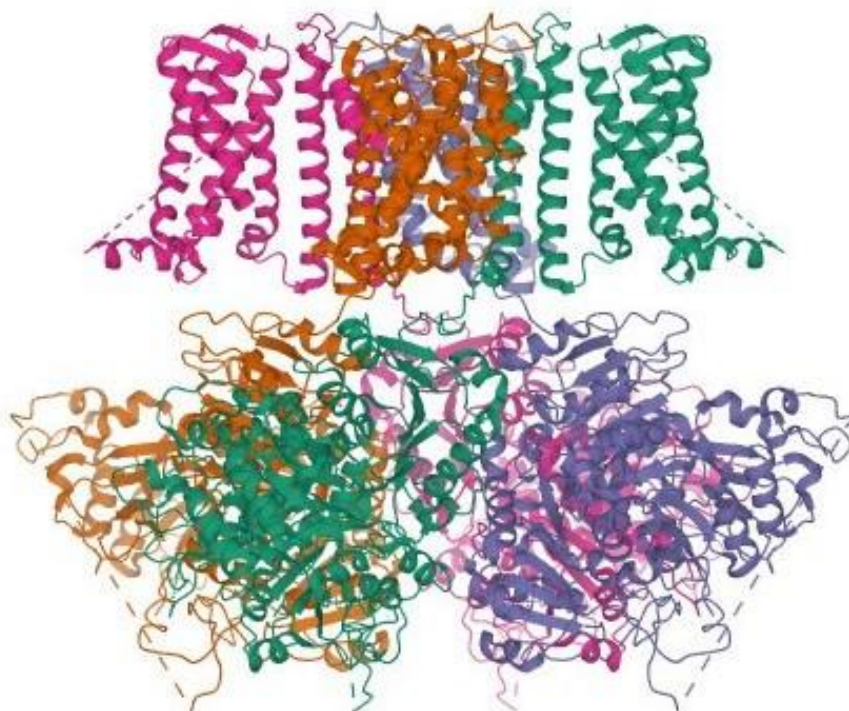


FIGURA 4. Estrutura cristalizada do canal BK depositada no banco de dados RCSB - Protein Data Bank sob o código 6V3G. Cada uma das subunidades- $\alpha$  estão coloridas com uma cor (laranja, verde, roxo e rosa). Fonte: RCSB - Protein Data Bank

### 3.2 BUSCA POR CAVIDADES E MOLECULAR DOCKING

As regiões inteiramente intracelulares (do resíduo 326 em diante) do canal foram removidas com o programa PyMol 2.5, para reduzir o custo computacional das análises futuras, esta remoção não afeta a parcela extracelular, que será o foco deste trabalho. A preparação do BK para o *docking*: remoção da água, adição dos hidrogênios, atribuição das cargas, escolha dos aminoácidos que terão suas cadeias laterais flexíveis e seleção da região (caixa) foi feita com o programa MGLTools 1.5.7. Possíveis cavidades foram buscadas através do programa CASTp (Tian et al., 2018), suas posições na membrana foram analisadas com a ferramenta PPM (Lomize et al., 2022) e através da ferramenta Caver (Stourac et al., 2019) foi verificado se existia um trajeto possível para o ligante chegar na região da cavidade. O tamanho da caixa é o suficiente para posicioná-la na cavidade escolhida (FIGURA-5) e na região do poro acessado de fora da célula. A análise de *docking* foi feita através da ferramenta AutoDock Vina 1.1.2.

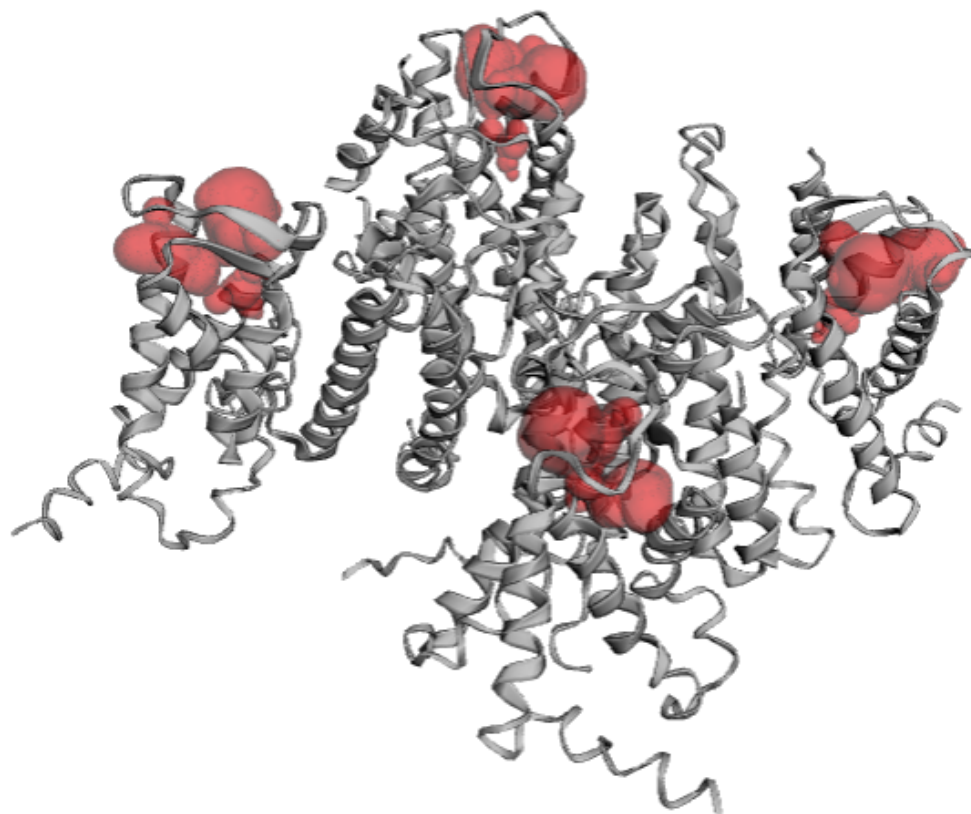


FIGURA 5. Estrutura do canal BK modificada (removidos os aminoácidos da posição 326 em diante) com as cavidades calculadas através da ferramenta CASTp (em vermelho). Fonte: elaborado pelo autor.

### 3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS DE *MOLECULAR DOCKING*

Os dados obtidos foram comparados com dados de outros trabalhos que usaram o mesmo método com objetivo de filtrar os resultados deste trabalho, buscando apenas as conformações onde os ligantes tenham, no mínimo, a energia de interação tão forte quanto outros testes presentes na literatura e assim buscar possíveis sítios de interação tanto para guanosina, quanto para o NS11021 e NS1619. Também foram comparados os resultados do mesmo ligante com as diferentes conformações e subunidades do canal BK, entre os diferentes locais de interação testados e entre os diferentes ligantes, com o objetivo de analisar se há alguma diferença de afinidade entre os diferentes casos testados.

A análise dos aminoácidos envolvidos na interação entre os ligantes e a proteína foram feitas com o programa Discovery Studio Visualizer 21.1.0.20298, usando a ferramenta Receptor-Ligand Interactions.

Também foi feito um alinhamento das sequência aminoacídicas do BK de diferentes espécies de animais através da ferramenta Clustal Omega (Madeira et al., 2022) e a visualização deste alinhamento foi feita com a ferramenta Jalview (Waterhouse et al., 2009). As sequências proteicas das diferentes espécies foram obtidas no banco de dados UniProt (<https://www.uniprot.org/>; The UniProt Consortium, 2023), sob os códigos Q12791 (*Homo sapiens*), Q08460 (*Mus musculus*), Q8AYS8 (*Gallus gallus*), Q90ZC7 (*Xenopus laevis*), Q5QJC5 (*Aplysia californica*), Q95V25 (*Caenorhabditis elegans*) e A0A0B4KHT2 (*Drosophila melanogaster*).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 BUSCA POR CAVIDADES NO CANAL BK

Os resultados do programa CASTp possuíam pelo menos uma cavidade hidrofóbica em regiões semelhantes, para cada uma das estruturas analisadas. Destas cavidades foram escolhidas as mais prováveis de serem acessadas através do meio extracelular e que eram compostas majoritariamente pelos mesmos aminoácidos, elas estão representadas na FIGURA-6.

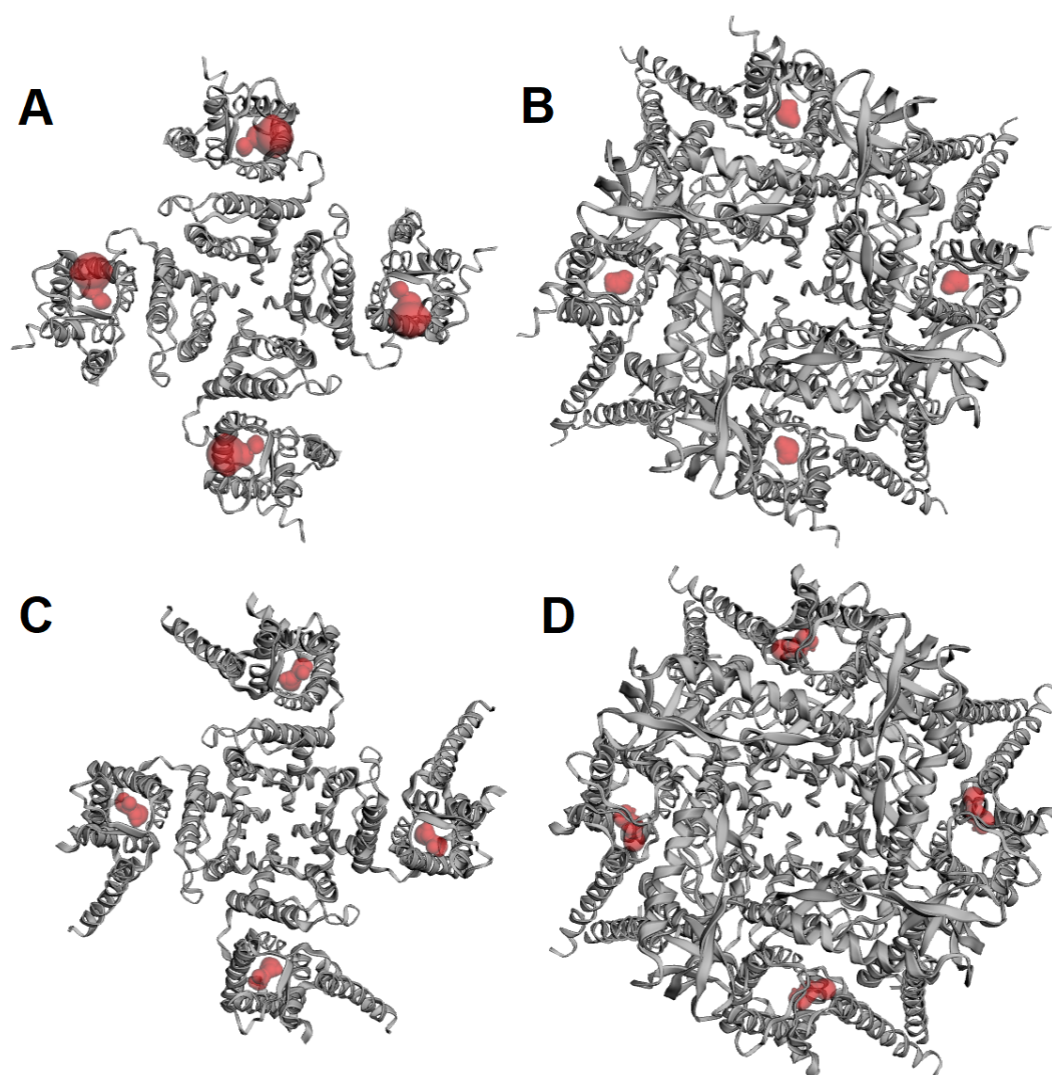


FIGURA 6. Resultados da análise do canal BK através da ferramenta CASTp, as cavidades estão representadas em vermelho e em cinza está a estrutura da proteína modificada (deleção dos aminoácidos da posição 326 em diante) vista de fora da célula. As cavidades representadas foram escolhidas pois elas estão em uma posição semelhante nas diferentes conformações e possuem diversos aminoácidos em comum. A: Conformação 6v3g (canal fechado e sem a subunidade- $\beta$ ); B: Conformação 6v35 (canal fechado e com a subunidade- $\beta$ ); C: Conformação 6v38 (canal aberto e sem a subunidade- $\beta$ ); D: Conformação 6v22 (canal aberto e com a subunidade- $\beta$ ). Fonte: elaborado pelo autor.



A análise da similaridade da posição e da probabilidade inicial de serem acessíveis a partir do meio extracelular foram feitas visualmente e os aminoácidos participantes foram analisados a partir da listagem fornecida pelo próprio CASTp. Também foi analisado a posição das cavidades em relação a membrana celular, representados na FIGURA-7, onde é possível ver a posição da membrana em vermelho, e os aminoácidos envolvidos nas cavidades em azul, a forma de representar cada estrutura foi escolhida com o intuito de facilitar a visualização da cavidade e sua posição relativa à membrana.

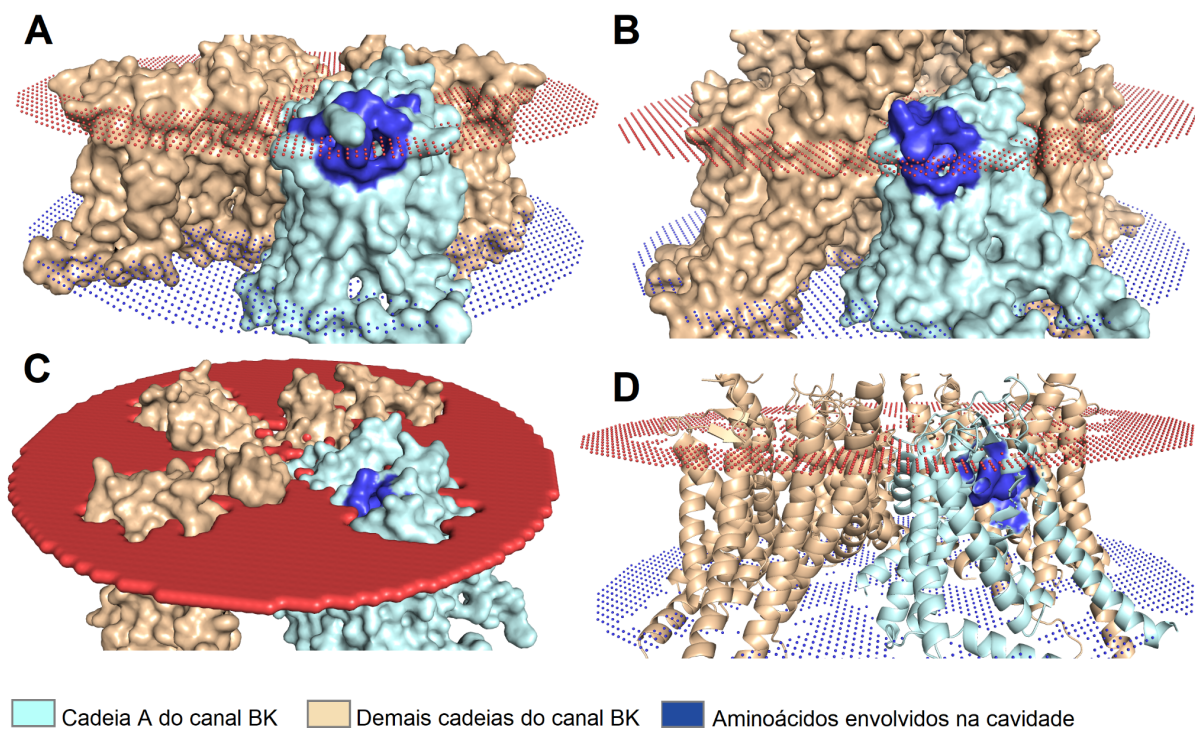


FIGURA 7. Visualização do canal BK preparada com o programa PyMol do resultado obtido da ferramenta PPM, mostrando a orientação do canal na membrana e a os aminoácidos da cadeia A envolvidos na cavidade encontrada pelo programa CASTp para cada uma das conformações. A forma de visualização foi escolhida de forma a apresentar melhor a localização da cavidade em relação à membrana, representada em vermelho. A: Conformação 6v3g (canal fechado e sem a subunidade- $\beta$ ); B: Conformação 6v35 (canal fechado e com a subunidade- $\beta$ ); C: Conformação 6v38 (canal aberto e sem a subunidade- $\beta$ ); D: Conformação 6v22 (canal aberto e com a subunidade- $\beta$ ). Fonte: elaborado pelo autor.

A partir destes resultados foi verificado se existia um trajeto possível conectando a parcela extracelular com as cavidades selecionadas em cada uma das diferentes conformações, utilizando a ferramenta Caver, os resultados estão expressos na FIGURA-8.

As cavidades nas diferentes conformações são formadas por alguns poucos aminoácidos diferentes e possuem tamanho variado. Além disso, o trajeto encontrado pelo Caver também possui variação conforme as diferentes conformações. Estas pequenas variações foram tratadas como irrelevantes para a escolha da cavidade para a simulação de atracamento molecular (*Docking*), pois as estruturas cristalizadas são estáticas e não representam o movimento dinâmico das proteínas, não pode prever, exatamente, o possível tamanho da cavidade em uma situação real. Assim, as regiões selecionadas para o *Docking* foram as cavidades expressas na FIGURA-6 para cada uma das conformações e a região extracelular do poro.

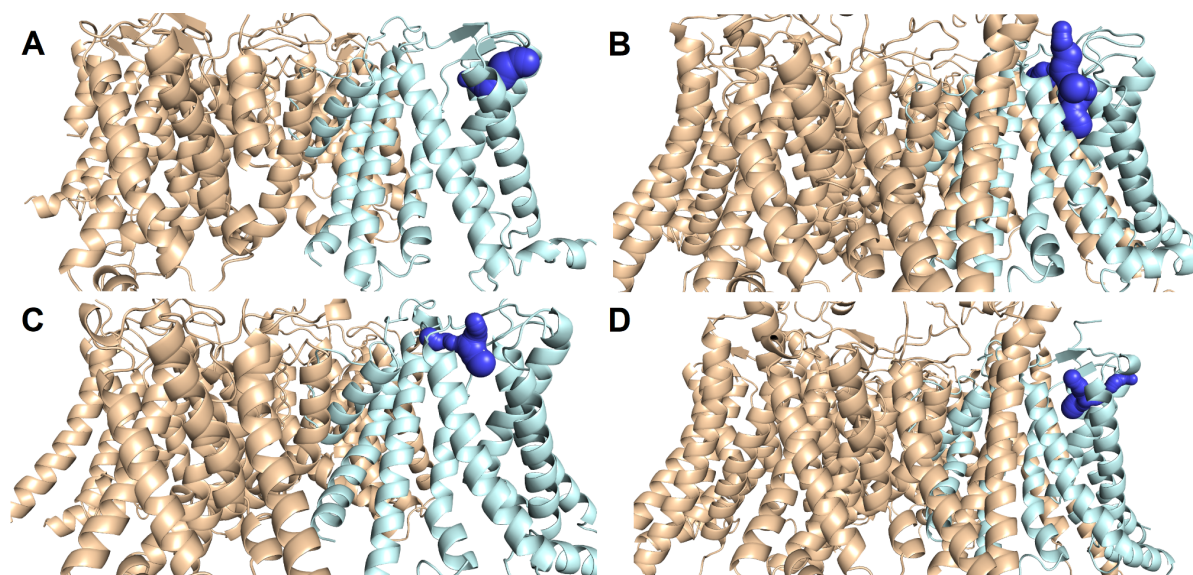


FIGURA 8. Visualização do canal BK destacando o resultado obtido da ferramenta Caver preparada com o programa PyMol. Em azul, representado na forma de esferas, estão as trajetórias encontradas, escolhidas por terem maior diâmetro e/ou menor comprimento. A: Conformação 6v3g (canal fechado e sem a subunidade- $\beta$ ); B: Conformação 6v35 (canal fechado e com a subunidade- $\beta$ ); C: Conformação 6v38 (canal aberto e sem a subunidade- $\beta$ ); D: Conformação 6v22 (canal aberto e com a subunidade- $\beta$ ). Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.2 DOCKING DA GUO, DO NS1619 E DO NS11021 COM O CANAL BK

Os resultados do *Docking* das moléculas GUO, NS1619 e NS11021 podem ser visualizados na TABELA-1, onde está expresso a menor energia livre calculada pelo programa AutoDock Vina para cada um dos ligantes em cada uma das conformações do canal BK. As conformações dos ligantes que possuem a energia

citada na tabela foram usadas para as demais análises. Podemos ver que a energia livre dos ligantes sintéticos na conformação 6v38, mostra uma afinidade baixíssima pela proteína (alta energia livre) na região do poro, -2,975 para o NS1619 e -2,515 para o NS11021. Além disso as energias livres de todos os ligantes em todas as conformações foram mais altas na região do poro do que a da cavidade, mostrando uma menor afinidade pelo poro. Também, estas interações se fazem na superfície, permitindo que o ligante interaja com qualquer molécula que esteja no meio.

Ligante	Conformação	Energia livre*	
		Cavidade**	Poro
GUO	6v3g	-8,650	-6,203
	6v35	-8,811	-6,354
	6v38	-7,175	-6,158
	6v22	-9,326	-6,457
NS1619	6v3g	-11,032	-6,743
	6v35	-10,328	-6,466
	6v38	-7,271	-2,975
	6v22	-7,151	-6,399
NS11021	6v3g	-10,281	-6,787
	6v35	-16,819	-6,716
	6v38	-9,998	-2,515
	6v22	-7,617	-6,337

TABELA 1. Menor valor de energia livre calculado pelo programa AutoDock Vina, indicando a conformação com maior afinidade pelo BK, para cada ligante e cada conformação da proteína, onde a 6v3g representa o canal fechado sem a subunidade- $\beta$ , 6v35 representa o canal fechado e com a subunidade- $\beta$ , 6v38 representa o canal aberto sem a subunidade- $\beta$  e 6v22 representa o canal aberto com a subunidade- $\beta$ . \*Valor estimado do  $\Delta G$ , calculado pelo AutoDock Vina. \*\* Cavidade encontrada pelo programa CASTp. Fonte: elaborado pelo autor.

É possível analisar conjuntamente outra informação fornecida pelo Discovery Studio Visualizer, demonstrada na FIGURA-9 através das esferas verdes no entorno de alguns átomos. Elas representam átomos “insatisfeitos”, que são calculados pelo programa como átomos que podem fazer interações com outras moléculas no meio. Como estas possibilidades não são calculadas pelo AutoDock



Vina, é possível apenas estimar que na presença de um meio aquoso, os ligantes interagindo com a superfície da proteína (em contraste com uma cavidade) poderiam rapidamente interagir com a água ou outros átomos e se difundirem pelo meio e assim se separarem do canal. Devido à interação na superfície, a baixa afinidade (apesar das muitas interações) e a presença de átomos insatisfeitos, a possibilidade de a interação com o poro levar a abertura do canal foi descartada e não foram feitas as demais análises com ela.

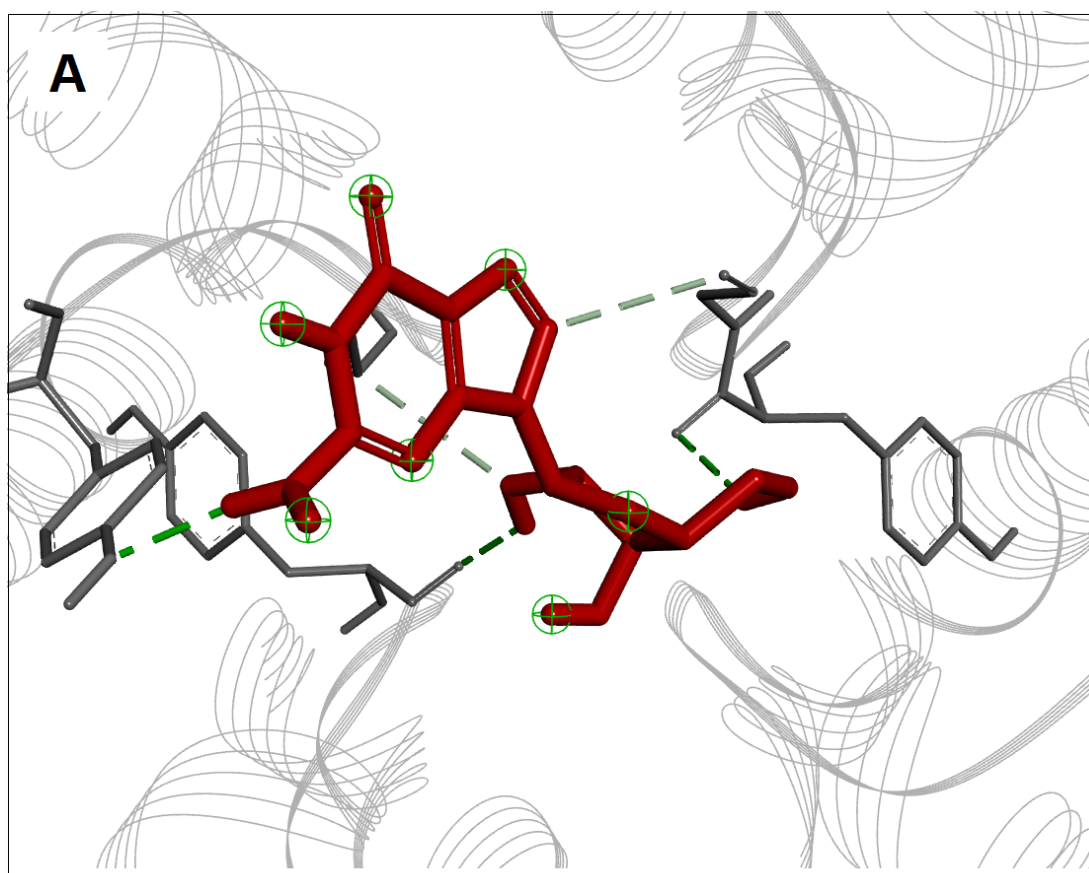


FIGURA 9. Posição com menor energia livre, calculada pelo AutoDock Vina, da guanosina (em vermelho) na região do poro do BK (em cinza). Imagem feita com o programa Discovery Studio Analyzer, com a ferramenta Receptor-Ligand Interaction, demonstrando os átomos insatisfeitos por esferas verdes, estes átomos podem fazer pontes de hidrogênio com outras moléculas presentes no meio. Fonte: elaborado pelo autor.

Quanto à energia livre dos diferentes ligantes interagindo com o BK na região da cavidade, elas estão dentro do esperado para um ligante natural. Outros estudos, analisando a energia livre de diferentes compostos, chegam a valores semelhantes, podendo variar de até -5 Kcal/mol até menos que -18 Kcal/mol (Abd

Ghani, 2020; Rutwick Surya 2021; Lehrer, 2023). Isso nos indica que esta cavidade é um possível local de interação dos três ligantes analisados com o canal.

Podemos ver que, no geral, a afinidade do BK pelos ligantes é maior nas conformações onde o canal está fechado (6v3g e 6v35) do que nas conformações onde o canal está aberto (6v38 e 6v22). Isto indica que é mais provável que os ligantes interajam com o canal quando este está na conformação fechada, perdendo afinidade conforme o canal muda de conformação para permitir a passagem dos íons  $K^+$ , porém dois casos discordam desta possibilidade. Um é a variação da afinidade do ligante NS11021 entre a conformação 6v3g (canal fechado, sem a subunidade- $\beta$ ) e 6v38 (canal aberto, sem a subunidade- $\beta$ ), com energias livres de -10,281 e -9,998 respectivamente, onde a variação é muito pequena para indicar uma tendência de redução da afinidade, podendo ser resultado das limitações da técnica empregada. O outro é a diferença de afinidade da GUO pelo BK na conformação 6v35 (canal fechado, com a subunidade- $\beta$ ), e na conformação 6v22 (canal aberto, com a subunidade- $\beta$ ), possuindo energia livre de -8,650 e -9,326 respectivamente.

#### 4.3 INTERAÇÕES DA GUO, DO NS1619 E DO NS11021 COM O BK

Os ligantes sintéticos, por serem moléculas maiores e com mais átomos suscetíveis a fazerem interações como Enxofre, Flúor e Bromo, interagem com muitos aminoácidos quando comparados à GUO, fazendo diferentes tipos de interação. Observa-se essa informação exemplificada na FIGURA-10, que é um esquema em duas dimensões dos aminoácidos envolvidos na interação do BK na conformação 6v3g com cada um dos ligantes, feito através de uma análise com o programa Discovery Studio Visualizer. O software usa a posição do ligante encontrada pelo AutoDock Vina e analisa todos os aminoácidos da proteína, buscando os que estão em uma posição na qual a distância entre os átomos do ligante e de algum aminoácido possibilitem algum tipo de interação. Dessa forma, a interação é escolhida dependendo das propriedades de cada átomo, das ligações que ele está fazendo e da distância que ele está dos átomos dos ligantes.

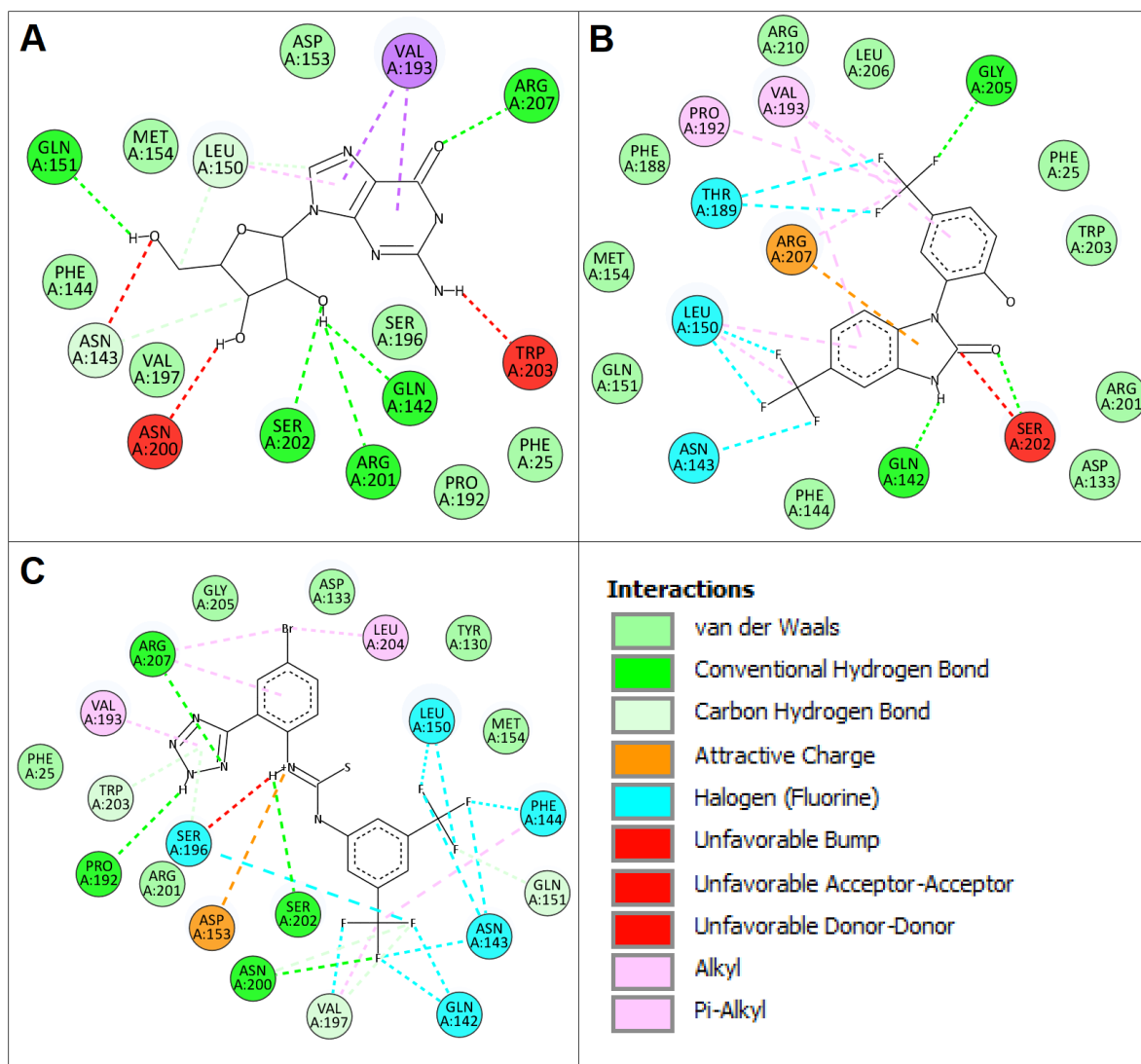


FIGURA 10. Esquema em duas dimensões das possíveis interações entre os ligantes e o canal BK na conformação 6v3g, cada aminoácido é representado por um disco e qualquer interação para além das de Van der Waals são representadas por um tracejado colorido. A cor do disco e do tracejado indica o tipo de interação, seguindo a legenda. A: Guanosina; B: NS1619; C: NS11021. Fonte: elaborado pelo autor através do programa Discovery Studio Visualizer.

A FIGURA-10 serve de exemplo para entendermos a quantidade e a variedade de interações possíveis entre os ligantes e a proteína. Podemos ver que para a GUO, assim como para os ligantes sintéticos, há uma possível posição na região escolhida onde ela interage com diversos aminoácidos e estas interações possivelmente poderiam contribuir para alteração de conformação do canal. Esta mesma análise foi feita com todos os ligantes e para todas as conformações, mostrando todos os aminoácidos possivelmente envolvidos em alguma interação, diferenciando entre interações de Van der Waals e outros tipos de interações (TABELA-2).

Ligante	Conformação	Aminoácidos cavidade*	
		Van der Waals**	Outras interações***
GUO	6v3g	PHE25, PHE144, ASP153, MET154, PRO192, VAL197.	GLN142, ASN143, LEU150, GLN151, VAL193, SER202, ARG207.
	6v35	LEU127, ILE129, TYR130, LEU150, THR189, VAL186, VAL193, SER196, ARG201, SER202.	ALA126, ASP133, ASP153, ASN157, TRP203, ARG207.
	6v38	ILE129, TYR130, PRO137, LEU150, ASP153, VAL193, SER196, GLY205.	ASP133, ASN136, SER140, GLN142, SER202, TRP203, LEU204, ARG210.
	6v22	PHE25, ASN136, LEU150, ASN157, THR189, PRO192, SER202, LEU204, LEU206.	ASP133, GLN142, VAL193, SER196, TRP203, GLY205, ARG207.
NS1619	6v3g	PHE25, ASP133, PHE144, GLN151, MET154, PHE188, SER196, ARG201, TRP203, LEU206, ARG210.	GLN142, ASN143, LEU150, THR189, PRO192, VAL193, SER202, GLT205, ARG207.
	6v35	ASP133, THR149, SER196, ARG201, SER202, LEU204.	LEU150, ASP153, MET154, PHE188, THR189, PRO192, VAL193, VAL197, TRP203, GLY205, LEU206, ARG207.
	6v38	TYR130, SER134, ILE138, PHE144, TRP203.	ASP133, ASN136, PRO137, SER140, GLN142, ASP147, THR149, LEU150, ASP153, VAL193, SER196, SER202, LEU204, ARG207, ARG210.
	6v22	PHE25, SER140, GLN142, THR149, SER196, ARG201, SER202, TRP203, GLY205.	ASP133, ASN136, CYS141, ASP147, LEU150, ASP153, THR189, PRO192, VAL193, ARG207.
NS11021	6v3g	PHE25, TYR130, ASP133, MET154, ARG201, GLY205.	GLN142, ASN143, PHE144, LEU150, GLN151, ASP153, PRO192, VAL193, SER196, VAL197, ASN200, SER202, TRP203, LEU204, ARG207.
	6v35	ILE129, ASN157, SER202, LEU204.	PHE25, ALA126, ASP133, THR149, LEU150, ASP153, MET154, PHE188, THR189, PRO192, VAL193, SER196, VAL197, TRP203, GLY205, LEU206, ARG207, ARG210.
	6v38	PRO137, GLU139, ILE152, ASP153, SER202, TRP203, ARG207, ARG210.	ILE129, ILE132, ASP133, ASN136, ILE138, SER140, GLN142, PHE148, THR149, LEU150, LEU204.
	6v22	ILE132, ILE138, GLN142, LEU150, PRO192, SER202, TRP203.	ASP133, ASN136, PRO137, SER140, CYS141, ASP147, THR149, VAL193, SER196, LEU204, ARG207.

TABELA 2. Lista com os aminoácidos que interagem com cada ligante em cada conformação, obtidos com o programa Discovery Studio Visualizar. \* Cavidade encontrada pelo programa CASTp. \*\* Aminoácidos que fazem apenas interações de Van der Waals. \*\*\* Qualquer outra interação favorável, polar ou apolar. Fonte: elaborado pelo autor.

Podemos ver que apenas dois aminoácidos participam da interação com todos os ligantes em todas as conformações, estes são a LEU150, a SER202. Se considerarmos apenas a GUO, a LEU150, a SER202 e mais a VAL193 participam da interação em todas as conformações. Estes são os principais candidatos a

aminoácidos chave que possibilitam a ação dos ligantes de levarem à abertura do canal. Se buscarmos os aminoácidos que se repetem apenas nas conformações onde o canal está fechado, não há nenhum resultado, porém apenas para as conformações onde o canal está aberto, o ASN136 aparece como exclusivo destas conformações, assim podemos adicionar ele à lista de possíveis aminoácidos chave. Foi também feito estas mesmas buscas limitadas à interação com a GUO, porém não houve nenhum resultado diferente.

Além dos aminoácidos encontrados usando o resultado do *Docking*, também foi percebido a existência da PHE144 e TYR145. A posição deles é na região de uma das aberturas da cavidade analisada neste trabalho e como há um anel aromático na estrutura destes aminoácidos, foi considerado que eles possivelmente possuem um papel auxiliar no deslocamento dos ligantes até a cavidade, interagindo inicialmente, antes do ligante entrar na cavidade, aumentando a presença dele naquela posição. A PHE144 já aparece na TABELA-2 como um dos aminoácidos que interagem com os ligantes em algumas conformações. A FIGURA-11 é um exemplo da posição da PHE144 e TYR145 em relação ao trajeto encontrado pelo programa Caver para a cavidade do BK na conformação 6v3g, onde podemos ver que a posição é bem próxima do início do trajeto. Estes aminoácidos também foram incluídos na lista de possíveis aminoácidos chave para a ação dos ligantes.

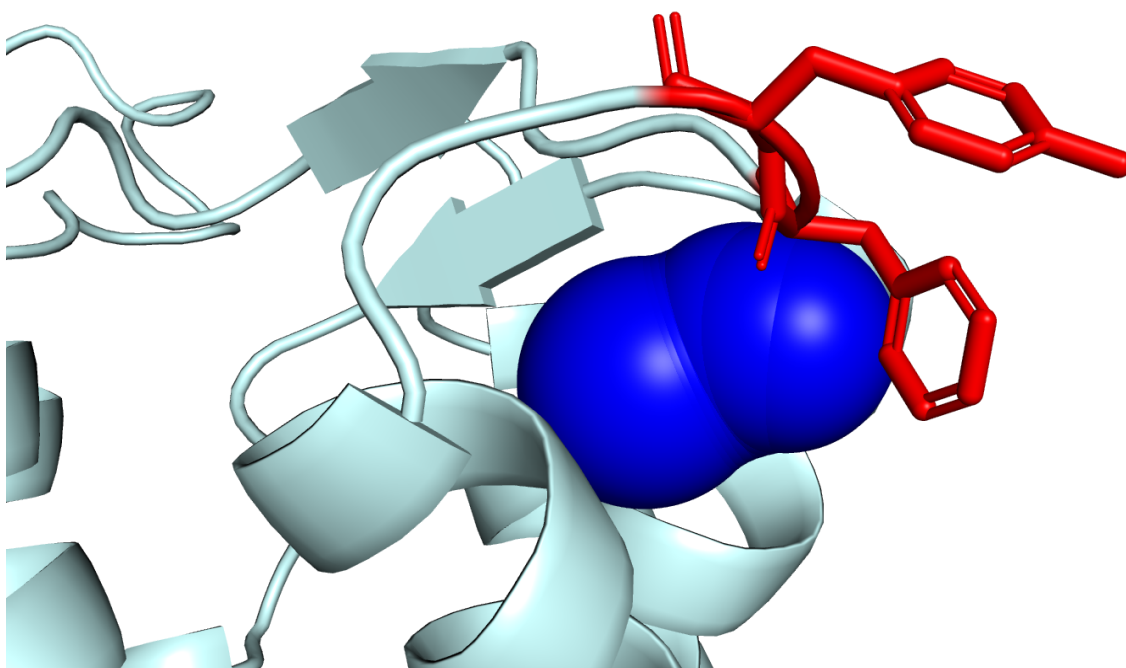


FIGURA 11. Comparação da posição dos aminoácidos PHE144 e TYR145, coloridos em vermelho, com a posição da trajetória encontrada pelo programa Caver. Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.4 ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA AMINOACÍDICA DO BK EM DIFERENTES ESPÉCIES

Um alinhamento entre a sequência aminoacídica do canal BK do *Homo sapiens* e das espécies: *Mus musculus*, *Gallus gallus*, *Xenopus laevis*, *Aplysia californica*, *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster* foi feito com o intuito de analisar se os aminoácidos escolhidos como chave estão conservados entre diferentes grupos animais. O resultado do alinhamento está exposto na FIGURA-12, colorido de forma a demonstrar a variação de conservação entre os diferentes aminoácidos da região envolvida na interação entre os ligantes. Podemos observar que embora o canal possua vários aminoácidos conservados entre vertebrados e os demais grupos, nenhum dos aminoácidos escolhidos em função das interações encontradas com os ligantes (ASN136, LEU150, VAL193 e SER202) estão entre eles, nem os dois aminoácidos escolhidos por possivelmente ajudarem na trajetória do ligante em direção à cavidade (PHE144 e TYR145). Isso não descarta a possível importância destes aminoácidos, visto que entre os vertebrados eles estão conservados. Assim podemos considerar que este alinhamento concorda com a possibilidade de que os aminoácidos escolhidos são importantes para interação, porém, talvez, ela exista apenas em vertebrados.

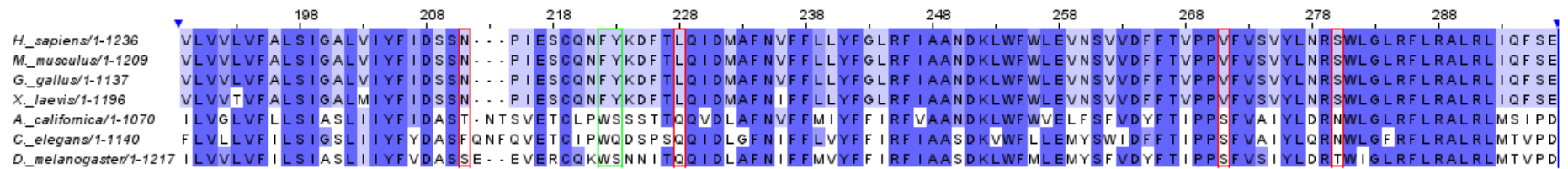
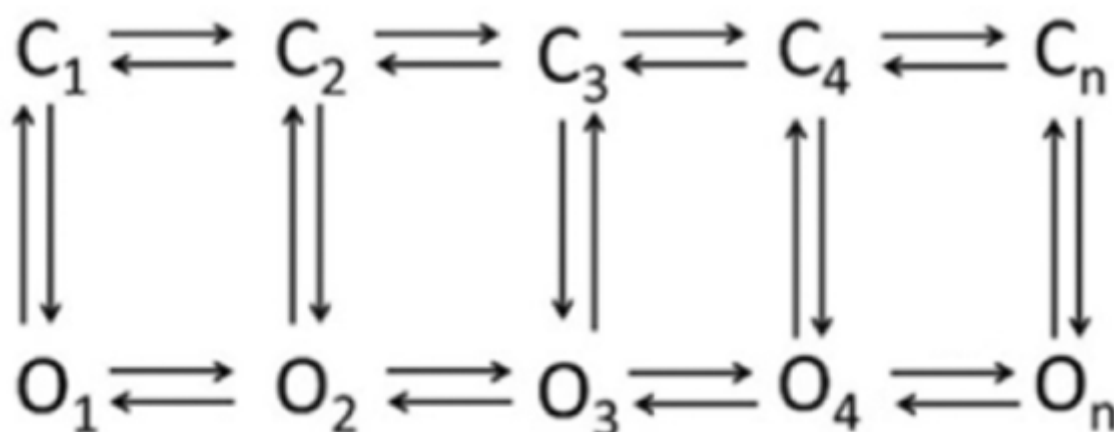


FIGURA 12. Alinhamento das sequências aminoácidas do canal BK. O tom de azul representa a conservação do aminoácido, quanto mais escuro mais conservado, a borda vermelha indica os aminoácidos ASN136, LEU150, VAL193 e SER202 e a borda verde os aminoácidos PHE144 e TYR145. As espécies foram escolhidas por serem de diferentes grupos animais normalmente usados como modelos e as sequências foram retiradas do banco de dados UniProt, sob os códigos: Q12791 (*Homo sapiens*), Q08460 (*Mus musculus*), Q8AYS8 (*Gallus gallus*), Q90ZC7 (*Xenopus laevis*), Q5QJC5 (*Aplysia californica*), Q95V25 (*Caenorhabditis elegans*) e A0A0B4KHT2 (*Drosophila melanogaster*). Fonte: elaborado pelo autor.

#### 4.5 LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

Os objetos deste estudo *in silico* consistem de estruturas cristalizadas estáticas criadas a partir de observações reais, assim a dinâmica natural das proteínas acaba não sendo bem representadas. O modelo mais bem aceito sobre a cinética do BK é um modelo baseado em alosteria representado pelo ESQUEMA-1.



ESQUEMA 1. Modelo representando o equilíbrio entre a conformação fechada (C) e aberta (O), onde o estado 1 ( $C_1$  e  $O_1$ ) representa o estado onde o canal tem a conformação fechada mais duradoura e a conformação aberta menos duradoura. A duração da conformação fechada diminui conforme o estado se desloca para direita e o contrário acontece com a conformação aberta. Os moduladores conhecidos do BK, o aumento da voltagem, interação com  $Ca^{2+}$ , etc. Deslocam o estado para a direita, aumentando a duração da conformação aberta. Fonte: Latorre et al., 2017.

Neste esquema, observa-se que há sempre a possibilidade de alteração entre a conformação aberta e fechada do canal e os ativadores conhecidos do BK, como o aumento da diferença de potencial elétrico, a interação com  $Ca^{2+}$ , a interação com  $Mg^{2+}$ , alteram a prevalência de cada uma destas conformações, aumentando a probabilidade de encontrar o canal aberto e reduzindo a de encontrá-lo fechado (Latorre et al., 2017). A interação do NS11021 com o BK também já foi demonstrada explicável por este mesmo modelo de alosteria (Rockman et al., 2020).

Este constante movimento da proteína não é capaz de ser captado pelos métodos usados neste trabalho. Assim, neste trabalho, optou-se por reduzir o rigor na escolha da cavidade para o *Docking*, aceitando que tanto o tamanho tanto da cavidade quanto do trajeto encontrado não representam esta dinâmica. O mesmo



acontece na escolha do Discovery Studio Visualizer para verificar quais aminoácidos estão envolvidos na interação entre o ligante e a proteína, pois este programa aceita mais possibilidades de interação, não se limitando a escolher mostrar apenas a mais provável, mas sim todas as possíveis, um resultado desejado para este trabalho.

Os resultados encontrados podem, assim, servir para desenvolver hipóteses que não descartem possibilidades reais e que possam ser testadas por métodos mais precisos como análises computacionais de Dinâmica Molecular, ou até ensaios *in vitro* (ou *in silico*) com mutações sítios dirigidas. Estas hipóteses ainda podem ser filtradas por outras análises como a busca por polimorfismos envolvidos em patologias, comparação com diferentes isoformas do canal, interação com toxinas, entre outras.

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho identificou uma região na parte extracelular do canal BK que possivelmente interage tanto com a GUO como com os ligantes sintéticos NS1619 e NS11021. Esta região provavelmente não é a região do poro, entretanto, pode ser uma cavidade acessível do meio extracelular.

Também analisou-se o mecanismo de interação para a ligação dos diferentes ligantes com o canal BK. Os aminoácidos ASN136, PHE144, TYR145, LEU150, VAL193 e SER202 são os mais prováveis aminoácidos chave para esta interação, mostrando interação consistente destes resíduos, seja quando já estão dentro da cavidade (ASN136, LEU150, VAL193 e SER202) ou tendo um possível papel de transporte do ligante até a cavidade (PHE144 e TYR145). Notavelmente, todos os aminoácidos são conservados entre os vertebrados, destacando sua importância evolutiva, embora esta conservação não seja observada ao comparar vertebrados e invertebrados.

Sendo assim, com estes resultados é possível traçar hipóteses para métodos mais precisos, como uma análise de Dinâmica Molecular ou uma avaliação eletrofisiológica com mutações sítio dirigidas no BK.

## REFERÊNCIAS

Abd Ghani MF, Othman R, Nordin N. Molecular Docking Study of Naturally Derived Flavonoids with Antiapoptotic BCL-2 and BCL-XL Proteins toward Ovarian Cancer Treatment. *J Pharm Bioallied Sci.* v.12, suppl.2, p676-680, nov. **2020**.

Armstrong R. What causes neurodegenerative disease? *Folia Neuropathol.* v.58, n.2, p.93-112, **2020**.

Bau C, Middlemiss PJ, Hindley S, Jiang S, Ciccarelli R, Caciagli F, Diiorio P, Werstiuk ES, Rathbone MP. Guanosine stimulates neurite outgrowth in PC12 cells via activation of heme oxygenase and cyclic GMP. *Purinergic Signal.* v.1, n.2, p.161-172, jun. **2005**.

Behrens R, Nolting A, Reimann F, Schwarz M, Waldschütz R, Pongs O. hKCNMB3 and hKCNMB4, cloning and characterization of two members of the large-conductance calcium-activated potassium channel beta subunit family. *FEBS Lett.* v.474, n.1, p.99-106, maio. **2000**.

Benfenati V, Caprini M, Nobile M, Rapisarda C, Ferroni S. Guanosine promotes the up-regulation of inward rectifier potassium current mediated by Kir4.1 in cultured rat cortical astrocytes. *J Neurochem.* v.98, n.2, p.430-445, jul. **2006**.

Bettio LE, Cunha MP, Budni J, Pazini FL, Oliveira Á, Colla AR, Rodrigues AL. Guanosine produces an antidepressant-like effect through the modulation of NMDA receptors, nitric oxide-cGMP and PI3K/mTOR pathways. *Behav Brain Res.* v.234, n.2, p.137-148, jun. **2012**.

Brejyeh Z, Karaman R. Comprehensive Review on Alzheimer's Disease: Causes and Treatment. *Molecules,* v.25, n.24, dez. **2020**.

Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* v.24, n.3, p.501-581, mar. **1972**.

Burnstock G. Introduction to purinergic signaling in the brain. *Adv Exp Med Biol.* p.1-12, **2013**.

Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J Neurosci.* v.28, n.1, p.264-278, jan. **2008**.

Chang R, Algird A, Bau C, Rathbone MP, Jiang S. Neuroprotective effects of guanosine on stroke models in vitro and in vivo. *Neurosci Lett.* v.431, n.2, p.101-105, jan. **2008**.

Chojdak-Łukasiewicz J, Dziadkowiak E, Zimny A, Paradowski B. Cerebral small vessel disease: A review. *Adv Clin Exp Med*. v.30, n.3, p.349-356, mar. **2021**.

Ciccarelli R, Di Iorio P, Giuliani P, D'Alimonte I, Ballerini P, Caciagli F, Rathbone MP. Rat cultured astrocytes release guanine-based purines in basal conditions and after hypoxia/hypoglycemia. *Glia*. v.25, n.1, p.93-98. jan. **1999**.

Ciccarelli R, Ballerini P, Sabatino G, Rathbone MP, D'Onofrio M, Caciagli F, Di Iorio P. Involvement of astrocytes in purine-mediated reparative processes in the brain. *Int J Dev Neurosci*. v.19, n.4, p.395-414. jul. **2001**.

Coelho V, Binder LB, Marques NF, Constantino LC, Mancini G, Tasca CI. Guanosine Prevents Spatial Memory Impairment and Hippocampal Damage Following Amyloid- $\beta$ 1-42 Administration in Mice. *Metabolites*. v.12, n.12, dez. **2022**.

Connell BJ, Di Iorio P, Sayeed I, Ballerini P, Saleh MC, Giuliani P, Saleh TM, Rathbone MP, Su C, Jiang S. Guanosine protects against reperfusion injury in rat brains after ischemic stroke. *J Neurosci Res*. v.91, n.2, p.262-272, fev. **2013**.

Contet C, Goulding SP, Kuljis DA, Barth AL. BK Channels in the Central Nervous System. *Int Rev Neurobiol*. v.128, p.281-342, **2016**.

Cui J. The action of a BK channel opener. *J Gen Physiol*. v.152, n.6, jun. **2020**.

Dal-Cim T, Martins WC, Santos AR, Tasca CI. Guanosine is neuroprotective against oxygen/glucose deprivation in hippocampal slices via large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^{+}$  channels, phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B pathway activation and glutamate uptake. *Neuroscience*. v.183, p.212-220, jun. **2011**.

Dal-Cim T, Molz S, Egea J, Parada E, Romero A, Budni J, Martín de Saavedra MD, del Barrio L, Tasca CI, López MG. Guanosine protects human neuroblastoma SH-SY5Y cells against mitochondrial oxidative stress by inducing heme oxygenase-1 via PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway. *Neurochem Int*. v.61, n.3, p.397-404, ago. **2012**.

Dal-Cim T, Ludka FK, Martins WC, Reginato C, Parada E, Egea J, López MG, Tasca CI. Guanosine controls inflammatory pathways to afford neuroprotection of hippocampal slices under oxygen and glucose deprivation conditions. *J Neurochem*. v.126, n.4, p.427-450, ago. **2013**.

Dal-Cim T, Poluceno GG, Lanznaster D, de Oliveira KA, Nedel CB, Tasca CI. Guanosine prevents oxidative damage and glutamate uptake impairment induced by oxygen/glucose deprivation in cortical astrocyte cultures: involvement of  $A_1$  and  $A_{2A}$  adenosine receptors and PI3K, MEK, and PKC pathways. *Purinergic Signal*. v.15, n.4, p.465-476, dez. **2019**.

Dalla Corte CL, Bastos LL, Dobrachinski F, Rocha JB, Soares FA. The combination of organoselenium compounds and guanosine prevents glutamate-induced oxidative stress in different regions of rat brains. *Brain Res.* v.1430, p.101-111, jan. **2012**.

Decker H, Piermartiri TCB, Nedel CB, Romão LF, Francisco SS, Dal-Cim T, Boeck CR, Moura-Neto V, Tasca CI. Guanosine and GMP increase the number of granular cerebellar neurons in culture: dependence on adenosine A2A and ionotropic glutamate receptors. *Purinergic Signal.* v.15, n.4, p.439-450, dez. **2019**.

Di Liberto V, Mudò G, Garozzo R, Frinchi M, Fernandez-Dueñas V, Di Iorio P, Ciccarelli R, Caciagli F, Condorelli DF, Ciruela F, Belluardo N. The Guanine-Based Purinergic System: The Tale of An Orphan Neuromodulation. *Front Pharmacol.* v.7, jun. **2016**.

Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. Stroke. *Lancet.* v.371, n.9624, maio. **2008**.

Dugger BN, Dickson DW. Pathology of Neurodegenerative Diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* v.9, n.7, jul. **2017**.

Frizzo ME, Lara DR, Prokopiuk Ade S, Vargas CR, Salbego CG, Wajner M, Souza DO. Guanosine enhances glutamate uptake in brain cortical slices at normal and excitotoxic conditions. *Cell Mol Neurobiol.* **2002**.

Gambino G, Giglia G, Gallo D, Scordino M, Giardina C, Zuccarini M, Di Iorio P, Giuliani P, Ciruela F, Ferraro G, Mudò G, Sardo P, Di Liberto V. Guanosine modulates K<sup>+</sup> membrane currents in SH-SY5Y cells: involvement of adenosine receptors. *Pflugers Arch.* v.474, n.11, p.1133-1145, nov. **2022**.

Ganzella M, de Oliveira ED, Comassetto DD, Cechetti F, Cereser VH Jr, Moreira JD, Hansel G, Almeida RF, Ramos DB, Figueredo YN, Souza DG, Oses JP, Worm PV, Achaval M, Netto CA, Souza DO. Effects of chronic guanosine treatment on hippocampal damage and cognitive impairment of rats submitted to chronic cerebral hypoperfusion. *Neurol Sci.* v.33, n.4, p.985-997, out. **2012**.

Gessner G, Cui YM, Otani Y, Ohwada T, Soom M, Hoshi T, Heinemann SH. Molecular mechanism of pharmacological activation of BK channels. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.109, n.9, p.3552-3557, fev. **2012**.

Gittis AH, Moghadam SH, du Lac S. Mechanisms of sustained high firing rates in two classes of vestibular nucleus neurons: differential contributions of resurgent Na, Kv3, and BK currents. *J Neurophysiol.* v.104, n.3, p.1625-1634, jun. **2010**.

Granados ST, Castillo K, Bravo-Moraga F, Sepúlveda RV, Carrasquel-Ursulaez W, Rojas M, Carmona E, Lorenzo-Ceballos Y, González-Nilo F, González C, Latorre R, Torres YP. The molecular nature of the 17β-Estradiol binding site in the voltage- and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BK) channel β1 subunit. *Sci Rep.* v.9, n.1, jul. **2019**.

Gribkoff VK, Starrett JE Jr, Dworetzky SI, Hewawasam P, Boissard CG, Cook DA, Frantz SW, Heman K, Hibbard JR, Huston K, Johnson G, Krishnan BS, Kinney GG, Lombardo LA, Meanwell NA, Molinoff PB, Myers RA, Moon SL, Ortiz A, Pajor L, Pieschl RL, Post-Munson DJ, Signor LJ, Srinivas N, Taber MT, Thalody G, Trojnacki JT, Wiener H, Yeleswaram K, Yeola SW. Targeting acute ischemic stroke with a calcium-sensitive opener of maxi-K potassium channels. *Nat Med*. v.7, n.4, p.471-477, abr. **2001**.

Gysbers JW, Rathbone MP. Guanosine enhances NGF-stimulated neurite outgrowth in PC12 cells. *Neuroreport*. v.3, n.11, p.997-1000, nov. **1992**.

Hansel G, Ramos DB, Delgado CA, Souza DG, Almeida RF, Portela LV, Quincozes-Santos A, Souza DO. The potential therapeutic effect of guanosine after cortical focal ischemia in rats. *PLoS One*. v.9, n.2, fev. **2014**.

Hansel G, Tonon AC, Guella FL, Pettenuzzo LF, Duarte T, Duarte MMMF, Oses JP, Achaval M, Souza DO. Guanosine Protects Against Cortical Focal Ischemia. Involvement of Inflammatory Response. *Mol Neurobiol*. v.52, n.3, p.1791-1803, dez. **2015**.

Huang CW, Huang CC, Wu SN. Activation by zonisamide, a newer antiepileptic drug, of large-conductance calcium-activated potassium channel in differentiated hippocampal neuron-derived H19-7 cells. *J Pharmacol Exp Ther*. v.321, n.1, p.98-106, abr. **2007**.

Jiang S, Khan MI, Lu Y, Wang J, Buttigieg J, Werstiuk ES, Ciccarelli R, Caciagli F, Rathbone MP. Guanosine promotes myelination and functional recovery in chronic spinal injury. *Neuroreport*. v.14, n.18, p.2463-2467, dez. **2003**.

Jiang S, Ballerini P, Buccella S, Giuliani P, Jiang C, Huang X, Rathbone MP. Remyelination after chronic spinal cord injury is associated with proliferation of endogenous adult progenitor cells after systemic administration of guanosine. *Purinergic Signal*. v.4, n.1, p.61-71, mar. **2008**.

Kshatri AS, Gonzalez-Hernandez A, Giraldez T. Physiological Roles and Therapeutic Potential of Ca<sup>2+</sup> Activated Potassium Channels in the Nervous System. *Front Mol Neurosci*. v.11, jul. **2018**.

Lanznaster D, Dal-Cim T, Piermartiri TC, Tasca CI. Guanosine: a Neuromodulator with Therapeutic Potential in Brain Disorders. *Aging Dis*. v.7, n.5, p.657-679, jul. **2016**.

Lanznaster D, Mack JM, Coelho V, Ganzella M, Almeida RF, Dal-Cim T, Hansel G, Zimmer ER, Souza DO, Prediger RD, Tasca CI. Guanosine Prevents Anhedonic-Like Behavior and Impairment in Hippocampal Glutamate Transport Following Amyloid- $\beta_{1-40}$  Administration in Mice. *Mol Neurobiol*. v.54, n.7, p.5482-5496, set. **2017**.

Lanznaster D, Massari CM, Marková V, Šimková T, Duroux R, Jacobson KA, Fernández-Dueñas V, Tasca CI, Ciruela F. Adenosine A<sub>1</sub>-A<sub>2A</sub> Receptor-Receptor Interaction: Contribution to Guanosine-Mediated Effects. *Cells*. v.8, n.12, dez. **2019**.

Lara DR, Schmidt AP, Frizzo ME, Burgos JS, Ramírez G, Souza DO. Effect of orally administered guanosine on seizures and death induced by glutamatergic agents. *Brain Res*. v.912, n.2, p.176-180. set. **2001**.

Latorre R, Castillo K, Carrasquel-Ursulaez W, Sepulveda RV, Gonzalez-Nilo F, Gonzalez C, Alvarez O. Molecular Determinants of BK Channel Functional Diversity and Functioning. *Physiol Rev*. v.97, n.1, p.39-87, jan. **2017**.

Lehrer S, Rheinstein PH. Insulin Docking Within the Open Hemichannel of Connexin 43 May Reduce Risk of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *In Vivo*. v.37, n.2, p. 539-547, abr. **2023**

Liu YC, Lo YK, Wu SN. Stimulatory effects of chlorzoxazone, a centrally acting muscle relaxant, on large conductance calcium-activated potassium channels in pituitary GH3 cells. *Brain Res*. v.959, n.1, p.86-97, jan. **2003**.

Lomize AL, Todd SC, Pogozheva ID. Spatial arrangement of proteins in planar and curved membranes by PPM 3.0. *Protein Sci*. v.31, n.1, p.209-220, jan. **2020**.

Madeira F, Pearce M, Tivey ARN, Basutkar P, Lee J, Edbali O, Madhusoodanan N, Kolesnikov A, Lopez R. Search and sequence analysis tools services from EMBL-EBI in 2022. *Nucleic Acids Res*. v.50, n.W1, p.276-279, jul. **2022**.

Mancinelli R, Fanò-Illic G, Pietrangelo T, Fulle S. Guanosine-Based Nucleotides, the Sons of a Lesser God in the Purinergic Signal Scenario of Excitable Tissues. *Int J Mol Sci*. v.21, n.5, out. **2020**.

Morciano M, Ortinau S, Zimmermann H. Guanine nucleotides inhibit NMDA and kainate-induced neurotoxicity in cultured rat hippocampal and neocortical neurons. *Neurochem Int*. v.45, n.1, p.95-101, jul. **2004**.

Molz S, Decker H, Oliveira IJ, Souza DO, Tasca CI. Neurotoxicity induced by glutamate in glucose-deprived rat hippocampal slices is prevented by GMP. *Neurochem Res*. v.30, n.1, p.83-89, jan. **2005**.

Molz S, Dal-Cim T, Budni J, Martín-de-Saavedra MD, Egea J, Romero A, del Barrio L, Rodrigues AL, López MG, Tasca CI. Neuroprotective effect of guanosine against glutamate-induced cell death in rat hippocampal slices is mediated by the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt/ glycogen synthase kinase 3 $\beta$  pathway activation and inducible nitric oxide synthase inhibition. *J Neurosci Res*. v.89, n.9, p.1400-1408, set. **2011**.

Moretto MB, Arteni NS, Lavinsky D, Netto CA, Rocha JB, Souza DO, Wofchuk S. Hypoxic-ischemic insult decreases glutamate uptake by hippocampal slices from neonatal rats: prevention by guanosine. *Exp Neurol*. v.195, n.2, p.400-406, out. **2005**.

Najam A. Sharif, Peter J. Roberts. Regulation of cerebellar I-[3H]glutamate binding: influence of guanine nucleotides and Na<sup>+</sup> ions. *Biochemical Pharmacology*. v.1748, nov. **1981**.

Nonose Y, Pieper LZ, da Silva JS, Longoni A, Apel RV, Meira-Martins LA, Grings M, Leipnitz G, Souza DO, de Assis AM. Guanosine enhances glutamate uptake and oxidation, preventing oxidative stress in mouse hippocampal slices submitted to high glutamate levels. *Brain Res*. dez. **2020**.

Oleskovicz SP, Martins WC, Leal RB, Tasca CI. Mechanism of guanosine-induced neuroprotection in rat hippocampal slices submitted to oxygen-glucose deprivation. *Neurochem Int*. v.52, n.3, p.411-418, fev. **2008**.

Pettifer KM, Jiang S, Bau C, Ballerini P, D'Alimonte I, Werstiuk ES, Rathbone MP. MPP(+)-induced cytotoxicity in neuroblastoma cells: Antagonism and reversal by guanosine. *Purinergic Signal*. v.3, n.4, p.399-409, set. **2007**.

Pettifer KM, Kleywegt S, Bau CJ, Ramsbottom JD, Vertes E, Ciccarelli R, Caciagli F, Werstiuk ES, Rathbone MP. Guanosine protects SH-SY5Y cells against beta-amyloid-induced apoptosis. *Neuroreport*. v.15, n.5, p.833-836, abr. **2004**.

Piermartiri TCB, Dos Santos B, Barros-Aragão FGQ, Prediger RD, Tasca CI. Guanosine Promotes Proliferation in Neural Stem Cells from Hippocampus and Neurogenesis in Adult Mice. *Mol Neurobiol*. v.57, n.8, p.3814-3826, set. **2020**.

Quincozes-Santos A, Bobermin LD, de Souza DG, Bellaver B, Gonçalves CA, Souza DO. Gliopreventive effects of guanosine against glucose deprivation in vitro. *Purinergic Signal*. v.9, n.4, p.643-654, dez. **2013**.

Rathbone MP, Saleh TM, Connell BJ, Chang R, Su C, Worley B, Kim M, Jiang S. Systemic administration of guanosine promotes functional and histological improvement following an ischemic stroke in rats. *Brain Res*. v.1407, p.79-89, ago. **2012**.

Ribeiro DE, Glaser T, Oliveira-Giacomelli Á, Ulrich H. Purinergic receptors in neurogenic processes. *Brain Res Bull*. v.151, p.3-11, set. **2019**.

Rockman ME, Vouga AG, Rothberg BS. Molecular mechanism of BK channel activation by the smooth muscle relaxant NS11021. *J Gen Physiol*. v.152, n.6, jun. **2020**.

Rutwick Surya U, Praveen N. A molecular docking study of SARS-CoV-2 main protease against phytochemicals of *Boerhavia diffusa* Linn. for novel COVID-19 drug discovery. *Virusdisease*. v.32 n.1 p.46-54. mar. **2021**

Schmidt AP, Lara DR, de Faria Maraschin J, da Silveira Perla A, Onofre Souza D. Guanosine and GMP prevent seizures induced by quinolinic acid in mice. *Brain Res.* v.864, n.1, p.40-43, maio. **2000**.

Schmidt AP, Böhmer AE, Leke R, Schallenberger C, Antunes C, Pereira MS, Wofchuk ST, Elisabetsky E, Souza DO. Antinociceptive effects of intracerebroventricular administration of guanine-based purines in mice: evidences for the mechanism of action. *Brain Res.* v.1234, p.50-58, out. **2008**.

Sheehan JJ, Benedetti BL, Barth AL. Anticonvulsant effects of the BK-channel antagonist paxilline. *Epilepsia.* v.50, n.4, p.711-720, abr. **2009**.

Soares FA, Schmidt AP, Farina M, Frizzo ME, Tavares RG, Portela LV, Lara DR, Souza DO. Anticonvulsant effect of GMP depends on its conversion to guanosine. *Brain Res.* v.1005, n.1-2, p.182-186, abr. **2004**.

Souza DO, Ramírez G. Effects of guanine nucleotides on kainic acid binding and on adenylate cyclase in chick optic tectum and cerebellum. *J Mol Neurosci.* v.3, n.1, p.39-45, **1991**.

Stourac J, Vavra O, Kokkonen P, Filipovic J, Pinto G, Brezovsky J, Damborsky J, Bednar D. Caver Web 1.0: identification of tunnels and channels in proteins and analysis of ligand transport. *Nucleic Acids Res.* v.47, n.W1, p.414-422, jul. **2019**.

Su C, Elfeki N, Ballerini P, D'Alimonte I, Bau C, Ciccarelli R, Caciagli F, Gabriele J, Jiang S. Guanosine improves motor behavior, reduces apoptosis, and stimulates neurogenesis in rats with parkinsonism. *J Neurosci Res.* v.87, n.3, p.617-625, fev. **2009**.

Tao X, MacKinnon R. Molecular structures of the human Slo1 K<sup>+</sup> channel in complex with  $\beta$ 4. *Elife.* v.8, dez. **2019**.

Tarozzi A, Merlicco A, Morroni F, Bolondi C, Di Iorio P, Ciccarelli R, Romano S, Giuliani P, Hrelia P. Guanosine protects human neuroblastoma cells from oxidative stress and toxicity induced by Amyloid-beta peptide oligomers. *J Biol Regul Homeost Agents.* v.24, n.3, p.297-306, jul-set. **2010**.

Tasca CI, Santos TG, Tavares RG, Battastini AM, Rocha JB, Souza DO. Guanine derivatives modulate L-glutamate uptake into rat brain synaptic vesicles. *Neurochem Int.* v.44, n.6, p.423-431. maio. **2004**.

Tasca, C., Decker, H., de Aguiar, C., Romao, L., Boeck, H., and Moura-Neto, V. (2010). A2A adenosine receptors and ionotropic glutamate receptors are involved on gmp-or guanosine-induced trophic effects in cultured cerebellar granule neurons. *Purinergic Signal.* v.6, **2010**.

Tasca CI, Lanznaster D, Oliveira KA, Fernández-Dueñas V, Ciruela F. Neuromodulatory Effects of Guanine-Based Purines in Health and Disease. *Front Cell Neurosci.* v.12, out. **2018a**.



Tasca CI, Estudo dos alvos moleculares do nucleosídeo neuroprotetor guanosina: interação com heterônimos de receptores de adenosina A1R/A2R e com o canal de potássio BK. Tese de Titular, *UFSC*, **2018b**.

Tavares RG, Schmidt AP, Tasca CI, Souza DO. Quinolinic acid-induced seizures stimulate glutamate uptake into synaptic vesicles from rat brain: effects prevented by guanine-based purines. *Neurochem Res.* v.33, n.1, p.97-102, jan. **2003**.

The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC.

The UniProt Consortium. UniProt: the Universal Protein Knowledgebase in 2023, *Nucleic Acids Research.* v.51, n.D1, p.523-531, jan. **2023**.

Thomaz DT, Andreguetti RR, Binder LB, Scheffer DDL, Corrêa AW, Silva FRMB, Tasca CI. Guanosine Neuroprotective Action in Hippocampal Slices Subjected to Oxygen and Glucose Deprivation Restores ATP Levels, Lactate Release and Glutamate Uptake Impairment: Involvement of Nitric Oxide. *Neurochem Res.* v.45, n.9, p.2217-2229, set. **2020**.

Tian W, Chen C, Lei X, Zhao J, Liang J. CASTp 3.0: computed atlas of surface topography of proteins. *Nucleic Acids Res.* v.46, n.W1, p.363-367, jul. **2018**.

Traversa U, Bombi G, Di Iorio P, Ciccarelli R, Werstiuk ES, Rathbone MP. Specific [(3)H]-guanosine binding sites in rat brain membranes. *Br J Pharmacol.* v.135, n.4, p.969-976, fev. **2002**.

Uemura Y, Miller JM, Matson WR, Beal MF. Neurochemical analysis of focal ischemia in rats. *Stroke.* v.22, n.12, p.1548-1553. dez. **1991**.

Wang L, Kang H, Li Y, Shui Y, Yamamoto R, Sugai T, Kato N. Cognitive recovery by chronic activation of the large-conductance calcium-activated potassium channel in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropharmacology.* v.92, p.8-15, maio. **2015**.

Waterhouse AM, Procter JB, Martin DM, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* v.25, n.9, p.1189-1191, maio. **2009**.

Yamagata K. Lactate Supply from Astrocytes to Neurons and its Role in Ischemic Stroke-induced Neurodegeneration. *Neuroscience.* v.481, p.219-231, jul. **2022**.