

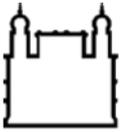
INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

**IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES E POSSÍVEIS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA
A VARIANTE ARG87CYS DA PROTEÍNA CYFIP2 HUMANA**

ÍISIS VENTURI BIEMBENGUT

CURITIBA/PR

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

Programa de pós-graduação em Biociências e Biotecnologia

Ísis Venturi Biembengut

IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES E POSSÍVEIS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA A VARIANTE ARG87CYS DA PROTEÍNA CYFIP2 HUMANA

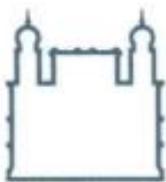
Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza

Co-orientadora: Dr^a. Patrícia Shigunov

CURITIBA/PR

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ - PARANÁ
Instituto Carlos Chagas

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em
Biociências e Biotecnologia.

Aos 22 dia do mês de março de dois mil e vinte e um, às 10:00 horas, **através de teleconferência pelo link <https://us02web.zoom.us/j/5953384663>**, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Marco Augusto Stimamiglio, Dra. Helen Cristina Miranda e Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer Carvalho, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Ísis Venturi Biembengut**, intitulada: **"IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES E POSSÍVEIS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA A VARIANTE ARG87CYS DA PROTEÍNA CYFIP2 HUMANA"**, sob a orientação de **Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza e Dra. Patrícia Shigunov**, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Marco Augusto Stimamiglio**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido o(a) candidato(a), os membros da banca examinadora deliberaram pela:

Aprovação da dissertação por unanimidade

Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

Reprovação da dissertação

Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 22 de março de 2021

Dr. Marco Augusto Stimamiglio – ICC/FIOCRUZ

Dra. Helen Cristina Miranda – Case Western Reserve University

Dra. Juliana de Saldanha da Gama Fischer Carvalho - ICC/FIOCRUZ

Candidato(a): Ísis Venturi Biembengut

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me concedido saúde e por ter iluminado as minhas escolhas para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha orientadora, Dra. Tatiana de Arruda Campos Brasil de Souza, por ter confiado no meu trabalho e me dado a oportunidade de trabalhar nesse projeto tão bonito. Obrigada por todas as trocas, aprendizados, desafios propostos e por ter me apresentado esse universo da biologia estrutural. Também agradeço à minha co-orientadora, Dra. Patrícia Shigunov, pelas conversas e pela disponibilidade em ajudar e colaborar com o projeto. Com toda a certeza, não poderia ter escolhido pessoas melhores para me orientar. Ver toda a dedicação e o amor de vocês pela pesquisa, mesmo com todas as dificuldades, me faz querer seguir firme nessa carreira.

A todos os pesquisadores e alunos do LPEC (Laboratório de Proteômica Estrutural e Computacional), que estão sempre disponíveis para a troca de ideias e auxílio no projeto.

À Natália Fernandes Frota e ao Dr. Marcos R. Lourenzoni pela realização das simulações de dinâmica molecular.

À Dra. Ana Paula Ressetti Abud e à Dra. Lia Carolina Almeida Soares de Medeiros Kuczera, avaliadoras do trabalho no programa de pós-graduação, pelo acompanhamento do projeto.

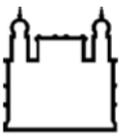
Às alunas da Patrícia do grupo de doenças raras, especialmente à Isabelle, pela ajuda, trabalho em colaboração e por me permitirem compreender um pouquinho mais sobre o universo das células-tronco. À minha amiga Louise por sempre estar disposta a trocar experiências e treinar apresentações desde os tempos da graduação.

Aos meus pais, Hiram e Rita, por sempre priorizarem a minha educação, por todo apoio e ensinamentos e aos meus irmãos, Isabel e Gabriel, por todo o carinho e por estarem sempre comigo nessa jornada. Sem vocês não chegaria até aqui, amo vocês.

Ao meu noivo/marido, Andrey, por nesses 8 anos juntos sempre me apoiar e vibrar pelas minhas conquistas de perto ou de longe. Obrigada pelos palpites no design de slides, por assistir minhas apresentações repetidas vezes e por aguentar a minha ansiedade. Amo você.

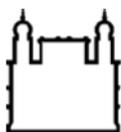
*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*

Madre Teresa de Calcutá

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS****IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES E POSSÍVEIS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA
A VARIANTE ARG87CYS DA PROTEÍNA CYFIP2 HUMANA****RESUMO****DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****Ísis Venturi Biembengut**

A proteína CYFIP2 (“Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2”) foi inicialmente caracterizada como proteína de interação à FMRP (“Fragile X mental retardation protein”), uma proteína de regulação da tradução de mRNA. A proteína CYFIP2 faz parte da família CYFIP e compartilha 88% de identidade e 95% de similaridade com sua proteína homóloga: CYFIP1. CYFIP1 vem sendo associada a desordens neurológicas há mais tempo, enquanto CYFIP2 começou a ser correlacionada com essas patologias mais recentemente. Um desses primeiros trabalhos foi a associação das variantes Arg87 de CYFIP2 com casos de encefalopatia epiléptica precoce. Nesse conjunto de síndromes, os espasmos e convulsões epiléticas que ocorrem desde a primeira infância levam a um comprometimento do desenvolvimento neurológico infantil. Ambas as proteínas são bem conservadas em diversos organismos e estão envolvidas nos mesmos processos biológicos até hoje descritos. Um deles trata-se do complexo “Wave Regulatory Complex”, WRC, cuja função está diretamente envolvida na regulação da formação dos filamentos de actina. Utilizando a estrutura atômica do complexo WRC (PDB 3P8C) – que contém a proteína CYFIP1 dentro do complexo – Nakashima e colaboradores (2018) apontaram, por comparação, que o resíduo variante estaria na interface de interação entre a proteína CYFIP2 e a proteína WAVE1. Levantando-se assim, a hipótese de que o enfraquecimento desta interação com a mudança do resíduo permitiria uma ativação constante do complexo WCR. O objetivo deste trabalho foi realizar a identificação de ligantes de CYFIP2p.Arg87Cys e possíveis alvos terapêuticos por análise *in silico*. Para isso, foram criados modelos com as diferentes versões de CYFIP2 e realizadas análises de docking molecular, seguidas de simulações de dinâmica molecular. Foram analisados 3.946 ligantes de dois bancos de dados: PDE3 e Drugbank. Identificamos 11 compostos que potencialmente se ligam de forma seletiva à proteína variante e que têm potencial de mitigar os efeitos dessa modificação estrutural, sendo 4 (minocycline, pomalidomide, remdesivir, maropitant) já utilizados em alguma aplicação clínica. Os efeitos desses compostos precisam ser ainda estudados de maneira a concluir se serão benéficos. Nossas análises estruturais também permitiram uma melhor compreensão do impacto da mudança de resíduo na estrutura da proteína, trazendo alguns esclarecimentos sobre a correlação entre a patologia e a variante, e novas evidências à hipótese do enfraquecimento da ligação com WAVE. A identificação de ligantes à proteína mutada é de extrema importância na busca de alvos para tratamento e poderá ser utilizada para nortear experimentos *in vitro* e o reposicionamento desses fármacos no futuro.

Palavras-chave: CYFIP2; encefalopatia epiléptica precoce; reposicionamento de fármacos; *docking* molecular.

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS****IDENTIFICAÇÃO DE LIGANTES E POSSÍVEIS AGENTES TERAPÊUTICOS PARA
A VARIANTE ARG87CYS DA PROTEÍNA CYFIP2 HUMANA****ABSTRACT****DISSERTAÇÃO DE MESTRADO****Ísis Venturi Biembengut**

The CYFIP2 protein (Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2) was initially described as an FMRP (Fragile X mental retardation protein) interactor, a protein that regulates mRNA translation. CYFIP2 is part of the CYFIP family, sharing 88% identity and 95% similarity with its homologous: CYFIP1. CYFIP1 has been associated with neurological disorders for a long time, while CYFIP2 started to be correlated with these pathologies recently. An early study was the association of Arg87 variants from CYFIP2 with early epileptic encephalopathy patients. In this set of syndromes, the epileptic spasms, and seizures that occur since early childhood lead to impaired neurological development in children. Both proteins are well conserved in several organisms and are involved in the same biological processes as our actual knowledge. One of these biological processes is involved with the WRC complex (Wave regulatory complex), whose function is directly involved in regulating the nucleation of actin filaments. Using the atomic structure of the WRC complex (PDB 3P8C) - which contains the CYFIP1 protein within the complex - Nakashima and collaborators (2018) pointed out, by comparison, that the variant residue would be at the interface between CYFIP2 protein and WAVE1 protein. Thus, the hypothesis that the weakening of this interaction with the residue modification would allow a constant activation of the WCR complex. This work aimed to perform the identification of CYFIP2p.Arg87Cys ligands and possible therapy targets by *in silico* approaches. We created models with the different versions of CYFIP2, and molecular docking analyzes were performed, followed by molecular dynamics simulations. 3,946 ligands were analyzed from two databases: PDE3 and Drugbank. This characterization allowed us to better predict the impact of the residue modification on the protein structure. Which adds new evidence to the hypothesis of weakening the interaction with WAVE. We also identified 11 compounds that potentially selectively bind to the variant protein and could be capable of mitigating the effects of this structural modification, of which 4 (minocycline, pomalidomide, remdesivir, maropitant) are already used in some clinical application. The effects of these compounds have yet to be studied in order to conclude whether they will be beneficial or not. The identification of ligands to the variant is extremely important in the search for targets for treatment. Also, it can be used to guide *in vitro* experiments and the repurposing of these drugs in the future.

Keywords: CYFIP2; early epileptic encephalopathy; drug repurposing; molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1. Estrutura tridimensional da proteína CYFIP1.	18
Figura 1.2. Extensão da edição de K320E do mRNA de CYFIP2 e níveis de mRNA de ADAR2 em tecidos humanos.	19
Figura 1.3. Gráfico mostrando a expressão de CYFIP1/2 em diferentes tipos celulares encontrados no hipocampo do cérebro de camundongos adultos.	21
Figura 1.4. Experimento demonstrando como o “knockdown” de CYFIP1 e CYFIP2 afeta o desenvolvimento dos axônios neuronais nas células gangliais de retina de embriões de “Zebrafish”.	22
Figura 1.5. Estrutura tridimensional do complexo WRC de acordo com o banco de dados do PDB.	23
Figura 1.6. Esquema representando a ativação do complexo WRC por Rac-GTP..	24
Figura 1.7. Modelo esquemático representando o complexo WRC com enfoque para a interação do domínio VCA com Sra1/Cyfip1.	25
Figura 1.8. Processo de nucleação dos filamentos de actina iniciado pelo complexo Arp2/3.....	26
Figura 1.9. Representação esquemática de como a remodelação do complexo WRC por Rac1-GTP, permite a ativação do complexo Arp2/3 e conseqüentemente o início do processo de nucleação dos filamentos de actina.	26
Figura 1.10. Diferentes estruturas de actina presentes nos neurônios.	28
Figura 1.11. Estrutura tridimensional do complexo WRC.	30
Figura 1.12. Figura esquemática indicando o possível efeito das variantes Arg87 de CYFIP2 no complexo WRC.	31
Figura 1.13. Hipóteses de mecanismos de patogenicidade e desregulação dos processos celulares pelas variantes Arg87 de CYFIP2.....	32
Figura 1.14. Modelo proposto para a atividade patológica das variantes Arg87 de CYFIP2.....	33
Figura 1.15. Modelo da proteína CYFIP (cinza) interagindo com o complexo WRC (salmão).	34
Figura 4.1 - Resultado da busca por alinhamentos para a proteína CYFIP2 no banco de dados.....	42
Figura 4.2 - Gráfico ilustrando os DOPE scores calculados para cada um dos modelos gerados por homologia para CYFIP2.	43

Figura 4.3 - Gráfico ilustrando os DOPE scores calculados para cada um dos modelos gerados por homologia para CYFIP2p.Arg87Cys.	43
Figura 4.4 - Gráfico ilustrando os DOPE scores calculados para cada um dos modelos gerados por homologia para CYFIP2p.Lys320Glu.	44
Figura 4.5 - Comparação da estrutura PDB 3P8C_A (cinza) com os modelos gerados de CYFIP2 (RMSD 1,626 Å, ciano) e CYFIP2p.Arg87Cys (RMSD 1,901 Å, bege)...	44
Figura 4.6 - Modelos de CYFIP2 (em cinza) com resíduos preditos para interação com ligantes pelo software COACH (em vermelho).	45
Figura 4.7 - Avaliação no Liglot dos 16 ligantes selecionados na conformação de maior afinidade no <i>docking</i> com a proteína nativa..	52
Figura 4.8 - Avaliação no Liglot dos 16 ligantes selecionados na conformação de maior afinidade no <i>docking</i> com a proteína variante.	53
Figura 4.9 - Avaliação no Liglot dos 16 ligantes selecionados na conformação de maior afinidade no <i>docking</i> com a proteína nativa contra a proteína variante.	54
Figura 4.10 - Avaliação no Liglot dos 16 ligantes selecionados na conformação de maior afinidade no <i>docking</i> com a proteína variante contra a proteína nativa.	55
Figura 4.11 - A variante Arg87Cys parece afetar a estrutura do loop em que se encontra na proteína CYFIP2.....	60
Figura 4.12 - Comparação das cadeias laterais dos aminoácidos Arginina e Cisteína.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Amostra do levantamento de genes relacionados às síndromes epilépticas realizado por Magalhães e colaboradores (2019).	16
Tabela 3.1 - Critérios de seleção dos ligantes através do score de afinidade de ligação comparado entre CYFIP2 e CYFIP2p.Arg87Cys.....	39
Tabela 4.1 - Geometria dos modelos de CYFIP2.....	45
Tabela 4.2 - Posições dos resíduos apontados como sítios de ligação pelo algoritmo de predição do COACH nos modelos das proteínas.....	46
Tabela 4.3 - Lista de compostos selecionados após o primeiro screening.	47
Tabela 4.4 - Lista de compostos selecionados após o refinamento do primeiro screening.....	56
Tabela 4.5 - Geometria dos modelos de CYFIP2 após a dinâmica molecular.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABI1/2/3	“Abelson-interacting protein 1/2/3”
ADAR	“Adenosine Deaminases Acting on RNA”
Arp2/3	“Actin Related Protein 2/3”
CD4	“Cluster of Differentiation 4”
CID	“PubChem Compound ID”
CYFIP1/2	“Cytoplasmic FMR1-interacting protein 1/2”
DOPE	“Discrete optimized protein energy”
eIF4E	“eukaryotic translation initiation factor 4 E”
FMRP	“Fragile X mental retardation protein”
FRET	“Förster resonance energy transfer”
FXR1/2P	“Fragile X related protein 1/2”
GFP	“Green Fluorescent Protein”
GTP	“Guanosine-5'-triphosphate”
Hem1	“Hematopoietic Protein 1”
HHpred	“Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison”
HSPC300	“Hematopoietic Stem Progenitor Cell 300”
ILAE	“International League Against Epilepsy”
MMTK	“Molecular Modelling Toolkit”
mRNA	RNA mensageiro
Nav1.1	“Sodium channel, voltage-gated, type I, alpha subunit”
NCKAP1	“Nck-associated protein 1”
PDB	“Protein Data Bank”
PDE3	“The Prescribable Drugs with Efficacy in Experimental Epilepsies”
PIR121	“p53-inducible Protein 121”
Rac1	“Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1”
RBPs	“RNA Binding Proteins”
RGCs	Células Gangliais de Retina
RMSD	“Root Mean Square Deviation”
RNA	Ácido ribonucleico
RNPs	“Ribonucleoproteins”
SCAR	“suppressor of cAR”

SCN1A	“Sodium Voltage-gated Channel alpha subunit 1”
SLC2A1	“Solute Carrier Family 2 Member 1”
SNPs	“Single Nucleotide Polymorphisms”
Sra1	“Specifically RAC1 Activated Protein”
VCA	“Verprolin-homology, Central, Acidic”
WAVE1/2/3	“Wiskott–Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein 1/2/3”
WRC	“Wave Regulatory Complex”
xFXR	“Xenopus RNA binding protein Fragile X mental retardation-related protein”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1. A ENCEFALOPATIA EPILÉPTICA PRECOCE	14
1.1.1 Genes envolvidos.....	15
1.1.2. Tratamentos	17
1.2. ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS CYFIP	18
1.3. FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS CYFIP	20
1.3.1. O complexo WRC.....	23
1.3.2. Interação com Arp2/3.....	25
1.3.3. Filamentos de actina e a função neuronal.....	27
1.3.4. Interações com RBPs.....	29
1.3.5. As variantes Arg87 de CYFIP2	29
1.4. CYFIP2 E SUA RELAÇÃO COM ALGUMAS PATOLOGIAS.....	33
2. OBJETIVOS	36
2.1. OBJETIVO GERAL.....	36
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS.....	37
3.2 <i>DOCKING</i> MOLECULAR.....	37
3.3 ANÁLISE DOS LIGANTES ENCONTRADOS NO <i>DOCKING</i>	39
3.4 DINÂMICA MOLECULAR	40
3.5 ALINHAMENTO	41
4. RESULTADOS	42
4.1 MODELOS CONSTRUÍDOS	42
4.2 LIGANTES IDENTIFICADOS NA 1ª VARREDURA.....	46
4.3 REFINAMENTO DA VARREDURA INICIAL.....	52
4.4 AVALIAÇÃO DOS MODELOS NA DINÂMICA MOLECULAR	59
5. DISCUSSÃO	62
6. CONCLUSÕES	66

REFERÊNCIAS	67
APÊNDICES	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. A ENCEFALOPATIA EPILÉPTICA PRECOCE

As encefalopatias epiléticas são um conjunto de desordens neurológicas, onde espasmos e perturbações na função cerebral com episódios de convulsão acabam levando a um comprometimento cognitivo e neurológico do paciente. Quando chamada encefalopatia epilética precoce, os sintomas se manifestam logo nos primeiros meses de vida e afetam o desenvolvimento neurológico infantil (ENGEL, 2001).

Nove síndromes diferentes são reconhecidas como encefalopatias epiléticas pela “International League Against Epilepsy” (ILAE). São elas:

- Encefalopatia mioclônica precoce;
- Síndrome de Ohtahara;
- Epilepsia com crises focais migratórias da infância;
- Síndrome de West (síndromes dos espasmos infantis);
- Síndrome de Dravet;
- Síndrome de Doose (epilepsia com crises mioclônicas atônicas);
- Síndrome de Lennox-Gastaut;
- Epilepsia com estado de mal elétrico do sono;
- Síndrome de Landau-Kleffner.

Essas síndromes se diferenciam devido à idade de início das crises, tipo e frequência das crises, padrões de eletroencefalograma, entre outras características (DONAT, 1992; ENGEL, 2001). A incidência precisa desse conjunto de síndromes não é reportada, mas estima-se que as síndromes de espasmos infantis (ou síndrome de West), que também estão agregadas dentro das encefalopatias epiléticas, têm ocorrência estimada de cerca de 0,25 casos a cada 1.000 nascimentos vivos. Sua prevalência gira em torno de 1 em cada 10.000 crianças com idade de 10 anos (LUX, 2013; JIA *et al*, 2018; PAVONE *et al*, 2020).

Estudos epidemiológicos mostram a importância das causas genéticas associadas à epilepsia. Cerca de 70 a 80% das síndromes têm envolvida alguma causa genética (KJELDSEN *et al*, 2003; HILDEBRAND *et al*, 2013). Em muitos casos trata-se de uma herança complexa e de difícil identificação. Mais recentemente, o desenvolvimento de técnicas de mapeamento genético, como o sequenciamento completo de exomas, técnicas de sequenciamento de nova geração e o uso de “microarrays” para identificação de SNPs (“Single Nucleotide Polymorphisms”), tem

ajudado na identificação de variantes e no melhor entendimento dos fatores genéticos da doença (MAGALHÃES *et al*, 2019). Mutações do tipo *de novo* têm sido encontradas de maneira predominante nesse tipo de síndrome, apesar de normalmente se apresentarem de maneira bem heterogênea, com variantes específicas para cada paciente (MOLLER *et al*, 2019).

1.1.1 Genes envolvidos

A variantes da proteína CYFIP1 já foram associadas a algumas doenças como autismo, deficiências intelectuais e esquizofrenia (ABEKHOUKH & BARDONI, 2014). Já a associação de variantes de CYFIP2 com desordens neurológicas é mais recente e apresenta menos trabalhos na literatura (ZHANG *et al*, 2019c). Por isso, as funções da proteína CYFIP2 são menos elucidadas, principalmente nessas doenças. Ambas estão envolvidas no complexo WRC. Este complexo atua na regulação da dinâmica de formação de citoesqueleto de actina sendo responsável pela regulação do complexo Arp2/3 (EDEN *et al*, 2002; DERIVERY *et al*, 2009).

Além das variantes de CYFIP1/2, outras variantes genéticas relacionadas à doença são reportadas na literatura. A plataforma “Orphanet”, portal para o registro de doenças raras, aponta pelo menos 39 genes relacionados à encefalopatia epiléptica precoce. Além disso, existe uma lista extensa de outros genes correlacionados, publicada por Magalhães e colaboradores em seu artigo de revisão de 2019, como ilustrado na tabela 1.1.

Tabela 1.1. Amostra do levantamento de genes relacionados às síndromes epiléticas realizado por Magalhães e colaboradores (2019).

Gene	Associated phenotypes	Gene	Associated phenotypes
			encephalopathy
<i>ADORA2A</i>	Acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion	<i>FOXG1</i>	Rett syndrome with early-onset seizures
<i>ALG13</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms	<i>GABRA1</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms
	Early-onset epileptic encephalopathy with optic atrophy	<i>GABRB3</i>	Lennox–Gastaut syndrome/Infantile spasms
<i>AP3B2</i>	West syndrome	<i>GABRG2</i>	Dravet syndrome/generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+)
<i>ARFGEF2</i>	Severe early-onset epilepsy	<i>GNAO1</i>	Epileptic encephalopathy with involuntary movements
<i>ARHGEF15</i>	Early infantile epileptic encephalopathy/epilepsy in X-linked mental retardation	<i>GRIA3</i>	Infantile spasms/epilepsy in X-linked mental retardation
<i>ARHGEP9</i>	Lennox–Gastaut syndrome/Ohtahara syndrome/West syndrome	<i>GRIN1</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms
<i>ARX</i>	Childhood onset epilepsy/early-onset encephalopathy		Epileptic encephalopathy with continuous spike-and-wave during sleep/atypical Rolandic epilepsy/Landau–Kleffner syndrome/mental retardation and/or epilepsy/early-onset epileptic encephalopathy
<i>ASAH1</i>	Unclassified epileptic encephalopathy	<i>GRIN2A</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms/mental retardation and/or epilepsy
<i>ATP1A2</i>	Developmental encephalopathy with epilepsy		Developmental and epileptic encephalopathy
<i>ATP6V1A</i>	Early-onset encephalopathy	<i>GRIN2B</i>	Infantile spasms
<i>C10orf2</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms	<i>HADHB</i>	Early infantile epileptic encephalopathy
<i>CACNA1A</i>	Developmental and epileptic encephalopathy	<i>HCN1</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms
<i>CACNA1E</i>	Early infantile epileptic encephalopathy	<i>HDAC4</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms
<i>CACNA2D2</i>	Ohtahara syndrome	<i>HNRNPU</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms
<i>CASK</i>	Early-onset encephalopathy/infantile spasms/Lennox–Gastaut syndrome/West syndrome	<i>HOXD</i>	Early infantile-onset epilepsy
<i>CDKL5/STK9</i>	Dravet syndrome/infantile spasms/Lennox–Gastaut syndrome	<i>IQSEC2</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms
<i>CHD2</i>	Refractory epilepsy/encephalopathy/severe encephalopathy with seizures and hypotonia	<i>IRF2BPL</i>	Developmental epileptic encephalopathy
<i>CHRNA7</i>	Severe early-onset epilepsy	<i>JNK3</i>	Lennox–Gastaut syndrome
<i>CLCN4</i>	Focal epilepsy with regression	<i>KCNA2</i>	Myoclonic atonic epilepsy/Dravet syndrome/ataxia and epilepsy
<i>CNTNAP2</i>	West syndrome	<i>KCNH5</i>	Severe early-onset epilepsy
<i>CNPY3</i>	Early-onset epileptic encephalopathy	<i>KCNQ2</i>	Early-onset epileptic encephalopathy/Ohtahara syndrome
<i>CPA6</i>	West syndrome	<i>KCNQ3</i>	Familial benign neonatal epilepsy/early-onset epileptic encephalopathy/Rolandic epilepsy
<i>CSNK1E</i>	Early-onset epileptic encephalopathy/West syndrome/Ohtahara syndrome	<i>KCNQ5</i>	Epileptic encephalopathy
<i>CYFIP2</i>	Lennox–Gastaut syndrome/infantile spasms	<i>KCNT1</i>	Migrating partial seizures of infancy/Ohtahara syndrome

Fonte: MAGALHÃES *et al*, 2019.

Dos genes identificados em pacientes portadores de epilepsia monogênica, cerca de 27% estão envolvidos com canais transportadores de íons (OYRER *et al*, 2018). Muitos deles também estão envolvidos nos processos de controle e remodelação do citoesqueleto celular, indicando a importância desses processos na função neuronal (MAGALHÃES *et al*, 2019).

As técnicas de sequenciamento de nova geração têm gerado um grande número de dados de pacientes com a síndrome. Isso tem permitido a associação de fenótipos com as características genéticas, principalmente quando variantes pontuais são encontradas (MOLLER *et al*, 2019).

1.1.2. Tratamentos

Uma característica comum nessas síndromes é a rejeição do tratamento com drogas antiepilépticas usuais. Como resultado, terapias mais agressivas acabam sendo empregadas com o uso de supressores de espasmos, terapias imunomodulatórias e dietas específicas. Opções cirúrgicas também são consideradas (DONAT, 1992; KHAN & BARADIE, 2012).

Estima-se que cerca de 25% dos pacientes com variantes *de novo* devam ter um alvo para medicina personalizada, caso possam ter um diagnóstico genético (MOLLER *et al*, 2019). Alguns estudos já demonstram resultados promissores. Mutações no gene SCN1A, por exemplo, estão associadas com o canal iônico Nav1.1. A perda de função desse canal tem um importante efeito no processo de inibição interneurônios. Assim, diversos grupos tentam encontrar tratamentos de interação específicos para Nav1.1, na tentativa de melhorar sua ativação em pacientes de síndromes epiléticas com a mutação. Pequenos compostos como A43279, EX15 e RE01 passam por testes *in vitro* e *in vivo* com resultados promissores (BODDUM *et al*, 2017; FREDERIKSEN *et al*, 2017).

Outro exemplo, trata-se das mutações no gene SLC2A1. Esse gene codifica um transportador de glucose específico que é o principal transportador de glucose para o cérebro. Sua perda de função resulta em uma redução do suprimento de energia para o tecido. O padrão ouro para o tratamento de síndromes epiléticas associadas a essa mutação é a dieta cetogênica. Esse tipo de dieta, rica em gorduras, proporciona a produção de muitas cetonas pelo metabolismo, que conseguem atravessar a barreira hematoencefálica e servir de fonte energética para as células do tecido (MAGALHÃES *et al*, 2019).

Sivapalarajah e colaboradores publicaram em 2018 um banco de dados chamado de PDE3 (“The Prescribable Drugs with Efficacy in Experimental Epilepsies”). Este banco de dados traz uma série de drogas aprovadas para outras doenças que têm algum tipo de resultado positivo em testes pré-clínicos e/ou clínicos para o tratamento de epilepsias (SIVAPALARAJAH *et al*, 2018). O objetivo dos autores do trabalho foi criar uma lista de medicamentos que pudessem ser explorados em novos estudos de reposicionamento de fármacos para o tratamento de síndromes epiléticas.

1.2. ESTRUTURA DAS PROTEÍNAS CYFIP

A proteína CYFIP2 (“Cytoplasmic Fmrp interacting Protein 2”), também conhecida como PIR121 (“p53 inducible protein”) (SALLER *et al*, 1999), faz parte da família de proteínas CYFIP. O seu gene encontra-se localizado no cromossomo humano 5q33.3 (NCBI gene ID: 26999). Sua proteína homóloga, CYFIP1 ou Sra1 (KOBAYASHI *et al*, 1998), tem mais trabalhos associados na literatura, com anormalidades estruturais na região cromossômica onde está localizada (15q11–q13) sendo correlacionadas a deficiências intelectuais, autismo e esquizofrenia desde o ano 2000 (ABEKHOUKH & BARDONI, 2014). As duas proteínas possuem 88% de identidade e 95% de similaridade entre si, com cerca de 145 kDa, sendo altamente conservadas em diversos organismos. As proteínas compartilham cerca de 99% de identidade com seus ortólogos em camundongos (SCHENCK *et al*, 2001).

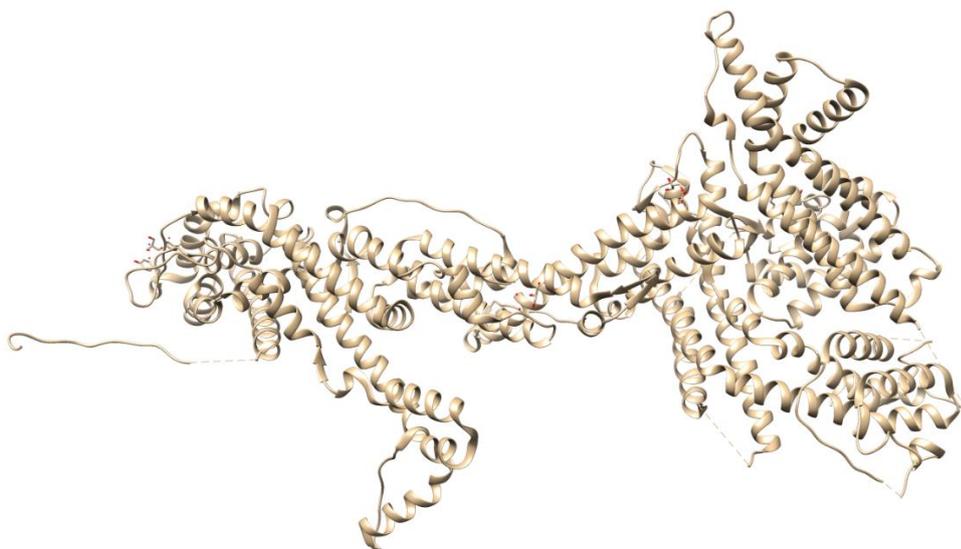


Figura 1.1. **Estrutura tridimensional da proteína CYFIP1.** Fonte: (CHEN *et al*, 2010).

A estrutura tridimensional da proteína CYFIP1 foi resolvida por cristalografia de raios-X, dentro do “Wave Regulatory Complex” (WRC), no qual desempenha importante função biológica, como ilustrado na figura 1.1. As coordenadas atômicas dessa estrutura encontram-se armazenadas no PDB (“Protein Data Bank”), sob os códigos 3P8C (CHEN *et al*, 2010) e 4N78 (CHEN *et al*, 2014). Já a estrutura tridimensional da proteína CYFIP2 ainda não foi elucidada por técnicas experimentais e não se encontra depositada nos bancos de dados. Por esse motivo e devido à alta homologia (88% de similaridade) entre as proteínas, esses registros de CYFIP1 são

usualmente utilizados também nos estudos de simulação com a proteína CYFIP2 (NAKASHIMA *et al*, 2018).

Estudos utilizando dinâmica e *docking* molecular propõem que CYFIP1 tenha funções diferentes dependendo da sua conformação estrutural. Nessas simulações computacionais, pesquisadores demonstraram que a proteína poderia passar de uma conformação mais planar para outra mais globular em um movimento de borboleta. Na forma globular, a proteína estaria mais associada ao complexo de eIF4E, enquanto na planar com o complexo WRC (DI MARINO *et al*, 2015). Esses dados de simulação são corroborados por alguns experimentos de FRET (DE RUBEIS *et al*, 2013). Por serem tão semelhantes, as mesmas alterações conformacionais poderiam se aplicar à CYFIP2, no entanto, mais estudos são necessários.

Existem também evidências de que a proteína CYFIP2 sofre algumas modificações pós-transcricionais e pós-traducionais. A modificação do mRNA de CYFIP2 foi descrita como um mecanismo dependente da enzima ADAR (“Adenosine Deaminases Acting on RNA”), responsável pela troca de uma adenosina por uma inosina. Em CYFIP2, essa modificação resulta na substituição K320E, ocorrendo principalmente no tecido cerebral, como ilustrado na figura 1.2. Essa edição da proteína já foi descrita em diversas espécies, indicando a sua conservação (LEVANON *et al*, 2005).

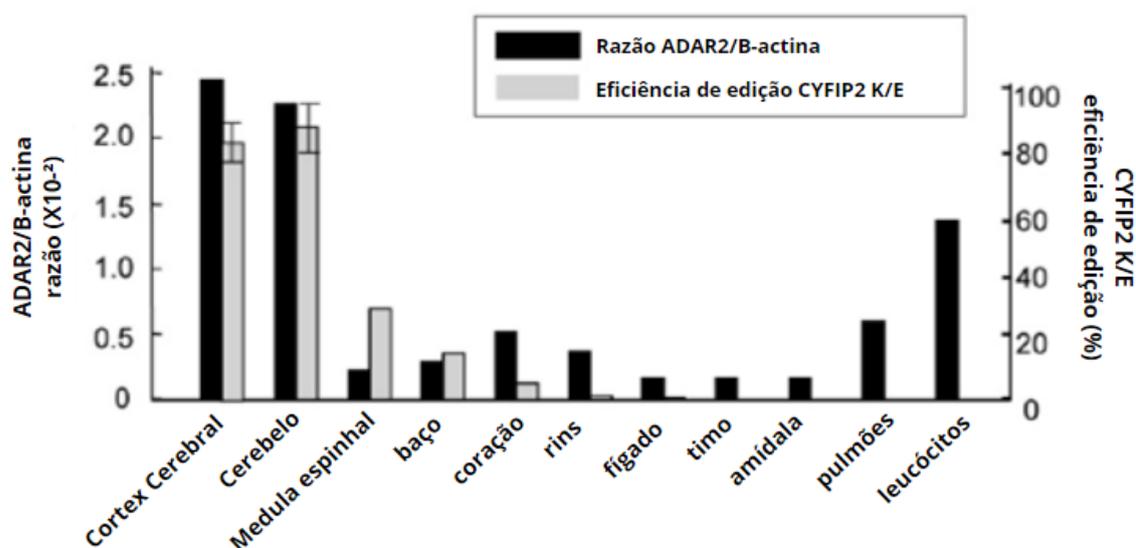


Figura 1.2. Extensão da edição de K320E do mRNA de CYFIP2 e níveis de mRNA de ADAR2 em tecidos humanos. Fonte: traduzido de (NISHIMOTO *et al*, 2008).

Além dessa edição do mRNA, estudos utilizando análise da fosforilação do proteoma, identificaram dois sítios específicos de fosforilação da proteína no tecido cerebral de camundongos (S582 e T1067). Nesse trabalho, a modificação do resíduo T1067A resultou em uma diminuição da densidade das espinhas dendríticas em células neuronais (LEE *et al*, 2017). Como essas modificações impactam o funcionamento neuronal ainda precisa ser elucidado.

1.3. FUNÇÃO DAS PROTEÍNAS CYFIP

Em 2014, Abekhoukh & Bardoni propuseram que a função e o papel na maturação neuronal seriam idênticos ou muito semelhantes entre as proteínas CYFIP1 e CYFIP2. Apesar da alta homologia entre ambas, os estudos mais recentes sugerem que, mesmo tendo papéis biológicos muito similares, as proteínas provavelmente também desempenham algumas funções de maneira diferente (ZHANG *et al*, 2019c). Experimentos em camundongos mostram que a disrupção de ambos os genes da maneira individual é letal, mas em diferentes pontos do desenvolvimento embrionário. Enquanto os embriões de camundongo com o gene *Cyfp1* deletado morrem por volta de 9,5 dias, embriões de camundongo com *Cyfp2* deletado morrem em torno de 18,5 dias (CHUNG *et al*, 2015; ZHANG *et al*, 2019b). Isso indicaria que não existe uma total sobreposição de função das proteínas homólogas.

Quanto à sua expressão, CYFIP1 parece estar igualmente expressa na maioria dos tecidos humanos, enquanto CYFIP2 se apresenta de maneira mais abundante no cérebro, rins e linfonodos (FAGERBERG *et al*, 2014). Outros estudos apontam ainda uma diferença dos locais de expressão entre as duas proteínas em células de hipocampo de camundongos adultos, como ilustra a figura 1.3. No cérebro dos camundongos adultos, CYFIP1 é mais expressa em células não neuronais enquanto CYFIP2 é mais expressa em células neuronais (ZHANG *et al*, 2019a).

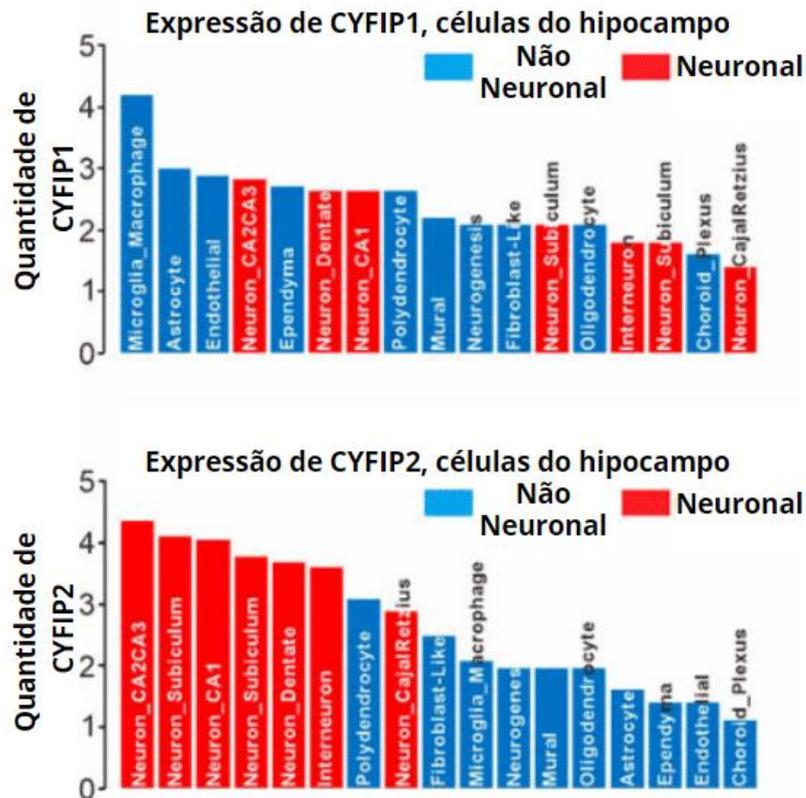


Figura 1.3. Gráfico mostrando a expressão de CYFIP1/2 em diferentes tipos celulares encontrados no hipocampo do cérebro de camundongos adultos. Fonte: traduzido de (ZHANG et al, 2019a).

Diferenças no papel do desenvolvimento dos axônios neuronais também já foram reportadas. Cioni e colaboradores (2018), utilizaram células gangliais de retina (RGCs) de embriões de “Zebrafish” e imagens do cérebro de *Xenopus sp.* para observar como o “knockdown” de CYFIP1 ou CYFIP2 afetaria a ordenação dos axônios. Os resultados deste ensaio estão ilustrados na figura 1.4. Neste estudo foi demonstrado que, nos modelos utilizados, CYFIP1 estaria mais relacionada à extensão dos axônios e CYFIP2 a sua correta ordenação (CIONI *et al*, 2018).

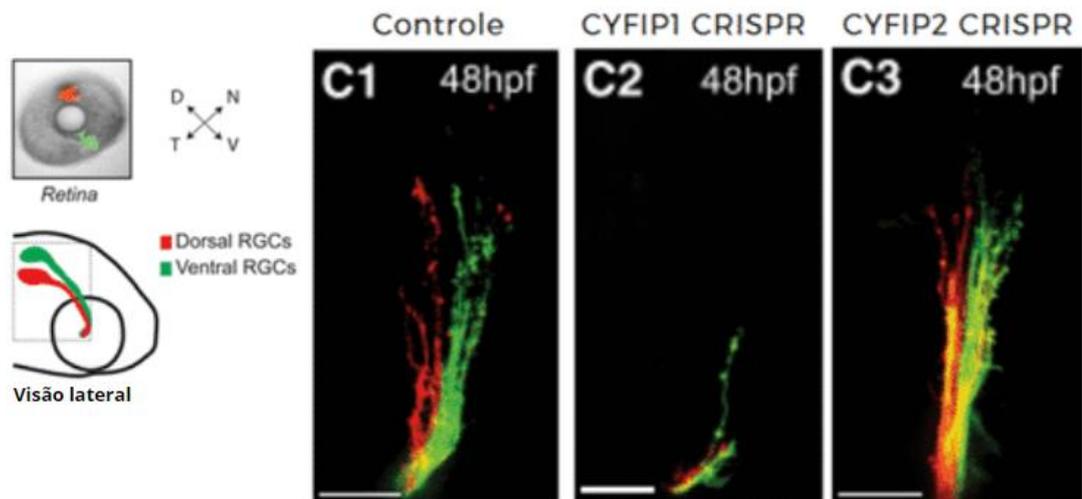


Figura 1.4. Experimento demonstrando como o “knockdown” de CYFIP1 e CYFIP2 afeta o desenvolvimento dos axônios neuronais nas células gangliais de retina de embriões de “Zebrafish”. Fonte: Modificado de (CIONI et al, 2018).

CYFIP2 foi inicialmente descrita como proteína de interação com FMRP (SCHENCK *et al*, 2001). A função de FMRP se encontra relacionada com a regulação da tradução nos dendritos neuronais (WEILER *et al*, 1997). Mutações no seu gene causam a síndrome do X-frágil, uma forma hereditária de deficiência intelectual e autismo (VERKERK *et al*, 1991). CYFIP2 interage com FMRP, assim como outros membros de sua família, FXR1P e FXR2P. A sua proteína homóloga, CYFIP1, apesar de apresentar também interação com FMRP, não é capaz de interagir com os outros dois membros da família (SCHENCK *et al*, 2001). A função biológica dessas interações, assim como a função de FMRP, ainda não é totalmente estabelecida. Um dos pontos do que se sabe é que FMRP também está envolvida na modulação de proteínas que regulam a reorganização do citoesqueleto (BROWN *et al*, 2001; RICHTER & ZHAO, 2021).

A proteína CYFIP2 também é descrita como um fator de apoptose dependente de p53 (por isso também é conhecida como PIR121) (SALLER *et al*, 1999). Em 2007, Jackson e colaboradores identificaram o gene de CYFIP2 como um gene induzível por p53 (JACKSON *et al*, 2007). Eles identificaram no promotor do gene um elemento responsivo à p53, o que poderia levar à ativação de sua transcrição pelo fator. A proteína p53 é considerada um supressor tumoral, atuando como um fator de ativação de apoptose (KO & PRIVES, 1996; LEVINE, 1997).

Outra função biológica muito importante desempenhada por esta proteína, como já citado, está na sua atuação dentro do WRC. Derivery e colaboradores (2009)

demonstraram que a proteína é precipitada junto do complexo WRC (DERIVERY *et al*, 2009). Outro estudo reportou que CYFIP2 é capaz de estabilizar a proteína WAVE (também integrante do complexo) no córtex cerebral de camundongos. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores encontraram que uma menor expressão de CYFIP2 ativa WAVE e permite que esta ative o processo de polimerização de actina antes de ser degradada por sua baixa estabilidade (HAN *et al*, 2015).

1.3.1. O complexo WRC

O complexo WRC, ilustrado na figura 1.5, é um complexo regulatório de cerca de 400 kDa atuante na regulação da polimerização dos filamentos de actina. Trata-se de um complexo pentamérico, consistindo dos seguintes grupos de proteínas (EDEN *et al.*, 2002):

- WAVE1/2/3 (“Wiskott–Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein”) também conhecida com SCAR;
- CYFIP1/2 (“cytoplasmic FMR1-interacting protein”) também conhecidas como Sra1 ou PIR121, respectivamente;
- NCKAP1 (“Nck-associated protein”)/ Hem1.
- ABI1/2/3 (“Abelson-interacting protein”);
- HSPC300 (“hematopoietic stem progenitor cell 300”).

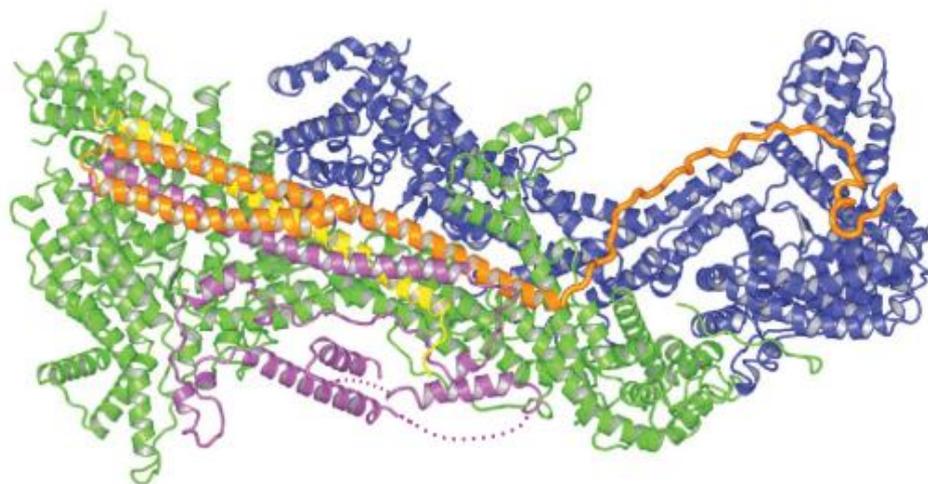


Figura 1.5. **Estrutura tridimensional do complexo WRC de acordo com o banco de dados do PDB.** CYFIP1 (verde), 1253 aminoácidos, 145 kDa; NCKAP1 (azul), 1128 aminoácidos, 129 kDa; WAVE1 (roxo), 559 aminoácidos, 62 kDa; HSPC300 (amarelo), 75 aminoácidos, 9 kDa; ABI2 (laranja), 513 aminoácidos, 56 kDa. Fonte: (CHEN *et al*, 2010; Uniprot, 2019).

Por ser composto de 5 subunidades, das quais a maior parte é codificada por genes parálogos, existem 36 possíveis formações para o complexo (POLESSKAYA *et al*, 2020). Sua atividade basal encontra-se na forma inativa. O complexo WRC pode ser ativado através da sua remodelação com a ligação de algumas moléculas como fosfolípídios de inositol e de Rac1-GTP (EDEN *et al*, 2002; OIKAWA *et al*, 2004). A ligação de Rac ao complexo é mapeada em duas regiões chamadas de “A site” e “D site”, respectivamente, como mostra a figura 1.6 (SCHAKS *et al*, 2018).

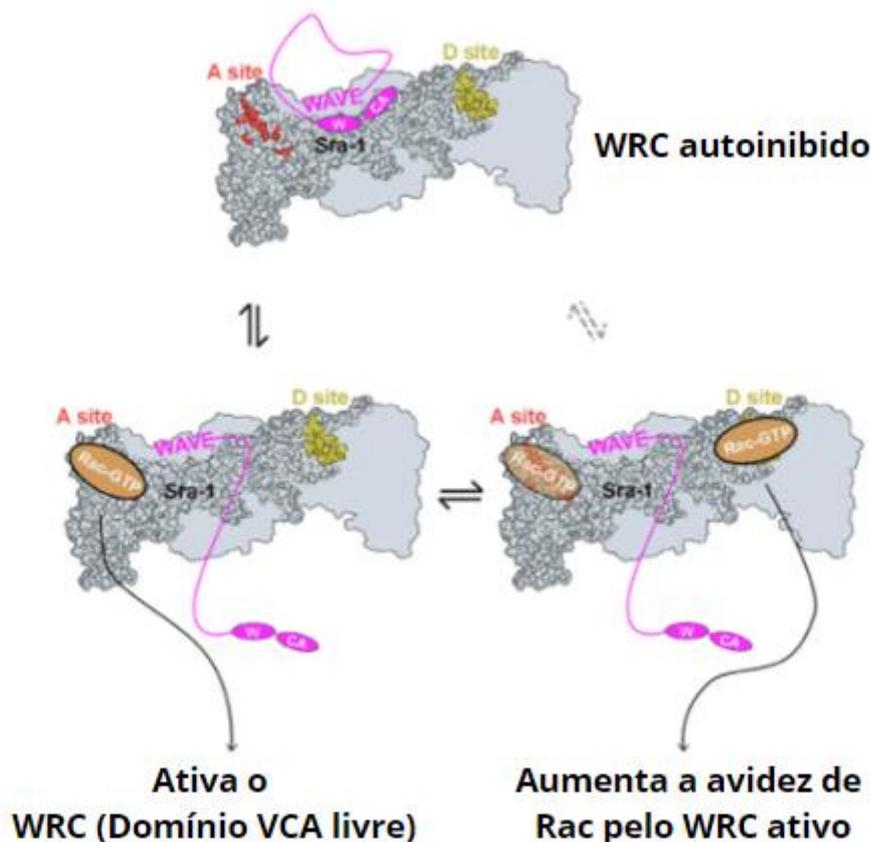


Figura 1.6. **Esquema representando a ativação do complexo WRC por Rac-GTP.** Papel da ligação de Rac-GTP no “A site” e no “D site” na ativação do complexo. Fonte: traduzido de (SCHAKS *et al*, 2018).

Dentro do complexo WRC é o domínio VCA (“Verprolin-homology, Central, Acidic”) da proteína WAVE, ilustrado na figura 1.7, o então responsável pela ativação de outro complexo: o Arp2/3. O complexo Arp2/3 é um dos complexos que atua na iniciação da nucleação dos filamentos de actina (MULLINS *et al*, 1998; MULLINS *et al*, 2000). Um dos processos de ativação do Arp2/3 se dá pela interação com o domínio VCA de WAVE, dando início à elongação de filamentos de actina na célula.

A interação entre as proteínas do complexo WRC, principalmente entre CYFIP e o domínio VCA de WAVE, impede sua interação com Arp2/3 (CHEN *et al*, 2014). Uma alteração na interação entre WAVE e CYFIP poderia resultar em uma exposição do domínio VCA e ativação constante do complexo Arp2/3, causando a desregulação da polimerização de filamentos de actina na célula (NAKASHIMA *et al*, 2018; SCHAKS *et al*, 2020).

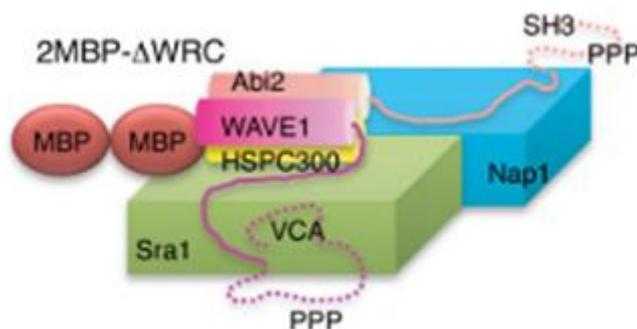


Figura 1.7. **Modelo esquemático representando o complexo WRC com enfoque para a interação do domínio VCA com Sra1/Cyfp1.** Fonte: (CHEN *et al*, 2014).

1.3.2. Interação com Arp2/3

Os filamentos de actina são estruturas que fazem parte do citoesqueleto e são formados por unidades globulares de actina. Para sua formação, uma das etapas fundamentais é o processo de nucleação. As unidades de actina podem se agregar de maneira espontânea, mas essa formação é normalmente muito instável e as subunidades se desagregam rapidamente. Para que possa haver a polimerização do filamento é necessário que várias unidades de actina se agreguem ao mesmo tempo de maneira que as interações se mantenham mais estáveis. É nesse processo de nucleação que um pequeno agregado é formado de maneira a promover a polimerização da estrutura (COOPER *et al*, 1983; FRIEDEN, 1983; TOBACMAN *et al*, 1983; ALBERTS *et al*, 2015).

Como já colocado anteriormente, um dos mecanismos para que esse processo ocorra é a ativação através do complexo Arp2/3. Quando ativado, Arp2/3 inicia o processo de nucleação do filamento de actina através da extremidade menos, permitindo uma rápida e eficiente alongação. Além disso, como ficará ligado na extremidade menos da estrutura, reduz a velocidade de sua despolimerização

espontânea na ponta menos (MULLINS *et al*, 1998; ALBERTS *et al*, 2015). Esse processo é ilustrado pela figura 1.8.

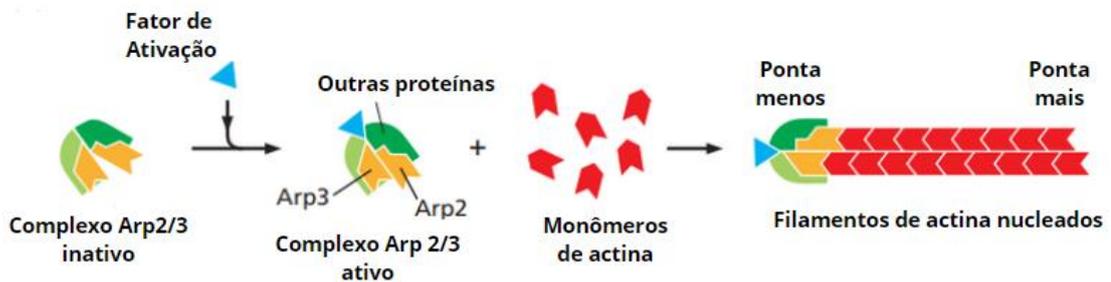


Figura 1.8. **Processo de nucleação dos filamentos de actina iniciado pelo complexo Arp2/3.** Fonte: traduzido de (ALBERTS *et al*, 2015).

Como também já citado, o papel de WRC na ativação do complexo Arp2/3 é fundamental. É através de suas modificações que o complexo WRC poderá ativar o Arp2/3 e assim regular a polimerização dos filamentos de actina. A remodelação de WRC devido à interação com Rac1-GTP, permite a exposição do domínio VCA da proteína WAVE. Esse domínio se liga então com Arp2/3 para sua ativação (CHEN *et al*, 2010). A figura 1.9 ilustra a descrição desse processo. Diversos trabalhos e evidências apontam que a estabilidade deste complexo e a de seus componentes é altamente regulada, além de sua formação e ativação. Essa seria uma forma de manter um controle estrito desse potente mecanismo de nucleação de actina (POLESSKAYA *et al*, 2020).

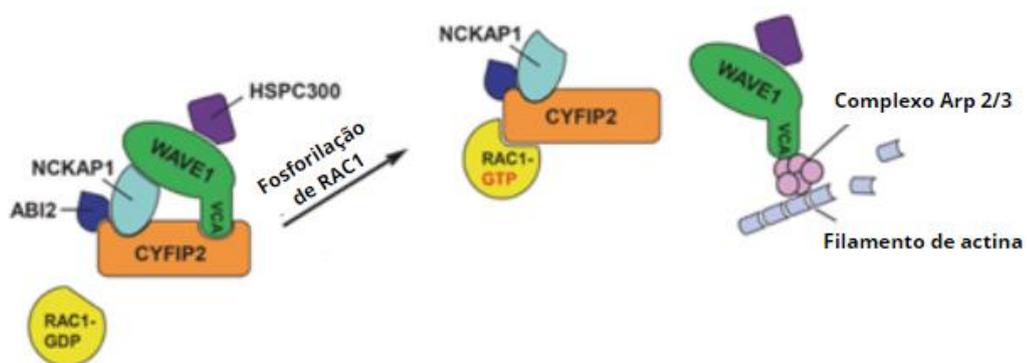


Figura 1.9. **Representação esquemática de como a remodelação do complexo WRC por Rac1-GTP, permite a ativação do complexo Arp2/3 e conseqüentemente o início do processo de nucleação dos filamentos de actina.** Fonte: Modificado de (ZWEIER *et al*, 2019).

Dentre os mecanismos de nucleação, o que se utiliza da regulação pelo complexo Arp2/3 é o único conhecido capaz de formar estruturas ramificadas (KONIETZNY *et al*, 2017). Isso ocorre porque o complexo pode iniciar o processo de nucleação se conectando aos braços de filamentos de actina já existentes em um ângulo de 70° (MULLINS *et al*, 1998).

1.3.3. Filamentos de actina e a função neuronal

Os filamentos de actina são formados por proteínas globulares e tem função estrutural, de movimentação e de adesão na célula. O processo de regulação da polimerização e despolimerização das fibras de actina é vital para as células eucarióticas. São estruturas flexíveis de cerca de 8 nm de diâmetro e se organizam em feixes e redes bi e tridimensionais (ALBERTS *et al*, 2015).

Os neurônios são células extremamente polarizadas, com uma estrutura complexa necessária à sua função de distribuição e alocação de informações, como mostra a figura 1.10 (A) (MAGEE, 2000; GULLEDGE *et al*, 2005). Os filamentos de actina e os microtúbulos são as estruturas do citoesqueleto majoritariamente responsáveis por essa estrutura (COLES & BRADKE, 2015). Os filamentos de actina são particularmente importantes no controle da função e da morfologia dos dendritos neuronais (OKAMOTO *et al*, 2004). As espinhas dendríticas são pequenas protusões das membranas dos dendritos que ajudam a passar os sinais para o corpo do neurônio. São estruturas muito dinâmicas na qual a remodelagem do citoesqueleto de actina é especialmente importante (ALVAREZ & SABATINI, 2007; KONIETZNY *et al*, 2017).

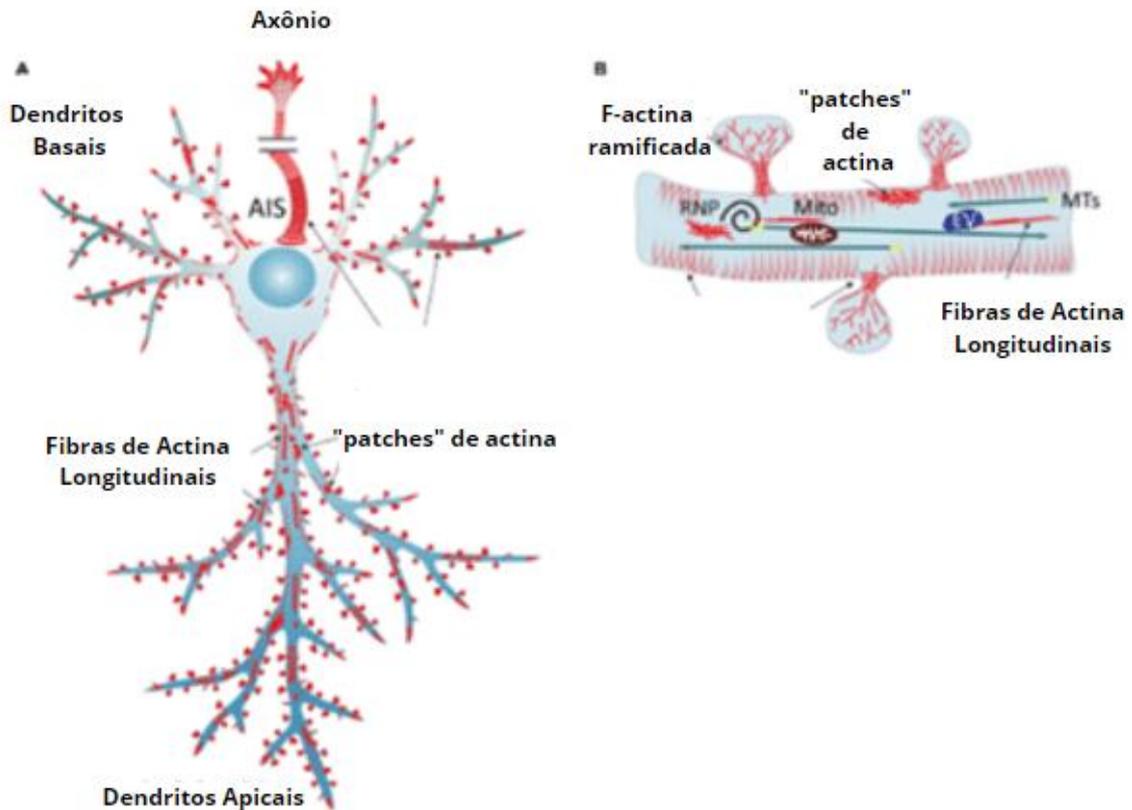


Figura 1.10. **Diferentes estruturas de actina presentes nos neurônios. Em foco na parte B, como as estruturas ramificadas fazem parte das espinhas dendríticas.** Fonte: Modificado de (KONIETZNY et al, 2017).

Nas pontas das espinhas dendríticas, a maior parte do citoesqueleto de actina se encontra na forma de estruturas ramificadas, como ilustrado na figura 1.10 (B). Isso ocorre porque essas estruturas conseguem ter melhor força de tração contra a membrana plasmática, necessária à maturação e crescimentos das espinhas dendríticas (BOSCH *et al*, 2014; SPENCE *et al*, 2016). Como citado anteriormente, o processo de nucleação do complexo Arp2/3 é o único mecanismo conhecido para a criação de estruturas ramificadas de actina (ALBERTS *et al*, 2015; KONIETZNY *et al*, 2017).

De maneira interessante, no estudo de Pathania e colaboradores (2014) foi possível observar como ambas as proteínas CYFIP1 e CYFIP2 estão localizadas predominantemente nas espinhas dendríticas de sinapses excitatórias de células cerebrais de camundongos. O estudo utilizou-se das proteínas acopladas ao gene da proteína GFP para a avaliação das proteínas nas estruturas. A superexpressão das proteínas também resultou no aumento da complexidade dos dendritos e em espinhas dendríticas com alterações estruturais (PATHANIA *et al*, 2014).

1.3.4. Interações com RBPs

Além de sua associação ao WRC, CYFIP2 também é mencionada como uma proteína capaz de interagir com RBPs (“RNA Binding Proteins”), podendo ter interferência na regulação da tradução. A interação de CYFIP2 com xFXR (um marcador de RNP - ribonucleoproteínas) foi descrita em regiões subcelulares específicas das células gangliais de retina de *Xenopus sp.* Os resultados sugerem que existe uma maior associação com as RNPs ao longo da região do axônio que muda para uma maior associação ao WRC quando a proteína é transportada para a periferia da célula (CIONI *et al*, 2018).

Napoli e colaboradores (2008) mostraram um possível domínio de ligação de eIF4E na porção C-terminal de CYFIP2, o que indica uma possível relação de regulação de alvos de FMRP (NAPOLI *et al*, 2008). Inclusive, CYFIP2 já foi imunoprecipitada junto de eIF4E em neurônios de ratos e seu mRNA aparece como um dos alvos do controle por FMRP (DARNELL *et al*, 2011; GHOSH *et al*, 2020). Mais recentemente, foi descrita a interação de CYFIP2 com 25 proteínas relacionadas ao processamento de mRNA através da análise do seu interactoma em cérebros de camundongos. Entre estas se encontram Pumilio1 (Pum1), Argonauta 1 e 2 (Ago1/2) (LEE *et al*, 2020). Estudos futuros são necessários para esclarecer melhor o papel de CYFIP2 na regulação pós-transcricional.

1.3.5. As variantes Arg87 de CYFIP2

Em 2018, foi reportada pela primeira vez uma associação da proteína CYFIP2 com a encefalopatia epiléptica precoce. Foram analisados 489 indivíduos (com análise das crianças e de seus pais) com a síndrome. Quatro dessas crianças apresentaram variantes *de novo* no resíduo Arg87 de CYFIP2, de maneira heterozigótica. As variantes encontradas foram Arg87Cys, Arg87Pro e Arg87Leu (NAKASHIMA *et al*, 2018).

Depois desse estudo, a literatura apresenta pelo menos mais seis pacientes reportados até 2019 com variantes no mesmo resíduo da proteína (PENG *et al*, 2018; ZWEIER *et al*, 2018; ZHONG *et al*, 2019). Temos conhecimento de três pacientes (com a variante Arg87Cys) no Brasil por contato de seus familiares com o Instituto Carlos Chagas - Unidade da Fiocruz no Paraná. Todos os pacientes identificados nos

casos reportados são heterozigotos para a variante. No estudo de Zweier e colaboradores (2018) outras variantes da proteína também foram associadas à síndrome. Sete diferentes variantes “missense” foram encontradas nos pacientes analisados, sendo que as variantes p.Arg87Cys e p.Ile664Met foram as mais recorrentes. Ambos os estudos, de Nakashima e colaboradores e Zweier e colaboradores, utilizaram modelos computacionais para avaliar o impacto da variante no complexo WRC utilizando a estrutura cristalográfica do complexo com CYFIP1.

Embora a correlação da doença com a mutação da proteína neste sítio específico exista, não foi possível ainda comprovar todos os mecanismos aos quais está associada em células neuronais. Uma hipótese dos autores, com base na análise estrutural do sítio Arg87, é de que alterações nesse sítio promoveriam a ativação contínua do WRC. Mais precisamente, a mutação estaria na interface de interação com WAVE, como ilustra a figura 1.11 (NAKASHIMA *et al*, 2018). O trabalho de Schaks e colaboradores (2020) mostra o efeito da mutação Arg87Cys em CYFIP1 na formação de lamelipódios em linhagem celular B16-F1, indicando uma superativação do complexo WRC (SCHAKS *et al*, 2020).

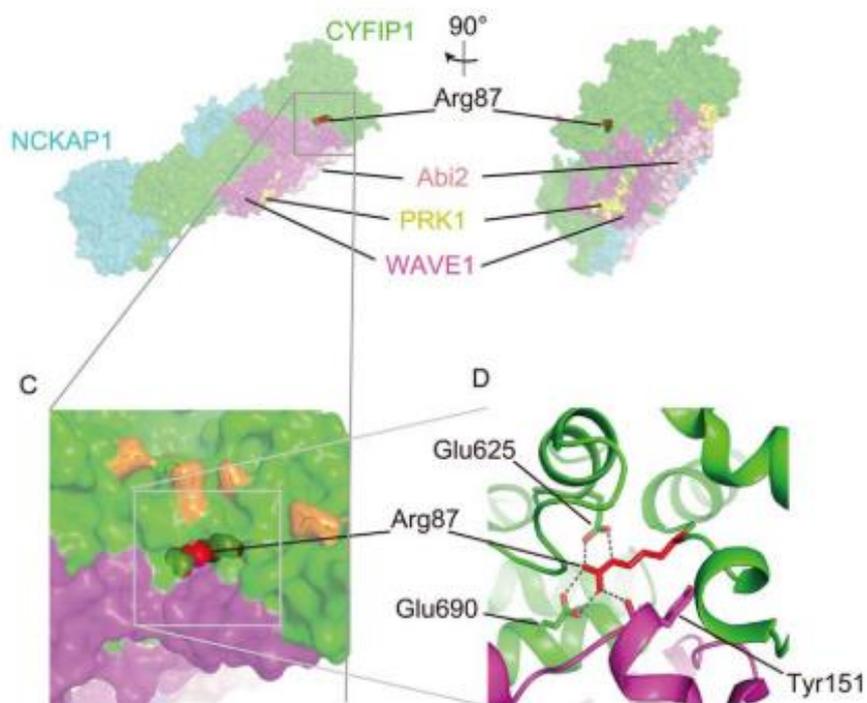


Figura 1.11. **Estrutura tridimensional do complexo WRC.** Foco nos resíduos de interação com o resíduo Arg87 de CYFIP2. Fonte: (NAKASHIMA *et al*, 2018).

O mecanismo proposto pelos grupos seria de que as variantes nesse resíduo promovessem uma interação mais fraca entre WAVE e CYFIP2. Essa interação faria com que o domínio VCA se desconectasse e ficasse mais exposto, criando uma ativação constante e aberrante de Arp2/3 (NAKASHIMA *et al*, 2018; ZWEIER *et al*, 2018). Isso resultaria na mudança das estruturas das espinhas dendríticas e afetaria o balanço entre excitação/ inibição das sinapses (ZHANG *et al*, 2019c). Essa hipótese é ilustrada na figura 1.12.

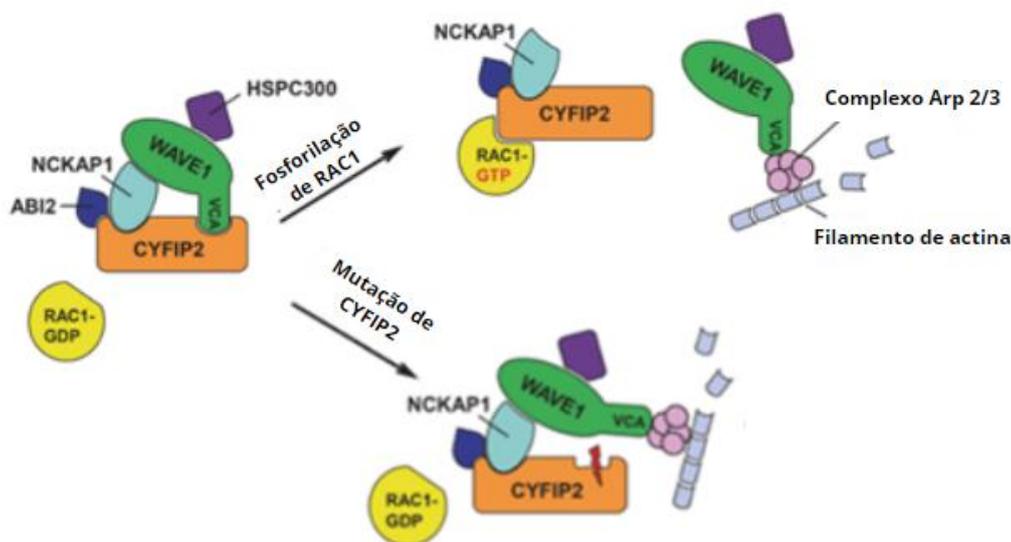


Figura 1.12. **Figura esquemática indicando o possível efeito das variantes Arg87 de CYFIP2 no complexo WRC.** Os autores propõem uma desregulação devido a ativação constante de Arp2/3. Fonte: Modificado de (ZWEIER *et al*, 2018).

Outras hipóteses ou mecanismos que poderiam ser afetados em conjunto com a desregulação do complexo WRC, ilustrados na figura 1.13, seriam:

- Assim como CYFIP1, CYFIP2 pudesse promover a regulação da liberação de neurotransmissores nos compartimentos sinápticos.
- O complexo WRC também forma interações com algumas proteínas de membrana e canais iônicos; e as variantes teriam interferência nesse complexo.
- Além disso, CYFIP2 também tem o papel de interagir com proteínas ligantes de mRNA. Assim, teria um papel importante no transporte e na tradução local de alguns mRNAs.

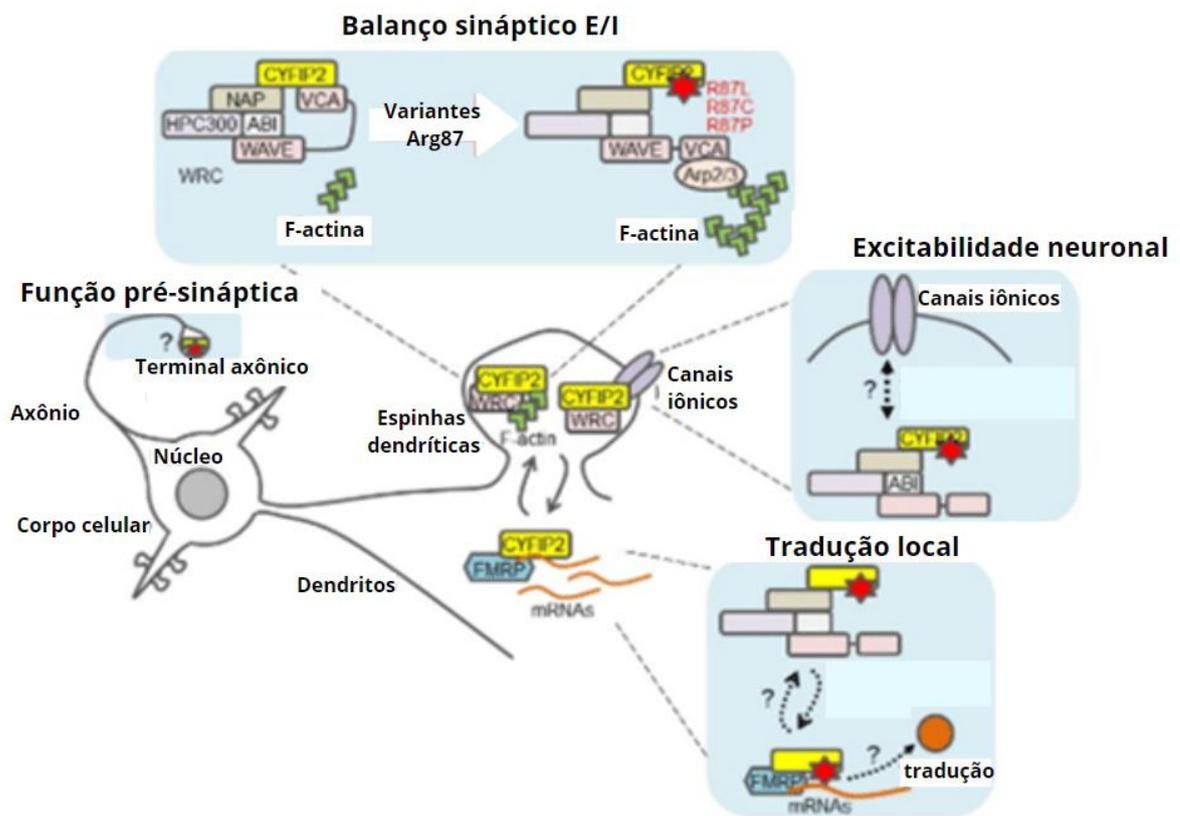


Figura 1.13. **Hipóteses de mecanismos de patogenicidade e desregulação dos processos celulares pelas variantes Arg87 de CYFIP2.** Fonte: traduzido de (ZHANG et al, 2019c).

O trabalho de Lee e colaboradores (2020) tem dados que reforçam esta última hipótese. Eles demonstraram que as variantes Arg87 de CYFIP2 podem impactar na formação dos grânulos de estresse. Super expressando diferentes formas de CYFIP2 em células do tipo HeLa, foi possível observar que sob condições de estresse apenas as variantes Arg87 não apresentaram a formação desses grânulos. O grupo também observou que as variantes formavam “clusters” de maneira espontânea nas células. Através da análise do interactoma de CYFIP2 no cérebro de camundongos foram identificadas diversas proteínas componentes dos grânulos de estresse e RBPs, por exemplo, as proteínas Argonata 1 e 2. Por isso, esses autores sugerem que além do papel das variantes no WRC, haveria também um impacto destas na regulação de tradução e formação dos grânulos de estresse, como mostra a figura 1.14. Ambos os mecanismos contribuiriam para a patologia (LEE *et al*, 2020).

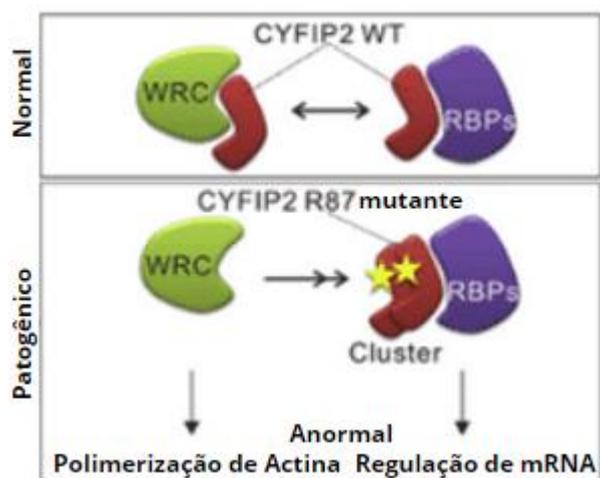


Figura 1.14. **Modelo proposto para a atividade patológica das variantes Arg87 de CYFIP2.** Fonte: Traduzido de (LEE et al, 2020).

Outro dado interessante reportado, que pode ajudar a elucidar o papel de CYFIP2 na doença, é o papel do lítio na reversão do fenótipo observado em camundongos *Cyfp2^{+/-}*. Esses camundongos apresentaram comportamento anormal (aumento da atividade e velocidade locomotora e redução de ansiedade) e hiperexcitabilidade dos neurônios de algumas regiões do córtex pré-frontal sem o tratamento. O tratamento com o lítio foi capaz de mitigar a hiperexcitabilidade e normalizar a resposta ao teste de ansiedade dos camundongos *Cyfp2^{+/-}*. O sequenciamento de RNAs dos camundongos *Cyfp2^{+/-}* não tratados mostrou uma redução da expressão de canais de potássio nessas células (LEE et al, 2020). Isso corrobora a hipótese de algum tipo de interferência das variantes em outras proteínas de membrana, como os canais iônicos. Mais estudos são necessários para entender melhor os mecanismos patológicos das variantes de CYFIP2.

1.4. CYFIP2 E SUA RELAÇÃO COM ALGUMAS PATOLOGIAS

Além das desordens neurológicas associadas às variantes Arg87, outras alterações em CYFIP2 já foram associadas a patologias. Camundongos heterozigotos para o gene de CYFIP2 demonstraram comportamentos e sintomas semelhantes à síndrome do X-frágil. Em combinação com a deleção de FMRP (proteína associada à síndrome), esses efeitos se mostraram ainda mais agudos (HAN et al, 2015).

Para avaliar as interações de CYFIP2 no WRC, assim como efeitos biológicos e correlações com patologias, diversos grupos realizaram mutações pontuais na proteína. Junto com a avaliação de expressão, ensaios de imunoprecipitação e “pull-down” dos mutantes é possível observar os efeitos dessas mutações no fenótipo celular. A figura 1.15 mostra algumas das mutações já realizadas em CYFIP1 ou CYFIP2, na estrutura tridimensional de CYFIP, com a descrição de seus efeitos.

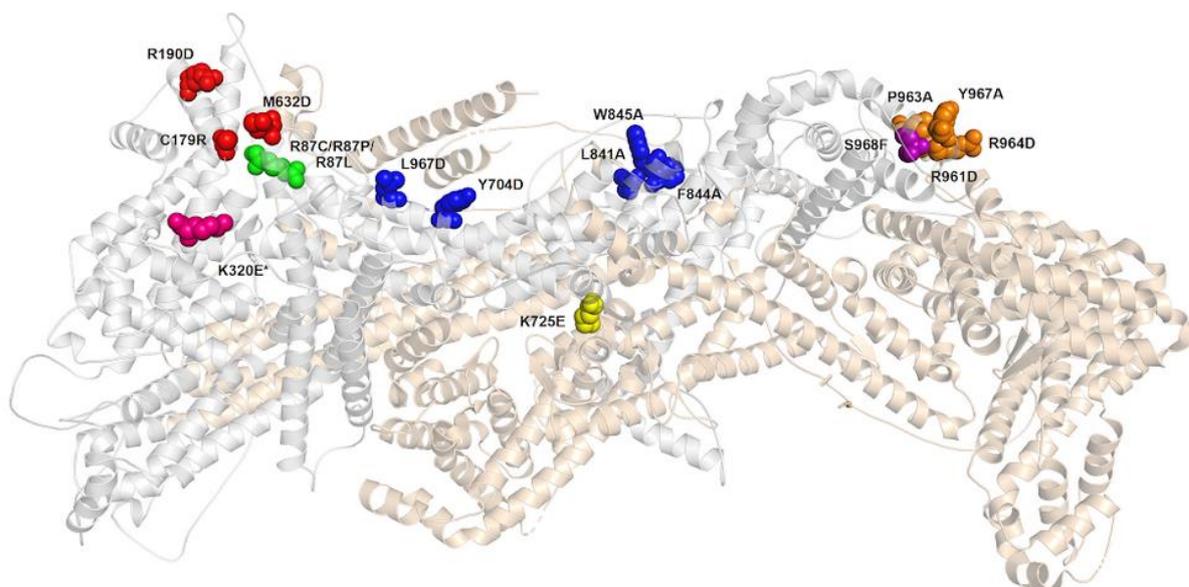


Figura 1.15. **Modelo da proteína CYFIP (cinza) interagindo com o complexo WRC (salmão).** As esferas enfatizam as regiões de mutações reportadas na literatura para CYFIP1 ou CYFIP2 que levam a efeitos biológicos: as mutações C179R, R190D e M632D (vermelho) demonstraram a inibição da ligação de RAC1 no “A site”. L697D, Y704D, L841A, F844A e W845A (azul) rompem a interação de CYFIP e o domínio VCA de WAVE. K725E (amarelo) apresenta a redução da interação entre CYFIP e eIF4E. R961D, P963A, R964D e Y967A (laranja) eliminam a ligação de RAC1 no “D site”. A mutação S968F (roxo) foi associada à resposta aguda à cocaína e comportamento alimentar compulsivo em camundongos. R87C, R87P, e R87L variantes (verde) estão relacionadas às encefalopatias epilépticas precoce. K320E (rosa) é uma variante resultante da edição do mRNA de CYFIP2 por enzimas ADAR. Fonte: (O autor, 2021).

A proteína também foi identificada como alvo potencial para o tratamento do mal de Alzheimer. Estudos indicam que a redução da expressão de CYFIP2 em células neuronais inicia uma cascata de modificações na doença como, a hiperfosforilação do fator tau, a formação das placas de amiloides e a perda de memória (TIWARI *et al*, 2016). Além disso, em um estudo recente, foi demonstrado que camundongos idosos *Cyfip2*^{+/-} apresentaram acúmulo de A β no cérebro, gliose, perda das sinapses e deficiência de memória (GHOSH *et al*, 2020).

Outras patologias que a proteína parece estar envolvida são a esclerose múltipla e alguns tipos de câncer, principalmente porque a sua atuação na regulação da polimerização de actina está envolvida na adesão e migração celular. A adesão de células do tipo T é elevada em pacientes com esclerose múltipla. Mayne e colaboradores (2004) analisaram células do tipo CD4+ em pacientes com a doença. Nesses pacientes, a expressão de CYFIP2 encontrava-se com um aumento de cerca de quatro vezes, o grupo então sugeriu que os altos níveis da proteína facilitassem a adesão de células do tipo T (MAYNE *et al*, 2004). No estudo de Poleskaya e colaboradores (2020) com diversos pacientes de câncer de mama, uma maior expressão de CYFIP2 foi relacionada a um maior tempo de sobrevida livre de metástase dos pacientes. Nesse mesmo estudo, experimentos celulares com a deleção da proteína indicaram seu papel de inibição da migração celular (POLESSKAYA *et al*, 2020).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Identificação de interações da proteína CYFIP2 com a mutação Arg87Cys (CYFIP2p.Arg87Cys) e possíveis agentes terapêuticos utilizando-se abordagens *in silico*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modelagem das proteínas CYFIP2 selvagem e variante Arg87Cys.
- Identificação de ligantes específicos para a variante Arg87Cys através de *docking* molecular.
- Dinâmica molecular dos modelos para validação dos mesmos e reavaliação dos ligantes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONSTRUÇÃO DOS MODELOS

Como a estrutura atômica de CYFIP2 não se encontrava resolvida e depositada em bancos de dados, foi necessária a construção de modelos para realização dos experimentos *in silico*. Para a predição da estrutura terciária das proteínas (CYFIP2, CYFIP2p.Arg87Cys e CYFIP2p.Lys320Glu) foi utilizado o método de modelagem por homologia. Este método é baseado na modelagem por comparação com proteínas homólogas.

A estrutura cristalográfica do complexo WRC, contendo a proteína CYFIP1, encontra-se depositada no PDB sob código 3P8C (CHEN *et al*, 2010). Considerando que CYFIP1 e CYFIP2 compartilham 88% de identidade (SCHENCK *et al*, 2001), as coordenadas atômicas de CYFIP1 (PDB 3P8C, cadeia A) foram utilizadas como molde na modelagem por homologia da proteína CYFIP2 nativa e suas variantes. O servidor HHpred (“Homology detection & structure prediction by HMM-HMM comparison” - Detecção de Homologia e predição de estrutura por comparação utilizando modelos escondidos de Markov) foi utilizado para realizar o alinhamento (a partir da referência NP_001032410), baseado na estrutura secundária, entre as proteínas (ZIMMERMANN *et al*, 2018). A modelagem foi realizada utilizando o software MODELLER versão 9.23 (WEBB & SALI *et al*, 2016). Um conjunto de 50 modelos foi gerado para cada versão da proteína. A função do MODELLER que calcula o “DOPE score” (“Discrete Optimized Protein Energy”) foi utilizada para avaliar e selecionar os modelos finais. As estruturas foram ainda checadas para choques entre os átomos com distância menor que 1,5 Å, utilizando a ferramenta “find clashes/contacts” do software Chimera versão 1.14 (PETTERSEN, 2004). A geometria dos modelos foi avaliada utilizando a ferramenta Molprobity pelo gráfico de Ramachandran (WILLIAMS *et al*, 2010).

3.2 DOCKING MOLECULAR

Antes da realização dos experimentos de *docking* molecular, os modelos foram preparados para o experimento. A preparação envolveu a checagem de átomos e ligações faltantes, checagem de contatos e a minimização de energia utilizando o pacote “molecular modelling toolkit” (MMTK) dentro do software Chimera versão 1.14 (HINSEN, 2000). Minimizamos a estrutura para simular o comportamento da proteína

em solvente, tornando-o mais próximo da realidade. A minimização de energia foi realizada utilizando os seguintes parâmetros:

- “Force field”: Amber ff14SB;
- “Steepest descent steps”: 100;
- “Steepest descent step size”: 0.2 Å;
- “Conjugate gradient steps”: 10;
- “Conjugate gradient step size”: 0.2 Å.

Para a escolha dos ligantes foi utilizada uma lista de 174 fármacos da base de dados PDE3 (“Prescribable Drugs with Efficacy in Experimental Epilepsies”) (SIVAPALARAJAH *et al*, 2018). Como forma de ampliar a base de análise também foram selecionados aleatoriamente 3.772 compostos do banco de dados Drugbank (WISHART *et al*, 2018).

As análises de *docking* molecular foram então realizadas com todas as moléculas selecionadas como ligantes para os modelos de ambas as proteínas (CYFIP2 e CYFIP2p.Arg87Cys) para comparação dos resultados. Para isso, foi utilizado a ferramenta “PyRx-virtual screening” versão 0.8 composta das bibliotecas AutoDock (MORRIS *et al*, 2009) e AutoDock Vina (TROTT & OLSEN, 2010). O seguinte protocolo foi então utilizado:

- Os modelos minimizados foram salvos no formato de arquivo pdb e importados para o PyRx;
- Os ligantes foram também importados no formato pdb ou sdf;
- O módulo AutoDock Tools foi utilizado para transformar todos os arquivos (modelos e ligantes) para o formato pdbqt;
- Finalmente, o algoritmo do AutoDock Vina foi utilizado para performar o *docking* com os ligantes selecionados. A caixa de análise foi desenhada com as seguintes dimensões em Å: centro (x, y, z) = (0.48, 39.17, 231.72), dimensões (x, y, z) = (20.77, 19.34, 19.84). O parâmetro de “exhaustiveness” foi definido como 8.

A posição e o formato da caixa haviam sido definidos previamente de forma a cobrir a região Arg87 da proteína. Além disso, o algoritmo COACH (YANG, ROY & ZHANG, 2013) foi utilizado para uma análise de predição de possíveis sítios de ligação de pequenos ligantes nos modelos. Os resultados dessa predição são apresentados na tabela 4.2. Essa análise também auxiliou na definição da caixa de busca, ilustrada na figura 4.6.

3.3 ANÁLISE DOS LIGANTES ENCONTRADOS NO DOCKING

Os resultados do *docking* molecular foram avaliados pela comparação do “score” de afinidade de ligação (kcal/mol) - preditos pela função de “score” do módulo Autodock Vina – entre os modelos de CYFIP2 e CYFIP2p.Arg87Cys. Os critérios de seleção dos ligantes pelo “score” se encontram na tabela 3.1. Aqui, dentre as 8 conformações testadas para cada ligante, foi selecionada a de maior afinidade (número mais negativo em kcal/mol).

Tabela 3.1. Critérios de seleção dos ligantes através do “score” de afinidade de ligação comparado entre CYFIP2 e CYFIP2p.Arg87Cys.

Critérios para seleção dos fármacos na primeira varredura	
1	<ul style="list-style-type: none">• “Score” de afinidade de ligação para CYFIP2 maior que -6,5 kcal/mol (baixa afinidade);• “Score” de afinidade de ligação para CYFIP2p.Arg87Cys menor que -6,5 kcal/mol (alta afinidade) e;• Diferença de “scores” de afinidade de ligação entre as duas proteínas maior que 1,0 kcal/mol.
2	<ul style="list-style-type: none">• “Score” de afinidade de ligação para CYFIP2 menor que -6,5 kcal/mol (alta afinidade);• “Score” de afinidade de ligação para CYFIP2p.Arg87Cys maior que -6,5 kcal/mol (baixa afinidade) e;• Diferença de “scores” de afinidade de ligação entre as duas proteínas maior que 1,0 kcal/mol.
3	<ul style="list-style-type: none">• Diferença de “scores” de afinidade de ligação entre as duas proteínas maior que 1,0 kcal/mol.

Fonte: O autor, 2021.

O software LigPlus (LASKOWSKI & SWINDELLS, 2011) foi utilizado para uma segunda avaliação da interação predita entre proteína e ligantes selecionados. A avaliação foi feita de maneira a comparar os pontos de interação dos ligantes com os resíduos de aminoácidos das duas versões da proteína, na conformação de maior afinidade predita. Avaliamos também a possibilidade da melhor conformação predita para uma versão da proteína se encaixar no outro modelo. Para isso, os arquivos resultantes do *docking* foram sobrepostos ao outro modelo (arquivos resultantes do

docking contra a proteína nativa foram sobrepostos à variante e vice-versa) utilizando a ferramenta “MatchMaker” do Chimera versão 1.14 (HINSEN, 2000). Com essa sobreposição, geramos novos modelos que foram também submetidos à mesma análise anterior no software LigPlus.

3.4 DINÂMICA MOLECULAR

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas em colaboração com o grupo de pesquisa em engenharia de proteínas e soluções para a saúde, da unidade da Fiocruz no Ceará. Os experimentos foram realizados pela Msc. Natália Fernandes Frota e pelo Dr. Marcos R. Lourenzoni. A metodologia utilizada pelo grupo para realização dos experimentos é descrita a seguir:

A simulação foi realizada utilizando o pacote GROMACS 2018 (BERENDSEN *et al.*, 1995; LINDAHL & HESS, 2001; VAN DER SPOEL *et al.*, 2005; HESS *et al.*, 2008; PRONK *et al.*, 2013; ABRAHAM *et al.*, 2015; PALL *et al.*, 2015) usando o campo de força CHARMM36 para descrever as interações atômicas (HUANG & MACKERELL, 2013). As coordenadas atômicas das proteínas foram submetidas no servidor H++ (GORDON *et al.*, 2005) e, em seguida, colocadas em uma caixa dodecaédrica solvatada com moléculas de água do tipo TIP3P (JORGENSEN *et al.*, 1983). A distância entre a extremidade da proteína e a extremidade da caixa foi de 2 nm. Os comprimentos de ligação envolvendo os átomos de hidrogênio da proteína foram controlados utilizando o algoritmo LINCS (HESS *et al.*, 1997; HESS, 2008;) e os das águas, utilizando o algoritmo SETTLE (MIYAMOTO & KOLLMAN, 1992). As interações entre átomos não ligados, de van der Waals e Coulomb, foram avaliadas com um raio de corte de 1.3 nm, sendo que as correções para interações eletrostáticas foram calculadas utilizando o método “Particle mesh Ewald” (PME) (DARDEN *et al.*, 1993).

A temperatura foi controlada pelo termostato “V-rescale” com proteína, solvente e íons acoplados separadamente (BUSSI *et al.*, 2007), com uma constante de acoplamento de 0.2 ps. Da mesma forma, a pressão do sistema foi controlada pelo barostato de Berendsen (BERENDSEN *et al.*, 1995) com uma constante de 0.2 ps em 1 bar.

As trajetórias obtidas foram analisadas utilizando programas do pacote GROMACS 2018. As variações na estrutura das proteínas foram avaliadas pelo desvio quadrático médio (RMSD – “Root Mean Square Deviation”) dos átomos, pelo

programa gmx rms. O RMSD em função do tempo é obtido após a sobreposição dos carbonos alfa (C α), de cada estrutura ao longo do tempo da dinâmica molecular, em relação à primeira estrutura (t = 0). O cálculo do RMSD provém da média do desvio das distâncias entre as posições dos átomos dos C α das duas estruturas em tempos distintos. As representações de estruturas foram geradas usando o software Pymol 2.2.0 (Schrödinger).

O software LigPlus (LASKOWSKI & SWINDELLS, 2011) foi utilizado para avaliar as interações entre os resíduos Arg87 (Cys87 na proteína variante) e outros resíduos da estrutura da proteína.

3.5 ALINHAMENTO

A conservação da sequência de CYFIP2 em diferentes espécies foi avaliada, especialmente para os resíduos Arg87 e Glu624. Para isso, foi utilizado a ferramenta Blastp (ALTSCHUL *et al*, 1990) para alinhamento de sequências a partir da referência NP_001032410. O servidor “BoxShade” (SIB-SWISS, s.d.) foi utilizado para criar a imagem do alinhamento entre as sequências selecionadas.

4. RESULTADOS

4.1 MODELOS CONSTRUÍDOS

A ferramenta online HHpred foi utilizada para uma busca por modelos experimentais similares, baseado em estrutura secundária para encontrar o alinhamento da sequência de CYFIP2 no banco de dados. Esse alinhamento foi realizado com a finalidade de encontrar uma estrutura base para construção dos modelos pelo método de modelagem por homologia. Como esperado, conforme os dados contidos na literatura, foi encontrada a proteína CYFIP1 (código PDB 3P8C) como melhor base para realizar a modelagem, com 88% de identidade. Os resultados desse alinhamento encontram-se na figura 4.1 e no apêndice 1.

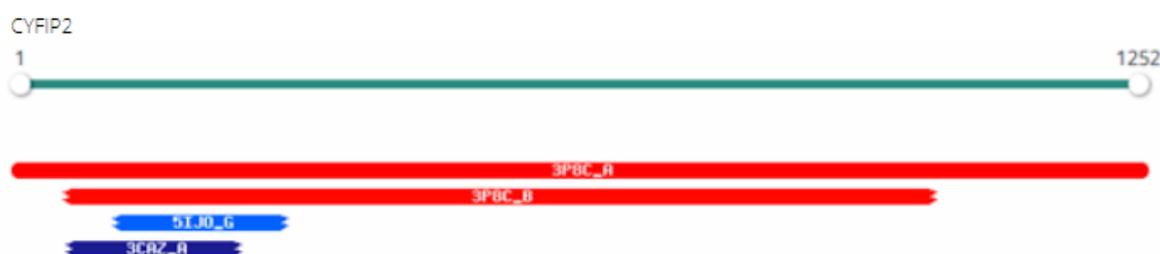


Figura 4.1. **Resultado da busca por alinhamentos para a proteína CYFIP2 no banco de dados.** Para o melhor alinhamento encontrado, com a cadeia PDB 3P8C_A, foram encontrados os seguintes resultados de pareamento: Probabilidade = 100.00, E-valor = $3,4 \cdot 10^{-240}$, "Score" = 2352,96, Colunas alinhadas = 1252, Identidade = 88%, Similaridade = 1,377.

Selecionamos então esse alinhamento para geração dos modelos utilizando o software MODELLER. Os "scores" de todos os modelos gerados encontram-se nas figuras 4.2, 4.3 e 4.4.

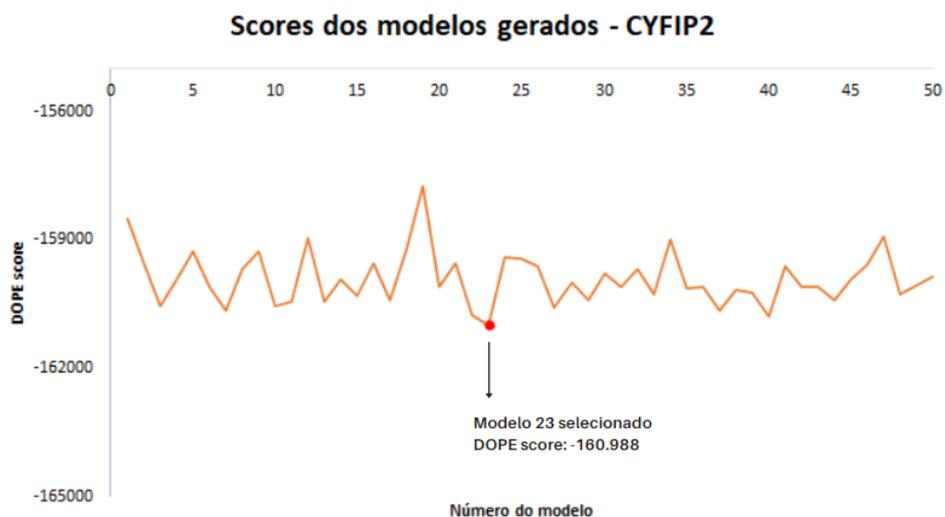


Figura 4.2. Gráfico ilustrando os “DOPE scores” calculados para cada um dos modelos gerados por homologia para CYFIP2. O modelo 23 foi selecionado por possuir o menor “score”: -160.988.

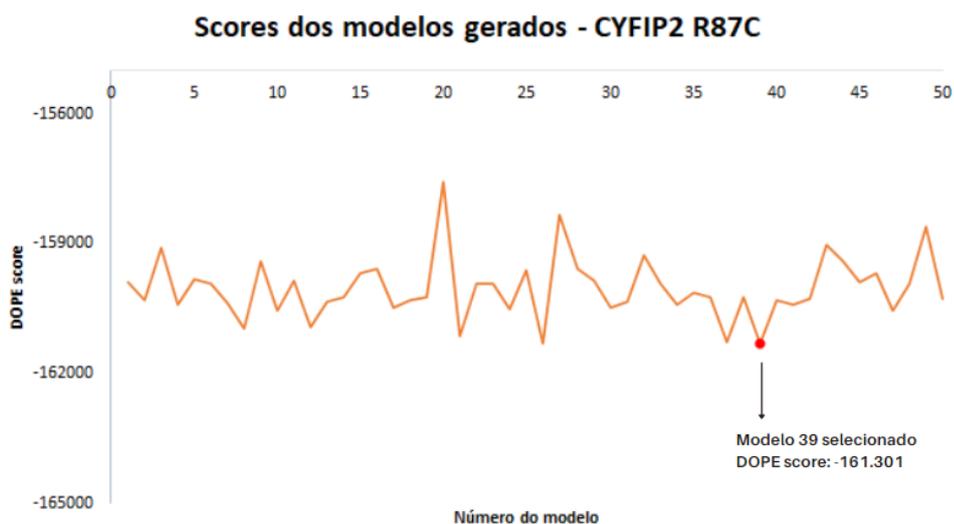


Figura 4.3. Gráfico ilustrando os “DOPE scores” calculados para cada um dos modelos gerados por homologia para CYFIP2p.Arg87Cys. O modelo 39 foi selecionado por possuir o menor “score”: -161.301.

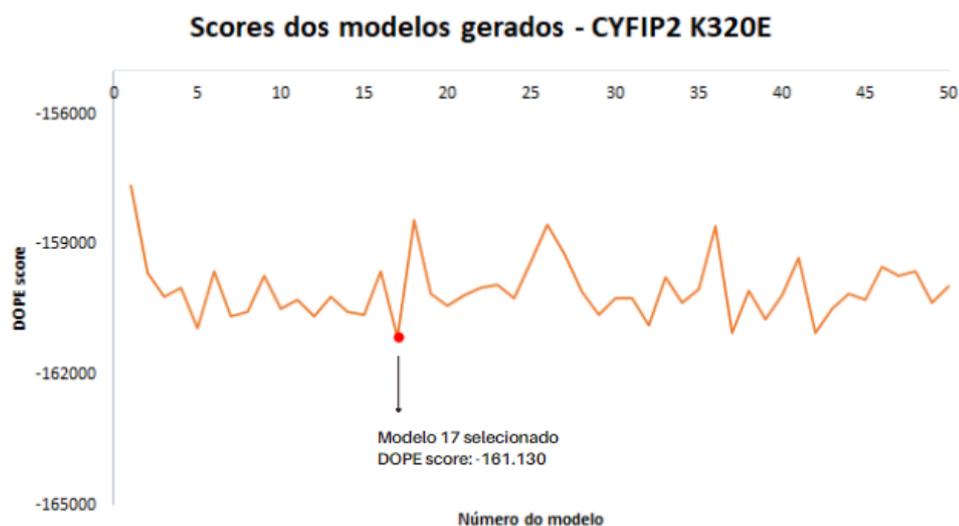


Figura 4.4. Gráfico ilustrando os “DOPE scores” calculados para cada um dos modelos gerados por homologia para CYFIP2p.Lys320Glu. O modelo 17 foi selecionado por possuir o menor “score”: -161.130.

Os modelos finais foram escolhidos com base no menor “DOPE score”, o que indica que possuíam uma melhor otimização energética do arranjo de átomos. Produzindo, ao final, estruturas com enovelamento conservado ao da proteína CYFIP1 contendo três domínios distintos, como apresentado na figura 4.5.

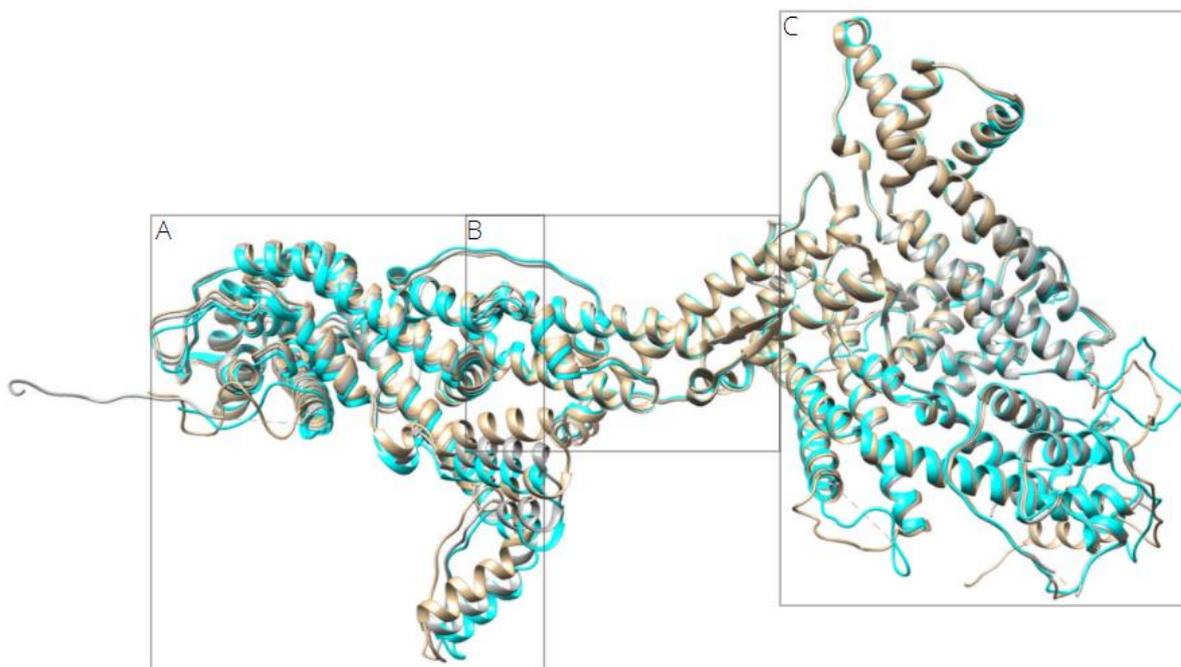


Figura 4.5. Comparação da estrutura PDB 3P8C_A (cinza) com os modelos gerados de CYFIP2 (RMSD 1,626 Å, ciano) e CYFIP2p.Arg87Cys (RMSD 1,901 Å, bege). As regiões dos três domínios são apresentadas como A, B e C.

A checagem final mostrou ainda que os modelos não apresentavam choques entre os átomos na estrutura. A análise pelo gráfico de Ramachandran determina o quanto a geometria do modelo se enquadra nos ângulos Ψ (psi) versus os ϕ (phi) possíveis espacialmente. Os dados da análise se encontram na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Geometria dos modelos de CYFIP2.

	CYFIP2	CYFIP2p.Arg87Cys
Ramachandran outliers	4	5
Ramachandran favorecidos	95,2%	96,3%
Ramachandran permitidos	99,7%	99,6%

Fonte: O autor, 2021.

Os modelos também foram analisados através do software COACH, de maneira a investigar possíveis regiões de interação com ligantes. As regiões encontradas pela análise se encontram na figura 4.6 e na tabela 4.2.

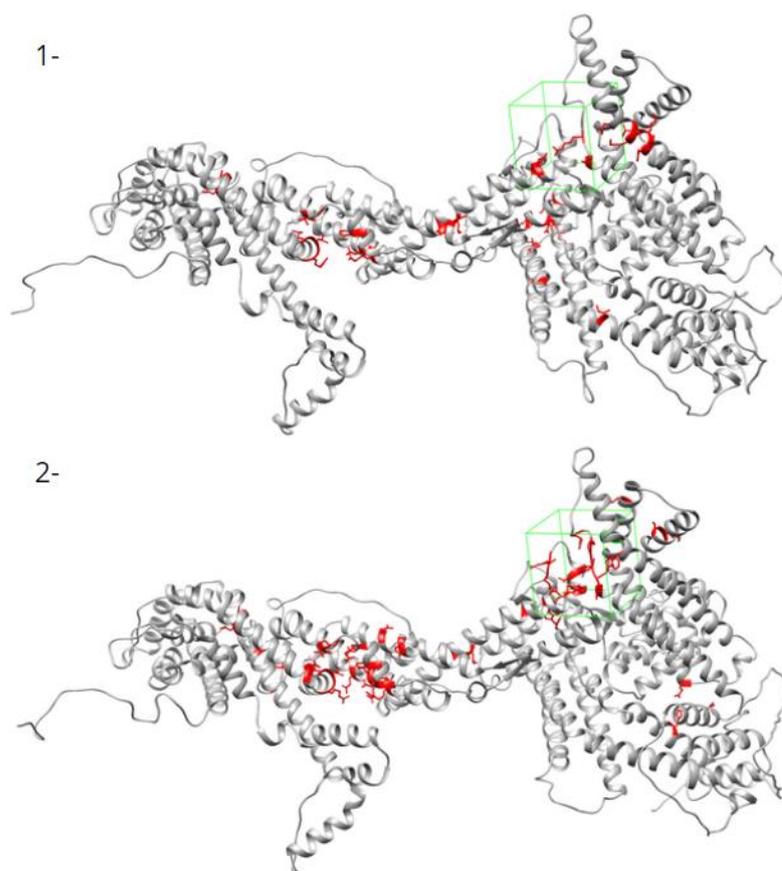


Figura 4.6. Modelos de CYFIP2 (em cinza) com resíduos preditos para interação com ligantes pelo software COACH (em vermelho). Destaque para o desenho da caixa utilizada nos experimentos de *docking* molecular (em verde). 1- CYFIP2 WT, 2- CYFIP2p.Arg87Cys.

Tabela 4.2. Posições dos resíduos apontados como sítios de ligação pelo algoritmo de predição do COACH nos modelos das proteínas.

Versão da proteína	Resíduo de ligação predito
CYFIP2	688, 689, 995, 996, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 705, 708, 460, 475, 85, 87, 118, 121, 766, 767, 342, 345, 410, 413, 414, 446, 669, 672, 805, 821, 824, 836, 839, 918, 919, 920
CYFIP2p.Arg87Cys	689, 693, 705, 708, 995, 996, 1001, 1002, 85, 86, 87, 91, 118, 184, 621, 623, 624, 627, 628, 634, 635, 636, 685, 689, 776, 780, 155, 570, 595, 860, 863, 798, 801, 802, 805, 820, 821, 824, 828, 830, 834, 836, 839, 918, 919, 920, 923, 924, 190, 211, 212

Fonte: O autor, 2021.

Nessa análise pode-se observar que a região que engloba o resíduo Arg87 da proteína, encontra-se coberta. Com esses dados, a caixa para “screening” dos ligantes pelo *docking* molecular foi desenhada.

4.2 LIGANTES IDENTIFICADOS NA 1ª VARREDURA

Uma primeira análise dos resultados de *docking* molecular, nos retornou 65 ligantes de acordo com os critérios estabelecidos na tabela 3.1. Os resultados para todos os “scores” dos 3.946 ligantes avaliados nos experimentos tanto para CYFIP2 quanto para CYFIP2p.Arg87Cys se encontram no link listado no apêndice 2. Os 65 ligantes selecionados, assim como seus códigos CID, critérios de seleção e ação farmacológica (quando existente) se encontram na tabela 4.3.

Tabela 4.3. Lista de compostos selecionados após o primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos, seu critério de seleção e grupo de uso farmacológico (quando existente).

(continua)

ID	Nome do composto	Banco de Dados de Origem	Código do composto (CID pubchem)	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo WT	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo R87C	Diferença	Critério de Seleção	Grupo do composto
1	Remdesivir	Drugbank	121304016	-6.0	-8.2	2.2	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	antiviral
2	EXPT02813	Drugbank	17754151	-5.6	-7.3	1.7	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	sem grupo
3	Mdl-29951	Drugbank	446916	-5.7	-7.1	1.4	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	neurorreceptor
4	EXPT01499	Drugbank	448471	-5.2	-6.6	1.4	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	sem grupo
5	Branerutinib	Drugbank	121293929	-6.1	-7.4	1.3	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	inibidor BTK (sistema imune)
6	Des(carbamimidoyl) zanamivir	Drugbank	445533	-5.4	-6.7	1.3	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	antiviral
7	EXPT02428	Drugbank	448249	-6.3	-7.4	1.1	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	sem grupo
8	AZD-1981	Drugbank	11292191	-6.4	-7.5	1.1	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	antagonista de receptor
9	EXPT02245	Drugbank	5288855	-5.5	-6.6	1.1	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	sem grupo
10	Porfiromycin	Drugbank	13116	-5.6	-6.6	1.0	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	tratamento de câncer
11	EXPT01096	Drugbank	461279	-5.6	-6.6	1.0	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	sem grupo
12	Macelignan	Drugbank	10404245	-7.5	-6.0	1.5	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	fitoestrógeno
13	Bevenopran	Drugbank	10452732	-7.6	-6.0	1.6	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	antagonista de receptor/ opioide
14	MBX-8025	Drugbank	11236126	-7.4	-5.6	1.8	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	PPAR- δ agonista
15	DB08322	Drugbank	11669698	-7.9	-5.9	2.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo

Tabela 4.3. Lista de compostos selecionados após o primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos, seu critério de seleção e grupo de uso farmacológico (quando existente).

(continua)

ID	Nome do composto	Banco de Dados de Origem	Código do composto (CID pubchem)	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo WT	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo R87C	Diferença	Critério de Seleção	Grupo do composto
16	DB08013	Drugbank	130188	-8.2	-6.4	1.8	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
17	DB08784	Drugbank	1432578	-7.9	-6.1	1.8	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
18	DB07355	Drugbank	14368760	-6.5	-4.8	1.7	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
19	DB08297	Drugbank	150889	-7.0	-6.0	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
20	Melperone	Drugbank	15387	-6.8	-5.7	1.1	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	antipsicótico
21	(S)-Fluoxetine	PDE3	1548968	-7.4	-6.4	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	antidepressivo
22	Arverapamil	Drugbank	15593907	-7.1	-5.8	1.3	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	droga cardiovascular
23	DB08193	Drugbank	15876	-6.7	-5.7	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
24	DB08401	Drugbank	16741209	-7.2	-5.8	1.4	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
25	Cobiprostone	Drugbank	16757521	-7.1	-5.9	1.2	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
26	Hydroxyprogesteron e caproate	Drugbank	169870	-7.4	-6.4	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	hormônio
27	DB07782	Drugbank	1722	-7.4	-6.0	1.4	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
28	Proxibarbal	Drugbank	17336	-6.7	-5.7	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	droga para enxaqueca
29	Dobesilic acid	Drugbank	17507	-6.9	-5.7	1.2	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	anti-hemorrágico
30	Bis-Benzamidine	Drugbank	17753851	-7.8	-6.4	1.4	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	inibidor de protease

Tabela 4.3. Lista de compostos selecionados após o primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos, seu critério de seleção e grupo de uso farmacológico (quando existente).

(continua)

ID	Nome do composto	Banco de Dados de Origem	Código do composto (CID pubchem)	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo WT	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo R87C	Diferença	Critério de Seleção	Grupo do composto
31	Etalocib	Drugbank	177941	-8.5	-6.4	2.1	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	tratamento de câncer
32	EXPT01529	Drugbank	188347	-7.4	-6.1	1.3	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
33	Ramelteon	PDE3	208902	-7.0	-6.0	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	tratamento de insônia
34	Idalopirdine	Drugbank	21071390	-8.3	-6.1	2.2	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	antagonista de receptor neural
35	Capromorelin	Drugbank	216208	-7.8	-6.4	1.4	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	hormônio
36	DB07269	Drugbank	23653503	-7.6	-5.7	1.9	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
37	Carvedilol	Drugbank	2585	-7.3	-6.3	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	droga cardiovascular
38	Diphenidol	Drugbank	3055	-7.8	-6.3	1.5	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	anti-náusea
39	Arformoterol	Drugbank	3083544	-7.0	-5.7	1.3	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	broncodilatador
40	EXPT00994	Drugbank	445383	-8.5	-6.4	2.1	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
41	EXPT01967	Drugbank	445569	-7.9	-6.0	1.9	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
42	EXPT00747	Drugbank	446783	-7.0	-5.8	1.2	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
43	EXPT02408	Drugbank	447049	-7.8	-6.1	1.7	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
44	EXPT00813	Drugbank	5287870	-7.7	-6.2	1.5	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
45	EXPT01301	Drugbank	65070	-7.4	-6.4	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo

Tabela 4.3. Lista de compostos selecionados após o primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos, seu critério de seleção e grupo de uso farmacológico (quando existente).

(continua)

ID	Nome do composto	Banco de Dados de Origem	Código do composto (CID pubchem)	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo WT	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo R87C	Diferença	Critério de Seleção	Grupo do composto
46	EXPT01184	Drugbank	65103	-7.6	-6.3	1.3	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	sem grupo
47	Aminoglutethimide	PDE3	9UQ	-6.9	-5.9	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	tratamento de câncer/ anticonvulsivo hipertensão/ bloqueador de canal de sódio
48	Nisoldipine	PDE3	4499	-5.4	-6.4	1.0	Resultados de <i>docking</i> interessantes	hormônio
49	Protirelin	PDE3	638678	-6.7	-8.1	1.4	Resultados de <i>docking</i> interessantes	tratamento de câncer/sistema imune
50	Pomalidomide	Drugbank	134780	-7.0	-8.2	1.2	Resultados de <i>docking</i> interessantes	opioide
51	Cyprenorphine	Drugbank	20054882	-6.9	-8.0	1.1	Resultados de <i>docking</i> interessantes	metabolismo de glicoproteínas
52	N-Acetylglucosamine	Drugbank	1738118	-4.4	-6.3	1.9	Resultados de <i>docking</i> interessantes	análogo de prostaglandina
53	Misoprostol	PDE3	5282381	-6.6	-5.5	1.1	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	hormônio e neurotransmissor
54	Epinephrine	PDE3	5816	-6.5	-5.5	1.0	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	analgésico veterinário
55	Dexmedetomidine	PDE3	5311068	-7.0	-5.9	1.1	Afinidade de ligação WT < -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys > -6.5	antibiótico
56	Minocycline	PDE3	54675783	-7.0	-8.1	1.1	Resultados de <i>docking</i> interessantes	droga cardiovascular experimental
57	Ataciguat	Drugbank	213037	-8.1	-9.2	1.1	Resultados de <i>docking</i> interessantes	sem grupo
58	Sulfamazone	Drugbank	187764	-8.2	-9.2	1.0	Resultados de <i>docking</i> interessantes	inibidor de farnesiltransferase
59	Tipifarnib	Drugbank	159324	-7.6	-8.9	1.3	Resultados de <i>docking</i> interessantes	

Tabela 4.3. Lista de compostos selecionados após o primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos, seu critério de seleção e grupo de uso farmacológico (quando existente).

								(conclusão)
ID	Nome do composto	Banco de Dados de Origem	Código do composto (CID pubchem)	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo WT	Afinidade de Ligação (Kcal/mol) – modelo R87C	Diferença	Critério de Seleção	Grupo do composto
60	Experimental	Drugbank	6323200	-7.4	-8.6	1.2	Resultados de <i>docking</i> interessantes	sem grupo
61	Alisertib	Drugbank	24771867	-7.5	-8.6	1.1	Resultados de <i>docking</i> interessantes	tratamento de câncer
62	BMS-986158	Drugbank	118196485	-7.3	-8.3	1.0	Resultados de <i>docking</i> interessantes	tratamento de câncer experimental
63	N,O-DIDANSYL-L-TYROSINE	Drugbank	446468	-7.0	-8.1	1.1	Resultados de <i>docking</i> interessantes	sem grupo
64	Torcetrapib	Drugbank	159325	-7.0	-8.0	1.0	Resultados de <i>docking</i> interessantes	tratamento de hipercolesterolemia
65	Maropitant	Drugbank	204108	-6.5	-7.7	1.2	Afinidade de ligação WT > -6.5; Afinidade de ligação Arg87Cys < -6.5	antagonista de receptor

Fonte: O Autor, 2021.

4.3 REFINAMENTO DA VARREDURA INICIAL

De forma a realizar uma inspeção visual do “screening” inicial, utilizamos o software LigPlus para visualizar as interações entre proteínas e ligantes preditas para a melhor conformação do ligante na análise por *docking* molecular (figuras 4.7 e 4.8, apêndices 3 e 4).

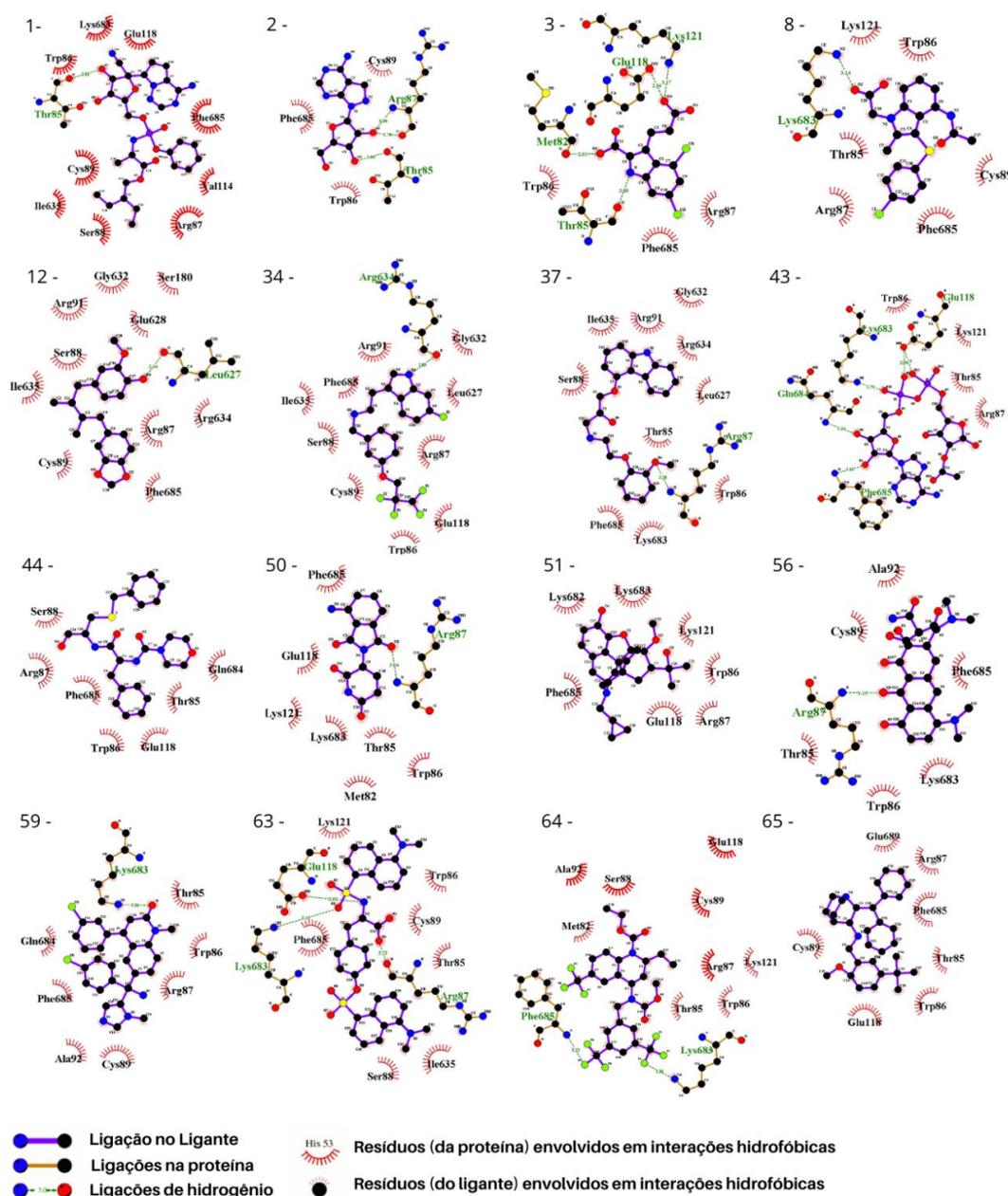


Figura 4.7. Avaliação no Liglot dos 16 ligantes selecionados na conformação de maior afinidade no *docking* com a proteína nativa. 1- Remdesivir, 2- EXPT02813, 3- Mdl-29951, 8- AZD-1981, 12- Macelignan, 34- Idalopirdine, 37- Carvedilol, 43- EXPT02408, 44- EXPT00813, 50- Pomalidomide, 51- Cyprenorphine, 56- Minocycline, 59- Tipifarnib, 63- N,O-didansyl-l-tyrosine, 64- Torcetrapib, 65- maropitant.

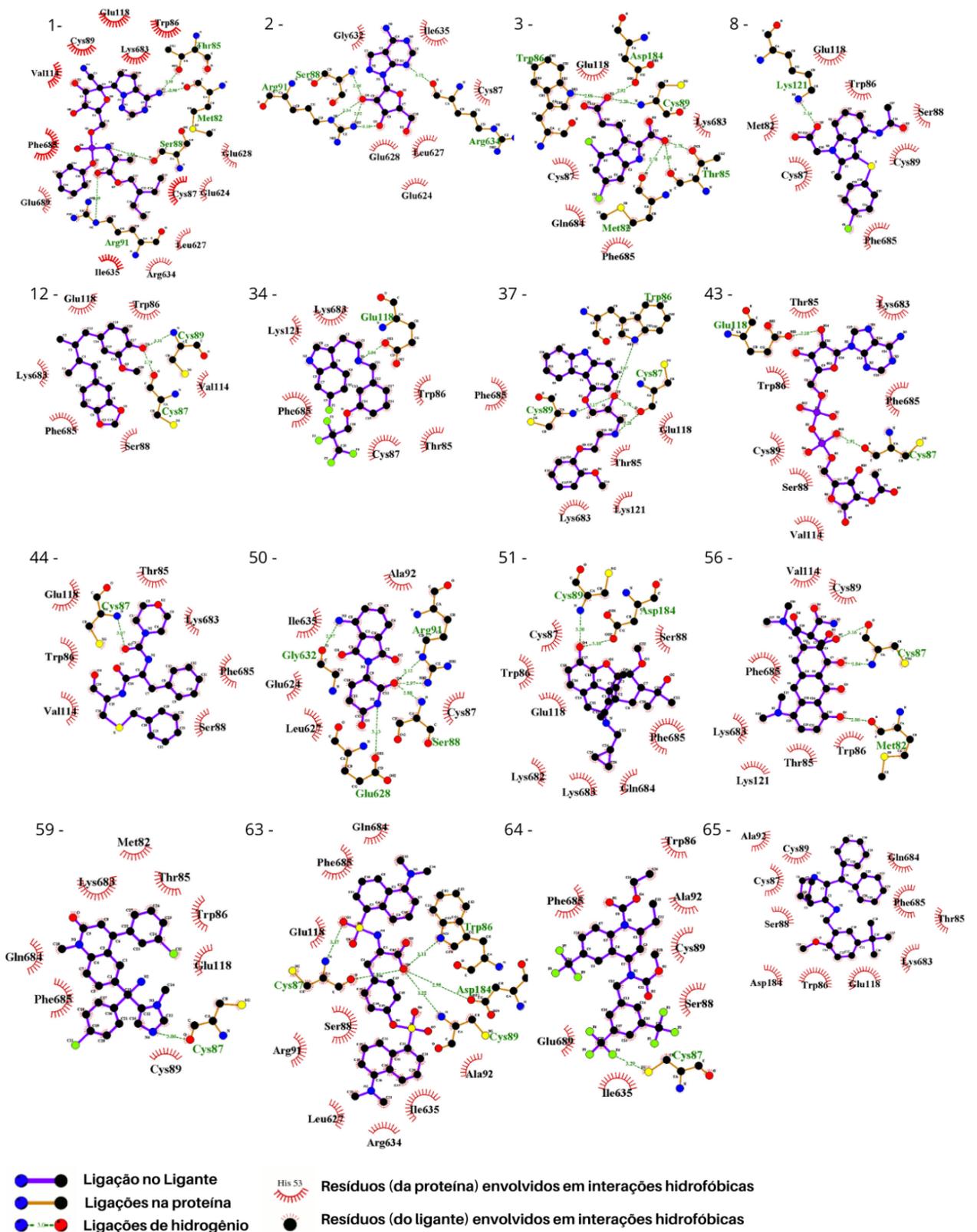


Figura 4.8. Avaliação no Liglot dos 16 ligantes seleccionados na conformação de maior afinidade no *docking* com a proteína variante. 1- Remdesivir, 2- EXPT02813, 3- Mdl-29951, 8- AZD-1981, 12- Macelignan, 34- Idalopirdine, 37- Carvedilol, 43- EXPT02408, 44- EXPT00813, 50- Pomalidomide, 51- Cyprenorphine, 56- Minocycline, 59- Tipifarnib, 63- N,O-didansyl-l-tyrosine, 64- Torcetrapib, 65- maropitant.

Como uma forma de validar a diferença de afinidade predita entre proteína nativa e variante, avaliamos o encaixe da melhor conformação na proteína nativa se inserido na proteína variante, e vice-versa (figuras 4.9 e 4.10, apêndices 5 e 6).

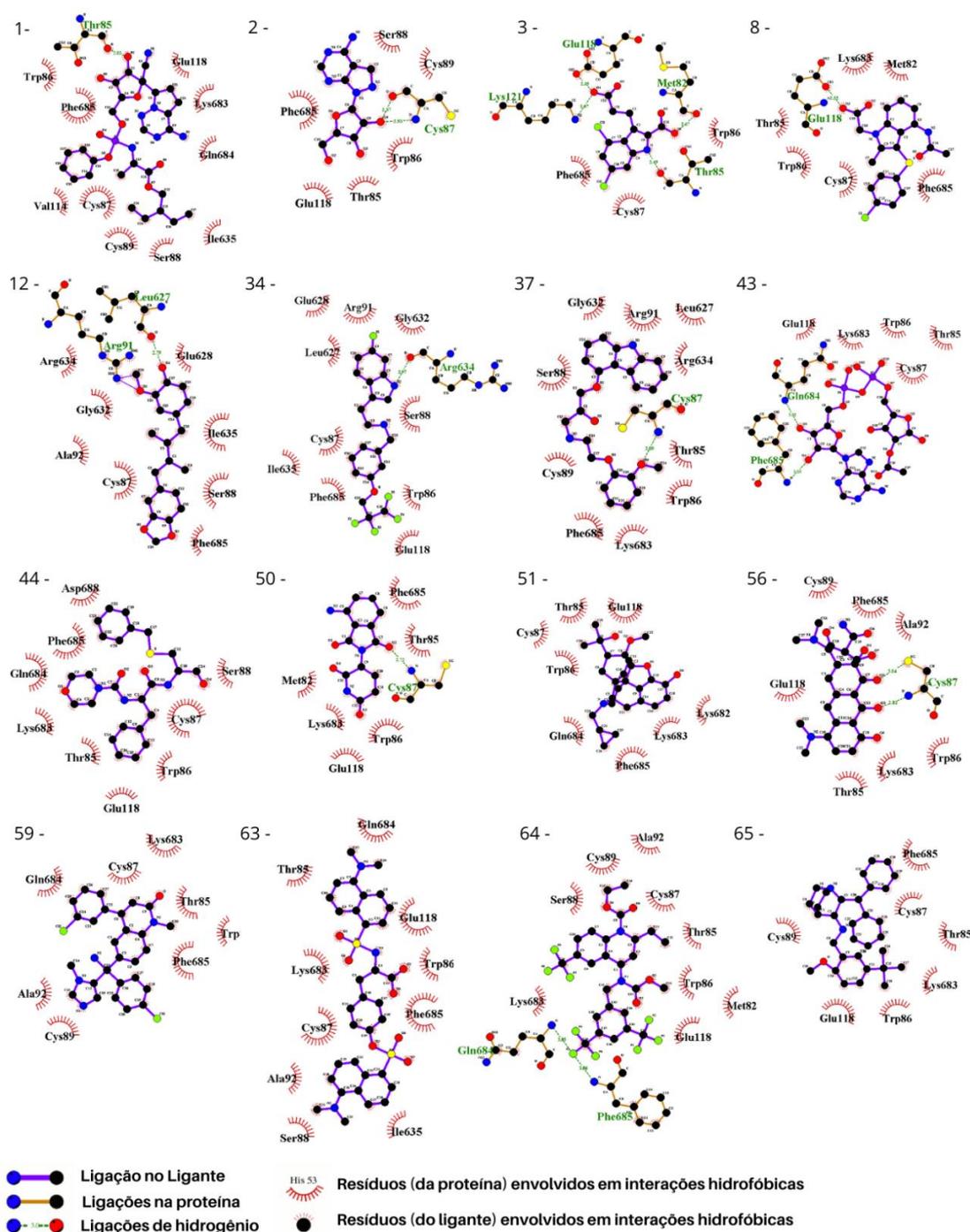


Figura 4.9. Avaliação no Liglot dos 16 ligantes seleccionados na conformação de maior afinidade no *docking* com a proteína nativa contra a proteína variante. 1- Remdesivir, 2- EXPT02813, 3- Mdl-29951, 8- AZD-1981, 12- Macelignan, 34- Idalopirdine, 37- Carvedilol, 43- EXPT02408, 44- EXPT00813, 50- Pomalidomide, 51- Cyprenorphine, 56- Minocycline, 59- Tipifarnib, 63- N,O-didansyl-L-tyrosine, 64- Torcetrapib, 65- maropitant.

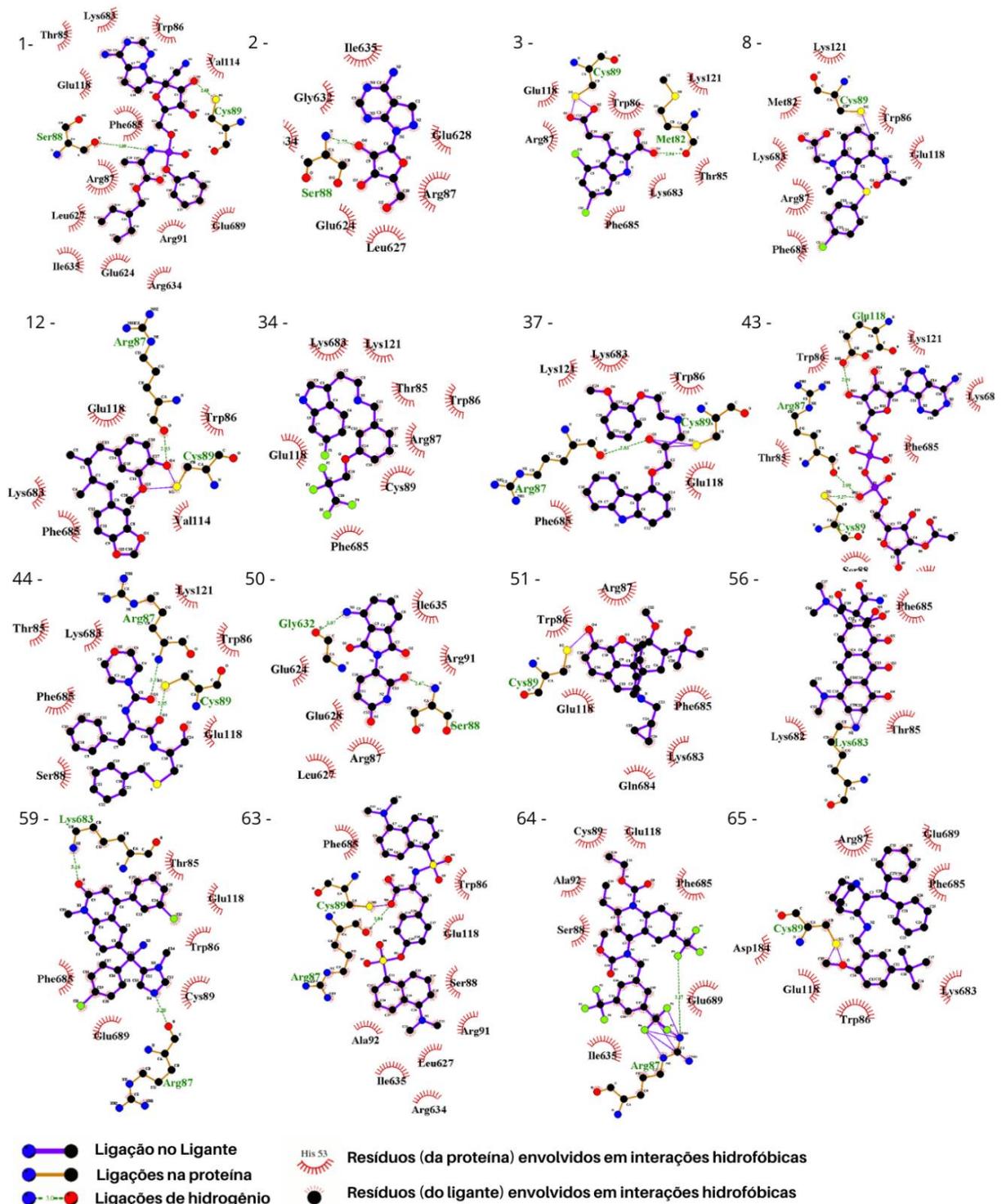


Figura 4.10. Avaliação no Liglot dos 16 ligantes selecionados na conformação de maior afinidade no *docking* com a proteína variante contra a proteína nativa. 1- Remdesivir, 2- EXPT02813, 3- Mdl-29951, 8- AZD-1981, 12- Macelignan, 34- Idalopirdine, 37- Carvedilol, 43- EXPT02408, 44- EXPT00813, 50- Pomalidomide, 51- Cyprenorphine, 56- Minocycline, 59- Tipifarnib, 63- N,O-didansyl-L-tyrosine, 64- Torcetrapib, 65- maropitant.

Foram observadas as interações das moléculas nas estruturas. Ao analisar as moléculas na melhor conformação para uma das proteínas no modelo oposto, vimos quais interações eram específicas apenas para um dos modelos. Assim, pode-se concluir para quais moléculas os scores do “screening” inicial eram mais consistentes com as interações. Após o refinamento do “screening” inicial, as moléculas da tabela 4.4 foram consideradas como os melhores potenciais inibidores seletivos para CYFIP2 variante ou CYFIP2 nativa.

Tabela 4.4. Lista de compostos selecionados após o refinamento do primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos e listadas suas interações com o modelo da proteína de maior afinidade.

(continua)

Nome do composto	Código Ligante (CID)	Afinidade WT (kcal/mol)	Afinidade R87C (kcal/mol)	Ligações de hidrogênio (proteína de maior afinidade)	Interações hidrofóbicas (proteína de maior afinidade)
Minocycline	54675783	-7.0	-8.1	Cys87 e Met82	Met82, Thr85, Trp86, Cys87, Cys89, Val114, Lys121, Lys683 e Phe685.
Remdesivir	121304016	-6	-8.2	Met82, Thr85, Ser88 e Arg91	Met82, Thr85-Cys89, Arg91, Val114, Glu118, Glu624, Leu627-Glu628, Arg634-Ile635, Lys683, Phe685 e Glu689
Pomalidomide	134780	-7	-8.2	Ser88, Arg91, Glu628 e Gly632	Cys87, Ser88, Arg91, Ala92, Glu624, Leu627, Glu628, Gly632 e Ile635

Tabela 4.4. Lista de compostos selecionados após o refinamento do primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos e listadas suas interações com o modelo da proteína de maior afinidade.

(continua)

Nome do composto	Código Ligante (CID)	Afinidade WT (kcal/mol)	Afinidade R87C (kcal/mol)	Ligações de hidrogênio (proteína de maior afinidade)	Interações hidrofóbicas (proteína de maior afinidade)
Cyprenorphine	20054882	-6.9	-8	Cys89 e Asp184	Trp86-Cys89, Glu118, Asp184 e Lys682-Phe685
AZD-1981	11292191	-6.4	-7.5	Lys121	Met82, Trp86-Cys89, Glu118, Lys121 e Phe685
EXPT02813	17754151	-5.6	-7.3	Ser88, Arg91 e Arg634	Cys87, Ser88, Arg91, Glu624, Leu627, Glu628, Gly632, Arg634 e Ile635
Mdl-29951	446916	-5.7	-7.1	Met82, Thr85, Trp86, Cys89 e Asp184	Met82, Thr85-Cys87, Cys89, Glu118 e Lys683-Phe685
Carvedilol	2585	-7.3	-6.3	Arg87	Thr85-Ser88, Arg91, Leu627, Gly632-Ile635, Lys683 e Phe685
EXPT00813	5287870	-7.7	-6.2	Thr85 e Arg87	Thr85-Arg87, Cys89 e Phe685
EXPT02408	447049	-7.8	-6.1	Glu118 e Lys683-Phe685	Thr85-Arg87, Glu118, Lys121 e Lys683-Phe685

Tabela 4.4. Lista de compostos selecionados após o refinamento do primeiro “screening”. Na tabela são apresentadas suas afinidades de ligação (da conformação de melhor afinidade das 8 testadas) para cada um dos modelos e listadas suas interações com o modelo da proteína de maior afinidade.

(conclusão)					
Nome do composto	Código Ligante (CID)	Afinidade WT (kcal/mol)	Afinidade R87C (kcal/mol)	Ligações de hidrogênio (proteína de maior afinidade)	Interações hidrofóbicas (proteína de maior afinidade)
Macelignan	10404245	-7.5	-6	Leu627	Arg87-Cys89, Arg91, Ser180, Leu627-Glu628, Gly632, Arg634-Ile635 e Phe685
Idalopirdine	21071390	-8.3	-6.1	Arg634	Trp86-Cys89, Arg91, Glu118, Leu627, Gly632, Arg634-Ile635 e Phe685
Tipifarnib	159324	-7.6	-8.9	Cys87	Met82, Thr85-Cys87, Cys89, Glu118 e Lys683-Phe685
N,O-DIDANSYL-L-TYROSINE	446468	-7	-8.1	Trp86, Cys87, Cys89 e Asp184	Trp86-Cys89, Arg91-Ala92, Glu118, Asp184, Leu627, Arg634-Ile635 e Gln684-Phe685
Torcetrapib	159325	-7	-8	Cys87	Trp86-Cys89, Ala92, Ile635, Phe685 e Glu689
Maropitant	204108	-6.5	-7.7	-	Thr85-Cys89, Ala92, Glu118, Asp184 e Lys683-Phe685

Fonte: O autor, 2021.

4.4 AVALIAÇÃO DOS MODELOS NA DINÂMICA MOLECULAR

Realizamos a avaliação da geometria dos modelos após a dinâmica pelo gráfico de Ramachandran da mesma forma que para os modelos iniciais. Os dados da análise se encontram na Tabela 4.5.

Tabela 4.5. Geometria dos modelos de CYFIP2 após a dinâmica molecular.

	CYFIP2	CYFIP2p.Arg87Cys
Ramachandran outliers	18	13
Ramachandran favorecidos	93,5%	94,4%
Ramachandran permitidos	98,5%	98,9%

Fonte: O autor, 2021.

Ao sobrepor os modelos ao final da dinâmica molecular, é possível notar uma mudança significativa na região da alça em torno do resíduo Arg87/Cys87. A alça na proteína variante parece muito mais solta e afastada do restante da estrutura da proteína quando comparado com a versão nativa, como mostra a figura 4.11(A). Por este motivo, buscamos as interações de aminoácidos que são perdidas quando o resíduo Arg87 é modificado para Cys87 e que poderiam contribuir para o afastamento dessa alça. Nessa análise foi possível verificar que o resíduo Glu624 forma ligações de hidrogênio com Arg87, importantes para a estabilização da alça na proteína nativa. Observamos então todas as interações que estes resíduos (Arg87 e Glu624) fazem nos nossos modelos após a dinâmica molecular, tanto na proteína nativa quanto na variante. Também comparamos com os seus resíduos respectivos na estrutura cristalográfica da proteína CYFIP1 dentro do complexo WRC (PDB 3P8C), figura 4.11 (B).

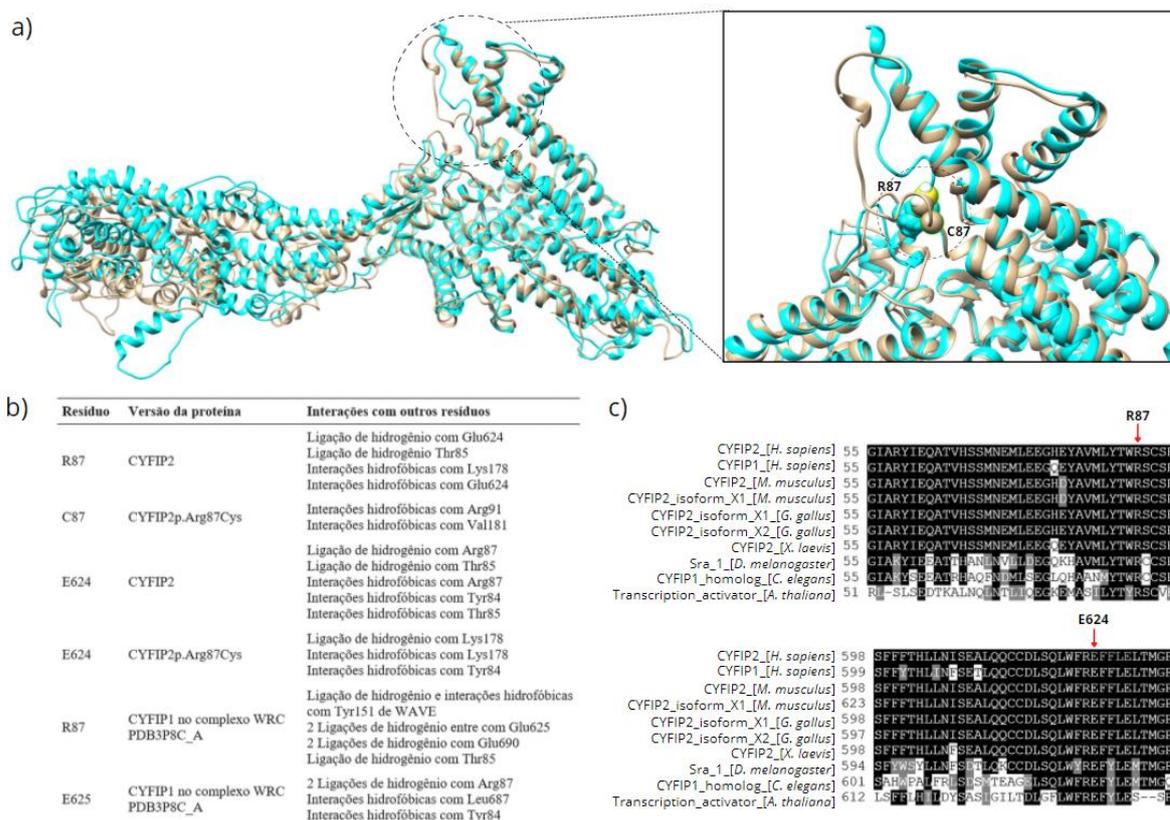


Figura 4.11. **A variante Arg87Cys parece afetar a estrutura do loop em que se encontra na proteína CYFIP2.** A) Modelos de CYFIP2 estabilizados por dinâmica molecular. Modelo da proteína nativa (ciano) e da proteína variante (bege). Foco para a alça da qual o resíduo R87/C87 (esferas) faz parte. B) Tabela destacando as interações de R87 e E624 com outros resíduos de aminoácidos, nos modelos e seus equivalentes na estrutura cristalográfica de CYFIP1 (PDB 3P8C). Note como o resíduo C87 em CYFIP2p.Arg87Cys faz menos interações que seus equivalentes. C) Alinhamento entre a sequência da proteína CYFIP2 humana e seus homólogos em diferentes organismos mostrando a conservação dos resíduos 87 e 624.

Na proteína variante, várias ligações de hidrogênio que o resíduo 87 realiza (com os resíduos Glu624 e Thr85), quando comparado a nativa, são perdidas. Isso parece acontecer porque a cadeia lateral do aminoácido cisteína é muito mais curta e permite menos ligações de hidrogênio que o de arginina, como mostra a figura 4.12. Analisamos então com mais cuidado as interações que Glu624 realiza com outros resíduos, por se tratar de um resíduo que já apresentava interações com Arg87 no modelo de CYFIP1 e que tem essa interação afetada pela variante. Além disso, outras modificações de interação desse resíduo poderiam afetar a estabilidade da alça do resíduo 87. Com essa análise verifica-se que a mutação desloca a interação do resíduo Glu624 com Arg87 para o resíduo Lys178. Além disso, a interação que Glu624

faz com Thr85 também é perdida. A diminuição no número de interações indica a desestabilização de toda essa região e o aumento de sua flexibilidade.

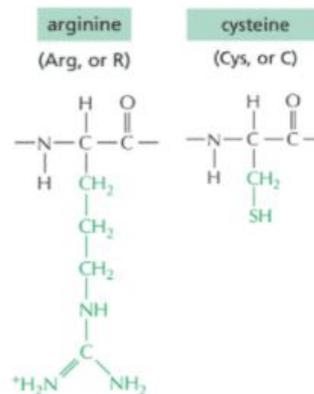


Figura 4.12. **Comparação das cadeias laterais dos aminoácidos Arginina e Cisteína.**
Fonte: ALBERTS et al, 2015.

Os resíduos Arg87 e Glu624 de CYFIP2 são conservados em seus homólogos em diversos organismos, como mostra a figura 4.11(C). Este é mais um indício da importância da interação destes dois resíduos na manutenção e estabilidade da estrutura desta proteína.

5. DISCUSSÃO

A proteína CYFIP2 foi identificada pela primeira vez em 1999 e nomeada como PIR121 devido à indução do seu gene por p53 (SALLER *et al*, 1999). Foi renomeada em 2001 para CYFIP2 pela identificação de sua interação com a proteína FMRP (SCHENCK *et al*, 2001), sendo relacionada a doenças do neurodesenvolvimento apenas em 2018 (NAKASHIMA *et al*, 2018).

Embora outros estudos realizem análises estruturais pontuais para tentar entender melhor o impacto das variantes de CYFIP2 tanto na estrutura da proteína quanto no complexo WRC, estes se utilizaram da comparação com CYFIP1 e não da criação de modelos específicos de CYFIP2 (NAKASHIMA *et al*, 2018). Neste trabalho realizamos a criação de modelos tanto de CYFIP2 quanto CYFIP2p.Arg87Cys com o objetivo de realizar uma análise estrutural mais aprofundada. Além disso, estes modelos passaram por simulações de dinâmica molecular, o que nos confere dados de simulação sobre a movimentação da proteína em solução e da estabilidade de sua estrutura terciária. Observando estes modelos após as simulações de dinâmica molecular notamos uma movimentação da alça onde fica o resíduo 87 da proteína. Na estrutura da proteína variante essa alça encontra-se mais afastada do restante da proteína quando comparado com o modelo da proteína nativa e com a estrutura cristalográfica de CYFIP1 (PDB 3P8C). Na estrutura cristalográfica do complexo WRC com CYFIP1, esta mesma alça está em uma zona de interação com a proteína WAVE. O deslocamento da alça em CYFIP2p.Arg87Cys encontrado nas simulações de dinâmica molecular mostra uma flexibilidade dessa região o que poderia prejudicar o encaixe e a interação entre WAVE e CYFIP2.

Nos primeiros estudos para entender a modulação do complexo WRC, especulava-se que o complexo se desagregasse ao interagir com Rac1-GTP e que isso permitisse a interação de WAVE com o complexo Arp2/3 (EDEN *et al*, 2002). O modelo revisado e mais atual da ativação do WRC aponta, baseado em uma série de evidências, que esse complexo não se desagrega, apenas sofre um remodelamento que permite a interação do domínio VCA de WAVE com o Arp2/3 (LEBENSÖHN *et al*, 2009; SCHAKS *et al*, 2018). Portanto, a alteração estrutural devido à variante Arg87Cys que observamos nos nossos modelos poderia sim impactar nessa remodelação do complexo e sua regulação. Inclusive, através de análises de co-imunoprecipitação, já foi apontado que as variantes Arg87Cys, Arg87Pro e Arg87Leu não tem a interação com WAVE1 diminuída, mas a interação específica com o domínio

VCA de WAVE1 é prejudicada (NAKASHIMA *et al*, 2018). Como já notado também por Nakashima e colaboradores (2018) e Zweier e colaboradores (2019), o resíduo Arg87 forma ligações de hidrogênio com Glu624, nossos modelos indicam que essa importante interação é perdida na variante CYFIP2p.Arg87Cys. Os resíduos de Arginina possuem sua cadeia lateral longa e carregada positivamente no pH fisiológico, inclusive em ambientes hidrofóbicos como no interior das proteínas (HARMS *et al*, 2011). Estas características fazem com que seja um resíduo propenso a interações com resíduos polares, principalmente na interação do seu grupamento guanidina da cadeia lateral com os grupamentos carboxila carregados negativamente da cadeia lateral de resíduos como o Glutamato e o Aspartato. Neste trabalho, apontamos essa perda de interação, com o deslocamento da interação de Glu624 com Arg87 para Lys178, como possível causa da instabilidade estrutural da alça (figura 4.11 A e B). Os resíduos Arg87 e Glu624 são conservados em proteínas homólogas de uma série de organismos (figura 4.11 C), apontando mais uma vez a importância da interação entre eles na estrutura de CYFIP2.

Apesar dos modelos serem excelentes ferramentas de estudo, a importância de CYFIP2 em diversas patologias aumenta a necessidade da resolução de sua estrutura. Isso nos ajudaria na compreensão do seu papel nos pacientes com as suas variantes. Por isso, temos a perspectiva de realizar a determinação estrutural de CYFIP2 e CYFIP2p.Arg87Cys por cristalografia de raios-X. Essa determinação nos fornecerá dados atômicos sobre os efeitos da modificação do aminoácido na proteína e poderá corroborar as diferenças estruturais apontadas através da dinâmica molecular nos modelos. No entanto, é importante ressaltar que a cristalografia de raios-X nos dará principalmente a informação do comportamento estático da proteína, sendo a combinação dos dados dinâmica molecular imprescindível para entender o comportamento estrutural da proteína em solução.

O reposicionamento de fármacos é uma estratégia utilizada no intuito de aproveitar moléculas já estudadas com um objetivo farmacológico, muitas já utilizadas na clínica, para um novo uso (ASHBURN & THOR, 2004). Quando há um alvo claro, o *docking* molecular pode ser empregado então para uma primeira varredura dessas moléculas. Uma abordagem que diminui os custos associados à prospecção de novos compostos e acelera o desenvolvimento de novas terapias (BRECKENRIDGE & JACOB, 2018; PUSHPAKOM *et al*, 2018). Identificamos em uma primeira varredura (estratégia para seleção na tabela 3.1) 65 compostos que tem uma afinidade predita de ligação alta (menor que -6.5 kcal/mol) e específica para a proteína nativa e para a

proteína variante. Este se encontram listados na tabela 4.3. Destes, 16 compostos foram selecionados após uma inspeção visual das interações preditas, sendo 11 com uma afinidade predita alta (menor que -6.5 kcal/mol) para a proteína variante. Dessas moléculas, quatro (minocycline, pomalidomide, remdesivir, maropitant) já são utilizadas na clínica em outros tratamentos. Considerando que a variante afeta diretamente as células do sistema nervoso central dos pacientes, é importante também avaliar se existem informações sobre a passagem desses compostos pela barreira hematoencefálica e se há evidências que seu uso como tratamento contínuo seria seguro.

Minocycline é um antibiótico análogo das tetraciclinas (REDIN, 1966), que também já foi identificado como tendo ação no sistema nervoso, é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica (CHENG *et al*, 2015) e tem estudos clínicos em crianças com sua aplicação para o tratamento de autismo e portadores da síndrome do X-frágil (“Clinical trials”: NCT01053156, NCT02680379, NCT04031755). Aprovado como medicamento em 1971 pelo FDA, normalmente é utilizado com administração oral em cápsulas ou cutânea. Em casos específicos a aplicação é feita de maneira intravenosa. Seu uso prolongado é bem tolerado e apresenta poucos riscos (GOULDEN, GLASS & CUNLIFFE, 1996). Em ensaios de citotoxicidade *in vitro* utilizando linhagem celular de leucemia mieloide (HL-60) apresentou IC₅₀ estimado de 9,9 µg/ml (SONG *et al*, 2014).

Pomalidomide é um imunomodulador e agente antineoplásico aprovado para tratamento de alguns tipos de mieloma (TERPOS *et al*, 2013; GERTZ, 2013). Existem evidências da sua capacidade de passagem pela barreira hematoencefálica (LI *et al*, 2018). Análogo da talidomida, normalmente é utilizado com administração oral em cápsulas em adultos (SCOTT, 2014). Apesar de sua hematotoxicidade em pacientes, seu uso prolongado já se mostrou bem tolerável em alguns casos clínicos (DANHOF *et al*, 2015). O uso pediátrico já foi testado em ensaios clínico de fase I para o tratamento de tumores do sistema nervoso central com boa tolerância pelos pacientes (FANGUSARO *et al*, 2020).

Remdesivir é um antiviral (WARREN *et al*, 2016) que foi aprovado recentemente pelo FDA para tratamento de pacientes com COVID-19 (FDA, 2020). Normalmente é utilizado com administração intravenosa ou por inalação (SUN, 2020). Em testes em primatas apresentou passagem pela barreira hematoencefálica menor que 5% (WARREN *et al*, 2016).

Maropitant é um medicamento de uso oral veterinário, para enjoo em cães e gatos (BENCHAOUI *et al*, 2007) sem evidências de sua aplicação em humanos.

Duas moléculas também estão em fase de testes clínicos: tipifarnib para o tratamento de leucemia (“Clinical trials”: NCT02807272, NCT02210858) e AZD-1981 para tratamento de asma (“Clinical trials”: NCT01197794). Análises de simulação serão ainda utilizadas para verificar a capacidade de 4 destes compostos (minocycline, tipifarnib, pomalidomide e AZD-1981) estabilizarem a alça do resíduo 87 e assim reverter as alterações estruturais causadas pela variante. Estes foram selecionados com base em seus “scores”, capacidade de interação com os resíduos da alça e disponibilidade para compra no mercado.

Este trabalho traz então novas evidências sobre as alterações estruturais da proteína CYFIP2 decorrentes da modificação do resíduo Arg87Cys, presente também em pacientes portadores de encefalopatia epiléptica precoce. Essas evidências parecem estar de acordo com a hipótese do enfraquecimento da ligação com WAVE já levantada na literatura e com resultados experimentais da interação de CYFIP2p.Arg87Cys e WAVE1. Vale ressaltar que os efeitos desses compostos, selecionados a partir de sua interação com a proteína CYFIP2 e sua variante Arg87Cys (lembrando que os pacientes são heterozigotos), precisam ser ainda estudados de maneira a concluir se serão benéficos. No entanto, a identificação de ligantes à proteína mutada auxilia na busca de alvos para tratamento e será utilizada para nortear experimentos *in vitro* e em linhagens celulares de modelos da patologia no futuro.

6. CONCLUSÕES

Neste trabalho criamos modelos computacionais para o estudo de CYFIP2, através de técnica de modelagem por homologia com CYFIP1, que foram posteriormente estabilizados por meio de dinâmica molecular.

Esses modelos permitiram a realização de experimentos de *docking* molecular, utilizando dois bancos de fármacos: o PDE3 – 174 ligantes (SIVAPALARAJAH *et al*, 2018) e o Drugbank – 3772 ligantes (WISHART *et al*, 2018). A partir desses ensaios *in silico*, foram identificados 11 compostos com potencial para inibição seletiva para a proteína variante, ou seja, com uma afinidade predita baixa (maior que -6.5 kcal/mol) para CYFIP2 e alta (menor que -6.5 kcal/mol) para CYFIP2p.Arg87Cys. Dentre eles, 4 compostos já são aprovados para o tratamento de outras condições (um antibiótico, um antiviral, um imunomodulador para o tratamento de câncer e um bloqueador de receptor para o tratamento de enjoo de uso veterinário). No futuro, esses compostos serão testados *in vitro* e em modelos celulares da patologia (com a mutação Arg87Cys) que estão sendo desenvolvidos em colaboração com o laboratório de células-tronco do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz/PR.

Os modelos também contribuíram para a confirmação de uma desestabilização da estrutura terciária de CYFIP2 na alça da qual o resíduo 87 faz parte, que teria impacto na interação com o domínio VCA da proteína WAVE. Esse processo seria um efeito da perda de ligações de hidrogênio entre os resíduos Arg87 e Glu624 com a substituição do aminoácido por um de cadeia lateral mais curta, como a cisteína. Outra evidência da importância desses resíduos está na sua conservação em diversos organismos.

Por fim, os resultados apresentados neste trabalho permitem estender a compreensão do impacto das variantes do resíduo Arg87 na estrutura de CYFIP2 e seu possível impacto na estrutura e regulação do complexo WRC. A identificação de compostos que se ligam à CYFIP2p.Arg87Cys pode servir como opção para estabilizar essa estrutura e na tentativa de reverter seus efeitos biológicos. Essas moléculas poderão ser utilizadas como alvos no desenvolvimento de fármacos para o tratamento de síndromes relacionadas à essa modificação estrutural.

REFERÊNCIAS

- ABEKHOUKH, S.; BARDONI, B. CYFIP family proteins between autism and intellectual disability: Links with fragile X syndrome. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 8, n. MAR, p. 1–9, 2014.
- ABRAHAM, M. J. *et al.* GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, set. 2015.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; ROBERTS, K.; MORGAN, D.; RAFF, M.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. Nova Iorque, Garland Science. 6th edition, 2015.
- ALVAREZ, V. A.; SABATINI, B. L. Anatomical and Physiological Plasticity of Dendritic Spines. **Annual Review of Neuroscience**, v. 30, n. 1, p. 79–97, 2007.
- ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, ago. 2004.
- BENCHAOUI, H. A. *et al.* Efficacy of maropitant for preventing vomiting associated with motion sickness in dogs. **Veterinary Record**, v. 161, n. 13, p. 444–447, set. 2007.
- BERENDSEN, H. J. C. *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. **The Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 15 out. 1984.
- BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D.; VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Computer Physics Communications**, v. 91, n. 1–3, p. 43–56, set. 1995.
- BERMAN, H. M. *et al.* The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 235–242, 2000.
- BODDUM, K. *et al.* Kv3.1/Kv3.2 channel positive modulators enable faster activating kinetics and increase firing frequency in fast-spiking GABAergic interneurons. **Neuropharmacology**, v. 118, p. 102–112, 2017.
- BOSCH, M. *et al.* Structural and molecular remodeling of dendritic spine substructures during long-term potentiation. **Neuron**, v. 82, n. 2, p. 444–459, 2014.
- BRECKENRIDGE, A.; JACOB, R. Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 1–2, 8 jan. 2019.
- BREUZA, L. *et al.* The UniProtKB guide to the human proteome. **Database**, v. 2016, p. 1–10, 2016.
- BROWN, V., JIN, P., CEMAN, S., DARNELL, J. C., O'DONNELL, W. T., TENENBAUM, S. A., *et al.* Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. **Cell**, 2001.

- BUSSI, G.; DONADIO, D.; PARRINELLO, M. Canonical sampling through velocity rescaling. **The Journal of Chemical Physics**, v. 126, n. 1, p. 014101, 7 jan. 2007.
- CHEN, Z. *et al.* Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. **Nature**, v. 468, n. 7323, p. 533–538, 2010.
- CHEN, B. *et al.* The WAVE regulatory complex links diverse receptors to the actin cytoskeleton. **Cell**, v. 156, n. 0, p. 195–207, 2014.
- CHENG, S. *et al.* Minocycline reduces neuroinflammation but does not ameliorate neuron loss in a mouse model of neurodegeneration. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10535, 22 set. 2015.
- CHUNG, L. *et al.* Parental origin impairment of synaptic functions and behaviors in cytoplasmic FMRP interacting protein 1 (Cyfip1) deficient mice. **Brain Research**, v. 1629, p. 340–350, dez. 2015.
- CIONI, J. M. *et al.* Axon-Axon Interactions Regulate Topographic Optic Tract Sorting via CYFIP2-Dependent WAVE Complex Function. **Neuron**, v. 97, n. 5, p. 1078-1093.e6, 2018.
- COLES, C. H.; BRADKE, F. Coordinating Neuronal Actin-Microtubule Dynamics. **Current Biology**, v. 25, n. 15, p. R677–R691, 2015.
- COOPER, J. A. *et al.* Kinetic Evidence for a Monomer Activation Step in Actin Polymerization. **Biochemistry**, v. 22, n. 9, p. 2193–2202, 1983.
- DANHOF, S. *et al.* Long-Term Disease Control by Pomalidomide-/Dexamethasone-Based Therapy in a Patient with Advanced Multiple Myeloma: A Case Report and Review of the Literature. **Case Reports in Oncology**, v. 8, n. 1, p. 189–195, 17 abr. 2015.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 15 jun. 1993.
- DARNELL, J. C. *et al.* FMRP Stalls Ribosomal Translocation on mRNAs Linked to Synaptic Function and Autism. **Cell**, v. 146, p. 247–261, 2011.
- DE RUBEIS, S. *et al.* CYFIP1 Coordinates mRNA Translation and Cytoskeleton Remodeling to Ensure Proper Dendritic Spine Formation. **Neuron** v. 79, p. 1169–1182, 2013
- DERIVERY, E. *et al.* The Wave complex is intrinsically inactive. **Cell Motil Cytoskeleton** v. 66, p. 777–790, 2009.
- DI MARINO, D. *et al.* MD and Docking Studies Reveal That the Functional Switch of CYFIP1 is Mediated by a Butterfly-like Motion. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 11, n. 7, p. 3401–3410, 2015.
- EDEN, S. *et al.* Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. **Nature**, v. 418, n. 6899, p. 790–793, 2002.

ENGEL, J. A proposed diagnostic scheme for people with epileptic seizures and with epilepsy: Report of the ILAE task force on classification and terminology. **Epilepsia**, v. 42, n. 6, p. 796–803, 2001.

FAGERBERG, L. *et al.* Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397–406, 2014.

FANGUSARO, J. *et al.* Phase 1 study of pomalidomide in children with recurrent, refractory, and progressive central nervous system tumors: A Pediatric Brain Tumor Consortium trial. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 68, n. 2, 7 fev. 2021.

FDA. Emergency Use Authorization for Baricitinib in Combination with Remdesivir for COVID-19, 2020. Disponível em <https://www.fda.gov/media/143822/download>, acesso em 12 de fevereiro de 2021.

FREDERIKSEN, K. *et al.* A small molecule activator of Na_v1.1 channels increases fast-spiking interneuron excitability and GABAergic transmission *in vitro* and has anti-convulsive effects *in vivo*. **Eur J Neuroscience**, 2017.

FRIEDEN, C. Polymerization of actin: Mechanism of the Mg²⁺-induced process at pH 8 and 20°C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 80, n. 21 I, p. 6513–6517, 1983.

GERTZ, M. A. Pomalidomide and myeloma meningitis. **Leukemia & Lymphoma**, v. 54, n. 4, p. 681–682, 2 abr. 2013.

GHOSH, A. *et al.* Alzheimer's disease-related dysregulation of mRNA translation causes key pathological features with ageing. **Transl Psychiatry**, 10:192, 2020.

GORDON, J. C. *et al.* H⁺⁺: a server for estimating pK_as and adding missing hydrogens to macromolecules. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. Web Server, p. W368–W371, 1 jul. 2005.

GOULDEN, V.; GLASS, D.; CUNLIFFE, W. J. Safety of long-term high-dose minocycline in the treatment of acne. **British Journal of Dermatology**, v. 134, n. 4, p. 693–695, abr. 1996.

GULLEDGE, A. T.; KAMPA, B. M.; STUART, G. J. Synaptic integration in dendritic trees. **Journal of Neurobiology**, v. 64, n. 1, p. 75–90, jul. 2005.

HAN, K. *et al.* Fragile X-like behaviors and abnormal cortical dendritic spines in Cytoplasmic FMR1-interacting protein 2-mutant mice. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 7, p. 1813–1823, 2014. JACKSON, R. S. *et al.* CYFIP2, a direct p53 target, is leptomycin-B sensitive. **Cell Cycle**, v. 6, n. 1, p. 95–103, 2007.

HARMS, M. J. *et al.* Arginine residues at internal positions in a protein are always charged. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 47, p. 18954–18959, 2011.

HESS, B. *et al.* LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, set. 1997.

- HESS, B. P-LINCS: A Parallel Linear Constraint Solver for Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 1, p. 116–122, jan. 2008.
- HESS, B. *et al.* GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 2 mar. 2008.
- HILDEBRAND, M. S. *et al.* Recent advances in the molecular genetics of epilepsy. **Journal of Medical Genetics**, v. 50, n. 5, p. 271–279, 2013.
- HINSEN, K. The molecular modeling toolkit: A new approach to molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 79–85, 30 jan. 2000.
- HUANG, J.; MACKERELL, A. D. CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. **Journal of Computational Chemistry**, v. 34, n. 25, p. 2135–2145, 30 set. 2013. J
- JACKSON, R. S. *et al.* CYFIP2, a direct p53 target, is leptomycin-B sensitive. **Cell Cycle**, v. 6, n. 1, p. 95–103, 2007.
- JIA J. L. *et al.* Latitudinal differences on the global epidemiology of infantile spasms: systematic review and meta-analysis. **Orphanet J Rare Dis**, v. 13(1), p. 216, 2018.
- KHAN, S.; AL BARADIE, R. Epileptic Encephalopathies: An Overview. **Epilepsy Research and Treatment**, v. 2012, p. 1–8, 2012. KONIETZNY, A.; BÄR, J.;
- KJELDSEN, M. J. *et al.* Epileptic seizures and syndromes in twins: The importance of genetic factors. **Epilepsy Research**, v. 55, n. 1–2, p. 137–146, 2003.
- KO, L. J.; PRIVES, C. p53: Puzzle and paradigm. **Genes and Development**, v. 10, n. 9, p. 1054–1072, 1996.
- KOBAYASHI, K. *et al.* p140Sra-1 (specifically Rac1-associated protein) is a novel specific target for Rac1 small GTPase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 1, p. 291–295, 1998.
- KONIETZNY, A.; BÄR, J.; MIKHAYLOVA, M. Dendritic actin cytoskeleton: Structure, functions, and regulations. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–10, 2017.
- LASKOWSKI, R. A.; SWINDELLS, M. B. LigPlot+: Multiple Ligand–Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 10, p. 2778–2786, 24 out. 2011.
- LEE, Y. *et al.* Phosphorylation of CYFIP2, a component of the WAVE-regulatory complex, regulates dendritic spine density and neurite outgrowth in cultured hippocampal neurons potentially by affecting the complex assembly. **NeuroReport**, v. 28, n. 12, p. 749–754, 2017.
- LEE, Y. *et al.* Epilepsy- and intellectual disability-associated CYFIP2 interacts with both actin regulators and RNA-binding proteins in the neonatal mouse forebrain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 529, n. 1, p. 1–6, 2020.

- LEVANON, E. Y. Evolutionarily conserved human targets of adenosine to inosine RNA editing. **Nucleic Acids Res** v. 33, p. 1162–1168, 2005.
- LEVINE, A. J. p53, the Cellular Gatekeeper for Growth and Division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323–331, fev. 1997.
- LI, Z. *et al.* Pomalidomide Shows Significant Therapeutic Activity against CNS Lymphoma with a Major Impact on the Tumor Microenvironment in Murine Models. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71754, 5 ago. 2013.
- LINDAHL, E.; HESS, B.; VAN DER SPOEL, D. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **Journal of Molecular Modeling**, v. 7, n. 8, p. 306–317, ago. 2001.
- LUX, A. L. *et al.* Latest American and European updates on infantile spasms. **Curr Neurol Neurosci Rep** v. 13, p. 334–341, 2013.
- MAGALHÃES, P. H. M. *et al.* New avenues in molecular genetics for the diagnosis and application of therapeutics to the epilepsies. **Epilepsy & Behavior**, n. xxxx, p. 106428, 2019.
- MAGEE, J. C. Dendritic integration of excitatory synaptic input. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 1, n. 3, p. 181–190, dez. 2000.
- MARKIDIS, S.; LAURE, E. (EDS.). **Solving Software Challenges for Exascale**. Cham: Springer International Publishing, 2015. v. 8759
- PRONK, S. *et al.* GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 1 abr. 2013.
- MAYNE, M. *et al.* CYFIP2 is highly abundant in CD4+ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. **European Journal of Immunology**, v. 34, n. 4, p. 1217–1227, 2004.
- MIKHAYLOVA, M. Dendritic actin cytoskeleton: Structure, functions, and regulations. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 11, n. May, p. 1–10, 2017.
- MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, out. 1992.
- MØLLER, R. S. *et al.* From next-generation sequencing to targeted treatment of non-acquired epilepsies. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 19, n. 3, p. 217–228, 2019.
- MORRIS, G. M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009.
- MULLINS, R. D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: Nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. **Proc Natl Acad Sci** v. 95, p. 6181–6186, 1998.

- MULLINS, R. D. How WASP-family proteins and the Arp2/3 complex convert intracellular signals into cytoskeletal structures. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 12, n. 1, p. 91–96, 2000.
- NAKASHIMA, M. *et al.* De novo hotspot variants in CYFIP2 cause early-onset epileptic encephalopathy. **Annals of Neurology**, v. 83, n. 4, p. 794–806, 2018.
- NAPOLI, I. *et al.* The Fragile X Syndrome Protein Represses Activity-Dependent Translation through CYFIP1, a New 4E-BP. **Cell**, 2008.
- NISHIMOTO, Y. *et al.* Determination of editors at the novel A-to-I editing positions. **Neuroscience Research**, v. 61, n. 2, p. 201–206, jun. 2008.
- OKAMOTO, K. I. *et al.* Rapid and persistent modulation of actin dynamics regulates postsynaptic reorganization underlying bidirectional plasticity. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 10, p. 1104–1112, 2004.
- OIKAWA, T. *et al.* PtdIns(3,4,5)P3 binding is necessary for WAVE2-induced formation of lamellipodia. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 5, p. 420–426, 2004.
- OYRER, J. *et al.* Ion channels in genetic epilepsy: From genes and mechanisms to disease-targeted therapies. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 1, p. 142–173, 2018.
- ORGENSEN, W. L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **The Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 15 jul. 1983.
- PATHANIA, M. *et al.* The autism and schizophrenia associated gene CYFIP1 is critical for the maintenance of dendritic complexity and the stabilization of mature spines. **Translational Psychiatry**, v. 4, n. February, p. 1–11, 2014.
- PAVONE, P. *et al.* West syndrome: a comprehensive review. **Neurological Sciences**, 2020.
- PENG, J. *et al.* Novel West syndrome candidate genes in a Chinese cohort. **CNS Neuroscience and Therapeutics**, v. 24, n. 12, p. 1196–1206, 2018.
- PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- POLESSKAYA, A. *et al.* CYFIP2 containing WAVE complexes inhibit cell migration. **Current Biology**, 2020.
- POLLARD T. D.; BORISY, G. G. Cellular Motility Driven by Assembly and Disassembly of Actin Filaments, 2003.
- POLLARD, T. D. Actin and Actin-Binding Proteins. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 8:a018226, 2016.
- PUSHPAKOM, S. *et al.* Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 1, p. 41–58, 12 jan. 2019.

- REDIN, G. S. Antibacterial activity in mice of minocycline, a new tetracycline. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 6, p. 371–6, 1966.
- RICHTER, J. D.; ZHAO, X. The molecular biology of FMRP: new insights into fragile X syndrome. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 0123456789, 19 fev. 2021.
- SALLER, E. *et al.* Increased apoptosis induction by 121F mutant p53. **Embo J**, v. 18, n. 16, p. 4424–4437, 1999.
- SCHAKS, M. *et al.* Distinct Interaction Sites of Rac GTPase with WAVE Regulatory Complex Have Non-redundant Functions in Vivo. **Current Biology**, v. 28, n. 22, p. 3674- 3684.e6, 2018.
- SCHAKS, M. *et al.* Molecular Dissection of Neurodevelopmental Disorder-Causing Mutations in CYFIP2. **Cells**, v. 9, n. 6, p. 1–14, 2020.
- SCHENCK, A. *et al.* A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8844–8849, 2001.
- SCOTT, L. J. Pomalidomide: A Review of Its Use in Patients with Recurrent Multiple Myeloma. **Drugs**, v. 74, n. 5, p. 549–562, 4 abr. 2014.
- SETHNA, F.; MOON, C.; WANG, H. From FMRP Function to Potential Therapies for Fragile X Syndrome. **Neurochemical Research**, v. 39, n. 6, p. 1016–1031, 18 jun. 2014.
- SIVAPALARAJAH, S. *et al.* The prescribable drugs with efficacy in experimental epilepsies (PDE3) database for drug repurposing research in epilepsy. **Epilepsia**, v. 59, n. 2, p. 492–501, 2018.
- SONG, H. *et al.* Cytotoxic Effects of Tetracycline Analogues (Doxycycline, Minocycline and COL-3) in Acute Myeloid Leukemia HL-60 Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e114457, 15 dez. 2014.
- SPENCE, E. F. *et al.* The Arp2/3 complex is essential for distinct stages of spine synapse maturation, including synapse unsilencing. **Journal of Neuroscience**, v. 36, n. 37, p. 9696–9709, 2016.
- SUN, D. Correction to: Remdesivir for Treatment of COVID-19: Combination of Pulmonary and IV Administration May Offer Additional Benefit. **The AAPS Journal**, v. 22, n. 5, p. 102, 2 set. 2020.
- TERPOS, E. *et al.* Pomalidomide: a novel drug to treat relapsed and refractory multiple myeloma. **OncoTargets and Therapy**, p. 531, maio 2013.
- TIWARI, S. S. *et al.* Alzheimer-related decrease in CYFIP2 links amyloid production to tau hyperphosphorylation and memory loss. **Brain**, v. 139, n. 10, p. 2751–2765, 2016.
- TOBACMAN, L. S.; BRENNER, S. L.; KORN, E. D. Effect of Acanthamoeba profilin on the pre-steady state kinetics of actin polymerization and on the concentration of F-actin at steady state. **Journal of Biological Chemistry**, v. 258, n. 14, p. 8806–8812, 1983.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.

UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506–D515, 8 jan. 2019.

VAN DER SPOEL, D. *et al.* GROMACS: Fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, dez. 2005.

VERKERK, A. J. *et al.* Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. **Cell**, v. 65, n. 5, p. 905–14, 31 maio 1991.

WEBB, B.; SALI, A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. **Current Protocols in Bioinformatics**, v. 54, n. 1, 20 jun. 2016.

WARREN, T. K. *et al.* Therapeutic efficacy of the small molecule GS-5734 against Ebola virus in rhesus monkeys. **Nature**, v. 531, n. 7594, p. 381–385, 2 mar. 2016.

WEILER, I. J. *et al.* Fragile X mental retardation protein is translated near synapses in response to neurotransmitter activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5395–5400, 1997.

WILLIAMS, C. J. *et al.* MolProbity: More and better reference data for improved all-atom structure validation. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 293–315, jan. 2018.

WISHART, D. S. *et al.* DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D1074–D1082, 4 jan. 2018.

YANG, J.; ROY, A.; ZHANG, Y. Protein–ligand binding site recognition using complementary binding-specific substructure comparison and sequence profile alignment. **Bioinformatics**, v. 29, n. 20, p. 2588–2595, 15 out. 2013.

ZHANG, Y. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 40, 23 dez. 2008.

ZHANG, Y.; KANG, H. R.; HAN, K. Differential cell-type-expression of CYFIP1 and CYFIP2 in the adult mouse hippocampus. **Animal Cells and Systems**, v. 8354, p. 1–4, 2019a.

ZHANG, Y. *et al.* Smaller body size, early postnatal lethality, and cortical extracellular matrix-related gene expression changes of Cyfip2-null embryonic mice. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. January, p. 1–5, 2019b.

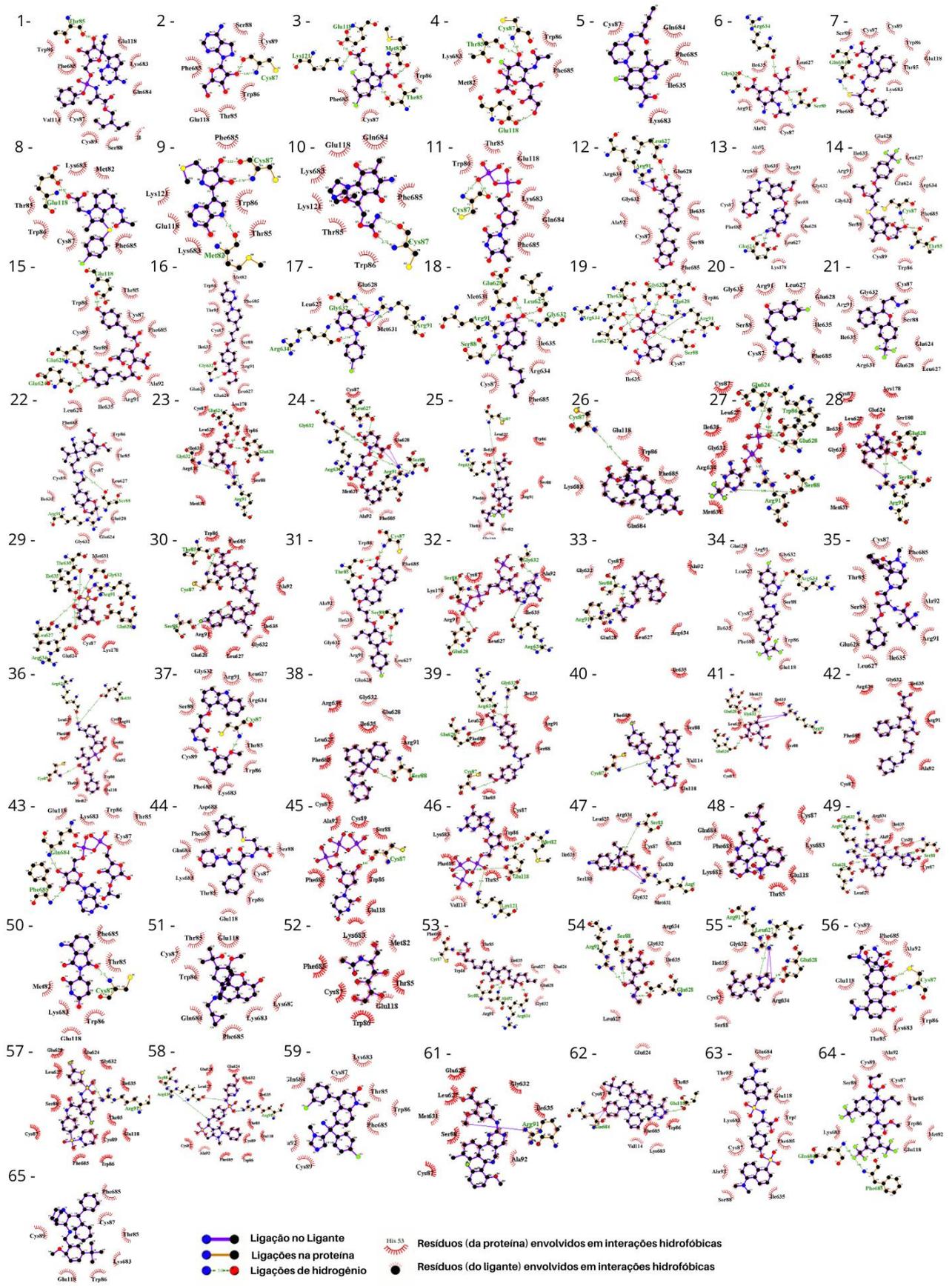
ZHANG, Y.; LEE, Y.; HAN, K. Neuronal function and dysfunction of CYFIP2: from actin dynamics to early infantile epileptic encephalopathy. **BMB reports**, 2019c.

ZHONG, M. *et al.* Early diagnosis improving the outcome of an infant with epileptic encephalopathy with cytoplasmic FMRP interacting protein 2 mutation: Case report and literature review. **Medicine**, v. 98, n. 44, p. e17749, 2019.

ZIMMERMANN, L. *et al.* A Completely Reimplemented MPI Bioinformatics Toolkit with a New HHpred Server at its Core. **Journal of Molecular Biology**, v. 430, n. 15, p. 2237–2243, jul. 2018.

ZWEIER, M. *et al.* Spatially clustering de novo variants in CYFIP2, encoding the cytoplasmic FMRP interacting protein 2, cause intellectual disability and seizures. **European Journal of Human Genetics**, v. 27, n. 5, p. 747–759, 2018.

5. Avaliação no Liglot dos 65 ligantes encontrados no primeiro screening na conformação de maior afinidade no *docking* com a proteína nativa contra a proteína variante.



6. Avaliação no Liglot dos 65 ligantes encontrados no primeiro screening na conformação de maior afinidade no *docking* com a proteína variante contra a proteína nativa.

