

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CAMPUS CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**A BUSCA DE FÁRMACOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DO AUTISMO:
ESTUDOS *IN SILICO* PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES
SELETIVOS DO RECEPTOR 5-HT_{2A}**

ALLANA CRISTINA FAUSTINO MARTINS

CASCAVEL, 2021

ALLANA CRISTINA FAUSTINO MARTINS

**A BUSCA DE FÁRMACOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DO AUTISMO:
ESTUDOS *IN SILICO* PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES
SELETIVOS DO RECEPTOR 5-HT_{2A}**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo

CASCADEL, 2021

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática
do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Faustino Martins, Allana Cristina A busca de fármacos
úteis no tratamento do autismo: estudos in silico para a
identificação de novos ligantes seletivos do receptor 5-
HT2A / Allana Cristina Faustino Martins; orientadora
Eduardo Borges de Melo. -- Cascavel, 2021. 79 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico Campus de Cascavel) --
Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Ciências
Médicas e Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, 2021.

1. Química Medicinal. 2. Modelagem molecular. 3. Transtorno
do Espectro Autista. 4. Inibidores do receptor 5HT2A. I.
Borges de Melo, Eduardo , orient. II. Título.

ALLANA CRISTINA FAUSTINO MARTINS

**A BUSCA DE FÁRMACOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DO AUTISMO:
ESTUDOS IN SILICO PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES
SELETIVOS DO RECEPTOR 5-HT_{2A}**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* de Cascavel, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Prof Dr. Eduardo Borges de Melo

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo
*Universidade Estadual do Oeste do
Paraná*
UNIOESTE



Prof.ª. Dr.ª. Maria Tereza Rojo de
Almeida
*Universidade Estadual do Oeste do
Paraná*
UNIOESTE



Prof. Dr. Favero Reisdofe Paula
Universidade Federal do Pampa
UNIPAMPA

CASCADEL, 2021

BIOGRAFIA RESUMIDA

Allana Cristina Faustino Martins, natural de Cascavel, Paraná, Brasil, nascida em 25 de junho de 1993, possui graduação em Farmácia pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná - UNIOESTE, *Campus* de Cascavel, Paraná (2018). Atualmente, é aluna de doutorado da North Dakota State University (USA) no departamento de Ciências Farmacêuticas, e é mestranda no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, pela Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE, *Campus* de Cascavel, Paraná. Dentro do programa, desenvolve projeto experimental de dissertação na linha de pesquisa de Fármacos e Medicamentos com aplicações na área de Química Medicinal, orientada pelo Prof. Dr. Eduardo Borges de Melo.

*“Quero, um dia, poder dizer
às pessoas que nada foi em
vão. Que o amor existe, que
vale a pena se doar às
amizades e às pessoas, que
a vida é bela sim, e que eu
sempre dei o melhor de mim.
E que valeu a pena!”*

Mário Quintana

DEDICATÓRIA

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus por me permitir concluir mais essa etapa na minha vida, apesar de todas as dificuldades impostas.

Agradecer aos meus pais pela paciência, incentivo, por sempre me apoiarem em todas as minhas decisões e pelo amor incondicional.

Às minhas irmãs por entenderem todos os momentos pelos quais eu passei e por me ajudarem de todas as formas possíveis, com muito amor e carinho.

Às minhas avós que sempre me incentivaram e sempre mostraram um grande orgulho por cada conquista que eu tive ao longo de todos esses anos.

À todos os meus familiares que direta ou indiretamente me forneceram uma palavra amiga em todos os momentos mais difíceis dessa caminhada.

Agradeço ao meu orientador, Eduardo Borges de Melo, por toda a paciência ao longo de todos esses anos de graduação e agora de mestrado, por me conduzir durante a realização deste trabalho e não desistir de mim em nenhum momento, apesar de todas as dificuldades. Sem ele, não teria alcançado tantos objetivos que propus em minha vida.

Agradeço à Luana J. Campos por toda a presteza em me auxiliar em meu projeto, pela paciência e disponibilidade em me auxiliar a compreender todo o estudo realizado.

Agradeço a todos os meus amigos que estiveram por perto nos momentos críticos, me confortando e me incentivando.

Agradeço também a instituição UNIOESTE e todo o corpo docente com o qual tive a oportunidade de aprender e agregar em minha formação, além dos meus colegas de mestrado.

A todos, o meu mais sincero agradecimento!

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação Araucária, ao CNPq (pela bolsa produtividade de E.B. de Melo), a CAPES (pelo programa PROAP) e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE.

**A BUSCA DE FÁRMACOS ÚTEIS NO TRATAMENTO DO AUTISMO:
ESTUDOS *IN SILICO* PARA IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS LIGANTES
SELETIVOS DO RECEPTOR 5-HT_{2A}**

RESUMO

Os receptores de serotonina (5-HT) fazem parte de uma família, a subfamília 5HT₂ é dividida nos receptores 2_A, 2_B e 2_C. O receptor 2_A tem alta afinidade para os fármacos antipsicóticos atípicos clozapina, risperidona e olanzapina e acredita-se que tenha um papel na atividade terapêutica desses fármacos. Atualmente, são necessárias novas estratégias terapêuticas que ofereçam início de ação mais rápido com menos efeitos colaterais e, assim, maior eficácia em uma proporção maior de pacientes com distúrbios neuropsicológicos. O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio de neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na interação social e comunicação, assim como a presença de comportamentos e interesses restritos ou repetitivos. Atualmente, vários alvos terapêuticos já foram descritos como associados a sintomas principais ou periféricos deste Quadro. Porém, até o momento, as poucas intervenções medicamentosas visam o controle de determinados sintomas associados, como convulsões, ansiedade, irritação, falta de sono, e outros. Na maioria dos casos, são medicamentos utilizados comumente na neuropsiquiatria, como ansiolíticos, anticonvulsivantes, etc, utilizados de modo off label, como a risperidona. A risperidona tem como alvos principais os receptores 5-HT_{2A}R e D₂R, locais onde age como antagonista. Porém, este fármaco, embora útil (ou potencialmente útil), foi originalmente e especificamente desenvolvido para o tratamento de pessoas autistas. Assim, este trabalho teve como objetivo principal estudar um conjunto de compostos selecionado da literatura, que foram empregados na identificação de compostos hits possíveis candidatos a antipsicóticos que atuam como bloqueadores do receptor 5-HT_{2A}. A partir destes conjuntos, foram realizados estudos de planejamento de fármacos auxiliado com computador (modelagem molecular, relação estrutura atividade, modelagem farmacofórica e triagem virtual), além de estudos de simulação de Dinâmica Molecular (DM). A abordagem utilizada levou a identificação de compostos que se mostraram, nas simulações de DM, estáveis no sítio de ligação, capazes de manter as interações com os resíduos de aminoácidos importantes para a inibição, de modo similar a risperidona. Esses resultados indicam uma possibilidade desses compostos exibirem um efeito antagonista sobre o receptor 5HT_{2A}. Estes compostos passam então a ser candidatos a ensaios biológicos visando a confirmação dos resultados obtidos.

Palavras chave: inibidores, Química medicinal *in silico*, Modelagem Molecular, Receptores de Serotonina, Transtorno do Espectro Autista (TEA).

THE SEARCH FOR USEFUL DRUGS IN THE TREATMENT OF AUSTISM: *In silico* STUDIES TO IDENTIFY NEW SELECTIVE LIGANTS TO 5-HT_{2A}

ABSTRACT

Serotonin (5-HT) receptors are part of a family, the 5HT₂ subfamily is divided into 2A, 2B and 2C receptors. The 2A receptor has high affinity for the atypical antipsychotic drugs clozapine, risperidone, and olanzapine and is believed to play a role in the therapeutic activity of these drugs. Currently, new therapeutic strategies are needed that offer faster onset of action with fewer side effects and, therefore, greater efficacy in a greater proportion of patients with neuropsychological disorders. Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social interaction and communication, as well as the presence of restricted or repetitive behaviors and interests. Currently, several therapeutic targets have been described as associated with main or peripheral symptoms of this framework. However, so far, the few drug interventions aim to control certain associated symptoms, such as seizures, anxiety, irritation, lack of sleep, and others. In most cases, these are drugs commonly used in neuropsychiatry, such as anxiolytics, anticonvulsants, etc., used off-label, such as risperidone. Risperidone primarily targets the 5-HT_{2A}R and D₂R receptors, where it acts as an antagonist. However, this drug, although useful (or potentially useful), was originally and specifically developed for the treatment of autistic people. Thus, this work had as main objective to study a set of compounds selected from the literature, which were used in the identification of hit compounds possible candidates for antipsychotics that act as 5-HT_{2A} receptor blockers. Based on these sets, computer-aided drug planning studies were carried out (molecular modeling, structure-activity relationship, pharmacophoric modeling and virtual screening), in addition to Molecular Dynamics simulation studies. The approach used led to the identification of compounds that were shown, in the DM simulations, to be stable at the binding site, capable of maintaining interactions with amino acid residues important for inhibition, similarly to risperidone. These results indicate a possibility that these compounds exhibit an antagonistic effect on the 5HT_{2A} receptor. These compounds then become candidates for biological tests aiming at confirming the results obtained.

KEYWORDS: inhibitors, *In silico* Medicinal Chemistry, Molecular Modeling, Molecular Dynamics, Serotonin Receptors, autism spectrum disorder (ASD).

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 2. OBJETIVOS | 20 |
| 2.1 Objetivos gerais | 20 |
| 2.2 Objetivos específicos | 20 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 21 |
| 3.1 Modelagem do conjunto de dados e seleção do ligante mais seletivo. | 21 |
| 3.2 Delineamento do estudo de triagem virtual | 23 |
| 3.3 Dinâmica Molecular | 30 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 4.1 <i>Virtual Screening</i> | 32 |
| 4.2 Análise da simulação de Dinâmica Molecular | 37 |
| 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 50 |
| 6. ARTIGO: “O autismo e o potencial uso de inibidores do receptor tipo 1 _A de vasopressina para seu tratamento”. | 50 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 73 |
| 8. ANEXOS | 76 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Compostos selecionados ao final da etapa de ancoramento molecular, e os valores dos parâmetros utilizados para ajudar neste processo. | 33 |
| Tabela 2. Valores médios de RMSD para os complexos mais estáveis. | 39 |
| Tabela 3. Valores de RMSF dos aminoácidos importantes localizados no sítio de ligação do receptor 5HT _{2A} em Å. | 45 |
| Tabela 4. Análise dos elementos de estrutura secundária da proteína (média %). | 47 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Possíveis neurotransmissores e seus alvos biológicos com potencial envolvimento nos sintomas relacionados ao autismo. | 16 |
| Figura 2. Estruturas 2D dos fármacos já aprovados para uso em portadores de TEA (risperidona e aripiprazol) e em ensaios clínicos (brexpiprazol e cariprazina). | 17 |
| Figura 3. Estrutura tridimensional do receptor dopaminérgico subtipo 2A complexado com o antipsicótico risperidona (no destaque, no formato “spacefill”), arquivo PDB 6A93. | 18 |
| Figura 4. Estrutura básica dos compostos do conjunto (arquivo ASAXUP). | 21 |
| Figura 5. Estrutura do 1-(6-nitro-1,2-benzisotiazol-3-il)-3-piperazina (A). A identificação no artigo original corresponde ao composto 18a. | 22 |
| Figura 6. Bibliotecas de compostos que podem ser acessadas pelo PHARMIT e a quantidade de compostos disponíveis em cada uma. | 26 |
| Figura 7. Estruturas relacionadas ao delineamento da metodologia de ancoramento molecular. | 28 |
| Figura 8. A) Pontos farmacofóricos. Ponto em verde: HFB; laranja: HBA; branco: HBD; roxo: ARO. | 30 |
| Figura 9. Modelo de representação dos complexos que foram simulados. | 32 |
| Figura 10. Estrutura dos compostos 1 a 13. | 34 |
| Figura 11. Resultados da etapa de ancoramento molecular dos compostos 2 e 9. | 35 |
| Figura 12. Resultados da etapa de ancoramento molecular dos compostos 1, 3 a 8, e 10 a 13. | 37 |
| Figura 13. A: Gráfico RMSD para proteína carbono alfa ($C\alpha$) do receptor apo 5HT _{2A} . B: Risperidona. C: Complexo 1. D: Complexo 9. E: Complexo 13. F: Complexo 7. G: Complexo 2. | 40 |
| Figura 14. Resultados das conformações que representam o cluster com maior quantidade de membros para os complexos 9 (A), 1 (B), 2 (C). | 42 |
| Figura 15. Resultados das conformações que representam o cluster com maior quantidade de membros para a risperidona (A), 13 (B), 7 (C). | 46 |
| Figura 16. Histograma apresentando o perfil de interação do controle e dos ligantes. | 49 |

THE SEARCH FOR USEFUL DRUGS IN THE TREATMENT OF AUSTISM: *In silico* STUDIES TO IDENTIFY NEW SELECTIVE LIGANTS TO 5-HT_{2A}

Allana C. F. Martins¹, Luana Janaína de Campos², Eduardo Borges de Melo¹

1) Laboratório de Química Medicinal e Ambiental Teórica (LQMAT), Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE), Cascavel, Paraná, Brazil.

2) Department of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, University of Nebraska Medical Center, Omaha, Nebraska, USA.

ABSTRACT

Serotonin (5-HT) receptors are part of a family, the 5HT₂ subfamily is divided into 2A, 2B and 2C receptors. The 2A receptor has high affinity for the atypical antipsychotic drugs clozapine, risperidone, and olanzapine and is believed to play a role in the therapeutic activity of these drugs. Currently, new therapeutic strategies are needed that offer faster onset of action with fewer side effects and, therefore, greater efficacy in a greater proportion of patients with neuropsychological disorders. Autism spectrum disorder (ASD) is a neurodevelopmental disorder characterized by deficits in social interaction and communication, as well as the presence of restricted or repetitive behaviors and interests. Currently, several therapeutic targets have been described as associated with main or peripheral symptoms of this framework. However, so far, the few drug interventions aim to control certain associated symptoms, such as seizures, anxiety, irritation, lack of sleep, and others. In most cases, these are drugs commonly used in neuropsychiatry, such as anxiolytics, anticonvulsants, etc., used off-label, such as risperidone. Risperidone primarily targets the 5-HT_{2A}R and D₂R receptors, where it acts as an antagonist. However, this drug, although useful (or potentially useful), was originally and specifically developed for the treatment of autistic people. Thus, this work had as main objective to study a set of compounds selected from the literature, which were used in the identification of hit compounds possible candidates for antipsychotics that act as 5-HT_{2A} receptor blockers. Based on these sets, computer-aided drug planning studies were carried out (molecular modeling, structure-activity relationship, pharmacophoric modeling and virtual screening), in addition to Molecular Dynamics simulation studies. The approach used led to the identification of compounds that were shown, in the DM simulations, to be stable at the binding site, capable of maintaining interactions with amino acid residues important for inhibition, similarly to risperidone. These results indicate a possibility that these compounds exhibit an antagonistic effect on the 5HT_{2A} receptor. These compounds then become candidates for biological tests aiming at confirming the results obtained.

KEYWORDS: inhibitors, *In silico* Medicinal Chemistry, Molecular Modeling, Molecular Dynamics, Serotonin Receptors, autism spectrum disorder (ASD).

1. INTRODUÇÃO

Os receptores de serotonina (5-HT) fazem parte de uma família diversa que consiste em 13 receptores acoplados à proteína G (GPCRs) e um canal catiônico fechado por ligante classificado com base nas funções operacionais, estruturais e transdutivas.^{1; 2; 3} A subfamília 5HT₂ é dividida nos receptores 2_A, 2_B e 2_C. O gene do receptor 5HT_{2A} está localizado no cromossomo 13, que foi identificado em estudos de associação como relacionado à esquizofrenia.^{4; 5} O receptor 2_A tem alta afinidade para as drogas antipsicóticas atípicas clozapina, risperidona e olanzapina e acredita-se que tenha um papel na atividade terapêutica dessas drogas.^{6; 7}

Atualmente, são necessárias novas estratégias terapêuticas que ofereçam início de ação mais rápido com menos efeitos colaterais e, assim, maior eficácia em uma proporção maior de pacientes com distúrbios neuropsicológicos. Os neurotransmissores biogênicos de amina, especialmente a serotonina, também foram associados ao pânico, transtorno obsessivo-compulsivo e até transtornos alimentares. A evidência mais forte são os estudos que mostram que muitos desses distúrbios são sensíveis a drogas que atuam no sistema serotoninérgico, como os ISRS (Inibidores da Recaptação de Serotonina).⁸

O transtorno do espectro autista (TEA) é um distúrbio de neurodesenvolvimento caracterizado por déficits na interação social e comunicação, e pela presença de comportamentos e interesses restritos ou repetitivos.⁹ Os principais déficits de comunicação social variam de dificuldade com conversas recíprocas e redução da comunicação não verbal à compreensão das normas sociais prejudicada e à falta de discernimento nas relações sociais.⁹ O desenvolvimento e a apresentação de sintomas varia amplamente em indivíduos, tornando a população de TEA etiológicamente e fenotipicamente heterogêneos.¹⁰ A prevalência deste quadro aumentou dramaticamente ao longo dos anos, e tem sido reconhecido atualmente como um dos transtornos mais

comuns do desenvolvimento.¹¹ Vários fatores contribuíram para esse aumento, como os critérios diagnósticos para TEA, que foram ampliados e modificados; o conceito de autismo se tornou mais amplo, definindo como um transtorno autista outros TEAs, incluindo a Síndrome de Asperger. Há também um co-diagnóstico com distúrbios médicos conhecidos, como síndrome de X frágil, síndrome de Tourette e síndrome de Down. Outros fatores incluem o aumento da disponibilidade de serviços e a capacidade de diagnosticar crianças em idades mais jovens.^{12; 13}

Embora o gama completo de etiologias subjacentes ao TEA permaneça, em grande parte, inexplicável, progressos foram realizados na última década na identificação de alguns fundamentos neurobiológicos e genéticos, além de alguns fatores de risco. O TEA é altamente hereditário, mas fatores ambientais também estão implicados em seu desenvolvimento.^{14; 15} Várias linhas de evidências sugerem que a etiologia dessa condição tem origem no período pré-natal.¹⁶ Atualmente, vários alvos terapêuticos já foram descritos como associados a sintomas principais ou periféricos deste quadro, e parte destes vem sendo explorados para o desenvolvimento de fármacos úteis para seus portadores, ao menos para a melhoria da qualidade de vida (Figura 1).

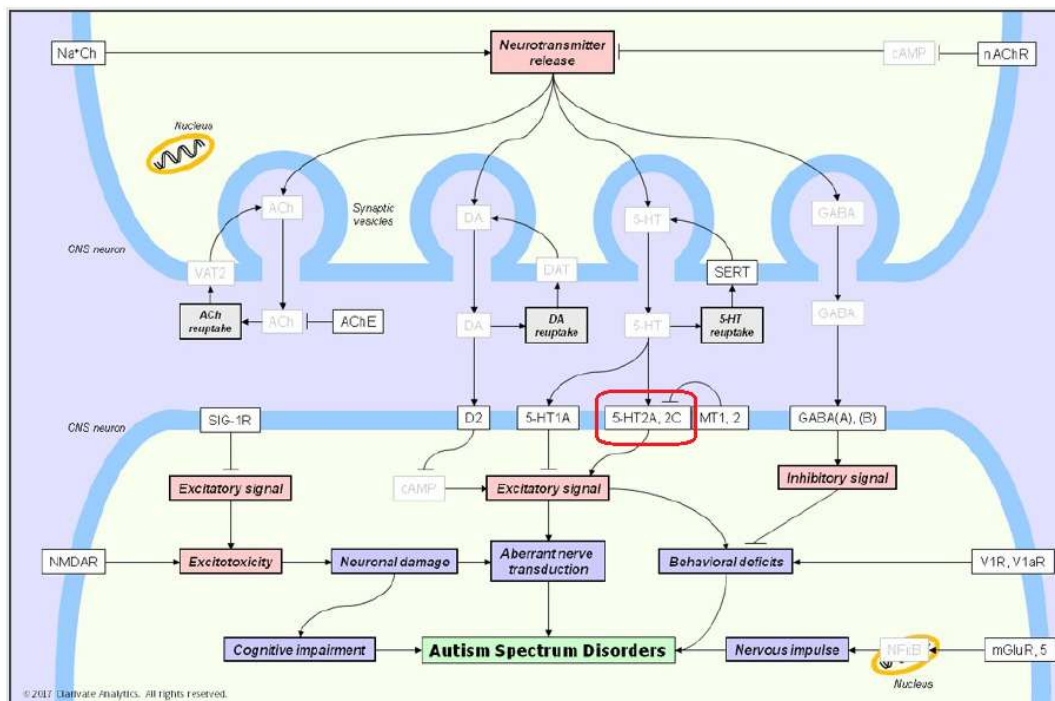


Figura 1. Possíveis neurotransmissores e seus alvos biológicos com potencial envolvimento nos sintomas relacionados ao autismo. Setas representam efeito excitatório. Linhas com barras representam efeitos inibitórios. Fonte: Base Clarivate Analytics, Thomson Reuters (todos os direitos reservados). Obs: os termos foram mantidos na língua original (inglês).

Atualmente, o diagnóstico de autismo é realizado principalmente com base em avaliações do quadro clínico realizado por um profissional com formação em medicina e, preferencialmente, com experiência clínica de vários anos no tema.^{17; 18} Da mesma forma, não existem alternativas farmacológicas para o tratamento definitivo.¹

Até o momento, as poucas intervenções medicamentosas visam ao controle de determinados sintomas associados, como convulsões, ansiedade, irritação, falta de sono, e outros. Na maioria dos casos, são medicamentos utilizados comumente na neuropsiquiatria, como ansiolíticos, anticonvulsivantes etc., utilizados de modo *off label*. Já os antipsicóticos atípicos de segunda geração risperidona (Risperdal®, Janssen- Johnson & Johnson) e aripiprazol (Abilif®, Bristol-Myers Squibb) (Figura 2) são os únicos medicamentos aprovados pelos órgãos reguladores de saúde para o tratamento de alguns sintomas associados ao TEA graças a estudos clínicos realizados com voluntários desta população.¹⁹ A risperidona tem como alvos principais os receptores 5-HT_{2A}R e D₂R, locais onde age como antagonista. O aripiprazol atua de modo semelhante, sendo também um agonista parcial do 5-HT_{1A}R. Atualmente, encontra-se em ensaios clínicos de fase III de estudos para autismo o brexpiprazol (Rexulti®, Lundbeck), que, além dos alvos já citados, também atua como um antagonista do adrenoceptor α_{1B} . Finalmente, a cariprazina (Reagila®, Recordati), que age como um antagonista dos 5-HT_{2A}R e 5-HT_{2B}R, antagonistas e agonistas parciais dos D₂R e D₃R, e agonista parcial do 5-HT_{1A}R, encontra-se em estudos iniciais com público autista (fase I). (<https://integrity.clarivate.com/integrity/xmlxsl/>). Porém, nenhum desses fármacos, embora úteis (ou potencialmente úteis) foram originalmente e especificamente desenvolvidos para o tratamento de pessoas autistas.

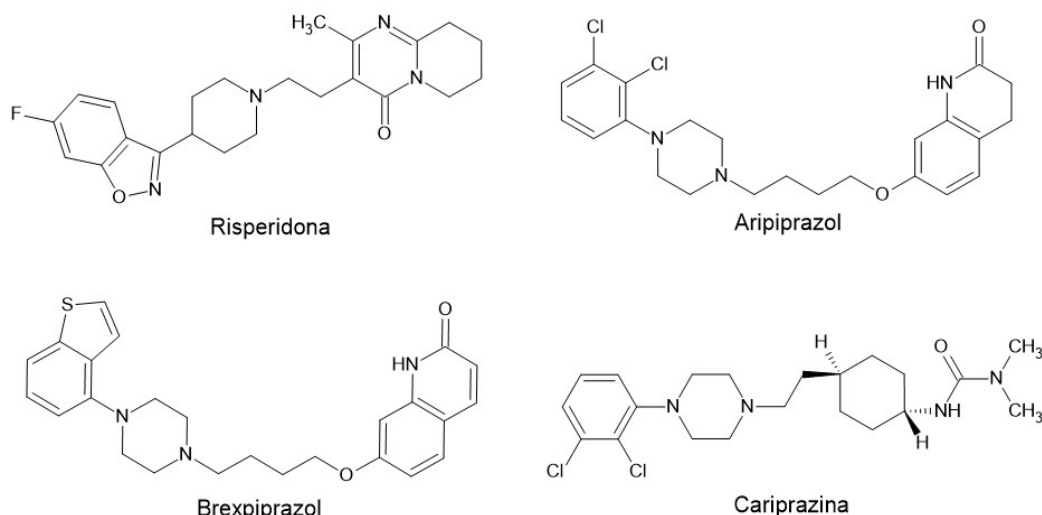


Figura 2. Estruturas 2D dos fármacos já aprovados para uso em portadores de TEA (risperidona e aripiprazol) e em ensaios clínicos (brexpiprazol e cariprazina). Todos estes compostos têm, entre seus alvos de ação, o 5-HT_{2A}R. Outros inibidores do 5-HT_{2A}R disponíveis ou em ensaios clínicos não são descritos oficialmente como úteis para portadores de autismo.

Os receptores de serotonina são expressos em todo o sistema nervoso e na periferia. O 5-HT_{2A}R é um dos 14 receptores de serotonina e é expresso em regiões como o sistema nervoso central e periférico, plaquetas e músculo liso vascular. O receptor 5-HT_{2A}R, apresentado na Figura 3 (PDB 6A93: <https://www.rcsb.org/structure/6A93>) está associado a doenças como esquizofrenia, depressão, transtorno bipolar, vício, transtornos alimentares, doença de Parkinson e doença de Alzheimer. Além disso, também apresenta relação com o autismo, pois participa de um sistema de excitação que auxilia no surgimento de déficits comportamentais causados por transdução nervosa aberrante (Figura 1). Desse modo, o antagonismo deste alvo biológico auxilia na redução, se não dos sintomas que caracterizam o autismo, ao menos de uma parte de sintomas geralmente presentes em todos os graus do espectro. Em especial, a agitação e a agressividade, a principal função clínica da risperidona e do aripiprazol. Porém, devido à necessidade de uso crônico, esses dois medicamentos acabam causando uma série de efeitos adversos, como sedação, ganho de peso, diabetes e efeitos anticolinérgicos, que são causados pela ligação não seletiva a outros receptores aminérgicos.² Esses efeitos adversos

podem ser considerados agravados quando o uso for pediátrico, fato muito comum no autismo.

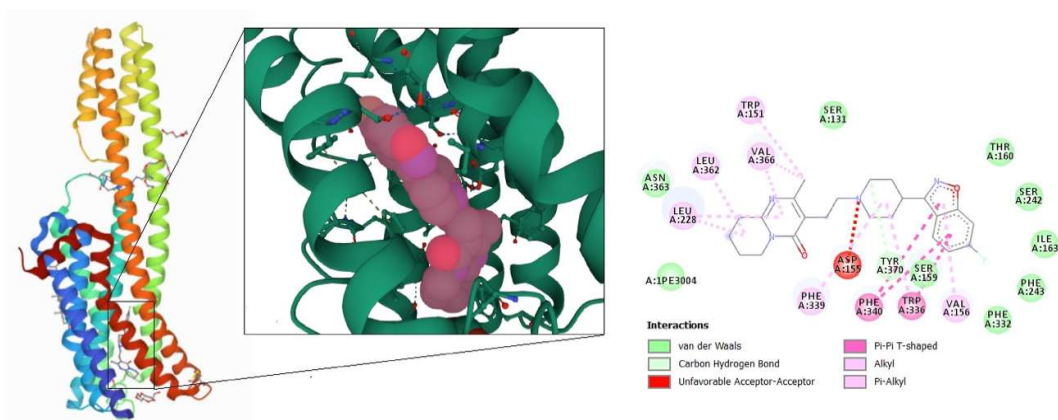


Figura 3. Estrutura tridimensional do receptor dopaminérgico subtipo 2A complexado com o antipsicótico risperidona (no destaque, no formato “spacefill”), arquivo PDB 6A93. O esquema 2D da interação entre o fármaco foi obtido no programa Discovery Studio e apresenta as principais interações observadas entre o ligante e o sítio de ligação identificados pelos autores.¹⁵

Considerando a necessidade de desenvolvimento de fármacos úteis para a melhoria da qualidade de vida dos portadores de TEA (e de qualquer outro transtorno psiquiátrico relacionado ao todo ou em parte ao 5-HT_{2A}R), neste trabalho, foram realizados estudos de simulações moleculares usando como base um conjunto de bloqueadores do 5-HT_{2A}R previamente descritos por Chen *et al.*³ Também foi utilizado o complexo cristalográfico PDB 6A93, recentemente disponibilizado por Kimura *et al.*⁴ como uma plataforma para estudos baseados em alvo biológico (SBDD: Structure-Based Drug Design), com o objetivo de identificar compostos *hits* em 10 bibliotecas químicas diferentes, com foco na tentativa de identificar ligantes, ou seus precursores, mais seletivos pelo receptor de interesse, e que, por este motivo, possam causar menor número de efeitos adversos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar conjuntos de compostos descritos na literatura (Chen *et al.*) que possam ser empregados na identificação de *hits* e protótipos em pesquisas que

visem à busca de novos antipsicóticos atípicos que atuem como inibidores do receptor 5-HT_{2A}, visando ao seu uso como tratamento de sintomas relacionados ao autismo.

2.2 Objetivos específicos

- Determinação de propriedades físico-químicas de caráter estrutural, eletrônico, termodinâmico, lipofílico, topológico, mistos e de campo dos compostos selecionados, utilizando os programas de modelagem molecular;
- Obter informações sobre quais propriedades físico-químicas podem influenciar a atividade de um conjunto de 37 derivados de benzisotiazolilpiperazina como potenciais novos antipsicóticos, descritos por um mesmo grupo de pesquisa como inibidores do receptor D₂, D₃, 5-HT_{1A} e 5-HT_{2A};
- Obter modelos de estrutura-atividade e farmacofóricos que permitam aumentar a compreensão sobre o mecanismo de ação das classes de compostos em estudo, e que possam ser empregados no planejamento e desenvolvimento de protótipos candidatos a novos fármacos;
- Identificação de novos compostos *hits*, que possam originar novos compostos protótipos, a partir de estudos de triagem virtual;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Modelagem do conjunto de dados e seleção do ligante mais seletivo

O conjunto de dados selecionado para realizar este estudo compila um total de 37 derivados de benzisotiazolilpiperazina (Anexo I), sintetizados e testados por Chen *et al.*³ Esse conjunto tem como grande vantagem ser formado por uma série de compostos com diferentes graus de afinidade pelos receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, D₂ e D₃. Desse modo, a exploração adequada desses dados pode auxiliar na obtenção de compostos *hits* que apresentem maior seletividade pelo alvo de interesse, preferencialmente com estruturas inovadoras e que nunca foram exploradas com este objetivo.

Para este fim, os compostos foram criados nos programas HYPERCHEM 7 (<http://www.hypercubeusa.com>) e GAUSSIAN 09 (<http://www.gaussian.com>)

para desenho, otimização de geometria molecular da estrutura, análise conformacional, e cálculos dos valores de algumas propriedades eletrônicas. Os modelos dos compostos em três dimensões (3D) foram construídos no HYPERCHEM 7, usando como base a estrutura cristalográfica do composto ASAXUP, disponível no bancos de dados Cambridge Crystallography Database (<https://summary.ccdc.cam.ac.uk>), código 1414993 (Figura 4). Na sequência, todas as geometrias foram otimizadas pelo método de mecânica molecular (MM+) e pelo método semiempírico Austin Model 1 (AM1).

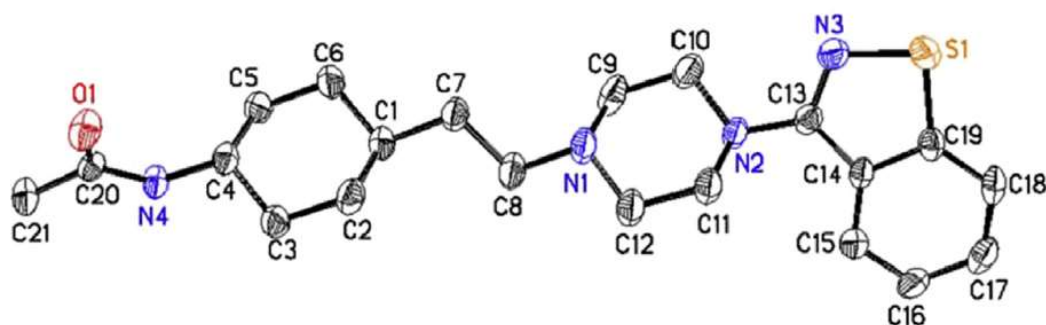


Figura 4. Estrutura básica dos compostos do conjunto (arquivo ASAXUP).³

As geometrias obtidas no HYPERCHEM 7 foram convertidas como arquivos de entrada do GAUSSIAN 09, em que cada composto foi otimizado ao nível de teoria *ab initio* HF/6-31G e, na sequência, ao nível da teoria do funcional de densidade (DFT: *density functional theory*) pelo funcional B3LYP e com as bases 6-311G++(d,p). O funcional B3LYP (*Becke, 3-parameter, Lee–Yang–Parr*) foi escolhido porque é descrito que esse método leva a resultados satisfatórios para a obtenção de geometrias e propriedades eletrônicas.^{5; 6} Uma das vantagens é que esse método, diferentemente da abordagem Hartree-Fock (HF), leva em consideração a correlação eletrônica na molécula (de uma forma simplificada, como cada elétron influencia no comportamento dos demais). Além disso, ele leva a resultados comparáveis àqueles de correlação eletrônica, como MP2 ou MP4, denominados métodos pós-Hartree-Fock, mas com um gasto de tempo consideravelmente menor. Estudos comparativos realizados por diversos autores^{7; 19} indicaram que os descritores eletrônicos obtidos utilizando o funcional B3LYP permitiram a obtenção de melhores modelos QSAR do que aqueles obtidos por outros métodos. Já a sequência de otimizações em etapas, com

aumento sequencial da complexidade dos níveis de teoria (e, conseqüentemente, do custo computacional), tem por objetivo reduzir o tempo de obtenção do mínimo de energia ao nível DFT, já que o aumento do custo computacional do MM+ direto para o DFT/B3LYP poderia levar a geometrias não convergidas, ou seja, sem realmente atingir um mínimo, mesmo um mínimo local.

O conjunto otimizado foi reservado para futuros estudos de relação-estrutura atividade quantitativa (QSAR), a serem realizados como continuidade deste estudo. Para este estudo, foi selecionado o composto mais seletivo pelo 5-HT_{2A}R dentre os descritos pelos autores.³ Para isso, foi realizada uma média simples das razões entre a atividade descrita quanto à inibição do 5-HT_{2A}R e das outras três proteínas. Os resultados estão disponíveis no Anexo 2. O composto 1-(6-nitro-1,2-benzisotiazol-3-il)-3-piperazina (A, Figura 5) apresentou a segunda melhor média (0,072), mas possui a vantagem adicional de ser o mais ativo dentre os compostos descritos ($K_i = 0,19$ nM), e, desse modo, pode-se considerar que realiza interações mais eficientes com o sítio de ligação, uma característica desejável para a etapa de modelagem farmacofórica.

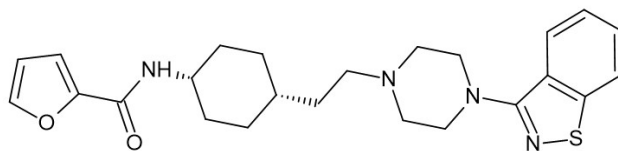


Figura 5. Estrutura do 1-(6-nitro-1,2-benzisotiazol-3-il)-3-piperazina (A). A identificação no artigo original corresponde ao composto 18a.

3.2 Delineamento do estudo de triagem virtual

Triagem virtual pode ser definida como uma técnica que utiliza métodos baseados em computador para descobrir novos ligantes com base na estrutura biológica. O objetivo básico da triagem virtual é a redução do enorme espaço químico de pequenas moléculas orgânicas, para sintetizar e/ou rastrear uma proteína-alvo específica, a um número administrável de compostos. Em teoria, a aplicabilidade da triagem virtual é limitada apenas por quais propriedades de um composto podem ser calculadas computacionalmente e pela relevância dessas

propiedades para o problema em questão.²⁰ Essas abordagens podem ser classificadas como independentes do receptor, com destaque para aquelas que são baseadas em modelagem farmacofórica clássica, em que são consideradas apenas semelhanças entre as estruturas tridimensionais de compostos que apresentam atividade biológica, conhecendo ou não seu alvo biológico (mas sendo especialmente útil quando este não é conhecido), e em ancoramento molecular, quando o alvo biológico é conhecido e tem sua estrutura tridimensional disponibilizada em bancos de dados.²¹

Por meio da modelagem farmacofórica, é possível obter um modelo farmacofórico, ou farmacóforo, um dos conceitos mais importantes dentro da Química Farmacêutica Medicinal. De um modo geral, um farmacóforo define as características essenciais de uma interação que um composto bioativo precisa apresentar para desencadear determinada atividade biológica. Quando se considera um farmacóforo *in silico*, este incluirá um arranjo espacial dessas características farmacofóricas, que geralmente são traduzidos em tipos de interações fármaco-receptor que aquela molécula pode fazer. Para obter este modelo, geralmente são utilizadas estruturas tridimensionais de um conjunto de compostos que apresentam a atividade de interesse, que, na sequência, são alinhados para que sejam determinadas quais são as características mais comuns entre estes compostos.^{21; 22; 23}

O ancoramento molecular ("*docking*") é considerado uma das principais abordagens de desenvolvimento de fármacos com base na estrutura tridimensional de um alvo-molecular. O objetivo central é o de prever a capacidade de um ligante de interesse interagir com o sítio de ligação do alvo, e ordenar esta molécula de acordo com seu encaixe, identificando, assim, a geometria que esta adota para gerar uma máxima complementariedade pelo sítio, assim como o grau dessa interação. Para isso, independentemente do programa, todos possuem duas partes básicas: a função de busca e o algoritmo de score. O algoritmo é utilizado na busca de orientações e conformações do ligante no sítio receptor, enquanto a função de score é aplicada aos possíveis modos de ligação propostos pelo algoritmo, com o propósito de classificá-los por afinidade de acordo com suas interações com os resíduos de aminoácidos do sítio receptor. Ao final do estudo, o objetivo geral é obter um conjunto de conformações do complexo ligante-receptor e classificá-los em ordem de

prioridade, com base em suas estabilidades energéticas, geralmente (mas não apenas) apresentado como o ΔG de ligação em Kcal/mol. Outra informação extremamente útil apresentada são as principais interações entre o ligante e o sítio de ligação, como ligação de hidrogênio, iônicas, van der Waals, π - π etc., junto de seus comprimentos.^{23; 24; 25}

Neste estudo, optou-se por uma abordagem baseada no alvo biológico não só para o estudo de ancoramento, mas também para a etapa de modelagem farmacofórica. Inicialmente, foi utilizado o servidor *web* PHARMIT (<https://pharmit.csb.pitt.edu/>). O algoritmo utilizado permite pesquisar pequenas moléculas com base em sua similaridade estrutural e química com outra molécula pequena, visando a identificar aquelas que podem se ligar a um mesmo alvo biológico de interesse. A pesquisa pode ter como entrada: 1) uma molécula pequena isolada; 2) um modelo farmacofórico (que pode ser gerado em outros programas ou no próprio PHARMIT); ou 3) a combinação de uma proteína de interesse e um farmacóforo ou uma pequena molécula para a qual uma posição de ligação putativa é conhecida.²¹ Esta posição pode ser derivada pela posição que o ligante ocupa na cavidade do alvo quando é co-cristalizado com este último, ou pode ser obtido por ancoramento molecular (esta última situação foi a selecionada para ser utilizada neste trabalho).

Outra grande vantagem do servidor PHARMIT é o grande número de bibliotecas de compostos que pode pesquisar, mesmo que essa busca não seja simultânea, e sem necessidade de *download* das estruturas. Atualmente, é possível pesquisar em 10 dos bancos de dados mais importantes para a descoberta de novos fármacos (Figura 6), somando quase 341 milhões de compostos orgânicos (embora existam duplicatas entre eles, mas que ainda assim são ocorrências indicadas pelo servidor). Além disso, é possível contribuir com bancos de dados *in house* ou que não estejam disponíveis entre os inicialmente disponibilizados, mas que possam ser baixados e adicionados ao servidor.²¹ Por exemplo, já se encontra disponível dentre estas versões (a maior com 2366 compostos) a base de dados NuBBE, com compostos isolados da biodiversidade brasileira, e mantida pelo Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <p>CHEMBL25 ⓘ 23,136,925 conformers of 1,752,844 molecules Updated: 2019-Jun-03 06:49:19</p> <p>ChemDiv ⓘ 21,562,497 conformers of 1,456,120 molecules Updated: 2019-Jun-05 06:41:23</p> <p>MCULE-ULTIMATE ⓘ 378,880,344 conformers of 126,471,502 molecules Updated: 2020-May-27 12:04:34</p> <p>MolPort ⓘ 113,009,400 conformers of 7,873,731 molecules Updated: 2021-Apr-10 17:46:03</p> | <p>ChemSpace ⓘ 250,205,463 conformers of 50,181,678 molecules Updated: 2019-Jun-19 22:22:08</p> <p>MCULE ⓘ 222,427,706 conformers of 45,045,153 molecules Updated: 2021-Mar-26 21:59:20</p> <p>NCI Open Chemical Repository ⓘ 574,117 conformers of 52,237 molecules Updated: 2019-Jun-06 13:51:25</p> <p>PubChem ⓘ 450,708,705 conformers of 93,067,404 molecules Updated: 2019-Jun-17 09:23:16</p> |
| <p>LabNetwork ⓘ 22,051,020 conformers of 1,794,286 molecules Updated: 2019-Sep-03 14:48:17</p> <p>ZINC ⓘ 123,399,574 conformers of 13,190,317 molecules Updated: 2019-Jun-02 09:58:08</p> | |

Figura 6. Bibliotecas de compostos que podem ser acessadas pelo PHARMIT e a quantidade de compostos disponíveis em cada uma. Dados de 30 de julho de 2021.

Segundo Kimura *et al.*⁴, o 5-HT_{2A}R possui uma cavidade lateral estendida próxima ao sítio de ligação ortostérico, ausente ou muito menos relevante do que nos demais receptores relacionados. Por sua vez, outra região muito importante, uma fenda hidrofóbica inferior, é altamente conservada nos 5-HT_{2C}R, 5-HT_{1B}R, D₂R e H₁R. Desse modo, os autores propuseram que o antagonista altamente seletivo para 5-HT_{2A}R se liga a essa cavidade lateral estendida, e que, explorando esse fato, podem-se planejar inibidores que apresentem menos efeitos adversos e que sejam relacionados a interações com outras proteínas. Por esse motivo, selecionou-se o composto **A** no lugar da risperidona, pois, assim, espera-se obter um padrão tridimensional que favoreça a identificação de compostos mais seletivos pelo 5-HT_{2A}R.

A obtenção do complexo foi realizada no programa Autodock Vina²⁶, via ambiente gráfico PyRx (<https://pyrx.sourceforge.io/home>).²⁷ O Autodock Vina é que utiliza a abordagem de alvo fixo e ligante flexível, com algoritmo genético para a etapa de busca, e uma função híbrida baseada em dados empíricos combinados com uma função baseada em conhecimento (*knowledge-based*).²⁶ O arquivo PDB 6A93 (Figura 2) foi então obtido no servidor *web Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>). A preparação do arquivo foi então realizada com o programa *Discovery Studio Visualizer 17.2* (<https://discover.3ds.com/discovery-studio-visualizer-download>), em que o ligante original foi retirado do sítio de

ligação, assim como as moléculas de água co-cristalizadas foram removidas. Na sequência, novos arquivos no formato *.PDB, um contendo apenas a risperidona e o outro contendo apenas o receptor, foram gerados. Ambos foram então usados como arquivos de entrada para o PyRx/Autodock Vina. O delineamento e a validação da metodologia de ancoramento molecular foram realizados utilizando *redocking* da risperidona. Essa abordagem, muito utilizada nesse tipo de estudo, visa a avaliar a capacidade de reproduzir a orientação de um ligante em relação aos modos de ligação observados em complexos com a mesma estrutura já resolvida. A reprodução de um modo de ligação experimental normalmente é considerada bem-sucedida quando o *RMSD* entre a orientação cristalográfica (experimental) e a orientação obtida durante o cálculo fica abaixo de 2,0 Å.²⁸

O átomo de nitrogênio do anel piperidina, central à estrutura da risperidona co-cristalizada, foi utilizado como referência para o ponto central do espaço virtual cúbico em que o algoritmo do Autodock Vina deveria realizar a busca. Assim, o ponto central foi definido com centro de 13,84 Å (*x*), 0,55 Å (*y*) e 60,96 Å (*z*), com lados de 25 Å.³ Esse posicionamento e volume foram adequados para cobrir o sítio de ligação de interesse, assim como a cavidade lateral, abrangendo os aminoácidos essenciais para a interação com a cavidade. Considerando que o sítio de ligação de interesse pode ser considerado grande, o parâmetro *exhaustiveness* (indica o tempo gasto em buscas por um mínimo global em cada cálculo de ancoramento) foi definido como 60. Considerando que o valor padrão do programa é 8, isso aumentou as chances de obtenção tanto de uma metodologia de ancoramento molecular adequada quanto de *best poses* adequadas e confiáveis para o propósito do estudo. Após a etapa de validação, foi possível obter uma *best pose* de *redocking* da risperidona (Figura 7A) que apresentava $\Delta G = -11,2$ Kcal/mol e um *RMSD* = 0,77 Å com a pose co-cristalizada (Figura 7B). Desse modo, a metodologia utilizada pode ser considerada adequada para o estudo.

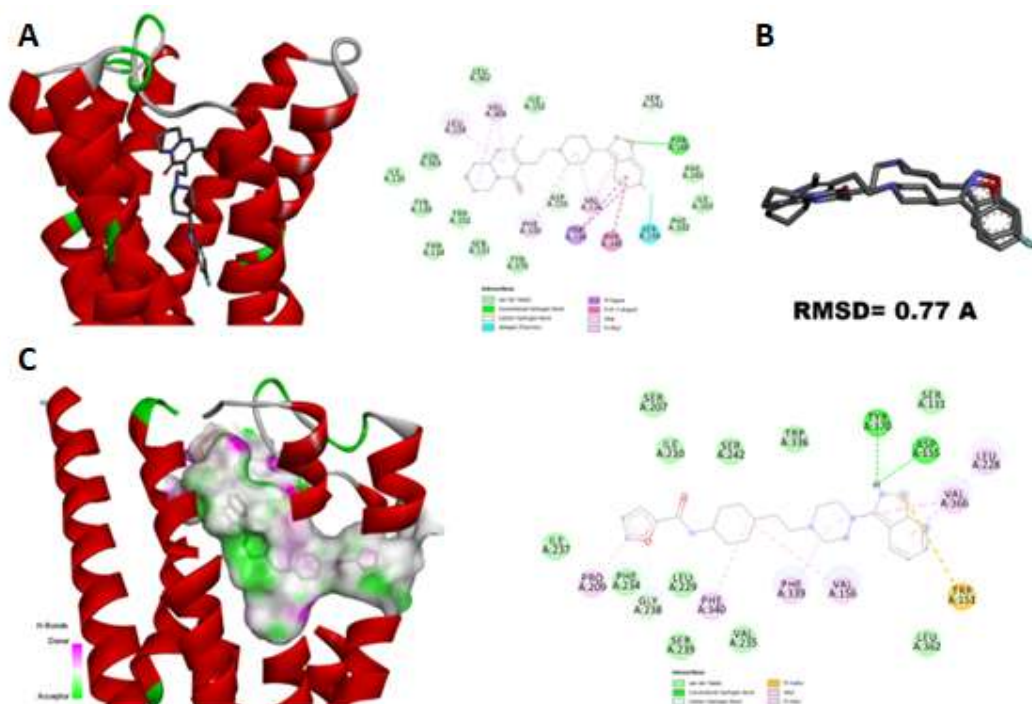


Figura 7. Estruturas relacionadas ao delineamento da metodologia de ancoramento molecular. A) *Best pose* obtida na etapa de *re-docking*; B) Sobreposição das geometrias da risperidona co-cristalizada e sua *best pose*; C) *Docking* do composto A, com visão rotacionada em 90 graus a direita em relação a imagem A, para destaque da cavidade lateral.

O ancoramento de A gerou uma *best pose* em que a cavidade lateral é ocupada pela cadeia lateral furano-carboxamida (Figura 6C). A região superior interage principalmente com o resíduo Asp155, conservado e essencial para a interação de ligantes em receptores aminérgicos, além dos resíduos Trp151, Leu228 e Val366, similares à risperidona. Já o anel cicloexano formou ligações com os resíduos Val156 e Phe340, mesmos resíduos que interagem com o grupo 6-fluoro-1,2-benzoxazole da risperidona. Finalmente, o anel piperazina interage com os resíduos Phe339 e Val366, semelhantes ao anel piperidina da risperidona. Porém, como ocupa a cavidade lateral, o composto **A** forma uma ligação hidrogênio com Gly238 (2,76 Å) e ligação de van der Waals com Pro209 (4,97 Å). Esta pose, associada às novas interações descritas, pode justificar a maior seletividade de A por este alvo no âmbito deste estudo. O complexo 5-HT_{2A}R/A foi, portanto, utilizado como *input* para a triagem virtual baseado em ligante com auxílio de receptor.

Ao carregar o complexo obtido no PHARMIT, foi gerado o arquivo apresentado na Figura 7. O servidor identificou, no ligante posicionado na

cavidade de interesse, a partir da avaliação dos seus grupos funcionais, dez pontos farmacofóricos - 2 doadores de ligação hidrogênio (DLH), 4 aceptores de ligação hidrogênio (ALH), 3 hidrofóbicas (LHF), e 1 de ligação aromática (ARO). Nas duas regiões que possuem pontos farmacofóricos que coincidem, optou-se por mantê-los como apresentados, para que ambas as características dessas regiões fossem consideradas na busca. Já três pontos (2 HBA e 1 HFB) foram excluídos da busca, visando a não limitar em excesso as possibilidades de busca em estruturas extremamente semelhantes ao composto A, e favorecendo aqueles que pudessem formar ligações semelhantes à porção 3-(piperazin-1-il)-1,2-benzotiazol e à porção furano-2-carboxamida. O PHARMIT também usa, em suas buscas, o método definido como formas moleculares alinhadas (VAMS), que visa a identificar formas moleculares correspondentes aos compostos utilizados como base de busca, usando-as como critérios de inclusão ou exclusão. Neste estudo, as restrições inclusivas foram especificadas usando a forma do ligante fornecido, enquanto, como critério de exclusão, foi utilizada a própria superfície do receptor. Assim, aqueles compostos que fossem encontrados na etapa de busca farmacofórica deveriam respeitar a forma base do ligante selecionado, e não ultrapassar a superfície acessível do receptor. Os compostos assim selecionados são proibidos de sobrepor essas restrições. Ambas as restrições são representadas usando volumes voxelizados.³ (Figura 7). Finalmente, para reduzir a quantidade de compostos encontrados, foi utilizado como critério de *hit reduction* o valor de 1 para o campo *max hits per mol*. Ou seja, caso determinada conformação de um composto fosse encontrada como adequada ao farmacóforo, uma nova conformação desse composto seria ignorada, evitando assim *hits* duplicados em um mesmo banco de dados.

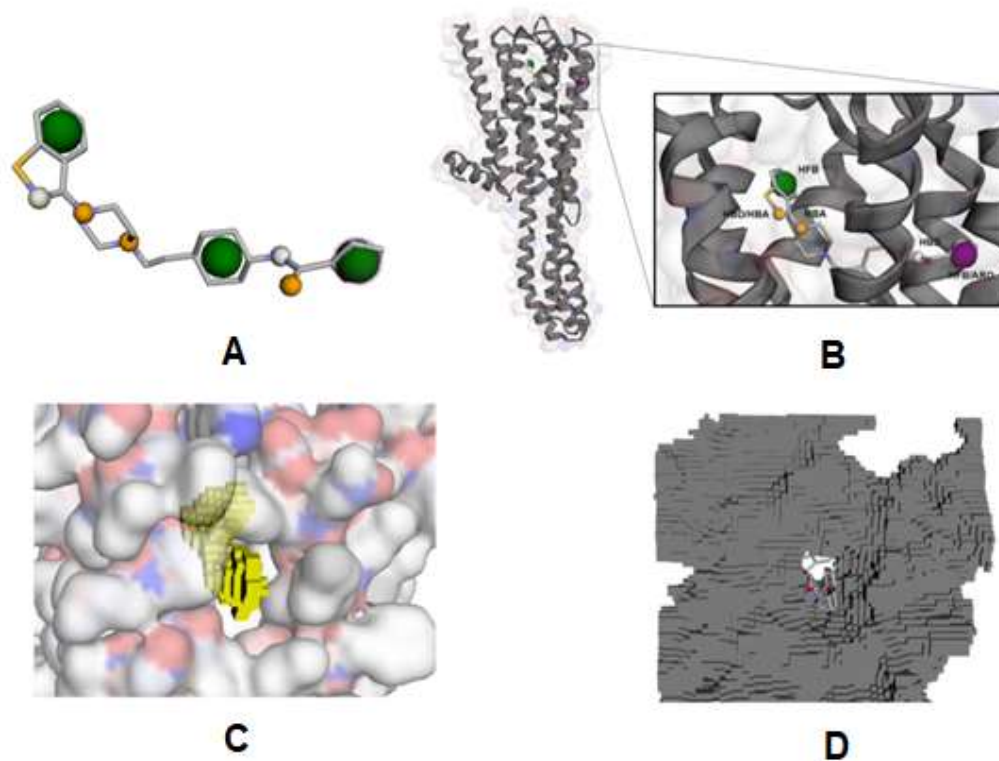


Figura 8. A) Pontos farmacofóricos. Ponto em verde: HFB; laranja: HBA; branco: HBD; roxo: ARO. Obs: nos pontos destacados, dois pontos coincidem – A: LHF e ARO; B: ALH e DLH; B) Destaque do composto A no sítio de ligação, e dos pontos farmacofóricos mantidos para a etapa de busca; C) Volume voxelizado do composto A, usado como critério de inclusão; D) Volume voxelizado do 5-HT_{2A}R, utilizado como critério de exclusão.

Na sequência, após a pesquisa em cada um dos bancos de dados disponíveis no PHARMIT (Figura 5), os compostos identificados foram individualmente submetidos à etapa de ancoramento molecular, utilizando a metodologia anteriormente validada, tendo como referência a risperidona, já que esta, apesar de pouco seletiva, é um inibidor utilizado clinicamente. Os compostos que apresentaram ΔG de ligação superiores à molécula de referência foram então selecionados para a etapa de dinâmica molecular.

3.3 Dinâmica Molecular

A simulação de Dinâmica Molecular (DM) é uma ferramenta *in silico* utilizada para prever os movimentos de cada átomo em uma proteína ou outro sistema molecular ao longo do tempo.¹ Isso é possível por meio do emprego das leis do movimento de Newton, sendo possível prever a posição espacial de cada

átomo em função do tempo.² Entre outras aplicações,³ a DM também pode prever como as biomoléculas responderão, em um nível atômico, a perturbações dentro do sistema, como a adição ou remoção de uma molécula (droga).²

Portanto, a Dinâmica Molecular foi realizada para analisar a estabilidade e as propriedades dinâmicas do receptor 5HT_{2A} (PDB code: 6A93⁴) ligado aos nossos compostos estudados. Os estudos de Dinâmica Molecular foram conduzidos pelo programa Desmond versão 3.0 no pacote Schrodinger versão 2020-4,^{5; 6} de acordo com o seguinte protocolo: o receptor 5HT_{2A}, juntamente com a membrana de fosfatidilcolina (POPC) – a posição da membrana no receptor foi calculada usando o servidor online Positioning of Proteins in Membrane (PPM)²⁹ – e cada ligante estudado foi colocado em uma caixa ortorrômbica com limites periódicos – distâncias (Å): 10x10x15. A caixa foi preenchida com água TIP3P e íons Na⁺ ou Cl⁻ foram adicionados, conforme necessário pelo software, para neutralizar o sistema. Além disso, 0,15 M de NaCl foi adicionado ao sistema para mimetizar a concentração iônica fisiológica. Em seguida, o sistema foi relaxado, utilizando dinâmica posicionalmente restrita, seguindo o protocolo padrão⁸ no programa Desmond. As simulações para todos os sistemas foram realizadas sobre o conjunto NPT (número constante de partículas, pressão e temperatura) com a temperatura ajustada para 300 K e pressão de 1,013 bar. A produção de simulações de DM foi definida para 250 nanosegundos (ns). A energia (kcal/mol) foi registrada em intervalos de 1,2 picosegundos (ps). Todas as simulações foram realizadas utilizando o GPU Desmond com o campo de força OPLS3e³⁰ através do Centro de Informática de Holland.³¹ O campo de força OPLS3e é baseado em potenciais otimizados para simulações líquidas (OPLS), demonstrado primeiramente por Jorgensen e colaboradores.³² Como controle positivo, foi empregada a Risperidona complexada com o receptor. Além disso, neste estudo, foi utilizado o *apo* receptor como controle negativo. Os controles foram submetidos a simulações de DM pelo mesmo protocolo do conjunto de moléculas estudado. Um modelo do conjunto final dos sistemas simulados é exibido na Figura 9.

A análise das trajetórias resultantes de todas as simulações foi produzida usando a ferramenta “diagrama de simulação de interação”, do programa Desmond.⁵ Em resumo, foram calculados o valor de *Root-Mean-Square Deviation* (RMSD) para a proteína e para os ligantes, o parâmetro de Elementos

de Estrutura Secundária (SSE) e o valor de *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) para os resíduos de proteína. Além disso, o perfil de interação entre resíduos importantes do bolso de ligação e ligantes foi analisado. Consulte a seção de resultados e discussão para detalhes sobre esses parâmetros. A análise de *cluster* para determinar a conformação representativa mais populosa dos ligantes de cada simulação de DM foi realizada usando a ferramenta "*Desmond trajectory clustering*". O intervalo de extração do quadro de trajetória foi definido como 10 *frames*, o número total de *frames* (1000 *frames*) foi usado para agrupar cada trajetória e o número máximo de saída de *clusters* foi definido como 10. De acordo com os resultados, as trajetórias dos complexos mais promissores foram analisadas e gravadas em formato de vídeo, utilizando a interface Maestro.

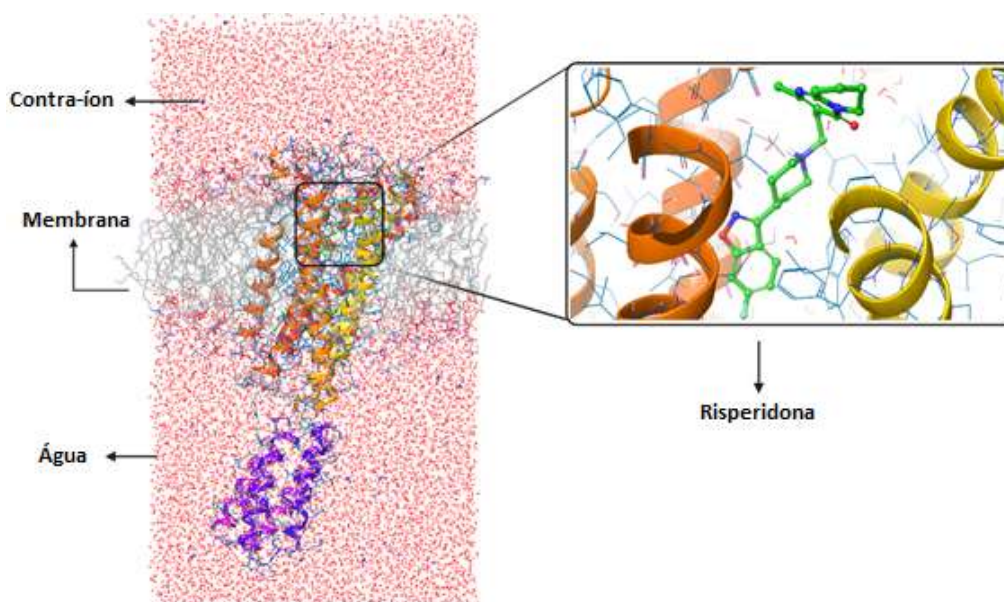


Figura 9. Modelo de representação dos complexos que foram simulados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Virtual Screening

Considerando o grau de exigência e especificidade que foi determinado para o farmacóforo construído (Figura 7), foi possível obter, na primeira etapa da

triagem, um conjunto de compostos formado por 129 *hits*, isso considerando duplicatas (ou seja, compostos que estão presentes em mais de um dos bancos de dados consultados). Desse modo, não se julgou necessário utilizar regras de *druglikeness* ou outros parâmetros para redução do tamanho do conjunto, já que este que foi obtido foi gerenciável. Além disso, é importante sempre observar que, na busca de compostos *hits*, ou mesmo de compostos protótipos, não é estritamente necessário que os compostos identificados já apresentem propriedades farmacocinéticas e toxicológicas ideais (embora seja muito desejável), já que, na grande maioria das vezes, ainda deverão passar por algum grau de otimização molecular, visando tanto ao aumento da potência terapêutica quanto à adequação de suas características ADMET.³³ Assim, o foco aqui foi encontrar compostos que possam apresentar, ao menos por meio das simulações *in silico*, boa potência, capacidade de inibição do receptor de interesse e, principalmente, uma possível seletividade por este alvo.

Após a remoção das duplicatas e preparação das estruturas, 63 compostos foram submetidos à etapa de ancoramento molecular. Apenas 13 compostos (Tabela 1 e Figura 9), 0,0000038% do total consultado por meio do PHARMIT, apresentaram energia de ligação superior ao da risperidona ($\Delta G = 11,2$ Kcal/mol). Utilizando a equação $K_i = e^{\Delta G \times 1000 / RT}$, em que $R = 1,98719$ e $T = 298,15$ K, compostos acima desta energia podem apresentar um $K_i > 5,2 \times 10^{-9}$ M, o que pode ser considerada uma faixa de atividade *in vitro* excelente, se esses valores forem confirmados por meio de ensaios experimentais. Para auxiliar no aumento da compreensão desses resultados, também foram calculadas as eficiências de ligação (LE) de cada composto, que é obtido por meio da equação $\Delta G / N_{ap}$ (em que N_{ap} corresponde ao número de átomos não-hidrogênio de cada composto). Esse parâmetro simples visa a comparar moléculas de acordo com sua energia de ligação média por átomo. No geral, compostos que se ligam de modo mais eficiente ao seu alvo de estudo devem apresentar $LE > 0,30$.³⁴ Como pode ser consultado na Tabela 1, oito compostos atendem a este critério, enquanto todos os demais possuem $LE = 0,29$.

Tabela 1. Compostos selecionados ao final da etapa de ancoramento molecular, e os valores dos parâmetros utilizados para ajudar neste processo.

| Composto | Identificador | ΔG (Kcal/mol) | LE | K_i calculados (nM) |
|----------|---------------------|-----------------------|------|-----------------------|
| 1 | CHEMBL166399 | -11,3 | 0,29 | 5,2 |
| 2 | MolPort-006-808-904 | -12,2 | 0,38 | 1,1 |
| 3 | ZINC000408991278 | -11,3 | 0,33 | 5,2 |
| 4 | MolPort-047-468-974 | -11,7 | 0,33 | 2,6 |
| 5 | ZINC000408990680 | -11,5 | 0,32 | 3,7 |
| 6 | PubChem-11444349 | -11,5 | 0,29 | 3,7 |
| 7 | ZINC000253409323 | -12,1 | 0,29 | 1,4 |
| 8 | ZINC000408991149 | -11,5 | 0,33 | 3,7 |
| 9 | ZINC000408994226 | -12,4 | 0,33 | 0,8 |
| 10 | PubChem-137534138 | -12,0 | 0,29 | 1,6 |
| 11 | PubChem-123469020 | -11,4 | 0,29 | 4,4 |
| 12 | PubChem-137534008 | -11,7 | 0,33 | 2,7 |
| 13 | PubChem-4595062 | -11,7 | 0,33 | 2,7 |
| | Risperidona | -11,2 | 0,37 | |

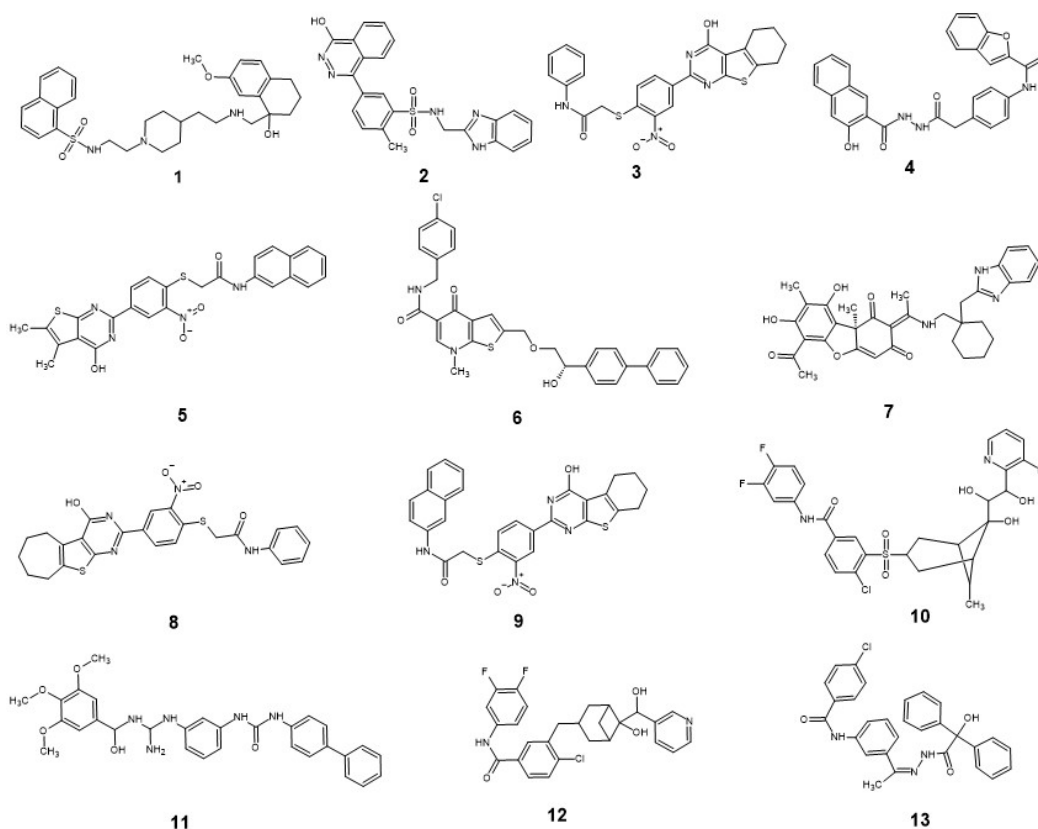


Figura 10. Estrutura dos compostos 1 a 13.

Os resultados obtidos na etapa de ancoramento molecular indicam que os compostos 2 e 9 (Figura 11) apresentam os resultados mais promissores, já

que apresentam a melhor combinação entre ΔG e LE. Apenas o composto 2, porém, apresenta tanto ΔG quanto LE superiores aos da risperidona, composto de referência. Estes dois compostos possuem, portanto, o melhor equilíbrio entre afinidade medida pelo 5-HT_{2A}R e seus tamanhos (no caso, representados pelo menor número de átomos não-hidrogênio que possuem em relação aos demais). Quando comparamos estes com os compostos 7, 10 e 11, que também possuem ΔG entre 12,0 e 12,2 Kcal/mol, porém com LE= 0,29, tem-se uma indicação de que estes três compostos precisaram de mais átomos para garantir uma boa afinidade calculada. Por outro lado, os compostos 3, 4, 5, 8, 12 e 13 possuem LE= 0,32-0,33, apesar de apresentarem $\Delta G > 12,0$ Kcal/mol. Quando comparados com a risperidona, observa-se que possuem um comportamento parecido com o fármaco. Isso pode indicar que, devido aos seus altos valores de LE, estes compostos não devem ser descartados do estudo, pois seus menores valores de ΔG podem estar relacionados apenas com um menor número de interações que são formadas, o que não significa perda do potencial de apresentar atividade *in vitro*. Já os compostos 1, 6 e 12 são os menos promissores do conjunto, já que ambos apresentam os maiores ΔG associados às piores LE.

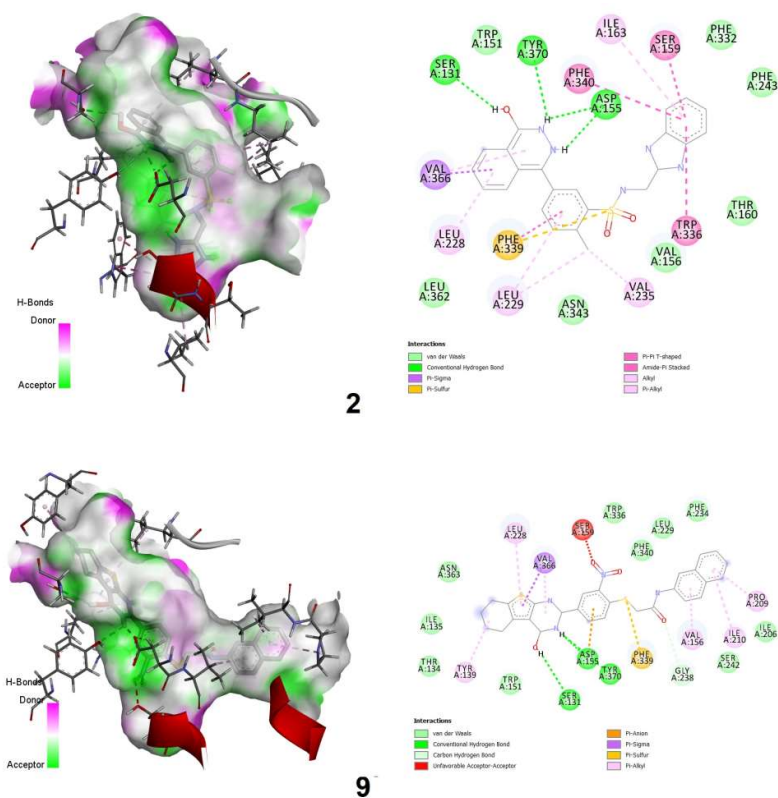


Figura 11. Resultados da etapa de ancoramento molecular dos compostos 2 e 9.

Pode-se observar que apenas o composto 9 (Figura 11) apresenta uma *best pose* que preenche completamente a cavidade lateral, formando uma ligação de hidrogênio com Gly238, resíduo localizado na entrada da cavidade, e interações π -aquil com os resíduos Val156, Pro209 e Ile210. Também se observa uma forte interação hidrogênio (1,99 Å) com Asp155, resíduo descrito como essencial para a inibição deste receptor. Já a *best pose* de 2 não ocupou a cavidade lateral, adotando um posicionamento mais parecido com a risperidona. Uma série de interações π é formada com os resíduos Ile163 e Trp336 (este último também presente na ligação da risperidona), localizados na cavidade hidrofóbica e também considerados importantes para a ativação do receptor, além de Ser159 e Phe340. A interação essencial com Asp155 também está presente, na forma de duas fortes ligações hidrogênio (2,06 e 2,48 Å) com os nitrogênios do sistema 2,3-diidrofitalazolinol.

4.2 Análise da simulação da Dinâmica Molecular

Em nossos estudos de simulação de Dinâmica Molecular (DM), a risperidona foi empregada como controle positivo, servindo como estrutura de referência, estrutura em que todos os ligantes foram comparados. Além disso, a estrutura *apo* do receptor 5HT_{2A} foi utilizada como controle negativo.

De acordo com Kimura e colaboradores⁴, os antipsicóticos risperidona e zotepine estabilizam efetivamente a conformação inativa do receptor 5-HT_{2A}, resultando no efeito antagonista. Primeiramente, essas drogas podem prevenir os movimentos dos resíduos na parte inferior da cavidade da proteína, na interação entre o sítio de ligação e o ligante, que resulta no bloqueio da ativação do receptor. Portanto, monitorar a dinâmica do receptor é uma etapa extremamente importante para a análise *in silico* de potenciais novos compostos *hit*. Em decorrência disso, o primeiro parâmetro analisado das trajetórias da DM foi o RMSD, que mensura a distância média entre os grupos de átomos.³⁵ A análise deste parâmetro durante a simulação permite determinar o nível de mudanças conformacionais da proteína ou do ligante. O monitoramento do RMSD da proteína (eixo-Y esquerdo, linhas pretas na Figura 13 e Tabela 2) fornece uma compreensão sobre a conformação estrutural da proteína estudada, fornecendo informações sobre a sua estabilidade. O RMSD do ligante (eixo-Y direito, “Lig fit Prot” em azul e “Lig fit Lig” em verde – Figura 13 e Tabela 2) é uma indicação da estabilidade do ligante em relação à proteína, assim como a evolução de sua conformação interna. Inibidores promissores devem apresentar baixo RMSD durante a simulação.³⁶

Em relação ao RMSD da proteína para o carbono alfa (Figura 13, linha preta no eixo Y esquerdo), todos os resultados foram alinhados com a referência (*frame 0*), então o RMSD foi calculado ao longo de todo o período da simulação. Esse parâmetro mede o desvio global dos átomos em comparação à referência.³⁶ A Tabela 2 (primeira coluna) e a Figura 13 exibem os complexos que apresentaram o RMSD da proteína calculado para carbono alfa com um valor médio menor que a risperidona e/ou do receptor *apo*. O perfil das variações para o RMSD da proteína desses ligantes estudados, o controle (risperidona) e o receptor *apo* são similares em magnitude de variação e apresentam um perfil

estável nos gráficos de RMSD ao longo da simulação. O complexo 7 apresenta algumas altas flutuações no valor de RMSD da proteína para o carbono alfa no início da simulação (até 100 ns), mas, após este período de equilíbrio, o complexo se estabiliza (Figura 13 – painel E). O perfil estável para o RMSD da proteína resultante dos complexos apresentados leva à conclusão de que o receptor não sofre uma grande mudança conformacional durante a simulação para o receptor *apo* ou os ligantes estudados/controle. Esse fato é uma indicação de que os ligantes apresentados na Tabela 2 poderiam manter o receptor em sua conformação inativada, resultando em um efeito antagônico.

Tabela 2. Valores médios de RMSD para os complexos mais estáveis.

| Ligante | RMSD C α Proteína | RMSD “Lig fit Prot” Ligante | RMSD “Lig fit Lig” Ligante |
|----------------------------|------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| Risperidona | 2,76 \pm 0,42 ^a | 2,78 \pm 1,28 | 1,30 \pm 0,68 |
| Receptor <i>apo</i> | 2,93 \pm 0,43 | NA | NA |
| 1 | 2,55 \pm 0,42 | 6,59 \pm 1,54 | 3,31 \pm 0,55 |
| 9 | 2,62 \pm 0,32 | 5,18 \pm 2,51 | 1,37 \pm 0,49 |
| 13 | 2,75 \pm 0,61 | 3,33 \pm 0,57 | 1,13 \pm 0,15 |
| 7 | 2,85 \pm 0,56 | 3,00 \pm 0,69 | 0,63 \pm 0,11 |
| 2 | 2,88 \pm 0,45 | 4,78 \pm 0,44 | 1,39 \pm 0,07 |

^aDesvio-Padrão. NA: Não aplicável

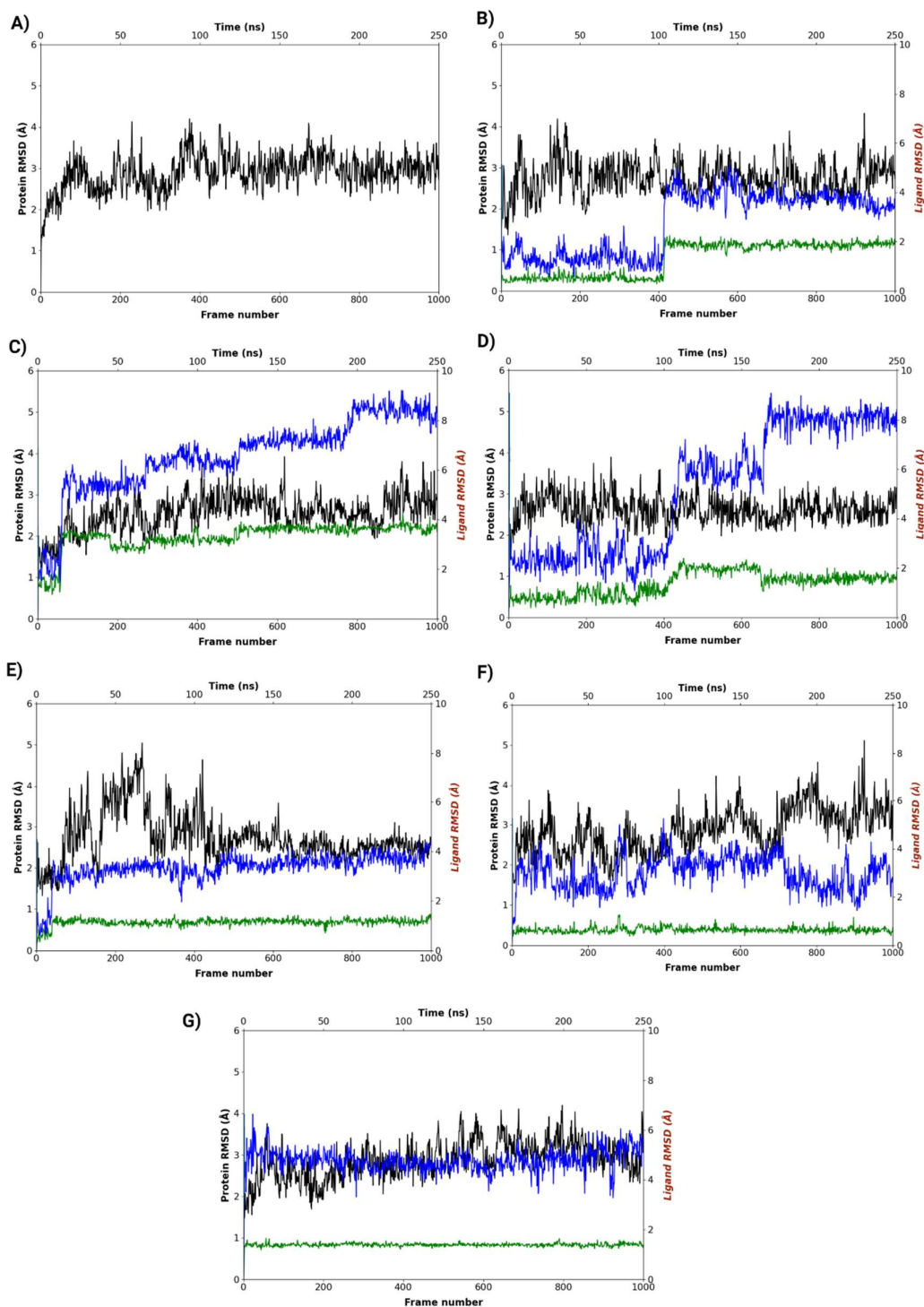


Figura 13. A: Gráfico RMSD para proteína carbono alfa (C α) do receptor *apo* 5HT_{2A}. B: Risperidona. C: Complexo 1. D: Complexo 9. E: Complexo 13. F: Complexo 7. G: Complexo 2. As simulações de Dinâmica Molecular em 250 ns foram monitoradas utilizando o primeiro *frame* como referência. O RMSD com base no carbono alfa da proteína (eixo-Y esquerdo) em preto e o RMSD do ligante (eixo-Y direito). “Lig fit Prot” em azul e “Lig fit Lig” em verde.

O parâmetro “Lig fit Lig” (Figura 13, linha verde no eixo-Y direito) apresenta o RMSD de um ligante que está alinhado e esse parâmetro é medido apenas de acordo com a sua conformação de referência (*frame* 1, nesse caso).³⁶ Em relação ao RMSD do parâmetro “Lig fit Lig” (Figura 13, linha verde no eixo-Y direito; Tabela 2, terceira coluna), no caso da risperidona como controle, esse parâmetro sofre flutuações durante a simulação, especialmente no início da trajetória, até o sistema atingir o equilíbrio (próximo de 100 ns). Então, a risperidona mantém a estabilidade ao longo da simulação até o final e não apresentou picos altos, ou seja, não apresenta grandes variações (Figura 13-B). De forma similar, os complexos 1 e 9 (Figura 13 C e D, respectivamente) apresentam flutuações durante a trajetória, mas, no final da simulação, os complexos se estabilizam. Os complexos 13, 7 e 2 apresentaram perfis bem estáveis de acordo com este parâmetro. Especificamente, os valores médios baixos para o RMSD do parâmetro “Lig fit Lig” (Tabela 2) e o perfil estável durante a simulação para os complexos 13 (1,13 Å) e o complexo 7 (0,63 Å) revelam um perfil mais estável em relação às flutuações internas dos seus átomos quando comparados com a risperidona (1,30 Å).

O parâmetro “Lig fit Prot” (Figura 13, linha azul no eixo-Y direito) representa o valor de RMSD do ligante quando o complexo proteína-ligante é inicialmente alinhado à estrutura da proteína e, em seguida, o RMSD dos átomos pesados do ligante é mensurado. Se os valores observados são significativamente maiores do que o RMSD da proteína, então é provável que o ligante tenha se separado da sua ligação inicial.³⁶ A análise desse parâmetro revelou que os complexos 1, 9 e 2 (Tabela 2, segunda coluna, e Figura 13) apresentaram um perfil dinâmico de movimentos dentro do bolso da proteína que resulta em valores médios maiores para o RMSD “Lig fit Prot”. Levando em consideração que o receptor 5-HT_{2A} apresenta uma cavidade lateral estendida próxima ao sítio de ligação ortostérica⁴, a qual também poderia acomodar parte do ligante, nós decidimos realizar uma análise de *cluster*. Essa análise foi realizada para verificar se a conformação mais comum assumida por esses ligantes ao longo da simulação poderia estar interagindo com essa cavidade lateral. Caso a resposta seja sim, este fato poderia ser a razão de esses ligantes apresentarem valores altos do parâmetro “Lig fit Prot”, com o fundamento de que, durante a interação, eles poderiam estar se movendo da posição de encaixe

inicial com o bolso da proteína, onde ocorre a ligação principal, para uma posição em que parte do ligante interage com a cavidade lateral. A Figura 14 apresenta os resultados da conformação, representando o *cluster* com o maior número de membros (a conformação mais representativa dentre todas as conformações assumidas pelo ligante durante a trajetória da simulação).

Em relação aos resultados da análise do *cluster* para o complexo 9, como apresentado no painel A da Figura 14, o ligante está posicionado na entrada da cavidade lateral (representado pelo resíduo Gly238⁴). Além disso, quando a trajetória para esse complexo é analisada no formato de vídeo, é possível observar a parte inferior do ligante se movendo da posição de encaixe inicial para a cavidade lateral, fato que explica o alto valor de RMSD para o parâmetro “Lig fit Prot”. Adicionalmente, para os complexos 1 e 2 (painel B e C, Figura 14), a análise do *cluster* revela que esses ligantes não interagem com a cavidade lateral. Entretanto, a parte inferior desses ligantes está posicionada próximo à fenda hidrofóbica inferior do bolso de ligação (representada pelos resíduos Ile163, Phe332 e Trp336), exibindo importantes interações com os aminoácidos que apresentam um papel importante no efeito antagonista. Ainda, o vídeo resultante da trajetória dos complexos 1 e 2 mostra que a parte superior desses ligantes exibe um perfil muito dinâmico, o que explica o alto valor de RMSD do parâmetro “Lig fit Prot” (mas o ligante permanece dentro do bolso de ligação durante todo o tempo da simulação).

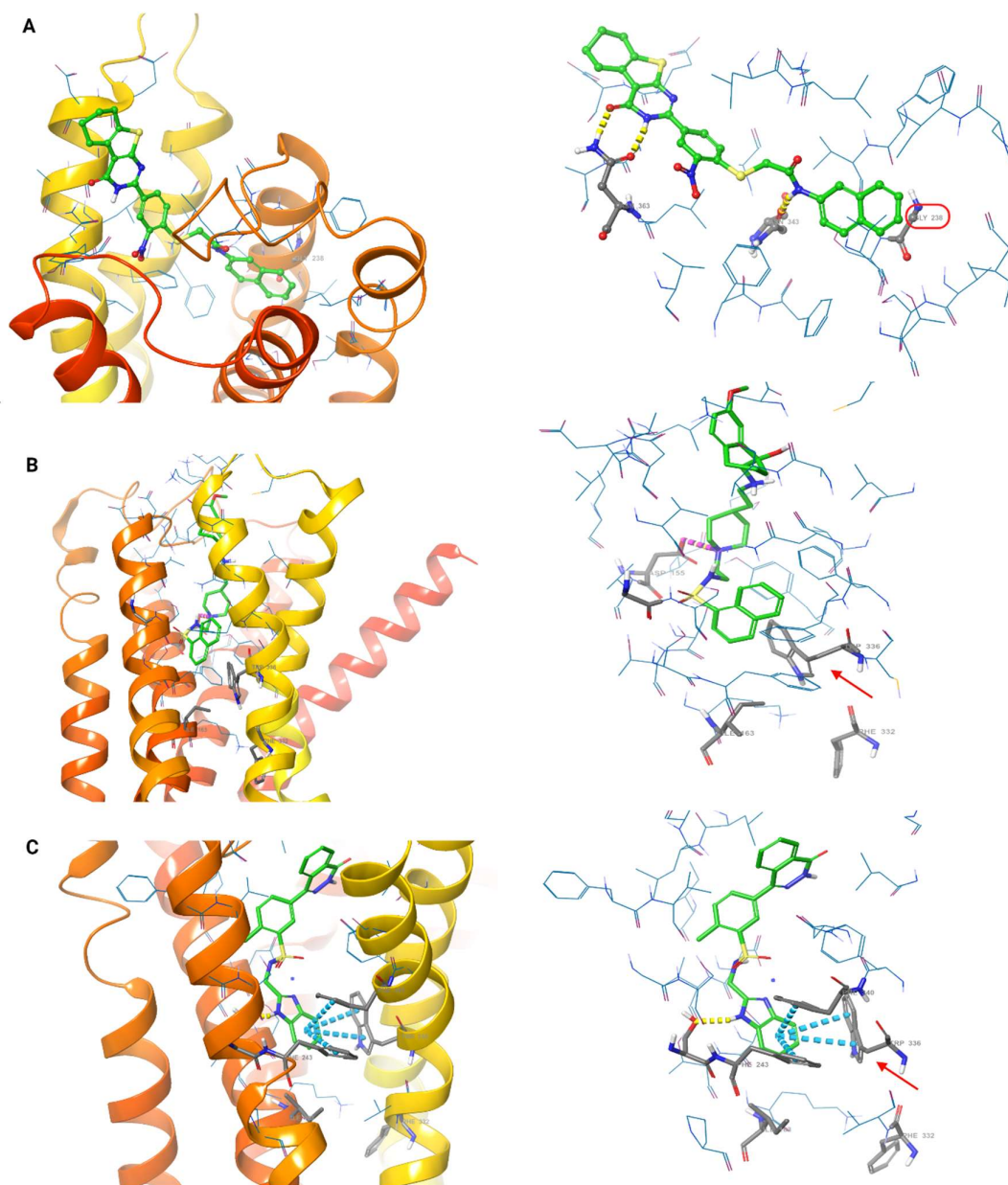


Figura 14. Resultados das conformações que representam o *cluster* com maior quantidade de membros para os complexos 9 (A), 1 (B), 2 (C). Lado esquerdo: representação do sítio de ligação com os elementos secundários. Lado direito: representação do sítio de ligação com os resíduos como linhas. Interações Pi-pi representadas como linhas pontilhadas na cor ciano, ligações de hidrogênio representadas como linhas pontilhadas na cor amarelo e pontes salinas representadas como linhas pontilhadas na cor magenta. Os resíduos Ile163, Phe332 e Trp336 (importantes para a ativação do receptor) da parte inferior do bolso de ligação e Gly238 (localizado na entrada da cavidade lateral-indicado por um retângulo vermelho no painel A) são representados no formato de linhas na cor cinza. O resíduo Trp336 está destacado por uma flecha vermelha.

Os complexos 13 e 7 apresentaram uma média de valores muito similar à risperidona (3,33 Å e 3,00 Å, respectivamente, comparando a 2,78 Å da

risperidona). Além disso, os valores de RMSD para o parâmetro “Lig fit Prot” dos complexos 13 e 7 são similares ao RMSD para o carbono alfa dos mesmos complexos (2,75 e 2,85), apresentando concordância com o movimento da proteína. Com base nos valores de RMSD para o receptor 5HT_{2A} e os valores de RMSD dos candidatos mais bem classificados ao longo da simulação, os complexos 13 e 7 exibiram os melhores perfis de estabilidade na análise de RMSD quando comparados com o receptor *apo* e com o complexo da risperidona. Entretanto, considerando os resultados da análise do *cluster* e do baixo valor de RMSD da proteína para o carbono alfa, apresentado pelos complexos 9, 1 e 2, quando comparados ao receptor *apo* e/ou à risperidona, decidiu-se continuar a análise desses três complexos.

De acordo com a literatura,^{4; 37} os resíduos Ile163, Phe332 e Trp336, localizados na parte inferior da cavidade hidrofóbica do bolso de ligação do receptor, são extremamente influentes na ativação do receptor. As mudanças conformacionais desses resíduos levam à ativação do receptor. O contato próximo entre os ligantes e os resíduos Ile163, Phe332, Trp336 é significativamente importante para o bloqueio dessas mudanças conformacionais dos resíduos, impedindo a ativação e contribuindo para a estabilidade efetiva do receptor em seu estado inativo.⁴ Portanto, bons inibidores devem interagir com o receptor de uma forma que mantenham esses resíduos no lugar, evitando mudanças conformacionais. Nesse sentido, durante todo o período de simulação, os valores de *Root Mean Square Fluctuation* (RMSF) para o carbono alfa desses respectivos resíduos foram monitorados. O parâmetro RMSF é utilizado para determinar mudanças locais ao longo da cadeia da proteína. Esta é uma medida numérica semelhante ao RMSD, mas, ao invés de indicar diferenças posicionais entre estruturas inteiras ao longo tempo, o RMSF reflete a flexibilidade individual do resíduo durante o tempo da simulação.³⁸ Consequentemente, baixos valores de RMSF para esses resíduos ao longo da simulação indicam um perfil menos dinâmico para esses aminoácidos e, portanto, uma maior probabilidade de impedir a ativação do receptor.

Os valores de RMSF para os ligantes e os controles estão relacionados na Tabela 3. De acordo com a análise da Tabela 3, o ligante 9 forma um complexo com o receptor 5HT_{2A}, em que os aminoácidos citados possuem os menores valores de RMSF, indicando que a formação do complexo com o ligante

9 estabiliza os aminoácidos em sua posição original, impedindo a ativação do receptor. Além disso, o complexo 9 apresenta menores valores de RMSF para esses resíduos importantes quando comparado com o antagonista, utilizado nesse caso como controle, risperidona e o receptor *apo*. Com base nos achados de Kimura⁴ e Wacker³⁷, que indicam a necessidade da prevenção do movimento dos resíduos Ile163, Phe332 e Trp336 como objetivo final para a efetivo antagonismo do receptor, é possível indicar o complexo 9 como nosso melhor candidato a antagonista do receptor 5HT_{2A}. Os complexos 13 e 1 também apresentaram boa performance na análise do RMSF para os mesmos aminoácidos. Especificamente, o valor de RMSF para o resíduo F332 do complexo 13 e para o resíduo I163 do complexo 1 apresentaram baixos valores (0,90 Å contra 0,94 Å da risperidona e 0,78 Å contra 0,80 Å da risperidona, respectivamente). O complexo 7 apresentou um perfil mais dinâmico para esses resíduos importantes (o maior valor de RMSF de todos os ligantes estudados). Esse fato pode ser explicado com base na análise de *cluster* apresentada na Figura 15 (apresenta a conformação resultante do *cluster* com o maior número de membros com base na trajetória da DM). Como se pode observar na Figura 15 – painel C, a conformação mais representativa da trajetória da DM para o complexo 7 liga-se em uma posição acima dos resíduos importantes Ile163, Phe332 e Trp336 (mas sem entrar na cavidade lateral). Portanto, não realiza interações com esses importantes resíduos, como a risperidona, o complexo 13 ou outros ligantes estudados. Essa análise ajuda a explicar o perfil mais dinâmico desses resíduos, que resulta em maiores valores de RMSF para o complexo 7. Esta é uma indicação de um efeito fraco ou de ausência de antagonismo para este ligante.

Tabela 3. Valores de RMSF dos aminoácidos importantes localizados no sítio de ligação do receptor 5HT_{2A} em Å.

| Complexo | W336 | F332 | I163 |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| Risperidona | 0,65 | 0,94 | 0,80 |
| Receptor <i>apo</i> | 0,66 | 0,83 | 0,73 |
| 9 | 0,57 | 0,80 | 0,61 |
| 2 | 0,71 | 1,24 | 0,82 |
| 13 | 0,74 | 0,90 | 1,02 |
| 1 | 0,75 | 1,02 | 0,78 |
| 7 | 0,89 | 1,42 | 0,98 |

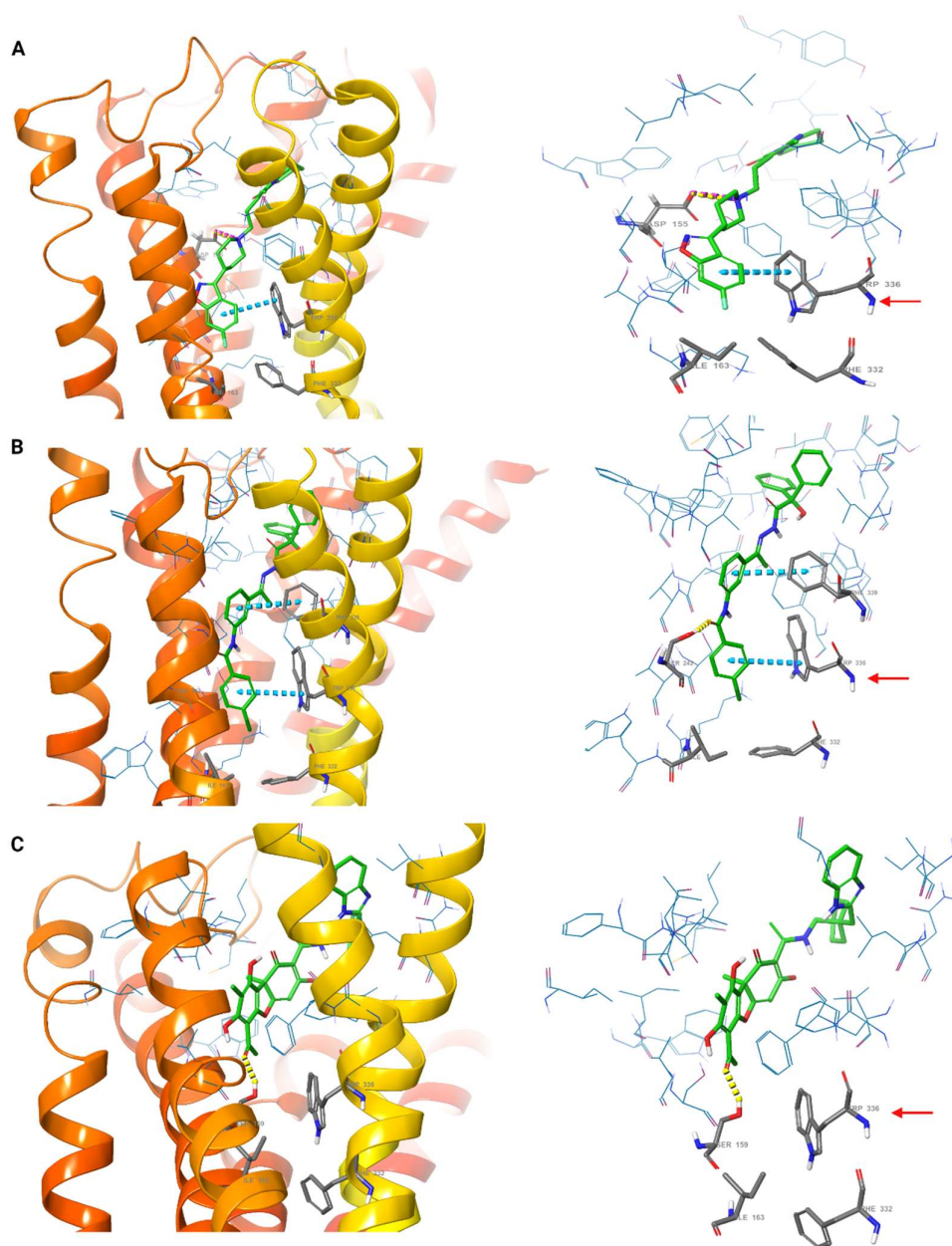


Figura 15. Resultados das conformações que representam o *cluster* com maior quantidade de membros para a risperidona (A), 13 (B), 7 (C). Lado esquerdo: representação do sítio de ligação com os elementos secundários. Lado direito: representação do sítio de ligação com os resíduos como linhas. Interações Pi-pi representadas como linhas pontilhadas na cor ciano, ligações de hidrogênio representadas como linhas pontilhadas na cor amarelo e pontes salinas representadas como linhas pontilhadas na cor magenta. Os resíduos Ile163, Phe332 e Trp336 (importantes para a ativação do receptor) da parte inferior do bolso de ligação (localizado na entrada da cavidade lateral-indicado por um retângulo vermelho no painel A) são representados no formato de linhas na cor cinza. O resíduo Trp336 está destacado por uma flecha vermelha.

Outro parâmetro de estabilidade analisado foi o índice da proteína em Elementos de Estrutura Secundária (SSE – Secondary Structure Elements) (Tabela 4). Os elementos de estrutura secundária da proteína foram monitorados durante todo o período da simulação. A porcentagem de SSE para o receptor *apo* teve um valor total de 75,77%. A porcentagem de hélice e fita foi de 74,85% e 0,92%, respectivamente. A risperidona apresentou um valor total de 75,12% (porcentagem de hélice de 74,27% e 0,85% para fita). No geral, os resultados do ligante em relação ao parâmetro SSE apresentaram uma variação desprezível quando comparados aos controles. Assim, os complexos analisados apresentaram a capacidade de manter os elementos secundários ao longo da simulação. Esse fato indica que os elementos secundários não foram interrompidos pela interação com os ligantes.

Tabela 4. Análise dos elementos de estrutura secundária da proteína (média %).

| Complexo | SSE Total | Hélice | Fita |
|----------------------------|------------------|---------------|-------------|
| Risperidona | 75,12 | 74,27 | 0,85 |
| Receptor <i>apo</i> | 75,77 | 74,85 | 0,92 |
| 9 | 76,23 | 75,31 | 0,91 |
| 2 | 74,85 | 73,88 | 0,97 |
| 13 | 75,72 | 74,77 | 0,95 |
| 1 | 76,40 | 75,44 | 0,95 |

A fim de estudar o perfil de interação de nossos ligantes, monitoramos os contatos proteína-ligante ao longo de todo o período da simulação. De acordo com Kimura e colaboradores⁴, ambos os inibidores risperidona e zotepina formam importantes pontes salinas entre o resíduo Asp155 e os nitrogênios básicos desses compostos. Além disso, os autores apontam que mutações dos resíduos Ile1633, Phe243 e Trp336 reduziram severamente as atividades antagonistas dos antipsicóticos e uma mutação do resíduo Trp336 apresentou uma perda de afinidade superior a 1.000 vezes por esses ligantes. Portanto, analisamos de perto a interação de nossos ligantes propostos com esses resíduos citados e comparamos com o controle risperidona. Os perfis de interação estão relacionados na Figura 16.

Em relação à ponte salina entre Asp155 e o nitrogênio carregado presente nos compostos risperidona e zotepina, os complexos 1 e 9 são capazes de

manter essa interação em alguns pontos durante o período da simulação (também exibindo ligações de hidrogênio ou pontes de água com os mesmos aminoácidos). Isso é possível porque esses compostos também apresentam um nitrogênio carregado em sua estrutura. Por outro lado, o ligante 13 não é capaz de produzir a mesma interação devido ao fato de que este composto não apresenta nitrogênio carregado em sua estrutura, o que impede a formação da ponte salina. No entanto, esse ligante apresenta algumas interações com o resíduo Asp155 por ligações de hidrogênio e pontes de água (ligações mais fracas quando comparadas à ponte salina). A análise dos perfis de interação também indica que os complexos 2, 13 e 1 são capazes de realizar interações hidrofóbicas com o resíduo Trp336 com uma fração de interação semelhante à risperidona (em torno de 0,8). Em relação às interações com Ile163 e Phe243, o controle risperidona apresenta um número reduzido de interações com esses dois resíduos. Para esses dois aminoácidos específicos, os complexos 2, 13 e 1 apresentam uma fração de interação maior do que o controle risperidona, especialmente para o resíduo Phe243 (fração de interação em torno de 0,2 a 0,4, exceto para o ligante 9).

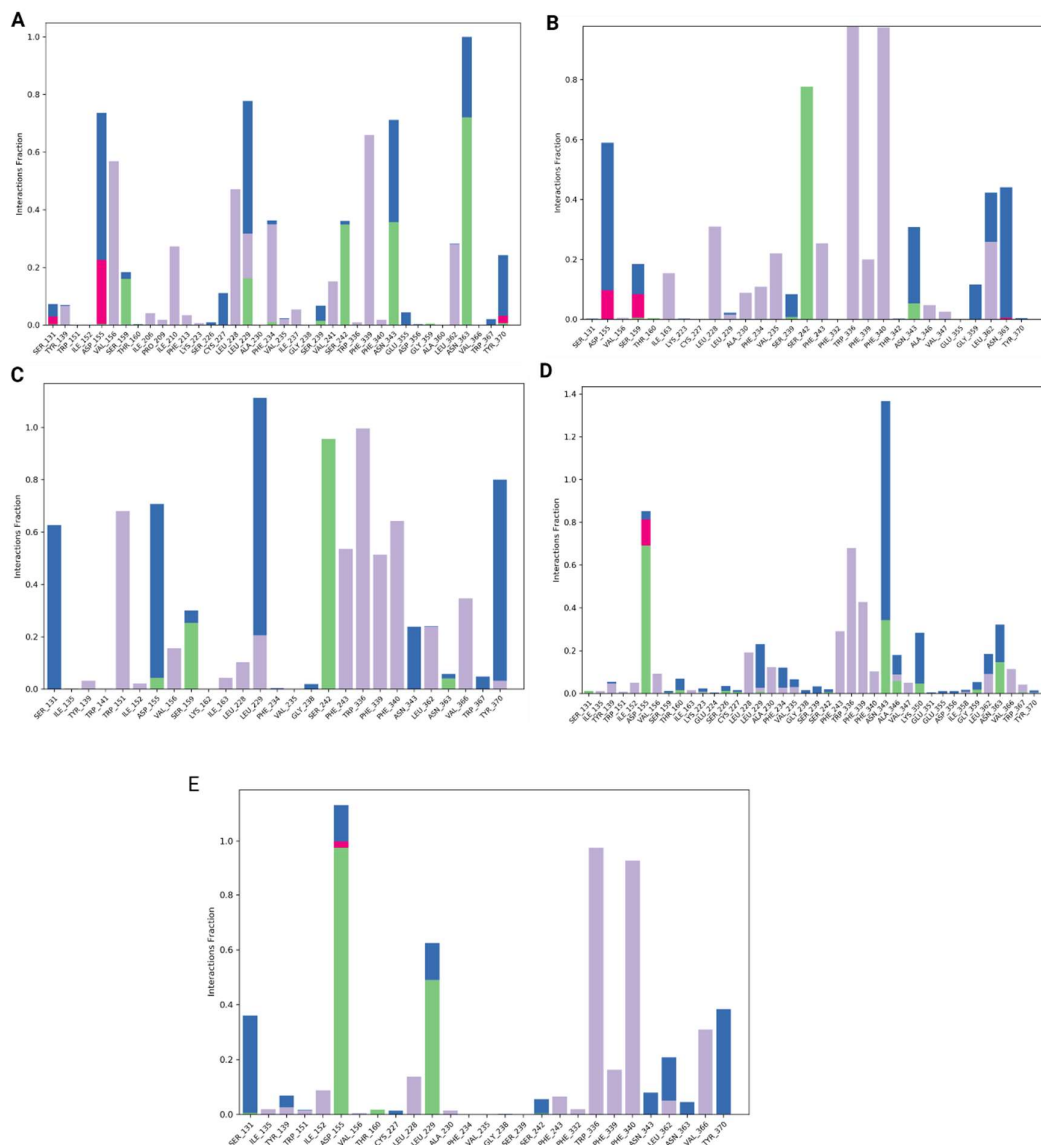


Figura 16. Histograma apresentando o perfil de interação do controle e dos ligantes. Os gráficos de barra são normalizados ao longo da trajetória. A: complexo 9; B: 2; C: 13; D: 1; E: risperidona. Valores acima de 1.0 são possíveis, pois alguns resíduos de proteína podem fazer contatos múltiplos do mesmo subtipo com o ligante. Interações de ligação de H (verde), interações hidrofóbicas (violeta) e pontes de água (azul), interações iônicas (rosa) durante os 250 ns de simulação.

Uma observação importante deve ser feita em relação ao composto **1**. Este derivado, encontrado por meio da pesquisa no ChemBL Database, foi descrito pela primeira vez por Itani *et al.*³⁹ como um potente inibidor do receptor *Human Neuropeptide Y Y5*, um alvo biológico relacionado com a obesidade. Mais importante, este alvo também é uma GPCR, e está presente em algumas regiões do SNC. Porém, apesar do resultado obtido, o composto apresentou baixa permeabilidade ao cérebro por ensaio de ligação *exo-vivo* quando

administrado oralmente em ratos. Não foram encontrados novos estudos utilizando ou citando este composto nas publicações posteriores. Dessa forma, a anterior e independente associação desse composto com um GPCR também presente no SNC pode ser um indicativo do potencial desse composto como um composto *hit* útil como precursor de novos inibidores do 5-HT_{2A}R.

No geral, o perfil de interação mostra que os ligantes apresentados são capazes de manter interações com importantes resíduos de aminoácidos de modo similar à risperidona. Finalmente, embora dados experimentais sejam necessários para provar a atividade biológica/potência desses ligantes, este estudo de simulação de DM apresenta importantes evidências de que os complexos 13, 9, 1 e 2 podem apresentar efeito antagonista sobre o receptor 5HT_{2A}.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

De modo geral, os estudos de *Virtual Screening* que foram aqui apresentados mostraram sucesso em identificar quatro compostos *hit* com potencial de inibição do receptor 5-HT_{2A}R. A abordagem usada, de buscar favorecer compostos que apresentassem ligação com a cavidade lateral responsável por uma maior seletividade por este alvo, levou à identificação do composto 9, cuja *best pose* obtida (capaz de formar várias interações com os resíduos que formam a citada cavidade) mostrou-se, nas simulações de DM, estável no sítio de ligação. Já 1, 2 e 13, apesar de não terem apresentado ligação com a cavidade, também mostraram afinidades e estabilidades que despertam interesse, pois foram capazes de manter as interações com os resíduos de aminoácidos importantes para a inibição, de modo similar à risperidona. Esses resultados indicam uma possibilidade de esses compostos exibirem um efeito antagonista sobre o receptor 5HT_{2A}. Esses compostos passam então a ser candidatos a ensaios biológicos, visando à confirmação das hipóteses aqui levantadas.

6. ARTIGO

O AUTISMO E O POTENCIAL USO DE INIBIDORES DO RECEPTOR TIPO 1A DE VASOPRESSINA PARA SEU TRATAMENTO

AUTISM AND THE POTENTIAL USE OF VASOPRESSIN TYPE 1A RECEPTOR
INHIBITORS FOR YOUR TREATMENT

Allana Cristina Faustino Martins

Farmacêutica, Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Estadual do
Oeste do Paraná (UNIOESTE) 110 - Cascavel, PR, Brasil.

E-mail: allanaa.martins@gmail.com

Eduardo Borges de Melo

Farmacêutico, Doutor em Química, Professor e Pesquisador do Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE (PCF-UNIOESTE).

Endereço: Rua Universitária, 2069, sala 88, Jardim Universitário. CEP: 85819-110 -
Cascavel, PR, Brasil.

E-mail: eduardo.b.de.melo@gmail.com

DOI: 10.34119/bjhrv3n2-064

RESUMO: O Transtorno do Espectro Autista (TEA), ou autismo, é caracterizado por um espectro de comportamentos caracterizados por dificuldades sociais e comportamentais, déficits de comunicação verbais e não verbais e na capacidade de interação social, interesses restritos e comportamentos estereotipados. O aumento dramático na prevalência na última década foi acompanhado por uma abundância de novas estratégias de pesquisa e tratamento. Embora ainda não exista causa ou cura conhecida, a progressão substancial do conhecimento sobre este transtorno vem aumentando substancialmente, abrindo a possibilidade de desenvolvimento de tratamentos farmacológicos mais eficientes. Este trabalho tem por objetivo apresentar os pontos principais deste transtorno, contextualizando assim o desenvolvimento dos inibidores do receptor 1A de vasopressina ($V_{1A}R$), primeira classe de fármacos com chance de ser aprovado para tratamento específico do TEA, e não de sintomas associados, e que atualmente encontram-se em estudos clínicos de fase III.

PALAVRAS-CHAVE: TEA; vasopressina; estudos clínicos; balovaptan.

ABSTRACT: Autism Spectrum Disorder (ASD), or autism, is characterized by a spectrum of behaviors characterized by social and behavioral difficulties, verbal and nonverbal communication deficits and in the capacity for social interaction, restricted interests, and stereotyped behaviors. The dramatic increase in prevalence in the last decade has been accompanied by an abundance of new research and treatment strategies. Although there is still no known cause or cure, the substantial progression of knowledge about this disorder comes to increase substantially, opening up the possibility of developing more efficient pharmacological treatments. This work aims to present the main points of this disorder, thus contextualizing the development of vasopressin 1A receptor inhibitors ($V_{1A}R$), first-class of drugs with a chance to be approved for specific treatment of ASD, and not associated symptoms, and which are currently in phase III clinical studies.

KEYWORDS: ASD; vasopressin; clinical studies; balovaptan.

1. INTRODUÇÃO

O transtorno do espectro autista (TEA), ou autismo, é a definição utilizada para englobar uma série de desordens do neurodesenvolvimento que variam em gravidade. Presente já na primeira infância, este quadro é caracterizado principalmente por dificuldades sociais e comportamentais, principalmente déficits de comunicação verbais e não verbais e na capacidade de interação social, interesses restritos e comportamentos estereotipados, que prejudicam severamente as habilidades sociais e a autonomia pessoal dos indivíduos afetados (United States, 2009; United States, 2013). Estes déficits variam de dificuldade com conversas recíprocas e redução da comunicação não verbal para a compreensão prejudicada das normas e relações sociais (United States, 2013). Atualmente o TEA apresenta uma prevalência mundial de aproximadamente 1% (Lord, 2018), e já é considerada uma importante questão de saúde pública.

Apesar deste aumento dramático da prevalência, que é maior em pessoas do sexo masculino (1 mulher para cada 4 homens), ainda não se conhece a etiologia ou etiologias deste quadro, sendo que muitas teorias são consideradas (Yenkoyan, 2017). Este aumento foi acompanhado por diversas novas estratégias de tratamento não farmacológico, como práticas complementares e integrativas (PICs), terapias cognitivas-comportamentais e de

comportamento social, dentre outras. Duas abordagens mais utilizadas, e que apresentam bons resultados, são a análise de comportamento aplicada (ABA: *Applied Behavioral Analysis*) e o Sistema de Comunicação por Troca de Figuras (PECS: *Picture Exchange Communication System*) (Lord, 2012; Sharma, 2018). Apesar disso, mesmo com a progressão substancial do conhecimento sobre a desordem em um período tão curto, ainda há muitos profissionais sem formação adequada sobre como reconhecer e lidar com os muitos casos apresentados na prática clínica (Mundy, 2003). Há muito se sabe que o TEA varia em algum grau de pessoa para pessoa, e deste modo não existem ainda biomarcadores confiáveis para seu diagnóstico, tornando esta população etiológicamente e fenotipicamente heterogênea, incluindo neste ponto fenótipos diferentes de acordo com o sexo (Bargiela, 2018; Wing, 1979). Junto a estes problemas, ainda não há um tratamento farmacoterapêutico específico para os sintomas principais do TEA.

Recentemente, uma classe de medicamentos conhecidos como inibidores de vasopressina demonstrou grande potencial de uso para o tratamento não apenas de sintomas associados, mas dos sintomas principais do TEA, podendo vir a se tornar os primeiros fármacos específicos para uso neste quadro. Assim, este trabalho tem o objetivo de apresentar informações básicas sobre este promissor tratamento farmacológico. Para contextualizar o problema, também são apresentadas informações básicas sobre o TEA em si.

2. HISTÓRICO

Kanner documentou pela primeira vez a síndrome de “distúrbios autísticos” em 11 crianças que compartilharam padrões de comportamento previamente não relatados, incluindo pobre interação social, obsessividade, movimentos estereotipados e ecolalia. O autor observou que o quadro surgia antes dos 3 anos de idade e por sinais e sintomas comportamentais característicos, incluindo (i) o desenvolvimento anormal no uso da língua; (ii) falta de interação social recíproca e responsividade; (iii) e padrões restritos, estereotipados e ritualizados de interesses e comportamentos (Kanner, 1943).

Ao longo das últimas décadas, pesquisadores trabalharam para categorizar a heterogeneidade do TEA (Bailey, 1996; Charman 2011), esforço de ainda pouco sucesso porque os subgrupos distintos foram empiricamente definidos e ainda precisam ser identificados de modo mais confiável. As teorias mudaram consideravelmente com o passar das décadas, indo de classificações puramente psicológicas até o mais aceito hoje, um quadro de origem genética que, em muitos casos, apresenta um componente de

influência ambiental sobre o mesmo. A 4ª edição do Manual de Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais (DSM-IV) utilizou um sistema multi categórico de diagnóstico de transtornos invasivos do desenvolvimento (PDD: *Pervasive Developmental Disorder*), que incluiu transtorno autístico, transtorno de Asperger, transtorno do desenvolvimento não especificado de outra forma, desordem desintegrativa da infância, a desordem de Rett e as PDDs não especificadas (Tabela 1). Vários estudos relataram uma confiabilidade limitada na forma como os subtipos, e as formas de diagnóstico (Tabela 2) foram atribuídos (Walker, 2014; Lord, 2011), com apresentações similares do sintoma principais através de diagnósticos categóricos (Macintosh, 2004; Malhotra, 2002; Ozonoff, 2000; Snow, 2011; Howlin 2003) e da habilidade preditiva deficiente do resultado mais atrasado baseado nesses subtipos (Szatmari, 2003; Szatmari, 2003). Conseqüentemente, a DSM-5 substituiu o sistema multicategórico por uma única dimensão diagnóstica: TEA (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre as categorias do Transtorno do Espectro Autista (TEA) (adaptada)

| |
|-------------------------------------------------------|
| DSM-IV |
| Transtornos invasivos do desenvolvimento (PDDs) |
| - Desordem autística |
| - Síndrome de Asperger |
| - Síndrome de Rett |
| - Desordem desintegrativa da infância |
| - PDD- não especificada |
| DSM-5 |
| Nível 1: Requer acompanhamento e suporte |
| Nível 2: Requer acompanhamento e suporte substanciais |
| Nível 3: Requer acompanhamento e suporte substanciais |

Tabela 2. Comparação entre os critérios das DSM-IV e 5 para o diagnóstico do Transtorno do Espectro Autista (adaptada)

| |
|--------------------------------------------------|
| DSM-IV |
| - Prejuízo social |
| - Déficit de fala/comunicação e atraso no idioma |

| |
|----------------------------------------------------------------|
| - Comportamentos repetitivos e interesses restritos |
| DSM-5 |
| - Déficit na comunicação social |
| - Padrões de comportamento e interesse restritos e repetitivos |

Atualmente também se considera que os indivíduos com TEA são mais bem representados por apenas uma categoria de diagnóstico (MacPartland, 2012) porque eles apresentam tipos de sintomas similares e são mais bem diferenciados por especificações clínicas, como, por exemplo, dimensões da severidade, e por características associadas, como desordens genéticas conhecidas, epilepsia e incapacidade intelectual.

3. EPIDEMIOLOGIA

Por muito tempo após o autismo ser descrito, em meados de 1940, a prevalência foi considerada como aproximadamente 2 a 4 casos a cada 10.000 crianças. (Lord, 2012) Porém, nos últimos anos a prevalência do TEA aumentou de forma dramática, com prevalência estimada em aproximadamente 1,5% da população mundial (Lyall, 2017; United States, 2014). Deveu-se isto não só a um aumento do número de casos propriamente dito, mas também ao aumento do número de casos realmente diagnosticados graças a mudanças nos conceitos sobre esta desordem decorrente de estudos mais aprofundados e em maior quantidade, com conseqüente aumento da compreensão sobre o mesmo, o que afetou diretamente os procedimentos de diagnósticos e a disponibilidade de serviços. Além disso, a crescente conscientização do público, especialmente entre pais e professores nos países em desenvolvimento, auxiliou neste aumento nos diagnósticos, em especial em idade pouco avançada a um levou a diagnósticos anteriores. Outros fatores incluem o aumento da disponibilidade de serviços e a capacidade de diagnosticar crianças em idades mais jovens (Lyall, 2017; Mundy 2003). Desta maneira, não é absurdo supor que este quadro possa estar presente na história da humanidade de modo muito mais frequente do que se imagina, como observam Donovan e Zucker (Donvan, 2017) em alguns casos apresentados por eles. Atualmente, o TEA é reconhecido como uma das desordens de desenvolvimento mais comuns.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou, para 2010, que o TEA estava presente em 0,76% das crianças, apesar do levantamento ter sido baseado em estudos que

consideravam apenas 16% da população infantil mundial (Lyall,2017). Se estes números forem extrapolados para a população mundial total, pode-se considerar que aproximadamente 60 milhões podem atualmente estar acometidas por esta desordem em seus mais diferentes aspectos. Destes casos, embora ainda não existam dados e levantamentos adequados, cerca de 2 milhões podem ser de brasileiros (Oliveira, 2020), o que aproxima-se da porcentagem estimada pela OMS. Porém, um grande estudo realizado com a população americana estimou em uma prevalência de 2,2% (aproximadamente 7.200.000 pessoas) (Lyall,2017). Dados de um estudo em realizado por Baio *et al.* (Baio, 2018) atualizou a prevalência norte-americana em 1 para cada 59 nascidos, porém com altas variações de acordo com cada Estado (com máxima de 1 em cada 39 em Nova Jersey), indicando que a prevalência média tende a aumentar. Assim, não é de se surpreender que as estimativas publicadas pela OMS a cerca de 10 anos já estejam defasadas. Outro fato importante a se considerar é que os levantamentos consideram basicamente a população infantil, com quase ausência total de estudos referentes a epidemiologia de pessoas diagnosticadas na fase adulta (Lyall, 2017).

Um fato importante a ser considerado é a muito divulgada prevalência de 1 menina com TEA para cada 4 meninos (inclusive, motivo este pela qual a cor que representa o autismo é o azul). Estudos recentes vêm indicando que o TEA pode apresentar fenótipos diferenciados entre as mulheres. Estes resultados indicam que há um subdiagnóstico em mulheres devido à possibilidade de expressão de um fenótipo diferenciado em relação aos homens em muitos casos, o que pode, com o tempo, contrariar a discutida maior prevalência em homens (Lord, 2016).

4. ETIOLOGIA

Segundo a literatura, hoje o TEA é dividido em duas categorias básicas: autismo monogênético e autismo complexo/multigênico ou idiopático. O primeiro incluem formas relacionadas com desordens genéticas bem determinadas, enquanto no segundo tipo (que envolve de 85 a 90% dos casos) (Ghosh, 2017, Beltrão-Braga, 2017) isto não ocorre. Dentre as causas sindrômicas, e conseqüentemente aquelas mais estudadas (Beltrão-Braga, 2017), destacam-se as síndromes do X Frágil (Salcedo-Arellano, 2020), de Rett (Cosentino, 2019), de Timothy (Ornoy, 2016), de Angelman (Khatri, 2019), de Prader-Willi (Harris, 2020), a de Phelan-McDermid (Kolevzon, 2019), e a desordem relacionada ao gene CDKL5. Ainda assim, algumas destas síndromes apresentam poucas pessoas com

TEA confirmada, como a de Timothy (20 casos) e a desordem do CDKL5 (80 casos) (Beltrão-Braga, 2017).

Porém, isto não quer dizer que os casos idiopáticos não estejam envolvidos com mutações genéticas, muito pelo contrário. Estes casos apresentam grande evidência de mutações *de novo*, ou seja, que não surgem devido à hereditariedade (Beltrão-Braga, 2017). Além disso, muitas destas mutações são identificadas em amostras extremamente pequenas de indivíduos (literalmente, menos de 10 pessoas) (Satterstrom, 2020) e que, embora não é possível dizer que estejam ausentes em uma número maior de pessoas com TEA, também não é possível relacioná-las sem sombra de dúvida com a presença da desordem.

Neste contexto, com a inexistência de um agente etiológico em comum, o diagnóstico da grande maioria dos casos é desafiador porque se baseia simplesmente na observação de comportamentos e fenótipos cognitivos sem o auxílio de testes laboratoriais, resultados de imagem ou marcadores bioquímicos (Geschwind, 2009). É aceito hoje que os casos idiopáticos provavelmente possuem uma origem epigenética: apresentam hereditariedade, que por si só não explica o aumento na prevalência, indicando o envolvimento de fatores ambientais. Isto é fortalecido por não ser possível identificar essa transmissão apenas analisando o sequenciamento do código genético, o que dificulta ainda mais a constatação de um ponto em comum em todos os casos apresentados (Geschwind, 2009; Taylor, 2014).

Um grande número de fatores ambientais heterogêneos foi levado em consideração, como a exposição a poluentes ambientais, como metais pesados e partículas, assim como medicamentos (como o ácido valpróico) e pesticidas agrícolas durante o pré-natal, mas sem conclusões definitivas (Lyll, 2014). Recentemente, vários estudos identificaram o estresse oxidativo em pacientes com autismo, porém a causa permanece desconhecida (Bjorklund, 2020). Infelizmente, apesar de todos os esforços que foram feitos na pesquisa médica, muitos aspectos da etiopatogenia do autismo ainda permanecem obscuros e sua prevalência parece aumentar dramaticamente sem uma explicação plausível. Atualmente, é necessário formular hipóteses alternativas para entender o que está por trás desse fenômeno.

5. PATOFISIOLOGIA

As interações sociais comprometidas no TEA podem incluir, mas não se limitam e não precisam estar presentes em todos os casos, a falta de contato ocular, dificuldade em compreender e transmitir gestos sociais apropriados, dificuldade em interpretar expressões faciais, falta de atenção conjunta, e expressões faciais limitadas ou inapropriadas. A empatia mal desenvolvida e a falta de reciprocidade também são traços característicos. Muitas crianças com TEA expressam o desejo de ter amigos, mas não sabem como iniciar ou manter relacionamentos, e muitas vezes não têm uma compreensão clara do que a amizade envolve (Mundy, 2003; Rogers, 2003; Tuchman, 2003). A comunicação não verbal e verbal é muitas vezes prejudicada. O desenvolvimento da linguagem é atrasado na maioria das crianças afetadas. Trinta por cento das crianças com TEA experimentam a regressão, geralmente antes de 36 meses de idade, onde frequentemente perdem toda a linguagem previamente adquirida (Rogers, 2004).

Embora muitos sejam capazes de re-adquirir as habilidades verbais perdidas, alguns nunca desenvolvem linguagem. Indivíduos com TEA que exibem a fala adequada geralmente têm dificuldade em iniciar e sustentar conversas fora de seus interesses focados. Seu discurso é muitas vezes repetitivo, ecoando frases de indivíduos circundantes, filmes, jogos ou livros. Essas crianças também apresentam dificuldade em compreender e integrar conceitos abstratos, concentrando sua discórdia em ideias concretas. A comunicação não verbal também é prejudicada no autismo, porque essas crianças tipicamente usam gestos inadequados ou inapropriados, que podem incluir não apontar, ou não agitar a cabeça para sinalizar concordância ou negação (Karande, 2006).

Além dos sintomas característicos, há uma série de condições coexistentes, mas não exclusivos, podem estar associadas ao TEA. Segundo Lord *et al* (Lord, 2019), a dificuldade de aprendizado acadêmico é um dos mais comuns, presente em cerca de 75% dos indivíduos de 9 a 18 anos, assim como atrasos de fala e linguagem (87% em crianças com 3 anos de idade). Também podem estar presentes distúrbios funcionais, sendo o mais comum problemas associados ao trato gastrintestinal, que podem estar presentes em até 47% das pessoas com TEA. Outros casos relacionados são problemas de sono, tiques, epilepsia e outros. Uma outra comorbidade importante é a depressão, geralmente presente em pessoas com TEA que tem consciência de seu quadro, geralmente na adolescência, e que acabam por desenvolver este quadro devido a, mesmo com este discernimento, não conseguirem formar e manter relações sociais estáveis. Por isso, estudos vêm mostrando que a presença de TEA pode se tornar um fator de risco para o suicídio neste subgrupo

em específico (Meyers, 2014). Devido a este e a outros fatores, como a não compreensão adequada de situações de risco do dia a dia, como o trânsito de uma cidade, Freitag (Freitag, 2007) avaliou que a expectativa de vida de uma pessoa com TEA pode ser, em média, quase vinte anos menor do que uma pessoa neurotípica.

6. INTERVENÇÃO FARMACOLÓGICA

Atualmente, ainda não há medicamentos aprovados para o tratamento do TEA. O tratamento para os sintomas principais concentra-se na população pediátrica e é limitado primeiramente às intervenções cognitivas e comportamentais, por exemplo, fonoaudiologia e análise do comportamento aplicado (Howlin, 2012; Houghton, 2017). No entanto, os ensaios clínicos que avaliam estas estratégias são muitas vezes subalimentados, e a evidência da sua eficácia em adultos, em particular, é limitada (Houghton, 2017).

Atualmente diversos fármacos encontram-se em desenvolvimento, em diferentes estágios de ensaios pré-clínicos e clínicos (Weele, 2017; Williams, 2013; Berry-Kravis, 2017; Lacivita, 2017). Enquanto isso, os únicos tratamentos farmacológicos aprovados, os antipsicóticos atípicos aripiprazol e risperidona (Figura 1), são limitados ao uso em estados de agitação e irritabilidade associada à TEA, com o objetivo de aliviar esses sintomas e melhoria da qualidade de vida. Outros sintomas alvo que devem ser tratados incluem problemas do sono, ansiedade, comportamentos motores repetitivos, sintomas obsessivo-compulsivos, impulsividade, depressão, mudanças de humor, agitação, hiperatividade, agressividade e comportamento prejudicial a si mesmos. (Kim, 2015) Embora essas fármacos, e outros medicamentos psicotrópicos utilizados de modo *off-label* para tratar estas comorbidades psiquiátricas, apresentam efeitos adversos (por exemplo, discinesia tardia, ganho de peso, e sedação), seu uso é comum (Brugha, 2015).

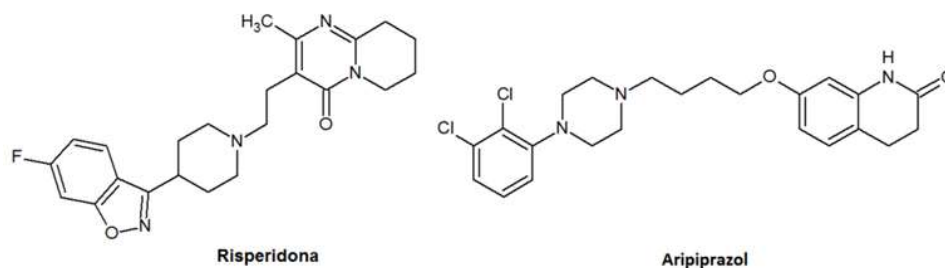


Figura 1. Estruturas da risperidona e do aripiprazol.

Existe um debate contínuo sobre como os tratamentos (farmacológicos, comportamentais e sociais) podem melhorar a qualidade de vida de indivíduos com TEA. É importante pontuar que um grande desafio para o desenvolvimento de medicamentos em todos os transtornos psiquiátricos, mas particularmente em distúrbios do desenvolvimento neurológico, é a escassez de medicamentos aprovados e um ambiente regulatório menos estabelecido que leva a incertezas no delineamento dos ensaios clínicos. Além disso, o desenvolvimento de fármacos e intervenções são realizados separadamente, apesar do fato de que ambas as abordagens podem ter efeitos sinérgicos quando combinadas (Forgeot d'Arc, 2019). Assim, um diálogo mais próximo para integração do tratamento farmacológico às intervenções comportamentais, principalmente em crianças, levaria a um benefício óbvio.

7. INIBIDORES DO RECEPTOR 1A DA VASOPRESSINA (V_{1A}R)

Embora a etiologia do TEA seja complexa e multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais, várias vias neurais e circuitos subjacentes ao comportamento social foram identificados. O neuropeptídeo vasopressina (Figura 1) tem sido implicado na modulação de circuitos cerebrais que regulam comportamentos sociais (Insel, 2010; Albers, 2012), como agressividade, comportamento sexual e esquizofrenia (Kreek, 2011). A vasopressina é produzida nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo, que se projetam para regiões-chave do cérebro, incluindo o sistema olfativo, o córtex pré-frontal, o córtex entorrinal e amígdala (Benarroch, 2013). No cérebro, a vasopressina tem como alvo os receptores V_{1a}, V_{1b} e V₂, todos pertencentes da classe dos receptores acoplados à proteína G (GRCP: *G protein-coupled receptor*). O receptor V_{1a} é o subtipo dominante no cérebro, possui sete unidades transmembrana, e localiza-se na membrana do neurônio pós-sináptico. Já a expressão do receptor V_{1b} é restrita ao hipocampo (Stoop, 2012; Young 2006). As ações no sistema nervoso central se dão em conjunto com a ocitocina, um nonapeptídeo de estrutura semelhante (Green, 2008). Já o receptor V₂ é expresso nos rins e no endotélio vascular.

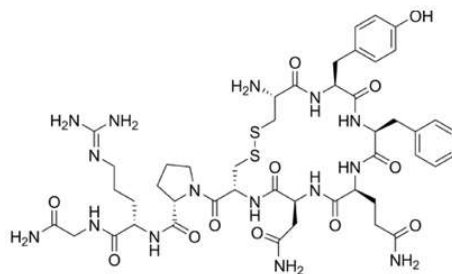


Figura 2. Estrutura da vasopressina

A alteração da expressão da vasopressina ou de seus receptores afeta os comportamentos sociais (Insel, 2010). Em humanos, estudos sugeriram que a administração aguda de vasopressina intranasal modula a cooperatividade (Rilling, 2012; Rilling, 2014) e a memória e a percepção das expressões faciais (Thompson, 2004; Thompson, 2006; Guastella, 2010), potencialmente de maneira dependente do sexo (Rilling, 2014, Thompson, 2006). Vários estudos também relataram uma ligação potencial do DNA de microssatélites no AVPR1A, o gene que codifica o receptor V_{1a} , com comportamentos sociais (Meyer-Lindenberg, 2009; Ebstein, 2012).

Porém, é importante citar que a vasopressina atua em conjunto com a ocitocina, um nonapeptídeo de estrutura semelhante (Figura 2). Ambos são secretados pelo hipotálamo, porém a ocitocina possui apenas um receptor, embora também se possa ligar nos receptores de vasopressina, sendo que o contrário também ocorre. Acredita-se que ambos atuem como moduladores do processamento de informações sociais e do comportamento social em mamíferos, facilitando a reconhecimento da via do olfato em roedores e da visão em seres humanos, além de promover o vínculo social entre parceiros (Insel, 2010; Bielsky, 2004). Alterações nas concentrações circulantes de vasopressina e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP: *single nucleotide polymorphism*) nos genes que codificam seus receptores podem estar associadas a diversos transtornos psiquiátricos. No entanto, evidências diretas implicando vasopressina e ocitocina na fisiopatologia do autismo permanecem obscuras. Análises das SNPs destes receptores sugeriram uma associação com o TEA, embora ainda não confirmado (Bielsky, 2005). Assim, a modulação das vias associadas a estes peptídeos podem ter como alvo os sintomas comportamentais no autismo no lugar dos mecanismos primários desta desordem.

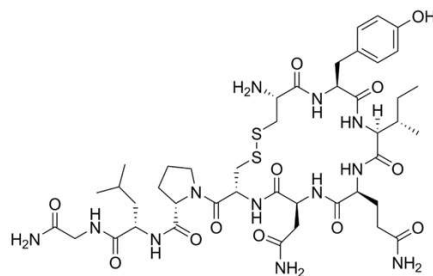


Figura 3. Estrutura da ocitocina.

Estudos também indicam alguma contribuição dos hormônios sexuais na fisiopatologia. De modo geral, a prevalência de perturbações sociais é mais elevada e severa nos homens do que nas mulheres. Também levando em conta um elevado grau de hereditariedade, Murakami *et al* (Murakami, 2011) avaliaram a interação social com expressão genética para os dois neuropeptídeos usando cobaias adultas. Observou-se uma correlação positiva entre a interação social e os respectivos receptores, as quais obtinham maior expressão quanto maior a interação social, apresentando correlação com o estrogênio, indicando que os sistemas da ocitocina e vasopressina são regulados pelos receptores do estrogênio.

Os inibidores do receptor V_{1a} já constituem uma classe de medicamentos em uso, embora não para tratamento do TEA ou de distúrbios relacionados. Os fármacos tolvaptan e conivaptan (Figura 1) são usados para o tratamento de hiponatremia (baixa quantidade de sódio no sangue), sendo que o primeiro também é indicado para situações associadas à insuficiência cardíaca e certos desequilíbrios hormonais. Além disso, o conivaptan não é seletivo pelo $V_{1a}R$, também sendo capaz de se ligar ao $V_{2}R$. Ambos promovem uma melhora no fluxo urinário, porém sem causar grande perda de sódio (<https://www.drugs.com/mtm/tolvaptan.html>; <https://www.drugs.com/mtm/conivaptan.html>). Desta forma, pode-se considerar que o $V_{1a}R$ é um receptor com potencial uso como alvo terapêutico confirmado, embora esta confirmação não ainda não esteja relacionada ao TEA.

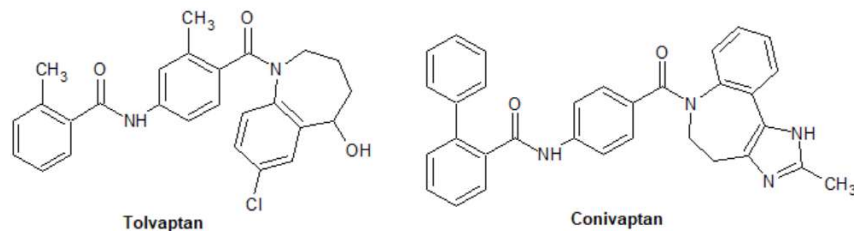


Figura 4. Estruturas do tolvaptan e do conivaptan.

Modelos animais de TEA têm sido utilizados para explorar o efeito da inibição do receptor V_{1a} nos comportamentos sociais. Por exemplo, a exposição fetal ao ácido valpróico (um fármaco antiepilético) é reconhecido como um fator de risco ambiental para o desenvolvimento de TEA (Christensen, 2013), e causa déficits sociais no modelo correspondente em ratos (Schneider, 2005; Felix-Ortiz, 2012). A infusão de antagonistas do receptor V_{1a} demonstrou ter efeitos pró-sociais nesse modelo (Felix-Ortiz, 2012). Dada esta conexão, considerou-se esta proteína como um potencial alvo terapêutico para o tratamento de TEA. Evidências de estudos em humanos também implicaram que este alvo está relacionado com a mediação e modulação de comportamentos sociais importantes para indivíduos com TEA. (<https://www.roche.com/investors/updates/inv-update-2018-01-29.htm>). Um pequeno estudo (ClinicalTrials.gov: NCT01474278) avaliou um inibidor altamente seletivo (RG7713/RO5028442, Figura 3) administrado por via intravenosa em homens adultos com TEA com quociente de inteligência (QI) ≥ 70 usando biomarcadores exploratórios, incluindo rastreamento ocular e avaliações comportamentais. A administração de uma dose única foi associada a uma melhora estatisticamente significativa (Umbricht, 2017). Embora este composto não possa ser desenvolvido para uso crônico em humanos devido às suas propriedades (Ratni, 2015), este estudo forneceu evidências preliminares de que a inibição do receptor V_{1a} pode melhorar os comportamentos sociais e de comunicação no TEA (Umbricht, 2017) e incentivou mais pesquisas e o desenvolvimento de fármacos para uso uma via oral, uma via mais adequada para medicamentos de uso contínuo.

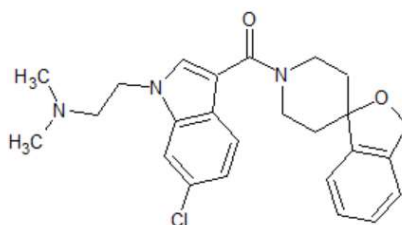


Figura 5. Estrutura do RO5028442

O balovaptan (Figura 4) é uma molécula atualmente em fase III de investigação clínica. Atua como antagonista competitivo seletivo do $V_{1A}R$, apresenta atividade quando administrado por via oral e possui potência e seletividade *in vitro* semelhante ao RO5028442. Os estudos clínicos de fase 1 de balovaptan (Bolognani, 2019) não

identificaram preocupações de segurança ou tolerabilidade com doses únicas de até 76 mg ou doses repetidas de até 52 mg por dia durante 2 semanas, respectivamente, em voluntários saudáveis do sexo masculino (identificador ClinicalTrials.gov: NCT01418963).

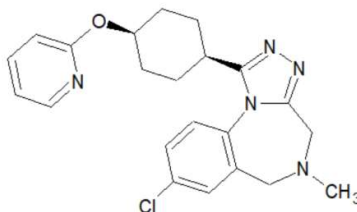


Figura 6. Estrutura do balovaptan (Roche Co.)

Parker *et al.* (Parker, 2017) e Bolognani *et al.* (Bolognani, 2019) relataram os resultados de dois ensaios clínicos relacionados à vasopressina, um em crianças (Parker, 2017) e outro em adultos (Bolognani, 2019). No primeiro estudo foi administrada vasopressina intranasal em crianças (6 a 12 anos) por 4 semanas, enquanto no segundo foi usado o balovaptan via oral em adultos (18 a 45 anos) por 12. Ambos os estudos corresponderam a ensaios clínicos de fase 2, randomizados e controlados por placebo, projetados com a mesma medida de resultado primário: mudança da linha de base na Escala de Responsabilidade Social (SRS-2), que mede o comprometimento social e comportamentos repetitivos. O poder estatístico dos dois estudos foi bem diferente entre si (30 crianças com TEA no primeiro e 223 adultos do sexo masculino no segundo) (Bolognani, 2019). A tolerabilidade aos medicamentos foram boas em ambos os estudos. A comparação dos resultados pode ajudar a elucidar como a modulação da via da vasopressina pode trazer benefícios para indivíduos com TEA.

O ensaio clínico de fase 2 do balavopatan foi realizado com o objetivo de melhorar a comunicação social e os déficits de interação social em portadores de TEA, além de avaliar a segurança e a tolerabilidade (ClinicalTrials.gov: NCT01793441). Três doses (1,5, 4 e 10 mg) foram avaliadas em homens adultos com TEA moderado a grave e $QI \geq 70$. O medicamento foi administrado diariamente durante 12 semanas (Bolognani, 2019). O estudo foi realizado em quatro estágios recrutados sequencialmente, com os estágios 1 a 3 projetados para avaliar doses crescentes de balovaptan e o estágio 4 adicionado para aumentar o tamanho da amostra das coortes de 1,5 e 10 mg de balovaptan.

A dose mais baixa de balovaptan (1,5 mg) foi selecionada para fornecer algumas informações de segurança iniciais em uma dose que se espera produzir efeito farmacodinâmico limitado. A dose de 4 mg correspondeu a estimativas usando cálculos de modelagem de uma ocupação do receptor V_{1a} com base em um ensaio periférico de agregação plaquetária *ex vivo* e em modelagem farmacocinética/farmacodinâmica. Havia uma previsão de ocupação de mais de 80% dos receptores no cérebro durante 24 horas. Deste modo, previa-se que a dose de 10 mg proporcionasse uma ocupação de receptor > 90% na maioria dos participantes tratados. Na conclusão, o estudo não atingiu seu objetivo primário (melhoria na eficácia do Escala de Responsividade Social, SRS-2). No entanto, um sinal de eficácia para o tratamento foi observado no escore composto *Vineland-II Adaptive Behavior Scales*. Isso sugeriu que a inibição do receptor V_{1a} melhorou os comportamentos sociais e a comunicação entre os participantes, adicionando evidências do papel da vasopressina nos comportamentos sociais humanos. Não surgiram problemas de segurança, e os parâmetros farmacocinéticos estavam alinhados com as expectativas baseadas nos estudos de fase 1. Atualmente, o balovoptan se encontra em estudos clínicos de fase 3, com previsão inicial de conclusão em 2022 (ClinicalTrials.gov: NCT04049578), quando então poderá se tornar o primeiro medicamento aprovado uso para o tratamento específico do TEA.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tudo indica que o Transtorno do Espectro Autista (TEA) é causado por uma complexa gama de variantes genéticas comuns e/ou raras, incluindo mutações *de novo*, associado ou não a fatores ambientais. Deste modo, é provável que mecanismos biológicos distintos possam estar envolvidos no processo, mas estes ainda precisam ser totalmente elucidados. Neste contexto, o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento deste transtorno é extremamente desafiador, e a farmacoterapia atualmente disponível buscam apenas aliviar sintomas psiquiátricos e comportamentais associados a este transtorno, incluindo aí os dois únicos medicamentos aprovados pelo FDA para uso neste quadro, os antipsicóticos atípicos risperidona e aripiprazol. Os inibidores do receptor V_{1A} podem vir a ser tornar a primeira classe terapêutica com o objetivo específico de tratamento do TEA em si, podendo auxiliar desta forma na melhoria da qualidade de vida de milhões de pessoas que apresentam este transtorno, em especial aqueles classificados em uma faixa mais alta do espectro, e que desta forma precisam conviver

com sérios problemas relacionados ao desenvolvimento cognitivo e, em alguns casos, até mesmo motor.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIOESTE (PCF-UNIOESTE) e a Fundação Araucária (www.fappr.pr.gov.br). O autor E.B.M. também agradece ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) pela Bolsa de Produtividade Nível 2 (processo 311048/2018-8).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. UNITED STATES. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2006 Principal Investigators. Prevalence of autism spectrum disorders—Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR Surveill Summ* 2009; 58 (No. SS-10).
2. UNITED STATES. American Psychiatric Association. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 5th ed. Washington, DC: American Psychiatric Association; 2013.
3. WING, L; Gould J: Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. *J autism Dev Disord* 1979, 9:11-29.
4. LORD, C., Elsabbagh M., Baird, G., Veenstra-VanderWeele, J. Autism spectrum disorder. *Lancet* **392**, 508–520 (2018).
5. YENKOYAN, K.; Grigoryan, A.; Fereshetyan, K.; Yepremyan, D.; Advances in understanding the pathophysiology of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res.* 2017,331, 92-101
6. LORD, C., Petkova E, Hus V, Gan W, Lu F, Martin DM, Ousley O, Guy L, Bernier R, Gerds J, *et al.*: A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2012, 69:306-313.
7. SHARMA, S.R.; Gonda, X.; Tarazi, F.I.; Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol Ther.* 2018, 190, 91-104

8. MUNDY P. Annotation: the neural basis of social impairments in autism: the role of the dorsal medial-frontal cortex and anterior cingulate system. *J Child Psychol Psychiatry* 2003;44(6):793–809.
9. BARGIELA, S.; Steward, R.; Mandy, W.; The Experiences of Late-diagnosed Women with Autism Spectrum Conditions: An Investigation of the Female Autism Phenotype. *J Autism Dev Disord*. 2016, 46, 3281-94; Lord, C.; Elsabbagh, M.; Baird, G.; Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392 (10146), 508–520
10. KANNER L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 1943;2:217-50.
11. BAILEY A, Phillips W, Rutter M. Autism: towards an integration of clinical, genetic, neuropsychological, and neurobiological perspectives. *J Child Psychol Psychiatry* 1996;37:89-126.
12. CHARMAN T, Jones C, Pickles A, Simonoff E, Baird G, Happé F: Defining the cognitive phenotype of autism. *Brain Res* 2011, 1380:10–21.
13. TAGER-FLUSBERG, H. Defining language phenotypes in autism. *Clin Neurosci Res* 2006, 6:219–224.
14. WALKER, D., Thompson A, Zwaigenbaum L, Goldberg J, Bryson S, Mahoney W, et al: Specifying PDD-NOS: a comparison of PDD-NOS, asperger syndrome, and autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2004, 43:172–180.
15. LORD, C., Petkova E, Hus V, Gan W, Lu F, Martin D, et al: A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2011, 69:306–313.
16. MACINTOSH K, Dissanayake C: Annotation: the similarities and differences between autistic disorder and asperger’s disorder: a review of the empirical evidence. *J Child Psychol Psychiatry* 2004, 45:421–434.
17. MALHOTRA, S., Gupta N: Childhood disintegrative disorder re-examination of the current concept. *Eur Child Adolesc Psychiatry* 2002, 11:108–114.
18. OZONOFF, S., South M, Miller J: DSM-IV-defined asperger syndrome: cognitive, behavioral and early history differentiation from high- functioning autism. *Autism* 2000, 4:29–46.
19. SNOW, A., Lecavalier L: Comparing autism, PDD-NOS, and other developmental disabilities on parent-reported behavior problems: little evidence for ASD subtype validity. *J Autism Dev Disord* 2011, 41:302–310.

20. HOWLIN, P. Outcome in high-functioning adults with autism with and without early language delays: implications for the differentiation between autism and Asperger syndrome. *J Autism Dev Disord* 2003, 33:3–13.
21. SZATMARI, P., Bryson S, Duku E, Vaccarella L, Zwaigenbaum L, Bennett T, et al: Similar developmental trajectories in autism and Asperger syndrome: from early childhood to adolescence. *J Child Psychol Psychiatry* 2009, 50:1459–1467.
22. SZATMARI, P., Bryson S, Boyle M, Streiner D, Duku E: Predictors of outcome among high functioning children with autism and Asperger syndrome. *J Child Psychol Psychiatry* 2003, 44:520–528.
23. MCPARTLAND, J., Reichow B, Vokmar F: Sensitivity and specificity of proposed DSM-5 diagnostic criteria for autism spectrum disorder. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 2012, 51:368–383.
24. GESCHWIND, D. H. . *Advances in Autism. Annual Review of Medicine*, 2009. 60(1), 367–380.
25. TAYLOR, L.E., Swerdfeger AL, Eslick GD. Vaccines are not associated with autism: An evidence-based meta-analysis of case-control and cohort studies. *Vaccine* 2014;32:3623-9.
26. BJORKLUND, Geir & Meguid, Nagwa & ELBana, Mona & Tinkov, Alexey & Saad, Khaled & Dadar, Maryam & Hemimi, Maha & Skalny, Anatoly & Hosnedlová, Božena & Kizek, Rene & Osredkar, Josko & Urbina, Mauricio & Fabjan, Teja & El-Houfey, Amira & Kałużna-Czaplińska, Joanna & Gątarek, Paulina. (2020). Oxidative Stress in Autism Spectrum Disorder. *Molecular Neurobiology*. First Online. 10.1007/s12035-019-01742-2.
27. LYALL, K., Schmidt RJ, Hertz-Picciotto I. Maternal lifestyle and environmental risk factors for autism spectrum disorders. *Int J Epidemiol* 2014;43:443-64.
28. MUNDY, P. Annotation: the neural basis of social impairments in autism: the role of the dorsal medial-frontal cortex and anterior cingulate system. *J Child Psychol Psychiatry* 2003;44(6):793–809.
29. ROGERS, S.J., Hepburn SL, Stackhouse T, et al. Imitation performance in toddlers with autism and those with other developmental disorders. *J Child Psychol Psychiatry* 2003;44(5):763–81.
30. TUCHMAN, R. Autism. *Neurol Clin* 2003;21(4):915–32, viii.
31. ROGERS, S.J. Developmental regression in autism spectrum disorders. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2004;10(2):139–43.

32. KARANDE, S. Autism: a review for family physicians. *Indian J Med Sci* 2006;60(5): 205–15.
33. MEYERS, S. D. *et al* Research in Autism Spectrum Disorders 2013, 7, 109; Cassidy, S. *et al*. *Lancet Psychiatry* 2014, 1, 142.
34. FREITAG, C. M. The genetics of autistic disorders and its clinical relevance: a review of the literature. *Mol Psychiatry*. 2007 Jan;12(1):2-22. Epub 2006 Oct 10.
35. LYALL, K., Lisa Croen, Julie Daniels, M. Daniele Fallin, Christine Ladd-Acosta, Brian K. Lee, Bo Y. Park, Nathaniel W. Snyder, Diana Schendel, Heather Volk, Gayle C. Windham, and Craig Newschaffer. The Changing Epidemiology of Autism Spectrum Disorders. *Annu. Rev. Public Health* 2017, 38, 81–102
36. UNITED STATES. Developmental Disabilities Monitoring Network Surveillance Year 2010 Principal Investigators, Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – Autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2010. *MMWR Surveill Summ* 2014;63:1-21.
37. LORD, C, Petkova E, Hus V, Gan W, Lu F, Martin DM, Ousley O, Guy L, Bernier R, Gerds J, *et al.*: A multisite study of the clinical diagnosis of different autism spectrum disorders. *Arch Gen Psychiatry* 2012, 69:306-313.
38. MUNDY, P. Annotation: the neural basis of social impairments in autism: the role of the dorsal medial-frontal cortex and anterior cingulate system. *J Child Psychol Psychiatry* 2003;44(6):793–809.
39. DONVAN, J.; Zucker, C.; *Outra Sintonia: a História do Autismo*. São Paulo: Companhia das Letras, 2017.
40. OLIVEIRA, C. Um retrato do autismo no Brasil. *Rev Espaço Aberto* Ed. 170, 2020. USP, São Paulo. Disponível em: <http://www.usp.br/espacoaberto/?materia=um-retrato-do-autismo-no-brasil>
41. BAIJO J, Wiggins L, Christensen DL, Maenner MJ, Daniels J, Warren Z, *et al*. Prevalence of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ* 2018; 67:1-23
42. LORD, C.; Elsabbagh, M.; Baird, G.; Veenstra-Vanderweele, J. (2018). Autism spectrum disorder. *The Lancet*, 392 (10146), 508–520.; Bargiela, S.; Steward, R.; Mandy, W.; *The Experiences of Late-diagnosed Women with Autism Spectrum Conditions:*

- An Investigation of the Female Autism Phenotype. *J Autism Dev Disord.* 2016, 46, 3281-94.
43. GHOSH, A.; Michalon, A.; Lindemann, L.; Fontoura, P.; Santarelli, L.; *Nature Reviews Drug Discovery* 2013, 12, 777;
 44. BELTRÃO-BRAGA, P.C.; Muotri, A.R. Modeling autism spectrum disorders with human neurons. *Brain Res.* 2017, 1656, 49-54.
 45. SALCEDO-ARELLANO, M.J.; Dufour, B.; McLennan, Y.; Martinez-Cerdeno, V.; Hagerman, R.; Fragile X syndrome and associated disorders: Clinical aspects and pathology. *Neurobiology of Disease.* Volume 136, March 2020, Article number 104740).
 46. COSENTINO, L., Vigli, D., Franchi, F., Laviola, G., De Filippis, B. Rett syndrome before regression: A time window of overlooked opportunities for diagnosis and intervention. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 107, pp. 115-135, 2019.
 47. ORNOY, A., Liza, W., Ergaz, Z. Genetic syndromes, maternal diseases and antenatal factors associated with autism spectrum disorders (ASD). *Frontiers in Neuroscience* 10 (JUL), 316, 2016.
 48. KHATRI, N., Man, H.-Y. The autism and Angelman syndrome protein Ube3A/E6AP: The gene, E3 ligase ubiquitination targets and neurobiological functions. *Frontiers in Molecular Neuroscience* 2019, 12, 109.
 49. HARRIS, R.M., Stafford, D.E.J. Prader Willi syndrome: Endocrine updates and new medical therapies. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity* 27(1), pp. 56-62, 2020.
 50. KOLEVZON, A., Delaby, E., Berry-Kravis, E., Buxbaum, J.D., Betancur, C. Neuropsychiatric decompensation in adolescents and adults with Phelan-McDermid syndrome: A systematic review of the literature. *Molecular Autism* 10 (1), 50, 2019
 51. SATTERSTROM, F. K. *et al.* Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell* 2020, 180, 568-584
 52. KANNER L. Autistic disturbances of affective contact. *Nerv Child* 1943;2:217-50.
 53. KIM, S. K. Recent update of autism spectrum disorders. *Korean Journal of Pediatrics*, (2015) 58(1), 8.
 54. HOWLIN, P., P. Moss, Adults with autism spectrum disorders. *Can. J. Psychiatry* 57, 275–283 (2012).

55. HOUGHTON, R., R. C. Ong, F. Bolognani, Psychiatric comorbidities and use of psychotropic medications in people with autism spectrum disorder in the United States. *Autism Res.* 10, 2037–2047 (2017).
56. BRUGHA, T. S., L. Doos, A. Tempier, S. Einfeld, P. Howlin, Outcome measures in intervention trials for adults with autism spectrum disorders: A systematic review of assessments of core autism features and associated emotional and behavioural problems. *Int. J. Methods Psychiatr. Res.* 24, 99–115 (2015).
57. WEELE, V., E. H. Cook, B. H. King, P. Zarevics, M. Cherubini, K. Walton-Bowen, M. F. Bear, P. P. Wang, R. L. Carpenter, Arbaclofen in children and adolescents with autism spectrum disorder: A randomized, controlled, phase 2 trial. *Neuropsychopharmacology* 42, 1390–1398 (2017).
58. WILLIAMS, K., A. Brignell, M. Randall, N. Silove, P. Hazell, Selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) for autism spectrum disorders (ASD). *Cochrane Database Syst. Rev.* 19, CD004677 (2013).
59. BERRY-KRAVIS, E.M., Lindemann L, Jønch AE, et al. Drug development for neurodevelopmental disorders: lessons learned from fragile X syndrome. *Nat Rev Drug Discov.* 2018;17(4):280–299. doi:10.1038/nrd.2017.221
60. LACIVITA, E.; Perrone, R.; Margari, L.; Leopoldo, M.; Targets for Drug Therapy for Autism Spectrum Disorder: Challenges and Future Directions. *J Med Chem.* 2017, 60, 9114-9141
61. BRUGHA, T. S., L. Doos, A. Tempier, S. Einfeld, P. Howlin, Outcome measures in intervention trials for adults with autism spectrum disorders: A systematic review of assessments of core autism features and associated emotional and behavioural problems. *Int. J. Methods Psychiatr. Res.* 24, 99–115 (2015).
62. ANAGNOSTOU, E., N. Jones, M. Huerta, A. K. Halladay, P. Wang, L. Scahill, J. P. Horrigan, C. Kasari, C. Lord, D. Choi, K. Sullivan, G. Dawson, Measuring social communication behaviors as a treatment endpoint in individuals with autism spectrum disorder. *Autism* 19, 622–636 (2015). T
63. INSEL, R., The challenge of translation in social neuroscience: A review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron* 65, 768–779 (2010).
64. ALBERS, H. E., The regulation of social recognition, social communication and aggression: Vasopressin in the social behavior neural network. *Horm. Behav.* 61, 283–292(2012).

65. RILLING, J. K., A. C. DeMarco, P. D. Hackett, R. Thompson, B. Ditzen, R. Patel, G. Pagnoni. Effects of intranasal oxytocin and vasopressin on cooperative behavior and associated brain activity in men. *Psychoneuroendocrinology* **37**, 447–461 (2012).
66. RILLING, J. K., A. C. Demarco, P. D. Hackett, X. Chen, P. Gautam, S. Stair, E. Haroon, R. Thompson, B. Ditzen, R. Patel, G. Pagnoni, Sex differences in the neural and behavioral response to intranasal oxytocin and vasopressin during human social interaction. *Psychoneuroendocrinology* **39**, 237–248 (2014).
67. THOMPSON, R., S. Gupta, K. Miller, S. Mills, S. Orr, The effects of vasopressin on human facial responses related to social communication. *Psychoneuroendocrinology* **29**, 35–48 (2004).
68. THOMPSON, R., K. George, J. C. Walton, S. P. Orr, J. Benson, Sex-specific influences of vasopressin on human social communication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 7889–7894 (2006).
69. GUASTELLA, A. J., A. R. Kenyon, G. A. Alvares, D. S. Carson, I. B. Hickie, Intranasal arginine vasopressin enhances the encoding of happy and angry faces in humans. *Biol. Psychiatry* **67**, 1220–1222 (2010).
70. MEYER-LINDENBERG, A., B. Kolachana, B. Gold, A. Olsh, K. K. Nicodemus, V. Mattay, M. Dean, D. R. Weinberger, Genetic variants in *AVPR1A* linked to autism predict amygdala activation and personality traits in healthy humans. *Mol. Psychiatry* **14**, 968–975 (2009).
71. EBSTEIN, R. P., A. Knafo, D. Mankuta, S. H. Chew, P. S. Lai, The contributions of oxytocin and vasopressin pathway genes to human behavior. *Horm. Behav.* **61**, 359–379 (2012).
72. KREEK, M. J., Zhou Y., Levran O. Functions of Arginine Vasopressin and Its Receptors: Importance of Human Molecular Genetics Studies in Bidirectional Translational Research, *Biological Psychiatry*, Volume 70, Issue 6, 2011. Pages 502-503.
73. BENARROCH, E. E., Oxytocin and vasopressin: Social neuropeptides with complex neuromodulatory functions. *Neurology* **80**, 1521–1528 (2013).
74. STOOP, R., Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* **76**, 142–159 (2012).
75. YOUNG, W. S., J. Li, S. R. Wersinger, M. Palkovits, The vasopressin 1b receptor is prominent in the hippocampal area CA2 where it is unaffected by restraint stress or adrenalectomy. *Neuroscience* **143**, 1031–1039 (2006).

76. GREEN, W. B., Zwiers, M. P., van der Gaag, R. J., and Buitelaar, J. K. (2008). The phenotype and neural correlates of language in autism: an integrative review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1416–1425. doi: 10.1016/j.neubiorev.2008.05.008
77. INSEL, T. R. The challenge of translation in social neuroscience: A review of oxytocin, vasopressin, and affiliative behavior. *Neuron* 2010, 65, 768–779.
78. BIELSKY, I.F., and Young, L.J. (2004). Oxytocin, vasopressin, and social recognition in mammals. *Peptides* 25, 1565–1574.
79. BIELSKY, I.F., Hu, S.B., Ren, X., Terwilliger, E.F., and Young, L.J. (2005). The V1a vasopressin receptor is necessary and sufficient for normal social recognition: a gene replacement study. *Neuron* 47, 503–513.
80. MURAKAMI, G., Hunter, R. G., Fontaine, C., Ribeiro, A., and Pfaff, D. (2011). Relationships among estrogen receptor, oxytocin and vasopressin gene expression and social interaction in male mice. *Eur. J. Neurosci.* 34, 469–477.
81. PARKER, K. J., Oztan, O., Libove, R. A., Sumiyoshi, R. D., Jackson, L. P., Karhson, D. S., ... Hardan, A. Y. (2017). Intranasal oxytocin treatment for social deficits and biomarkers of response in children with autism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201705521.
82. BOLOGNANI, F., del Valle Rubido, M., Squassante, L., Wandel, C., Derks, M., Murtagh, L., ... Fontoura, P. (2019). A phase 2 clinical trial of a vasopressin V1a receptor antagonist shows improved adaptive behaviors in men with autism spectrum disorder. *Science Translational Medicine*, eaat7838.
83. CHRISTENSEN, J., T. K. Grønberg, M. J. Sørensen, D. Schendel, E. T. Parner, L. H. Pedersen, M. Vestergaard, Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 309, 1696–1703 (2013).
84. SCHNEIDER, T., R. Przewlocki, Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* 30, 80–89 (2005).
85. FELIZ-ORTIZ, A. C., M. Febo, Gestational valproate alters BOLD activation in response to complex social and primary sensory stimuli. *PLoS One* 7, e37313 (2012).
86. UMBRICHT, D., M. del Valle Rubido, E. Hollander, J. T. McCracken, F. Shic, L. Scahill, J. Noeldeke, L. Boak, O. Khwaja, L. Squassante, C. Grundschober, H. Kletzl, P. Fontoura. A single dose, randomized, controlled proof-of-mechanism study of a novel vasopressin 1a receptor antagonist (RG7713) in high-functioning adults with autism spectrum disorder. *Neuropsychopharmacology* 42, 1914–1923 (2017).

87. RATNI, H., M. Rogers-Evans, C. Bissantz, C. Grundschober, J.-L. Moreau, F. Schuler, H. Fischer, R. Alvarez Sanchez, P. Schnider, Discovery of highly selective brain-penetrant vasopressin 1a antagonists for the potential treatment of autism via a chemogenomic and scaffold hopping approach. *J. Med. Chem.* **58**, 2275–2289 (2015).
88. FORGEOT D'ARC, B., Mottron, L., Elsabbagh, M., & Jacquemont, S. . Tinkering with the vasopressin pathway in autism. *Science Translational Medicine*, (2019) 11(491).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 TORDJMAN, S. et al. Advances in the research of melatonin in autism spectrum disorders: literature review and new perspectives. **Int J Mol Sci**, v. 14, n. 10, p. 20508-42, Oct 14 2013. ISSN 1422-0067. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24129182> >.
- 2 EISSA, N. et al. Current Enlightenment About Etiology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder. **Front Neurosci**, v. 12, p. 304, 2018. ISSN 1662-4548. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29867317> >.
- 3 CHEN, X. W. et al. Synthesis and pharmacological characterization of novel N-(trans-4-(2-(4-(benzo[d]isothiazol-3-yl)piperazin-1-yl)ethyl)cyclohexyl)amides as potential multireceptor atypical antipsychotics. **Eur J Med Chem**, v. 123, p. 332-353, Nov 10 2016. ISSN 1768-3254. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27487565> >.
- 4 KIMURA, K. T. et al. Structures of the 5-HT_{2A} receptor in complex with the antipsychotics risperidone and zotepine. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 26, n. 2, p. 121-128, 2019/02/01 2019. ISSN 1545-9985. Disponível em: < <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0180-z> >.
- 5 MOLFETTA, F. A. D., ALINE T ROSSELLI, FLÁVIA PIROLASILVA, ALBERICO BORGES FERREIRA DA. **A partial least squares and principal component regression study of quinone compounds with trypanocidal activity.** < *data-test="journal-title" style="box-sizing: inherit;"*>Structural Chemistry volume. 18: 49-57 p. 2007.
- 6 LAMEIRA, J. et al. Structure-activity relationship study of flavone compounds with anti-HIV-1 integrase activity: a density functional theory study. **Bioorg Med Chem**, v. 14, n. 21, p. 7105-12, Nov 01 2006. ISSN 0968-0896. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890444> >.
- 7 WAN, J. et al. Quantitative structure-activity relationship for cyclic imide derivatives of protoporphyrinogen oxidase inhibitors: a study of quantum chemical descriptors from density functional theory. **J Chem Inf Comput Sci**, v. 44, n. 6, p. 2099-105, 2004 Nov-Dec 2004. ISSN 0095-2338. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15554680> >.
- 8 BELL, C.; WILSON, S.; NUTT, D. J. Pindolol augmentation of sertraline in resistant depression and its effect on sleep. **J Psychopharmacol**, v. 12, n. 1, p. 105-7, 1998. ISSN 0269-8811. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9584976> >.
- 9 ASSOCIATION, A. P. **Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM–5)**American Psychiatric Association, Edn 5. American Psychiatric Association. 5 2013.
- 10 WING, L.; GOULD, J. Severe impairments of social interaction and associated abnormalities in children: epidemiology and classification. **J Autism Dev**

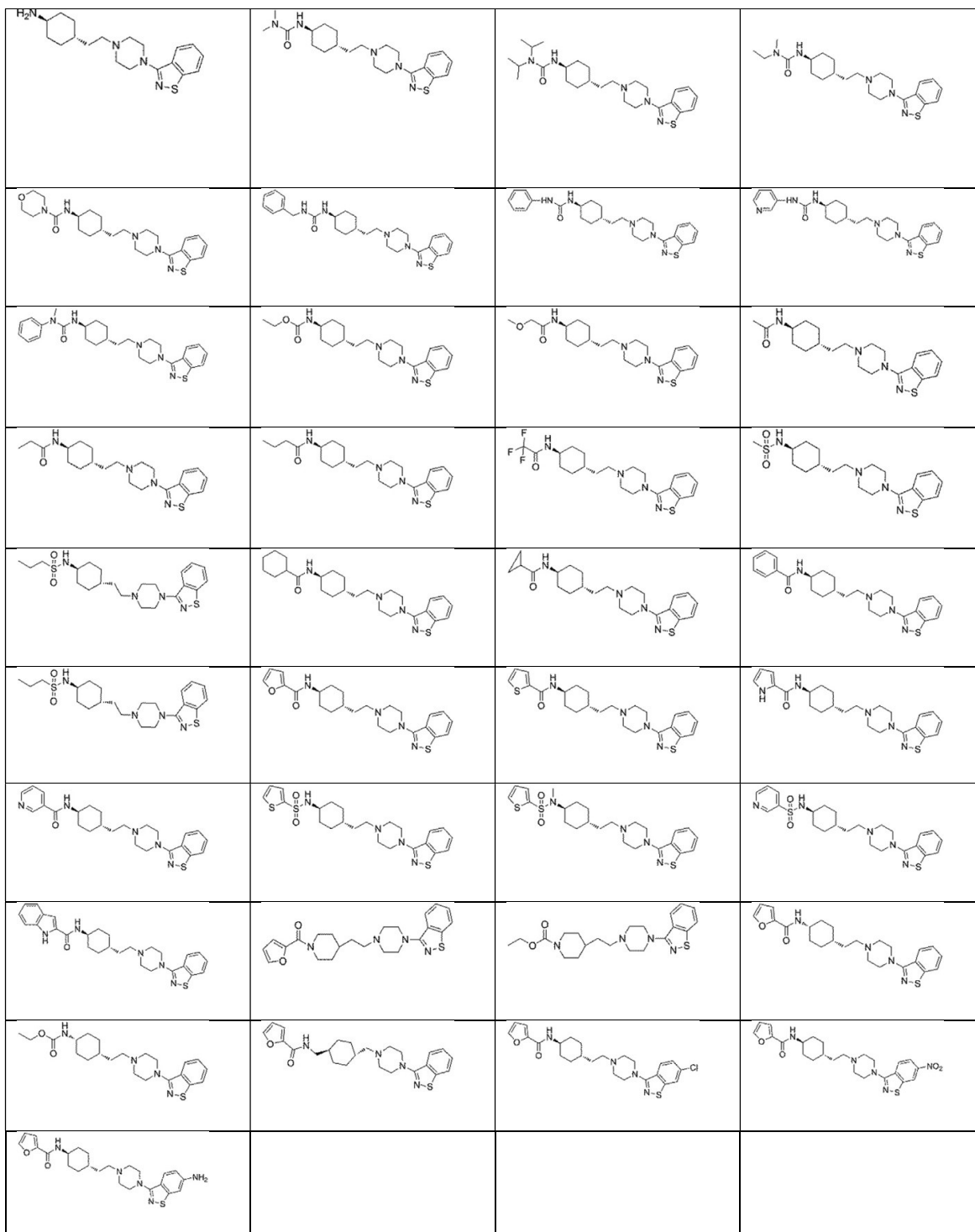
- Disord**, v. 9, n. 1, p. 11-29, Mar 1979. ISSN 0162-3257. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/155684> >.
- 11 WING, L.; POTTER, D. The epidemiology of autistic spectrum disorders: is the prevalence rising? **Ment Retard Dev Disabil Res Rev**, v. 8, n. 3, p. 151-61, 2002. ISSN 1080-4013. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12216059> >.
- 12 LEONARD, H. et al. Autism and intellectual disability are differentially related to sociodemographic background at birth. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e17875, Mar 30 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479223> >.
- 13 PARNER, E. T.; SCHENDEL, D. E.; THORSEN, P. Autism prevalence trends over time in Denmark: changes in prevalence and age at diagnosis. **Arch Pediatr Adolesc Med**, v. 162, n. 12, p. 1150-6, Dec 2008. ISSN 1538-3628. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19047542> >.
- 14 HALLMAYER, J. et al. Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. **Arch Gen Psychiatry**, v. 68, n. 11, p. 1095-102, Nov 2011. ISSN 1538-3636. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21727249> >.
- 15 RISCH, N. et al. Familial recurrence of autism spectrum disorder: evaluating genetic and environmental contributions. **Am J Psychiatry**, v. 171, n. 11, p. 1206-13, Nov 01 2014. ISSN 1535-7228. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24969362> >.
- 16 BAUMAN, M. L.; KEMPER, T. L. Neuroanatomic observations of the brain in autism: a review and future directions. **Int J Dev Neurosci**, v. 23, n. 2-3, p. 183-7, 2005 Apr-May 2005. ISSN 0736-5748. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15749244> >.
- 17 GHOSH, A. et al. Drug discovery for autism spectrum disorder: challenges and opportunities. **Nat Rev Drug Discov**, v. 12, n. 10, p. 777-90, Oct 2013. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080699> >.
- 18 CANITANO, R.; SCANDURRA, V. Psychopharmacology in autism: an update. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 35, n. 1, p. 18-28, Jan 15 2011. ISSN 1878-4216. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21034789> >.
- 19 MARTIN, C.; ZHANG, Y. Mechanisms of epigenetic inheritance. **Curr Opin Cell Biol**, v. 19, n. 3, p. 266-72, Jun 2007. ISSN 0955-0674. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17466502> >.
- 20 VYAS et al. **Virtual Screening: A Fast Tool for Drug Design**. Scientia Pharmaceutica. 76, Issue 3: 333-360 p. 2008.

- 21 SUNSERI, J.; KOES, D. R. Pharmit: interactive exploration of chemical space. **Nucleic Acids Res**, v. 44, n. W1, p. W442-8, 07 08 2016. ISSN 1362-4962. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27095195> >.
- 22 TILAHUN, M.; AKI-YALCINESIN. **Pharmacophore Modeling in Drug Discovery: Methodology and Current Status. Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry** 8, Issue 3: 749-762 p. 2021.
- 23 SILVA, R. P. R. S. P. M. J. R. D. A. F. R. P. E. P. S. V. B. D. S. C. H. T. P. D. **Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos**. Revista Virtual de Química. 4 2012.
- 24 LIN, X.; LI, X. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. **Molecules**, v. 25, n. 6, Mar 18 2020. ISSN 1420-3049. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32197324> >.
- 25 SULIMOV, V. B. et al. Docking Paradigm in Drug Design. **Curr Top Med Chem**, v. 21, n. 6, p. 507-546, 2021. ISSN 1873-4294. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33292135> >.
- 26 TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**, v. 31, n. 2, p. 455-61, Jan 2010. ISSN 1096-987X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19499576> >.
- 27 DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods Mol Biol**, v. 1263, p. 243-50, 2015. ISSN 1940-6029. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25618350> >.
- 28 RODRIGUES, R. P. et al. **Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos**. Revista Virtual de Química. 4, Issue 6: 739-776 p. 2012.
- 29 LOMIZE, M. A. et al. OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes. **Nucleic Acids Res**, v. 40, n. Database issue, p. D370-6, Jan 2012. ISSN 0305-1048 (Print)
0305-1048.
- 30 HARDER, E. et al. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 12, n. 1, p. 281-296, 2016/01/12 2016. ISSN 1549-9618. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/acs.jctc.5b00864> >.
- 31 Holland Computer Center. 2021. Disponível em: < <https://hcc.unl.edu/> >. Acesso em: 02/14/2021.
- 32 JORGENSEN, W. L.; MAXWELL, D. S.; TIRADO-RIVES, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 118, n. 45, p. 11225-11236, 1996/11/13 1996. ISSN 0002-7863. Disponível em: < <https://doi.org/10.1021/ja9621760> >.

- 33 MONTANARI, C. A. **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. 2011. ISBN 978-85-314-1266-0.
- 34 HOPKINS, A. L. et al. The role of ligand efficiency metrics in drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 2, p. 105-21, 02 2014. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24481311> >.
- 35 SCHREINER, W. et al. Relaxation Estimation of RMSD in Molecular Dynamics Immunosimulations. **Comput. Math. Methods Med**, v. 2012, p. 173521, 2012/09/16 2012. ISSN 1748-670X. Disponível em: < <https://doi.org/10.1155/2012/173521> >.
- 36 Schrödinger. Simulation Interactions Diagram. 2021. Disponível em: < <https://www.schrodinger.com/newsletters/introducing-sid-simulation-interactions-diagram> >. Acesso em: 01/15/2021.
- 37 WACKER, D. et al. Structural features for functional selectivity at serotonin receptors. **Science**, v. 340, n. 6132, p. 615-9, May 3 2013. ISSN 0036-8075 (Print)
0036-8075.
- 38 FUGLEBAKK, E.; ECHAVE, J.; REUTER, N. Measuring and comparing structural fluctuation patterns in large protein datasets. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2431-2440, 2012. ISSN 1367-4803. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts445> >. Acesso em: 7/19/2021.
- 39 ITANI, H. et al. **Novel potent antagonists of human neuropeptide Y Y5 receptors. Part 3: 7-methoxy-1-hydroxy-1-substituted tetraline derivatives**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 12, Issue 15: 799-802 p. 2002.

8. ANEXOS

Anexo I. Derivados de benzisotiazolilpiperazina.



ANEXO II. Tabela S2

| | Receptor affinity K_i (nM) | | | |
|--|------------------------------|--|--|--|
| | | | | |

| | hD _{2L} | hD ₃ | h5-HT _{1A} | h5-HT _{2A} | 2A/D2 | 2A/D3 | 2A/1A | Média 2A/outros |
|-------------|------------------|-----------------|---------------------|---------------------|--------|-------|-------|-----------------|
| 7 | 4.6 | 9.6 | 7.2 | 0.21 | 0.046 | 0.022 | 0.029 | 0.032 |
| 18a | 6.3 | 2.3 | 2.2 | 0.19 | 0.030 | 0.091 | 0.095 | 0.072 |
| 8h | 2.4 | 1.2 | 5.2 | 0.35 | 0.146 | 0.175 | 0.040 | 0.120 |
| 41a | 15 | 7.3 | 0.72 | 2.2 | 0.147 | 0.029 | 0.292 | 0.156 |
| 18b | 4 | 2 | 0.57 | 0.18 | 0.045 | 0.105 | 0.368 | 0.173 |
| 37 | 14 | 1.1 | 33 | 4.3 | 0.307 | 0.191 | 0.006 | 0.168 |
| 41b | 10 | 8.7 | 1.3 | 3.3 | 0.330 | 0.024 | 0.162 | 0.172 |
| 9q | 9.6 | 0.31 | 3 | 0.24 | 0.025 | 0.677 | 0.070 | 0.257 |
| 36 | 26 | 0.24 | 39 | 1.8 | 0.069 | 0.875 | 0.005 | 0.317 |
| 8b | 0.72 | 1.4 | 2.3 | 0.38 | 0.528 | 0.150 | 0.091 | 0.256 |
| 9e | 1.9 | 0.22 | 1.1 | 0.34 | 0.179 | 0.955 | 0.191 | 0.441 |
| 9c | 1.7 | 0.27 | 1.1 | 0.63 | 0.371 | 0.778 | 0.191 | 0.446 |
| 9f | 0.94 | 0.19 | 5.6 | 0.36 | 0.383 | 1.105 | 0.038 | 0.509 |
| 9g | 0.85 | 0.21 | 0.92 | 0.35 | 0.412 | 1.000 | 0.228 | 0.547 |
| 8c | 0.51 | 0.78 | 1.4 | 0.5 | 0.980 | 0.269 | 0.150 | 0.467 |
| 9j | 2.9 | 0.13 | 1.3 | 0.23 | 0.079 | 1.615 | 0.162 | 0.619 |
| 6 | 25 | 0.16 | 0.69 | 5.8 | 0.232 | 1.313 | 0.304 | 0.616 |
| 9b | 2.8 | 0.14 | 2.1 | 0.87 | 0.311 | 1.500 | 0.100 | 0.637 |
| 8e | 1.4 | 0.18 | 5.3 | 0.91 | 0.650 | 1.167 | 0.040 | 0.619 |
| 8d | 2.2 | 1.6 | 15 | 3.2 | 1.455 | 0.131 | 0.014 | 0.533 |
| 8a | 0.53 | 0.4 | 1.2 | 0.6 | 1.132 | 0.525 | 0.175 | 0.611 |
| 9d | 8.9 | 0.095 | 1.3 | 0.28 | 0.031 | 2.211 | 0.162 | 0.801 |
| 9m | 0.85 | 0.09 | 2.1 | 0.29 | 0.341 | 2.333 | 0.100 | 0.925 |
| 45 | 8.9 | 1 | 5.3 | 16 | 1.798 | 0.210 | 0.040 | 0.682 |
| 9l | 0.21 | 0.31 | 0.52 | 0.29 | 1.381 | 0.677 | 0.404 | 0.821 |
| 8g | 0.51 | 0.055 | 12 | 0.14 | 0.275 | 3.818 | 0.018 | 1.370 |
| 9a | 18 | 0.052 | 1.5 | 1.1 | 0.061 | 4.038 | 0.140 | 1.413 |
| 35 | 2.1 | 0.051 | 15 | 0.32 | 0.152 | 4.118 | 0.014 | 1.428 |
| 9i | 0.42 | 0.062 | 3.9 | 0.26 | 0.619 | 3.387 | 0.054 | 1.353 |
| 9k | 0.19 | 0.056 | 1.1 | 0.15 | 0.789 | 3.750 | 0.191 | 1.577 |
| 8f | 0.63 | 0.043 | 1.4 | 0.21 | 0.333 | 4.884 | 0.150 | 1.789 |
| 9h | 0.33 | 0.047 | 1.7 | 0.24 | 0.727 | 4.468 | 0.124 | 1.773 |
| 9p | 0.71 | 0.058 | 0.2 | 0.53 | 0.746 | 3.621 | 1.050 | 1.806 |
| 9n | 0.43 | 0.043 | 1.1 | 0.3 | 0.698 | 4.884 | 0.191 | 1.924 |
| 9r | 0.43 | 0.029 | 7.6 | 0.64 | 1.488 | 7.241 | 0.028 | 2.919 |
| 12 | 0.3 | 0.046 | 2.9 | 1.2 | 4.000 | 4.565 | 0.072 | 2.879 |
| cariprazine | 1.3 | 0.096 | 3.1 | 23 | 17.692 | 2.188 | 0.068 | 6.649 |
| 9o | 0.35 | 0.058 | 11 | 8.1 | 23.143 | 3.621 | 0.019 | 8.928 |