



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOSÉ GREGORIO SEVERICHE CASTRO

**ESTUDO *IN SILICO* POR DINÂMICA MOLECULAR DO
SISTEMA CANABINOIDE: RECEPTOR DE CANABINOIDES
TIPO 1 E LIGANTES CANABINOIDES**

Londrina
2021

JOSÉ GREGORIO SEVERICHE CASTRO

**ESTUDO *IN SILICO* POR DINÂMICA MOLECULAR DO
SISTEMA CANABINOIDE: RECEPTOR DE CANABINOIDES
TIPO 1 E LIGANTES CANABINOIDES**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Marcello Ferreira da Costa
Co-Orientador: Prof. Dr. Tiago de Oliveira Mendes

Londrina
2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Castro, José Gregorio Severiche.

Estudo in silico por dinâmica molecular do sistema canabinoide: receptor de canabinoides tipo 1 e ligantes canabinoides / José Gregorio Severiche Castro.
- Londrina, 2021.
111 f.

Orientador: Marcello Ferreira da Costa.

Coorientador: Tiago de Oliveira Mendes.

Tese (Doutorado em Física) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Física, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Cannabis - Tese. 2. Computacional simulation - Tese. 3. Free energy - Tese. 4. Molecular docking - Tese. I. Ferreira da Costa, Marcello . II. de Oliveira Mendes, Tiago. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Física. IV. Título.

CDU 53

JOSÉ GREGORIO SEVERICHE CASTRO

**ESTUDO *IN SILICO* POR DINÂMICA MOLECULAR DO
SISTEMA CANABINOIDE: RECEPTOR DE
CANABINOIDES TIPO 1 E LIGANTES CANABINOIDES**

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Física, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Doutor.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Marcello Ferreira da Costa
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Prof. Dr. Alexandre Urbano
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Prof. Dr. Eduardo Di Mauro
Universidade Estadual de Londrina-UEL

Prof. Dr. Diego Da Silva Paschoal
Universidade Federal do Rio de Janeiro-UFRJ

Prof. Dr. Marcos Serrou Do Amaral
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Londrina, ____ de ____ de ____.

DEDICATORIA

Dedico especialmente este trabajo a esa mujer heroína incansable, luchadora que nunca se dio por vencida frente a la pérdida de su esposo y dos de sus hijos. Mientras estudiaba por la noche ella me hacía compañía trabajando para tener dinero y enviarme a la escuela. Cuantas veces te vi llorar recordando a tus seres idos y te consolaba diciendo que todo iba a estar mejor. Cuando te dije que quería ir a la universidad me dijiste: hágale, yo tengo las faldas bien puestas. Luego cuando te comenté que quería hacer una maestría en Brasil me respondiste: cuánto cuesta el semestre aquí en Colombia?, si es eso; yo lo consigo trabajando. No querías dejarme ir, pero sabías que no debes cortar las alas a quien quiere volar, entonces me ayudaste a salir de Colombia. Madre todo lo que soy te lo debo, no fue la inteligencia la que me permitió llegar a la cumbre, fueron los valores que me enseñaste. Soco, hermana mía, si bien no me pariste pero has estado conmigo desde antes de nacer, eres mi segunda madre, tu apoyo ha sido indispensable en cada etapa de mi vida, te amo. Roger, hermano mío, eres de las personas que están detrás de bambalinas pero tan importantes como los de delante, te quiero. Dios presenta a las personas en momentos que ni imaginamos, hay unas que llegan, dejan su huella y se van, otras que llegan y se quedan. Mi consentida, dueña de mi felicidad, mi mundo bonito, Yaremis Meriño Cabrera aún en medio de tanta gente me viste solo y llegaste para quedarte. Gracias amor mío por tu ayuda, sin ti esto no hubiese sido posible, me has enseñado tanto que mucho de lo que soy te lo debo. Es verdad que un hijo llega para alegrarte la vida, nunca dudamos en tenerte, al principio fue difícil aceptar tu llegada porque no nos sentíamos preparados, pero quién realmente está preparado para tener un hijo? Isabel, así como se la pedí a Dios llegaste, creo que mejor jejeje. Mis primeros “hijos”: Hilda Arrieta, Ariela Severiche, Jesus Severiche, Ciro Arrieta, Maria Arrieta, Zuly Severiche, Yajaira Severiche, Gisela Severiche, Liceth Severiche y Emanuel Severiche, con ustedes comencé a aprender a ser papá. A veces olvidamos la primera mano que nos ayudó, pero como olvidar la historia contada por mi madre de cuando te pidió ayuda porque se le hizo difícil educarme, en ese momento le dijiste: montelo en la moto así sea en pantaloncillo que allá le compramos ropa y lo colocamos a estudiar. Gracias a quien considero mi padre de crianza: Ciro Arrieta Turizo, viejo siempre viviré agradecido contigo. Dedico especialmente a un amigo que por el COVID-19 partió al descanso eterno, Delmis Florez Lastre siempre vivirás en nuestras mentes y corazones.

A todos ustedes dedico este trabajo.

AGRADECIMENTOS

O principal agradecimento é para Deus, pela ajuda em todos os momentos da minha vida.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nivel Superior (CAPES) e a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos de doutorado.

A Universidade Estadual de Londrina, ao departamento de Física e ao programa de pós-graduação em Física, pela oportunidade de engrandecer meus estudos.

Aos professores Dr. Marcello Ferreira da Costa, Dr. Tiago de Oliveira Mendes e Dr. Alexandre Suman de Araujo pela paciência e tranquilidade para me transmitir os ensinamentos da Física Atomica e Molecular e Bioquímica.

Ao sempre amigo Dr. Mawin Javier Martinez e sua família pela ajuda nesta jornada.

A minha nova família Ricardo Meriño, Nubia Cabrera e Arnold Meriño.

Ao primo José Aguilera Castro e toda minha família pela ajuda e orações.

Aos irmãos da vida Samir Vides, Jorge Gamarra, Aliecer Quesada, Jorge Acosta, Luis Mejía, Robert Caez, Enso Jimenez, Encida Mangones, Gonzalo Jimenez, Leonazir, Jimenez Victor de la Hoz.

A Rita Meza (QEPD) e toda sua família.. A Arnold Hoyos (QEPD) e toda sua família.

SEVERICHE CASTRO, José Gregorio. **Estudo *in silico* por dinâmica molecular do sistema canabinoide: receptor de canabinoides tipo 1 e ligantes canabinoides**. 2021. 111 f. Tese (Doutorado em Física) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

Resumo

Muito tem se discutido, recentemente, acerca do uso da *Cannabis* medicinal, mas pouco se conhece do que realmente é o que está por trás do termo medicinal. É conhecida como *Cannabis* Medicinal já que possui controle de qualidade, cuja produção é padronizada e que atende aos padrões internacionais de medicamentos fitoterápicos. O uso medicinal da *cannabis* refere-se sobretudo aos usos potencialmente benéficos que podem ser observados em muitas doenças, pois quase todos os órgãos e sistemas possuem locais onde ela pode exercer o seu efeito por meio da ação dos princípios ativos da planta (canabinóides). Um desses alvos é a proteína CB1, ela é receptora dos compostos fitocanabinoides canabidiol (CBD) e tetrahidrocanabidiol (Δ^9 -THC) presentes na planta *Cannabis sativa*. Estudos *in vivo* com canabinóides como o CBD no tratamento da epilepsia, têm demonstrado o potencial terapêutico do composto agonista, reduzindo os efeitos de doenças como a síndrome de Dravet, Lennox-Gastaut, entre outras. No entanto, a maioria dos programas de descoberta de drogas baseados em GPCR (receptores acoplados a proteína G) focam no desenvolvimento de moléculas ortostéricas que competem com ligantes endógenos. O desenvolvimento de novos ensaios tornou possível identificar ligantes ativos que interagem em locais topograficamente distintos do receptor, a saber, locais alostéricos. Ligantes alostéricos, como CBD no receptor CB1, exercem seus efeitos modificando a conformação do receptor, levando a uma mudança estrutural da proteína e perda da afinidade a ligantes ortostéricos. Este sítio pode ser alvo para o desenho de novos fármacos, oferecendo uma nova abordagem para modular o CB1. O estudo de biomoléculas usando técnicas computacionais tem produzido bons resultados, capazes de orientar estudos experimentais economizando tempo e recursos. Assim, neste estudo usou-se a dinâmica molecular como ferramenta computacional, fornecendo informações sobre o comportamento dinâmico, dependente do tempo, das interações do sistema CB1-CBD em ambiente membrana e água. O estudo da interação CB1-CBD foi desenvolvido em duas etapas, diferenciando-se em que na primeira o objetivo foi determinar o melhor sítio de ligação do CBD no receptor, e na segunda, foi avaliar se o aumento do número de moléculas de CBD interagindo com CB1, causa sinergismo entre os ligantes. A partir das duas etapas empregadas concluímos que a estimação da energia livre de ligação dos complexos e o cálculo da contribuição dos aminoácidos da

proteína CB1 permitiu determinar que o sítio alostérico 1 é o local de interação com as melhores características energéticas e estruturais para a ligação do CBD a CB1. A maior contribuição à energia de interação é feita pelos resíduos de aminoácido Arg477 e Ser64 do receptor CB1, cuja presença é estável em todos os sistemas analisados, interagindo por meio de ligações hidrofóbicas e mantendo a afinidade do CB1 com o ligante CBD. As interações não-covalentes mais importantes entre os grupos químicos do CBD e os resíduos de aminoácido do CB1 são alquil, pi-alquil e pi-pi em forma de T. E o aumento do número de moléculas CBD interagindo com o CB1 não potencializa o efeito antagonista do ligante, demonstrado pela perda de afinidade quando outras moléculas são adicionadas, assim, o melhor sistema de interação é CB1-CBD-AS1 (-14.37 Kcal/mol).

Palavras-chaves: *Cannabis*. Simulação computacional. Energia livre. *Docking* molecular. NAMD. Perfil farmacofórico.

SEVERICHE CASTRO, José Gregorio. ***In silico* study by molecular dynamics of the cannabinoid system: cannabinoid type 1 receptor and cannabinoid ligands**. 2021. 111 f. Thesis (Doctoral in Physics) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

Abstract

A lot has been discussed recently about the use of medicinal cannabis, but little is known about what really is behind the term medicinal. It is known as Medicinal Cannabis as it has quality control, whose production is standardized and meets international standards for herbal medicines. The medicinal use of cannabis mainly refers to the potentially beneficial uses that can be observed in many diseases, as almost all organs and systems have places where it can exert its effect through the action of the active principles of the plant (cannabinoids). CB1 protein is the target of the compounds cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabidiol (Δ^9 -THC) present in the Cannabis sativa plant. In vivo studies with cannabinoids such as CBD in the treatment of epilepsy, have demonstrated the therapeutic potential of the agonist compound, reducing the effects of diseases such as Dravet's syndrome, Lennox-Gastaut, among others. However, most GPCR-based drug discovery programs (protein G-coupled receptors) focus on the development of orthosteric molecules that compete with endogenous ligands. The development of new, more sophisticated assays has made it possible to identify active ligands that interact in sites topographically distinct from the receptor, namely allosteric sites. Allosteric ligands, such as CBD at the CB1 receptor, exert their effects by modifying the conformation of the receptor, leading to a structural change in the protein and loss of affinity to orthosteric ligands. This site can be targeted for the design of new drugs, offering a new approach to modulate CB1. The study of biomolecules through computational techniques has produced good results, capable of guiding experimental studies, saving time and resources. Thus, this study used molecular dynamics as a computational tool, providing information on the dynamic behavior, dependent on time, of the interactions of the CB1-CBD system in a membrane and water environment. Two steps were used to study the CB1-CBD interaction, differing in that in the first, the aim was to determine the best CBD binding site in the receptor, and in the second, it was to assess whether the increase in the number of CBD molecules interacting with CB1, causes synergism between the ligands. From the two steps employed, we concluded that the estimation of the free binding energy of the complexes and the calculation of the amino acid contribution of the CB1 protein allowed to determine that the allosteric site 1 is the place of interaction with the best energetic and structural characteristics for the binding of the CBD to

CB1. The greatest contribution to the interaction energy is made by the amino acid residues Arg477 and Ser64 of the CB1 receptor, whose presence is stable in all analyzed systems, interacting through hydrophobic interactions and maintaining the affinity of CB1 with the CBD ligand. The most important non-covalent interactions between CBD chemical groups and CB1 amino acid residues are alkyl, pi-alkyl, and T-shaped pi-pi. And the increase in the number of CBD molecules interacting with CB1 does not enhance the antagonist effect of the ligand, demonstrated by the loss of affinity when other molecules are added, thus the best interaction system is CB1-CBD-AS1(-14.37 Kcal/mol).

Palavras-chaves: *Cannabis*. Computacional simulation. Free energy, Molecular docking. NAMD. Pharmacophoric profile.

LISTA DE FIGURAS

1 Capítulo: Introdução teórica

- Figura 1** – Representação dos potenciais de repulsão e atração (Lennard-Jones e Eletrostático) entre dois sítios ou átomos não-ligados em função da distância entre eles. Os valores positivos da curva azul (subindo no eixo Potencial) representam forças de repulsão para curtas distâncias entre átomos, enquanto os valores negativos (descendo até o ponto de equilíbrio ε_{ij}) representam forças de atração17
- Figura 2** – Modelo de solvatação implícito (A) e explícito (B) usando como proteína receptora a estrutura tridimensional do receptor de canabinoides tipo 1 (CB1)19
- Figura 3** – Representação do raio de corte R em um sistema tridimensional. O raio de corte é traçado a partir de um átomo de interesse i , onde este não interage com o átomo j e com sua imagem j' ao mesmo instante, muito menos com sua própria imagem i' . O quadrado tracejado representa a aproximação de mínima imagem e o círculo o raio de corte20
- Figura 4** – Esquema 2D que o método de Partículas-Mesh usa na maioria dos métodos baseados em Fourier. (a) Um sistema de partículas carregadas. (b) Cargas interpoladas em uma grade 2D. (c) Os potenciais e as forças são calculados em uma grade de pontos usando FFT. (d) Cálculo da força sobre as partículas.....21
- Figura 5** – Esquema do funcionamento do algoritmo Verlet-velocidade24
- Figura 6** – Ciclo termodinâmico usado para estimar as energias livres de ligação com o método LIE da equação 21. Os quadrantes superiores representam dois estados (esquerda: livre, solvatada na água; direita: ligado à proteína). Os dois quadrantes inferiores serão responsáveis por dois estados intermediários, não físicos: um pseudo-ligante sem quaisquer interações eletrostáticas (intermoleculares), em seu estado livre (à esquerda) ou ligado (à direita)26

2 Capítulo: Modulação do receptor canabinóide tipo 1 (CB1): análises estrutural e energético das interações alostéricas usando simulações de dinâmica molecular

- Figura 1** – Comparação estrutural através do alinhamento e cálculo do RMSD (C e D) entre as proteínas 5U09 (A) (estrutura tridimensional determinada experimentalmente) e o modelo gerado usando Phyre2 a partir da sequência Fasta 5U09 (B).....35
- Figura 2** – Estrutura tridimensional do ligante Canabidiol (ZINC04097406) obtida do bando de dados ZINC.....37
- Figura 3** – **A.** Perspectiva completa das estruturas de partida para simulações de MD em membrana POPC. CB1 mostrado em cartoon na cor arco-íris. Camada lipídica superior e inferior mostrada em cinza. Modelo de água TIP3P mostrado em azul e íons mostrados em forma de bolas, cor laranja para Cl⁻ e cor amarela para Na⁺. **B.** Ligante CBD mostrado em forma de stick de cor verde em interação com os resíduos Arg477 e Ser64 no sítio alostérico 1 da proteína CB1.....40
- Figura 4** – Temperatura (A), pressão (B) e energia total (C) do complexo receptor canabinoide tipo 1 CB1-CBD ligado ao sítio ortostérico (OS), sítio alostérico 1 (AS1) e sítio alostérico 3 (AS3) após simulação de dinâmica molecular em POPC na etapa de produção durante 100ns42
- Figura 5** – Modo de ligação estrutural entre o receptor canabinoide tipo 1 (CB1) e o canabidiol no sítio ortostérico, sítio alostérico 1 e sítio alostérico 3. A forma dos bastões representa o ligante do Canabidiol (magenta e preto), a estrutura verde em cartoon representa a proteína CB1, a superfície azul é a caixa de água e a superfície marrom é a membrana POPC46
- Figura 6** – Perfil farmacofórico do complexo CBD-CB1 após *docking* molecular. (A) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (B) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (C) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). A cor das bolas e linhas indica o tipo de interação entre o CBD e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do CB147
- Figura 7** – Perfil farmacofórico do complexo CBD-CB1 aos 50 ns e a os 100ns de simulação por dinâmica molecular em membrana POPC (A e B)

CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). A cor das bolas e linhas ponteadas indica o tipo de interação entre o CBD e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do CB148

Figura 8 – Perfil farmacofórico do complexo CBD-CB1 aos 50 ns e a os 100ns de simulação por dinâmica molecular em caixa de água (A e B) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). A cor das bolas e linhas ponteadas indica o tipo de interação entre o CBD e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do CB149

Figura 9 – Energia de interação por residuo de aminoácido do CB1-ligante CBD, calculada a partir das simulações por dinâmica molecular dos complexos em membrana POPC e caixa de água. (A e D) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (B e E) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). Resíduos de aminoácidos com alta contribuição ao valor da energia (Contribuição $\leq -1.0\text{Kcal/mol}$) foram identificados52

Figura 10 – RMSD do receptor de Canabinoides tipo 1 (CB1) obtidos a partir das das simulações por dinâmica molecular dos complexos em membrana POPC e caixa de água. (A e B) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3)54

Figura 11 – RMSF do receptor de Canabinoides tipo 1 (CB1) obtidos a partir das simulações por dinâmica molecular dos complexos em membrana POPC e caixa de água. (A e B) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). Cada curva de RMSF foi comparada com o RMSF do receptor CB1 sem ligante (linha vermelha).55

Figura 12 – RMSD do Cannabidiol (CBD) obtidos a partir das simulações por dinâmica molecular em membrana POPC (A) e caixa de água (B), em interação com o receptor CB1 no sítio ortostérico (OS), alostérico 1 (AS1) e alostérico 3 (AS3)56

Figura 13 –Energia de interação por residuo de aminoácido dos sítios de ligação do CBD no receptor CB1. **A.** Complexo 1 (**CB1-CBD-AS1**): uma

molécula CBD ligada no sítio alostérico 1 (AS1). **B.** complexo 2 (**CB1-CBD-OS-AS1**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio ortostérico (OS) e outro no sítio AS1; **C.** complexo 3 (**CB1-CBD-OS-AS1-AS3**): três CBD ligados a CB1, um CBD ocupando cada sítio (OS, AS1 e AS3)60

Figura 14 – Perfil farmacofórico dos complexos ligantes CBD-receptor CB1 analisados. **A.** Complexo 1 (**CB1-CBD-AS1**): uma molécula CBD ligada no sítio alostérico 1 (AS1). **B.** complexo 2 (**CB1-CBD-OS-AS1**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio ortostérico (OS) e outro no sítio AS1; **C.** complexo 3 (**CB1-CBD-OS-AS1-AS3**): três CBD ligados a CB1, um CBD ocupando cada sítio (OS, AS1 e AS3).....62

Figura 15 –Evolução do RMSD e RMSF para átomos Cα da CB1 durante 100 ns de simulação. Complexos CB1-CBD-OS-AS1, CB1-CBD-OS-AS1-AS3 e CB1-CBD-AS1 representados pela linha azul, verde e vermelha respectivamente64

LISTA DE TABELAS

1 Capítulo: Introdução teórica

Tabela 1 – Valores para o parâmetro β em função da natureza química do ligante...27

2 Capítulo: Modulação do receptor canabinóide tipo 1 (CB1): análises estrutural e energético das interações alostéricas usando simulações de dinâmica molecular

Tabela 1 – Título Resultados da análise de qualidade do modelo tridimensional da proteína CB1 gerado pelo simulador online Phyre236

Tabela 2 – Valores da média das energias Eletrostáticas e Van der Waals (Kcal/mol) entre o ligante (*l*) e sua vizinhança (*s*) no estado ligado e não ligado.....43

Tabela 3 – Energias livre de ligação (*kcal/mol*) calculadas mediante simulações por dinâmica molecular para a interação entre CB1 e o CBD nos sítios analisados51

Tabela 4 – Energia livre de ligação para o ligante CBD nos sistemas analisados no receptor CB1. Complexo 1 (**CB1-CBD-AS1**): uma molécula CBD ligada no sítio alostérico 1 (AS1), complexo 2 (**CB1-CBD-OS-AS1**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio ortostérico (OS) e outro no sítio AS1; complexo 3 (**CB1-CBD-OS-AS3**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio OS e outro no sítio alostérico 4 (AS3); e complexo 4 (**CB1-CBD-OS-AS1-AS3**): três CBD ligados a CB1, um CBD ocupando cada sítio (OS, AS1 e AS3)..... .58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DM	Dinâmica molecular
SEC	Sistema endocanabinoide
CB1	Receptor de canabinoides tipo 1
CBD	Canabidiol
THC	Tetrahidrocanabinol
GPCR	Receptores acoplados às proteínas G
NAMD	Nanoscale Molecular Dynamics
PDB	Protein Data Bank
CHARMM	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
TIP3P	Transferable Intermolecular Potential with 3 Points
Cutoff	Raio de corte
PME	Particle Mesh Ewald
LIE	Energia Livre de Interação
(Δ 9-THC)	delta-9-tetra-hidrocanabinol
NAMs	Moduladores alostéricos negativos
PAMs	Moduladores alostéricos positivos
OS	Sítio ortostérico
AS1	Sítio alostérico 1
AS2	Sítio alostérico 2
AS3	Sítio alostérico 3
RMSD	Desvio quadrático médio das posições atômicas
RMSF	Desvio quadrático médio
POPC	1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfocolina

Sumário

1 Introdução teórica	9
1.1 Sistema Endocanabinoide	9
1.2 Dinâmica molecular de proteínas e desenho racional de fármacos	12
1.3 Simulação por Dinâmica Molecular	13
1.3.1 Condições iniciais	13
1.3.2 Potenciais de interação molecular	14
1.3.3 Campo de força CHARMM	17
1.3.4 Solvente explícito	18
1.3.5 Condições periódicas de contorno	19
1.4 Energia Livre de Interação (LIE): Método e aplicações em desenho de fármacos	24
REFERENCIAS	29
2 Modulação do receptor canabinóide tipo 1 (CB1): análises estrutural e energético das interações alostéricas usando simulações de dinâmica molecular	33
1. INTRODUÇÃO	33
2. METODOLOGIA	35
2.1 Obtenção do receptor e ligante	35
2.2 <i>Docking</i> Molecular	37
2.2.1 Primeira etapa	38
2.2.2 Segunda etapa	38
2.3 Simulações por dinâmica molecular em caixa de água	39
2.4 Simulações por dinâmica molecular em bicamada lipídica de POPC	39
2.5 Análise de dados	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
3.1 Primeira Etapa	45
3.2 Segunda etapa	57
4. CONCLUSÕES	66
5. REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE A: ARTIGO ACEITO COMO REQUISITO PARA DEFESA DE TESE	72

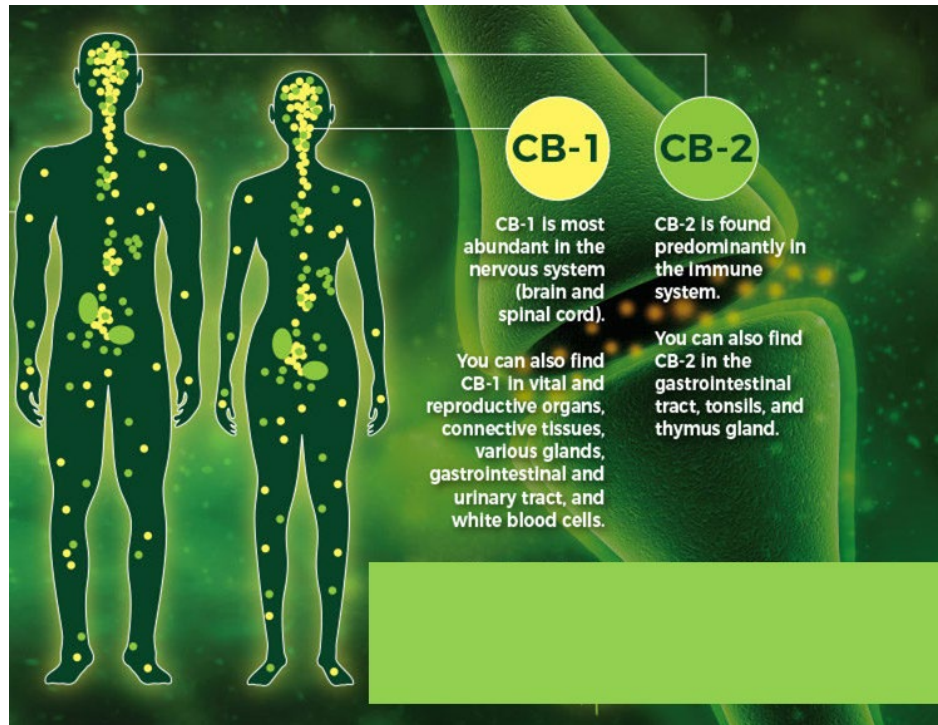
1 Introdução teórica

1.1 Sistema Endocanabinoide

Médicos e profissionais de diversas áreas estudam os benefícios e as interações das substâncias encontradas na planta *Cannabis Sativa* no organismo. Estas substâncias tem grande importância no tratamento de doenças neurológicas como a epilepsia. Pacientes portadores de doenças como epilepsia não tem um tratamento curativo. Estudo com a *Cannabis* medicinal comprovaram a eficácia que pode ter sobre doenças do sistema nervoso. Um dos desafios da ciência é a obtenção de estruturas químicas novas que servirão como agentes terapêuticos. Por isso as plantas tem sido usadas como fontes de terapias para o homem. O uso terapêutico da *Cannabis* ou dos seus derivados é conhecido desde há anos, no entanto, o estudo das suas propriedades, seus análogos, receptores canabinoides e a interação com compostos capazes de inibir ou ativar estes receptores precisa ser atualizado com o intuito de obter um melhor entendimento e ter opções farmacológicas no tratamento das doenças associadas a estes sistemas.

O sistema endocanabinoide (SEC) é um sistema biológico composto por endocanabinoides, que são neurotransmissores baseados em lipídios endógenos que se ligam a receptores canabinoides (CBRs) e proteínas receptoras de canabinoides que são expressas em todo o sistema nervoso central dos vertebrados (incluindo o cérebro) e sistema nervoso periférico [1, 2]. O SEC está envolvido na regulação de processos fisiológicos e cognitivos, incluindo fertilidade, gravidez, desenvolvimento pré e pós-natal, várias atividades do sistema imunológico, apetite, sensação de dor, humor, memória e na mediação dos efeitos farmacológicos da *Cannabis* [1, 2].

Ilustração 1. Sistema endocanabinoide: Receptor de canabinoides tipo 1 (CB-1) e tipo 2 (CB-2), dentro de corpo humano.



Fonte: Modificado de <http://iashan.com/index.php/blogoneclip/79-the-ecs>.

Dois receptores de canabinoides foram identificados. Os receptores foram nomeados pela União Internacional de Farmacologia Básica e Clínica (International Union of Basic and Clinical Pharmacology - IUPHAR), de acordo com sua ordem de descoberta, como receptores CB1 e CB2 [1]. O CB1 se encontra predominantemente no sistema nervoso, tecidos conjuntivos, gônadas, glândulas e órgãos. Os receptores CB2 são encontrados no sistema imunológico e suas estruturas (Ilustração 1). Algumas células contêm tanto receptores CB1 e CB2, cada um ligado a funções diferentes.

Embora o organismo dos vertebrados seja capaz de fabricar seus próprios canabinoides, como anandamida e 2-araquidonoilglicerol (endocanabinoides), este sistema pode ser suplementado por fitocanabinoides encontrados em plantas como a cannabis, equinácea e linhaça [2].

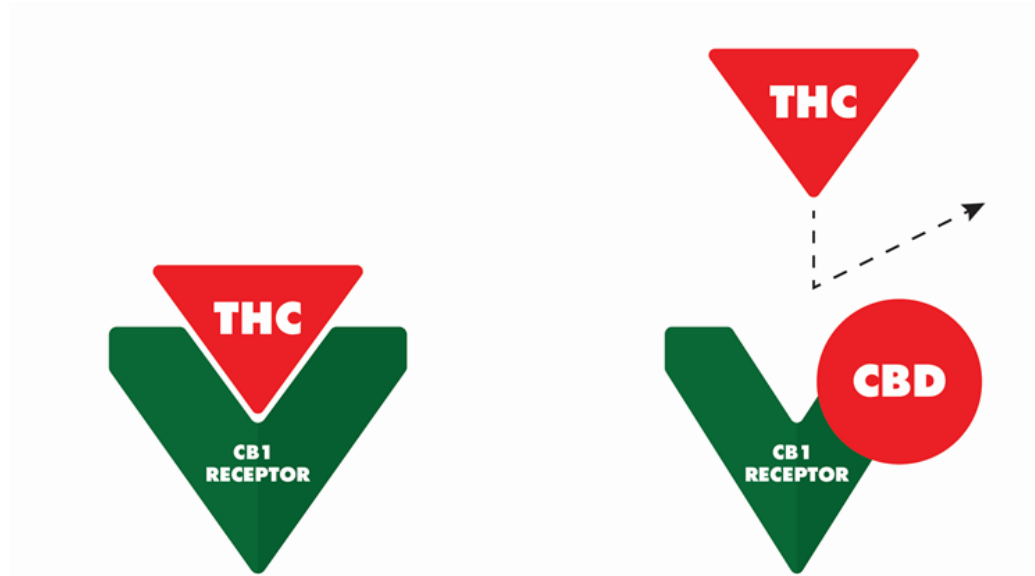
Cannabis (*Cannabis sativa*) é uma planta que pertence à família Cannabaceae (Magnoliopsida, Urticales). O conhecimento das propriedades médicas e psicoativas da cannabis remonta a 4000 a.c. Todas as diferentes variedades de Cannabis, incluindo a conhecida como *Cannabis indica*, pertencem à mesma espécie. Todas as plantas de *C. sativa* produzem compostos ativos, mas cada variedade produz estes compostos em diferentes concentrações e

proporções, que não dependem apenas da genética, mas também das condições de crescimento e do clima [3].

O Canabidiol (CBD) e o Tetrahydrocannabinol (THC) são compostos naturais encontrados em plantas do gênero *Cannabis*. Conhecidos como fitocanabinóides, estes compostos interagem com os receptores CB1 e CB2 encontrados no sistema endocanabinoide presente em todas as espécies de mamíferos. O CBD foi isolado pela primeira vez em 1940, enquanto o THC foi isolado em 1964 pelo cientista Raphael Mechoulam. No nível mais fundamental, o THC e o CBD são diferentes devido a seus efeitos fisiológicos. O CBD é não-psicotrópico e, portanto, não ilícito, enquanto o THC é psicotrópico e é o único composto derivado de *Cannabis* que causa a maioria dos efeitos adversos da droga [4].

O THC e o CBD são dois compostos de uma família de cerca de 113 canabinóides bicíclicos e tricíclicos encontrados naturalmente na planta. Tanto o CBD quanto o THC compartilham exatamente a mesma fórmula molecular, $C_{21}H_{30}O_2$, contendo vinte e um átomos de Carbono, trinta de Hidrogênio e dois de Oxigênio. Tal como acontece com muitos dos canabinóides, THC e CBD têm baixa solubilidade em água, mas boa solubilidade na maioria dos solventes orgânicos, particularmente lipídios e álcoois. Tanto o THC como o CBD estão presentes na cannabis numa mistura de formas ácidas, que são descarboxiladas e quimicamente alteradas após o aquecimento [5].

Ilustração 2. Esquerda: THC é um agonista parcial potente de CB1. É esse estímulo que leva aos principais efeitos psicotrópicos do consumo de cannabis. Direita: O CBD é um modulador alostérico negativo do CB1, por isso muda a forma do receptor CB1, enfraquecendo sua capacidade de se ligar ao THC.



Fonte: LIGRESTI, Alessia (2016).

Como um potente agonista parcial do CB1, o THC estimula o receptor CB1 levando aos efeitos psicotrópicos experimentados quando se consome Cannabis. O CBD, por outro lado, é classificado como um modulador alostérico negativo do CB1, significando que ele efetivamente altera a estrutura do receptor CB1. Essa alteração torna mais difícil para os agonistas do CB1, como o THC e outros agonistas endógenos do CB1, estimular o receptor (Ilustração 2) [6].

Sabendo das interações entre o CBD e THC sobre o receptor CB1, e os efeitos benéficos do CBD, são necessários estudos teóricos e experimentais que ajudem a entender em detalhe o efeito alostérico de CBD sobre CB1 e como estes compostos juntos (THC e CBD) nas proporções adequadas poderiam estimular o receptor CB1. Assim, a dinâmica molecular surge como uma alternativa de baixo custo para este tipo de estudos de interação de proteína-ligantes, já que permite estudar as variações estruturais e energéticas entre proteínas como a CB1 e os ligantes CBD e THC.

1.2 Dinâmica molecular de proteínas e desenho racional de fármacos

As funções que desempenham as proteínas estão diretamente relacionadas com sua estrutura tridimensional. Existem técnicas experimentais como cristalografia por difração de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN), Espectroscopia de difração de nêutrons, capazes de fornecer informações da estrutura tridimensional de uma macromolécula com resolução atômica [7]. Estas técnicas dão uma visão estática de uma biomolécula, o que traz

informações importantes para o início das simulações por dinâmica molecular. Já a dinâmica molecular é capaz de descrever o movimento das partículas em função do tempo. Assim, pode ser usada para estudar o comportamento dinâmico do complexo CB1-CBD em relação às variações de geometria molecular, energias moleculares, sítio de ligação do ligante na proteína e energia livre de ligação [8-10].

1.3 Simulação por Dinâmica Molecular

O desenvolvimento dos computadores no começo dos anos 50 e sua aplicação à resolução de problemas científicos, introduziu o que alguns têm chamado de 'terceira abordagem' para a pesquisa científica: simulação por computador [11]. Esta forma complementar e alternativa para fazer ciência, exerceu um forte impacto sobre praticamente todos os campos da ciência [12-13]. Os cientistas Alder e Wainwright no final dessa década publicaram um trabalho sobre a dinâmica de um conjunto de esferas rígidas usando o método de Dinâmica Molecular (DM) onde simularam as colisões elásticas entre estas, pelo qual seriam considerados os pioneiros do método [14]. Na simulação por MD são resolvidas as equações clássicas do movimento, ou seja, as equações de Newton

Na DM é calculada a resultante das forças \vec{F}_i agindo sobre cada partícula i no instante t em um sistema conservativo (cujo potencial interno é independente das velocidades e do tempo, e é calculado a partir da derivada do potencial de interação $V(\vec{r}_{ij})$). Esta força descreve a interação entre as partículas em relação à sua posição \vec{r}_i ;

$$\vec{F}_{ij} = -\frac{d}{dr_{ij}}V(\vec{r}_{ij}) \quad (1)$$

sendo $(i \neq j) = 1, 2, 3, \dots$ até N , o número total de partículas do sistema.

1.3.1 Condições iniciais

Como dito na seção 1.2, as posições iniciais dos átomos podem ser obtidas de experimentos como cristalografia de raios X e ressonância magnética nuclear. Estas estruturas são depositadas em banco de dados como *Protein Data Bank* [15]. Caso as estruturas não

estejam disponíveis, em alguns casos é possível determinar a disposição geométrica dos átomos por modelagem de homologia ou métodos *ab initio* [11].

Além das posições, as velocidades iniciais de todos os átomos devem ser especificadas para que as equações de movimento possam ser calculadas. As equações diferenciais de movimento são de segunda ordem e as velocidades podem ser computadas usando uma distribuição de Maxwell-Boltzmann em que a energia cinética do sistema clássico é especificada pela temperatura escolhida:

$$\frac{3}{2}Nk_B T = \frac{1}{2}\sum_{i=1}^N m_i v_i^2 \quad (2),$$

sendo N o número de partículas, m_i e v_i a massa e velocidade da partícula i , respectivamente. Para isso se dar é preciso que eu esteja aplicando o teorema de equipartição a um sistema físico cuja energia depende de forma quadrática de uma variável contínua. Por tanto, esse resultado se aplica a sistemas clássicos, porque num sistema quântico confinado nunca a energia vai depender de uma variável contínua

Outro ponto importante é a escolha do passo de tempo (*timestep*) de simulação. Este depende do evento que está sendo estudado. Por exemplo, para um evento de estiramento de ligações e deformações angulares envolvendo átomos de hidrogênio é recomendável usar o *timestep* da ordem de um femtossegundo (fs) [12]. Deve-se usar 1fs quando se considera a vibração das ligações covalentes envolvendo átomos de H. Para usar 2fs deve-se desconsiderar a vibração de todas as ligações covalentes destes átomos. Em nosso trabalho foi usado um passo de tempo de 2 fs porque abrange todos os movimentos e interações entre os átomos do sistema em estudo. Valores menores geram longos tempos de simulação o que se torna uma limitação para a simulação computacional.

1.3.2 Potenciais de interação molecular

Definidas as condições iniciais, o passo seguinte é calcular as forças sobre cada átomo do sistema. Estas forças são calculadas mediante a derivação do potencial de interação (Equação 1). Para isso é preciso definir o potencial de interação $V(\vec{r}_{ij})$. A escolha dos potenciais de interação intra e inter-moleculares compõe uma etapa indispensável para a especificação correta do sistema em estudo, já que primeiramente determinam as forças que atuam em cada partícula

e, por conseguinte, definirão como o sistema irá evoluir no tempo, para gerar as trajetórias para análise.

O potencial de interação entre duas moléculas pode ser descrito como a soma de interações entre cada par de átomos ou sítios de interação, assumindo que estas interações dependem somente da distância que separa estes sítios. As interações intramoleculares relacionadas à deformação da geometria angular devem ser acrescentadas em caso que sejam importantes. Então, geralmente o potencial de interação total é a soma das contribuições de interação inter- e intra-molecular.

O conjunto de funções que descrevem todas as interações de um sistema de átomos ou partículas em simulações de mecânica molecular recebem o nome de campo de força (*Force Field*) (ver Equação 3) [16]. Os parâmetros K_{H_n} , K_{θ_n} e K_{ϕ_n} são as constantes de força da mola ou de restauração que mantêm esses valores ao redor dos valores de referência r_0 e θ_0 . Estas constantes representam a altura da barreira de energia entre diferentes estados conformacionais. r_n , θ_n e ϕ_n são a distância, ângulo e ângulo diedro em um dado momento. O ângulo diedro pode rodar 360° e, ao longo desta rotação, apresentar múltiplos mínimos de energia. Assim, não há necessariamente, uma única geometria de referência. O perfil rotacional dos diedros tem a adição do parâmetro m , que descreve a multiplicidade do diedro (número de mínimos de energia) e δ_n , que diz respeito à mudança de fase e a localização do máximo de energia ao longo do perfil da rotação do diedro. As constantes das funções de energia podem ser derivadas a partir de trabalhos experimentais e cálculos de mecânica quântica. A transmissibilidade é uma propriedade fundamental de um campo de força, porem em alguns casos, como moléculas novas, é necessário parametrizar um campo de força para estas. [17]. A forma geral desses campos de força segue a seguinte equação:

$$V = V_H + V_b + V_{tor-i} + V_{tor-p} + V_C + V_{vdW} \quad (3)$$

Cada termo da equação se relaciona com um parâmetro geométrico, tal como uma ligação química, com o potencial de interação. Com isto, pode-se avaliar o potencial associado com uma dada conformação molecular de equilíbrio. Pode-se dizer que um bom campo de força descreve os estados conformacionais de energia mínima, local ou global, mesmo estando o sistema molecular sob a ação de forças externas ou excitações térmicas.

$$V_H = \frac{1}{2} \sum_n^{N_b} K_{H_n} (\mathbf{r}_n - \mathbf{r}_0)^2 \quad (4)$$

O termo V_H da equação representa o potencial necessário para comprimir ou alongar as ligações químicas do tipo covalentes.

$$V_b = \frac{1}{2} \sum_n^{N_\theta} K_{\theta_n} (\theta_n - \theta_0)^2 \quad (5)$$

V_b representa a contribuição das ligações angulares no potencial.

$$V_{tor-i} = \frac{1}{2} \sum_n^{N_\theta} K_{\theta_n} (\theta_n - \theta_0)^2 \quad (6)$$

$$V_{tor-p} = \frac{1}{2} \sum_n^{N_\phi} K_{\phi_n} [1 + \cos(m\phi_n - \delta_n)]^2 \quad (7)$$

V_{tor-i} e V_{tor-p} são as contribuições torsionais que representam os movimentos harmônicos nas ligações angulares diedrais, o potencial de diedros impróprios que tem por finalidade manter a planaridade das moléculas.

$$V_C = \frac{1}{4\pi\epsilon\epsilon_0} \sum_{i<j}^{N_b} \frac{q_i q_j}{r_{ij}} \quad (8)$$

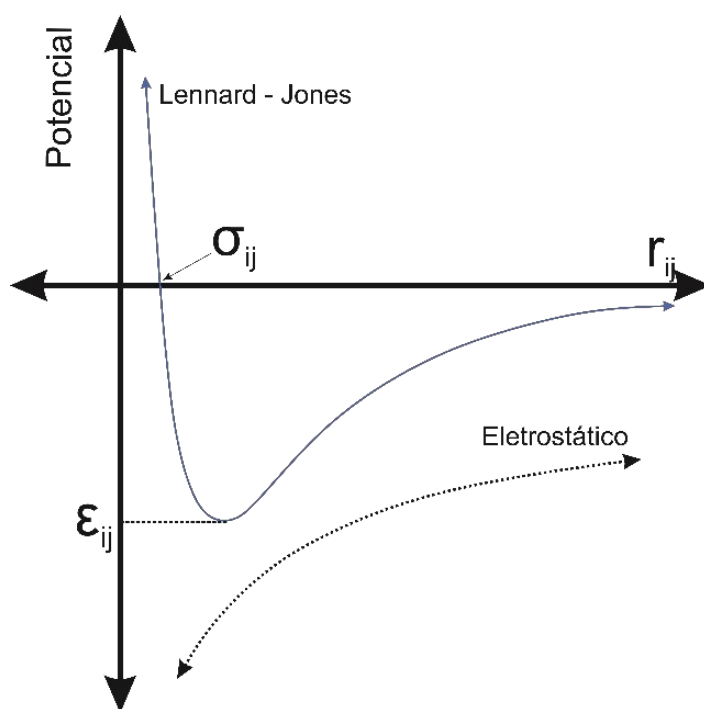
$$V_{vdW} = \sum_{i<j}^{N_b} \left[\frac{C_{12}(ij)}{r_{ij}^{12}} - \frac{C_6(ij)}{r_{ij}^6} \right] \quad (9)$$

Os dois últimos termos V_C e V_{vdW} representam as contribuições das interações envolvendo átomos não ligados, tais como as pontes de hidrogênio, forças de van der Waals e contribuições eletrostáticas coulombianas. No potencial de Lennard-Jones são computadas as interações repulsivas $\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^{12}$ e atrativas $-\left(\frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}}\right)^6$ entre pares de átomos que surge devido à interação entre um átomo i e outro j , sendo ϵ_{ij} , σ_{ij} , r_{ij} a profundidade do potencial, a distância na qual o potencial é zero e a distância entre os átomos i e j respetivamente. O primeiro termo

representa o impedimento à sobreposição dos átomos, e o segundo simboliza as interações de van der Waals (Figura 1).

Todos estes termos são funções explícitas das posições atômicas ou conformações moleculares. A diferença entre os valores das energias de duas conformações moleculares deve ser equivalente à energia experimental observada, que representa a barreira de energia ou a energia necessária para mudar de uma conformação molecular a outra.

Figura 1. Representação dos potenciais de repulsão e atração (Lennard-Jones e Eletrostático) entre dois sítios ou átomos não-ligados em função da distância entre eles. Os valores positivos da curva azul (subindo no eixo Potencial) representam forças de repulsão para curtas distâncias entre átomos, enquanto os valores negativos (descendo até o ponto de equilíbrio ϵ_{ij}) representam forças de atração.



Fonte: Modificado de Morgon (2007).

1.3.3 Campo de força CHARMM

Em mecânica molecular clássica, os campos de força como CHARMM [18-20], OPLS [21-22] ou AMBER [23-24] dividem em duas categorias os termos da energia para uma molécula específica; componentes ligados e não ligados, como descrito na equação (3) para o

campo de força CHARMM [18, 21]. Os termos $(V_H + V_b + V_{tor-i} + V_{tor-p})$ representam os componentes ligados, e $(V_C + V_{vdw})$ os não ligados.

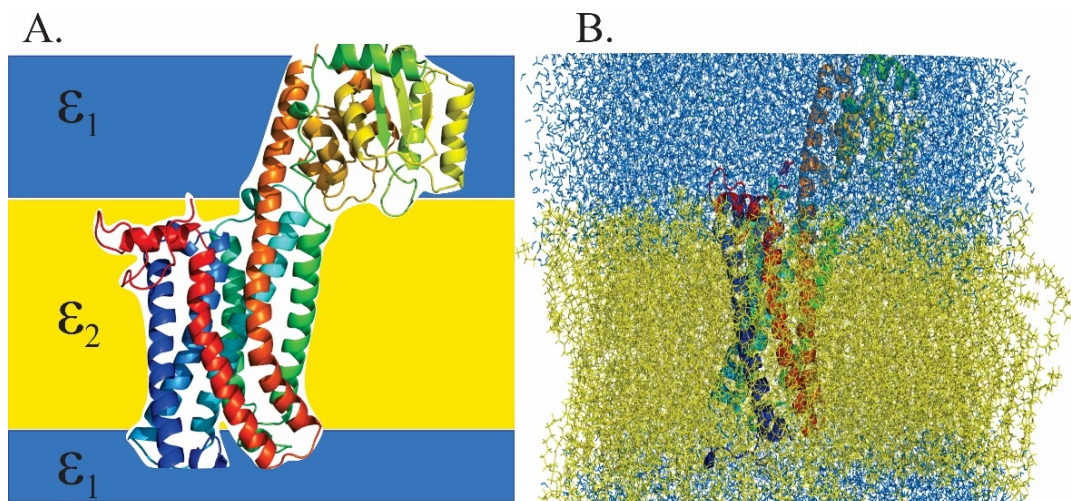
O campo de força escolhido para desenvolver esse estudo foi o CHARMM versão 36 (CHARMM36), o qual representa um modelo aprimorado da versão CHARMM22 para proteínas [20]. Pode ser empregado para os estudos de modelagem e simulação de proteínas, incluindo estudos de dobramento de proteínas, montagem e mudanças conformacionais funcionalmente relevantes [20]. O modelo CHARMM36 corrige a propensão no campo de força C22 em superestabilizar os parâmetros (ângulos ψ (psi) e ϕ (phi)) do esqueleto carbônico (*backbone*) das estruturas secundárias α -hélices nas proteínas [20].

1.3.4 Solvente explícito

O solvente de um sistema, em particular a água, exerce influência considerável sobre a estrutura do soluto e a termodinâmica do sistema. As enzimas, por exemplo, requerem um elevado grau de hidratação para que possam exercer sua função biológica. Por essa razão, é importante, em simulações computacionais de sistemas biomoleculares solvatados recriar o ambiente aquoso da forma mais precisa possível, de modo a incluir os efeitos do solvente, seja pelos métodos implícitos ou explícitos.

O modelo de solvatação implícita (Figura 2A) não considera os graus de liberdade das partículas que compõe o solvente, mas o trata como um meio contínuo que contém as propriedades médias do solvente real, a cada região é atribuída uma constante dielétrica ϵ_i que representa o solvente. Na solvatação explícita (Figura 2B), o solvente é tratado como parte do sistema, ou seja, como um elemento adicional. Dessa forma, se tem uma melhor descrição das interações intermoleculares que são negligenciadas nos métodos implícitos. As interfaces e os interiores de membranas biológicas não são necessariamente uniformes, isto indica que a melhor representação para nosso caso em estudo é usar o solvente explícito, o qual foi usado.

Figura 2. Modelo de solvatação implícito (A) e explícito (B) usando como proteína receptora a estrutura tridimensional do receptor de canabinoides tipo 1 (CB1).



Fonte: O próprio autor.

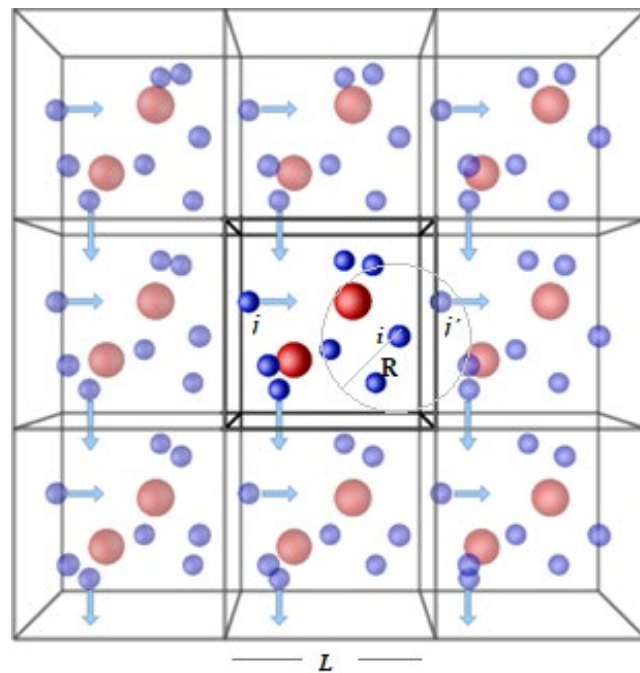
Dentre os vários modelos de água disponíveis mais utilizados na solvatação de sistemas simulados por dinâmica molecular tem-se o modelo de água explícita TIP3P (Transferable Intermolecular Potential with 3 Points) onde os três sítios de interação correspondem aos três centros de massa dos átomos da molécula de água. A interação eletrostática é modelada usando o potencial coulombiano e as forças de dispersão e repulsão usando o potencial de Lennard-Jones [25-26]. O uso deste modelo em MD reproduz bem os dados experimentais relatados na literatura por Jorgensen e colaboradores. Nesse estudo eles compararam os valores experimentais obtidos via difração de nêutron, da entalpia de vaporização, capacidade calorífica e propriedades estruturais da água líquida a 1 atm a 25° C com os valores atingidos nas simulações computacionais [26].

1.3.5 Condições periódicas de contorno

Simulações de DM são realizadas com o objetivo de mimetizar um sistema onde o número de moléculas envolvidas em um processo é da ordem do número de Avogadro ($6,022 \times 10^{23}$ partículas). Neste caso, para simular um sistema real é necessária a utilização de condições periódicas de contorno [27]. A ideia básica de uma condição periódica de contorno é replicar a caixa de simulação para formar uma rede infinita. Neste tipo de condição de contorno, átomos próximos às fronteiras da caixa possuem vizinhos virtuais para interagir. Estes vizinhos virtuais possuem uma dinâmica idêntica aos átomos da caixa de simulação real. Portanto, no decorrer da simulação quando um átomo se move dentro da caixa de simulação o

átomo virtual correspondente na caixa de simulação vizinha move-se da mesma forma. Assim, se um átomo i “sai” por um lado da caixa sua imagem i' deve “aparecer” no lado oposto. Com isso, o número total de partículas dentro da caixa central e de suas réplicas se mantém constante (Figura 3).

Figura 3. Representação do raio de corte R em um sistema tridimensional. O raio de corte é traçado a partir de um átomo de interesse i , onde este não interage com o átomo j e com sua imagem j' ao mesmo instante, muito menos com sua própria imagem i' . O quadrado tracejado representa a aproximação de mínima imagem e o círculo o raio de corte.



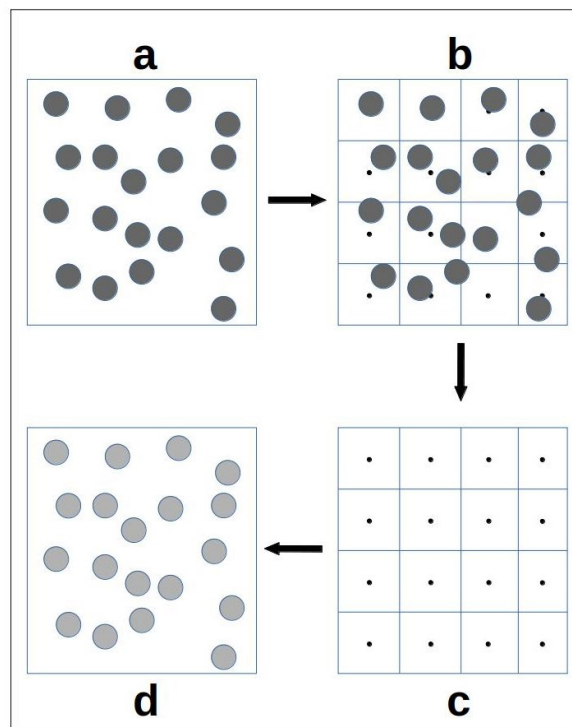
Fonte: Modificado de Tavares, R. M. (2016).

Para impedir que uma partícula i interaja com sua própria imagem i' , é definida uma aproximação denominada de “mínima imagem” (Figura 3) que consiste em que cada partícula i da caixa central interage com a mais próxima dentro de uma esfera chamada de raio de corte R (sigla em inglês *cut-off*), a qual determina a região em que estão as partículas com as quais a partícula i pode interagir. Esse raio deve ser igual ou menor do que a metade da aresta da caixa cúbica de simulação, de modo que as interações de curto alcance além do raio de corte são ignoradas, isto é, a energia potencial para uma distância $\geq R$ vai para 0 (Figura 3) [27].

Para o tratamento de interações de longo alcance a imposição de um raio de corte é problemática, já que influi na conservação da energia [27-28]. Uma opção para solucionar esse

problema é a substituição das forças de interação entre pares por uma força efetiva, segundo o método de soma PME (Particle Mesh Ewald) [29]. Este método consiste em dividir o sistema em grades tridimensionais. Dependendo da posição dos átomos do sistema, uma carga é atribuída a cada ponto da grade, então a energia eletrostática é calculada pela adição da somatória das interações de curta distância (determinada pelo raio de corte) que são explicitamente calculadas, e a derivada numérica do potencial, a qual é obtida pela transformada de Fourier (FT) em função da distribuição das cargas na grade. A força exercida sobre cada átomo é calculada pela interpolação da energia sobre a grade (Figura 4) [30-31].

Figura 4. Esquema 2D que o método de Partículas-Mesh usa na maioria dos métodos baseados em Fourier. (a) Um sistema de partículas carregadas. (b) Cargas interpoladas em uma grade 2D. (c) Os potenciais e as forças são calculados em uma grade de pontos usando FFT. (d) Cálculo da força sobre as partículas.



Fonte: Modificado de Toukmaji, A. Y., & Board Jr, J. A. (1996).

1.3.6 Dinâmica das partículas do sistema

Depois de estabelecer as condições iniciais e a forma dos potenciais, é momento de movimentar o sistema, sendo necessário determinar as posições e velocidades nas etapas subsequentes. Para isso é preciso resolver as equações diferenciais de movimento, que regem o sistema sob ação do potencial de interação entre as partículas. Considerando que o sistema

estiver isolado de forças externas, então a soma das energias potencial e cinética do sistema é uma constante, e nestes casos, dadas as posições (\vec{r}) e as velocidades (ou momento \vec{p}) iniciais das partículas, é factível obter as novas coordenadas das partículas para qualquer tempo, por meio da resolução das equações de movimento de Newton:

$$0 = m\ddot{\vec{r}} + \nabla_i V_N(\vec{r}_N) \quad (10)$$

Estas são equações diferenciais de segunda ordem acopladas, onde N é o número de partículas do sistema. Para resolver essas equações, são usadas aproximações de diferenças finitas, onde as implementações mais usadas em dinâmica molecular são os algoritmos de Verlet e Verlet-velocidade [13].

Dado que a resultante das forças \vec{F}_i atuando numa partícula i no instante de tempo t em um sistema conservativo (cujo potencial interno é independente do tempo e das velocidades) é uma função somente das coordenadas $\vec{r} = \frac{\vec{F}_i(t)}{m_i}$. Esta equação segue a descrição clássica de movimento de Newton. No algoritmo de Verlet, se a posição do centro de massa da partícula i no tempo t é $\vec{r}_i(t)$, as posições nos tempos $t \pm \delta t$ são dadas por uma expansão de Taylor ao redor de $\vec{r}_i(t)$.

Do polinómio de Taylor de ordem n em torno de $x = x_0$:

$$f(x) = f(x_0) + f'(x_0)\frac{(x-x_0)^1}{1!} + f''(x_0)\frac{(x-x_0)^2}{2!} + \dots + f^n(x_0)\frac{(x-x_0)^n}{n!}, \quad (11)$$

Podemos expressar as posições ao redor do $r_i(t)$ nos tempos $t \pm \delta t$:

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \delta t \vec{\dot{r}}_i(t) + \frac{\delta t^2}{2!} \vec{\ddot{r}}_i(t) + \frac{\delta t^3}{3!} \vec{\ddot{\ddot{r}}}_i(t) + O(\delta t^4), \quad (12)$$

$$\vec{r}_i(t - \delta t) = \vec{r}_i(t) - \delta t \vec{\dot{r}}_i(t) + \frac{\delta t^2}{2!} \vec{\ddot{r}}_i(t) - \frac{\delta t^3}{3!} \vec{\ddot{\ddot{r}}}_i(t) + O(\delta t^4) \quad (13)$$

Se somarmos essas equações é possível eliminar as derivadas de ordem ímpar e obter uma expressão simplificada da função posição:

$$\vec{r}_i(t + \delta t) \cong 2\vec{r}_i(t) - \vec{r}_i(t - \delta t) + \frac{\delta t^2}{m_i} \vec{F}_i(t) \quad (14)$$

A equação (14) no instante anterior a $t = 0$ não é definida, para evitar essa situação no começo das simulações de dinâmica molecular ($t = 0$) é usada uma aproximação dadas as condições iniciais $\vec{r}_i(0)$ e $\vec{v}_i(0)$ [32]. Essa aproximação consiste em substituir $t = 0$ na equação (12) e truncar até a derivada de segunda ordem. De modo que teremos a posição no tempo $t = \delta t$ como:

$$\vec{r}_i(\delta t) \approx 2\vec{r}_i(0) + \delta t \vec{v}_i(0) + \frac{1}{2!} \delta t^2 \ddot{\vec{r}}_i(0) \quad (15)$$

Com as posições $\vec{r}_i(\delta t)$ é possível calcular as forças $\vec{F}(\vec{r}_i(\delta t))$. Logo feito isso, o cálculo será iterativamente empregando a equação (14).

Como alternativa ao método anterior para calcular as posições e velocidades, existe uma modificação do algoritmo de Verlet conhecido como Verlet-velocidade [13], este método requer o cálculo da velocidade em um intervalo de tempo intermediário ($\delta t/2$).

A equação (12) pode ser expandida em função de $\vec{r}_i(t)$, e considerando as derivadas até a segunda ordem temos:

$$\vec{r}_i(t + \delta t) = \vec{r}_i(t) + \delta t \vec{v}_i(t) + \frac{\delta t^2}{2} \frac{\vec{F}(t)}{m_i} \quad (16)$$

A expressão para a velocidade $v(t + \delta t)$ pode ser expandida em serie de Taylor até a segunda ordem:

$$\vec{v}_i(t + \delta t) = \vec{v}_i(t) + \delta t \frac{d}{dt}(\vec{v}_i(t)) + \frac{\delta t^2}{2!} \frac{d^2}{dt^2}(\vec{v}_i(t)) \quad (17)$$

Expressamos o termo $\frac{d^2}{dt^2}(\vec{v}_i(t))$ em função das derivadas de ordem inferior como:

$$\frac{d}{dt} \vec{v}_i(t + \delta t) = \frac{d}{dt}(\vec{v}_i(t)) + \delta t \frac{d^2}{dt^2}(\vec{v}_i(t)) + C \delta t^2 \quad (18)$$

Da equação (18) podemos isolar o termo $\frac{d^2}{dt^2}(\vec{v}_i(t))$ e substituir na equação (17),

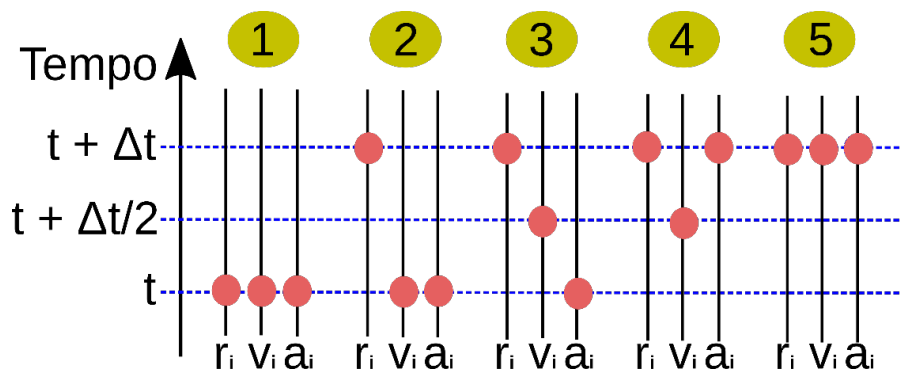
$$\vec{v}_i(t + \delta t) = \vec{v}_i(t) + \frac{\delta t}{2} \frac{d}{dt}(\vec{v}_i(t + \delta t)) + \frac{\delta t}{2} \frac{d}{dt}(\vec{v}_i(t)) \quad (19)$$

Reescrevendo a equação (19) temos que $\vec{v}_i(t + \delta t)$ é:

$$\vec{v}_i(t + \delta t) = \vec{v}_i(t) + \frac{\delta t}{2} \frac{\vec{F}(\vec{r}_i(t + \delta t))}{m_i} + \frac{\delta t}{2} \frac{\vec{F}(\vec{r}_i(t))}{m_i} \quad (20)$$

Na figura 5 mostra-se um esquema da implementação do algoritmo de Verlet-velocidade. Primeiro, são definidas as condições iniciais das posições, velocidades e acelerações. Segundo, calculam-se as novas posições no tempo $t + \delta t$ (Equação 16). Terceiro, são calculadas as velocidades no intervalo de tempo $t + \delta t/2$. Quarto, com as posições no tempo $t + \delta t$ é possível calcular as forças e, com isto, as acelerações $\vec{a}(t + \delta t) = -\frac{1}{m} \nabla V(\vec{r}_1(t + \delta t) \dots \vec{r}_N(t + \delta t))$. Quinto, calcular as velocidades no tempo $t + \delta t$ (Equação 20). Este procedimento é feito iterativamente desde o segundo passo até o quinto.

Figura 5. Esquema do funcionamento do algoritmo Verlet-velocidade.



Fonte: Modificado de AYME, Lopez *et al.* (2016)

1.4 Energia Livre de Interação (LIE): Método e aplicações em desenho de fármacos

A energia livre de Gibbs pode ser obtida através de métodos teóricos, embora a obtenção de estimativas mais precisas envolva um custo computacional muitas vezes proibitivo para estudos de atracamento molecular em larga escala envolvendo dezenas, centenas ou milhares de átomos. Alguns dos métodos mais comumente utilizados para cálculo da energia livre incluem o método de perturbação da energia livre (PEL) e o método de integração termodinâmica (IT), que procuram calcular diferenças entre as energias livres de ligação entre ligantes similares [34-35].

Embora esses métodos sejam precisos, o alto custo computacional envolvido limita a sua utilização. Esses métodos necessitam do conhecimento prévio da estrutura de um complexo

onde a proteína está associada com um ligante com estrutura similar ao que se quer estudar. Além disso, tendem a ter um pior desempenho quando os compostos envolvidos diferem de muitos átomos e/ou promovem mudanças conformacionais significativas no receptor. Métodos ainda mais poderosos (conhecidos na literatura como *Absolute Binding Free Energies Methods*), e com custos computacionais mais elevados, procuram calcular os valores das energias livres de ligação sem a necessidade de se ter previamente como referência o conhecimento da energia livre de ligação de um ligante similar [34-35].

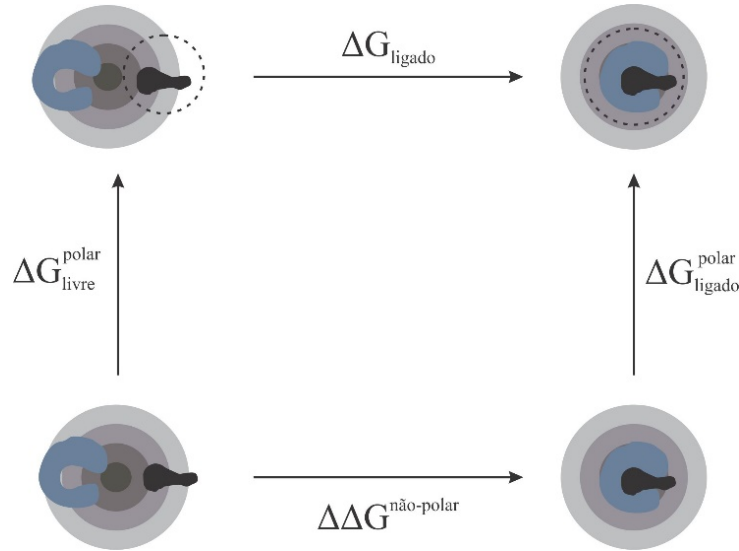
Uma metodologia utilizada para a obtenção de energias livres de ligação é a chamada Energia de Interação Linear (LIE, do inglês *Linear Interaction Energy*), a qual trata de estimar as energias livres a partir de simulações de dinâmica molecular utilizando um campo de força molecular clássico. Os cálculos de energia livre com esta metodologia envolvem simulações somente nos estados inicial (ligante em solução) e final (complexo receptor/ligante), podendo reduzir desta maneira os problemas de convergência e custo computacionais associados às técnicas PEL e IT [34, 36-39].

Neste estudo, foi aplicado o método de Energia Livre de Interação (LIE) para estimar a energia de ligação.

A amostragem associada da DM dos complexos ligante-receptor, que é principalmente necessária para gerar médias termodinâmicas das energias, também é útil para permitir o relaxamento estrutural e energético das estruturas. Esta é uma grande diferença em comparação com o uso de funções de *scoring* e oferece vantagens adicionais do uso do método LIE no caminho de projeto de ligante.

O método LIE analisa a mudança na energia livre quando o ligante é transferido da solução para o local de ligação do receptor solvatado, composta de uma contribuição polar e não polar do ciclo termodinâmico (Figura 6). Assim, a energia livre de ligação pode ser expressa como uma soma dos componentes polares e não polares correspondentes da energia livre. Isto é bastante conveniente, uma vez que os campos de força da mecânica molecular dividem analogamente as energias potenciais não ligadas em componentes eletrostáticos e não eletrostáticos.

Figura 6. Ciclo termodinâmico usado para estimar as energias livres de ligação com o método LIE da equação 21. Os quadrantes superiores representam dois estados (esquerda: livre, solvatada na água; direita: ligado à proteína). Os dois quadrantes inferiores serão responsáveis por dois estados intermediários, não físicos: um pseudo-ligante sem quaisquer interações eletrostáticas (intermoleculares), em seu estado livre (à esquerda) ou ligado (à direita).



Fonte: Modificado de DURRANT, Jacob D. (2011)

Além disso, a aproximação linear é usada para determinar a contribuição eletrostática para a energia livre de ligação, enquanto a contribuição não polar é estimada usando um parâmetro derivado empiricamente que escala as energias de interação intermoleculares de van der Waals (Lennard-Jones) das simulações MD. Isso foi motivado pelo fato de as energias de van der Waals soluto-solvente estarem correlacionadas com as mesmas variáveis como energias livres de solvatação hidrofóbica (por exemplo, área de superfície acessível), e que as energias médias de van der Waals também escalam aproximadamente linearmente com o tamanho do soluto [36]. Isto levou a uma equação aproximada para a energia livre de ligação do seguinte tipo:

$$\Delta G_{Bind} = \beta \Delta \langle V_{l-s}^{el} \rangle + \alpha \Delta \langle V_{l-s}^{vdw} \rangle + \gamma \quad (21)$$

Onde $\langle \rangle$ indicam médias termodinâmicas das energias de Van der Waals (*vdw*) e eletrostática (*el*) da interação do ligante e do seu meio envolvente (*l-s*) calculadas com dinâmica molecular. Os Δ indicam a mudança nestas médias quando se transfere o ligante da solução (estado livre) para o local de ligação do receptor (estado ligado). Os parâmetros α , β e γ são conhecidos como fatores de escala para as contribuições de energia de ligação polar e apolar. Estes são obtidos ajustando as energias livres de ligação experimentais e estimados por

simulação usando regressão linear para uma série de compostos químicos com características estruturais semelhantes.

Tabela 1. Valores para o parâmetro β em função da natureza química do ligante.

β	Natureza química
0.5	Compostos carregados
0.43	Compostos neutros
0.37	Compostos neutros contendo um único grupo hidroxila
0.33	Compostos neutros com 2 ou mais grupos hidroxila

Fonte: Hansson *et al.* (1998).

Åqvist e Hansson determinaram um primeiro conjunto de valores refinados para o fator de escala β em função da natureza química do ligante (Tabela 1) com base nos cálculos de Free Energy Perturbation (FEP) realizados para diferentes entidades químicas [40]. Os valores correspondem a desvios da teoria da resposta linear, que estão diretamente relacionados à capacidade do ligante de participar da rede de ligação de hidrogênio do solvente aquoso (Tabela 1).

Um conjunto mais detalhado de valores de β_{FEP} foi proposto com base nas energias livres de solvatação estimadas com o método FEP para mais de 200 grupos químicos [41]. De acordo com este estudo, o fator de escala β é calculado para um determinado ligante, como uma contribuição ponderada dos correspondentes valores de β_{FEP} atribuídos a cada grupo químico presente no ligante.

A principal vantagem desta nova estimativa do coeficiente β é a flexibilidade e maior precisão, uma vez que os desvios da resposta linear devido a grupos químicos como amidas, aminas ou ácidos carboxílicos são agora explicitamente levados em conta. No entanto, para a maioria dos compostos normalmente considerados em um processo de desenho de fármaco, os fatores β estimados são próximos aos valores “clássicos” mostrados na Tabela 1, o que será suficiente para a maioria dos cálculos de ligação de ligante.

Na derivação inicial do método LIE, o fator de escala não polar foi estimado usando uma abordagem empírica, através de uma calibração em um conjunto de 18 complexos de proteína-ligante. O valor obtido de $\alpha = 0.18$ reproduziu com sucesso desde então as energias livres de ligação em uma ampla variedade de sistemas ligante-proteína, incluindo ligantes pequenos e neutros de P450_{CAM}, compostos carregados tais como bloqueadores dos canais de

potássio e mesmo compostos flexíveis tais como peptidomiméticos em proteases aspárticas [42-44].

Finalmente, a fim de estimar as energias livres de ligação, um parâmetro de compensação γ pode ser considerado, embora não seja estritamente necessário para o cálculo de afinidades de ligação relativas (isto é, classificação de compostos). O valor desse parâmetro foi relacionado à hidrofobicidade do sítio de ligação e, em qualquer caso, deve ser determinado empiricamente [44]. Uma excelente concordância com os dados experimentais é encontrada, usando os coeficientes padrão de LIE ($\alpha = 0,18$, $\beta = 0,33$ e $\gamma = 0$) já que em nosso estudo o ligante CBD possui 2 grupos hidroxila [45].

REFERENCIAS

- [1] FREITAS, Hércules Rezende *et al.* Fatty acids, antioxidants and physical activity in brain aging. **Nutrients**, v. 9, n. 11, p. 1263, 2017.
- [2] FREITAS, Hércules Rezende *et al.* Polyunsaturated fatty acids and endocannabinoids in health and disease. **Nutritional neuroscience**, v. 21, n. 10, p. 695-714, 2018.
- [3] LEWIS, Mark A.; RUSSO, Ethan B.; SMITH, Kevin M. Pharmacological foundations of cannabis chemovars. **Planta medica**, v. 84, n. 04, p. 225-233, 2018.
- [4] PERTWEE, Roger G. Cannabinoid pharmacology: the first 66 years. **British journal of pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S163-S171, 2006.
- [5] BRUNI, Natascia *et al.* Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2478, 2018.
- [6] LIGRESTI, Alessia.; DE PETROCELLIS, Luciano.; DI MARZO, Vincenzo. From phytocannabinoids to cannabinoid receptors and endocannabinoids: pleiotropic physiological and pathological roles through complex pharmacology. **Physiological reviews**, v. 96, n. 4, p. 1593-1659, 2016.
- [7] KARPLUS, Martin.; KURIYAN, John. Molecular dynamics and protein function. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 19, p. 6679-6685, 2005.
- [8] NAMBA, Adriana Mico.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, 2008.
- [9] SCHLICK, Tamar. **Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide: an interdisciplinary guide**. 2nd ed. Springer Science & Business Media, 2010.
- [10] DURRANT, Jacob D.; MCCAMMON, J. Andrew. Molecular dynamics simulations and drug discovery. **BMC biology**, v. 9, n. 1, p. 71, 2011.
- [11] MARTÍNEZ, Leandro.; BORIN, I. A.; SKAF, Munir S. Fundamentos de Simulação por Dinâmica Molecular. In: MARTINEZ, Leandro; BORIN, Ivana A, MUNIR, S. Skaf. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Editora Livraria da Física, Capítulo 12, 2007.
- [12] ALLEN, Michael P.; TILDESLEY, Dominic J. **Computer simulation of liquids**. 2. Ed. Oxford university press, 2017.
- [13] ALLEN, Michael P. *et al.* **Introduction to Molecular Dynamics Simulation**. In book: **Computational Soft Matter: From Synthetic Polymers to Proteins**. 1. ed. v. 23, n. 1, p. 1-28, 2004.

- [14] KAUFMANN, William J.; SMARR, Larry L. Supercomputing and the Transformation of Science. **La Météorologie**, 1995.
- [15] HEINZ, Dirk W. *et al.* How amino-acid insertions are allowed in an α -helix of T4 lysozyme. **Nature**, v. 361, n. 6412, p. 561-564, 1993.
- [16] VERLI, Hugo. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 1. Ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2014.
- [17] SOLOMON, K. Anand. Molecular modelling and drug design. MJP Publisher, 2019.
- [18] VANOMMESLAEGHE, Kenno *et al.* CHARMM general force field: A force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671-690, 2010.
- [19] AD MACKERELL, B. BROOKS, CL BROOKS, L. NILSSON, B. ROUX, Y. Won e M. Karplus, em *Enciclopédia de Química Computacional*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Reino Unido, 2002
- [20] BEST, Robert B. *et al.* Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ_1 and χ_2 dihedral angles. **Journal of chemical theory and computation**, v. 8, n. 9, p. 3257-3273, 2012.
- [21] JORGENSEN, William L.; TIRADO-RIVES, Julian. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **Journal of the American Chemical Society**, v. 110, n. 6, p. 1657-1666, 1988.
- [22] HARDER, Edward *et al.* OPLS3: a force field providing broad coverage of drug-like small molecules and proteins. **Journal of chemical theory and computation**, v. 12, n. 1, p. 281-296, 2015.
- [23] WANG, Junmei *et al.* Development and testing of a general amber force field. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 9, p. 1157-1174, 2004.
- [24] JÄMBECK, Joakim PM.; LYUBARTSEV, Alexander P. Update to the General Amber Force Field for small solutes with an emphasis on free energies of hydration. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 118, n. 14, p. 3793-3804, 2014.
- [25]. KIRBY, Brian J. **Micro-and nanoscale fluid mechanics: transport in microfluidic devices**. New York: Cambridge University Press, 2010.
- [26] JORGENSEN, William L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of chemical physics**, v. 79, n. 2, p. 926-935, 1983.
- [27] KOEHL, Patrice. Electrostatics calculations: latest methodological advances. **Current opinion in structural biology**, v. 16, n. 2, p. 142-151, 2006.

- [28] SCHLICK, Tamar. Molecular Dynamics: Basics. In: **Molecular modeling and simulation: an interdisciplinary guide**. New York: Springer, 2010. p. 425-461.
- [29] LEACH, Andrew R.; LEACH, Andrew R. Molecular modelling: principles and applications. 2. Ed. Pearson education, 2001.
- [30] POLLOCK, E. L.; GLOSLI, Jim. Comments on P3M, FMM, and the Ewald method for large periodic Coulombic systems. **Computer Physics Communications**, v. 95, n. 2-3, p. 93-110, 1996.
- [31] TOUKMAJI, Abdulnour Y.; BOARD JR, John A. Ewald summation techniques in perspective: a survey. **Computer physics communications**, v. 95, n. 2-3, p. 73-92, 1996.
- [32] CARLON, E. LALEMAN M. NOMIDIS E S. Molecular Dynamics Simulations. url: [http:// itf.fys.kuleuven.be/~enrico/Teaching/molecular_dynamics_2015.pdf](http://itf.fys.kuleuven.be/~enrico/Teaching/molecular_dynamics_2015.pdf) (acesso em 25/01/2018).
- [33] AYME, Lopez *et al.* Estudo computacional da fluorescência do triptofano em proteínas por meio de simulações de dinâmica molecular. Unicamp. 2019.
- [34] VERLI, Hugo. **Bioinformática: da biologia à flexibilidade molecular**. 1. Ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular – SBBq, 2014.
- [35] MUEGGE, Ingo. A knowledge-based scoring function for protein-ligand interactions: Probing the reference state. **Perspectives in Drug Discovery and Design**, v. 20, n. 1, p. 99-114, 2000.
- [36] ÅQVIST, Johan.; MEDINA, Carmen.; SAMUELSSON, Jan-Erik. A new method for predicting binding affinity in computer-aided drug design. **Protein Engineering, Design and Selection**, v. 7, n. 3, p. 385-391, 1994.
- [37] AQVIST, J.; MARELIUS, John. The linear interaction energy method for predicting ligand binding free energies. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 4, n. 8, p. 613-626, 2001.
- [38] BJELIC, Sinisa *et al.* Computational inhibitor design against malaria plasmepsins. **Cellular and molecular life sciences**, v. 64, n. 17, p. 2285-2305, 2007.
- [39] WANG, Renxiao; LAI, Luhua; WANG, Shaomeng. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 16, n. 1, p. 11-26, 2002.
- [40] ÅQVIST, Johan.; HANSSON, Tomas. On the validity of electrostatic linear response in polar solvents. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 100, n. 22, p. 9512-9521, 1996.

- [41] ALMLÖF, Martin.; CARLSSON, Jens.; ÅQVIST, Johan. Improving the accuracy of the linear interaction energy method for solvation free energies. **Journal of chemical theory and computation**, v. 3, n. 6, p. 2162-2175, 2007.
- [42] ALMLÖF, Martin.; BRANDSDAL, Bjørn O.; ÅQVIST, Johan. Binding affinity prediction with different force fields: examination of the linear interaction energy method. **Journal of computational chemistry**, v. 25, n. 10, p. 1242-1254, 2004.
- [43] ÖSTERBERG, Fredrik; ÅQVIST, Johan. Exploring blocker binding to a homology model of the open hERG K⁺ channel using docking and molecular dynamics methods. *FEBS letters*, v. 579, n. 13, p. 2939-2944, 2005.
- [44] LUZHKOV, Victor B.; ÅQVIST, Johan. Mechanisms of tetraethylammonium ion block in the KcsA potassium channel. **FEBS letters**, v. 495, n. 3, p. 191-196, 2001.
- [45] HANSSON, Tomas.; MARELIUS, John.; ÅQVIST, Johan. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 12, n. 1, p. 27-35, 1998.

2 Modulação do receptor canabinóide tipo 1 (CB1): análises estrutural e energético das interações alostéricas usando simulações de dinâmica molecular

1. INTRODUÇÃO

As proteínas de membrana, devido ao seu papel como receptores celulares e mediadores de sinalização, são as principais candidatas a alvos de drogas. Estima-se que mais de 70% dos medicamentos disponíveis atuem através de proteínas de membrana [1]. A análise da afinidade de ligação proteína-ligante tem sido amplamente empregada como uma ferramenta no de desenho racional de medicamentos. Embora métodos eficazes baseados em solvente explícito para modelagem da ligação proteína-ligante globular já existam há muitos anos, a extensão de tais métodos ao estudo da ligação proteína-ligante no ambiente de membrana celular ainda está em sua infância [2].

Um exemplo dessas proteínas são os receptores de canabinóides tipo 1 (CB1), abundantes no cérebro, capazes de inibir os canais de cálcio dependentes de voltagem e ativar os canais de potássio [3]. Essas proteínas pertencem à família de receptores acoplados à proteína G, encontrados nos terminais nervosos central e periférico, que contribuem para a transdução de estímulos extracelulares em sinais intracelulares [3].

O CB1 é um receptor de compostos canabinóides, como é o caso do Canabidiol (CBD) e o Δ^9 -tetra-hidrocanabinol (Δ^9 -THC). Estudos *in vivo* com CBD mostraram que este composto pode reduzir os efeitos de distúrbios neurológicos, como as síndromes de Dravet e Lennox-Gastaut [4]. Além disso, foi demonstrado que o CBD pode atuar como um modulador alostérico negativo (NAM) do CB1; capaz de reduzir a eficácia e a potência do THC na sinalização dependente de CB1 *in vitro* [5].

Foram identificados sítios de ligação alostéricos distintos do sítio de ligação clássica (ortostérica) ao CB1 [6-10]. Várias moléculas, moduladores alostéricos negativos (NAMs) ou positivos (PAMs) do CB1 foram propostos, acompanhados pela identificação de vários sítios de ligação alostérica de agonistas e antagonistas [11,12].

Através do mapeamento *in silico* usando acoplamento molecular, foi recentemente descoberto que o CBD é capaz de se ligar a dois sítios distintos (*pocket 1* e *pocket 3*) ao sítio ortostérico [13]. Apesar da existência de estudos experimentais e dados calculados sobre a interação do CBD e do receptor CB1, não há conhecimento sobre modificações energéticas e estruturais que possam causar a ocupação de mais de um sítio de ligação no receptor completo (CB1) pelo ligante (CBD) num ambiente de membrana POPC.

As características alostéricas do CBD podem trazer vantagens, aumentando a seletividade do ligante do CBD ao receptor, interagindo em locais alostéricos estruturalmente menos conservados. Além disso, possui um “efeito teto” na função do ligante ortostérico, de modo que o aumento na concentração além da saturação do local de ligação ao receptor alostérico não aumente a magnitude do efeito alostérico (prevenção de sobredosagem) [14]. Assim, o estudo de como as interações alostéricas do CBD podem influenciar a ligação ortostérica no CB1 e saber qual seria o melhor local para a função alostérica do CBD seria relevante para a potencialização do efeito terapêutico do CBD e o desenho racional de moléculas miméticas a este ligante.

Para isso, como alternativa às técnicas experimentais, são encontrados os estudos *in silico*, que permitem analisar as interações entre os átomos das proteínas alvo e os ligantes de interesse, sendo um método não invasivo e sem colocar a saúde dos indivíduos em risco, reduzindo o tempo e custos da pesquisa [15]. Um exemplo de análises *in silico* são aquelas que empregam simulações de dinâmica molecular (DM), que descrevem a evolução temporal do sistema a partir do potencial de interação entre átomos e a solução da segunda equação de Newton.

Como ponto de partida para estudos de dinâmica molecular, as técnicas de raios-X ou RMN são importantes, pois fornecem as coordenadas necessárias para executar as simulações, gerando os valores das médias temporais, coletadas durante o experimento e ao final em uma simulação de DM. No entanto, essas técnicas experimentais não analisam as interações dinâmicas entre a proteína, ligante, lipídios e águas que influenciam os vários estados que pode passar o sistema proteína-ligante [16-18].

Baseados no exposto anteriormente, no presente estudo foram avaliadas as interações do CBD no sítio ortostérico e dois sítios alostéricos do receptor CB1 usando simulações de

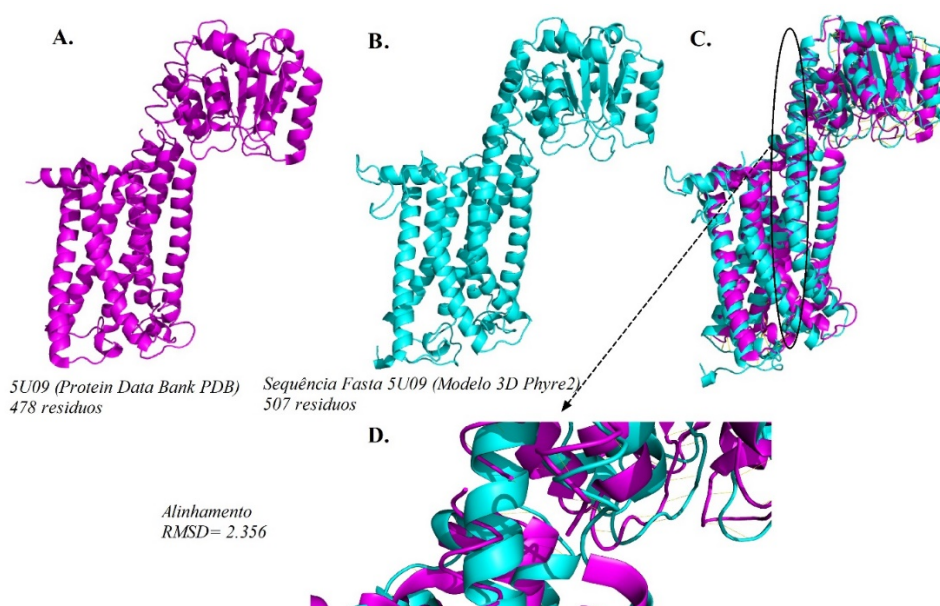
dinâmica molecular, analisou-se o efeito do ambiente membrana POPC nessas interações, assim como foi determinado o impacto das ligações ortostéricas e alostéricas na estabilidade e afinidade das interações formadas quando mais de um CBD está interagindo com CB1. Todas estas análises foram feitas objetivando extrair dados estruturais que possam ser úteis na proposta de novos fármacos com características alóstericas mimetizando o efeito do CBD.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção do receptor e ligante

A estrutura cristalina de alta resolução do receptor canabinoide 1 humano foi obtida do banco de dados PDB (Protein Data Bank) com o código de acesso 5U09 [19, 20]. Para o uso da proteína no trabalho, os ligantes associados à estrutura foram removidos e os átomos de hidrogênio foram adicionados através do programa PyMOL Molecular Graphics System, Versão 2.0 Schrödinger, LLC. Devido que algumas partes da CB1 estavam quebradas, a estrutura tridimensional completa foi determinada usando o *webserver* Phyre2 [21]. Este *webserver* é um conjunto de ferramentas disponíveis na Web para prever a estrutura 3D da sequência de aminoácidos da proteína alvo. As diferenças estruturais entre a estrutura CB1 extraída do PDB e a modelada são mostradas na Figura 1.

Figura 1. Comparação estrutural através do alinhamento e cálculo do RMSD (C e D) entre as proteínas 5U09 (A) (estrutura tridimensional determinada experimentalmente) e o modelo gerado usando Phyre2 a partir da sequência Fasta 5U09 (B).



Fonte: O próprio autor.

Tabela 1. Resultados da análise de qualidade do modelo tridimensional da proteína CB1 gerado pelo simulador online Phyre2.

Proteína	Modelo 3D (Phyre2)			Análises Ramachandran		Análises PROSA	ERRAT
	Confidencia minima	Minimo % i.d	Molde	Permitido	General	Não-permitido	
CB1	100	30	20	91.9	6.4	1.7	-4.02
							92.46

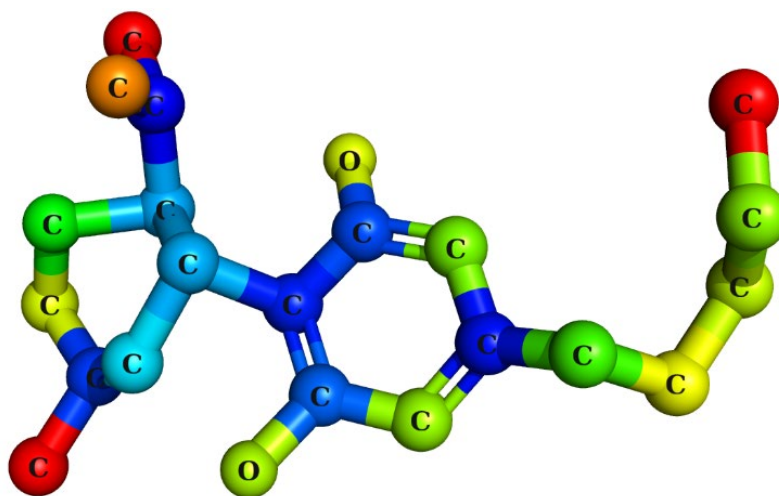
Fonte: O próprio autor.

A qualidade do modelo da CB1 obtido com Phyre2 (Tabela 1) foi mensurada pela avaliação da geometria e estereoquímica, distribuição de energia e outras características do modelo 3D usando o pacote de análise PROSA (Análise de Estrutura de Proteínas) (<https://prosa.services.came.sbg.ac>), ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>), análises de Ramachandran (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>) e Verify3D (http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/).

A estrutura 3D da proteína CB1 obtida a partir do programa Phyre2 foi prevista com 100% de confiança e identidade do 30% ao *template* ou proteína modelo empregada pelo software. A análise de qualidade usando o teste de Ramachandran computado com software online PROCHECK mostrou 98% dos resíduos de aminoácidos realizam ligações favoráveis dentro da proteína o que indica que a estrutura da proteína tem boa qualidade, sem impedimentos estéricos entre as cadeias laterais dos resíduos de aminoácido.

O ligante Canabidiol (Figura 2) foi obtido da base de dados ZINC [22], com o código de acesso ZINC04097406. A estrutura do CBD foi otimizada usando o método AM1 empregado pelo programa MarvinSketch [23]. A topologia e os parâmetros do campo de força (ligado e não ligado) para o CBD foram obtidos usando a ferramenta da web SwissParam [24].

Figura 2. Estrutura tridimensional do ligante Canabidiol (ZINC04097406) obtida do bando de dados ZINC.



Fonte: O próprio autor.

2.2 Docking Molecular

Antes das simulações por DM devem ser montados os complexos receptor-ligante usando o método de acoplamento molecular para cálculo das afinidades de ligação e escolher a melhor posição do ligante a ser empregada para estudo com dinâmica molecular. Por tal motivo, para o estudo de acoplamento foi utilizado o programa AutoDock Vina [25, 26], que determina o sítio de interação entre as cadeias de aminoácidos da proteína receptora e o ligante, isto, a partir do cálculo da energia de afinidade usando um método de busca e uma função de avaliação. O método de busca que o programa AutoDock Vina emprega é conhecido como estocástico, onde a exploração das diferentes orientações e conformações possíveis para o ligante no sítio de ligação do receptor alvo é feita de tal forma a se obter diferentes resultados para distintas posições como saída para um mesmo estado inicial de entrada do ligante, onde o melhor valor da afinidade está associado a posição que mais se repete [25, 26]. Este método empregado pelo AutoDock Vina é adequado e comumente utilizado para a interação receptor-ligante, como é o caso do nosso sistema de estudo CB1-CBD.

Conforme mencionado na introdução deste capítulo, por meio do mapeamento *in silico* usando docking molecular, foi recentemente descoberto que o CBD pode se ligar a dois locais distintos (*pocket 1* e *pocket 3*) ao sítio ortostérico [13]. Porém, não há conhecimento sobre modificações energéticas e estruturais que podem causar a ocupação de mais de um sítio de ligação no receptor CB1 pelo ligante CBD usando simulações de dinâmica molecular.

Assim neste capítulo, foram utilizadas duas etapas para o estudo da interação CB1-CBD, diferenciando-se em que na primeira o objetivo foi determinar o melhor sítio de ligação do CBD no receptor, e na segunda, o objetivo foi determinar se aumentando o número de moléculas de CBD interagindo com CB1, existia sinergismo entre os ligantes. Cada etapa contém suas respectivas análises de *docking* e simulações por dinâmica molecular:

2.2.1 Primeira etapa

No *docking*, a proteína receptora CB1 é considerada rígida e os graus de liberdade do ligante CBD são explorados dentro de cada uma das *grids* (caixas cúbicas) localizadas nos sítios de ligação previamente definidos (sítios alostéricos e ortostérico). O centro de cada *grid* foi definido pelas seguintes coordenadas xyz: (1) *pocket* OS (centro- $x = 20,97\text{\AA}$; centro- $y = -2,08\text{\AA}$ e centro- $z = -8,59\text{\AA}$), *pocket* AS1 (centro- $x = 19,53\text{\AA}$; center- $y = 1,83\text{\AA}$ and center- $z = 17,74\text{\AA}$) e *pocket* AS3 (center- $x = 29,61\text{\AA}$; center- $y = 13,87\text{\AA}$ e center- $z = -16,38\text{\AA}$). As nove melhores posições do ligante são armazenadas pelo programa de *docking* empregado (AutoDock Vina) e a energia de afinidade calculada pela função de pontuação foi usada para escolher a melhor pose de CBD nos sítios analisados [26, 27].

Foram realizadas três *dockings* direcionados: (1) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (2) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) localizado na região transmembranar que inclui os resíduos conservados Trp241, Phe237 e Hys154; (3) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3) que inclui resíduos de aminoácidos como Cys98 e Cys107. As posições dos sítios alostéricos foram baseadas no estudo do mapeamento *in silico* dos sítios de ligação alostérica no receptor CB1 [13].

2.2.2 Segunda etapa

Três sistemas proteína-ligante foram configurados para as simulações por DM, o complexo 1 (CB1-CBD-AS1): uma molécula CBD ligada no sítio alostérico 1 (AS1) (tomada da ETAPA1), complexo 2 (CB1-CBD-OS-AS1): dois CBD ligados a CB1, um no sítio ortostérico (OS) e outro no sítio AS1; complexo 3 (CB1-CBD-OS-AS3): dois CBD ligados a CB1, um no sítio OS e outro no sítio alostérico 3 (AS3); e complexo 4 (CB1-CBD-OS-AS1-AS3): três CBD ligados a CB1, um CBD ocupando cada sítio (OS, AS1 e AS3).

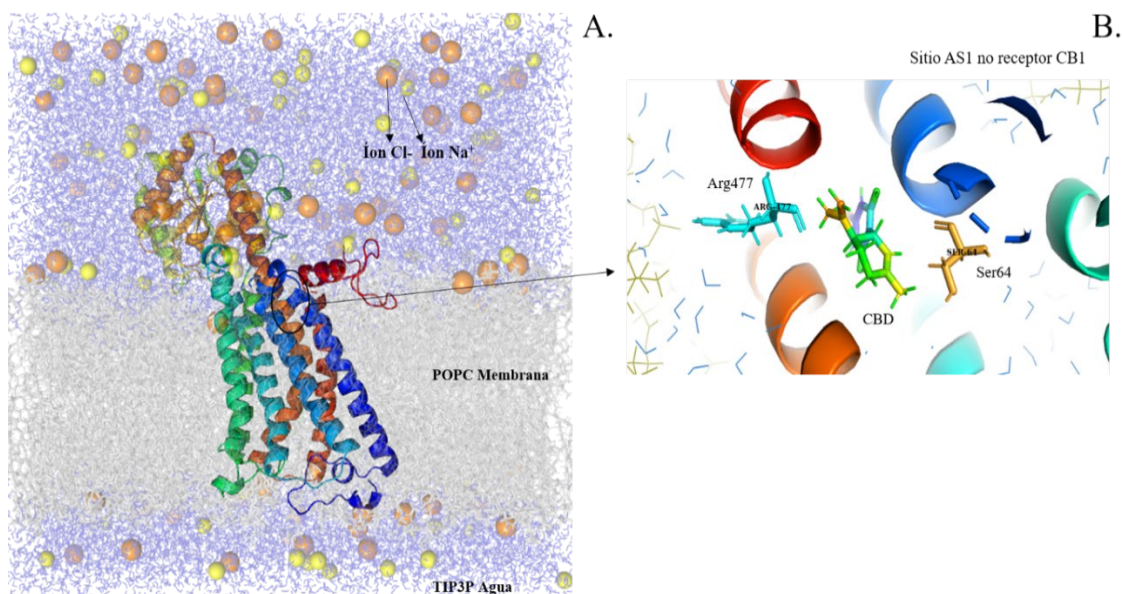
2.3 Simulações por dinâmica molecular em caixa de água

As coordenadas dos complexos gerados da primeira etapa no *docking* molecular foram usadas para rodar as simulações em caixa de água, com o objetivo de determinar o papel do ambiente de membrana POPC nas interações do sistema canabinoide em estudo. Para a solvatação de cada sistema foi realizada utilizando o modelo de água TIP3P, considerando que a distância entre o final da proteína e o limite da caixa de simulação era $> 15 \text{ \AA}$ em cada direção. Para manter a neutralidade da carga total das moléculas do sistema, 187 moléculas de cloreto de sódio foram usadas como composto iônico que em contato com a água ficam em forma de íons devido à força eletrostática exercida pelas moléculas de H_2O . Após 1000 etapas de minimização, a dinâmica foi executada por 100 ns.

2.4 Simulações por dinâmica molecular em bicamada lipídica de POPC

Para as simulações de dinâmica molecular, foram selecionadas as conformações de menor energia de cada *docking* (primeira e segunda etapa). Foram realizadas as simulações dentro de cada etapa e como controle foi feita uma simulação da proteína individual sem o ligante. Utilizamos o pacote de simulação de dinâmica molecular NAMD 2.9, usando o campo de força CHARMM36 [28], que pode ser usado para proteínas, lipídios e o modelo de água TIP3P.

Figura 3. **A.** Perspectiva completa das estruturas de partida para simulações de MD em membrana POPC. CB1 mostrado em cartoon na cor arco-íris. Camada lipídica superior e inferior mostrada em cinza. Modelo de água TIP3P mostrado em azul e íons mostrados em forma de bolas, cor laranja para Cl⁻ e cor amarela para Na⁺. **B.** Ligante CBD mostrado em forma de stick de cor verde em interação com os resíduos Arg477 e Ser64 no sítio alostérico 1 da proteína CB1.



Fonte: O próprio autor.

A inserção e orientação do receptor CB1 na bicamada lipídica 1-palmitoil-2-oleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina (POPC) foi guiada pelos resíduos de aminoácidos P113, F180, R186, G254, D272, F368 e K376 da região intramembranar da proteína e que estão mais próximas da região extramembranar [13] (Figura 3).

O servidor web PPM para posicionamento de proteínas em membranas foi utilizado na validação dos dados. Este servidor calcula as posições rotacionais e translacionais das proteínas transmembranares e periféricas em membrana usando sua estrutura 3D (arquivo de coordenadas do PDB) como entrada [29].

O tamanho da bicamada foi determinado pela proteína receptora, que foi de ≈ 30 Å entre a proteína e o limite da membrana na direção dos eixos X e Y . O tamanho da membrana foi de 130 Å no plano XY , contendo 205 moléculas de lipídeo por monocamada (Figura 3). A

bicamada foi criada usando o programa VMD (Visual Molecular Dynamics) com a ferramenta *Membrane Builder* [30].

A solvatação de todos os sistemas foi realizada usando água cujo modelo utilizado foi o TIP3P, considerando que a distância entre o final da proteína e o limite da caixa de simulação era $> 15 \text{ \AA}$ em cada direção. Um total de 31.863 moléculas de água foram adicionadas. Para manter a neutralidade da carga total do sistema, as moléculas foram usadas como íons 187 moléculas de cloreto de sódio (Figura 3). A inserção dos íons foi realizada com a ferramenta *Autoionize* do VMD.

A simulação de cada complexo na bicamada lipídica foi dividida em quatro etapas, conforme descrito abaixo:

a. Movimentação das caudas lipídicas: uma simulação em que tudo (água, íons, proteínas, ligantes, grupos da cabeça lipídica), exceto as caudas lipídicas, é fixado. Dessa maneira, induzimos o distúrbio apropriado de uma bicamada do tipo fluido. Nesta parte, o NAMD executa 1000 etapas de minimização, reinicia as velocidades e, em seguida, executa a dinâmica por 0,5 ns (usando um passo de tempo de 2 fs).

b. Minimização e equilíbrio com restrição de proteína e ligantes: nossa segunda execução com NAMD foi uma “minimização”, que simplesmente guia o sistema para o mínimo de energia local mais próximo no espaço de configuração. A minimização foi seguida por um equilíbrio com a proteína e o ligante restringidos, de modo a permitir que o ambiente relaxasse primeiro. A execução dinâmica por 0,5 ns (usando uma etapa de 2 fs).

c. Equilíbrio sem restrições: após minimização e equilíbrio com a restrição de proteínas e ligantes, esperamos ter um sistema no qual os lipídios estejam bem compactados em torno do complexo, enquanto a água não entrou nas regiões proibidas. Logo, passamos a liberar as restrições harmônicas após equilibrar todo o sistema e submetemos a simulação por 10 ns.

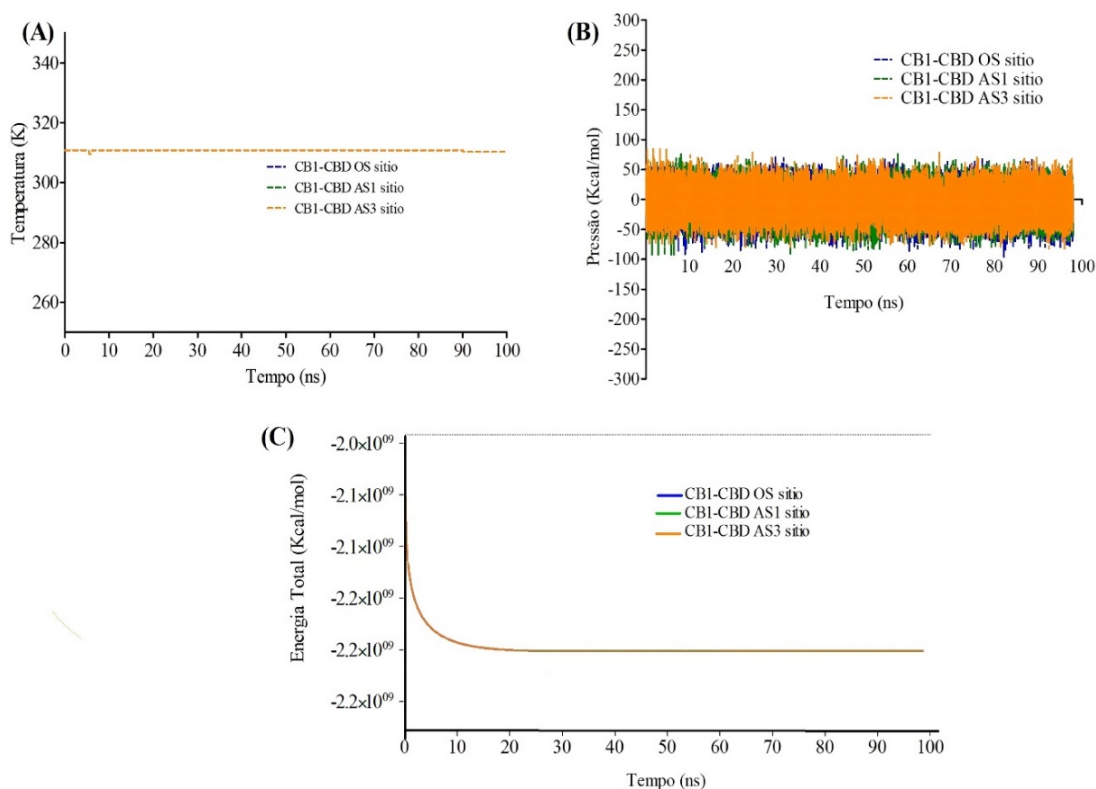
d. Execução da produção: Após equilibrar o sistema, a simulação foi submetida durante 100 ns [31].

As simulações em POPC e caixa de água foram realizadas a 310 K e pressão de 1 atm mantendo constante o número de partículas (N), pressão (P) e temperatura (T). Para as

interações não ligadas, o ponto de corte (cutoff) foi ajustado para 12 Å e, para o longo alcance, foi usado o método Mesh Ewald Particle (PME) [31].

Realizamos simulação por dinâmica molecular do ligante livre (CBD) em água. As condições de simulação do CBD em água são as mesmas do ligante ligado à proteína.

Figura 4. Temperatura (A), pressão (B) e energia total (C) do complexo receptor canabinoide tipo 1 CB1-CBD ligado ao sítio ortostérico (OS), sítio alostérico 1 (AS1) e sítio alostérico 3 (AS3) após simulação de dinâmica molecular em POPC na etapa de produção durante 100ns.



Fonte: O próprio autor.

2.5 Análise de dados

Após as simulações, os resultados foram analisados inicialmente com o plugin *NAMD Plot* incluído no software VMD. O plugin gerou gráficos temporais com as informações da energia total, temperatura, pressão (Figura 4). Os valores de energia elétrica e de van der Waals entre o ligante e sua vizinhança nos estados livre e complexo foram calculados usando o plugin NAMD Energy (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da média das energias Eletrostáticas e Van der Waals (Kcal/mol) entre o ligante (l) e sua vizinhança (s) no estado ligado e não ligado.

		Estado Y	Energia Eletrostática	Energia Van der Waals
POPC Membrana	OS	$\langle V_{l-s} \rangle_{ligado}$	-7.92	-47.31
	AS1	$\langle V_{l-s} \rangle_{ligado}$	-27.14	-39.99
	AS3	$\langle V_{l-s} \rangle_{ligado}$	-18.73	-42.25
Caixa de Água	OS	$\langle V_{l-s} \rangle_{ligado}$	-2.04	-15.82
	AS1	$\langle V_{l-s} \rangle_{ligado}$	8.88	-6.13
	AS3	$\langle V_{l-s} \rangle_{ligado}$	1.18	9.55
		$\langle V_{l-s} \rangle_{n\tilde{a}o\ ligado}$	-15.81	19.05

Fonte: O próprio autor.

O cálculo da energia livre de ligação foi realizado pelo método de energia de interação linear, este método fornece estimativas das energias de ligação e livres de hidratação com baixo esforço computacional. A expressão da energia livre de ligação ligante-proteína é dada por:

$$\Delta G_{Bind} = \beta(\langle V_{l-s}^{el} \rangle_{ligado} - \langle V_{l-s}^{el} \rangle_{n\tilde{a}o\ ligado}) + \alpha(\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_{ligado} - \langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_{n\tilde{a}o\ ligado}) + \gamma \quad (21.1)$$

onde $\langle V_{l-s}^{el} \rangle_Y$ e $\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_Y$ são os valores médios das interações eletrostáticas e van der Waals entre o ligante (l) e seu entorno (s) no estado do ligante Y , que pode ser livre em solução ou ligado à proteína. Os parâmetros β e α são, respectivamente, fatores de escala das energias de Van der Waals e eletrostática e γ é um termo constante. Eles são dependentes da natureza química do ligante; no caso do CBD, é um composto neutro com dois ou mais grupos hidroxila, assim os valores assignados para os parâmetros são $\beta = 0.33$, $\alpha = 0.18$ e $\gamma = 0$ [32].

As propriedades macroscópicas obtidas por dinâmica molecular são extraídas do sistema no estado de equilíbrio termodinâmico. O conjunto de trajetórias em equilíbrio ocorre quando há convergência da energia total e consequente diminuição na variação estrutural.

Após confirmar a estabilização do sistema (Figura 4), as alterações sofridas pela estrutura da macromolécula (CB1) e do ligante (CBD) durante a trajetória dinâmica das simulações foram analisadas por RMSD (desvio quadrático médio). Foram gerados gráficos da flutuação quadrática média (RMSF), permitindo determinar a variação da distância por cada resíduo de aminoácido do esqueleto da proteína.

Em seguida, as interações de cada sistema foram analisadas após o docking molecular e simulações por DM. Foram feitos gráficos das distâncias entre os principais resíduos de cada sítio de interação do receptor. Esses gráficos foram feitos com o objetivo de capturar a variação dessas distâncias ao longo do tempo. Além disso, a contribuição da energia de interação por resíduo de aminoácido e a energia livre de ligação total para todos os complexos foram calculadas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

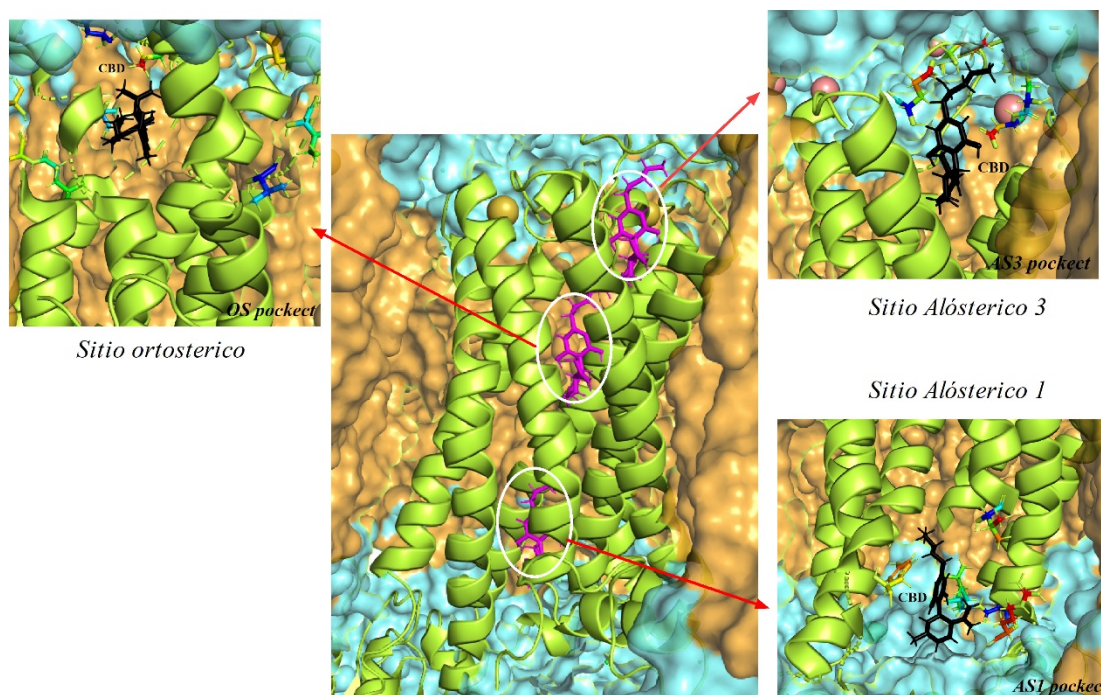
3.1 Primeira Etapa

Nos últimos anos, diferentes moléculas foram propostas para atuarem como moduladores alostéricos positivos (PAMs) ou negativos (NAMs) para CB1 [33]. A presença de sítios alostéricos diferentes do sítio ortostérico em que agonistas e antagonistas se ligam foi proposta. Além disso, foram feitas tentativas para identificar estruturalmente a localização dos sítios de ligação de PAMs e NAMs no CB1 [33]. Assim, neste estudo usando técnicas de modelagem e dinâmica molecular foi avaliada a interação entre o CBD e diferentes sítios no receptor CB1. Além disso, foi estimada a energia livre de ligação e o comportamento dinâmico da interação do CBD em dois sítios alóstericos em um mesmo estudo, assim como o número de moléculas de um mesmo ligante podem influenciar estas interações.

A maioria dos estudos usando o receptor CB1, emprega a proteína incompleta, sem a região extramembranar [34, 35, 36, 37], o que pode diminuir o custo computacional, mas desconsidera o efeito que essa parte externa relevante do receptor CB1 pode ter nas interações com o ligante CBD. Apesar que a região fora da membrana em CB1 não participe da interação com ligantes alóstericos como CBD, está envolvida na criação de complexos de sinalização envolvidos no sinal extracelular e a estabilidade estrutural desta região pode influenciar a resposta intracelular causada pela interação CB1-CBD [38]. Por isso, neste estudo as simulações por DM dos complexos CB1-CBD foram realizadas usando a proteína completa, tanto a região intermembranar quanto a extramembranar, o que aumenta a similaridade das interações CB1-ligante no ambiente fisiológico.

O *docking* molecular realizado pela Autodock Vina gerou um total de 9 modelos com modo de ligação previsto entre o CB1 e o ligante de canabidiol nos três sítios escolhidos para o estudo. Os melhores modelos para cada docking foram selecionados de acordo com os resultados da função de pontuação de afinidade (kcal/mol) (Figura 5). Para identificar o comportamento dinâmico da proteína quando complexada com o CBD nos sítios específicos, a dinâmica molecular foi realizada e os complexos atingiram um mínimo de energia estável na fase de produção (Figura 4C).

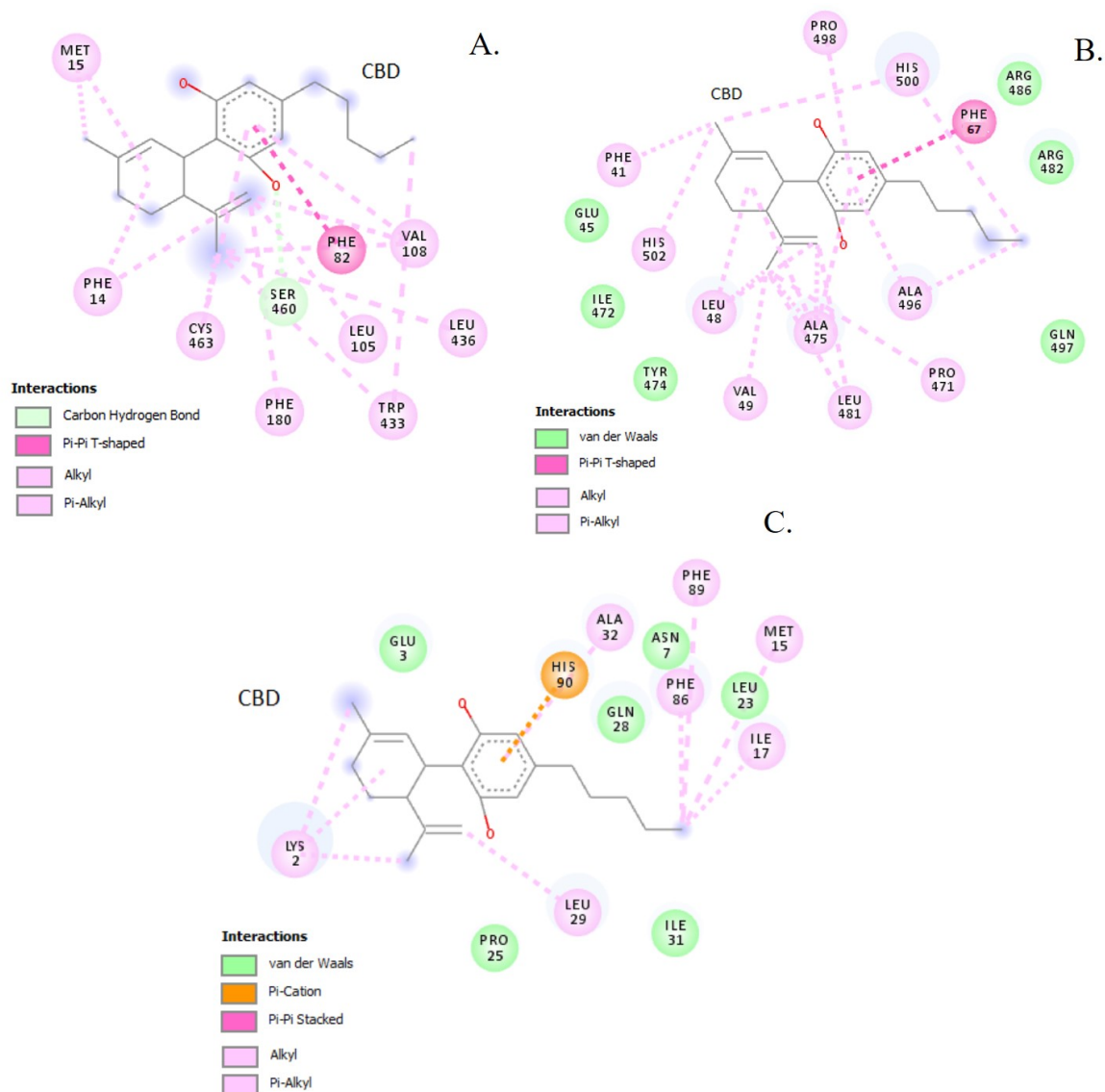
Figura 5. Modo de ligação estrutural entre o receptor canabinoide tipo 1 (CB1) e o canabidiol no sítio ortostérico, sítio alostérico 1 e sítio alostérico 3. A forma dos bastões representa o ligante do Canabidiol (magenta e preto), a estrutura verde em cartoon representa a proteína CB1, a superfície azul é a caixa de água e a superfície marrom é a membrana POPC.



Fonte: O próprio autor.

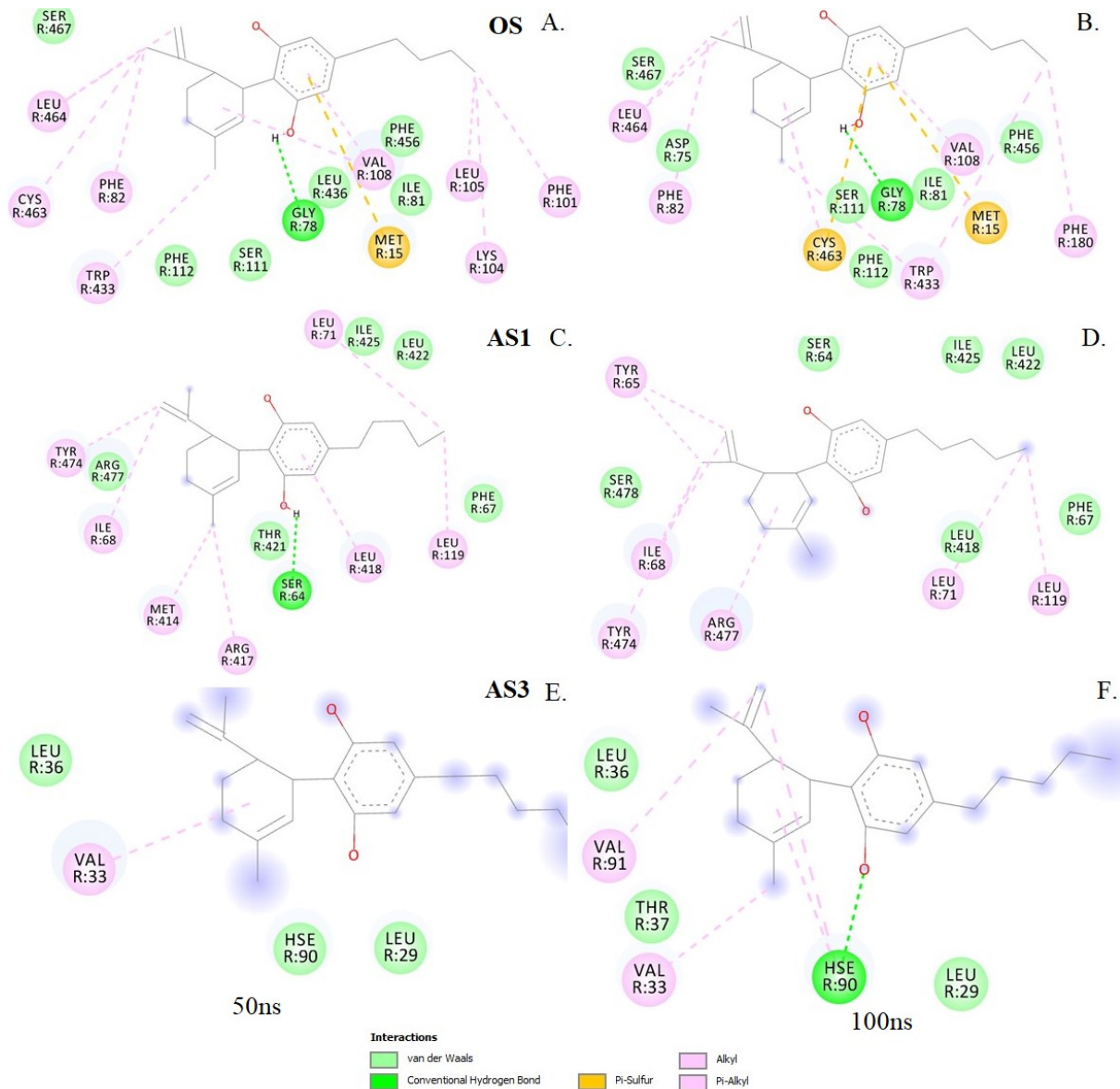
Além disso, a temperatura do sistema permaneceu estável durante toda a fase de produção (Figura 4A). Esses resultados demonstram que o protocolo de simulação dinâmica molecular utilizado foi adequado e encontrou a conformação de energia mínima global nos complexos estudados. Assim, 100ns de simulação foi o tempo correto para investigar a estabilidade dos CBDs ancorados nos locais estudados e a acomodação da cadeia proteica ao redor do ligante, devido a que foi observada estabilidade energética durante a simulação e não houve expulsão do ligante dos locais de interação.

Figura 6. Perfil farmacofórico do complexo CBD-CB1 após *docking* molecular. (A) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (B) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (C) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). A cor das bolas e linhas indica o tipo de interação entre o CBD e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do CB1.



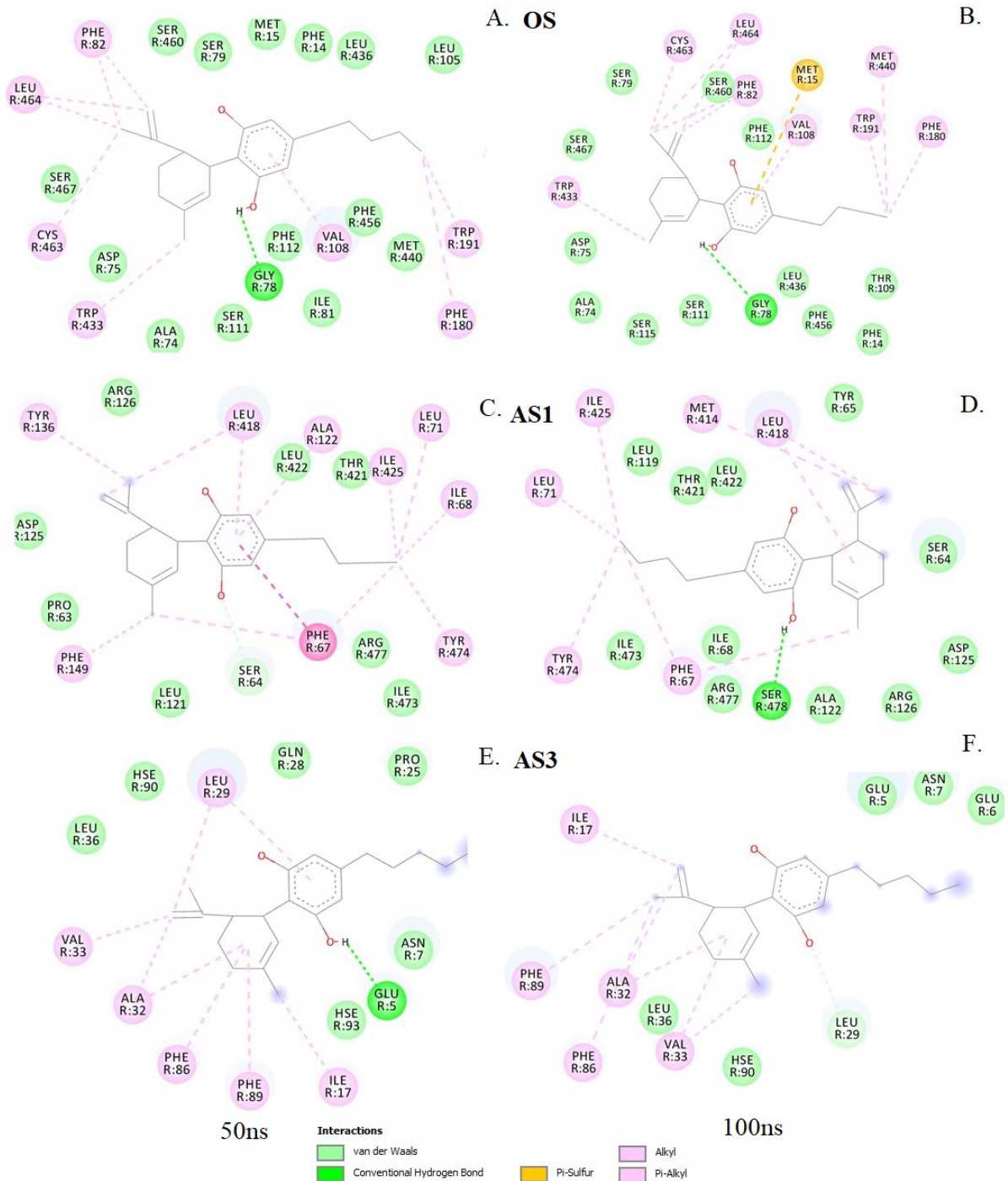
Fonte: O próprio autor.

Figura 7. Perfil farmacofórico do complexo CBD-CB1 aos 50 ns e a os 100ns de simulação por dinâmica molecular em membrana POPC (A e B) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). A cor das bolas e linhas ponteadas indica o tipo de interação entre o CBD e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do CB1.



Fonte: O próprio autor.

Figura 8. Perfil farmacofórico do complexo CBD-CB1 aos 50 ns e a os 100ns de simulação por dinâmica molecular em caixa de água (A e B) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). A cor das bolas e linhas ponteadas indica o tipo de interação entre o CBD e as cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos do CB1.



Fonte: O próprio autor.

A interação do CBD com o CB1 foi analisada após *docking* e dinâmica molecular (Figuras 5-7); a ligação do CBD no sítio ortostérico do CB1 mostrou interações com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos como Phe82, Leu464, Val108 (Figura 6A e Figura 7A-B).

A interação do canabidiol no local alostérico 1 do CB1 mostrou a participação da região transmembranar, como foram os resíduos hidrofóbicos e não polares Ile68, Leu418, Tyr474, resíduo polar não carregado Ser64 e o resíduo polar com carga positiva Arg477 (Figura 7C-D).

A ligação do CBD no sítio alostérico 3 do CB1 mostrou a participação de resíduos com cadeia lateral apolar como Val33, Phe89 e Phe86 (Figura 6C); e foram observados resíduos com carga positiva e cadeia lateral polar como HSE90 (Figura 6C e Figura 7E-F).

A partir do perfil farmacofórico feito para o CBD em cada sítio de ligação no CB1, foram identificadas as regiões do CBD ligadas ao receptor, bem como os resíduos do receptor envolvidos em cada ligação (Figura 6-8). Várias ligações como Van der Waals, ligação de hidrogênio-carbono, Pi-Pi em forma de T, Pi-Pi *Stacked*, *Cation-PI*, Pi-alquil e alquil foram encontradas nas análises farmacofóricas (Figura 6-8).

Os perfis farmacofóricos mostraram que, embora na vizinhança do ligante CBD haja aminoácidos com características hidrofílicas, quando as interações são medidas, o que leva em consideração o ângulo e a distância dos aminoácidos, aproximadamente 80% das interações são hidrofóbicas incluído anéis aromáticos em todos os sítios analisados.

Além disso, quando a análise farmacofórica foi realizada no meio e no final da simulação da dinâmica molecular, observa-se que na caixa de água, embora o número de interações de Van der Waals aumente, o ligante CBD é estabilizado principalmente pela presença de interações tipo hidrofóbicas alquil e pi-alquil com a cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos (Figura 8). Estes resultados corroboram que na interface de complexos proteína-ligante interações aromáticas são chaves na estabilidade e afinidade molecular [39]; e no sistema CB1-CBD, as interações não-covalentes mais importantes na interação entre os grupos químicos do CBD e os resíduos de aminoácido do CB1 são alquil, pi-alquil e pi-pi em forma de T. Como tem sido citado na literatura [39] e corroborado neste estudo, estas interações são responsáveis pela afinidade do ligante à macromolécula alvo, reduzindo sua dissociação do local de interação principalmente no sítio AS1.

A presença de resíduos hidrofóbicos nos sítios alostéricos (Figura 6-8) pode ser explicada a que embora o sítio seja o local de ligação mais exposto na proteína, é uma região de interação com a membrana POPC. Além disso, CB1 é uma proteína de membrana integral tipo GPCR com uma porção considerável da proteína incorporada na membrana [40]. O *pocket* AS1 é considerado sítio de interação ao colesterol, ajudando a controlar funções como ligação, sinalização e tráfico de moléculas ligantes. E estão presentes resíduos de aminoácidos como Phe, Lys, Val, conforme relatado neste estudo e outros [13,41].

Tabela 3. Energias livre de ligação ($kcal/mol$) calculadas mediante simulações por dinâmica molecular para a interação entre CB1 e o CBD nos sítios analisados

SÍTIO	$\Delta G_{\text{ligação}(DM)}(Kcal/mol)$	
	POPC	ÁGUA
OS	-9.3 ± 0.05	-1.7 ± 0.06
AS1	-14.4 ± 2.03	3.6 ± 0.21
AS3	-11.9 ± 1.08	3.8 ± 0.18

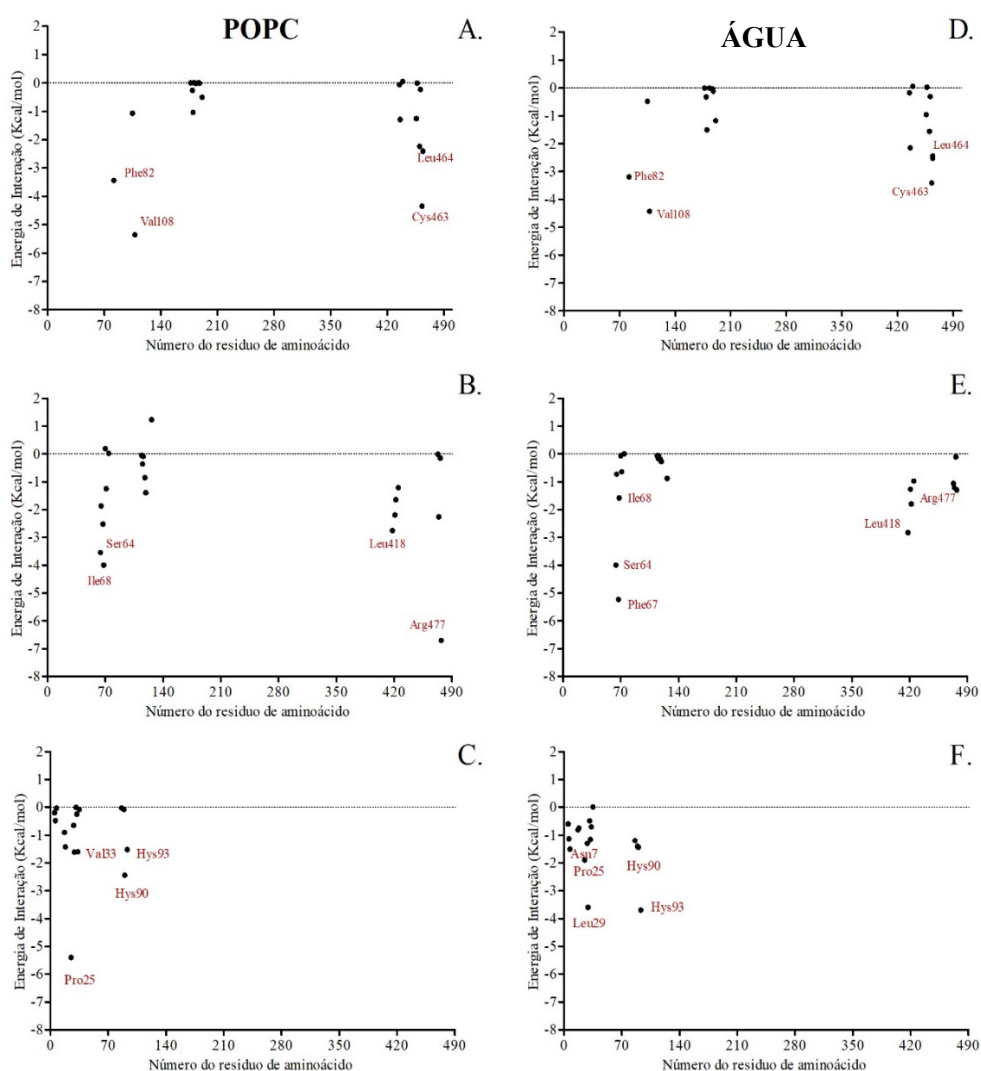
Fonte: O próprio autor.

A partir de tentativas de incluir a flexibilidade da proteína durante o *docking* molecular clássico, o desenvolvimento de tecnologias de hardware e novas técnicas computacionais de DM tem permitido cada vez mais simular movimentos conformacionais [42]. Assim, a melhor posição do CBD nos diferentes locais analisados foi verificada com os valores de sua função de pontuação de afinidade gerada no *docking* molecular. Esses complexos montados a partir do *docking* foram usados para analisar a interação receptor-ligante por meio da dinâmica molecular, mas as energias geradas pela função de pontuação do Autodock Vina foram desconsideradas.

A energia de afinidade gerada no *docking* não pode ser comparada com a energia livre de ligação ($\Delta G_{\text{ligação}(DM)}$) calculada após as simulações de dinâmica em POPC ou água (Tabela 3), pois os programas de *docking* subestimam a afinidade de ligação em complexos com altas afinidades experimentais e vice-versa, tais como demonstrado em outros estudos com CB1 e CBD [43,44]. Além disso, os valores de afinidade obtidos por dinâmica são mais precisos porque vêm do cálculo dos movimentos dos átomos no sistema CB1-CBD ao longo do tempo pela integração das equações de movimento de Newton (mecânica clássica) [42,45].

O sítio alostérico 1 (AS1) foi encontrado como o melhor sítio para ligação do CBD no CB1 a partir do valor de $\Delta G_{bind(DM)}$ igual a -14,4 kcal/mol, seguido pelo sítio alostérico 3 (-11,9 kcal/mol) e o último foi o sítio ortostérico (-9,3 kcal/mol) nas simulações de POPC (Tabela 3). No caso de simulações em caixas de água, as energias $\Delta G_{bind(DM)}$ apresentaram valores positivos para os sítios alostéricos (AS1 =3,6 kcal/mol e AS3 =3,8 kcal/mol), e um valor negativo foi obtido para o sítio ortostérico (-1,73 kcal/mol) (Tabela 3).

Figura 9. Energia de interação por resíduo de aminoácido do CB1-ligante CBD, calculada a partir das simulações por dinâmica molecular dos complexos em membrana POPC e caixa de água. (A e D) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (B e E) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). Resíduos de aminoácidos com alta contribuição ao valor da energia (Contribuição ≤ -1.0 Kcal/mol) foram identificados.



Fonte: O próprio autor.

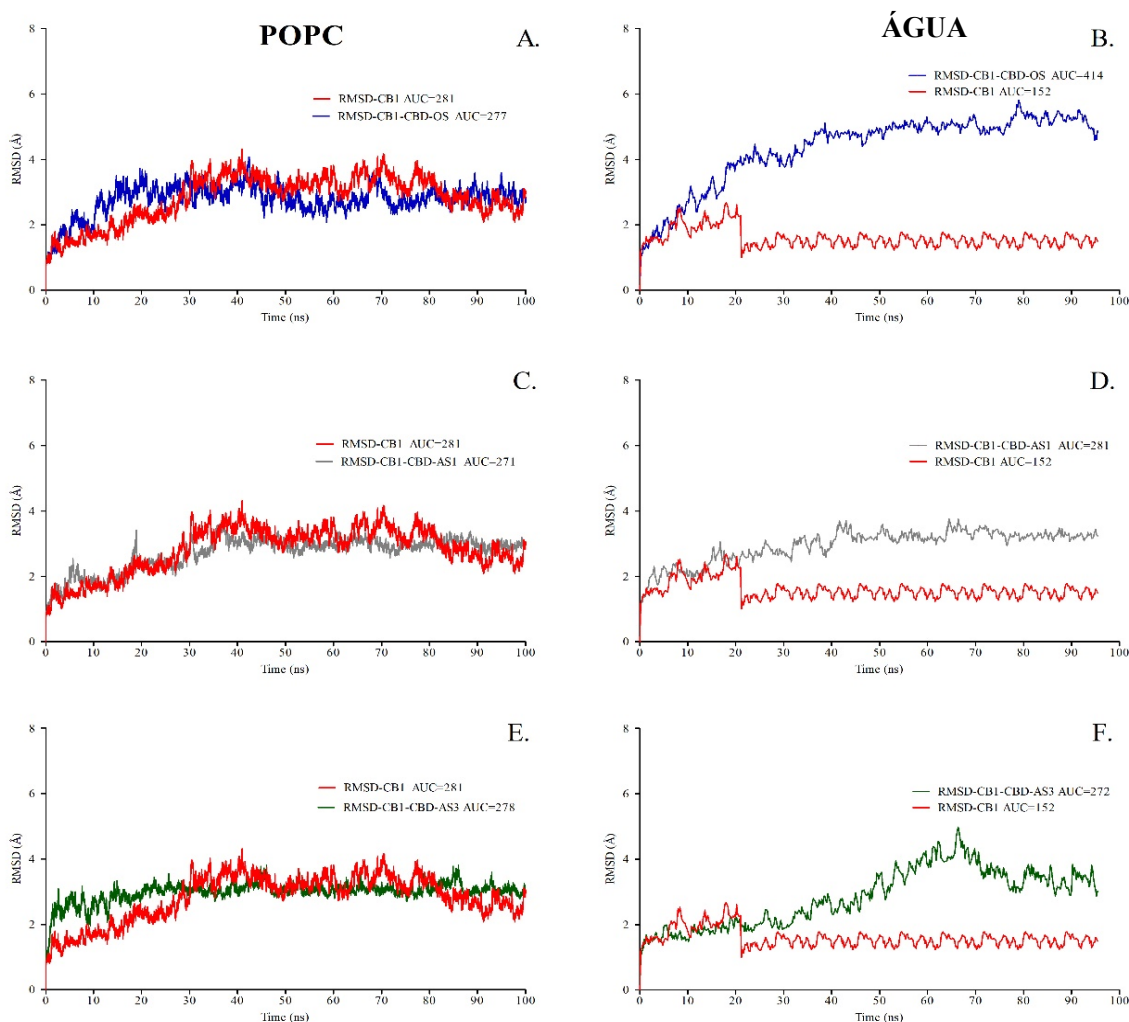
Além da energia livre de ligação calculada entre o CBD e o receptor, a decomposição de energia de interação de cada resíduo de aminoácido foi realizada nas proximidades dos sítios estudados em CB1 (distância menor que 4Å), objetivando identificar os resíduos que são importantes para a interação dos complexos CB1-ligante em cada ambiente (POPC e água) (Figura 9).

Os resíduos com maior contribuição energética foram identificados dentro da figura (Figura 8); os resíduos Val108, Phe82, Leu464 e Cys463 apresentaram a maior contribuição energética no sítio ortostérico, tanto nas simulações de membrana POPC como em caixa de água (Figura 9A e 9D). Quando CBD foi ligado no sítio AS1, os resíduos Arg477, Ile68, Ser64 e Leu418 do CB1 apresentaram os menores valores de energia (maior contribuição energética) na simulação de POPC e em caixa de água (Figura 9B). O resíduo Phe67 foi adicionado como outro resíduo com menor energia na simulação em caixa de água (Figura 9E). No sítio AS3, os resíduos Pro25, Hse90, Val33 e Hse93 apresentaram os menores valores de energia na simulação de POPC (Figura 9C). O resíduo Leu29 foi adicionado como outro resíduo com menor energia na simulação da caixa de água do complexo CB1-CBD no sítio AS3 (Figura 9F). Estes resíduos de aminoácidos como Ile, Phe, Val e Ser tem sido reportado também em outros estudos de interação entre CB1 e outros ligantes [34, 46, 47, 48].

Nos sítios analisados (OS, AS1 e AS3) a contribuição energética dos resíduos diminuiu nas simulações em caixa de água, o que mostra que o ambiente da membrana é importante para estabilizar as interações entre o ligante e a proteína CB1.

O CBD parece ter afinidade pelos sítios alostérico e ortostérico no receptor CB1 [49]. Mas baseados nos resultados do nosso estudo de dinâmica molecular e a comparação feita do complexo CB1-CBD nos ambientes membrana e água, podemos afirmar que o CBD apresenta alta afinidade pelo sítio alostérico 1 (AS1) no receptor CB1. Este sítio permite estabilidade estrutural ao CBD formando ligações principalmente hidrofóbicas o que pode mediar a característica de modulador alósterico negativo e os efeitos antagônicos do CBD no receptor de canabinoides CB1 em concentrações abaixo da relatada pelos valores de afinidade (K_i) no sítio ortostérico, sugerindo que pode existir um sítio de ligação de CBD de alta afinidade distinto do sítio ortostérico [5, 12, 50, 51] e um candidato potencial é o sítio alostérico 1 (AS1).

Figura 10. RMSD do receptor de Canabinoides tipo 1 (CB1) obtidos a partir das das simulações por dinâmica molecular dos complexos em membrana POPC e caixa de água. (A e B) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3).



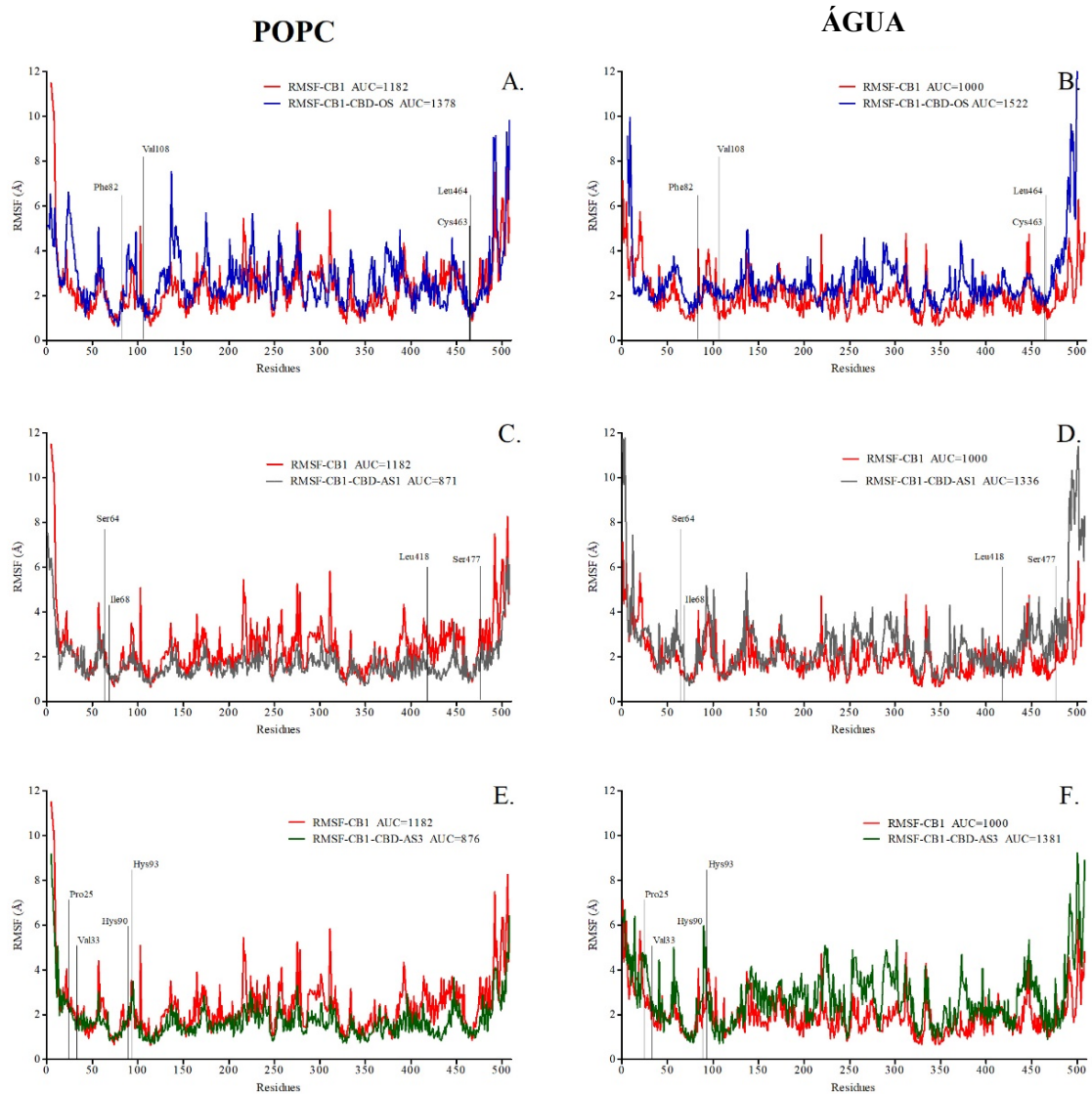
Fonte: O próprio autor.

Para identificar o comportamento dinâmico do receptor CB1, os valores de RMSD foram calculados para o CB1 individual (não complexado ao ligante) e CB1 interagindo com o CBD nos três sítios separadamente (Figura 10). O cálculo do RMSD é realizado comparando as coordenadas dos átomos da cadeia principal (CBD) ou carbonos alfas (CB1), durante a trajetória com relação à coordenada inicial.

Quando o CBD foi ligado ao receptor no sítio ortostérico em POPC, a proteína foi mais flexível em comparação com as ligações nos outros sítios (Figura 10A, 10C, 10E). Além disso,

os valores de RMSD de CB1-CBD ligado no OS apresentaram os valores mais próximos ao RMSD da proteína individual no ambiente POPC (Figura 10A). Comparando os valores de área sob a curva (AUC) do RMSD, os valores desse parâmetro foram mais altos nas simulações em caixa de água do que os obtidos no POPC (Figura 10).

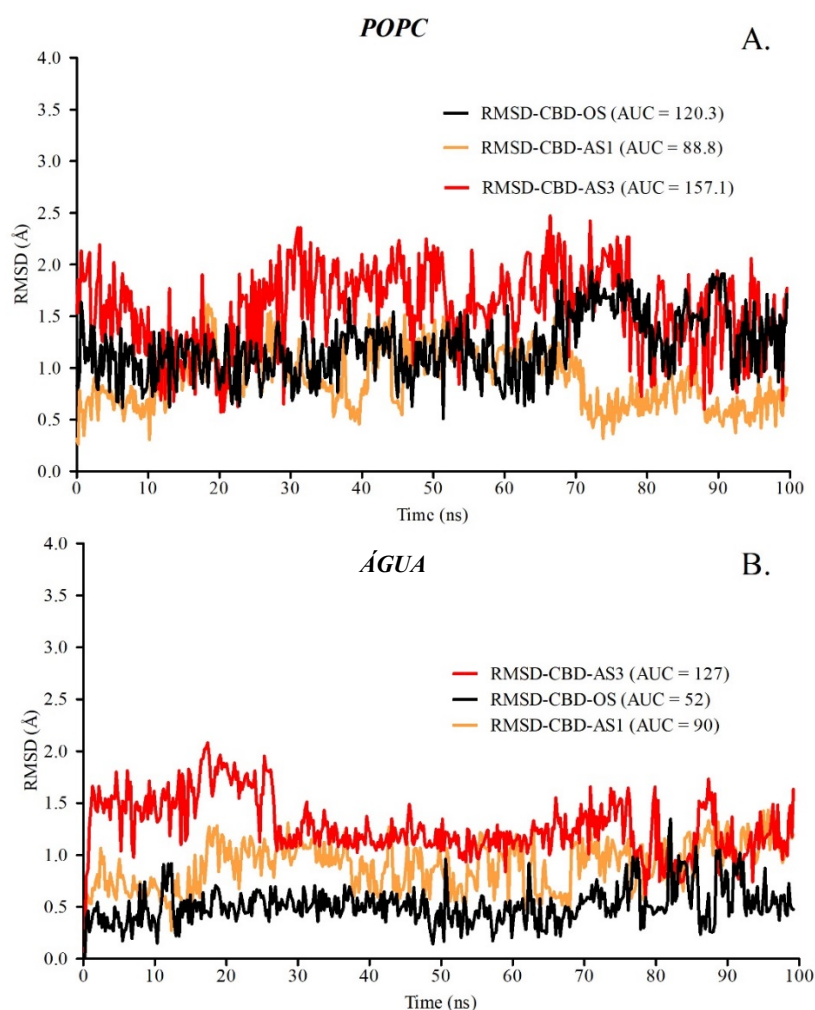
Figura 11. RMSF do receptor de Canabinoides tipo 1 (CB1) obtidos a partir das simulações por dinâmica molecular dos complexos em membrana POPC e caixa de água. (A e B) CBD ligado ao sítio ortostérico (OS); (C e D) CBD ligado ao sítio alostérico 1 (AS1) e (E e F) CBD ligado ao sítio alostérico 3 (AS3). Cada curva de RMSF foi comparada com o RMSF do receptor CB1 sem ligante (linha vermelha).



Fonte: O próprio autor.

As flutuações dos resíduos individualmente (RMSF) foram obtidas (Figura 11). Todos os RMSFs foram comparados com os valores de CB1 individual na membrana e água. A menor flutuação dos resíduos CB1 foi observada quando o CBD foi ligado no sítio AS1 nas simulações em POPC (Figura 11C). Os maiores valores de RMSF foram encontrados para o sistema CB1-CBD no sítio ortostérico (Figura 11A e 11B). Esta análise mostrou que o aumento nos movimentos dos resíduos reduz as interações favoráveis entre o ligante e o receptor, o que é corroborado com os valores de energia livre de ligação.

Figura 12. RMSD do Cannabidiol (CBD) obtidos a partir das simulações por dinâmica molecular em membrana POPC (A) e caixa de água (B), em interação com o receptor CB1 no sítio ortostérico (OS), alostérico 1 (AS1) e alostérico 3 (AS3).



Fonte: O próprio autor.

O RMSD para o CBD foi analisado, constatando que os valores mais baixos deste parâmetro foram determinados com o CBD ligado no sítio AS1 (0,238 - 1,485Å) e os valores mais altos foram para o CBD ligado no site AS3 (0,534 - 2,432Å) no ambiente POPC (Figura 11A). Os valores de RMSD nas simulações de caixas de água foram maiores comparando a AUC das curvas RMSD em relação ao ambiente POPC (Figura 12B).

Tanto para o CBD como CB1, os RMSDs mais baixos de suas conformações ligadas foram obtidos nas simulações moleculares no sítio AS1. Baseado nos valores de AUC, u=indica que as simulações usando DM são a melhor escolha quando pretende-se estudar um complexo ligante-proteína, já que nelas são levadas em conta a flexibilidade de proteínas e ligantes durante sua interação [52, 53].

O cálculo do RMSD como o RMSF confirma os resultados da interação CBD-CB1 neste estudo. Em outros trabalhos estruturais que analisam a ligação de moduladores alostéricos ao receptor CB1 [35, 37], não consideram o cálculo do RMSD dentro da pesquisa, o que pode ser um erro devido a que estes parâmetros indicam se a flexibilidade da proteína é significativa ou se existe algum desvio da estrutura nativa no tempo de simulação por DM. Assim, foi corroborado que as interações formadas no sítio alostérico 1 diminuem a flexibilidade do ligante, favorecendo a estabilidade do CBD naquele sítio. Estes resultados confirmam que a interação entre CB1 e CBD associado no sítio AS1 fornece estabilidade estrutural tanto ao receptor como ao ligante, e esta estabilidade pode estar explicando a maior afinidade do ligante determinada pela energia livre de ligação. Além disso, a estrutura nativa do receptor CB1 foi mantida durante os 100 ns da dinâmica molecular.

3.2 Segunda etapa

O receptor de canabinóides CB1 é abundante no sistema nervoso central e regula a transmissão neuronal e outros processos fisiológicos importantes, incluindo aqueles que levam à dor, inflamação, memória e comportamento alimentar. O CB1 é ativado pelos ligantes endógenos, araquidonoil etanolamina e 2-araquidonoil glicerol, por vários ligantes sintéticos (por exemplo, CP55940) e por Δ^9 -tetra-hidrocanabidiol, o componente psicoativo da *C. sativa*. Esses ligantes do CB1 são ortostéricos e fazem tradução de sinais para o interior da célula quando se ligam ao CB1. Recentemente, foram descobertos moduladores alostéricos para CB1 que interagem em locais topograficamente distintos e podem impactar de maneira não

competitiva a potência e a eficácia dos compostos ortostéricos. Eles oferecem um potencial interessante para a análises mecanicista e para o desenvolvimento de terapias [54].

Tabela 4. Energia livre de ligação para o ligante CBD nos sistemas analisados no receptor CB1. Complexo 1 (**CB1-CBD-AS1**): uma molécula CBD ligada no sítio alostérico 1 (AS1), complexo 2 (**CB1-CBD-OS-AS1**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio ortostérico (OS) e outro no sítio AS1; complexo 3 (**CB1-CBD-OS-AS3**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio OS e outro no sítio alostérico 4 (AS3); e complexo 4 (**CB1-CBD-OS-AS1-AS3**): três CBD ligados a CB1, um CBD ocupando cada sítio (OS, AS1 e AS3)

Sítios	ΔG (Kcal/mol): Dinâmica Molecular
CB1-CBD-AS1	-14.37
CB1-CBD-OS-AS1	OS:-9.54 AS1:-11.9
CB1-CBD-OS-AS3	OS:-9.16 AS3:-11.4
CB1-CBD-OS-AS1-AS3	OS:-9.16 AS1:-12.65 AS3: -11.21

Fonte: O próprio autor.

Assim, na segunda etapa foi investigado através de simulações de dinâmica molecular, o impacto de ligações ortostéricas e alostéricas na estabilidade e afinidade das interações formadas entre CB1 e CBD no sítio alostérico 1 (AS1). Baseados nos resultados da etapa 1 todas as simulações da segunda etapa foram realizadas na presença da membrana Palmitoil-Oleil-Fosfatidil-Colina (POPC). A partir das simulações dos complexos CB1-CBD, a energia livre de ligação foi estimada para cada sistema, como mostrado na Tabela 4.

Uma molécula de CBD associada a CB1 no sítio alostérico (CB1-CBD-AS1) mostrou a melhor energia de ligação ($\Delta G = -14.37$ Kcal/mol) comparado com os outros complexos estudados (Tabela 4). Quando foi determinado o ΔG para os complexos contendo mais de uma molécula de CBD associada a CB1, encontrou-se que a afinidade de ligação no sítio ortostérico (OS) não está afetada pela presença de outras moléculas de CBD associadas em sítios

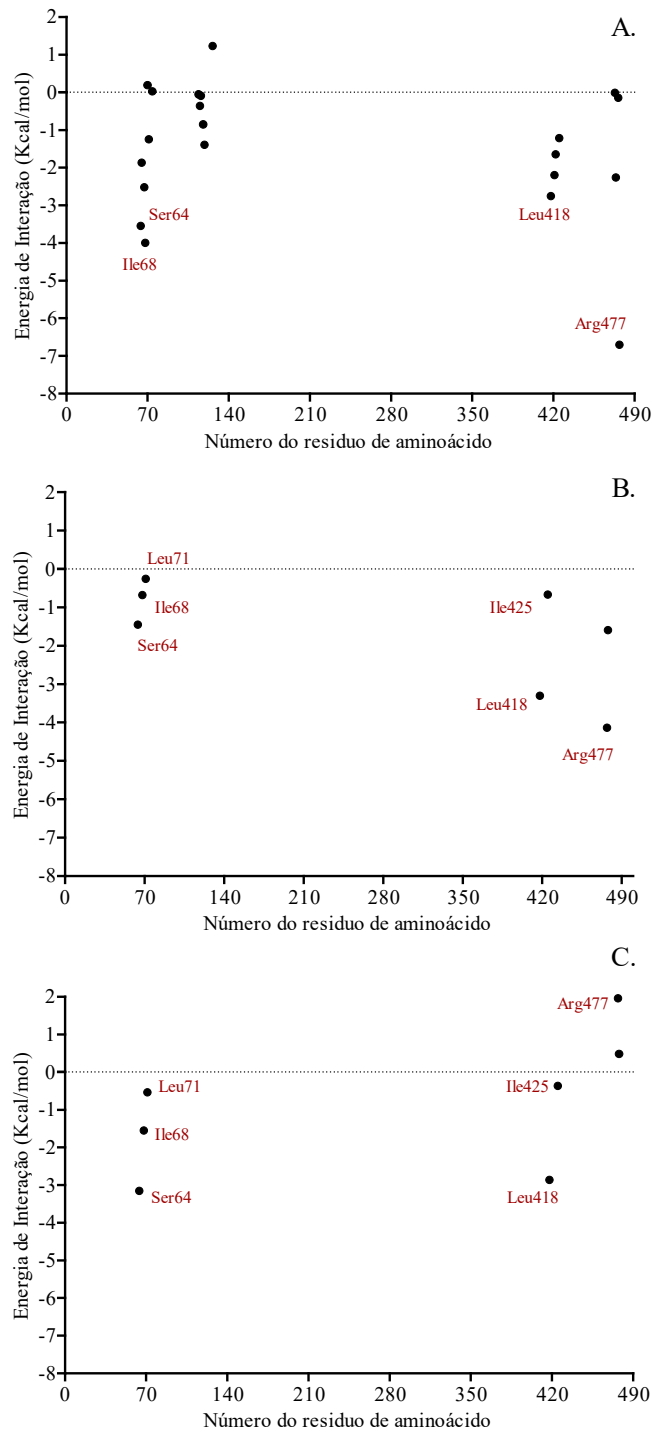
alostéricos como são AS1 e AS3, mantendo valores de energia livre entre -9.54 a -9.16 Kcal/mol (Tabela 4).

Os sítios alostéricos sim estão influenciados por outros tipos de ligações formadas no receptor CB1, mostrando uma diminuição da afinidade do CBD, determinado pelo valor do ΔG , que passou de -14.37 (AS1) para -12.65 Kcal/mol (Tabela 4 quando interações ortostéricas e alostéricas no sítio AS3 são formadas. O ΔG de -14.37 (AS1) passou a -11.9 (Tabela 4) quando só ligações ortostéricas são formadas entre o CBD e o CB1 no sítio OS.

Estes resultados sugerem que a ligação estável do CBD no sítio ortostérico apresenta uma conformação bastante rígida na qual as ligações de outras moléculas de CBD em sítios alostéricos não perturbam a ligação ao longo do tempo, o que pode ser causado pela localização dos resíduos de aminoácido que caracterizam o pocket OS, caracterizados por ter cadeias laterais menos expostas ao solvente ou meio fisiológico [55]. O rearranjo das moléculas de água que solvatam o ligante CBD nas posições alostéricas pode representar um custo entrópico associado à ligação do CBD com o receptor diminuindo a afinidade do ligante nestes sítios quando ligação ortostérica está presente [56].

As seguintes análises neste capítulo foram focadas no sítio AS1 devido a que foi o *pocket* com a melhor afinidade de ligação onde o CBD liga e foi influenciado por outras ligações no receptor CB1.

Figura 13. Energia de interação por resíduo de aminoácido dos sítios de ligação do CBD no receptor CB1. **A.** Complexo 1 (**CB1-CBD-AS1**): uma molécula CBD ligada no sítio alostérico 1 (AS1). **B.** complexo 2 (**CB1-CBD-OS-AS1**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio ortostérico (OS) e outro no sítio AS1; **C.** complexo 3 (**CB1-CBD-OS-AS1-AS3**): três CBD ligados a CB1, um CBD ocupando cada sítio (OS, AS1 e AS3).



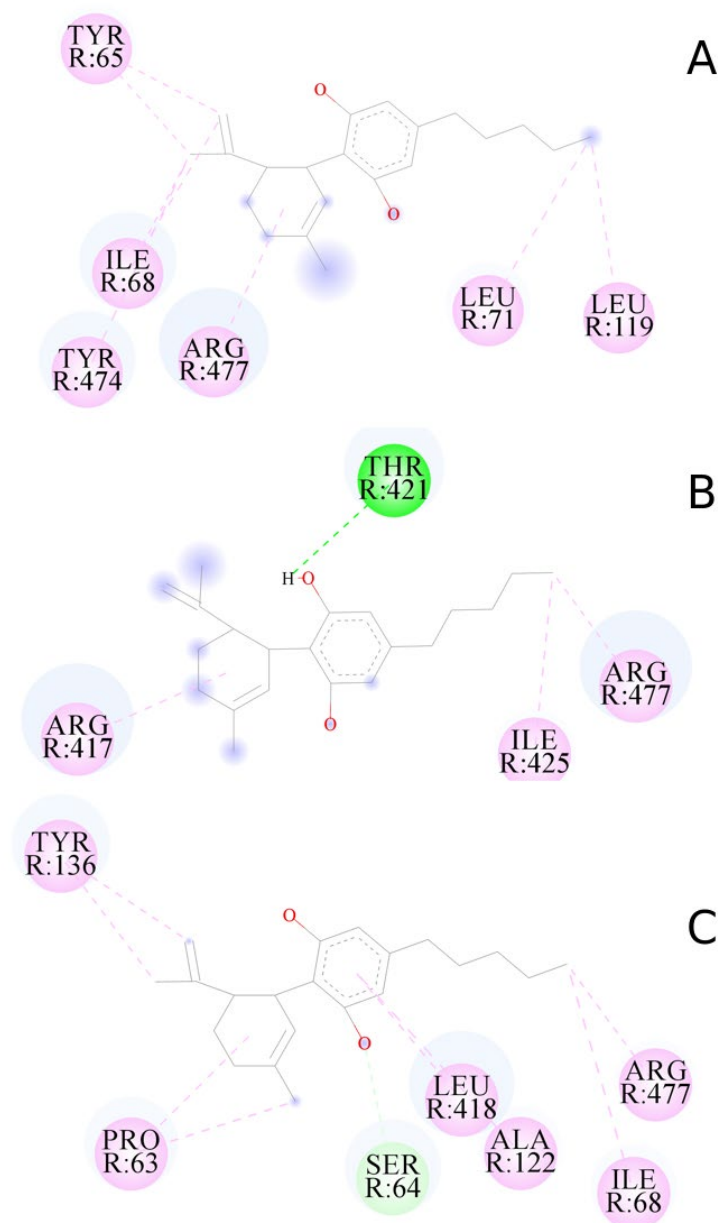
Fonte: O próprio autor.

Como na primeira etapa, foi estimada a contribuição de cada resíduo ao valor de energia livre. Assim $\Delta G_{\text{interação/aa}}$ no sítio AS1 teve valores negativos dos resíduos Ser64 (-3.54Kcal/mol), Ile68 (-3.99Kcal/mol), Leu418 (-2.75 Kcal/mol) e Arg477 (-6.70 Kcal/mol) (Figura 13). Isso confirma a sua participação na formação do complexo CBD-CB1 em membrana POPC. Desses resíduos de aminoácido os que mais contribuem na formação do complexo são Ile68 e Arg477.

Quando a contribuição dos resíduos Ser64, Ile68, Leu 418 e Arg477 são determinadas nos sistemas CB1-CBD-OS-AS1 e CB1-CBD-OS-AS1-AS3, o sinal negativo no $\Delta G_{\text{interação}}$ permanece, o que confirma a contribuição favorável em manter a estabilidade do complexo em POPC, mas os valores aumentam, ou seja, a afinidade dos resíduos é diminuída quando ligações ortostéricas e alostéricas no AS3 estão presentes no receptor CB1 (Figura 13).

A contribuição dos resíduos Ser64 e Arg477 em todos os sistemas analisados sugere que ambos aminoácidos são chaves na ligação do CB1 ao ligante CBD e justifica o fato de que resíduos de aminoácidos polares (Ser) e carregados (Arg) concentram uma densidade eletronegativa na superfície extra e intracelular da proteína receptora o que pode impedir a entrada de moléculas de POPC no sítio de ligação e manter a afinidade com o ligante CBD [48].

Figura 14. Perfil farmacofórico dos complexos ligantes CBD-receptor CB1 analisados. **A.** Complexo 1 (**CB1-CBD-AS1**): uma molécula CBD ligada no sítio alostérico 1 (AS1). **B.** complexo 2 (**CB1-CBD-OS-AS1**): dois CBD ligados a CB1, um no sítio ortostérico (OS) e outro no sítio AS1; **C.** complexo 3 (**CB1-CBD-OS-AS1-AS3**): três CBD ligados a CB1, um CBD ocupando cada sítio (OS, AS1 e AS3).



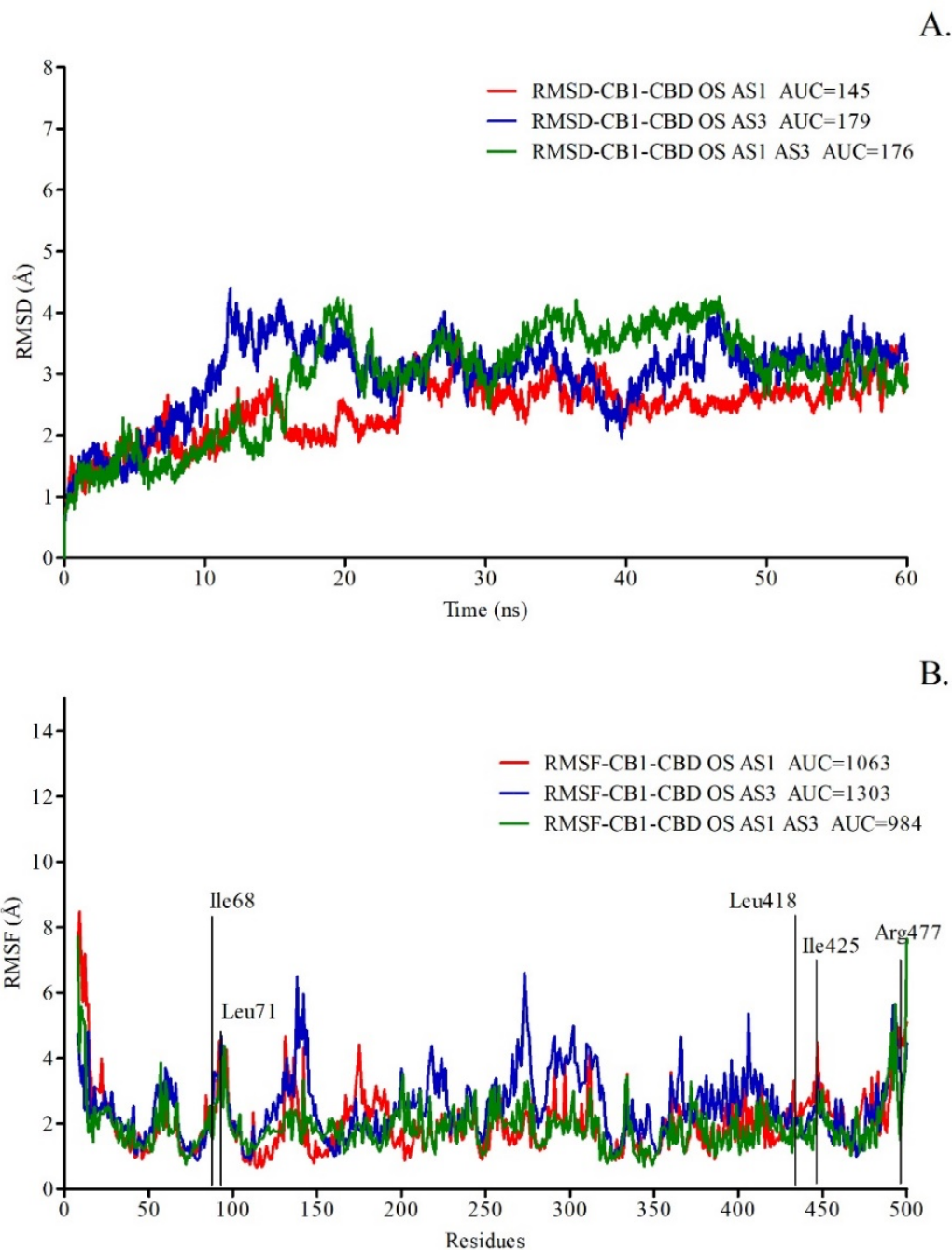
Fonte: O próprio autor.

Para o sítio AS1 foi feita uma descrição topográfica e análises dos tipos de interações moleculares formadas entre os resíduos de aminoácido do receptor CB1 e os átomos do ligante CBD (Figura 14A). Além disso, o efeito da presença de outros CBD na posição OS e AS3 foi avaliado sobre essas interações no sítio AS1 (Figura 14B e 14C).

O 90% dos resíduos de aminoácidos que interagem com o CBD no sítio AS1 após simulação por dinâmica molecular apresentam cadeias laterais hidrofóbicas ou sem carga causando que a maioria das interações encontradas sejam tipo hidrofóbicas (Figura 14). No sistema CB1-CBD-AS1 (Figura 14A) foi observado que todas as ligações entre o CBD e CB1 foram hidrofóbicas, com participação dos grupamentos isopropenil ligado ao ciclohexano e o metil ligado ao pentilbenzeno, assim como o anel ciclohexano do CBD (Figura 14A). As ligações encontradas foram pi-Alkyl e alkyl que intensificam a afinidade do CBD ao CB1, sendo assim essenciais para a estabilização da ligação alostérica do CBD.

Interações convencionais de hidrogênio e carbono-hidrogênio foram registradas nos sistemas CB1-CBD-OS-AS1 e CB1-CBD-OS-AS1-AS3 entre os grupamentos hidroxil ligados a benzeno do CBD e resíduos de aminoácidos com cadeias laterais polares não carregadas como são Thr421 e Ser64 (Figura 14B e C).

Figura 15. Evolução do RMSD e RMSF para átomos C α da CB1 durante 100 ns de simulação. Complexos CB1-CBD-OS-AS1, CB1-CBD-OS-AS1-AS3 e CB1-CBD-AS1 representados pela linha azul, verde e vermelha respectivamente.



Fonte: O próprio autor.

Dos resíduos de aminoácidos encontrados com maior contribuição ao valor da energia livre de ligação (Ser64, Ile68, Leu 418 e Arg477), também foram registrados no perfil de interação com o CBD no sítio AS1, criando interações hidrofóbicas principalmente. O resíduo

Arg477 com a maior contribuição ao ΔG de ligação esteve interagindo com o CBD em todos os sistemas analisados (Figura 14)

O RMSF e o RMSD são medidas da estabilidade de uma macromolécula como a proteína receptora CB1 e pode ser avaliada utilizando-se todos os átomos, inclusive os das cadeias laterais, ou apenas os átomos do esqueleto polipeptídico (N, C α , C, O) ou, ainda, o C α (carbono alfa). As flutuações dos átomos C α de cada aminoácido da proteína CB1 foram analisadas em cada complexo CB1-CBD-OS-AS1, CB1-CBD-OS-AS1-AS3 e CB1-CBD-AS1 (Figura 14). A maior estabilidade, ou seja, valores de RMSF menores a 3 Å e menor valor de área sob a curva (AUC= 830 Å²) foi determinado no sistema CB1-CBD-AS1 (Figura 14). Já nos sistemas CBD-OS-AS1 e CB1-CBD-OS-AS1-AS3 foi observado um aumento na flutuação dos aminoácidos, mostrando que a proteína permaneceu menos estável (linha verde, AUC = 984 Å², e azul, AUC = 1063 Å²) (Figura 15).

4. CONCLUSÕES

1. A energia livre de ligação dos complexos e o cálculo da contribuição dos aminoácidos da proteína CB1 permitiu avaliar sua afinidade ao ligante CBD nos diferentes sítios analisados, baseados nestes valores o sítio alostérico 1 é o local de interação com as melhores características energéticas e estruturais para a ligação do CBD a CB1.
2. A maior contribuição à energia de interação é feita pelos resíduos de aminoácido Arg477 e Ser64 do receptor CB1, cuja presença é estável em todos os sistemas analisados por meio de interações hidrofóbicas e mantendo a afinidade do CB1 com o ligante CBD.
3. No sistema CB1-CBD, as interações não-covalentes mais importantes entre os grupos químicos do CBD e os resíduos de aminoácido do CB1 são alquil, pi-alquil e pi-pi em forma de T, responsáveis da afinidade do ligante à macromolécula alvo, reduzindo sua dissociação do local de interação principalmente no sítio AS1.
4. O aumento do número de moléculas CBD interagindo com o CB1 não potencializa o efeito antagonista do ligante, demonstrado pela perda de afinidade quando outras moléculas são adicionadas na segunda etapa, assim, o melhor sistema de interação é CB1-CBD-AS1 (-14.37 Kcal/mol).

5. REFERÊNCIAS

- [1] FEIXAS, Ferran, *et al.* Exploring the role of receptor flexibility in structure-based drug discovery. **Biophysical chemistry**, v. 186, p. 31-45, Fevereiro 2014.
- [2] GREENE, D.'Artagnan *et al.* Modeling Membrane Protein–Ligand Binding Interactions: The Human Purinergic Platelet Receptor. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 120, p. 12293-12304, Novembro 2016.
- [3] HOWLETT, A. C. *et al.* Classification of cannabinoid receptors. In: International Union of Pharmacology, XXVII, **Pharmacological Reviews**, 2002, v. 54, p. 161-202.
- [4] MAA, Edward.; FIGI, Paige. The case for medical marijuana in epilepsy. **Epilepsia**, v. 55, n. 6, p. 783-786, Maio 2014.
- [5] LAPRAIRIE, R. B. *et al.* Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 20, p. 4790-4805, Julho 2015.
- [6] SHORE, Derek M. *et al.* Allosteric modulation of a cannabinoid G protein-coupled receptor: binding site elucidation and relationship to G protein signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 9, p. 5828-5845. Dezembro 2014.
- [7] PICONE, R. P.; KENDALL, D. A., Minireview: From the bench, toward the clinic: therapeutic opportunities for cannabinoid receptor modulation. **Molecular Endocrinology**, v. 29, n. 6, p. 801-813. 2015
- [8] IGNATOWSKA-JANKOWSKA, Bogna M. *et al.* A Cannabinoid CB1 Receptor-Positive Allosteric Modulator Reduces Neuropathic Pain in the Mouse with No Psychoactive Effects. **Neuropsychopharmacology**, v. 40, n. 13, p. 2948-2959. Junho 2015.
- [9] ROSS, R. A. Tuning the endocannabinoid system: allosteric modulators of the CB1 receptor. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 5, p. 565-566. Janeiro 2007.
- [10] PRICE, Martin R. *et al.* Allosteric modulation of the cannabinoid CB1 receptor. **Molecular Pharmacology**, v. 68, n. 5, p. 1484-1495. Novembro 2005.
- [11] SLIVICKI, Richard A. *et al.* Positive allosteric modulation of cannabinoid receptor type 1 suppresses pathological pain without producing tolerance or dependence. **Biological Psychiatry**, v. 84, n. 10, p. 722-733. Novembro 2018.
- [12] STRAIKER, Alex *et al.* Cannabidiol inhibits endocannabinoid signaling in autaptic hippocampal neurons. **Molecular Pharmacology**, v. 94, n. 1, p. 743-748. Julho 2018.
- [13] SABATUCCI, Annalaura *et al.* In silico mapping of allosteric ligand binding sites in type-1 cannabinoid receptor. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 21-28. Agosto 2018.
- [14] MAY, Lauren T. *et al.* Allosteric modulation of G protein–coupled receptors. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**, v. 47, p. 1-51, Fevereiro 2007.

- [15] WANG, Lirong *et al.* TargetHunter: an in silico target identification tool for predicting therapeutic potential of small organic molecules based on chemogenomic database. **The AAPS journal**, v. 15, n. 2, p. 395-406, Janeiro 2013.
- [16] PAYGHAN, Pavan V. *et al.* Computational studies for structure-based drug designing against transmembrane receptors: pLGICs and class A GPCRs. **Frontiers in Physics**, v. 6, p. 52, Setembro 2018.
- [17] GAPSYS, Vytautas; DE GROOT, Bert L.; BRIONES, Rodolfo. Computational analysis of local membrane properties. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 27, n. 10, p. 845-858, Outubro 2013.
- [18] THANGSUNAN, Patcharapong *et al.* Rapid activity prediction of HIV-1 integrase inhibitors: harnessing docking energetic components for empirical scoring by chemometric and artificial neural network approaches. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 30, n. 6, p. 471-488, Junho 2016.
- [19] HEINZ, Dirk W. *et al.* How amino-acid insertions are allowed in an α -helix of T4 lysozyme. **Nature**, v. 361, n. 6412, p. 561-564, Fevereiro 1993.
- [20] SHAO, Zhenhua *et al.* High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. **Nature**, v. 540, n. 7634, p. 602-606, Novembro 2016.
- [21] KELLEY, Lawrence A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, Maio 2015.
- [22] IRWIN, J. J.; STERLING, T. T.; Mysinger, MM; Bolstad, ES; Coleman. ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, p. 1757, 2012
- [23] MarvinSketch (version 6.2.2, calculation module developed by ChemAxon, <http://www.chemaxon.com/products/marvin/marvinsketch/>, 2014.
- [24] ZOETE, Vincent *et al.* SwissParam: a fast force field generation tool for small organic molecules. **Journal of computational chemistry**, v. 32, n. 11, p. 2359-2368, Maio 2011.
- [25] 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, Abril 2009.
- [26] 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, Junho 2010.
- [27] SHIM, Joong-Youn; AHN, Kwang H.; KENDALL, Debra A. Molecular Basis of Cannabinoid CB1 Receptor Coupling to the G Protein Heterotrimer $G\alpha\beta\gamma$ IDENTIFICATION OF KEY CB1 CONTACTS WITH THE C-TERMINAL HELIX $\alpha 5$ OF $G\alpha i$. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 45, p. 32449-32465, Outubro 2013.

- [28] HUANG, Jing *et al.* CHARMM36m: an improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. **Nature methods**, v. 14, n. 1, p. 71-73, Novembro 2017.
- [29] LOMIZE, Mikhail A. *et al.* OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. **Nucleic acids research**, v. 40, n. D1, p. D370-D376, Setembro 2012.
- [30] HUMPHREY, William *et al.* VMD: visual molecular dynamics. **Journal of molecular graphics**, v. 14, n. 1, p. 33-38, Janeiro 1996.
- [31] AKSIMENTIEV, Alek; SOTOMAYOR, Marcos; WELLS, David. Membrane proteins tutorial. **University of Illinois at Urbana-Champaign**, 2012.
- [32] HANSSON, Tomas; MARELIUS, John; ÅQVIST, Johan. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 12, n. 1, p. 27-35, Janeiro 1998.
- [33] MOREIRA, Irina S. *et al.* Structural basis of dopamine receptor activation. In: **The dopamine receptors**. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 47-73.
- [34] JI, Beihong *et al.* Prediction of the Binding Affinities and Selectivity for CB1 and CB2 Ligands Using Homology Modeling, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulations, and MM-PBSA Binding Free Energy Calculations. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 1139-1158, Março 2020.
- [35] SHAO, Zhenhua *et al.* Structure of an allosteric modulator bound to the CB1 cannabinoid receptor. **Nature chemical biology**, v. 15, n. 12, p. 1199-1205, Outubro 2019.
- [36] KHURANA, Leepakshi *et al.* Modulation of CB1 cannabinoid receptor by allosteric ligands: Pharmacology and therapeutic opportunities. **Neuropharmacology**, v. 124, p. 3-12, Setembro 2017.
- [37] PANDEY, Pankaj; ROY, Kuldeep K.; DOERKSEN, Robert J. Negative allosteric modulators of cannabinoid receptor 2: protein modeling, binding site identification and molecular dynamics simulations in the presence of an orthosteric agonist. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 1, p. 32-47, 2020.
- [38] LUTTRELL, Louis M.; LEFKOWITZ, Robert J. The role of β -arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. **Journal of cell science**, v. 115, n. 3, p. 455-465, 2002.
- [39] BRYLINSKI, Michal. Aromatic interactions at the ligand-protein interface: Implications for the development of docking scoring functions. **Chemical biology & drug design**, v. 91, n. 2, p. 380-390, 2018.
- [40] JAFURULLA, Md; TIWARI, Shrish; CHATTOPADHYAY, Amitabha. Identification of cholesterol recognition amino acid consensus (CRAC) motif in G-protein coupled receptors. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 404, n. 1, p. 569-573, Janeiro 2011.

- [41] ODDI, Sergio *et al.* Functional characterization of putative cholesterol binding sequence (CRAC) in human type-1 cannabinoid receptor. **Journal of neurochemistry**, v. 116, n. 5, p. 858-865, Janeiro 2011.
- [42] SALMASO, Veronica; MORO, Stefano. Bridging molecular docking to molecular dynamics in exploring ligand-protein recognition process: An overview. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 923, Agosto 2018.
- [43] ATKOVSKA, Kalina *et al.* Multipose binding in molecular docking. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 2, p. 2622-2645, Fevereiro 2014.
- [44] JI, Beihong *et al.* Prediction of the Binding Affinities and Selectivity for CB1 and CB2 Ligands Using Homology Modeling, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulations, and MM-PBSA Binding Free Energy Calculations. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 8, p. 1139-1158, Março 2020.
- [45] ADCOCK, Stewart A.; MCCAMMON, J. Andrew. Molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chemical reviews**, v. 106, n. 5, p. 1589-1615, Fevereiro 2006.
- [46] LIU, Cheng *et al.* Computational investigation on the binding modes of Rimonabant analogs with CB 1 and CB 2. **Chemical biology & drug design**, v. 92, n. 3, p. 1699-1707, Maio 2018.
- [47] ASHTON, John C. *et al.* Cannabinoid CB1 and CB2 receptor ligand specificity and the development of CB2-selective agonists. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 14, p. 1428-1443, Junho 2008.
- [48] SHAO, Zhenhua *et al.* High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. **Nature**, v. 540, n. 7634, p. 602-606, Novembro 2016.
- [49] THAM, Mylyne *et al.* Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 10, p. 1455-1469, Julho 2019.
- [50] MCPARTLAND, John M. *et al.* Are cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. **British journal of pharmacology**, v. 172, n. 3, p. 737-753, 2015.
- [51] LAPRAIRIE, Robert B. *et al.* Type 1 cannabinoid receptor ligands display functional selectivity in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 36, p. 24845-24862, Julho 2014.
- [52] WANG, Jinan *et al.* Improved Modeling of Peptide-Protein Binding through Global Docking and Accelerated Molecular Dynamics Simulations. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 6, p. 112, Outubro 2019.
- [53] KURCINSKI, Mateusz *et al.* CABS-dock standalone: a toolbox for flexible protein-peptide docking. **Bioinformatics**, v. 35, n. 20, p. 4170-4172, Outubro 2019.

- [54] ZOU, Shenglong; KUMAR, Ujendra. Cannabinoid receptors and the endocannabinoid system: signaling and function in the central nervous system. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 3, p. 833, Março 2018.
- [55] AHN, Kwang H. *et al.* Hydrophobic residues in helix 8 of cannabinoid receptor 1 are critical for structural and functional properties. **Biochemistry**, v. 49, n. 3, p. 502-511, 2010.
- [56] CHUNG, Hery; FIERRO, Angélica; PESSOA-MAHANA, C. David. Cannabidiol binding and negative allosteric modulation at the cannabinoid type 1 receptor in the presence of delta-9-tetrahydrocannabinol: An In Silico study. **PloS one**, v. 14, n. 7, p. e0220025, Julho 2019.

APENDICE A: ARTIGO ACEITO COMO REQUISITO PARA DEFESA DE TESE

Accepted to: Bioinformatics and Biology Insights

**Allosteric modulation of cannabinoid type 1 receptor by cannabidiol
detected by molecular dynamic simulations in membrane and binding free
energy prediction**

José Gregorio Severiche Castro^{1,2}, Yaremis Beatriz Meriño-Cabrera³ Alexandre Suman de
Araujo⁴ Tiago Antônio de Oliveira Mendes^{3*}, Marcello Ferreira da Costa^{1,2},

¹Departamento de Física, Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, Brazil.

²Laboratório de Biofísica e Modelagem Molecular, Universidade Estadual de Londrina,
Londrina-PR, Brazil

³Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa-
MG, Brazil.

⁴Departamento de Física, IBILCE, Universidade Estadual de São Paulo, São José de Rio
Preto-SP, Brazil.

*Corresponding author

Dr. Tiago de Oliveira Mendes

E-mail: tiagoaomendes@ufv.br

Phone: +55 3184520167

ABSTRACT

G protein-coupled receptors (GPCR)-based drug discovery programs focus on developing orthosteric molecules that compete with endogenous ligands. The development of new assays has made it possible to identify active ligands that interact with topographically distinct sites of the receptor, namely allosteric sites. Cannabidiol (CBD) is a negative allosteric modulator, and it exerts its effects by modifying the conformation of the receptor, leading to structural changes in the Cannabinoid receptor type 1 (CB1) and loss of affinity to orthosteric ligands, such as tetrahydrocannabinol (THC). This molecule may be a target for the design of new drugs, offering a new approach to modulate CB1. Thus, in this study was employed molecular dynamics as a computational tool and binding free energy estimation by linear

interaction energy (LIE) method, providing information on the dynamic, time-dependent behavior of the interactions of the CB1-CBD system in a 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (POPC) membrane environment. In this study was determinate the best binding site of CBD on the receptor, and was studied the modulation exerted by cannabidiol on the effects of THC in the CB1, evaluating the best site to the allosteric action of CBD. Our results demonstrate that CBD is able to bind to two allosteric sites of the CB1 receptor, allosteric site 1 (AS1) or allosteric site 3 (AS3); but when CBD is in AS3 there is conformational and energetic changes with reduction of 81.2% in the affinity of the THC ligand to the receptor. We concluded that the allosteric site 3 is the interaction site with the best energetic and structural characteristics for the negative allosteric modulation by CBD. The largest contribution to the interaction energy is made by the amino acid residues valine 91 and valine 33 from the CB1 receptor that interact by hydrophobic bonds and maintaining the affinity of CB1 to the CBD ligand in AS3.

Keywords: *Cannabis*, dynamic simulation, free energy, molecular docking, NAMD.

Introduction

CB1 protein is the target of the compounds cannabidiol (CBD) and tetrahydrocannabidiol (Δ^9 -THC) present in the *Cannabis sativa* plant.¹ *In vivo* studies with cannabinoids such as CBD in the treatment of epilepsy, have demonstrated the therapeutic potential of the agonist compound, reducing the effects of diseases such as Dravet's syndrome, Lennox-Gastaut, among others.² However, most G protein-coupled receptors (GPCR)-based drug discovery programs focus on the development of orthosteric molecules that compete with endogenous ligands.³

The development of news and more sophisticated assays has made it possible to identify active ligands that interact in sites topographically distinct from the receptor CB1, namely allosteric sites.⁴⁻⁷ Allosteric ligands, such as CBD, are molecules that modify the conformational state of the pharmacological target when bound to an allosteric site, leading then to a modification of functional response upon binding of the endogenous ligand.⁸⁻⁹ According to the mode of actions, allosteric modulators can in general be classified as positive allosteric modulators (PAMs) or negative allosteric modulators (NAMs) based on the increase or decrease in the affinity and/or efficacy of the orthosteric agonists, respectively.^{9,10} Thus, CBD is a NAM,¹¹ and it exert their effects by modifying the conformation of the receptor, leading to a structural change in the CB1 protein and loss of affinity to orthosteric ligands, such as THC.¹² The deep understanding of the interactions between this molecule and CB1 can help in the design of new drugs, offering a new approach to modulate CB1.

The allosteric characteristics of CBD can bring advantages, increasing the selectivity of the CBD ligand to the receptor, interacting in allosteric sites that are structurally less conserved.¹² In addition, possess a “ceiling effect” on orthosteric ligand function such that increase in concentration beyond saturation of the allosteric receptor binding site does not increase the magnitude of the allosteric effect (avoidance of overdosing).¹³ Thus, the study of how the allosteric interactions of CBD can influence the orthosteric bond in CB1 and to know which would be the best site for the allosteric function of CBD, would be relevant for the potentiation of the therapeutic effect of CBD and rational design of mimetic molecules.

The study of biomolecules through computational techniques has produced good results, capable of guiding experimental studies, saving time and resources.¹⁴ For that, as an alternative to the experimental techniques, *in silico* studies are found, which allow to analyze the interactions between the atoms of the target proteins and the ligands of interest, being a non-invasive method, without putting the health of individuals at risk, and reducing research time and costs.¹⁵ An example of *in silico* analyzes are those employing molecular dynamics simulations (MD), which describe the temporal evolution of the system in question from the potential for interaction between atoms and the resolution of Newton's second equation.¹⁶

As starting points for molecular dynamics studies, X-ray or NMR techniques are important because, they provide the necessary coordinates to run the simulations, generating the values of the temporal averages, collected during the experiment and at the end in a simulation of DM these average properties are calculated, and representative of biological behaviors measured experimentally. However, these experimental techniques do not address the dynamic interactions between a protein, ligand, lipids and waters that influence multiple protein-ligand states.¹⁷⁻¹⁸

Based on the above assumptions, the aim of this study was evaluated the interaction of CBD in the orthosteric and two allosteric sites of the CB1 receptor through molecular dynamics simulations. We analyzed the interactions between the ligand and the different residues of each pocket of the CB1 receptor. Besides, binding energies were determined to identify the most important contributions of the polar and non-polar contacts between CBD and the different binding sites in CB1. Furthermore, the modulation exerted by cannabidiol on the effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in the CB1 was studied, evaluating the best site to the allosteric action of CBD.

Materials and Methods

Obtaining the receptor and ligand

The high-resolution crystal structure of the human cannabinoid receptor 1 was obtained from the PDB (Protein Data Bank) database with accession code 5U09,¹⁹⁻²⁰ was chosen this structure because it has a lower resolution value (2.60 Å) indicating better resolution compared to other structures such as 5XRA (2.80 Å). The ligands associated with the structure were removed and hydrogen atoms were added using the program PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.0 Schrödinger, LLC. Because some parts of the receptor protein were broken due to loss of interactions, the complete three-dimensional structure was determined and improved using the Phyre2 webserver using the interactive mode.²¹

The CB1 model quality after modeling the broken part was measured by evaluation of geometry and stereochemistry, energy distribution, and three dimensional non-covalent interaction using the webserver PROSA (Protein Structure Analysis) (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), ERRAT (<http://services.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) and Ramachandran Plot analyzes (<http://mordred.bioc.cam.ac.uk/~rapper/rampage.php>).

The coordinates of Cannabidiol (CBD) and Tetrahydrocannabinol (THC) were obtained from the database ZINC,²² with access code ZINC04097406 and ZINC1530625. The structure of the CBD and THC were optimized using the program MarvinSketch (<http://www.chemaxon.com>). The topology and force field parameters (bound and unbound) for the CBD and THC were described using the web tool SwissParam,²³ a fast force field generation tool able to generate, for small organic molecule, topologies, and parameters.

Molecular Docking

The ligands were docked to CB1 protein using the AutoDock Vina package,²⁴⁻²⁵ this program determines the site of interaction between the amino acid chains from the receptor protein and the ligand by calculation of the affinity energy using a search method and an evaluation function. The search method that the AutoDock Vina program employs is known as stochastic, where the exploration of different possible orientations and conformations for the ligand in the binding site of the target receptor is done in such a way as to obtain different results as output for the same initial input state of the ligand.²⁴⁻²⁵

A study performed by in silico mapping using molecular docking, it was recently discovered that CBD can bind to two distinct sites (pocket 1 and pocket 3) to the orthosteric site.²⁶ However, there is no knowledge about the temporal evolution, energetic and structural modifications that can cause the occupation of more than one binding site on the CB1 receptor

by the CBD ligand. Thus in this work, was determinate the best binding site of CBD on the receptor, and was studied the modulation exerted by cannabidiol on the effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in the CB1, evaluating the best site to the allosteric action of CBD.

The best docking conformations (CB1-CBD) were chosen as having the largest binding affinity by AutoDock Vina program^{25,27}. In this analysis, the CB1 receptor protein is considered rigid and the degrees of freedom of the CBD ligand were explored within each one of the designated cubic grids (allosteric and orthosteric sites). The center of each grid were chosen as: (1) pocket OS (center-x = 20.97; center-y = -2.08 and center-z = -8.59), (2) pocket AS1 (center-x = 19.53; center-y = 1.83 and center-z = 17.74) and (3) pocket AS3 (center-x = 29.61; center-y = 13.87 and center-z = -16.38); all the xyz values are defined in Å.

Thus, three targeted dockings were performed: (1) CBD bound to the orthosteric site (OS); (2) CBD bound to allosteric site 1 (AS1) located in the transmembrane region that includes the conserved residues Trp241, Phe237 and Hys154; and (3) CBD bound to allosteric site 3 (AS3) that includes amino acid residues such as Cys98 and Cys107. The positions of the allosteric sites were based on the *in silico* mapping study of allosteric binding sites on the CB1 receptor.²⁶

The best docking conformations (CB1-CBD-THC) were chosen as having the largest binding affinity by AutoDock Vina program,^{25,27}. Three docking were performed: (1) a THC molecule bound to the orthosteric site of CB1 (CB1-THC) (2) To the system AS1 (CBD bound to allosteric site 1), a THC was docked in the orthosteric site of CB1 (CB1-THC-CBD-AS1). (3) To the system AS3 (CBD bound to allosteric site 3), a THC was docked in the orthosteric site of CB1 (CB1-THC-CBD-AS3). The CBD ligand was kept rigid at both AS1 and AS3 sites and just the THC conformations were explored in the grid (flexible ligand). The center of grid was chosen as center-x = 20.97; center-y = -2.08 and center-z = -8.59, all the xyz values are defined in Å.

Molecular dynamics simulations in lipid bilayer POPC

For the molecular dynamic simulations, the lowest energy conformations of each docking were selected. Simulations were performed and as a control a simulation of the individual protein without the ligand was performed. We used the molecular dynamics simulation package NAMD 2.9, using the CHARMM36 force field,²⁸ which can be used for proteins, lipids and the TIP3P water model.

The insertion and orientation of the CB1 receptor in the lipid bilayer 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycerol-3-phosphocholine (POPC) was guided by amino acid residues P113, F180, R186, G254, D272, F368 and K376 from the intramembrane region of the protein and which are closer to the extramembrane region²⁶ (Supplementary Figure 1).

The webserver PPM for proteins positioning in membranes was used in the validation of the data. This server calculates the rotational and translational positions of transmembrane and peripheral proteins in membranes using its 3D structure (PDB coordinate file) as input.²⁹

The size of the bilayer was determined by the receptor protein, this was ≈ 30 Å between the protein and the membrane boundary in the direction of the axis X and Y . The size of the membrane was 130 Å in the plane XY , containing 205 molecules of lipid per monolayer; the bilayer was created using the program VMD (Visual Molecular Dynamics) with the tool *Membrane Builder*.³⁰

The surface area of the bilayer, in the xy plane, is determined by the area of each phospholipid multiplied by the amount in which they are present in each monolayer. In simulation of membranes in which the system is balanced, the number of lipids per unit area tends to remain constant and therefore can be considered an equilibration parameter. A script was executed in the VMD software to perform the area per lipid during the simulation time, the average value was 63.3 Å^2 (Supplementary Figure 2). Experimental results performed with the same lipid bilayer composition provide a result equal to $68.3 \pm 1.2 \text{ Å}^2$,³¹ while theoretical results provide the value of $64.7 \pm 0.2 \text{ Å}^2$.³² Thus, the result found for the area by lipid is satisfactory, as it is consistent with the results already published.

The solvation of the system was done using the TIP3P water model, following the consideration that the distance between the end of the protein and the limit of the simulation box was >15 Å in each direction. A total of 31,863 water molecules were added. To mimic the physiological environment of CB1, 187 sodium chlorides were used as ionic compound. The insertion of the ions was performed using the tool *Autoionize* of VMD.

The simulation of the individual CB1 complexes and the lipid bilayer was divided into four steps as described below:

- a. Melting of lipid tails: a simulation in which everything (water, ions, protein, ligand, lipid head groups) except lipid tails, is fixed. In this way, we induced the appropriate disorder of a fluid-like bilayer. In this part, NAMD runs 1000 steps of minimization, then it reinitiates velocities, and then it runs dynamics for 0.5 ns (using a 2 fs time step).
- b. Minimization and equilibration with protein and ligand constrained: our second run with NAMD was a “minimization”, which simply guides the system to the nearest local energy minimum in configuration space. Minimization was then followed by equilibration with the protein and ligand constrained, so as to permit the environment to relax first. The dynamic runs for 0.5 ns (using a 2 fs time step).

- c. Equilibration without restraints: after minimization and equilibration with the protein and ligand constrained, we hopefully have a system in which lipids are well packed around the complex, while water has not entered forbidden regions. We now proceed to release the harmonic constraints and further equilibrate the whole system. The dynamic run for 10 ns.
- d. Production Runs: After equilibrating the system, the production run was simulated for 100 ns.³³

The simulations in POPC were performed at 310 K and pressure of 1 atm using the constant pressure ensemble (NPT). The temperature was controlled using Langevin dynamics (1.0) and pressure using the Langevin piston method, with an oscillation period of 2 fs. For the unbound interactions, the cutoff was adjusted to 12 Å and for the long-range the cutoff was modeled using the Mesh Ewald Particle method (PME).³³

We performed MD simulation of the free ligand (CBD) in water. The conditions MD simulation of the free CBD in water are the same as that of the bound ligand to protein, but without restraint.

Data analyses

After the simulations were performed, the results were initially analyzed with the plugin NAMD Plot included in the software Visual Molecular Dynamics (VMD). The plugin generated temporal graphs with the information on the total energy, temperature, pressure (Supplementary Figure 3). The electric and van der Waals energy values between the ligand and its neighborhood in the free and complex states were calculated using plugin NAMD Energy (Supplementary Table 2).

The binding free energy estimation was performed by the linear interaction energy (LIE) method. This method provides approximated estimation of the absolute binding free energies with low computational effort. It adopts the microscopic all-atom LRA (linear response approximation) for the electrostatic contribution, while estimating the non-electrostatic term by scaling the average van der Waals (vdW) interaction.³⁴ The LIE governing equation for estimation of binding free energy is as follows:

$$\Delta G_{Bind} = \beta(\langle V_{l-s}^{el} \rangle_{bound} - \langle V_{l-s}^{el} \rangle_{free}) + \alpha(\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_{bound} - \langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_{free}) + \gamma \quad (1)$$

where $\langle V_{l-s}^{el} \rangle_Y$ and $\langle V_{l-s}^{vdw} \rangle_Y$ are the average values of the electrostatic and van der Waals interactions between the ligand (*l*) and its surroundings (*s*) in the ligand state *Y*, which can be either free in solution or bound to the protein. The α and β parameters are, respectively,

dispersion and electrostatic adjustable energy scale factors and γ is a constant term. They are dependent on chemical nature of the ligand, in the CBD case, it is a neutral compound bearing two or more hydroxyl groups, then the parameters $\beta = 0.33$, $\alpha = 0.18$ and $\gamma = 0$.³⁴ The standard deviation (SD) was calculated as the square root of variance by determining each data point's deviation relative to the mean for the electrostatic and van der Waals interactions values generated during the simulation time (100 ns), were calculated both for the bound and free states, and included within the equation (1) to estimate the lower and upper value of binding free energy, and it was possible to obtain the lower and upper values for the binding free energy of each analyzed system.

After confirming the stabilization of the system, the changes that the structure of the macromolecule (CB1) and the ligand (CBD) underwent during the dynamic trajectory of the simulations were analyzed by RMSD (Root Mean Square Deviation). The per-residue Root Mean Square Fluctuation (RMSF) graphs were generated, allowing to determine the fluctuation of the distance moved by each amino acid residue of the protein backbone.

Then, the interactions of each system were analyzed before and after the simulations. Figures were done on the distances between the principal residues of each receptor interaction site. These graphs were made with to capture the variation of these distances over time. Besides, the interaction energy contribution per-residue and the total binding free energy for all complexes were also calculated.

Results

The 3D structure of the CB1 protein obtained from the Phyre2 program was predicted with 100% confidence and 30% identity to the template or model protein employed by the software. The quality analysis using the Ramachandran test computed with PROCHECK, showed that more than 98% of the amino acid residues make favorable bonds within the protein which indicates that the structure of the protein has good quality, with no steric hindrance between the side chains of the amino acid residues (Supplementary Table 1).

In this step, molecular docking performed by Autodock Vina generated a total of 9 models with predicted binding mode between CB1 and Cannabidiol ligand for each three sites chosen for the study. The best models for each docking were selected according to the results of the affinity scoring function (kcal/mol) (Figure 1).

In order to identify the dynamic behavior of the protein when complexed with CBD in the pockets, the molecular dynamic was performed and the complexes reached a stable minimum of energy (Supplementary Figure 2). Besides, the systems temperature remained

stable throughout the production run stage (Supplementary Figure 2). These results demonstrate that the molecular dynamic simulation protocol used was suitable to find the global minimum energy conformation by the complexes studied in the production runs. Thus, 100ns of simulation was a correct time to investigate the stability of the docked CBDs at the studied sites and accommodation of the protein chain around the ligand, energy stability was observed during the simulation and there was no expulsion of the ligand from the interaction sites.

The CBD interactions with CB1 were analyzed after docking and molecular dynamics. When CBD was docked in the orthosteric site of CB1, bonds were formed between the ligand and amino acid residues with hydrophobic characteristic, such as Phe82, Leu454, Val108 (Figure 2A and Figure 3A-B).

The interaction of Cannabidiol in the allosteric site 1 of CB1 showed the participation of the transmembrane region, hydrophobic and non-polar amino acid residues Ile68, Leu418, Tyr474, polar uncharged residue Ser64 and positive charge and polar residue like Arg477 (Figure 2B and Figure 3C-D).

The CBD binding in the allosteric site 3 of CB1 showed the participation of residues with nonpolar side chain as Val33, Phe89 and Phe86 (Figure 2C and Figure 3E-F); and residues with positive charge and polar side chain such as His90 and His93 were observed (Figure 2C and Figure 3E-F).

From the diagram 2D of the interactions made for the CBD at each binding site in CB1, the ligand regions intimately bound to the receptor were identified, as well as the receptor residues involved in each binding (Figure 2-3). Several Van der Waals, Carbon Hydrogen bond, Pi-Pi T-shaped, Pi-Pi Stacked, Cation-PI, Pi-Alkyl and alkyl interactions were found (Figure 2-3).

The allosteric site 1 (AS1) was found as the best site for CBD binding in CB1 with a value energy of -14.4 ± 2.03 kcal/mol, followed by the allosteric site 3 (-11.9 ± 1.08 kcal/mol) and the last was the orthosteric site (-9.3 ± 0.05 kcal/mol) in the POPC simulations (Table 1).

Interaction energy decomposition per residue was performed in the vicinity of CB1 sites (distance less than 4Å) to identify the residues that are important for the interaction of the CB1-ligand complexes in POPC environment (Figure 4). The residues Val108, Phe82, Leu464, and Cys463 showed the highest energetic contribution in the orthosteric site both in POPC membrane simulations (Figures 4A).

In the AS1 site, the residues Ser477, Ile68, Ser64 and Leu418 had the lowest energy values (greater energetic contribution) (Figure 4B). In the AS3 site, the residues Pro25, His90, Val33, and His93 had the lowest energy values (Figure 4C).

To identify the dynamic behavior of CB1 protein, RMSD values were calculated by the individual CB1 and CB1 interacting with CBD in the three sites separately (Figure 6). When CBD was bound to receptor in the orthosteric site, the protein was more flexible compared to the bindings on other sites (Figure 5). Also, the RMSD values of CB1 with CBD bound in the OS had the values closer to the RMSD of non-bonded protein in POPC environment (Figure 5A).

The RMSF values were calculated to analyze the fluctuations of the residues individually (Figure 6). All the RMSFs were compared with the CB1 non-bound values. The lower fluctuation of the CB1 residues was observed when the CBD was bound at the AS1 site in the POPC simulations (Figure 6). The highest values for RMSF were found for the CB1-CBD system at the orthosteric site (Figure 6A).

The RMSD for the CBD was analyzed, finding that the lower values of this parameter were in the AS1 site ($0.238 - 1.485\text{\AA}$) and the highest values were for the bound CBD at the AS3 site ($0.534 - 2.432\text{\AA}$) in the POPC environment (Figure 7).

Second Step

From of the binding free energy estimation by LIE in the complexes CB1-THC, CB1-THC-CBD-AS1, and CB1-THC-CBD-AS3, was demonstrated that the binding free energy is -15.85 ± 0.12 Kcal/mol when one THC molecule is bound to the OS site in the absence of interactions between CBD and CB1 (Table 2). In the CB1-THC-CBD-AS1 complex, the binding energy THC-OS increases to -6.47 ± 0.43 (Table 2), i.e, decrease the THC affinity to the OS site in CB1 receptor. In the CB1-THC-CBD-AS3 complex the energy increase too, where the energy value to THC-OS was -2.99 ± 0.23 .

As for the CBD, the binding energy also had a variation in relation to the initial values obtained. In the CB1-THC-CBD-AS1 complex, the value was -12.31 ± 1.83 (Table 2), and in CB1-THC-CBD-AS3 was -9.68 ± 1.04 .

Interaction energy decomposition per residue was performed in the vicinity of CB1 sites analyzed in this step (distance less than 4\AA) to identify the residues that are important for the interaction of the CB1-THC complexes in POPC environment (Figure 8). In the complexes CB1-THC, CB1-THC-CBD-AS1, and CB1-THC-CBD-AS3, the aminoacid residues Phe82 and Ser460 showed the highest energetic contribution to the THC binding in the orthosteric site

in CB1 (Figure 8). However, the values of the energy contribution of these amino acid residues were more negative in the CB1-THC system (Figure 8).

When the type of binding were analyzed by diagram 2D (Figure 9 and 10), were identified the amino acid residues of CB1 that are interacting with THC in the orthosteric site, and the variation of these interactions between the complexes CB1-THC, CB1-THC-CBD-AS1, and CB1-THC-CBD-AS3 was also analyzed. In the complex CB1-THC are registered conventional hydrogen bonds, pi-pi stacked, pi-sulfur and pi-alky (Figure 9). Furthermore, all the residues identified like the most contributors to binding energy (Phe180, Val108, Phe14, Phe82, Trp433 and Ser460) were found like participants of the interactions. In the complexes CB1-THC-CBD-AS1, and CB1-THC-CBD-AS3, the type interactions are reduced. When CBD bind in the allosteric sites (AS1 or AS3) the binding Pi-Sulfur is lost, and the residue Ser460 stops interacting with THC in the orthosteric site (Figure 9).

In relation to the interactions between CBD in allosteric sites when THC was bound in the OS site, only a reduction in the number of interactions in the AS3 site was observed (Figure 10), compared to the results of the first part of this study.

THC bound to CB1 receptor in the orthosteric site was stabilized, determinate by the low root mean square desviation, RMSD, less than 2 Å (Figure 11A). However, this stabilization was lower in the complex CB1-THC (higher RMSD) (Figure 10A). In relation to RMSD and RMSF of the CB1 protein, the values were lower in the complex CB1-THC (Figure 11B and 11C).

Discussion

In the last few years, different molecules have been proposed to act as positive (PAMs) or negative allosteric modulators (NAMs) for CB1. The presence of allosteric sites different from the orthosteric site where agonists and antagonists bind has been hypothesized. Also, attempts have been made to structurally identify the localization of PAMs and NAMs binding sites in CB1.³⁵ Thus, this study evaluated the interaction of CBD in the orthosteric and two allosteric sites of the CB1 receptor through molecular dynamics simulations, identifying that in the AS1 site, the CBD is the best stabilizer and has the best affinity value, demonstrated by the lowest value of ΔG_{Bind} . Furthermore, the action of CBD like negative allosteric modulator was evaluated using THC as exogenous agonist, determining that when CBD binds on allosteric sites (AS1 or AS3) the affinity of THC for the CB1 receptor is decreased (increase in the values of ΔG_{Bind}). But the binding in the allosteric site AS3 is the one that most affects the affinity of THC, as well as the type and number of interactions between receptor-ligand. Our results are

based on the estimated values of binding free energy, the identification of the most important contributions of the polar and non-polar contacts between CBD and the different binding sites in CB1, RMD and RMSF and the type interactions analyzed by 2D diagram.

The simulations of the complexes were performed using the complete protein, both the intermembrane and the extramembrane region, which increases the similarity of CB1-ligand interactions in the physiological environment. Most studies use incomplete CB1, without the extramembrane region, which can decrease the computational cost, but disregard the effect that this relevant part of the CB1 receptor can have on interactions with CBD ligand.³⁶

Interactions diagram 2D together with the molecular docking showed that although in the vicinity of the CBD ligand have amino acids with hydrophilic characteristics, when interactions are measured, which takes into account the amino acid angle and distance, approximately 80% of the interactions are hydrophobic in all analyzed sites. Furthermore, when the interaction diagram 2D was done in the middle and at the end of the molecular dynamic simulation, it is observed that the ligand CBD is mostly stabilized by the presence of alkyl and pi-alkyl hydrophobic interactions with the side chain of the Leu, Val, Ile, Arg and Phe residues.

The CBD appears to have a fluid affinity for both allosteric and orthosteric sites at CB1 receptors.³⁷ Based on binding free energy values, we propose that through dynamic analysis, CBD has a high affinity for allosteric site 1 (AS1) in the CB1 receptor. This can be explained to the fact CBD can mediate NAM and antagonistic effects at CB1 at concentrations well below the reported affinity (K_i) values of CBD at the orthosteric site of CB1 receptors, suggesting that a high-affinity CBD binding site distinct from the orthosteric site can exist.^{11, 38-40}

For both CBD and CB1, the lowest RMSDs of their bound conformations were obtained in the molecular simulations at the AS1 site, favoring the stability of CBD at that site. Based on the AUC values, it indicates that CBD is simulations using DM are the best choice when a ligand-protein complex is to be studied, as in them the flexibility of proteins and ligands during their interaction are taken into account.^{11, 41} These results confirm that the interaction between CB1 and CBD associated at the AS1 site provides structural stability to both the receptor and the ligand, and this stability may be explaining the higher affinity of the ligand determined by the binding free energy. Furthermore, the native structure of the CB1 receptor was maintained during the 100 ns of molecular dynamics.

In relation to the evaluation of CBD as negative allosteric modulator, in vitro studies on characterization of the NAM activity of phytocannabinoid CBD has been performed¹¹. Here, we have used computational methods and binding free energy estimation to study the

modulation exerted by cannabidiol on the effects of delta-9-tetrahydrocannabinol (THC) in the cannabinoid receptor type 1, evaluating the best site to the allosteric action of CBD. Our results demonstrate that CBD is able to bind in a allosteric site of the CB1 receptor (AS1 or AS3), but when the binding energy is estimate the binding of CBD in AS3 promote conformational and energetic changes leading to a high reduction (81.2% more reduced) in the affinity of the THC ligand to the receptor.

Our results suggest that alkyl and Pi-alkyl interactions are essential in the CBD and THC stabilization in the binding site, allosteric and orthosteric, respectively. And the function of extracellular and intracellular regions suggests that incorporation of both segments is important for the study of allosteric mechanisms of CBD and binding free energy estimation.

We concluded that the allosteric site 3 is the interaction site with the best energetic and structural characteristics for the negative allosteric modulation of CBD. The largest contribution to the interaction energy is made by the amino acid residues Val91 and Val33 from the CB1 receptor, whose presence is stable in all systems analyzed. Those amino acids interacting via hydrophobic bonds and maintaining the affinity of CB1 to the CBD ligand in AS3.

1. ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank the National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq), the Brazilian Federal Agency for the Support and Evaluation of Graduate Education (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES), CENAPAD-SP National Center for High Performance Processing (UNICAMP, Campinas, Brazil) and Universidade Federal de Viçosa (UFV, Viçosa, Brazil). The research was developed with the help of the computer cluster managed by the UFV Information Technology Board (DTI).

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

1. Pertwee RG. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: Δ^9 -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin. *Br. J. Pharmacol.* 2008;153:199-215.
2. Perucca E. Cannabinoids in the treatment of epilepsy: hard evidence at last?. *J. Epilepsy Res.* 2017;7:61.
3. Conn P, Jeffrey AC, Craig WL. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2009;8.1:41-54.
4. Scott CE, Kendall DA. Assessing allosteric modulation of CB1 at the receptor and cellular levels. *Methods Enzymol.* 2017;593:317-342.
5. Shore M, Baillie L, Hurst H, Navas F, Seltzman H, Marcu P, Mary A, Ruth R, Patricia R. Allosteric modulation of a cannabinoid G protein-coupled receptor: binding site elucidation and relationship to G protein signaling. *J. Biol. Chem.* 2014;289:5828-5845.

6. Picone P, Kendall A. Minireview: From the bench, toward the clinic: therapeutic opportunities for cannabinoid receptor modulation. *J. Mol. Endocrinol.* 2015;29: 801-813.
7. Ignatowska-Jankowska M, Baillie L, Kinsey S, Crowe M, Ghosh S, Owens A, Damaj M, Poklis J, Wiley L, Zanda M, Zanato C, Greig R, Lichtman H, Ross A. A Cannabinoid CB1 Receptor-Positive Allosteric Modulator Reduces Neuropathic Pain in the Mouse with No Psychoactive Effects. *Neuropsychopharmacology.* 2015;40:2948-2959.
8. Platania CBM, Bucolo C. Molecular Dynamics Simulation Techniques as Tools in Drug Discovery and Pharmacology: A Focus on Allosteric Drugs. In *Allostery. Humana.* 2021:245-254.
9. Nguyen T, Li JX, Thomas BF, Wiley JL, Kenakin TP, Zhang Y. Allosteric modulation: an alternate approach targeting the cannabinoid CB1 receptor. *Med. Res. Rev.* 2017;37:441-474.
10. Conn PJ, Christopoulos A, Lindsley CW. Allosteric modulators of GPCRs: a novel approach for the treatment of CNS disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2009;8:41-54.
11. Laprairie B, Bagher M, Kelly M, Denovan-Wright M. Cannabidiol is a negative allosteric modulator of the cannabinoid CB1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 2015;172:4790-4805.
12. Hryhorowicz S, Kaczmarek-Ryś M, Andrzejewska A, Staszak K, Hryhorowicz M, Korcz A, Słomski R. Allosteric modulation of cannabinoid receptor 1-Current challenges and future opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20(23):5874.
13. May LT, Leach K, Sexton PM, Christopoulos A. Allosteric modulation of G protein-coupled receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2007;47:1-51.
14. Sliwoski G, Kothiwale S, Meiler J, Lowe EW. Computational methods in drug discovery. *Pharmacol. Rev.* 2014;66(1):334-395.
15. Wang L, Ma C, Wipf P, Liu H, Su W, Xie XQ. TargetHunter: an *in silico* target identification tool for predicting therapeutic potential of small organic molecules based on chemogenomic database. *AAPS J.* 2013;15(2):395-406.

16. Büyüköztürk O, Buehler MJ, Lau D, Tuakta C. Structural solution using molecular dynamics: Fundamentals and a case study of epoxy-silica interface. *Int J Solids Struct.* 2011;48:2131-2140.
17. Gapsys V, de Groot BL, Briones R. Computational analysis of local membrane properties. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2013;27(10):845-858.
18. Thangsunan P, Kittiwachana S, Meepowpan P, Kungwan N, Prangkio P, Hannongbua S, Suree N. Rapid activity prediction of HIV-1 integrase inhibitors: Harnessing docking energetic components for empirical scoring by chemometric and artificial neural network approaches. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 2016;30(6):471–488.
19. Heinz DW, Baase WA, Dahlquist FW, Matthews BW. How amino-acid insertions are allowed in an α -helix of T4 lysozyme. *Nature.* 1993;361(6412):561-564.
20. Shao Z, Yin J, Chapman K, Grzemska M, Clark L, Wang J, Rosenbaum DM. High-resolution crystal structure of the human CB1 cannabinoid receptor. *Nature.* 2016;540:602.
21. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature protocols.* 2015;10(6):845-858.
22. Irwin J, Sterling T, Mysinger M, Bolstad S, Coleman RG. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J. Chem. Inf. Model.* 2012;52:1757-1768.
23. Zoete V, Cuendet MA, Grosdidier A, Michielin O, SwissParam, a Fast Force Field Generation Tool For Small Organic Molecules. *J. Comput. Chem.* 2011;32:2359-2368.
24. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, Olson A J.. Autodock4 and AutoDockTools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem.* 2009;16:2785-91.
25. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. *J. Comput. Chem.* 2010;31:455-461.

26. Sabatucci A, Tortolani D, Dainese E, Maccarrone M. In silico mapping of allosteric ligand binding sites in type-1 cannabinoid receptor. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 2018;65:21-28.
27. Shim JY, Ahn KH, Kendall DA. Molecular Basis of Cannabinoid CB1 Receptor Coupling to the G Protein Heterotrimer Gai $\beta\gamma$ identification of key cb1 contacts with the c-terminal helix $\alpha 5$ of Gai. *J. Biol. Chem.* 2013;288:32449-32465.
28. Huang J, Rauscher S, Nawrocki G, Ran T, Feig M, de Groot BL, Grubmüller H, MacKerell AD. CHARMM36: An improved force field for folded and intrinsically disordered proteins. *Nature Methods.* 2017;14:71-73.
29. Lomize MA, Pogozheva ID, Joo H, Mosberg HI, Lomize AL. OPM database and PPM webserver: resources for positioning of proteins in membranes. *Nucleic Acids Res.* 2012;40:D370-D376.
30. Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graph.* 1996;14:33-38.
31. Kucerka N, Trisiran-Nagle S, Nagle JF. Structure of fully hydrated fluid phase lipid bilayers with monounsaturated chains. *J. Membr. Biol.* 2006;20:193-202.
32. Klauda JB, Venable RM, Freites JA, O'connor JW, Tobias DJ, Mondragon-Ramirez C, Vorobyov I, Mackerell Jr.AD, Pastor RW. Update of the CHARMM All-Atom additive force field for lipids: validation on six lipid types. *J. Phys. Chem. B.* 2010;114:7830-7843.
33. Aksimentiev A, Sotomayor M, Wells D. Membrane proteins tutorial. University of Illinois at Urbana-Champaign. 2012.
34. Hansson T, Marelius J, Aqvist J. Ligand binding affinity prediction by linear interaction energy methods. *J. Comput. Aided Mol. Des.* 1998;12:27-35.
35. Moreira IS, Shi L, Freyberg Z, Ericksen SS, Weinstein H, Javitch JA. Structural basis of dopamine receptor activation. *Humana Press*, Totowa, NJ. 2010:47-73.

36. Ji B, Liu S, He X, Man VH, Xie XQ, Wang J. Prediction of the Binding Affinities and Selectivity for CB1 and CB2 Ligands Using Homology Modeling, Molecular Docking, Molecular Dynamics Simulations, and MM-PBSA Binding Free Energy Calculations. *ACS Chem. Neurosci.* 2020;11(8):1139-1158.
37. Tham M, Yilmaz O, Alaverdashvili M, Kelly ME, Denovan-Wright EM, Laprairie R B. Allosteric and orthosteric pharmacology of cannabidiol and cannabidiol-dimethylheptyl at the type 1 and type 2 cannabinoid receptors. *Br. J. Pharmacol.* 2019;176:1455-1469.
38. Laprairie RB, Bagher AM, Kelly ME, Dupré DJ, Denovan-Wright EM. Type 1 cannabinoid receptor ligands display functional selectivity in a cell culture model of striatal medium spiny projection neurons. *J. Biol. Chem.* 2014;36:24845-24862.
39. McPartland JM, Duncan M, Di Marzo V, Pertwee RG. Are cannabidiol and Δ^9 -tetrahydrocannabivarin negative modulators of the endocannabinoid system? A systematic review. *Br. J. Pharmacol.* 2015;172:737-753.
40. Straiker A, Dvorakova M, Zimmowitch A, Mackie K. Cannabidiol inhibits endocannabinoid signaling in autaptic hippocampal neurons. *Mol. Pharmacol.* 2018;94:743-748.
41. Kurcinski M, Pawel Ciemny M, Oleniecki T, Kuriata A, Badaczewska-Dawid AE, Kolinski A, Kmiecik S. CABS-dock standalone: a toolbox for flexible protein–peptide docking. *Bioinformatics.* 2019;35(20):4170-4172.

Figures

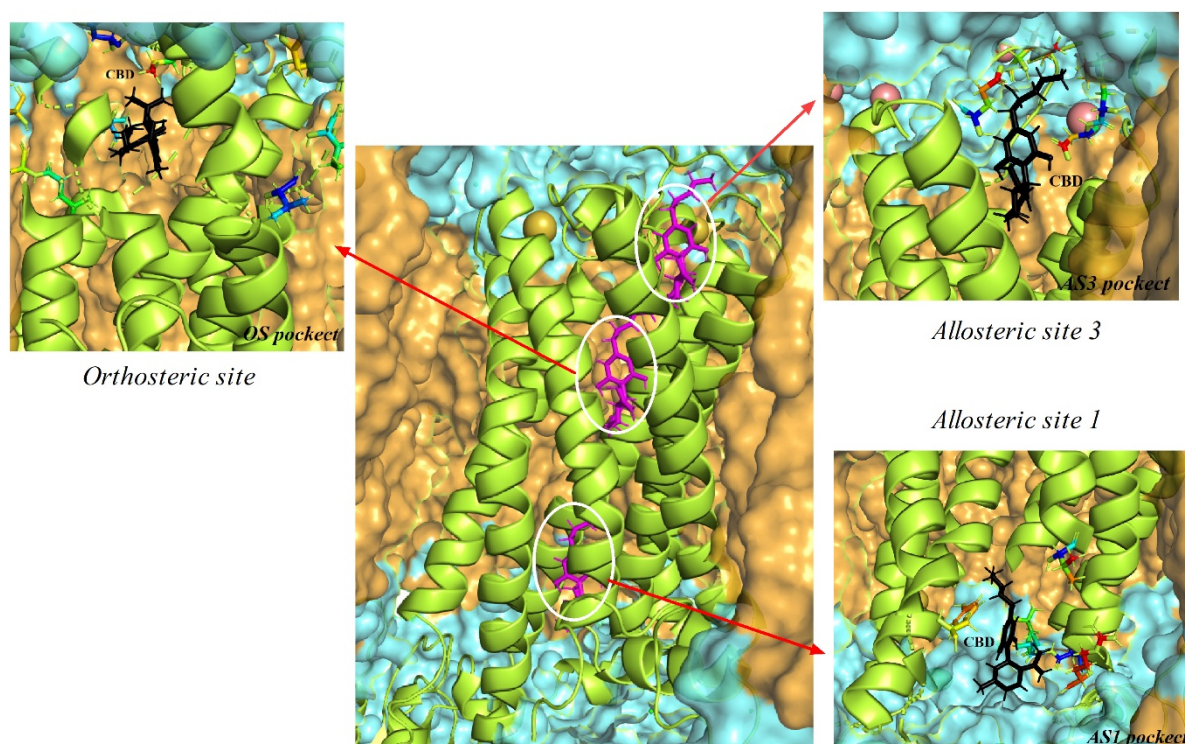


Figure 1. Structural binding mode between Cannabinoid receptor type 1 (CB1) and Cannabidiol in the orthosteric site, allosteric site 1 and allosteric site 3 (C). Sticks shape representing Cannabidiol ligand (magenta and black), green cartoon structure representing of CB1 protein, blue surface is the water box and brown surface is POPC membrane. The CBD interaction in the orthosteric site of CB1 showed the binding between the ligand and residues Phe82, Leu454, Val108. The interaction of Cannabidiol in the allosteric site 1 of CB1 showed the participation of the transmembrane region, the hydrophobic and non-polar residues Ile68, Leu418, Tyr474, polar uncharged residue Ser64 and positive charge and polar residue like Arg477 and the CBD binding in the allosteric site 3 of CB1 showed the participation of residues with nonpolar and side chain like Val33, Phe89 and Phe86 and residues with positive charge and polar side chain such as His90 and His93 were observed.

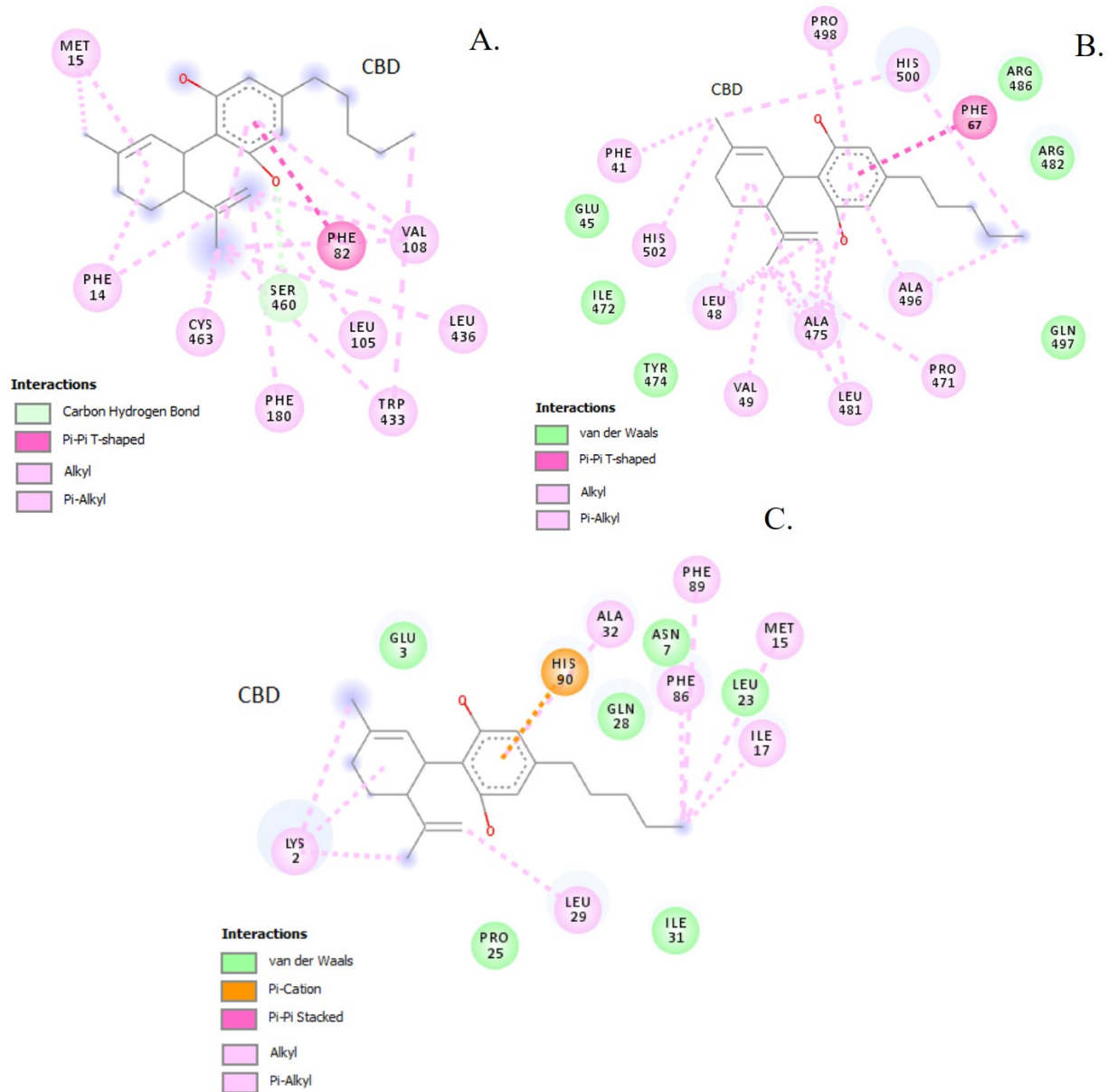


Figure 2. Interactions diagram 2D of the CBD-CB1 complexes before molecular dynamic simulation. (A) CBD bound to orthosteric site (OS); (B) CBD bound to allosteric site 1 (AS1) and (C) CBD bound to allosteric site 3 (AS3). Color ball and pointed line indicate the interaction type between CBD and residues side chains of CB1.

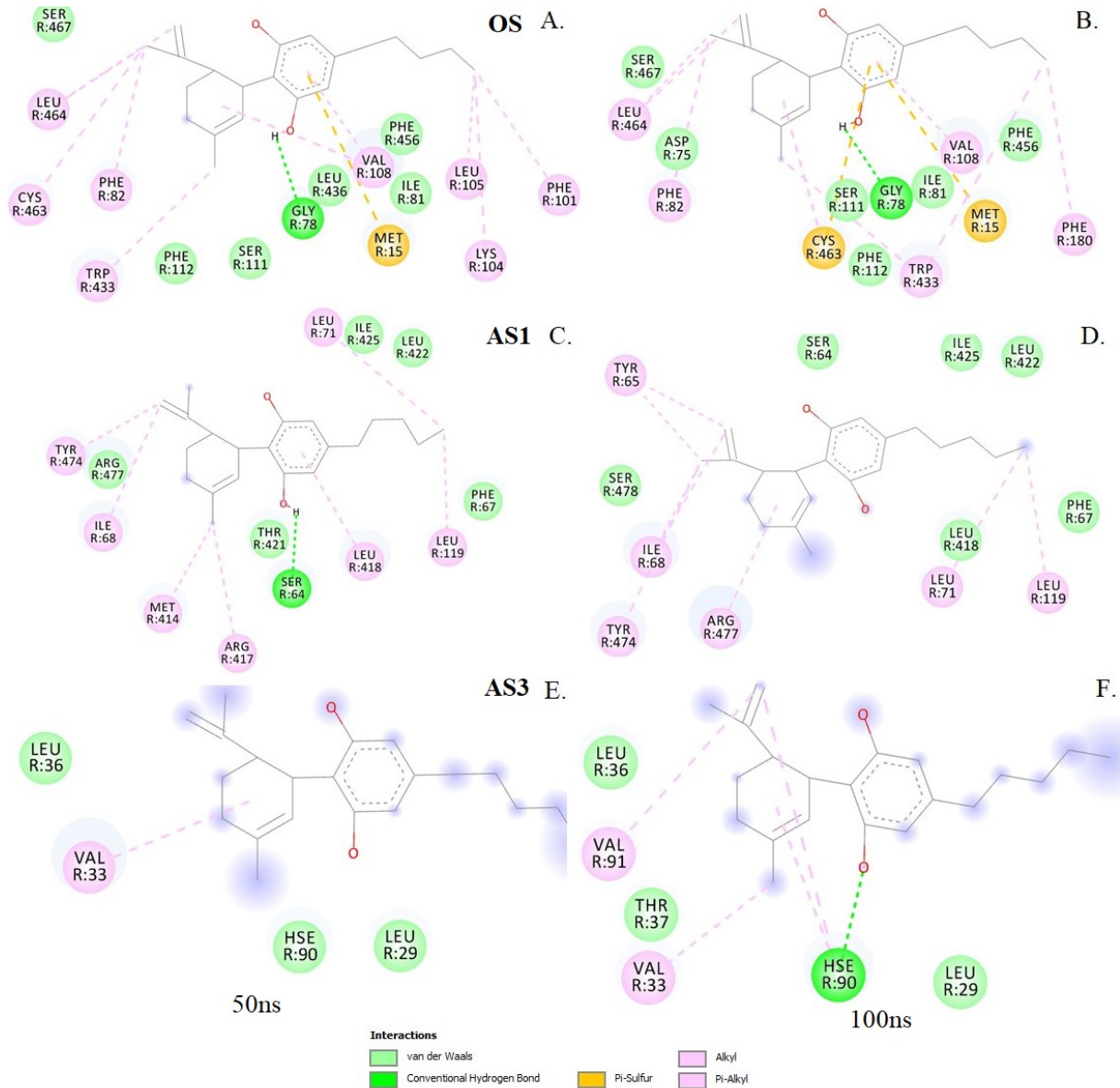


Figure 3. Interactions diagram 2D e of the CBD-CB1 complexes in the middle (50ns) and in the end (100ns) of the molecular dynamic simulation in POPC membrane. (A and B) CBD bound to orthosteric site (OS); (C and D) CBD bound to allosteric site 1 (AS1) and (E and F) CBD bound to allosteric site 3 (AS3). Color ball and pointed line indicate the interaction type between CBD and residues side chains of CB1.

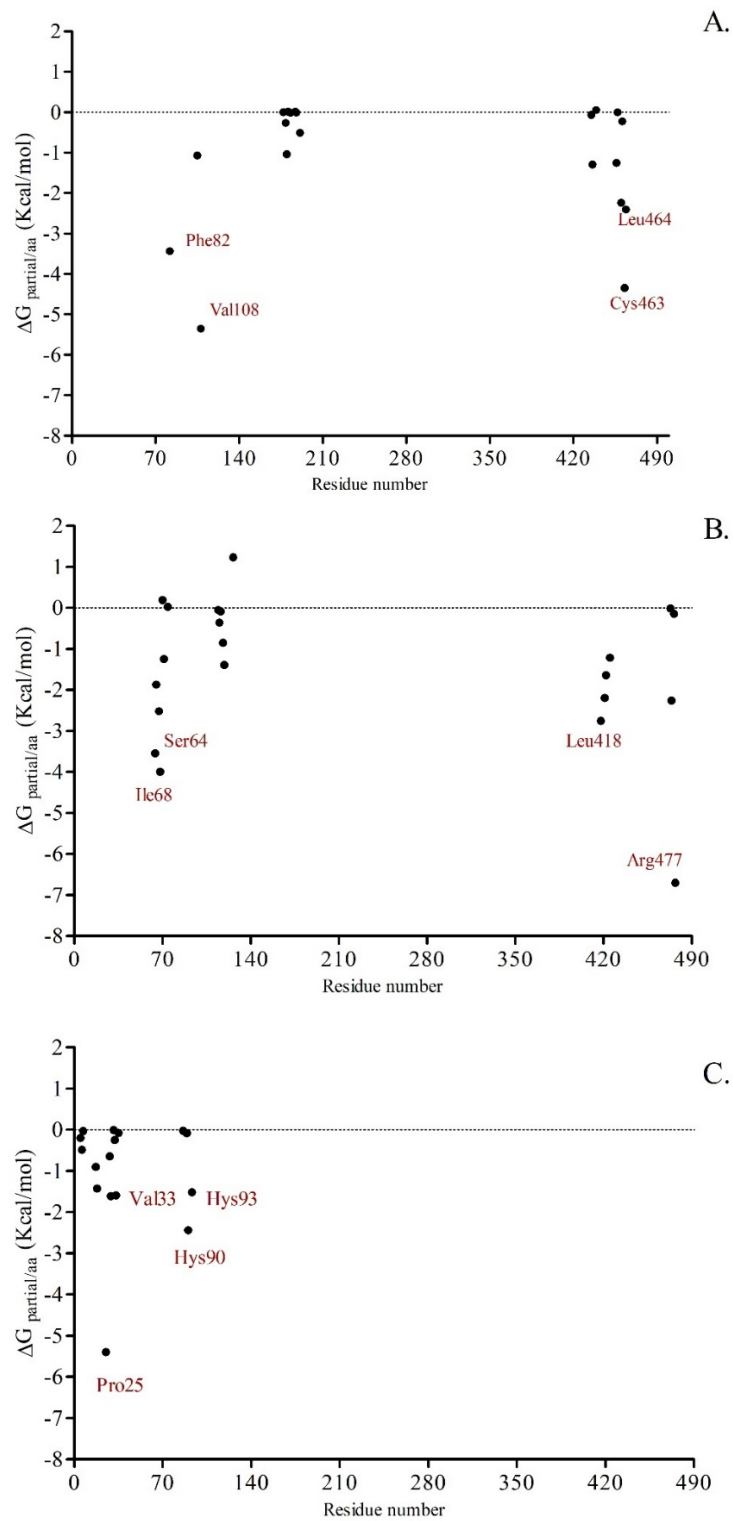


Figure 4. Per-residue interaction energy decomposition of CB1-ligand CBD, calculated from molecular dynamic simulation of the complexes in POPC membrane (A) CBD bound to orthosteric site (OS); (B) CBD bound to allosteric site 1 (AS1) and (C) CBD bound to allosteric site 3 (AS3). Residues with high energy contribution (the energy contribution ≤ -1.0 Kcal/mol) were labeled.

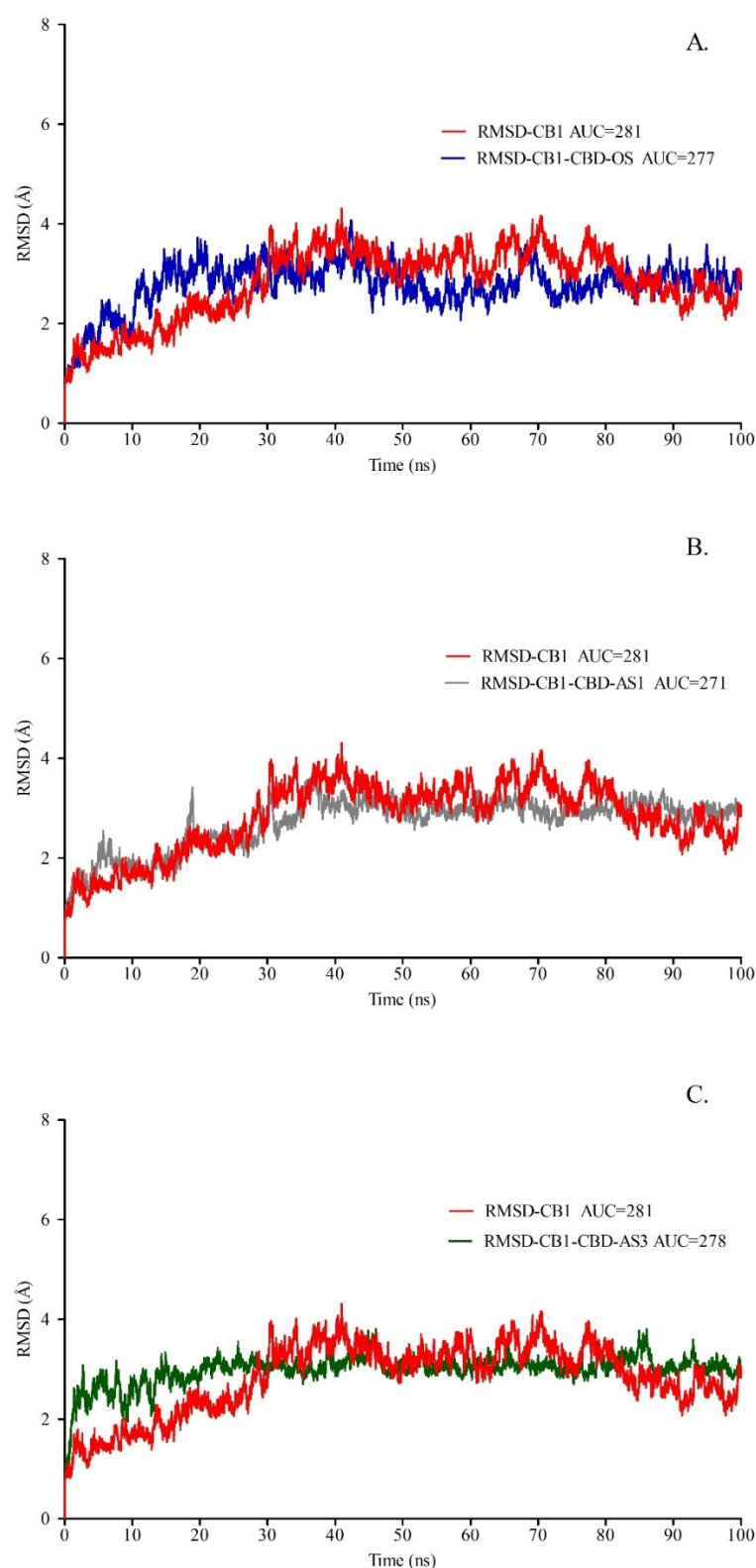


Figure 5 RMSD values of Cannabinoid receptor type 1 (CB1) obtained from molecular dynamic simulations in POPC. Each RMSD curve were also compared against CB1 structure (red lines). (A) CBD bound to orthosteric site (OS); (B) CBD bound to allosteric site 1 (AS1) and (C) CBD bound to allosteric site 3 (AS3).

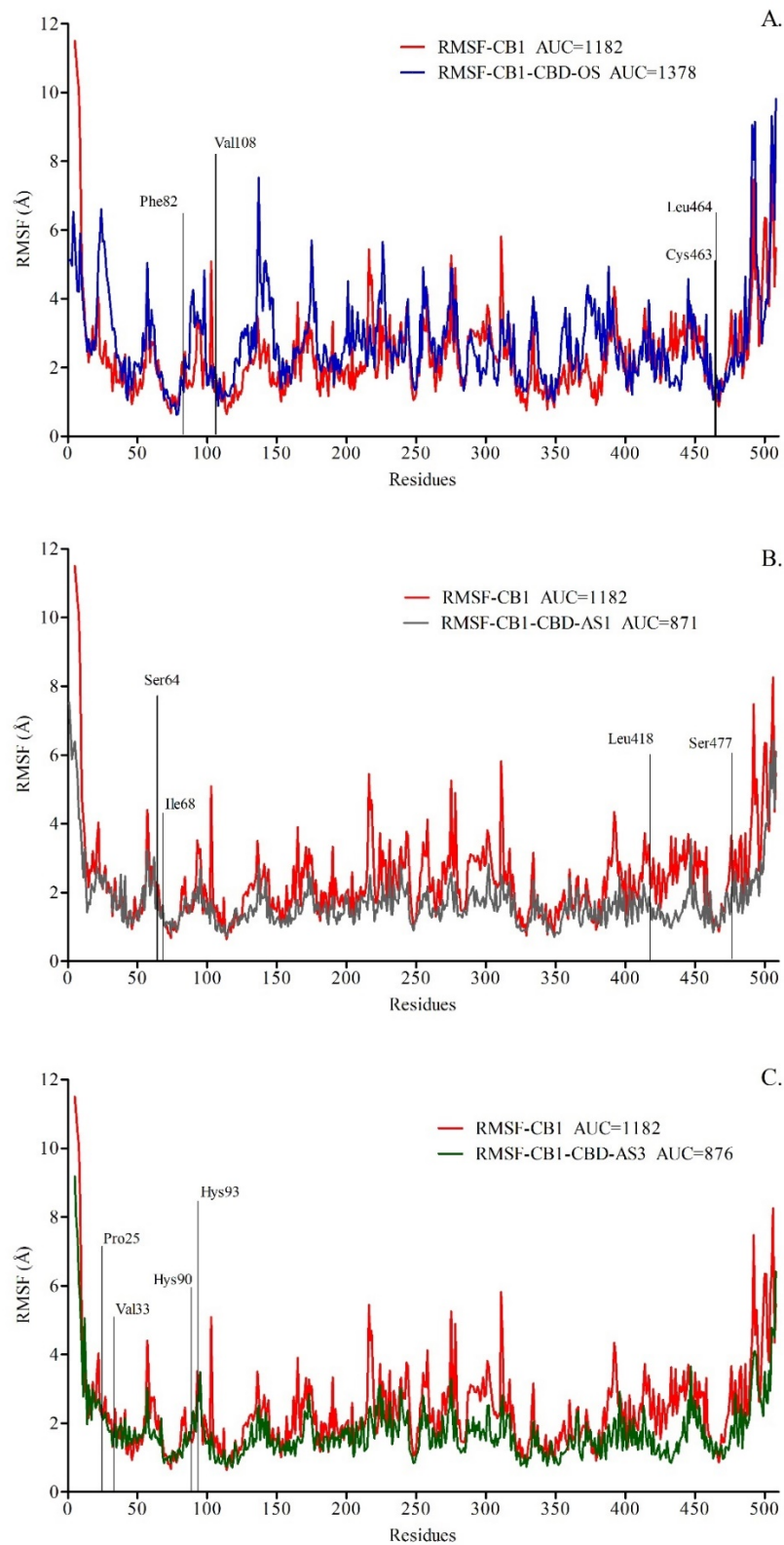


Figure 6. RMSF values of Cannabinoid receptor type 1 (CB1) obtained from molecular dynamic simulations in POPC. Each RMSF curve were also compared against CB1 structure (red lines). (A) CBD bound to orthosteric site (OS); (B) CBD bound to allosteric site 1 (AS1) and (C) CBD bound to allosteric site 3 (AS3).

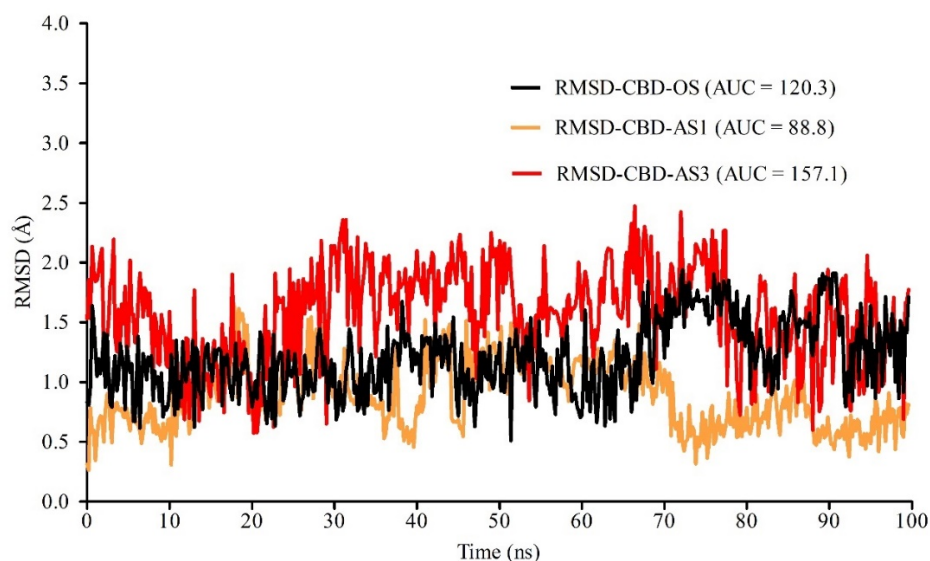


Figure 7. RMSD values of Cannabidiol (CBD) obtained from MD simulations in POPC, when interacting with Cannabinoid receptor type 1 (CB1) in the positions orthosteric (OS), allosteric 1 (AS1) and allosteric 3 sites (AS3).

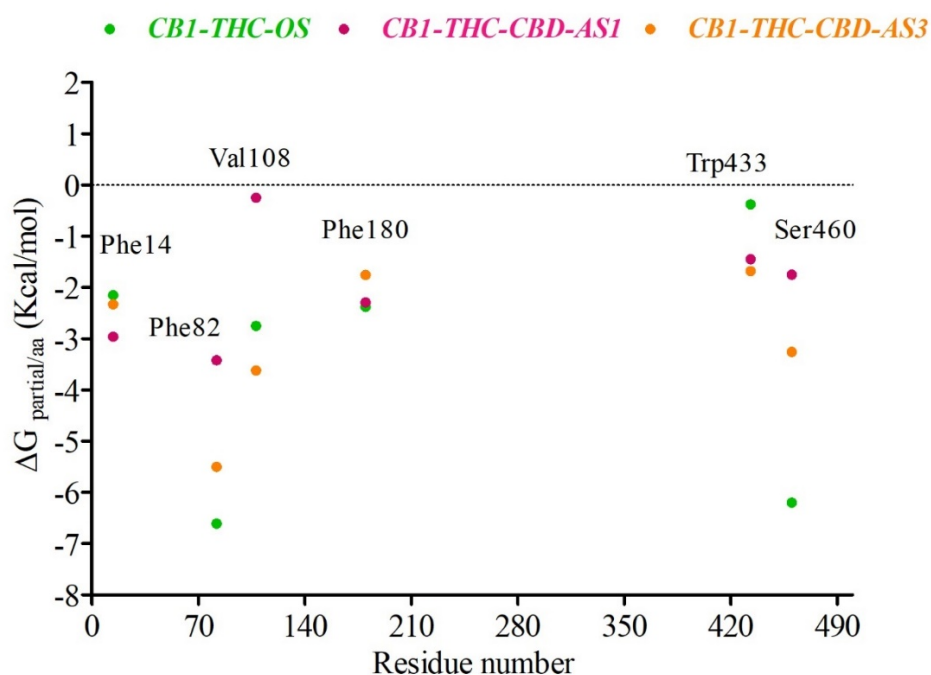


Figure 8. Per-residue interaction energy decomposition of CB1-ligand THC, calculated from molecular dynamic simulation of the complexes in POPC membrane. Green ball: THC bound in the orthosteric site (CB1-THC-OS); pink ball: CBD bound to allosteric site 1 (AS1) and THC bound in OS (CB1-THC-CBD-AS1); and orange ball: CBD bound to allosteric site 3 (AS3) and THC bound in OS (CB1-THC-CBD-AS3).

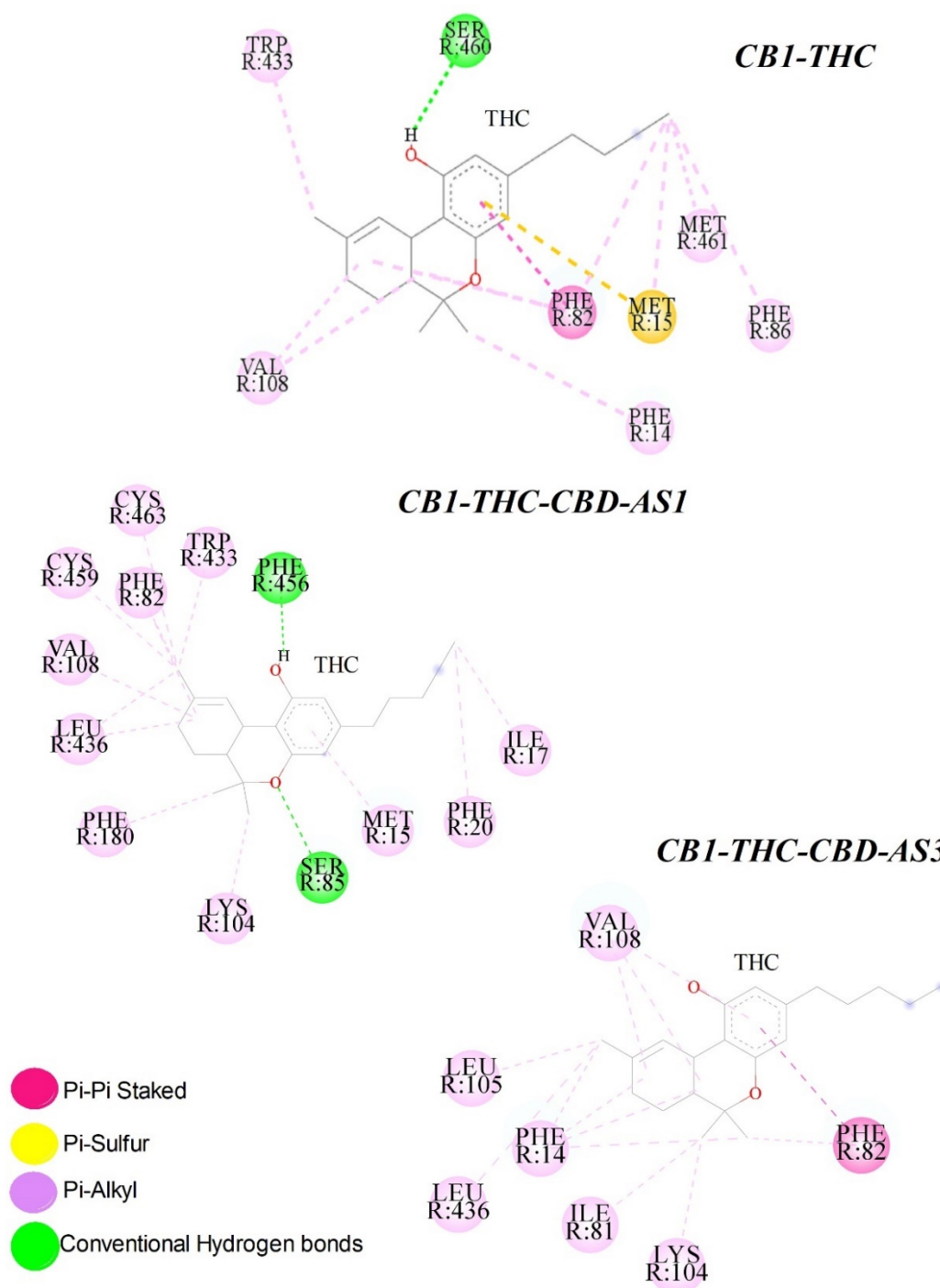


Figure 9. Interactions diagram 2D of the CB1-THC complexes after molecular docking and dynamic simulations in POPC membrane. Complex 1 (CB1-THC): one THC molecule bound at orthosteric site (OS), complex 2 (CB1-THC-CBD-AS1): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 1 (AS1), and complex 3 (CB1-CBD-OS-AS3): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 3 (AS3).

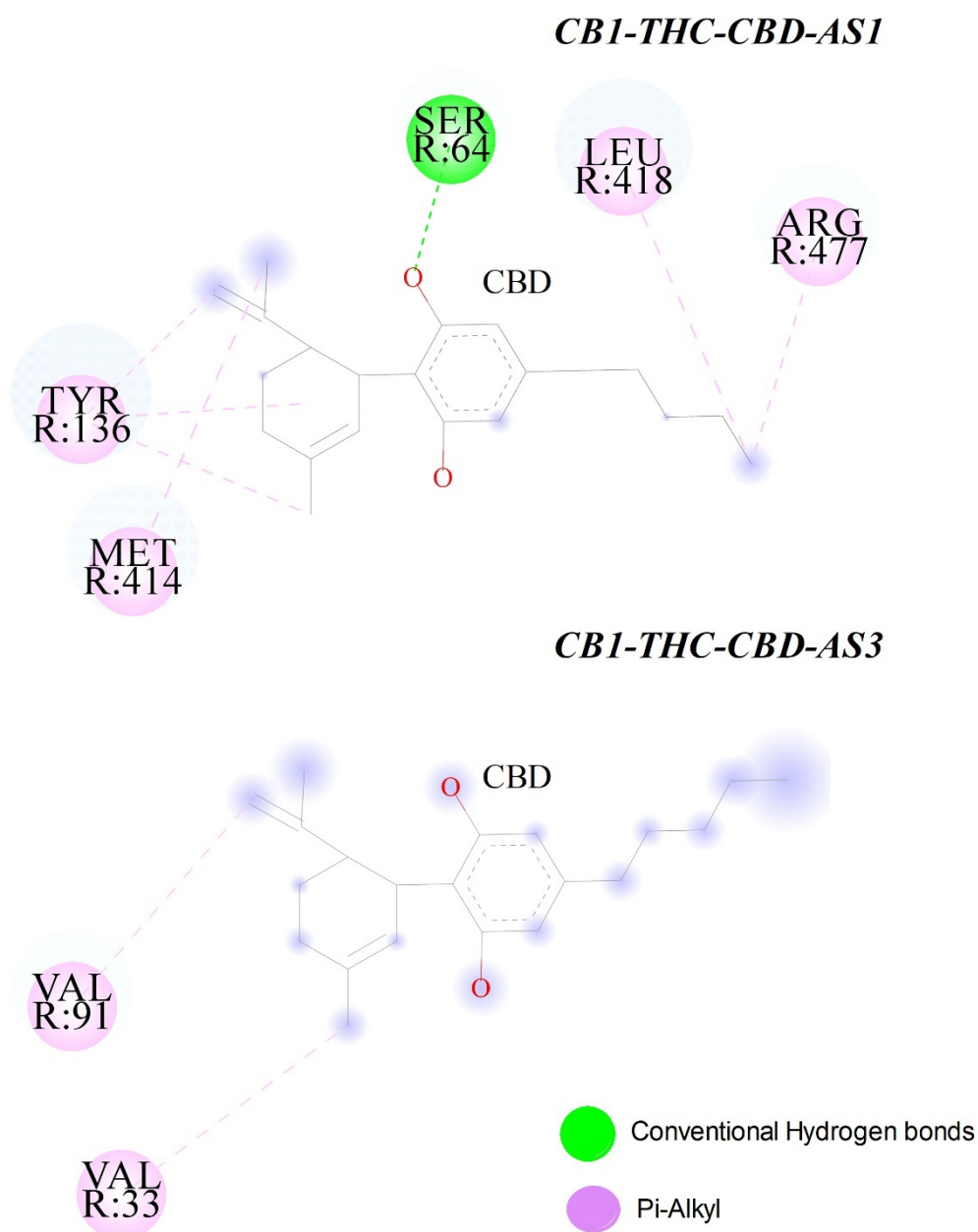


Figure 10. Interactions diagram 2D of the CB1-CBD complexes after molecular docking and dynamic simulations in POPC membrane. Complex 2 (CB1-THC-CBD-AS1): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 1 (AS1), and complex 3 (CB1-CBD-OS-AS3): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 3 (AS3).

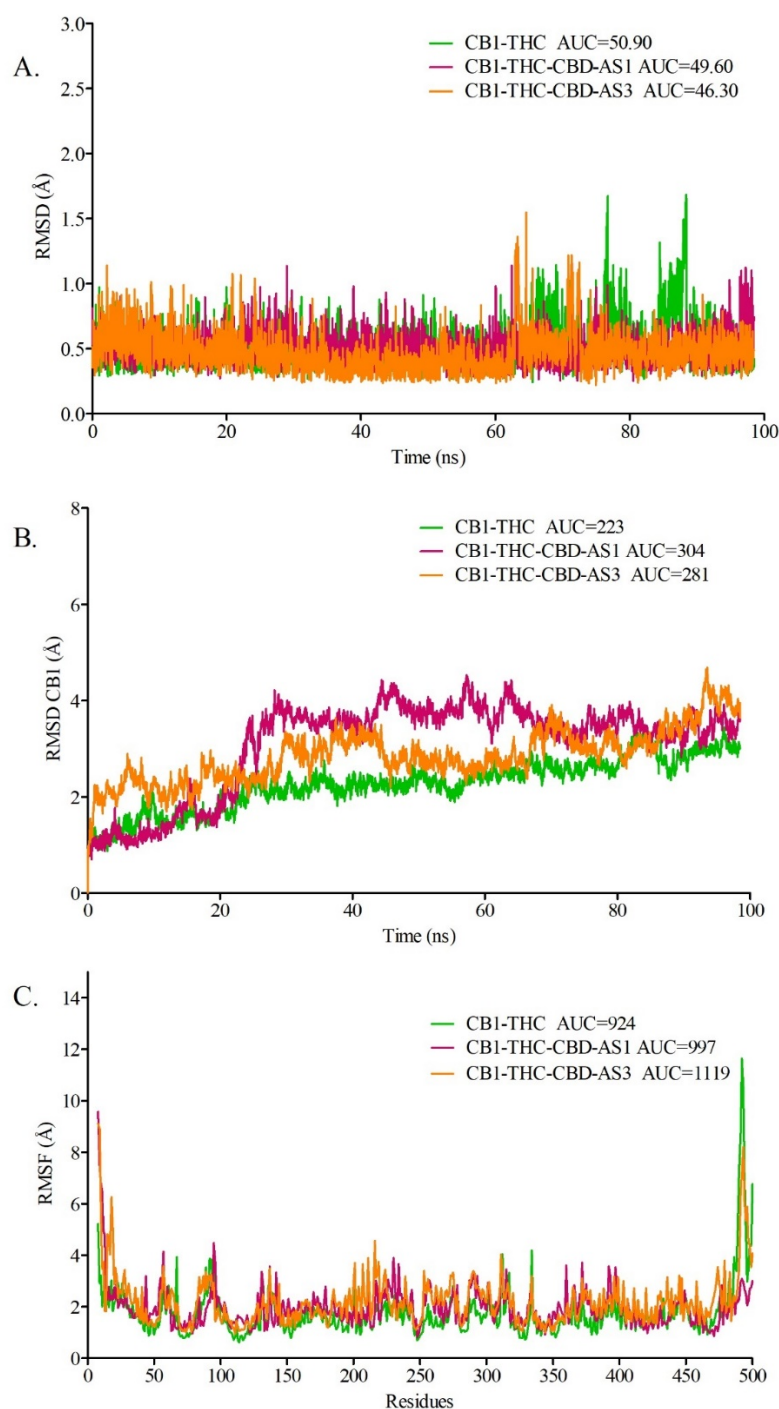
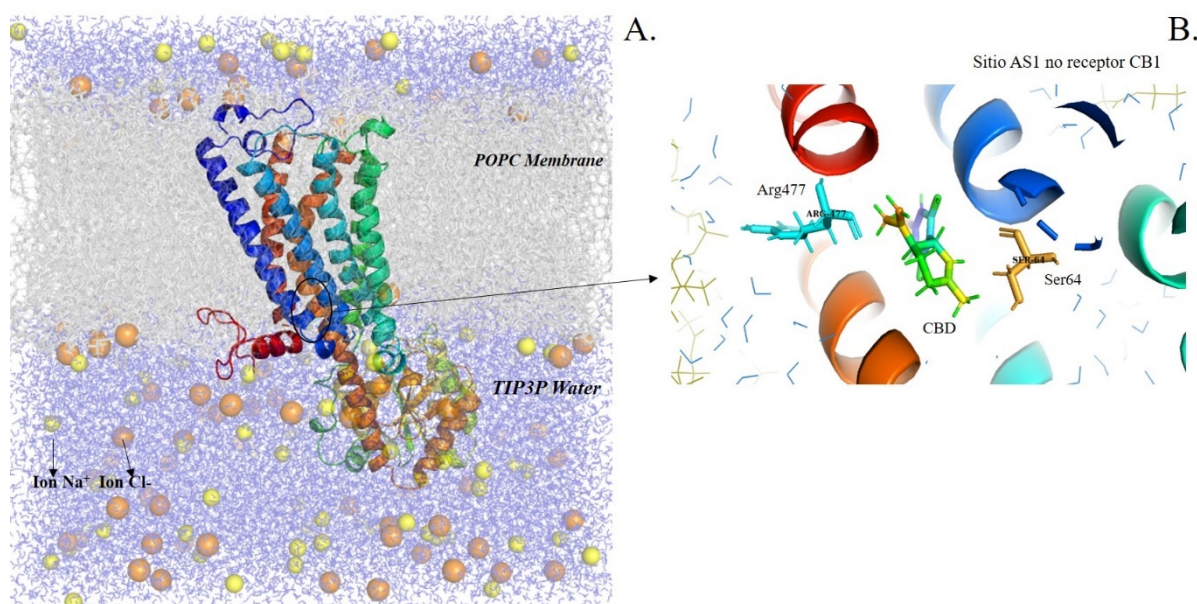
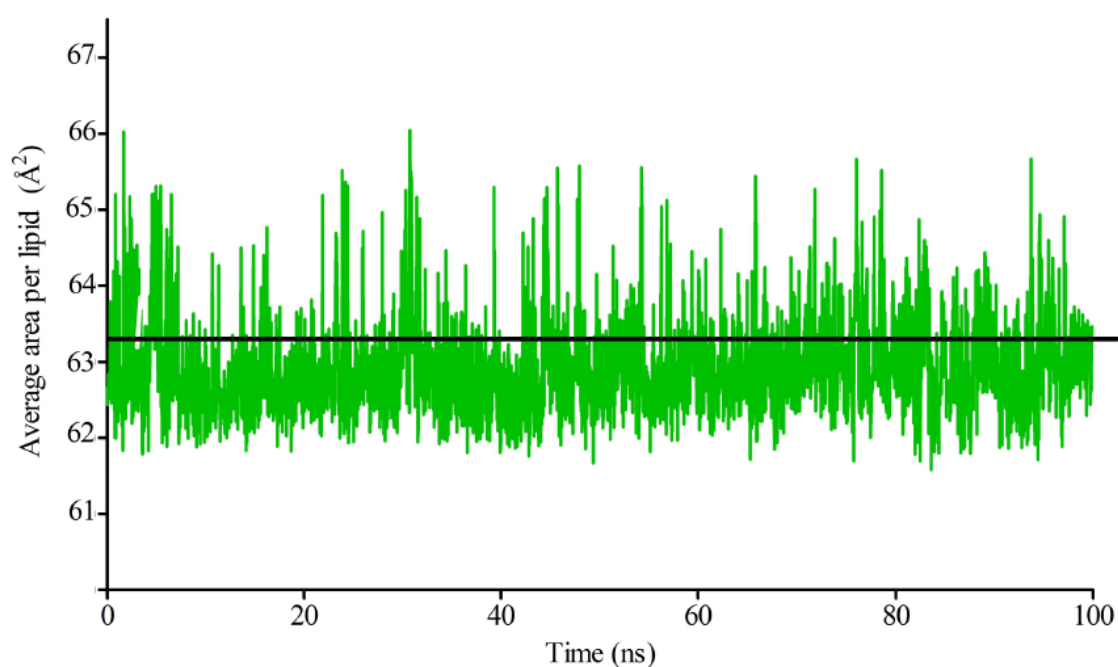


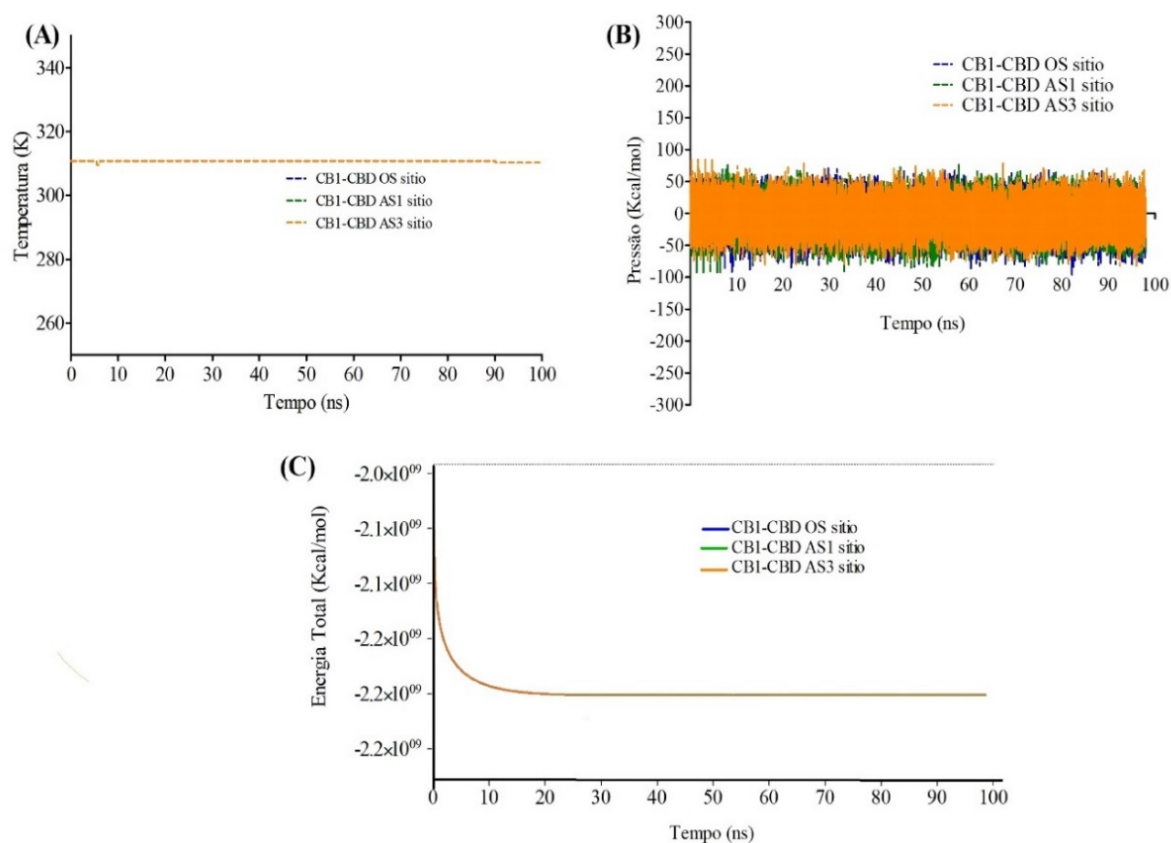
Figure 11. (A) RMSD values of Tetrahydrocannabinol (THC), (B) RMSD values of Cannabinoid receptor type 1 (CB1), and (C) RMSF values of Cannabinoid receptor type 1 (CB1) obtained from molecular dynamic simulations in POPC. Green lines: complex 1 (CB1-THC): one THC molecule bound at orthosteric site (OS); pink lines: complex 2 (CB1-THC-CBD-AS1): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 1 (AS1), and Orange lines: complex 3 (CB1-CBD-OS-AS3): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 3 (AS3).



Supplementary Figure 1. (A) Complete perspective of starting structures for MD simulations. CB1 shown in cartoon representation in rainbow. Top and bottom lipid layer shown in gray. Water model TIP3P shown in blue and ions shown in balls form, orange color for Na⁺ and yellow color for Cl⁻. (B) CBD ligand shown as thick sticks colored in green in interaction with the residues Arg 477 and Ser64 in allosteric site 1 of CB1.



Supplementary Figure 2. Area per lipid of the total simulation with time of 100 ns. The black line is the average value of the area results per lipid.



Supplementary Figure 3. Temperature (A), pressure (B) and total energy (C) of the complex Cannabinoid receptor type 1 (CB1)-CBD bound to orthosteric site (OS), bound to allosteric site 1 (AS1) and bound to allosteric site 3 (AS3) after molecular dynamic simulation in POPC.

Tables

Table 1 Free binding energy values ($kcal/mol$) calculated by molecular dynamic simulation using LIE method of the interaction between CBD and CB1 protein in the several sites

SITE	$\Delta G_{bind(DM)}(Kcal/mol)$
POPC	
OS	-9.3 ± 0.05
AS1	-14.4 ± 2.03
AS3	-11.9 ± 1.08

Table 2. Binding free energy for the TCH ligand in the systems analyzed at the CB1 receptor. Complex 1 (CB1-THC): one THC molecule bound at orthosteric site (OS), complex 2 (CB1-THC-CBD-AS1): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 1 (AS1), and complex 3 (CB1-CBD-OS-AS3): one THC molecule bound at orthosteric site (OS) and one CBD bound to allosteric site 3 (AS3).

Site	ΔG (Kcal/mol): Molecular Dynamic
CB1-THC	-15.85 ± 0.12
CB1-THC-CBD-AS1	THC-OS: -6.47 ± 0.43 CBD-AS1: -12.31 ± 1.83
CB1-THC-CBD-AS3	THC-OS: -2.99 ± 0.23 CBD-AS3: -9.68 ± 1.04

Supplementary Table 1 Results of tridimensional model protein generated by Phyre2 and model quality analysis of the CB1 receptor

Protein	3D Model Protein (Phyre2)			Ramachandran Plot quality			Protein Structure Analysis	ERRAT
	Minimum coincidence	Minimum % i.d	Template	Allowed	General	Disallowed	Overall model quality	Quality factor
CB1	100	30	20	91.9	6.4	1.7	-4.02	92.46

Supplementary Table 2 Average values of the Electrostatic and Van der Waals energy (Kcal/mol) between the ligand (l) and its surroundings (s) in the receptor, which can be either free in solution or bound to the protein.

State Y			Electrostatic energy	Van der Waals energy
POPC	OS	$\langle V_{l-s} \rangle_{bound}$	-7.92	-47.31
Membrane	AS1	$\langle V_{l-s} \rangle_{bound}$	-27.14	-39.99
	AS3	$\langle V_{l-s} \rangle_{bound}$	-18.73	-42.25