

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE QUÍMICA – CAMPUS ARARAQUARA

Victor de Sousa Batista

**Estudos de modelagem molecular de compostos bioativos frente ao receptor
nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$**

Araraquara

2016

Victor de Sousa Batista

**Estudos de modelagem molecular de compostos bioativos frente ao receptor
nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel em
Química.

Orientador:

Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Araraquara

2016

Victor de Sousa Batista

**Estudos de modelagem molecular de compostos bioativos frente ao receptor
nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Química da Universidade Estadual
Paulista “Júlio de Mesquita Filho” como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel em
Química.

Aprovado em _____ de _____ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior
Unesp – Araraquara

Prof. Dr. Gustavo Troiano Feliciano
Unesp – Araraquara

Prof^a. Dr^a. Cíntia Duarte de Freitas Milagre
Unesp – Araraquara

Araraquara
2016

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, por sempre me incentivar a ultrapassar meus limites e pela orientação que me mostrou como desenvolver novas habilidades essenciais para minha vida profissional.

Aos meus familiares pelo apoio e compreensão ao longo dos anos, sem os quais eu não estaria aqui hoje.

Aos amigos que me acompanharam durante essa jornada e com os quais tive experiências inesquecíveis.

A PROPe pela bolsa concedida.

RESUMO

Os receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais (nAChRs) são canais iônicos transmembranares pentaméricos localizados no sistema nervoso central (SNC) que se abrem e permitem a passagem de alguns cátions mediante à ação do neurotransmissor endógeno acetilcolina ou de moléculas exógenas, como a nicotina. Eles estão envolvidos em diversas desordens do SNC, como o Alzheimer, Parkinson, epilepsia, esquizofrenia, entre outras doenças altamente debilitantes, além de mediar o mecanismo de dependência pela nicotina. Face a grande quantidade de doenças nas quais estão envolvidos, fica clara a importância do planejamento racional de novos compostos que os tenham como alvo. Os nAChRs apresentam uma grande diversidade estrutural, existindo diversas subunidades que podem se combinar de diversas formas para formar um canal iônico com propriedades distintas. Os subtipos dos nAChRs presentes em maior quantidade no SNC são os subtipos $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$, sendo que este último é o foco deste trabalho. Até recentemente não existiam estruturas cristalográficas definidas para o nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ da espécie humana, de modo que os estudos direcionados para o planejamento de novos candidatos a fármacos eram realizados utilizando modelos por homologia que nem sempre são capazes de prever as reais interações entre os ligantes bioativos e o receptor. Com a recente elucidação da estrutura cristalográfica do receptor, o processo de planejamento racional dessas substâncias bioativas se torna mais eficaz. Nesse contexto, utilizou-se da estrutura cristalográfica do nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ para estudos de ancoramento molecular utilizando o programa GOLD® e um conjunto de ligantes obtidos da literatura a fim de melhor compreender as interações envolvidas nos complexos ligante-receptor formados e avaliar a capacidade preditiva do modelo computacional.

Palavras-chave: Química medicinal. Química computacional. Receptores nicotínicos de acetilcolina. Compostos bioativos. Subtipo $\alpha 4\beta 2$. Ancoramento molecular

ABSTRACT

Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are pentameric transmembrane ion channels located in the central nervous system (CNS) that open and allow the flow of some ions through the action of the endogenous neurotransmitter acetylcholine or exogenous molecules, such as nicotine. They are involved in several CNS disorders such as Alzheimer's, Parkinson's, epilepsy, schizophrenia, among other highly debilitating diseases, as well as mediating the mechanism of nicotine addiction. Given the great number of diseases in which they are involved, it is clear the importance of the rational design of novel compounds that target them. The nAChRs present a great structural diversity, with several subunits that can be combined in different ways to form an ion channel with different properties. The nAChRs subtypes more expressed in the CNS are the $\alpha 3\beta 4$, $\alpha 7$ and $\alpha 4\beta 2$ subtypes, the latter being the focus of this work. Until recently, there were no defined crystallographic structures for nAChRs of the $\alpha 4\beta 2$ subtype of the human species, so studies aimed for the planning of new drug candidates were performed using homology models that are not always able to predict the real interactions between the ligands and their receptor. With the recent elucidation of the receptor's three-dimensional crystal, the process of rational design of these bioactive substances becomes more effective. In this context, we used the crystallographic structure of $\alpha 4\beta 2$ subtype nAChRs for molecular docking studies using the GOLD® program and a set of ligands obtained from the literature in order to better understand the interactions involved in the ligand-receptor complexes formed and evaluate the predictive capability of the computational model.

Keywords: Medicinal Chemistry. Computational chemistry. Nicotinic acetylcholine receptors. Bioactive compounds. $\alpha 4\beta 2$ subtype. Molecular docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estruturas das moléculas de acetilcolina (1), muscarina (2) e nicotina (3).	14
Figura 2 - Visão vertical e transversal dos nAChRs e tipos de interface entre as subunidades.	16
Figura 3 - a , visão lateral do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$ e seu sítio ativo contendo o ligante 3 . b , ampliação do sítio ativo do receptor e resíduos de aminoácidos que o compõem, preservando a orientação mostrada na Figura 3 (a).	21
Figura 4 - Interações do ligante 3 com o receptor e estrutura bidimensional.....	22
Figura 5 - a , comparação entre a posição espacial de cada átomo do ligante 3 co-cristalizado (em laranja) e do ligante 3 redocado (pose 7, em verde) utilizando a função de pontuação ASP. b , comparação entre a posição espacial de cada átomo nas poses 2 (em azul) e 7 (em verde).	24
Figura 6 - Interações do ligante 4 com o receptor e estrutura bidimensional.....	26
Figura 7 - Interações do fármaco 5 com o receptor e estrutura bidimensional.	28
Figura 8 - Interações do ligante 6 com o receptor e estrutura bidimensional.....	30
Figura 9 - Interações do ligante 7 com o receptor e estrutura bidimensional.....	32
Figura 10 - Interações do ligante 8 com o receptor e estrutura bidimensional.....	34
Figura 11 - Interações do ligante 9 com o receptor e estrutura bidimensional.....	35
Figura 12 - Interações do ligante 10 com o receptor e estrutura bidimensional.....	37
Figura 13 - Interações do ligante 11 com o receptor e estrutura bidimensional.....	39
Figura 14 - Interações do ligante 12 com o receptor e estrutura bidimensional.....	41
Figura 15 - Interações do ligante 13 com o receptor e estrutura bidimensional.....	43
Figura 16 - Interações do ligante 14 com o receptor e estrutura bidimensional.....	45
Figura 17 - Interações do ligante 15 com o receptor e estrutura bidimensional.....	47
Figura 18 - Interações do ligante 16 com o receptor e estrutura bidimensional.....	49
Figura 19 - Interações do ligante 17 com o receptor e estrutura bidimensional.....	51

Figura 20 - Interações do ligante 18 com o receptor e estrutura bidimensional.....	52
Figura 21 - Interações do ligante 19 com o receptor e estrutura bidimensional.....	54
Figura 22 - Interações do ligante 20 com o receptor e estrutura bidimensional.....	56
Figura 23 - Interações do ligante 21 com o receptor e estrutura bidimensional.....	58
Figura 24 - Interações do ligante 22 com o receptor e estrutura bidimensional.....	60
Figura 25 - Interações do ligante 23 na pose 8 com o receptor e estrutura bidimensional. ..	61
Figura 26 - Interações do ligante 23 na pose 6 com o receptor.....	63
Figura 27 - Interações do ligante 24 com o receptor e estrutura bidimensional.....	65
Figura 28 - Interações do ligante 25 com o receptor e estrutura bidimensional.....	66
Figura 29 - Interações do ligante 26 na pose 7 com o receptor e estrutura bidimensional. ..	68
Figura 30 - Interações do ligante 26 na pose 2 com o receptor.....	69
Figura 31 - Interações do ligante 27 com o receptor e estrutura bidimensional.....	70
Figura 32 - Interações do ligante 28 com o receptor e estrutura bidimensional.....	72
Figura 33 - Interações do ligante 29 com o receptor e estrutura bidimensional.....	73
Figura 34 - Interações do ligante 30 com o receptor e estrutura bidimensional.....	75
Figura 35 - Interações do ligante 31 com o receptor e estrutura bidimensional.....	76
Figura 36 - Interações do ligante 32 com o receptor e estrutura bidimensional.....	78
Figura 37 - Interações do ligante 33 com o receptor e estrutura bidimensional.....	79
Figura 38 - Interações do ligante 34 na pose 4 com o receptor e estrutura bidimensional. ..	81
Figura 39 - Interações do ligante 34 na pose 6 com o receptor.....	82
Figura 40 - Interações do ligante 35 com o receptor e estrutura bidimensional.....	83
Figura 41 - Interações do ligante 36 com o receptor e estrutura bidimensional.....	85
Figura 42 - Interações do ligante 37 com o receptor e estrutura bidimensional.....	86
Figura 43 - Interações do ligante 38 com o receptor e estrutura bidimensional.....	88
Figura 44 - Interações do ligante 39 com o receptor e estrutura bidimensional.....	90
Figura 45 - Interações do ligante 40 com o receptor e estrutura bidimensional.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados de pontuação e RMSD obtidos através do redocking do ligante 3 para as quatro funções de pontuação do programa GOLD®.	23
Tabela 2 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 4	25
Tabela 3 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o fármaco 5	27
Tabela 4 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 6	29
Tabela 5 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 7	31
Tabela 6 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 8	33
Tabela 7 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 9	34
Tabela 8 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 10	36
Tabela 9 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 11	38
Tabela 10 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 12	40
Tabela 11 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 13	42
Tabela 12 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 14	44
Tabela 13 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 15	46
Tabela 14 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 16	48
Tabela 15 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 17	50
Tabela 16 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 18	52
Tabela 17 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 19	53
Tabela 18 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 20	55
Tabela 19 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 21	57
Tabela 20 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 22	59
Tabela 21 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 23	61
Tabela 22 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 24	64
Tabela 23 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 25	65
Tabela 24 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 26	67
Tabela 25 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 27	70

Tabela 26 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 28 .	71
Tabela 27 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 29 .	72
Tabela 28 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 30 .	74
Tabela 29 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 31 .	76
Tabela 30 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 32 .	77
Tabela 31 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 33 .	78
Tabela 32 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 34 .	80
Tabela 33 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 35 .	82
Tabela 34 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 36 .	84
Tabela 35 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 37 .	85
Tabela 36 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 38 .	87
Tabela 37 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 39 .	89
Tabela 38 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante 40 .	91
Tabela 39 - Interações previstas pela função ASP para os ligantes clássicos dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$, propriedades farmacológicas e pontuação obtida para as poses analisadas.....	92
Tabela 40 - Interações previstas pela função ASP para 7 e seus análogos, propriedades farmacológicas e pontuação obtida para as poses analisadas.....	94
Tabela 41 - Interações previstas pela função ASP para 21 e seus análogos, propriedades farmacológicas e pontuação obtida para as poses analisadas.....	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. Aminoácidos

A - Alanina
C - Cisteína
D - Ácido Aspártico
E - Ácido Glutâmico
F - Fenilalanina
K - Lisina
L - Leucina
N - Asparagina
R - Arginina
S - Serina
T - Treonina
V - Valina
W - Triptofano
Y - Tirosina

2. Outros

ACh - acetilcolina
ASP - Astex Statistical Potential
CCDC - The Cambridge Crystallographic Data Center
CE50 – Concentração de agonista que produz 50% da resposta máxima
ELIC - canal iônico ligante-dependente da bactéria *Erwinia chrysanthemi*
GLIC - canal iônico ligante-dependente da cianobactéria *Gloeobacter violaceus*
mAChRs Receptores muscarínicos de acetilcolina
CI50 – Concentração de um antagonista que inibe 50% da ação de um agonista
Ki - Constante de inibição
nAChRs - Receptores nicotínicos de acetilcolina
PDB - Protein Data Bank
PLP - Piecewise Linear Potential
RMSD - Root-Mean-Square Deviation
SNC - Sistema nervoso central

LISTA DE SÍMBOLOS

α - alfa, referente à uma subunidade dos nAChRs

β - beta, referente à uma subunidade dos nAChRs

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	MATERIAIS E MÉTODOS	18
2.1	Construção dos ligantes	18
2.2	Preparo e análise da estrutura cristalográfica do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$	18
2.3	Estudos de ancoramento molecular para validação (redocking)	19
2.4	Estudos de ancoramento molecular com 32 ligantes dos nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$	20
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
3.1	Interações presentes na estrutura cristalográfica do nAChRs $\alpha 4\beta 2$	21
3.2	Redocking da nicotina (3)	23
3.3	Ancoramento molecular do ligante citisina (4)	25
3.4	Ancoramento molecular do fármaco vareniclina (5)	27
3.5	Ancoramento molecular do ligante epibatidina (6)	29
3.6	Ancoramento molecular do ligante sazetidina-A (7) e análogos	31
3.6.1	Sazetidina-A (7)	31
3.6.2	Ancoramento molecular do ligante 8	33
3.6.3	Ancoramento molecular do ligante 9	34
3.6.4	Ancoramento molecular do ligante 10	36
3.6.5	Ancoramento molecular do ligante 11	38
3.6.6	Ancoramento molecular do ligante 12	40
3.6.7	Ancoramento molecular do ligante 13	42
3.6.8	Ancoramento molecular do ligante 14	44
3.6.9	Ancoramento molecular do ligante 15	46
3.6.10	Ancoramento molecular do ligante 16	48
3.6.11	Ancoramento molecular do ligante 17	50

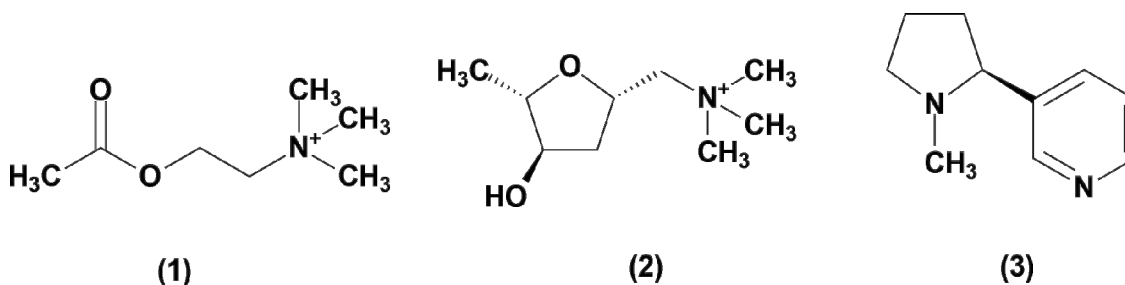
3.6.12	Ancoramento molecular do ligante 18	51
3.6.13	Ancoramento molecular do ligante 19	53
3.6.14	Ancoramento molecular do ligante 20	55
3.7	Ancoramento molecular do ligante bupropiona (21) e análogos.....	57
3.7.1	Bupropiona (21)	57
3.7.2	Ancoramento molecular do ligante 22	58
3.7.3	Ancoramento molecular do ligante 23	60
3.7.4	Ancoramento molecular do ligante 24	64
3.7.5	Ancoramento molecular do ligante 25	65
3.7.6	Ancoramento molecular do ligante 26	67
3.7.7	Ancoramento molecular do ligante 27	69
3.7.8	Ancoramento molecular do ligante 28	71
3.7.9	Ancoramento molecular do ligante 29	72
3.7.10	Ancoramento molecular do ligante 30	74
3.7.11	Ancoramento molecular do ligante 31	75
3.7.12	Ancoramento molecular do ligante 32	77
3.7.13	Ancoramento molecular do ligante 33	78
3.7.14	Ancoramento molecular do ligante 34	80
3.7.15	Ancoramento molecular do ligante 35	82
3.7.16	Ancoramento molecular do ligante 36	84
3.7.17	Ancoramento molecular do ligante 37	85
3.7.18	Ancoramento molecular do ligante 38	87
3.7.19	Ancoramento molecular do ligante 39	89
3.7.20	Ancoramento molecular do ligante 40	90
3.8	Comparação entre as interações previstas pela função ASP	92
4	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	101
	ANEXO	105

1 INTRODUÇÃO

A descoberta de novos candidatos a fármacos é essencial para a manutenção da qualidade de vida da espécie humana. Neste contexto, um dos alvos terapêuticos da literatura científica são os receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais (nAChRs), associados a diversas desordens do sistema nervoso central (SNC), como o mal de Parkinson, doença de Alzheimer e esquizofrenia, entre outras, além de mediar o mecanismo de dependência em nicotina **(3)**.¹

Os (nAChRs) são membros do grupo de receptores do neurotransmissor endógeno acetilcolina (ACh) **(1)** (**Figura 1**) que compreende, além dos já mencionados nAChRs, os receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs). Os mAChRs são receptores metabotrópicos com alta afinidade pela muscarina **(2)** e baixa afinidade pela nicotina **(3)**, sendo que se observa comportamento inverso para os nAChRs. Os nAChRs podem ser divididos em dois grupos, os receptores nicotínicos musculares e os neuronais,^{2,3} com os nAChRs neuronais majoritariamente expressos pelos subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$, podendo exercer funções variadas como regulação de excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores.⁴⁻⁶

Figura 1 - Estruturas das moléculas de acetilcolina **(1)**, muscarina **(2)** e nicotina **(3)**.



Quanto a sua estrutura, os nAChRs neuronais são glicoproteínas grandes (aproximadamente 290 kDa) compostas por cinco subunidades transmembranares que se arranjam em torno de um poro central permeável a cátions^{5,7,8} e fazem parte da família dos canais iônicos cys-loop, que inclui também os nAChRs musculares, e receptores de serotonina (5-HT₃), receptores de glicina e receptores de ácido gama aminobutírico (GABA_A e GABA_C)^{5,9}

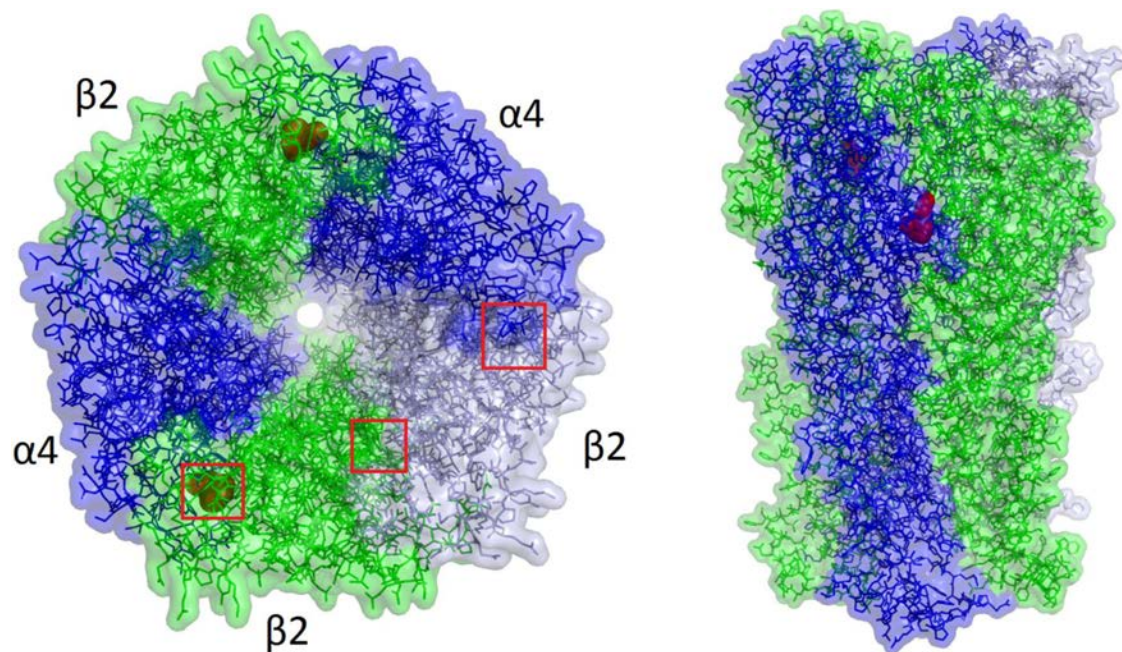
Cada receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) divide-se em três domínios: um grande domínio extracelular *N*-terminal onde encontram-se os sítios ortostéricos, um poro transmembranar e um pequeno domínio intracelular, tendo esse conjunto um comprimento total aproximado em 160 Å.⁸ As subunidades que compõem os nAChRs neuronais, a saber, α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e β ($\beta 2$ - $\beta 4$), podem combinar-se de diversas maneiras diferentes, podendo estas combinações serem homoméricas, como os receptores $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ ou heteroméricas, como os receptores $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7\alpha 8^*$, $\alpha 9\alpha 10^*$, $\alpha 6\beta 2^*$, $\alpha 3\beta 4^*$, entre outros, com a presença obrigatória de uma subunidade α no receptor. O asterisco representa a possibilidade de outras subunidades no complexo. Essa grande possibilidade de combinações é a responsável pela grande variedade de funções dessa classe de receptores.^{3,5,7} Classifica-se as subunidades como α ou não- α baseando-se na presença ou ausência, respectivamente, de cisteínas vicinais ligadas por pontes dissulfeto no domínio extracelular do receptor.¹⁰

Ao interagirem com um agonista ou com seu neurotransmissor endógeno **1** a estrutura dos nAChRs muda de conformação, sendo possível descrever muito simplificada o processo de ativação do receptor em três etapas: **(a)** a conformação fechada, onde o receptor é capaz de interagir com um agonista e não há a passagem de cátions pelo poro permeável, **(b)** a conformação aberta, onde o receptor já interagiu com um agonista e passa a permitir a passagem de cátions em um intervalo de tempo da ordem de milissegundos e **(c)** a conformação dessensibilizada, onde o receptor se fecha e novamente deixa de permitir a passagem de cátions pelo poro central.¹² O poro central é permeável a cátions monovalentes e bivalentes, principalmente sódio e cálcio.^{15,18}

Como já foi dito, o sítio ortostérico dos nAChRs neuronais está localizado no domínio extracelular do receptor, nas interfaces entre as subunidades α e as demais subunidades que os constituem, sendo as subunidades desse tipo o componente principal do sítio ativo e as subunidades do tipo β sendo responsáveis pela parte complementar do mesmo, como exemplificado na Figura 2. A permeabilidade a cátions e afinidade por determinado ligante bioativo variam grandemente em função dos componentes complementares do receptor.¹⁴⁻¹⁶ Além disso, os nAChRs costumam apresentar uma subunidade assessora que não participa ativamente da formação do sítio ortostérico mas influenciam nas propriedades farmacológicas e biofísicas do receptor.⁵ Dessa forma, fica clara a abundância de configurações possíveis para os nAChRs, uma vez que as diversas subunidades existentes podem

se combinar em inúmeras configurações. Para maiores informações sobre os nAChRs, consultar o Anexo da página 105.

Figura 2 - Visão vertical e transversal dos nAChRs e tipos de interface entre as subunidades.



Até recentemente, não existiam estruturas cristalográficas completas para os nAChRs neuronais dos mamíferos. A maior parte do conhecimento estrutural sobre esses receptores foi adquirida através do estudo de proteínas ligantes de acetilcolina (AChBP) homólogas obtidas de espécies de peixe como a *Torpedo marmorata* (PDB ID: 1OED), espécies de moluscos como a *Lymnaea stagnalis* (PDB ID: 1UW6) e *Aplysia californica* (PDB ID: 2BYN) e das proteínas procarióticas GLIC (canal iônico ligante-dependente da cianobactéria *Gloeobacter violaceus*, PDB ID: 4NPQ) e ELIC (canal iônico ligante-dependente da bactéria *Erwinia chrysanthemi*, PDB ID: 2VL0), entre outras.^{8,16-21} No ano de 2016, um grupo de pesquisadores foi capaz de elucidar a estrutura cristalográfica dos nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ da espécie humana (PDB ID: 5KXI).²² Essa descoberta permitiu que outros grupos de pesquisa utilizassem essa estrutura em estudos visando o planejamento de novos compostos bioativos candidatos a fármacos que atuem nesse receptor.

Nesse contexto, uma das técnicas utilizadas no planejamento de novos candidatos a fármacos é o ancoramento molecular (docking). Essa abordagem faz uso da estrutura cristalográfica do receptor para avaliar as interações entre um ligante de interesse e o receptor, retornando um valor de pontuação (score) que permite avaliar se tal ligante é um potencial candidato para síntese e posteriores etapas de avaliação farmacológica. Uma das ferramentas mais utilizadas atualmente para essa finalidade é o programa GOLD® (CCDC), que apresenta boas capacidades preditivas.

O programa GOLD® permite o uso de quatro funções de pontuação para avaliar as interações presentes em um complexo ligante-receptor: GoldScore, ChemScore, Piecewise Linear Potential (ChemPLP) e Astex Statistical Potential (ASP). Cada uma dessas funções apresenta vantagens e desvantagens, de modo que é necessário um método de triagem que selecione a melhor alternativa para cada caso em particular.

Com uma função escolhida, realiza-se o ancoramento de uma série de ligantes com o receptor em questão, avaliando-se as interações presentes para as poses melhor pontuadas pela função escolhida e obtendo assim dados sobre a capacidade preditiva da função de pontuação.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Construção dos ligantes

As substâncias nicotina (**3**), citisina (**4**), vareniclina (**5**), epibatidina (**6**) e outros 31 ligantes dos receptores nicotínicos de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$ análogos da bupropiona (**21**) e da sazetidina-A (**7**) foram construídos com o programa PC Spartan Pro, todos na forma protonada no átomo de nitrogênio básico, de modo a nos aproximarmos das condições que são observadas em pH fisiológico (pH=7,8). Em seguida, todas as estruturas foram otimizadas por meio de cálculos de mecânica molecular MMFF, inspeção visual cuidadosa para verificar os ângulos de ligação e protonação do átomo de nitrogênio e em seguida salvos com extensão .mol2 para os estudos de ancoramento molecular.

2.2 Preparo e análise da estrutura cristalográfica do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$

A estrutura cristalográfica do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$ (PDB ID: 5KXI), co-cristalizado com a molécula de nicotina (**3**) foi obtida a partir do site do Protein Data Bank (PDB), para a qual se definiu as coordenadas $x = 67.3680$, $y = -27.2034$ e $z = -39.0781$ como sendo o átomo de nitrogênio protonado da estrutura **3** para os estudos de ancoramento molecular. A estrutura apresenta resolução de 3.94 Å e a técnica utilizada para sua elucidação foi a difratometria de raios-x.

Em seguida, definiu-se ancoramento molecular no modo rígido com o intuito de preservar a posição dos resíduos de aminoácidos (backbone) e suas respectivas cadeias laterais (side chains) da estrutura cristalográfica, por tratar-se de um dado experimental.

Como não foram observadas moléculas de água mediando as interações entre **3** e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$, foi decidido que as moléculas de água, assim como demais ligantes/moléculas de co-cristalização, também seriam removidos para os estudos computacionais por meio do programa GOLD®. Os átomos de hidrogênio foram adicionados à estrutura do receptor no programa GOLD® de forma automatizada, uma vez que os mesmos não estão inclusos na estrutura cristalográfica utilizada.

2.3 Estudos de ancoramento molecular para validação (redocking)

Visto que a estrutura cristalográfica do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$ (PDB ID: 5KXI) está co-cristalizada com a molécula de nicotina (**3**), foi realizada a redocagem como método de validação. Este método consiste em submeter o mesmo ligante co-cristalizado com o biorreceptor em questão aos estudos de ancoramento molecular e observar se as interações com os resíduos de aminoácidos chave e a orientação espacial do ligante são preservados, ou seja, que o RMSD (root-mean-square deviation) seja o menor possível, de modo a comprovar a capacidade preditiva do modelo *in silico*.

Durante o redocking (redocagem) não foi escolhido um molde (template) de proteína, visto que nenhuma delas tinha características próximas às do receptor em questão. Num primeiro momento, optou-se por não utilizar *rescore* nos estudos de ancoramento molecular, visto que não se sabe quais das funções de pontuação são mais adequadas. Dessa forma, os estudos de ancoramento molecular foram realizados com todas as funções de pontuação (GOLDScore, ChemScore, ASP e ChemPLP), para posterior avaliação de qual delas possui a melhor capacidade preditiva.

Cada função de pontuação faz uso de uma série de parâmetros para retornar um valor de pontuação final dos ligantes. A função GOLDScore faz uso de quatro parâmetros, dois deles relacionados às interações ligante-receptor (ligações de hidrogênio e interações de van der Waals) e dois relativos à energias internas do ligante (van der Waals e torcionais). A função ChemScore estima a variação de energia livre total que ocorre no sistema com a interação ligante-proteína utilizando valores empíricos derivados de um conjunto de 82 complexos ligante-receptor.^{23,24} A função ASP é uma função de potencial átomo-átomo derivada de um banco de dados de complexos ligante-proteína, sendo que as informações a respeito da frequência das interações entre o ligante e o receptor são obtidas desses complexos e o cálculo se baseia em um estado de referência onde o ligante se encontra livre de interações.²⁵ Por fim, a função ChemPLP utiliza uma função de potencial denominada Piecewise Linear Potential para modelar complementariedades estéricas entre o ligante e a proteína, com os termos de ligações metálicas e de hidrogênio dependentes de distância e ângulo sendo calculados de maneira similar ao que ocorre na função ChemScore e somados ao resultado final.²⁶

Por conta do tamanho das estruturas dos ligantes envolvidos neste estudo, foi definido um raio para o ancoramento molecular de 15 Å e o número de poses foi definido como 10 para cada ligante.

Após análises dos resultados da redocagem, considerando o RMSD de referência da própria estrutura cristalográfica e definição da melhor função de pontuação, foi realizado o ancoramento molecular com os ligantes **4**, **5** e **6**, sem utilizar um RMSD de referência por conta das diferenças estruturais, de modo a avaliarmos se a orientação espacial e interações com resíduos de aminoácidos chave se aproximavam das observadas na estrutura cristalográfica. Esta etapa auxilia a avaliarmos se o modelo e função de pontuação são adequados para avaliação de substâncias estruturalmente distintas e se a função de pontuação escolhida é adequada ou se deve ser substituída.

2.4 Estudos de ancoramento molecular com 32 ligantes dos nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$

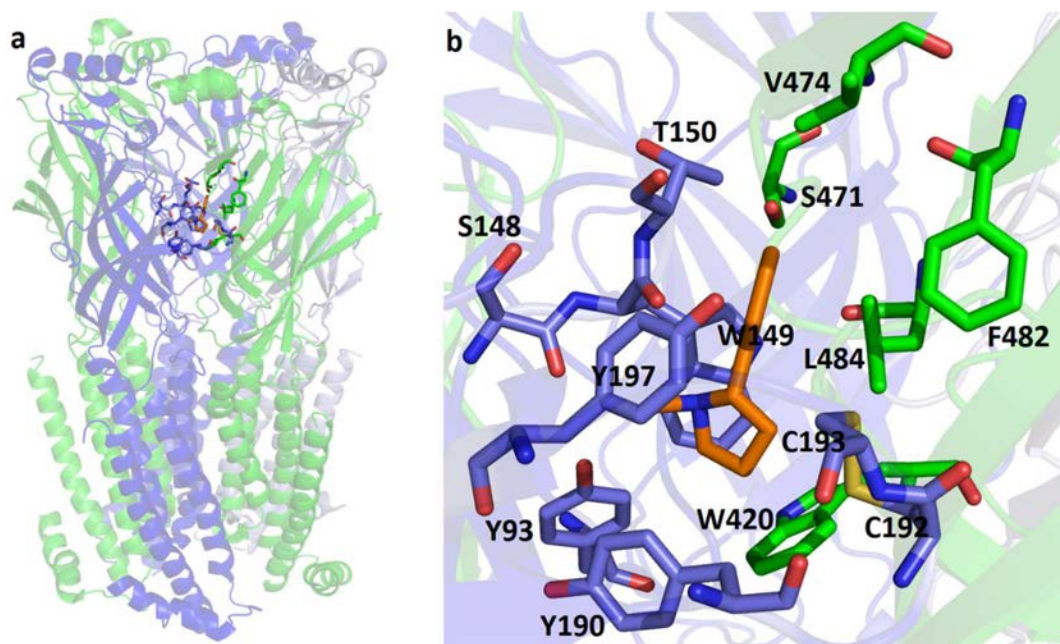
Uma vez validado o modelo do receptor e a função de pontuação mais adequados, realizou-se o ancoramento molecular de 32 substâncias bioativas análogas da sazetidina-A (**7**) e bupropiona (**21**) descritas na literatura e as poses de docking melhor pontuadas pelo programa GOLD® foram avaliadas quanto a orientação espacial e interações com resíduos de aminoácidos chave. Com base nestes resultados, foram avaliadas a capacidade preditiva do modelo quanto os ligantes do subtipo $\alpha 4\beta 2$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Interações presentes na estrutura cristalográfica do nAChRs $\alpha 4\beta 2$

Na estrutura cristalográfica recentemente elucidada para o nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ é possível observar que a molécula **3** se liga ao sítio ortostérico clássico desse receptor, localizado na interface entre as subunidades α e β , conforme mostrado na Figura 3. Daqui em diante, as ligações de hidrogênio serão representadas por um tracejado amarelo, os átomos de hidrogênio serão omitidos para facilitar a visualização e as distâncias inter-atômicas mencionadas no texto para ligações de hidrogênio serão sempre referentes à distância entre o hidrogênio fornecido pelo heteroátomo doador e o heteroátomo aceptor.

Figura 3 - **a**, visão lateral do receptor nicotínico de acetilcolina do subtipo $\alpha 4\beta 2$ e seu sítio ativo contendo o ligante **3**. **b**, ampliação do sítio ativo do receptor e resíduos de aminoácidos que o compõem, preservando a orientação mostrada na Figura 3 (a).

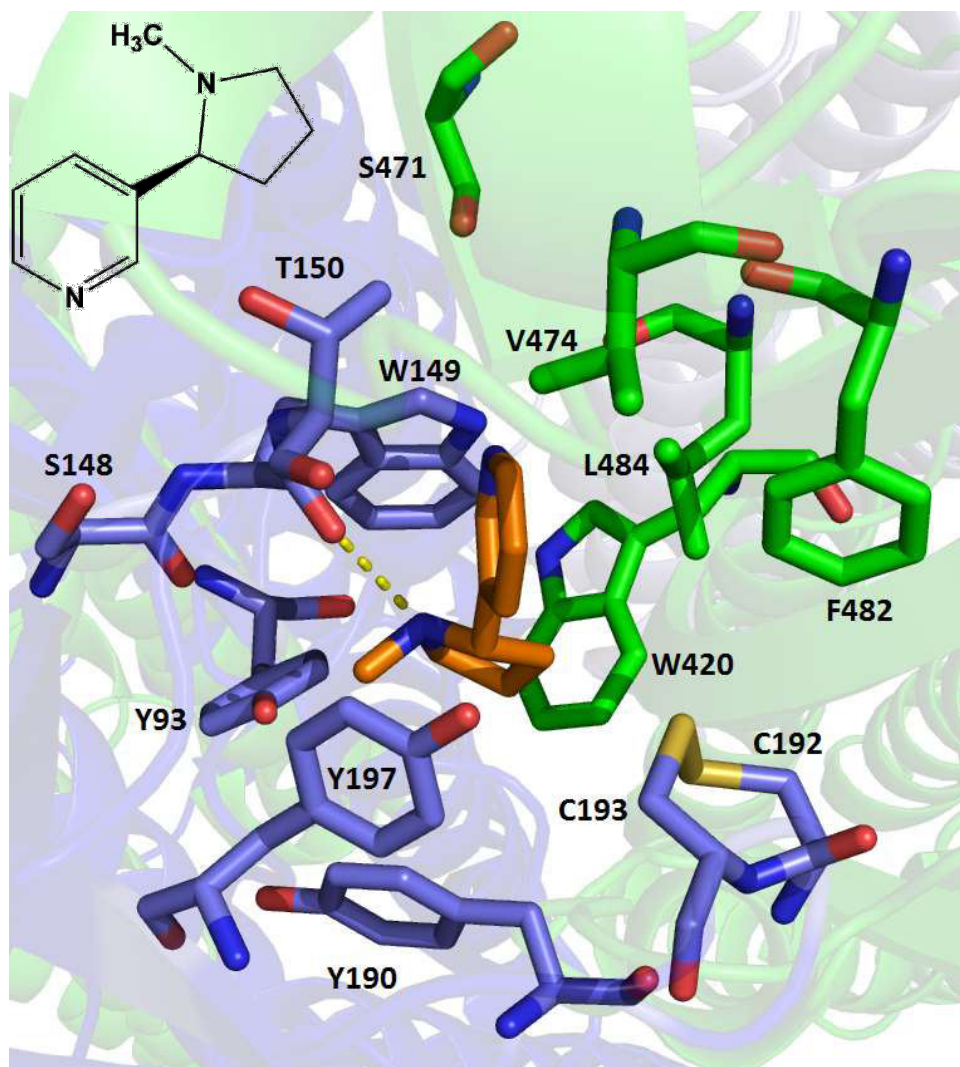


Por convenção, diz-se que a subunidade $\alpha 4$ forma o lado (+) do sítio ortostérico, enquanto a subunidade $\beta 2$ forma o lado (-) do mesmo. O sítio ativo mostrado na Figura 3 é uma região hidrofóbica que retira **3** do solvente quase completamente. Dos doze resíduos de aminoácidos integrantes da região oito são hidrofóbicos, sendo que seis desses são aromáticos e os demais são resíduos com

cadeias laterais polares não carregadas. A região inferior do sítio ativo é formada pelos resíduos Y100 proveniente da subunidade $\alpha 4$ e W420 da subunidade $\beta 2$. A parede do fundo da região contém os resíduos W149 do lado (+) e L484 do lado (-) do sítio ativo, enquanto a parede da frente é formada por duas cisteínas vicinais, C192 e C193, e por dois resíduos aromáticos hidrofóbicos, Y190 e Y197, todos provenientes da subunidade $\alpha 4$. A parte superior do sítio ativo contém os resíduos V474 e F482, ambos provenientes do lado (-).

Além das interações hidrofóbicas presentes nessa situação, algumas outras são relevantes no entendimento do reconhecimento da molécula pelo receptor, conforme mostrado na Figura 4.

Figura 4 - Interações do ligante **3** com o receptor e estrutura bidimensional.



O nitrogênio pirrolidínico da molécula **3** se encontra protonado quando em pH fisiológico, permitindo que o átomo de hidrogênio a ele ligado participe de uma ligação de hidrogênio (2,26 Å de distância entre os átomos participantes) envolvendo o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149. O mesmo nitrogênio também participa de interações cátion- π com os resíduos W149 e Y197. As interações apresentadas resultam em atividade agonista do ligante para esse receptor, com $K_i = 0,6$ nM e $CI_{50} = 1,2$ nM.²⁷

3.2 Redocking da nicotina (3)

Para escolher a função de pontuação do programa GOLD® que melhor prediz as interações observadas na estrutura cristalográfica utilizada neste estudo, realizou-se o redocking do ligante **3** na estrutura do receptor preparada conforme descrito na seção de metodologia, avaliando assim o RMSD em relação à posição dos átomos do ligante originalmente co-cristalizado. Os dados obtidos estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1 - Dados de pontuação e RMSD obtidos através do redocking do ligante **3** para as quatro funções de pontuação do programa GOLD®.

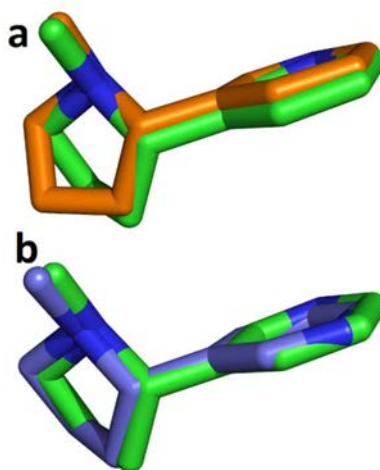
ASP			CHEMPLP		
Pose	Pontuação	RMSD	Pose	Pontuação	RMSD
2	35,3106	1,4813	1	50,9111	2,3168
7	35,1694	0,4616	5	50,8581	2,3157
6	35,0421	0,6905	3	50,7456	2,3238
5	34,7308	0,6143	9	50,5680	2,3038
10	34,6915	0,5227	8	50,4823	2,3072
9	33,9622	1,5501	10	48,0179	4,5866
3	33,9533	1,4995	7	47,7428	2,0435
4	33,7158	0,4884	4	47,6167	2,3247
8	33,2407	1,4929	6	46,8954	2,3312
1	33,1860	2,3182	2	46,7489	0,7347

ChemScore			GOLDScore		
Pose	Pontuação	RMSD	Pose	Pontuação	RMSD
6	29,2540	2,3063	5	70,6134	2,3332
4	28,7100	2,3559	1	70,3647	2,3226
5	28,4715	2,3552	7	70,2787	2,3156
8	27,8830	0,6830	10	70,2676	2,3391
1	27,6929	2,3499	2	70,2623	2,3737

2	27,5775	2,3671	3	70,2404	2,3686
10	27,4067	1,5555	9	70,1831	2,3827
7	26,7115	4,5126	6	69,9540	2,3963
9	26,5891	0,5223	4	69,8750	2,4190
3	26,5559	4,5921	8	67,9427	1,9564

As funções CHEMPLP, ChemScore e GOLDScore foram ineficazes na predição da pose da molécula **3**, uma vez que as poses de docking melhor pontuadas apresentam RMSD inadequado. A função de pontuação ASP se mostrou adequada para o trabalho, pois o RMSD da pose 7 apresentou o menor valor. Apesar dessa pose não ser a melhor classificada pela função ASP, a diferença entre sua pontuação e da pontuação atribuída à pose classificada em primeiro lugar é de 1,0197, mostrando assim que esse método de cálculo é capaz de reproduzir corretamente a orientação espacial da molécula de nicotina (**3**) dentro do sítio ativo do receptor. Na Figura 4 temos uma comparação entre a posição de cada átomo do ligante co-cristalizado e do ligante redocado utilizando a função de pontuação ASP e a comparação entre as poses de docking 7 e 2 obtidas através dessa função.

Figura 5 - **a**, comparação entre a posição espacial de cada átomo do ligante **3** co-cristalizado (em laranja) e do ligante **3** redocado (pose 7, em verde) utilizando a função de pontuação ASP. **b**, comparação entre a posição espacial de cada átomo nas poses 2 (em azul) e 7 (em verde).



Conforme observa-se na Figura 5 (a), a posição espacial dos átomos prevista pela função de pontuação ASP para a pose 7 é muito semelhante ao que se observa para o ligante **3** co-cristalizado na estrutura 5KXI, em acordo com o valor de RMSD mostrado na Tabela 1. Na Figura 5 (b) observa-se que a diferença principal entre as

poses 7 e 2 é a orientação da subunidade aromática piridina, uma vez que a ligação entre os átomos de carbono que ligam os dois anéis possui rotação livre. A diferença nas pontuações obtidas se deve à predição de uma ligação de hidrogênio adicional entre o nitrogênio piridínico do ligante na pose 2 e um resíduo do sítio ativo, interação essa ausente tanto na estrutura cristalográfica quanto na pose de docking 7. Dessa forma, entende-se que o modelo computacional é eficiente em suas previsões, mas possui limitações que devem ser avaliadas cuidadosamente para cada ligante. Sendo assim, a função de pontuação ASP foi utilizada como base para todos os cálculos de docking subsequentes.

3.3 Ancoramento molecular do ligante citisina (4)

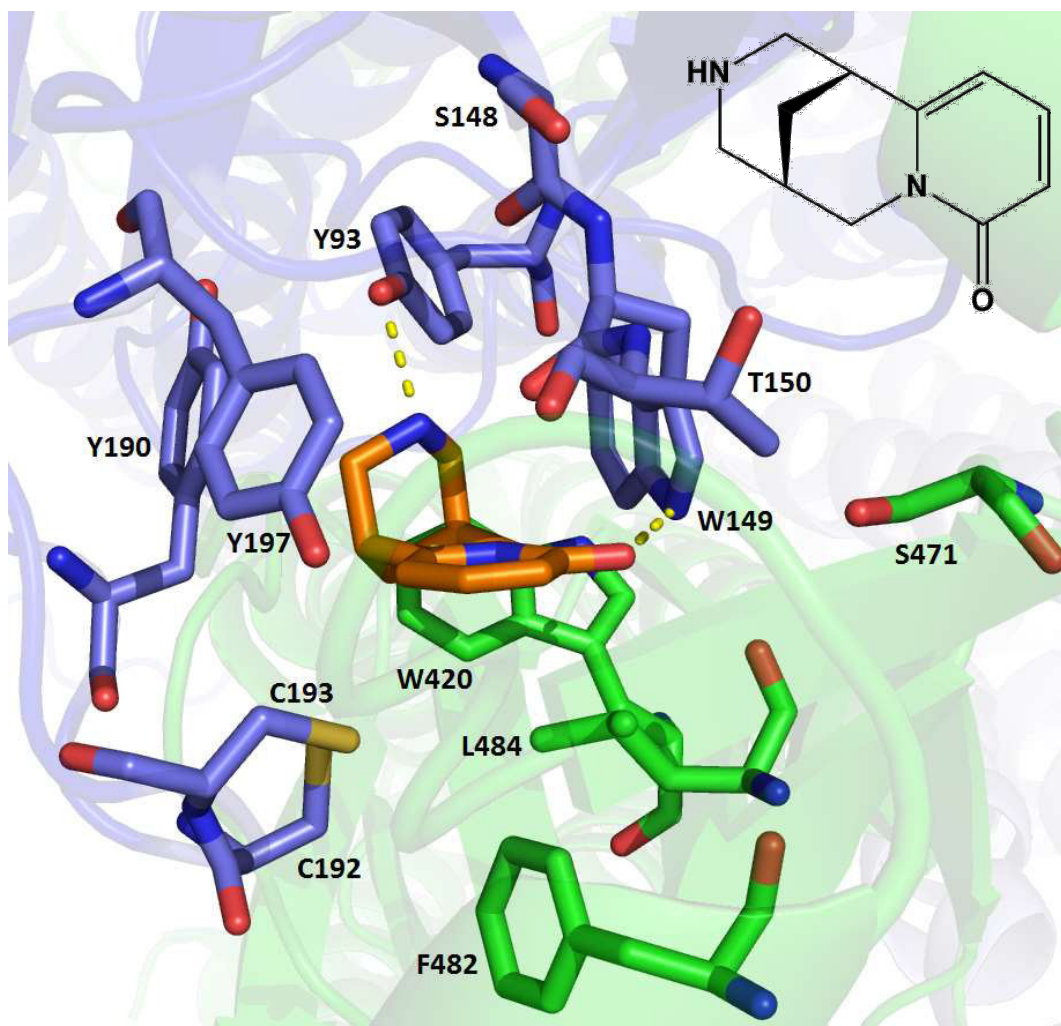
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **4** está relacionada na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **4**.

Citisina (4)	
Pose	Pontuação
8	33,4331
3	33,4005
9	33,2513
4	33,2253
10	33,0556
2	32,9368
6	32,1821
1	32,1329
7	32,0539
5	31,9349

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 8 está representado na Figura 6.

Figura 6 - Interações do ligante **4** com o receptor e estrutura bidimensional.



Para a pose de docking 8, a função de pontuação ASP prediz que o ligante **4** participa de duas ligações de hidrogênio. A primeira delas ocorre entre o oxigênio carbonílico do ligante e o hidrogênio ligado ao nitrogênio indólico do resíduo W149 pertencente à subunidade $\alpha 4$ do receptor, havendo uma distância de 2,02 Å entre os átomos participantes. A segunda ocorre com o nitrogênio do anel aza-bicíclico sendo o aceptor e o oxigênio hidroxílico do resíduo Y93 do lado (+) do sítio ativo, sendo a distância entre os dois átomos 2,23 Å. De acordo com o modelo computacional o átomo de nitrogênio do anel aza-bicíclico também está posicionado favoravelmente em relação ao resíduo W149 para que ocorra uma interação do tipo cátion- π , uma vez que este átomo se encontra protonado em pH fisiológico. Essa interação também existe no complexo nicotina-receptor.

A molécula de citisina (**4**) é um agonista parcial dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$, apresentando $K_i = 2$ nM, $CI_{50} = 50$ nM, e $CE_{50} = 2000$ nM para a conformação em questão do receptor.²⁸

3.4 Ancoramento molecular do fármaco vareniclina (**5**)

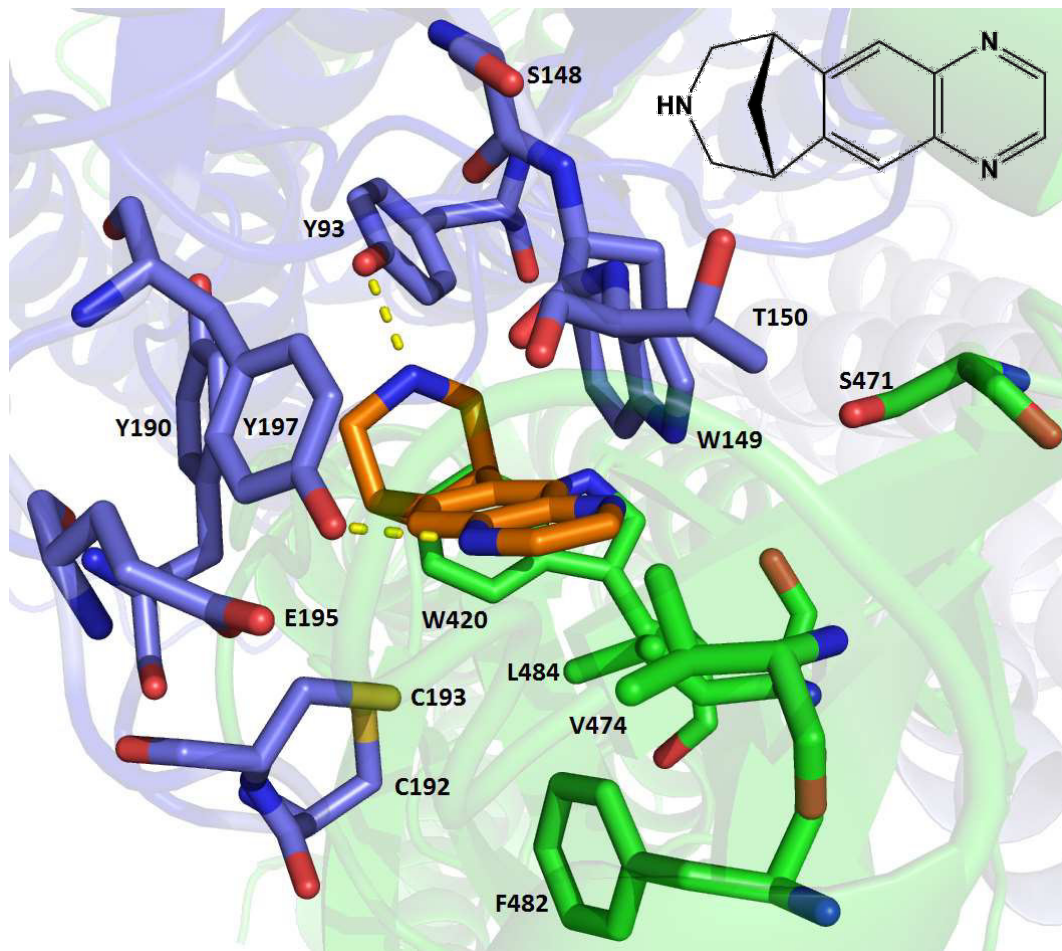
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **5** está relacionada na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o fármaco **5**.

Vareniclina (5)	
Pose	Pontuação
1	43,1506
10	42,3307
6	41,7201
7	41,7152
3	41,5075
2	41,3033
5	41,2683
4	41,0891
9	41,0357
8	37,9122

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 1 está representado na Figura 7.

Figura 7 - Interações do fármaco **5** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP prediz duas interações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 7. A primeira delas ocorre entre o hidrogênio da função hidroxila do resíduo Y197 e um dos átomos de nitrogênio da subunidade quinoxalina do ligante, sendo a distância entre os átomos mencionados 1,66 Å. Os átomos envolvidos na segunda ligação de hidrogênio são o nitrogênio do anel aza-bicíclico de **5** como doador de hidrogênio e o oxigênio da função hidroxila do resíduo de aminoácido Y93 como aceitor, com a distância entre os átomos participantes sendo 1,93 Å, de maneira semelhante ao que ocorre para os complexos nicotina-receptor e citisina-receptor. Analogamente aos casos da nicotina (**3**) e citisina (**4**), o nitrogênio protonável da região aza-bicíclica do fármaco **5** também está localizado em uma região que favorece interações do tipo cátion- π entre o mesmo e o resíduo W149. Esse mesmo átomo de nitrogênio participa também de interações cátion- π com o

resíduo Y197 pertencente a região (+) do sítio ativo. O resíduo F482 pode participar de interações aromáticas do tipo empilhamento-T com a subunidade quinoxalina.

O fármaco vareniclina (**5**) é um agonista parcial dos nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ e apresenta $K_i = 0,12$ nM, $Cl_{50} = 38,9$ nM,²⁹ e $CE_{50} = 950$ nM para o receptor em questão.³⁰

3.5 Ancoramento molecular do ligante epibatidina (**6**)

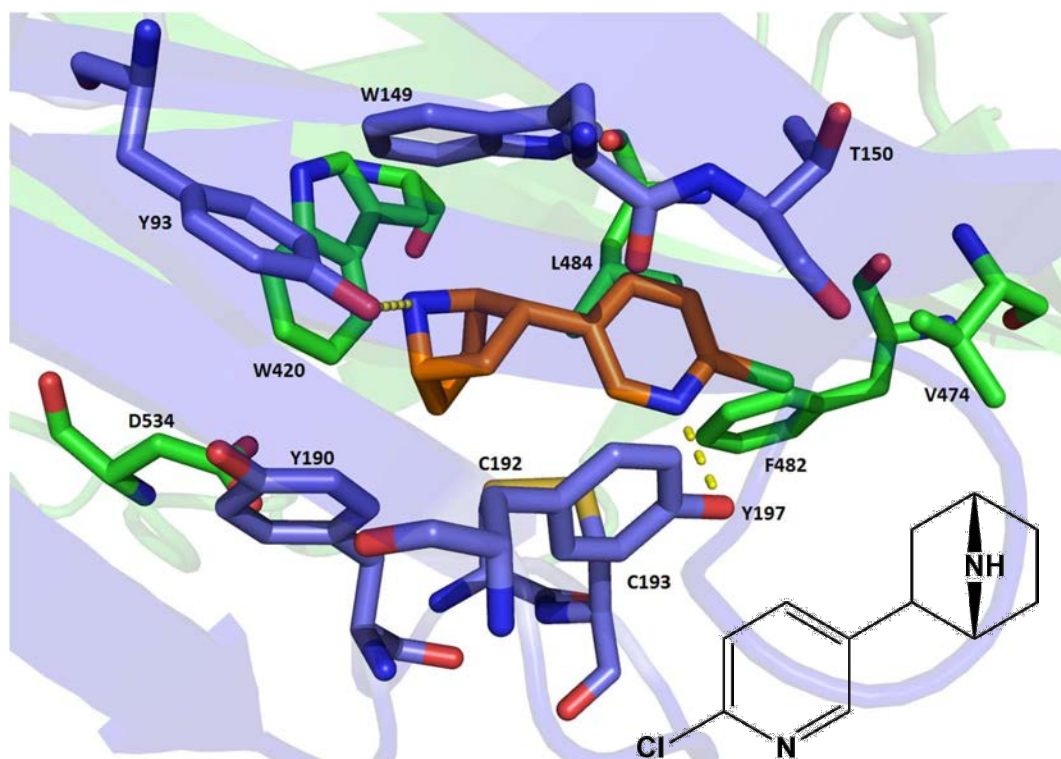
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **6** está relacionada na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **6**.

Epibatidina (6)	
Pose	Pontuação
7	35,9315
5	35,6602
4	35,6529
9	38,0905
2	34,2759
10	33,7562
3	33,1503
6	32,9015
1	32,1416
8	32,0245

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 7 está representado na Figura 8.

Figura 8 - Interações do ligante **6** com o receptor e estrutura bidimensional.



De acordo com a função de pontuação ASP, o ligante **6** se encontra posicionado favoravelmente para que ocorram duas interações cátion- π , ambas envolvendo o nitrogênio protonado do anel aza-bicíclico da molécula. A primeira delas ocorre entre o nitrogênio mencionado e o a cadeia lateral do resíduo W149, uma interação análoga à que existe para o complexo nicotina-receptor e aos demais complexos previamente mencionados. A segunda interação cátion- π ocorre entre o átomo mencionado e o resíduo W420 da região (-) do sítio ativo. A função ASP também estima que existam duas interações de hidrogênio. A primeira envolve os átomos de hidrogênio do resíduo Y197 pertencente ao lado (+) do sítio ativo e o nitrogênio piridínico do ligante, sendo a distância entre os átomos mencionados 2,25 Å. A segunda ocorre entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio protonado do sistema aza-bicíclico de **6** e o oxigênio da função hidroxila do resíduo Y93, com distância entre os átomos mencionados igual a 3,29 Å.

O ligante epibatidina (**6**) é um antagonista dos nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ que apresenta $Cl_{50} = 1,06 \text{ nM}^{31}$ e $K_i = 0,014 \text{ nM}^{37}$ frente ao receptor em questão.

3.6 Ancoramento molecular do ligante sazetidina-A (7) e análogos

3.6.1 Sazetidina-A (7)

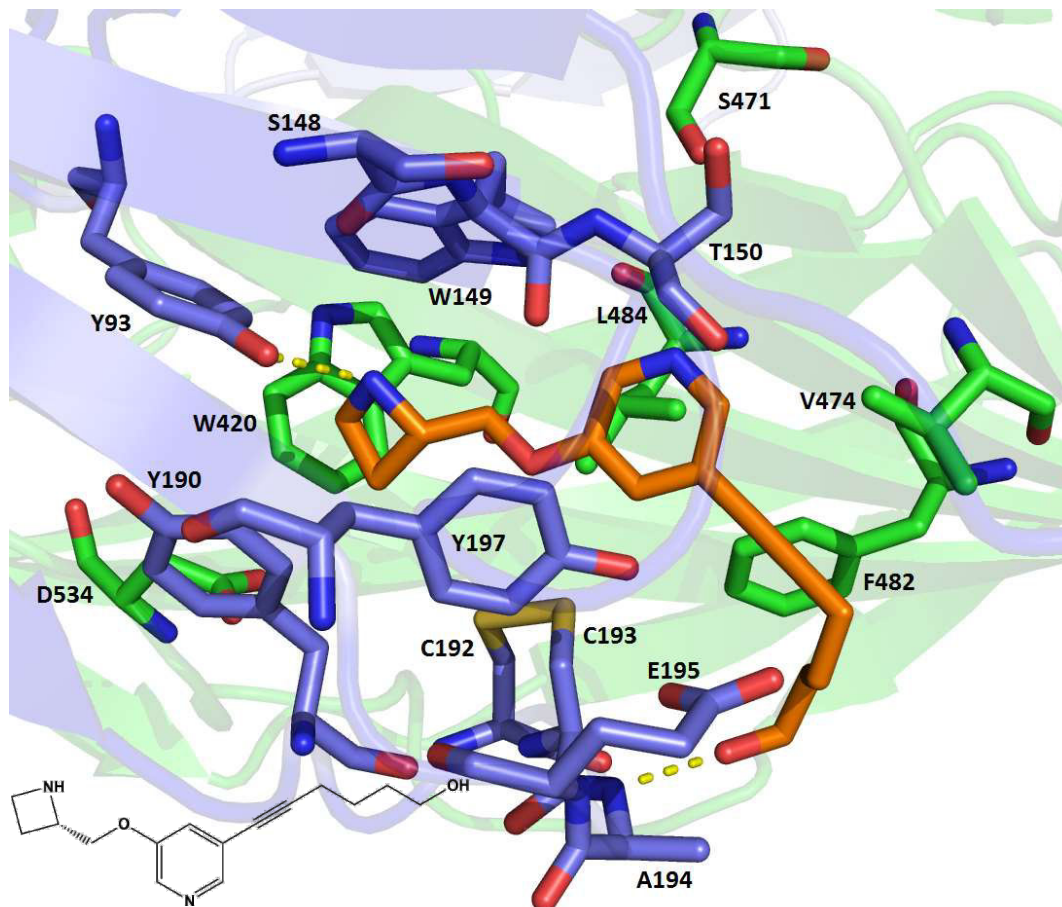
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **7** está relacionada na Tabela 5.

Tabela 5 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **7**.

Sazetidina- A (7)	
Pose	Pontuação
5	44,2933
8	44,0998
4	44,0735
3	43,8103
6	43,7023
2	43,6409
10	43,5505
7	43,4884
1	43,4102
9	43,4074

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 5 está representado na Figura 9.

Figura 9 - Interações do ligante **7** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP prediz a ocorrência de duas ligações de hidrogênio para o complexo em questão. A primeira ocorre entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio protonado do ligante e o oxigênio da cadeia lateral de Y93, pertencente ao lado (+) do sítio ativo, interação esta também presente nos complexos formados para os ligantes citisina (**4**), vareniclina (**5**) e epibatidina (**6**). A distância entre os átomos envolvidos é de 2,04 Å. A segunda tem como aceptor de hidrogênio o oxigênio hidroxílico de **7** e o nitrogênio da ligação peptídica do resíduo A194 como doador, também pertencente à subunidade $\alpha 4$. A distância entre o átomo de oxigênio do ligante e o hidrogênio do resíduo de aminoácido é de 2,41 Å. O nitrogênio protonável do ligante se encontra posicionado em uma região que permite a ocorrência de três interações cátion- π envolvendo os resíduos aromáticos W420, pertencente à subunidade $\beta 2$ do sítio ativo do receptor, W149 e Y190, sendo estes parte da subunidade $\alpha 4$.

O ligante **7** é um agonista parcial do receptor em questão, apresentando $K_i = 0,4$ nM, $Cl_{50} = 4,8$ nM e $CE_{50} = 5,8$ nM.³²

3.6.2 Ancoramento molecular do ligante 8

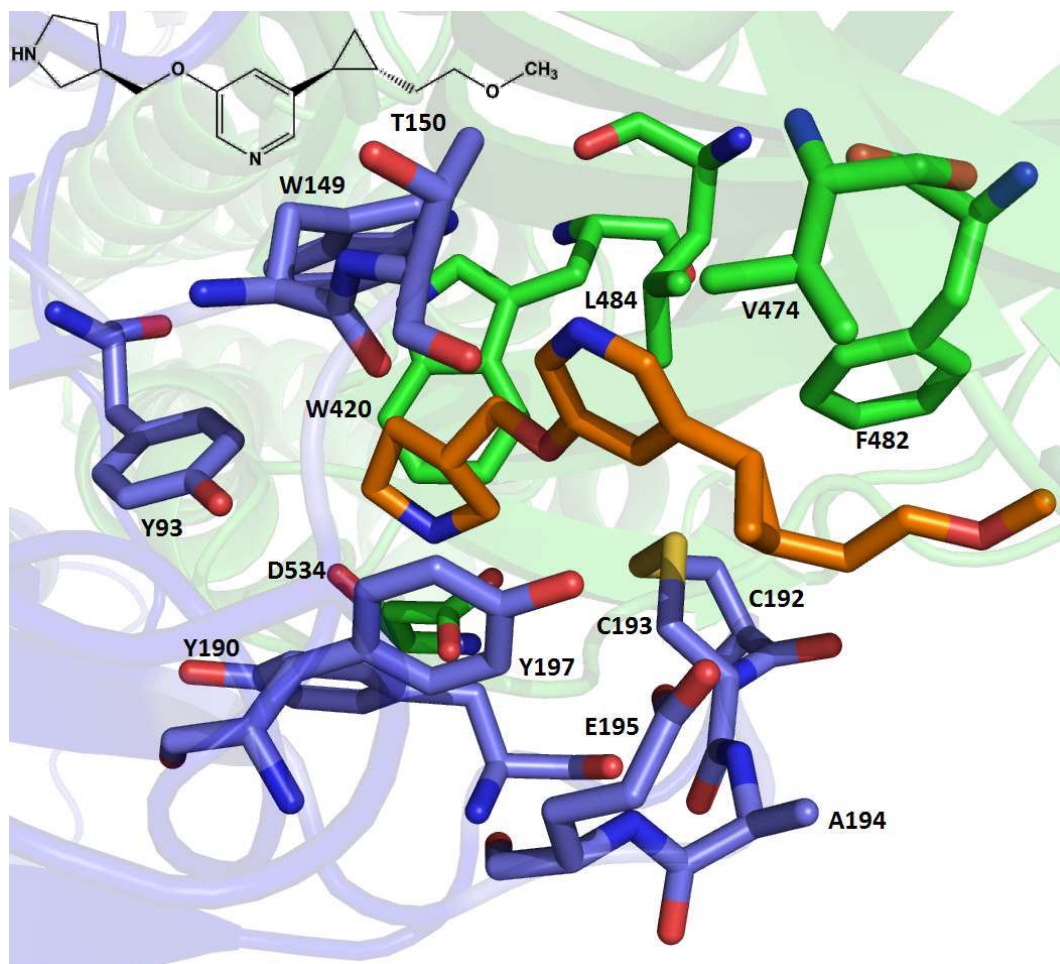
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **8** está relacionada na Tabela 6.

Tabela 6 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **8**.

8	
Pose	Pontuação
9	43,7677
7	43,7250
1	43,4457
2	43,3336
6	43,2623
5	43,1909
10	42,9728
4	42,9397
8	42,3338
3	41,5982

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 9 está representado na Figura 10.

Figura 10 - Interações do ligante **8** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função ASP prediz a presença de duas interações do tipo cátion- π entre o nitrogênio pirrolidínico do ligante e os resíduos W420, Y190 e também uma interação aromática do tipo empilhamento-T entre a subunidade piridina de **8** e o resíduo F482.

O ligante **8** é um agonista parcial desse receptor e apresenta $K_i = 0,05$ nM, $Cl_{50} = 5,5$ nM e $CE_{50} = 6,2$ nM.³³

3.6.3 Ancoramento molecular do ligante **9**

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **9** está relacionada na Tabela 7.

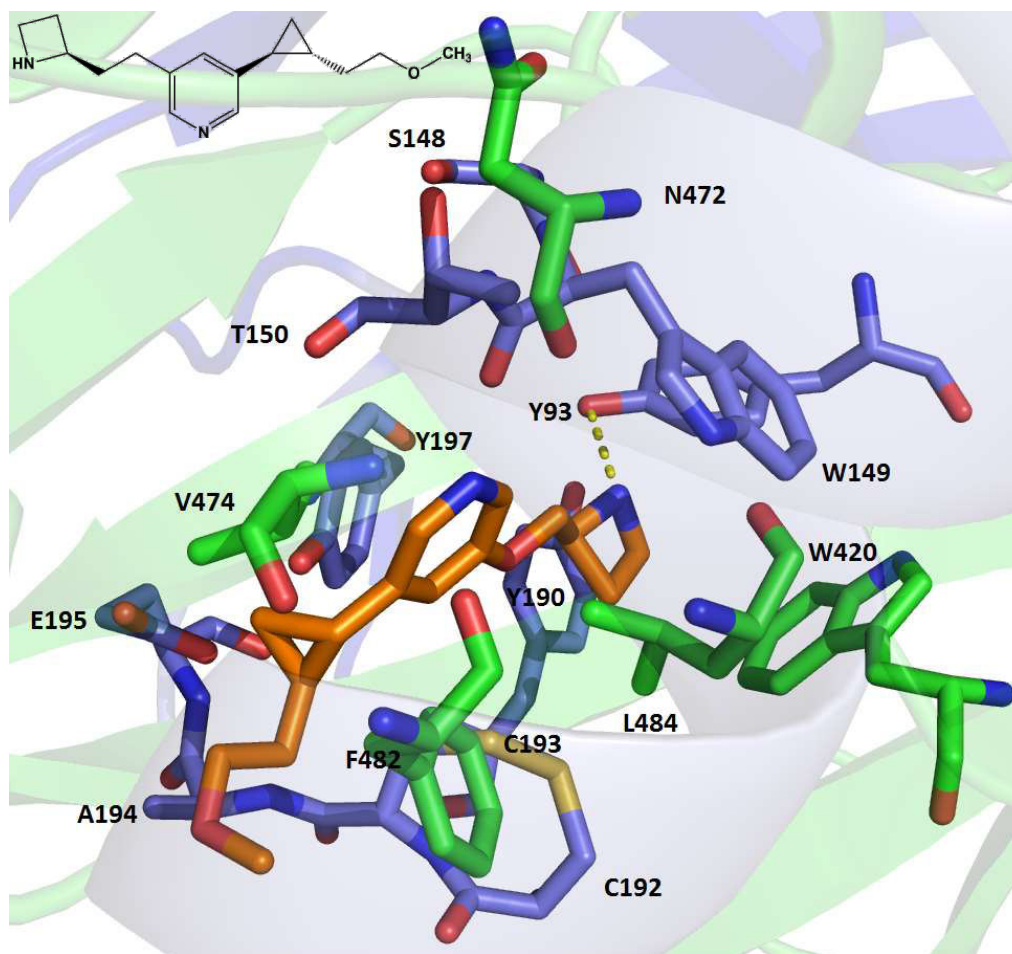
Tabela 7 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **9**.

9	
Pose	Pontuação
9	45,6860

3	45,2114
10	45,1340
4	45,0517
6	44,5133
8	44,4592
1	44,3649
7	44,3211
2	43,9329
5	43,3753

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 9 está representado na Figura 11.

Figura 11 - Interações do ligante **9** com o receptor e estrutura bidimensional.



Para o complexo mostrado na Figura 11, a função de pontuação ASP prediz uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio azetidínico de **9** como doador de hidrogênio e o oxigênio da cadeia lateral do resíduo Y93 como aceptor, com 2,13 Å

de separação entre os átomos participantes. O mesmo átomo de nitrogênio participa também de interações cátion- π com o resíduo W420. O modelo prediz também a ocorrência de um empilhamento-T entre o resíduo F482 e o subunidade piridina do ligante.

O derivado da sazetidina –A (7) **9** é um agonista parcial que apresenta $K_i = 0,1$ nM, $Cl_{50} = 5,6$ nM e $CE_{50} = 17,5$ nM para o receptor em questão.³³

3.6.4 Ancoramento molecular do ligante 10

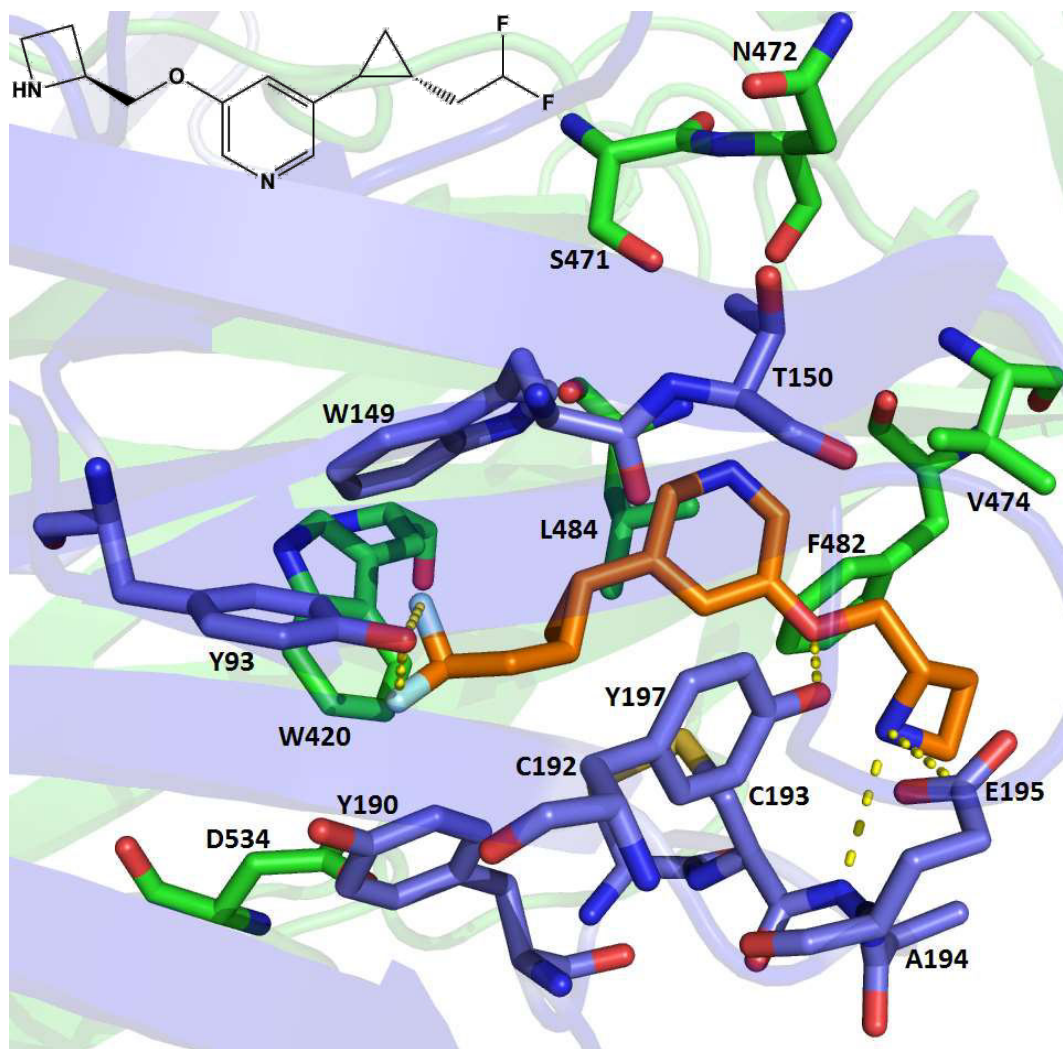
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **10** está relacionada na Tabela 8.

Tabela 8 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **10**.

10	
Pose	Pontuação
7	48,3805
6	47,8786
1	47,5934
2	46,8545
5	46,3789
8	45,8881
9	45,7674
4	45,5252
3	44,6210
10	44,1686

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 7 está representado na Figura 12.

Figura 12 - Interações do ligante **10** com o receptor e estrutura bidimensional.



Segundo o modelo computacional, o ligante **10** participa de cinco interações de hidrogênio. A primeira delas ocorre entre o nitrogênio da ligação peptídica do resíduo A194 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio azetidínico do ligante, com distância de 2,80 Å entre eles. A segunda ocorre entre o oxigênio diretamente ligado ao sistema aromático do ligante e o hidrogênio da função hidroxila proveniente do resíduo Y197. A distância entre os átomos que participam dessa interação é de 2,18 Å. A terceira das ligações de hidrogênio presentes nesse complexo ocorre entre o nitrogênio azetidínico do ligante e a cadeia lateral do resíduo E195. Essa interação também possui caráter iônico, uma vez que ambos os heteroátomos envolvidos encontram-se ionizados em pH fisiológico e a distância entre o hidrogênio do ligante e o oxigênio aceitor é de 3,10 Å. Por fim, as duas últimas ligações de hidrogênio ocorrem entre os

átomos de flúor de **10** e o hidrogênio da função hidroxila do resíduo Y93, com distância entre os átomos participantes de 2,87 Å e 3,10 Å. O modelo computacional prevê também uma interação do tipo cátion- π entre o nitrogênio protonado de **10** e o resíduo F482 da subunidade $\beta 2$ do sítio ativo. Esse mesmo resíduo participa também de um empilhamento-T com a subunidade piridina do ligante.

O ligante **10** apresenta $K_i = 0,1$ nM, $CE_{50} = 8,8$ nM e $CI_{50} = 8,6$ nM frente ao alvo em questão.³⁵

3.6.5 Ancoramento molecular do ligante 11

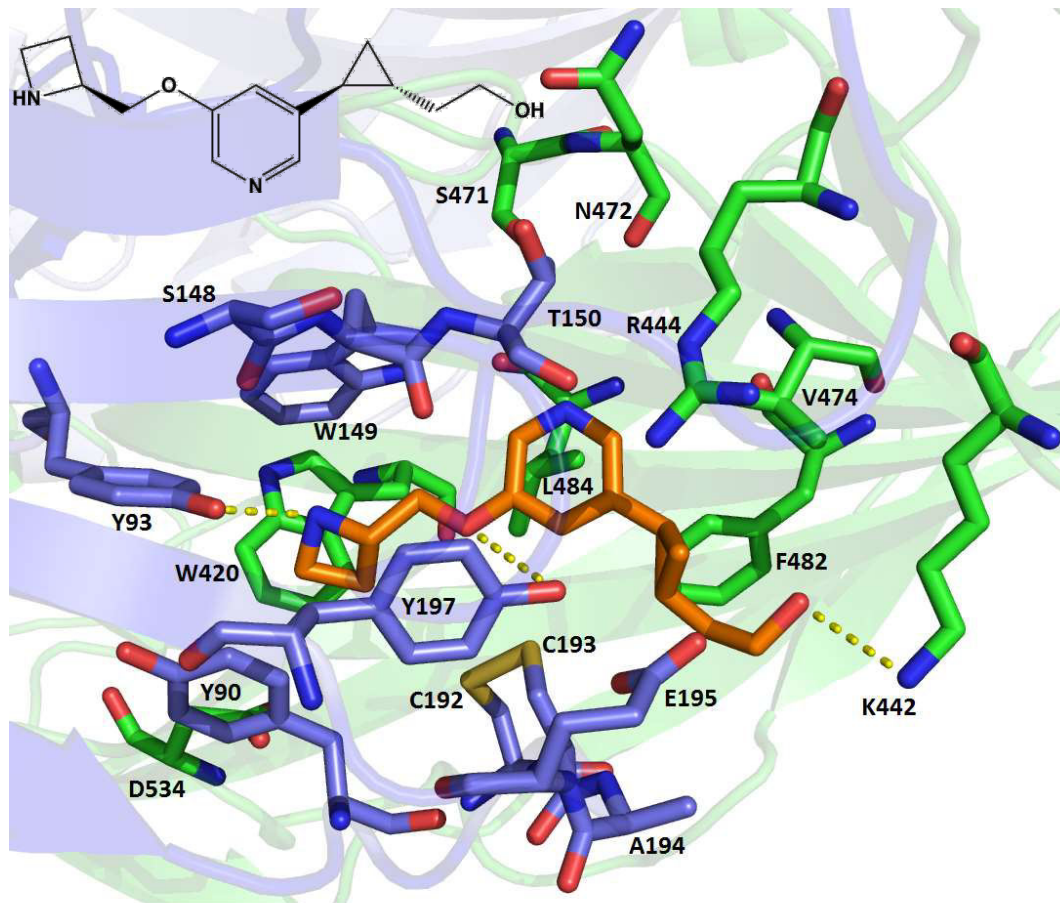
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **11** está relacionada na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **11**.

11	
Pose	Pontuação
2	44,5399
1	44,5288
4	44,1215
9	43,7791
7	43,7406
8	43,5465
10	43,0828
6	42,7101
3	42,6316
5	41,5174

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 2 está representado na Figura 13.

Figura 13 - Interações do ligante **11** com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional prevê três interações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 13. Na primeira delas o nitrogênio azetidínico atua como doador de hidrogênio e o oxigênio do resíduo Y93 como aceptor, sendo a distância entre os átomos participantes 2,30 Å. A segunda envolve o oxigênio ligado a subunidade piridina do ligante e o átomo de hidrogênio da função hidroxila do resíduo Y197, com distância de 3,63 Å entre os átomos. A terceira ligação de hidrogênio tem como átomo doador de hidrogênio o nitrogênio da cadeia lateral do resíduo K442 e como aceptor o oxigênio da função hidroxila do ligante. A distância entre os átomos citados é de 3,74 Å. O sistema aromático piridina de **11** interage com o resíduo F482 em um empilhamento-T. De acordo com a função ASP, o nitrogênio azetidínico protonado do ligante também pode participar de interações cátion- π com os resíduos W420 da região (-) do sítio ativo, W149 e Y190 pertencentes à subunidade β 2.

O ligante **11** apresenta $K_i = 0,1$ nM, $CE_{50} = 10,2$ nM e $CI_{50} = 9,4$ nM para o receptor em questão.³²

3.6.6 Ancoramento molecular do ligante 12

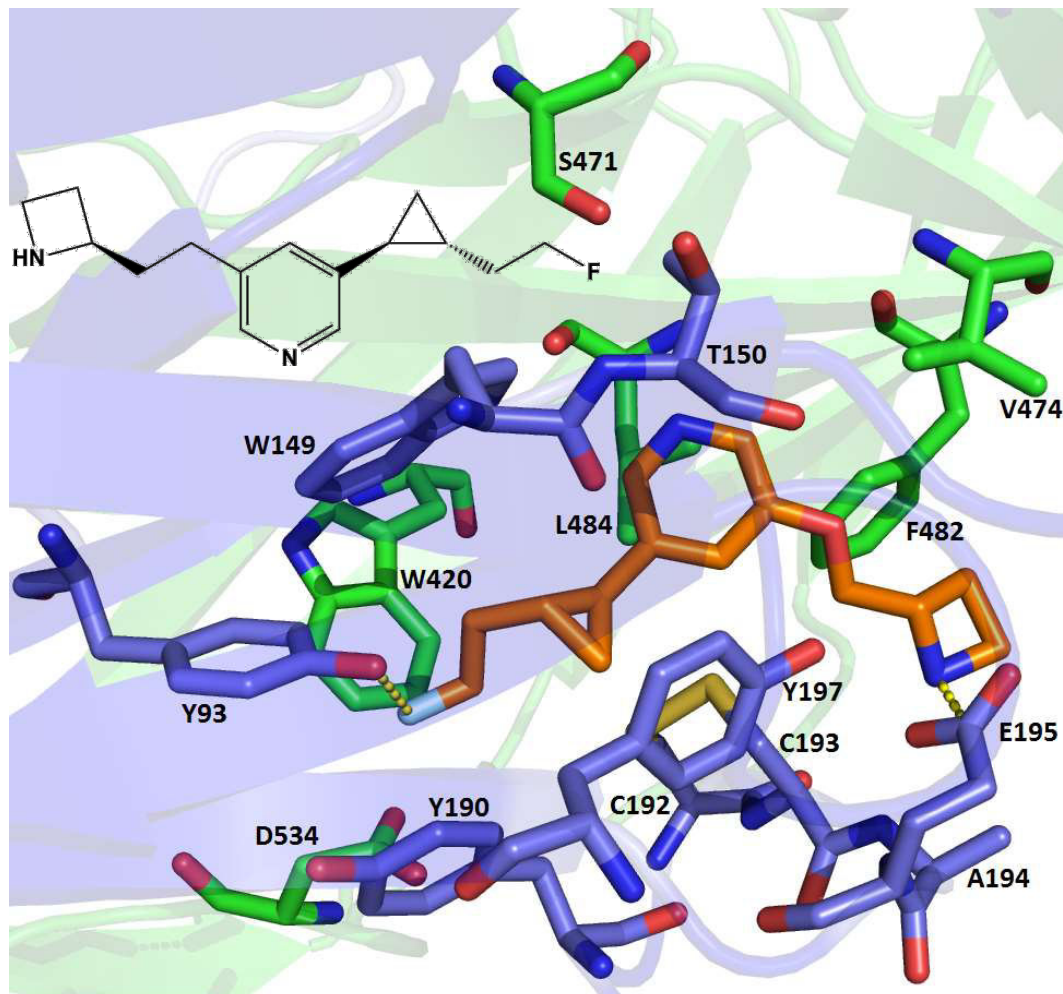
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **12** está relacionada na Tabela 10.

Tabela 10 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **12**.

12	
Pose	Pontuação
1	46,7536
8	45,7638
2	44,4844
10	44,3821
9	44,3004
4	44,2657
7	44,1659
5	43,9008
6	43,4432
3	43,2279

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 1 está representado na Figura 14.

Figura 14 - Interações do ligante **12** com o receptor e estrutura bidimensional.



De acordo com a função de pontuação ASP, o nitrogênio azetidínico de **12** participa como doador em uma ligação de hidrogênio envolvendo um oxigênio do resíduo E195 comoceptor, uma interação que possui caráter iônico visto que os envolvidos estarão ionizados em pH fisiológico. A distância entre os átomos participantes é de 2,81 Å. O modelo prevê também que o átomo de flúor do ligante se encontra em uma posição favorável à uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo Y93, com 3,61 Å de separação entre os participantes. O sistema aromático piridina do ligante interage com o resíduo F482 em uma interação de empilhamento- π , respectivamente.

O ligante **12** apresenta $K_i = 0,2$ nM, $CE_{50} = 11,3$ nM e $CI_{50} = 10,2$ nM para o receptor em questão.³⁵

3.6.7 Ancoramento molecular do ligante 13

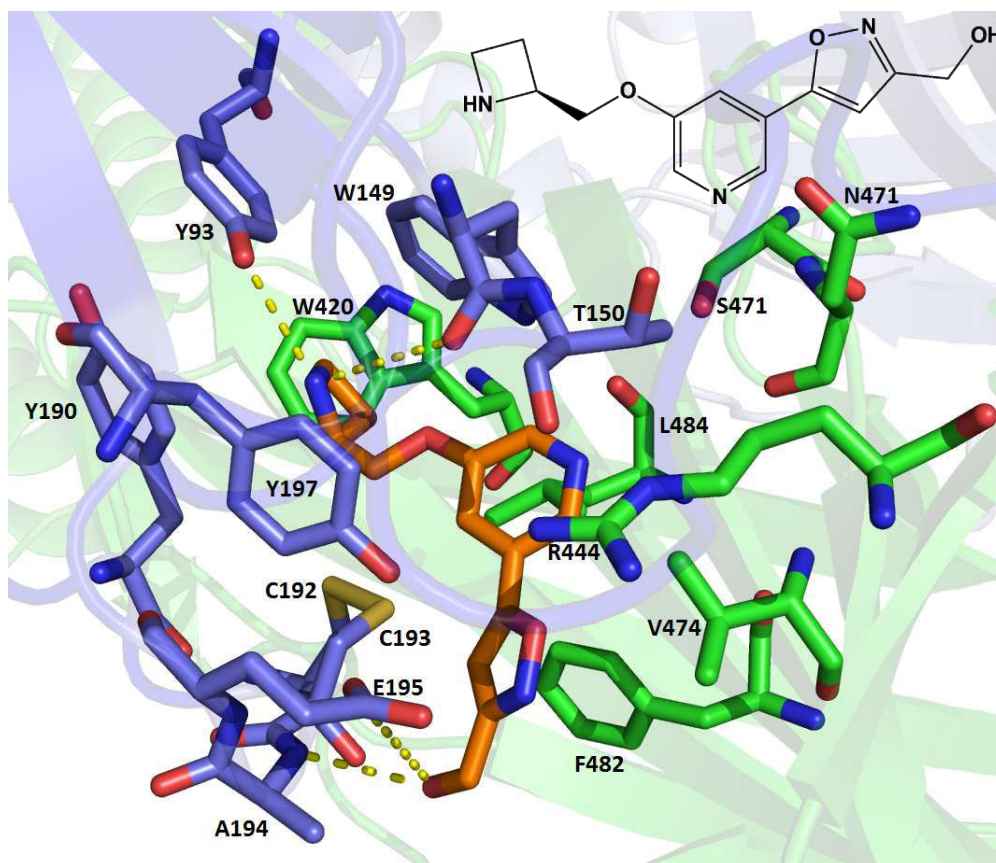
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **13** está relacionada na Tabela 11.

Tabela 11 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **13**.

13	
Pose	Pontuação
6	47,2335
4	46,4762
8	46,2767
3	46,1525
5	46,1496
1	46,0320
7	45,7287
9	45,5776
2	45,5032
10	44,2454

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 6 está representado na Figura 15.

Figura 15 - Interações do ligante **13** com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional prediz a presença de quatro ligações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 15. As duas primeiras têm como átomo doador de hidrogênio o nitrogênio azetidínico do ligante, envolvendo o oxigênio da cadeia lateral do resíduo Y93 e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149, com distância entre os átomos envolvidos de 2,95 Å e 3,65 Å, respectivamente. As demais têm como átomo doador o oxigênio da função hidroxila do ligante **13**. O átomo aceitor na primeira delas é o nitrogênio da ligação peptídica do resíduo A194. Para a segunda, um oxigênio integrante do grupo ionizado da cadeia lateral do resíduo E195 atua como aceitor. As distâncias entre os átomos envolvidos em ambas as ligações é de 2,38 Å e 3,61 Å, respectivamente. A função indica também que o nitrogênio azetidínico participa de interações cátion- π envolvendo os resíduos W420 da subunidade $\beta 2$ do sítio ativo, W149, Y190 e Y197 da subunidade $\alpha 4$.

O ligante **13** apresenta $K_i = 0,31$ nM, $CE_{50} = 25$ nM e $CI_{50} = 16$ nM para o receptor estudado.³⁶

3.6.8 Ancoramento molecular do ligante 14

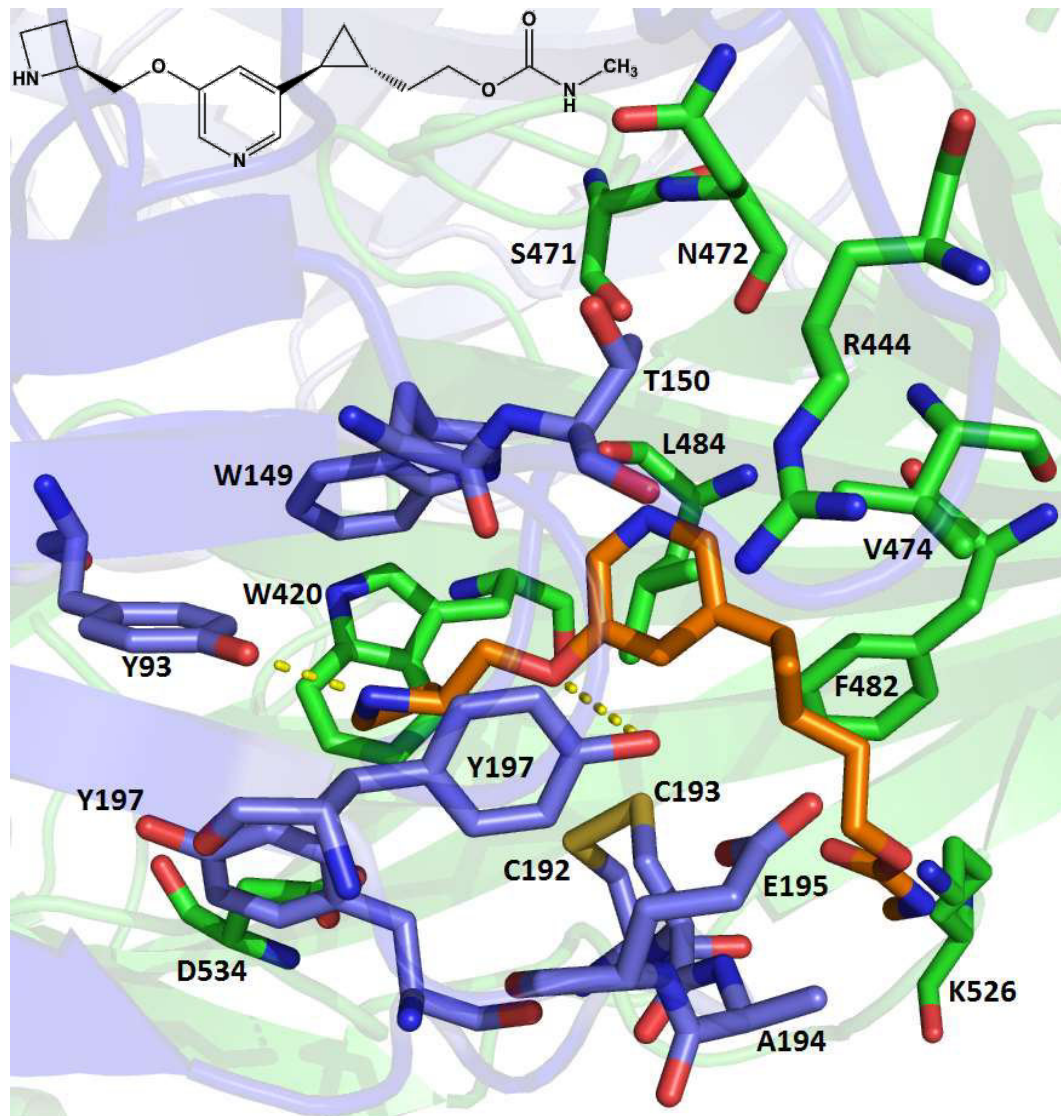
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **14** está relacionada na Tabela 12.

Tabela 12 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **14**.

14	
Pose	Pontuação
7	49,5029
5	48,8850
8	48,8126
9	48,0618
10	47,6264
3	47,4321
2	46,8447
6	46,8023
1	46,3024
4	45,8444

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 7 está representado na Figura 16.

Figura 16 - Interações do ligante **14** com o receptor e estrutura bidimensional.



Para o complexo representado na Figura 16, a função ASP indica a ocorrência de duas interações de hidrogênio. A primeira ocorre entre o hidrogênio ligado ao nitrogênio azetidínico de **14** e o oxigênio da função hidroxila pertencente à cadeia lateral do resíduo Y93, com 2,64 Å de separação entre os átomos envolvidos. A segunda envolve o átomo de hidrogênio da função hidroxila do resíduo Y197 e o par de elétrons do oxigênio diretamente ligado ao sistema aromático piridina do ligante, com distância de 3,59 Å entre os átomos participantes. O modelo prevê também interações cátion- π nas quais o nitrogênio azetidínico de **14** interage com as cadeias

laterais dos resíduos W420, W149 e Y197 e um empilhamento-T envolvendo a subunidade piridina do ligante e o resíduo F482.

O ligante **14** apresenta $K_i = 1,7$ nM, $CE_{50} = 15,7$ nM e $CI_{50} = 18,2$ nM frente ao receptor em questão.³²

3.6.9 Ancoramento molecular do ligante 15

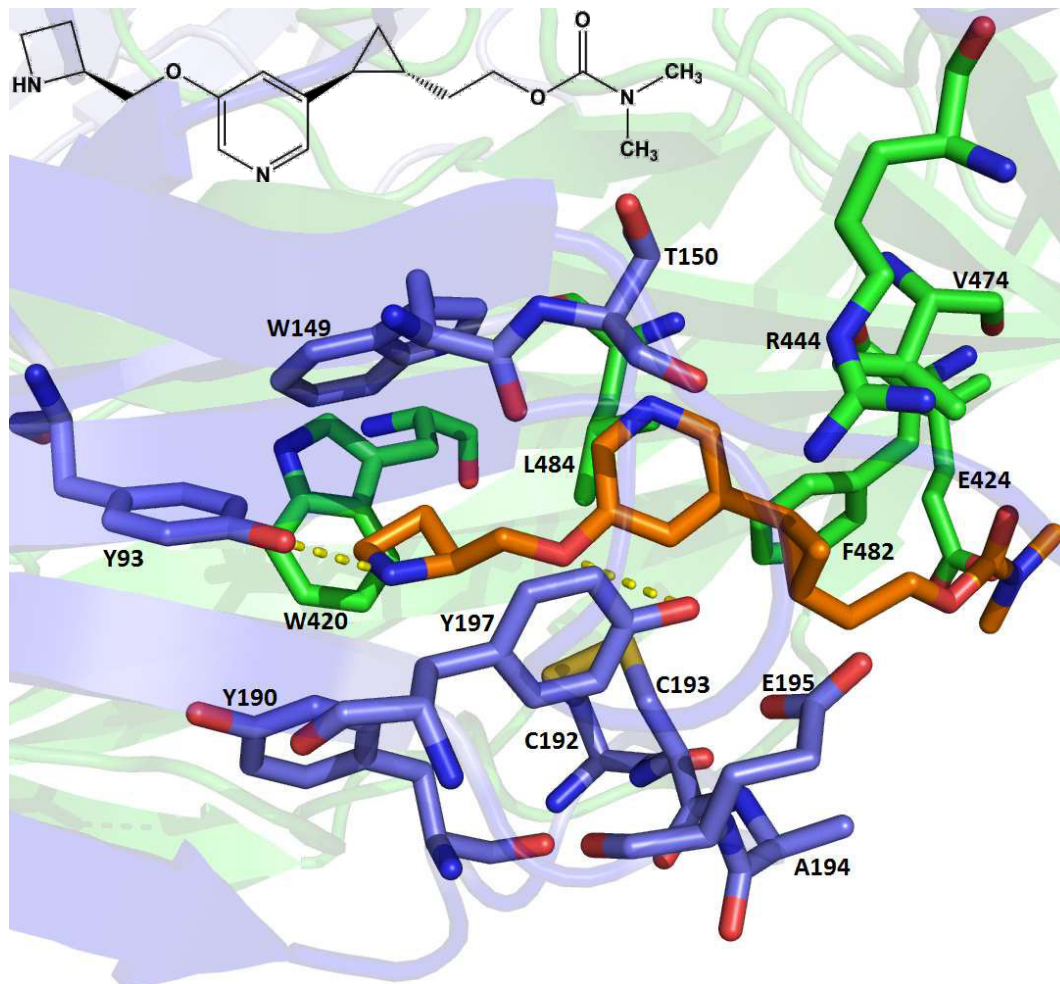
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **15** está relacionada na Tabela 13.

Tabela 13 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **15**.

15	
Pose	Pontuação
10	49,8524
2	49,7908
7	49,6580
1	49,6188
5	49,0122
6	48,7924
4	48,3026
3	48,1488
8	48,0725
9	47,1459

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 10 está representado na Figura 17.

Figura 17 - Interações do ligante **15** com o receptor e estrutura bidimensional.



De acordo com o modelo computacional, duas interações de hidrogênio são possíveis para o complexo representado na Figura 17. A primeira delas envolve o nitrogênio azetidínico como átomo doador de hidrogênio e o oxigênio da função hidroxila do resíduo Y93 como aceptor. Com distância de 2,33 Å entre os átomos mencionados. A segunda ocorre com o hidrogênio ligado ao oxigênio da função hidroxila do resíduo Y197 e o oxigênio ligado ao sistema aromático do ligante, sendo a distância entre esses átomos 3,43 Å. O nitrogênio protonável de **15** também pode participar de interações do tipo cátion- π com os resíduos W149, W420 e Y190.

O ligante **15** apresenta $K_i = 0,4$ nM, $CE_{50} = 18,2$ e $CI_{50} = 19,1$ nM para o receptor em questão.³²

3.6.10 Ancoramento molecular do ligante 16

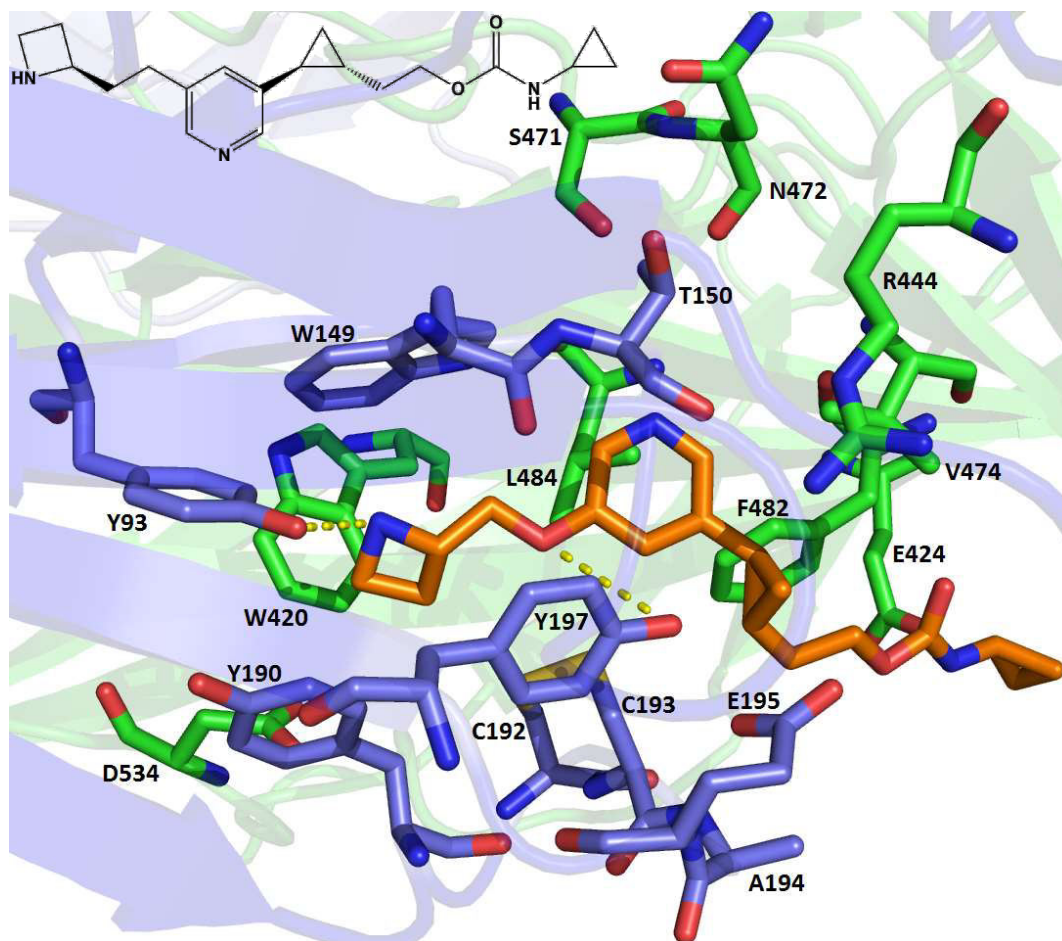
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **16** está relacionada na Tabela 14.

Tabela 14 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **16**.

16	
Pose	Pontuação
10	49,5684
8	49,2714
4	48,5911
7	47,9216
6	47,6443
9	47,4419
2	46,4243
1	46,3977
3	45,5014
5	45,4251

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 10 está representado na Figura 18.

Figura 18 - Interações do ligante **16** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP indica a possibilidade de duas ligações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 18. A primeira delas envolve o nitrogênio azetidínico de **16** como doador e o oxigênio hidroxílico do resíduo Y93 como aceitor, com 2,45 Å de separação entre os envolvidos. A segunda ocorre entre o hidrogênio hidroxílico do resíduo Y197 e o oxigênio ligado ao sistema aromático piridina do ligante, sendo a distância entre os átomos mencionados igual a 3,69 Å. O modelo prevê também interações cátion- π entre o nitrogênio protonável de **16** e os resíduos Y190 e W149 pertencentes à subunidade $\alpha 4$ do sítio ativo e W420 pertencente à região (-). O resíduo F482 participa de interações aromáticas do tipo empilhamento-T com sistema aromático piridina do ligante.

O ligante **16** apresenta $K_i = 0,7$ nM, $CE_{50} = 23,3$ nM e $CI_{50} = 19,6$ nM frente ao receptor e questão.³²

3.6.11 Ancoramento molecular do ligante 17

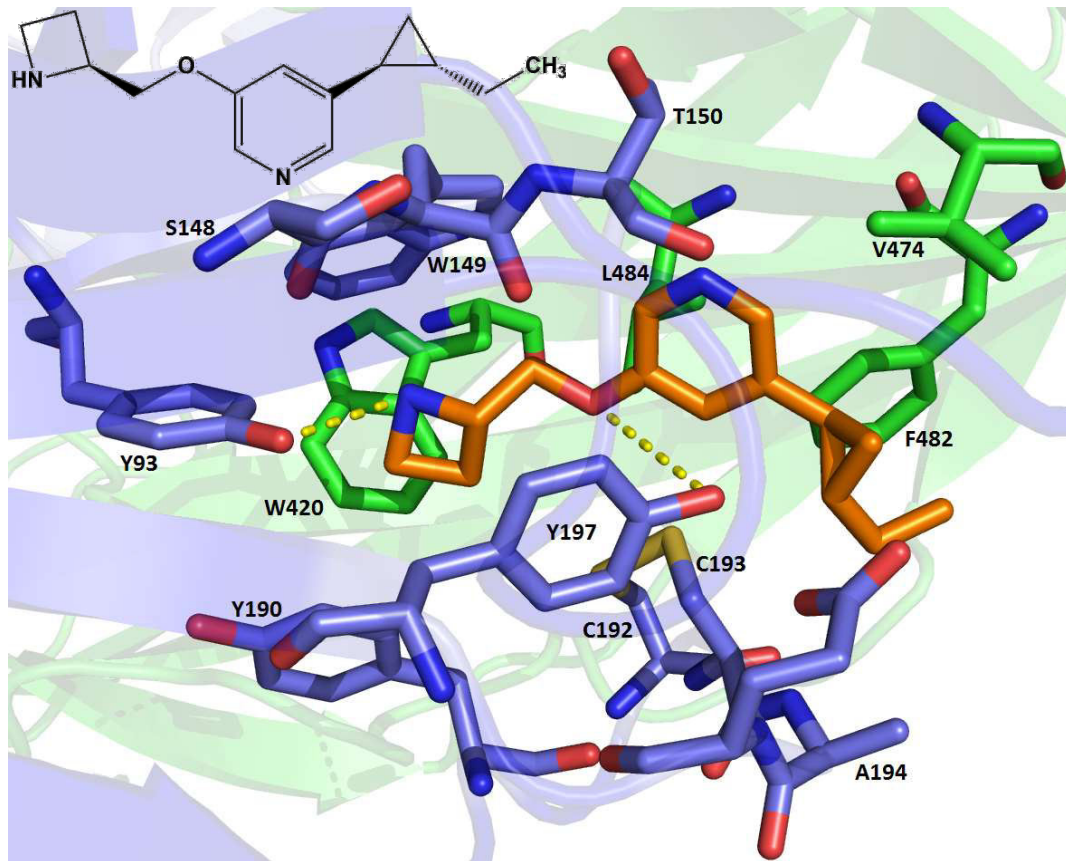
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **17** está relacionada na Tabela 15.

Tabela 15 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **17**.

17	
Pose	Pontuação
10	42,9535
7	42,8161
5	42,6433
8	42,4339
9	42,0770
3	42,0086
6	41,8232
1	41,6005
4	41,3579
2	41,1273

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 10 está representado na Figura 19.

Figura 19 - Interações do ligante **17** com o receptor e estrutura bidimensional.



De acordo com a função de pontuação ASP, duas ligações de hidrogênio são possíveis. A primeira delas envolve o nitrogênio azetidínico do ligante como doador de hidrogênio e o oxigênio hidroxílico do resíduo Y93 como aceitor. A distância entre os átomos participantes é de 2,72 Å. A segunda delas ocorre entre o hidrogênio hidroxílico do resíduo Y197 e o oxigênio ligado ao sistema aromático piridina de **17**, com 3,96 Å de separação entre os átomos envolvidos. O nitrogênio azetidínico também interage com as cadeias laterais dos resíduos W420, Y190 e W149 em interações do tipo cátion- π . O resíduo F482 participa de um empilhamento-T com o sistema aromático piridina do ligante.

O ligante **17** apresenta $K_i = 0,4$ nM, $CE_{50} = 19,1$ nM e $CI_{50} = 22,2$ nM para o receptor em questão.³⁵

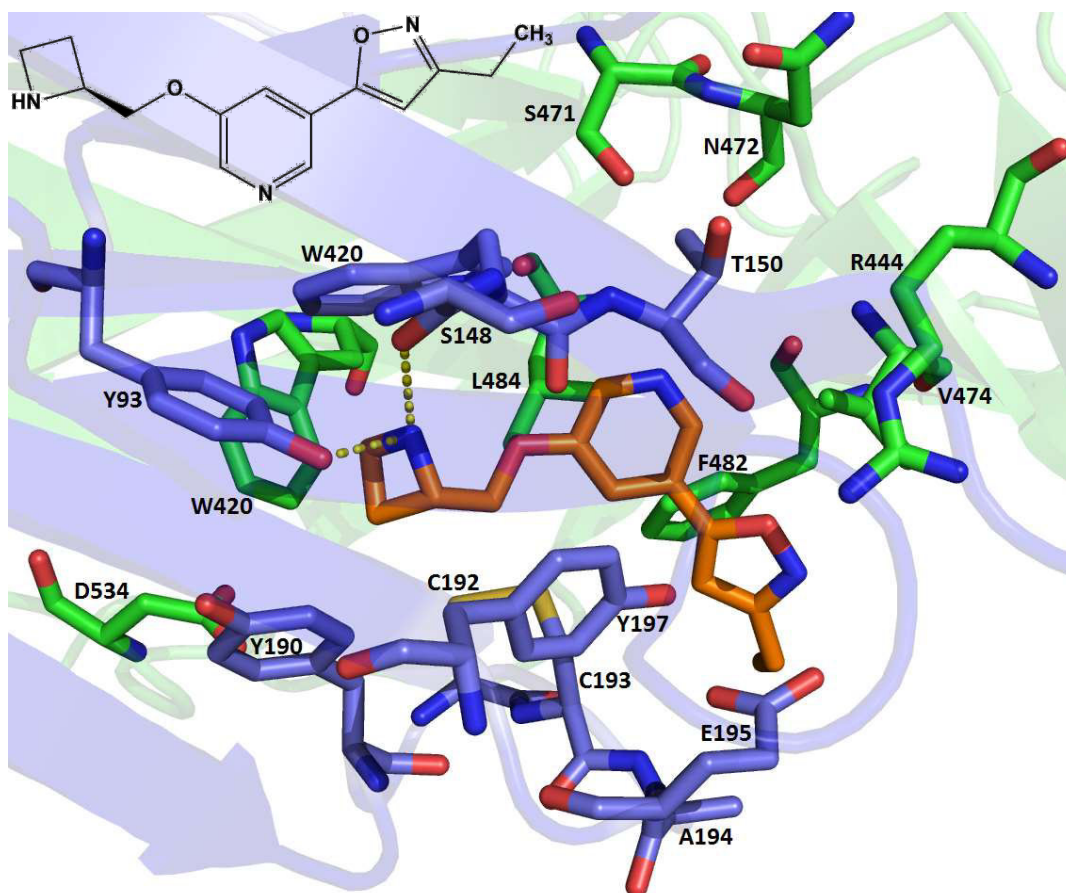
3.6.12 Ancoramento molecular do ligante 18

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **18** está relacionada na Tabela 16.

Tabela 16 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **18**.

18	
Pose	Pontuação
1	46,0546
3	45,9194
2	45,8875
9	45,8503
10	45,8386
4	45,7271
5	45,5161
8	45,4292
6	45,4065
7	44,6246

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 2 está representado na Figura 20.

Figura 20 - Interações do ligante **18** com o receptor e estrutura bidimensional.

O modelo computacional indica a possibilidade de duas interações de hidrogênio onde o nitrogênio azetidínico de **18** atua como doador. Na primeira delas o átomo acceptor é o oxigênio da cadeia lateral do resíduo Y93 e o acceptor da segunda ligação é o átomo de oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo S148, sendo a distância entre os átomos envolvidos igual a 3,59 Å e 3,80 Å, respectivamente. O nitrogênio já citado se encontra protonado em pH fisiológico, podendo participar de interações do tipo cátion- π com a cadeia lateral do resíduo W149. A função de pontuação indica também que o resíduo F482 pode participar de um empilhamento-T com o sistema piridínico de **18**.

O ligante **18** apresenta $K_i = 0,4$ nM, $CE_{50} = 51$ nM e $CI_{50} = 32$ nM frente ao receptor estudado.²⁹

3.6.13 Ancoramento molecular do ligante 19

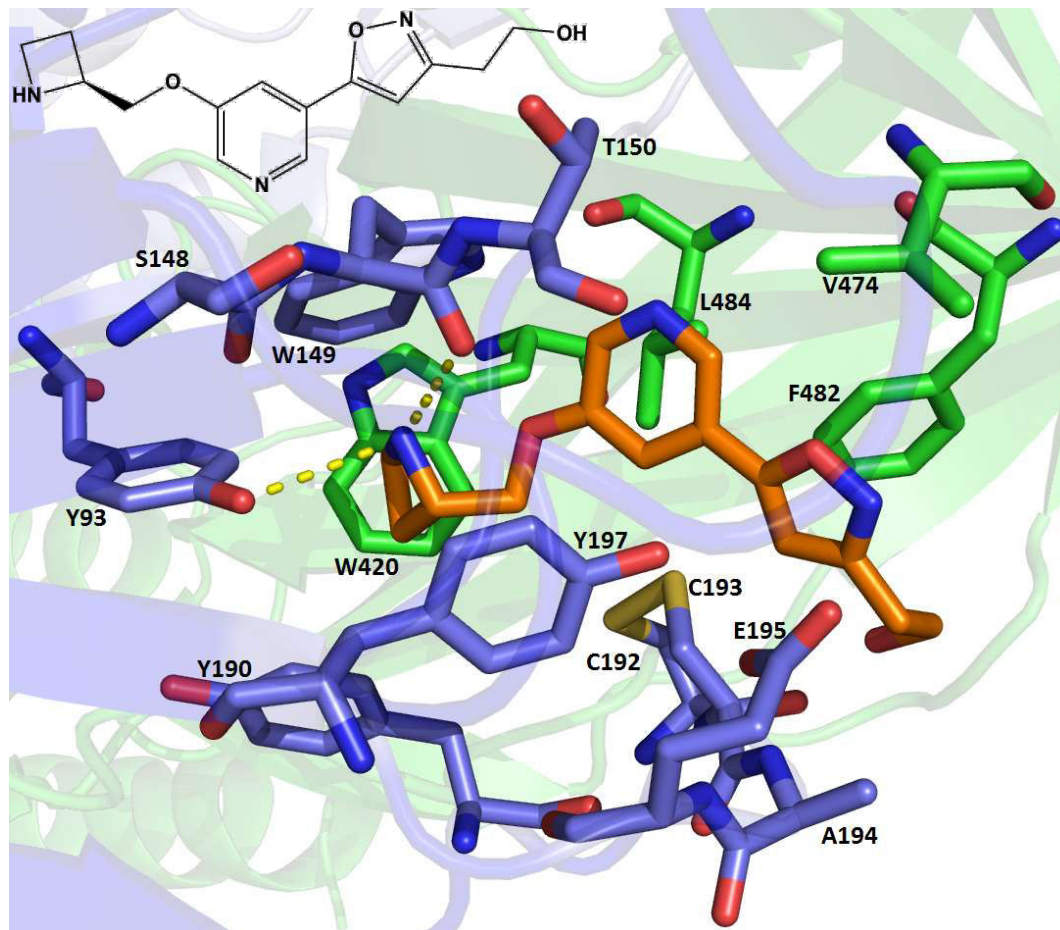
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **19** está relacionada na Tabela 17.

Tabela 17 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **19**.

19	
Pose	Pontuação
1	47,5220
2	47,3400
7	47,2833
4	46,8112
10	46,7544
9	46,6059
6	46,5082
5	46,1794
8	46,0087
3	45,9220

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 1 está representado na Figura 21.

Figura 21 - Interações do ligante **19** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP prediz a ocorrência de duas ligações de hidrogênio, sendo o átomo de nitrogênio protonável do ligante o doador em ambos os casos. A primeira delas envolve o oxigênio da cadeia lateral do resíduo Y93 como aceptor, com 2,65 Å de separação entre os participantes, e a segunda ocorre entre o nitrogênio já citado e tem o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 como aceptor, sendo a distância entre os envolvidos 2,98 Å. O modelo indica também que o nitrogênio azetidínico de **19** interaja com a cadeia lateral do resíduo W149 em uma interação cátion- π e que o resíduo F482 pode participar de um empilhamento-T com o sistema pirdínico de **19** e de um empilhamento- π deslocado paralelamente com o anel isoxazólico do mesmo.

O ligante **19** apresenta $K_i = 0,6$ nM, $CE_{50} = 43$ nM e $CI_{50} = 32$ nM frente ao receptor em questão.²⁹

3.6.14 Ancoramento molecular do ligante 20

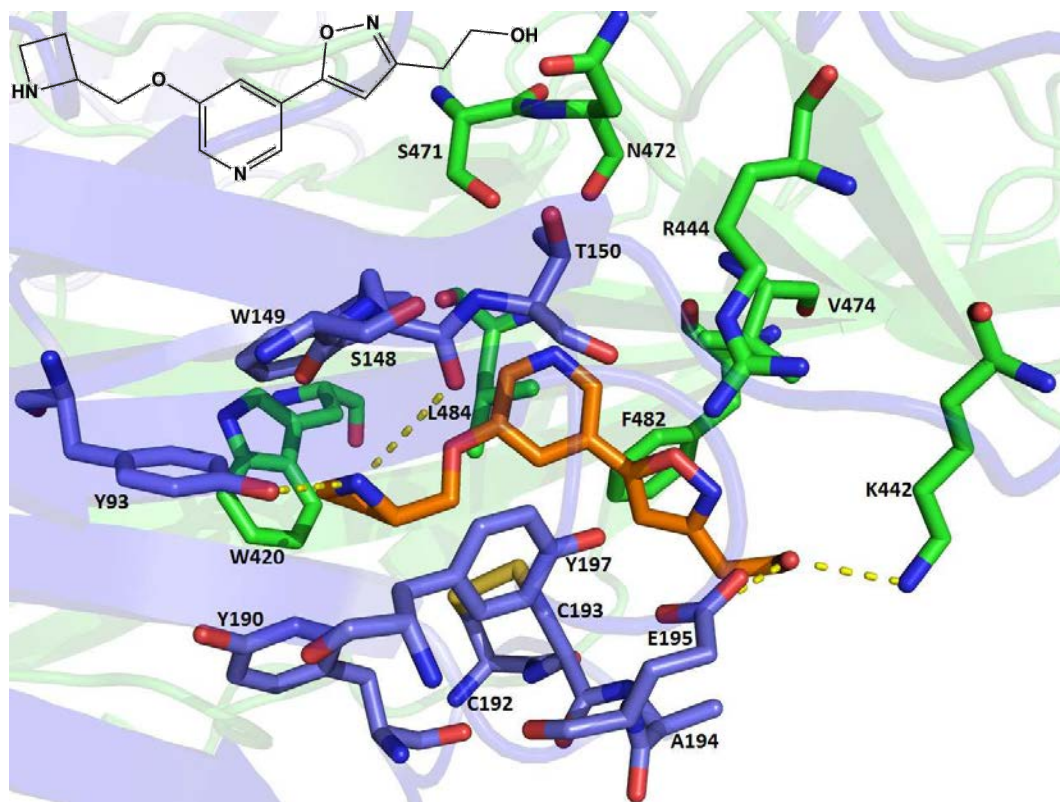
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **20** está relacionada na Tabela 18.

Tabela 18 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **20**.

20	
Pose	Pontuação
2	47,9000
5	47,4447
9	47,2334
1	47,0821
10	47,0640
3	46,7123
6	46,6697
4	46,5853
7	46,2948
8	46,2528

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 2 está representado na Figura 22.

Figura 22 - Interações do ligante **20** com o receptor e estrutura bidimensional.



Para o caso mostrado na Figura 22 a função ASP indica a ocorrência de quatro ligações de hidrogênio. Nas duas primeiras delas o nitrogênio azetidínico atua como doador de hidrogênio, com o átomo de oxigênio hidroxílico do resíduo Y93 sendo aceitor de uma delas e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 sendo o aceitor de outra. As distâncias entre os participantes são de 2,40 Å e 3,29 Å, respectivamente. As outras duas tem como participante o oxigênio da função hidroxila de **20**. Esse oxigênio atua como doador de hidrogênio para um oxigênio da cadeia lateral do resíduo E195, com 2,58 Å de separação entre os participantes, e como aceitor para a cadeia lateral do resíduo K442, sendo a distância entre os participantes igual a 2,22 Å. Segundo o modelo computacional, o átomo de nitrogênio azetidínico participa de interações cátion- π com os resíduos W149 e Y190 e o resíduo F482 participa de um empilhamento-T com a subunidade piridina.

O ligante **20** apresenta $K_i = 0,37$ nM, $CE_{50} = 110$ nM e $CI_{50} = 44$ nM frente ao receptor estudado.³⁶

3.7 Ancoramento molecular do ligante bupropiona (21) e análogos

3.7.1 Bupropiona (21)

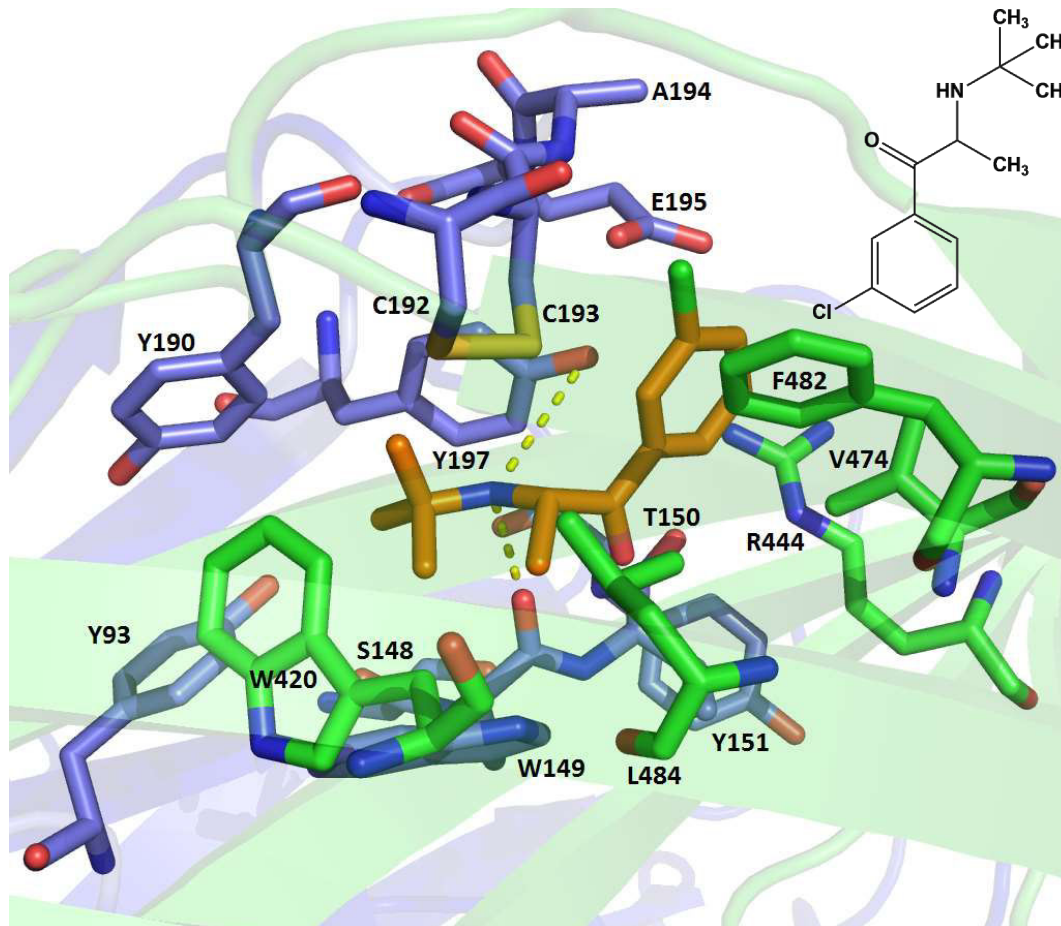
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **21** está relacionada na Tabela 19.

Tabela 19 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **21**.

21	
Pose	Pontuação
3	28,6382
10	28,1836
6	28,1209
2	27,2677
5	26,6412
9	26,3813
4	26,1269
1	25,8597
7	22,1639
8	21,115

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 3 está representado na Figura 23.

Figura 23 - Interações do ligante **21** com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional prevê duas interações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 23, ambas envolvendo o nitrogênio azetidínico protonável do ligante **21**. Na primeira delas o átomo citado atua como doador de hidrogênio e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 atua como aceptor, com distância de 2,15 Å entre os átomos envolvidos. Essa interação também está presente no cristal nicotina-receptor. A segunda ocorre de maneira semelhante, com oxigênio hidroxílico pertencente ao resíduo Y197 atuando como aceptor, sendo a distância entre os átomos envolvidos 3,25 Å. O nitrogênio azetidínico também participa de interações cátion- π com os resíduos Y197 e W149.

O ligante bupropiona (**21**) apresenta $Cl_{50} = 12 \mu M$ para o receptor estudado.³⁴

3.7.2 Ancoramento molecular do ligante 22

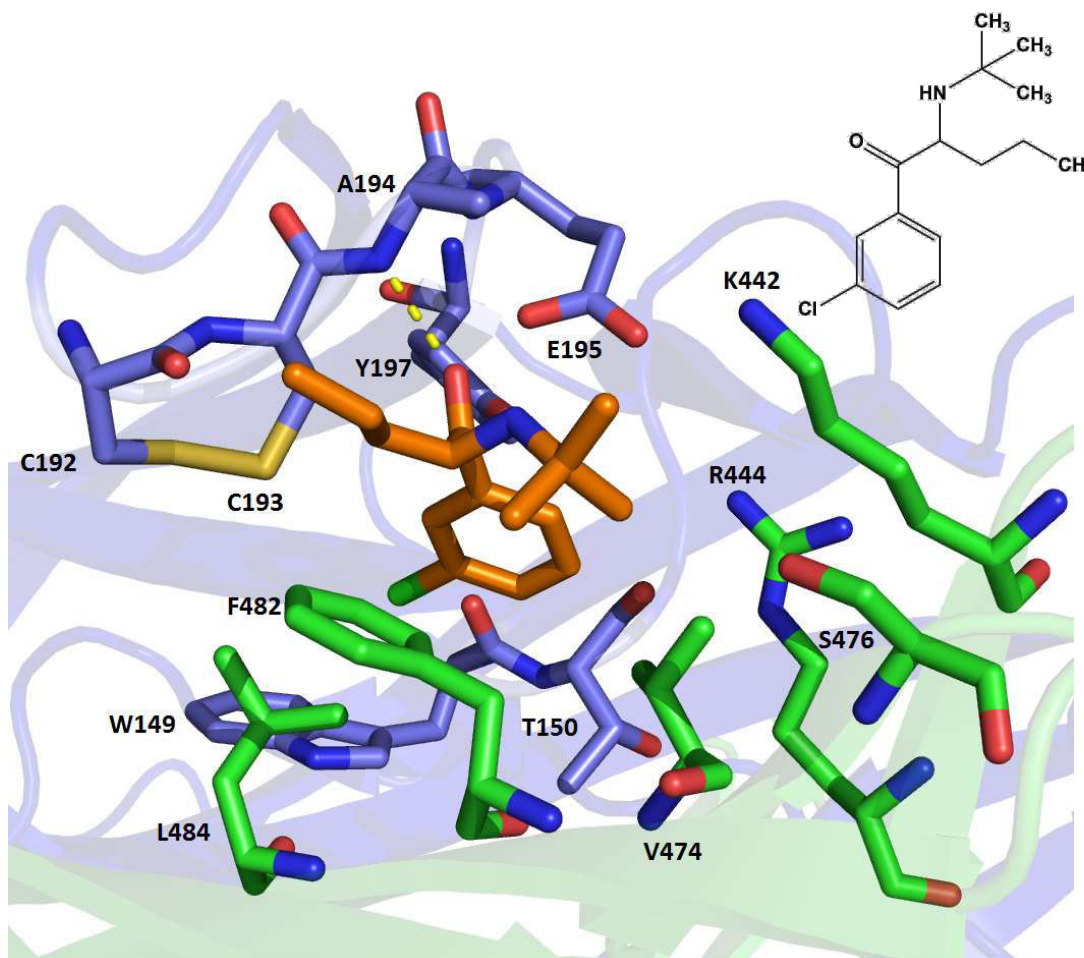
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **22** está relacionada na Tabela 20.

Tabela 20 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **22**.

22	
Pose	Pontuação
9	21,0437
2	20,3911
8	20,3571
1	19,8421
7	19,7685
5	19,1452
4	18,6476
3	18,4880
10	18,4704
6	18,3957

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 9 está representado na Figura 24.

Figura 24 - Interações do ligante **22** com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional prevê a ocorrência de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico de **22** e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica do resíduo A194 pertencente à subunidade $\alpha 4$ que compõe o sítio ativo. O átomo de nitrogênio protonado se encontra idealmente posicionado para que ocorra uma interação cátion- π entre o mesmo e o resíduo F482 do lado (-) do sítio ativo. Outra interação prevista pela função ASP é o empilhamento-T entre o resíduo F482 e a subunidade aromática de **22**.

O ligante **22** apresenta $Cl_{50} = 7,7 \mu M$ para o receptor estudado.³⁴

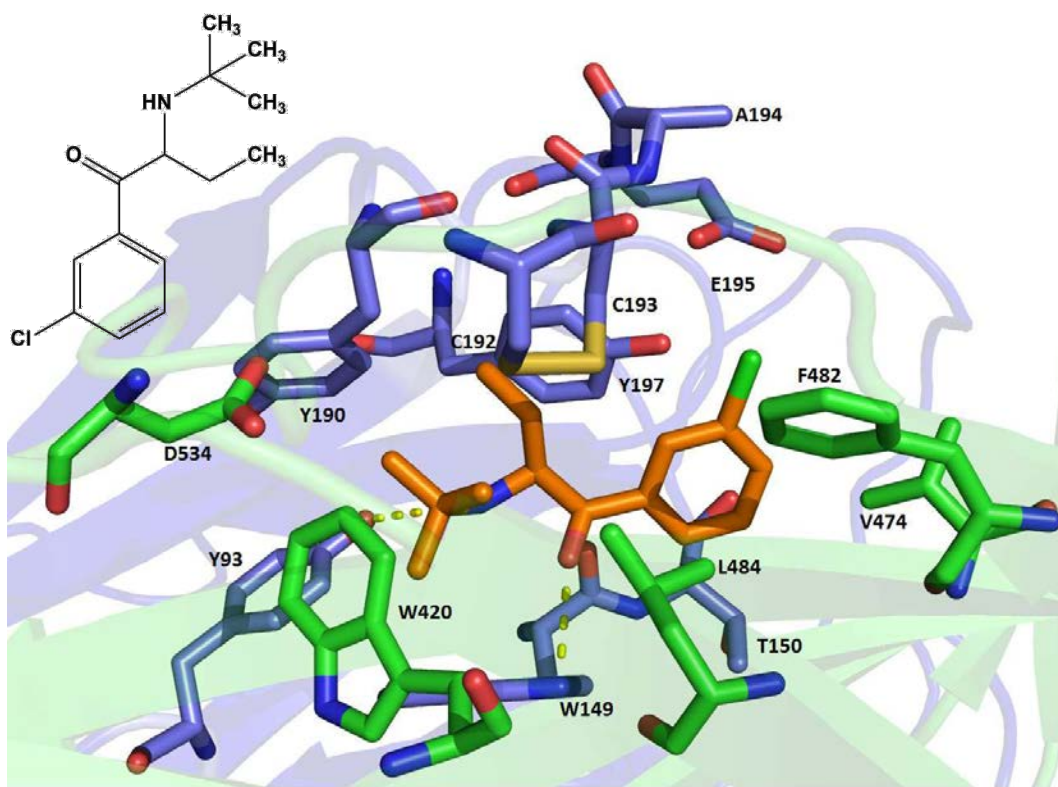
3.7.3 Ancoramento molecular do ligante 23

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **23** está relacionada na Tabela 21.

Tabela 21 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **23**.

23	
Pose	Pontuação
8	25,3861
6	21,1505
2	19,5902
10	18,6783
5	18,5604
3	18,4458
1	18,2477
4	18,0966
9	17,6017
7	17,2189

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 8 está representado na Figura 25.

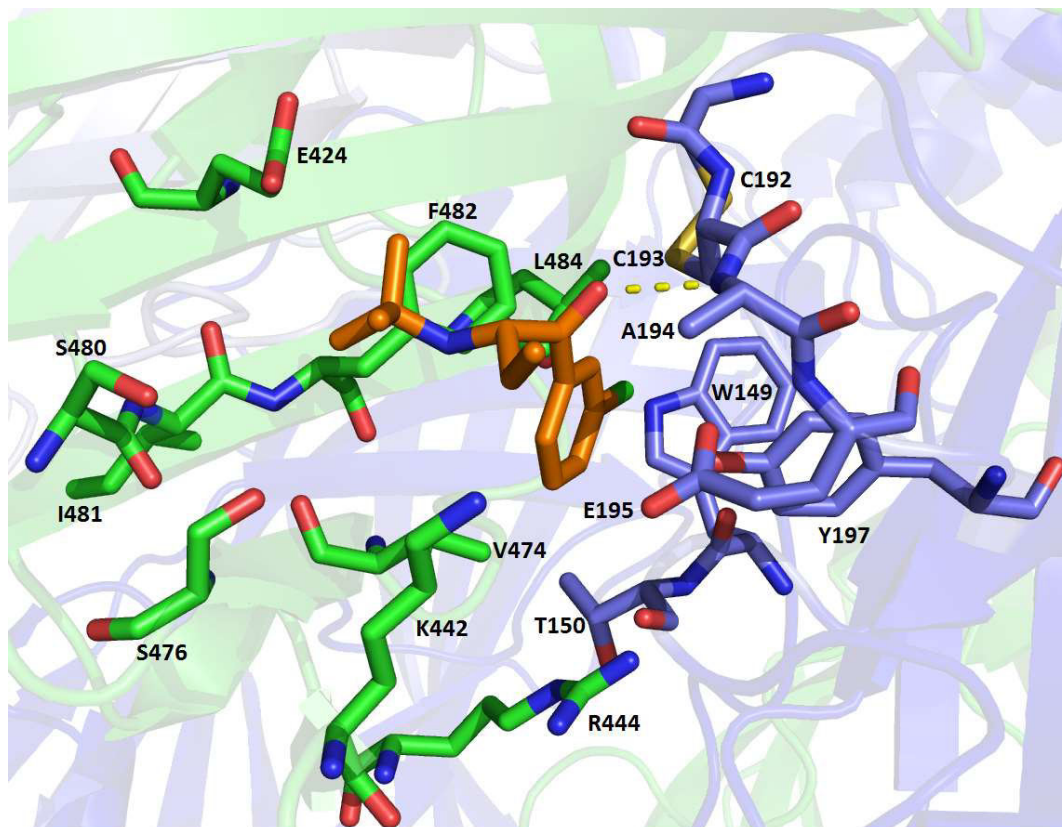
Figura 25 - Interações do ligante **23** na pose 8 com o receptor e estrutura bidimensional.

De acordo com o modelo computacional, o ligante se encontra posicionado de modo que exista duas ligações de hidrogênio. A primeira delas envolve o hidrogênio

ligado ao nitrogênio protonável do ligante e o átomo de oxigênio da função hidroxila do resíduo Y93, sendo a distância entre os átomos participantes igual a 3,17 Å. A segunda ocorre entre o hidrogênio do anel indólico do resíduo W149 e o oxigênio carbonílico do ligante **23**, com a distância entre estes átomos sendo 2,94 Å. O nitrogênio protonável do ligante participa também de duas interações cátion- π envolvendo os resíduos W149 e Y197, ambos pertencentes à subunidade $\alpha 4$ do sítio ativo. A função ASP prediz uma interação aromática do tipo empilhamento-T entre a subunidade aromática cloro-substituída do ligante e o resíduo F482 pertencente ao lado (-) do sítio ativo.

Devido à diferença considerável entre a pontuação das duas melhores poses de docking, torna-se necessária a análise de ambas para melhor entendimento da situação. O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 6 está representado na Figura 26.

Figura 26 - Interações do ligante **23** na pose 6 com o receptor.



Para essa pose, a função ASP prediz a ocorrência de somente uma ligação de hidrogênio envolvendo o oxigênio carbonílico do ligante comoceptor de hidrogênio e o nitrogênio da ligação peptídica do resíduo A194 como doador, com distância de 2,09 Å entre os átomos participantes. O modelo também indica a possibilidade de uma interação cátion- π entre o nitrogênio protonável de **23** e a cadeia lateral do resíduo F482 e uma interação aromática do tipo empilhamento- π envolvendo esse mesmo resíduo e a subunidade aromática do ligante.

Comparando as interações presentes em cada uma das duas poses acima descritas, nota-se que elas são muito distintas. A única interação semelhante às duas poses ocorre entre a subunidade aromática e o resíduo F482, que são interações aromáticas de empilhamento em ambos os casos. Nota-se também que para a pose 6 o grupo *t*-butila está posicionado em uma região onde não ocorrem interações hidrofóbicas significativas. Dessa forma percebe-se o motivo da diferença entre as pontuações das duas poses, uma vez que as pontuações fornecidas pela função ASP

são baseadas em potenciais gerados a partir das frequências de interação entre os átomos do ligante e do receptor.

O ligante **23** apresenta $CI_{50} = 8,6 \mu M$ frente ao receptor estudado.³⁴

3.7.4 Ancoramento molecular do ligante 24

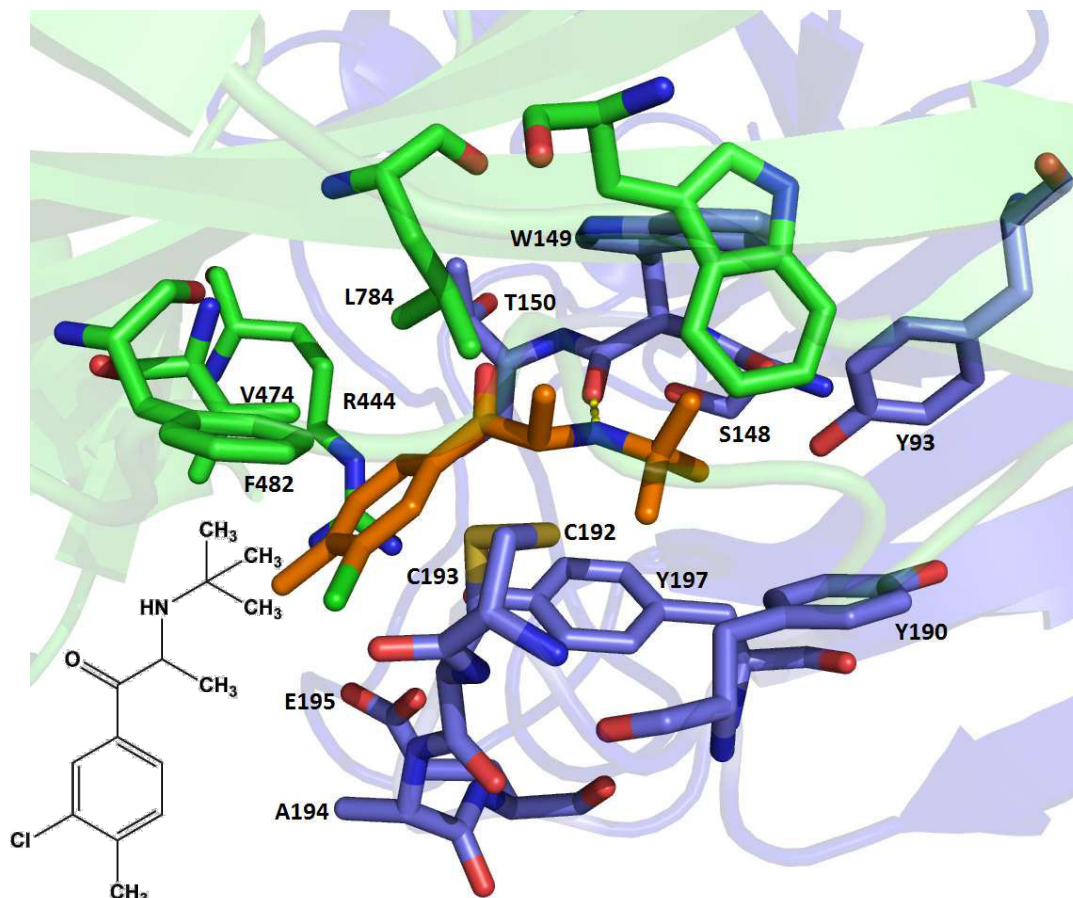
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **24** está relacionada na Tabela 22.

Tabela 22 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **24**.

24	
Pose	Pontuação
4	32,7468
1	31,9736
9	30,4864
7	29,6378
5	29,2994
8	27,7250
3	26,1751
10	26,1194
2	25,1785
6	19,3572

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 4 está representado na Figura 27.

Figura 27 - Interações do ligante **24** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP prediz uma interação de hidrogênio envolvendo o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 e o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio protonável de **24** com distância de 2,42 Å entre eles. O nitrogênio protonável participa também de interações cátion- π com os resíduos Y197 e W149. O método computacional prevê também uma interação aromática do tipo empilhamento-T entre a subunidade aromática di-substituída do ligante e o resíduo F482 pertencente ao lado (-) do sítio ativo.

O ligante **24** apresenta $Cl_{50} = 9,2 \mu M$ para o nAChRs $\alpha 4\beta 2$.³⁵

3.7.5 Ancoramento molecular do ligante 25

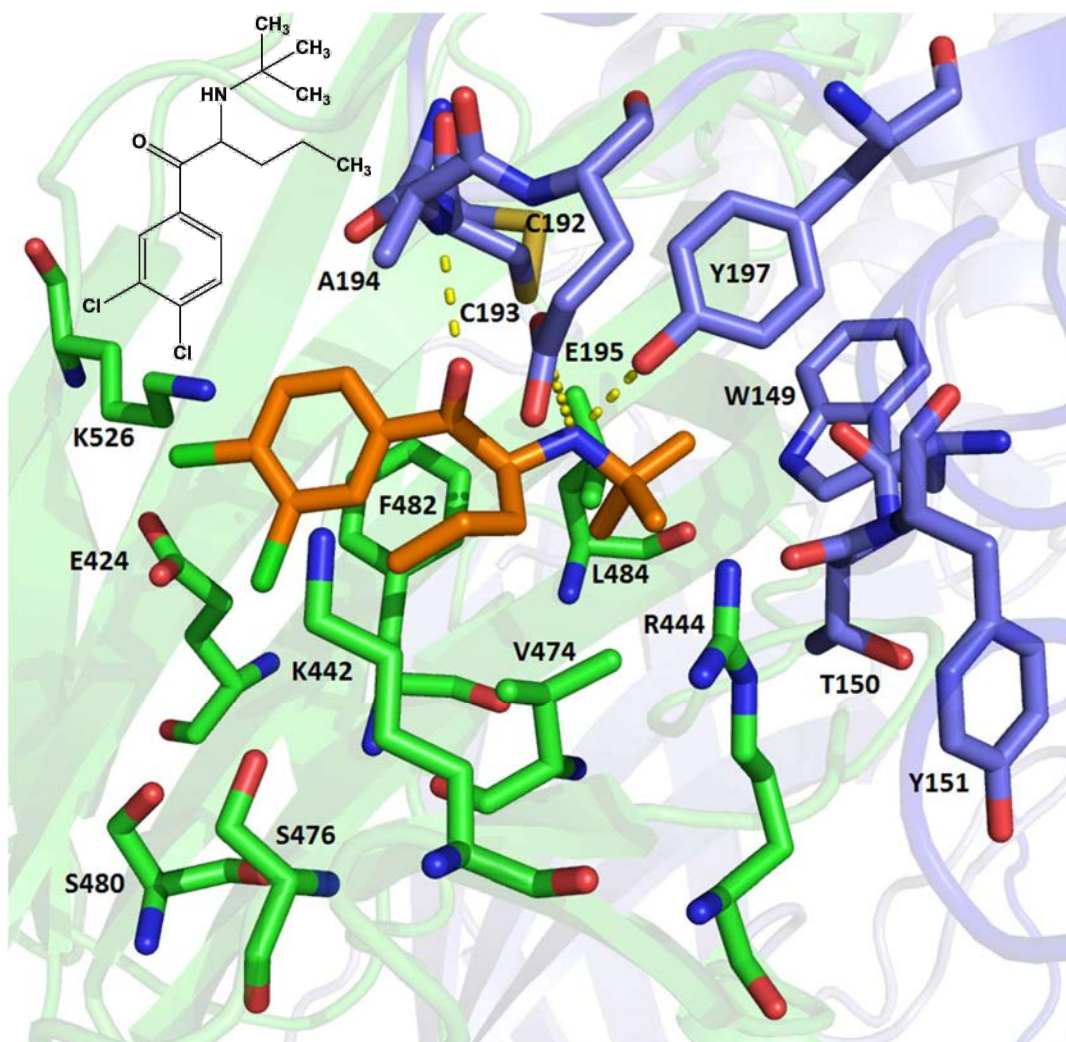
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **25** está relacionada na Tabela 23.

Tabela 23 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **25**.

Pose	Pontuação
10	21,2487
3	21,1155
9	21,0909
2	20,3040
6	20,1433
4	19,7916
1	19,5658
8	19,0294
7	18,7889
5	18,4616

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 10 está representado na Figura 28.

Figura 28 - Interações do ligante **25** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP prevê três interações de hidrogênio para o complexo em questão. A primeira delas tem como átomo doador de hidrogênio o nitrogênio protonado de **25** e como aceptor o oxigênio da função hidroxila do resíduo Y197, com 1,68 Å de separação entre os átomos mencionados. O doador de hidrogênio para a segunda delas é o mesmo que para a primeira e o aceptor é um oxigênio da função carboxila do resíduo E195, sendo que essa interação tem também caráter iônico e apresenta separação entre os átomos participantes de 3,84 Å. A última ocorre entre o oxigênio carbonílico do ligante e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica do resíduo A194. A distância entre os átomos envolvidos nessa interação é de 1,96 Å. A função ASP aponta também a possibilidade de uma interação cátion- π entre o resíduo K526 e a subunidade aromática do ligante. O resíduo F482 interage com a subunidade aromática do ligante em uma interação π - π deslocada paralelamente.

O ligante **25** apresenta $CI_{50} = 9,8 \mu M$ para o receptor estudado.³⁴

3.7.6 Ancoramento molecular do ligante 26

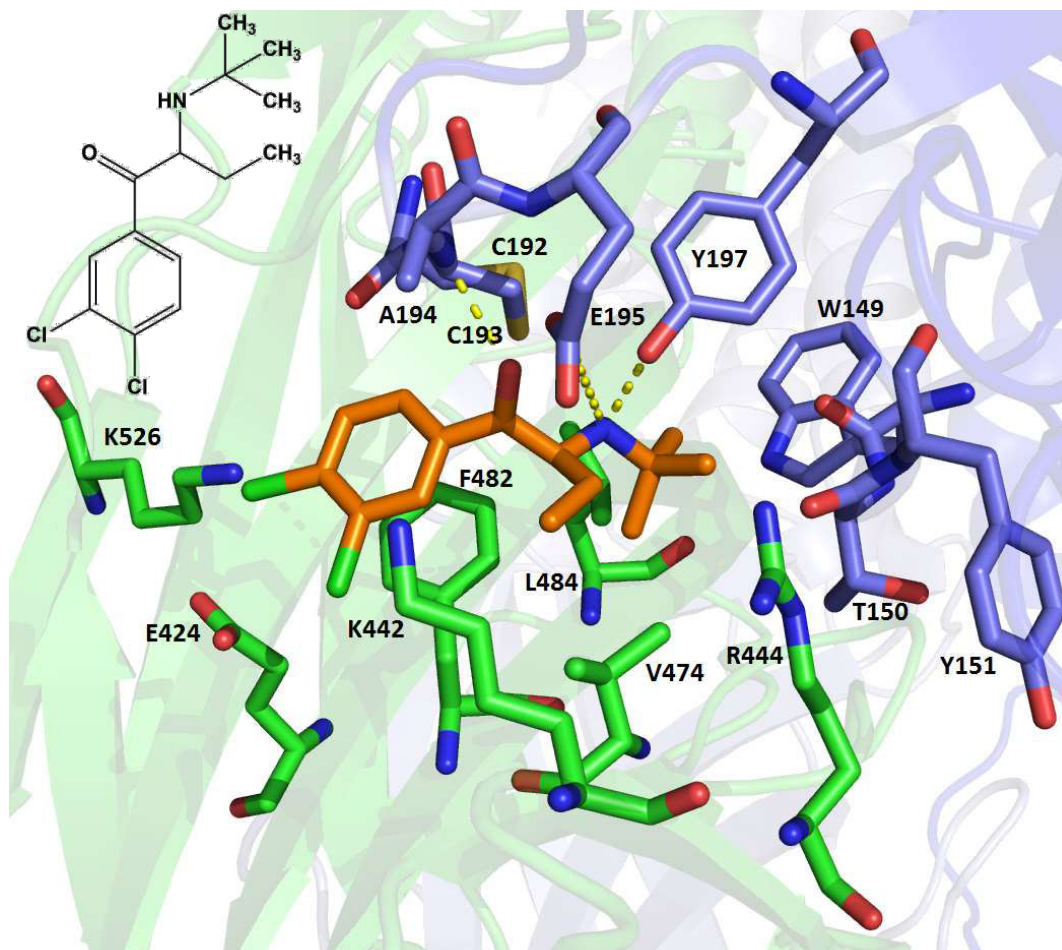
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **26** está relacionada na Tabela 24.

Tabela 24 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **26**.

26	
Pose	Pontuação
7	24,9833
2	19,5648
9	19,4919
3	19,3964
4	19,3144
10	19,0548
5	18,9278
8	17,7446
1	17,7306
6	16,7987

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 7 está representado na Figura 29.

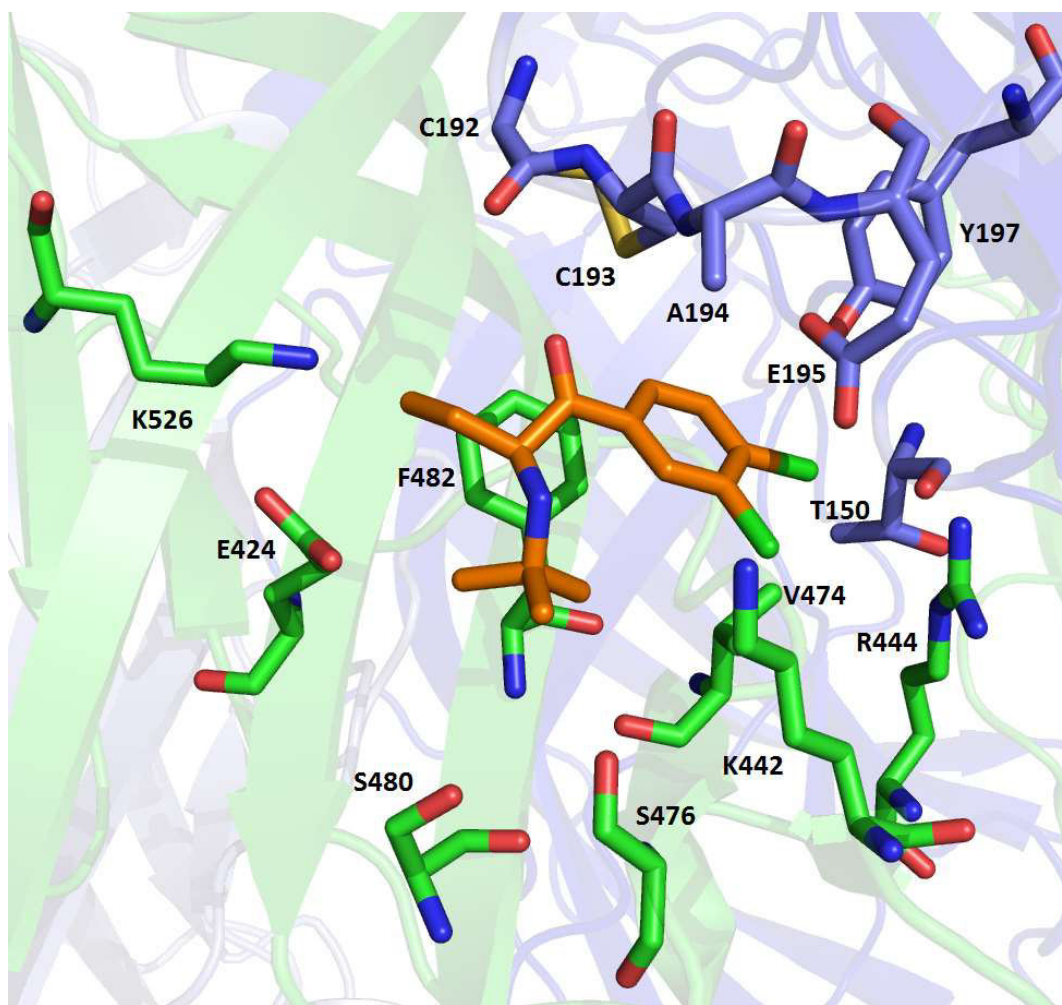
Figura 29 - Interações do ligante **26** na pose 7 com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional indica a presença de três ligações de hidrogênio para o caso representado na Figura 29. O doador de hidrogênio para a primeira delas é o mesmo que para a primeira e o aceptor é a função carboxila do resíduo E195. Essa interação tem também caráter iônico e apresenta separação entre os átomos participantes de 3,75 Å. A segunda tem como átomo doador de hidrogênio o nitrogênio protonado do ligante e como aceptor o oxigênio da função hidroxila do resíduo Y197, com 1,80 Å de separação entre os átomos mencionados. A última ocorre entre o oxigênio carbonílico do ligante e o hidrogênio ligado ao nitrogênio da ligação peptídica do resíduo A194. A distância entre os átomos participantes é de 1,88 Å. A função ASP prediz uma interação de empilhamento- π entre a subunidade aromática do ligante e o resíduo F482.

Uma análise da pose de docking 2 também se faz necessária devido a diferença entre sua pontuação e a pontuação da pose 7. O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 2 está representado na Figura 30.

Figura 30 - Interações do ligante **26** na pose 2 com o receptor.



Conforme pode ser visto na Figura 31, a função ASP não prediz nenhuma interação relevante além de contatos hidrofóbicos para a pose 2, explicando assim a diferença nas pontuações obtidas.

O ligante **26** apresenta $CI_{50} = 10 \mu M$ para o receptor estudado.³⁴

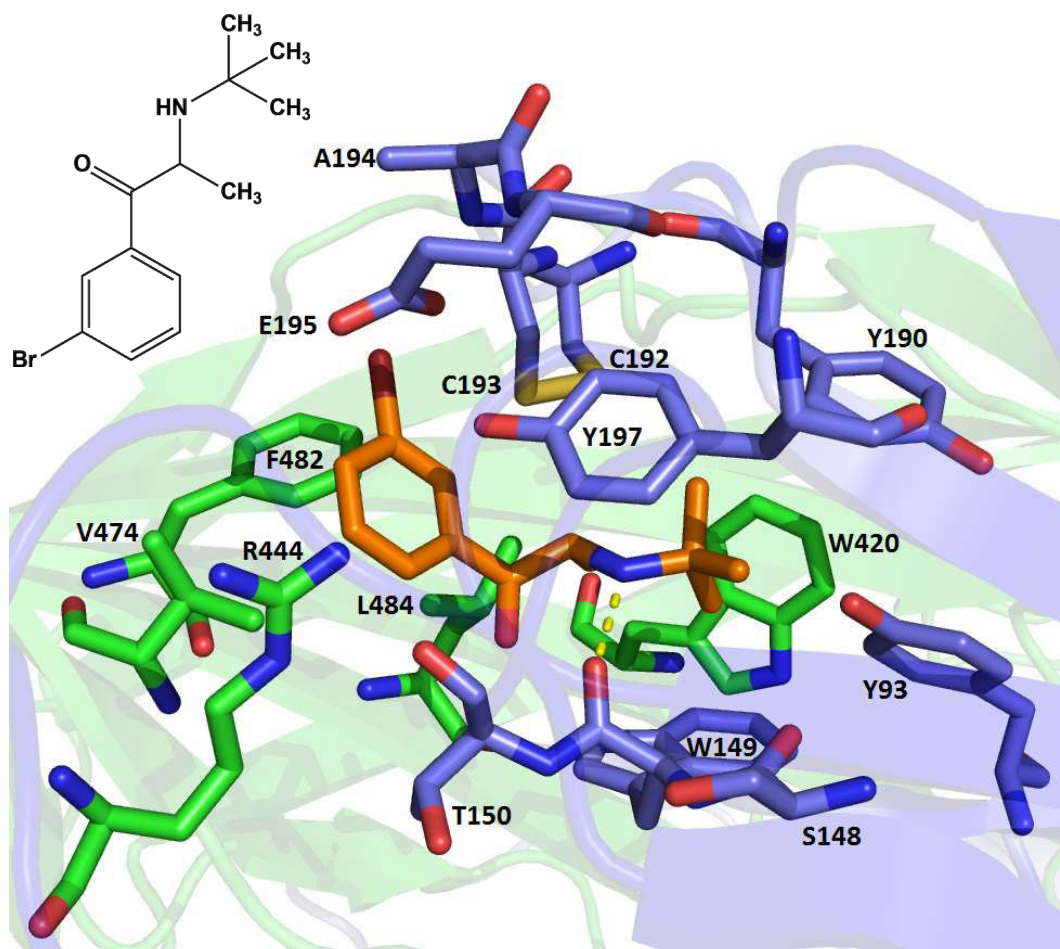
3.7.7 Ancoramento molecular do ligante 27

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **27** está relacionada na Tabela 25.

Tabela 25 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **27**.

27	
Pose	Pontuação
9	29,2171
8	29,1053
1	28,4835
4	28,3770
6	28,0065
7	25,7631
3	24,5260
1	22,5762
2	18,9567
5	17,8706

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 1 está representado na Figura 31.

Figura 31 - Interações do ligante **27** com o receptor e estrutura bidimensional.

A função de pontuação ASP prediz a ocorrência de uma ligação de hidrogênio envolvendo o nitrogênio protonável do ligante como átomo doador e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 como aceptor, com distância de 1,93 Å entre os átomos participantes. O mesmo átomo de nitrogênio participa também de interações cátion- π com os resíduos W149 e Y197. A função indica também que o resíduo F482 participa de interações de empilhamento-T com a subunidade aromática de **27**.

O ligante **27** apresenta $Cl_{50} = 15 \mu M$ para o receptor em questão.³⁴

3.7.8 Ancoramento molecular do ligante 28

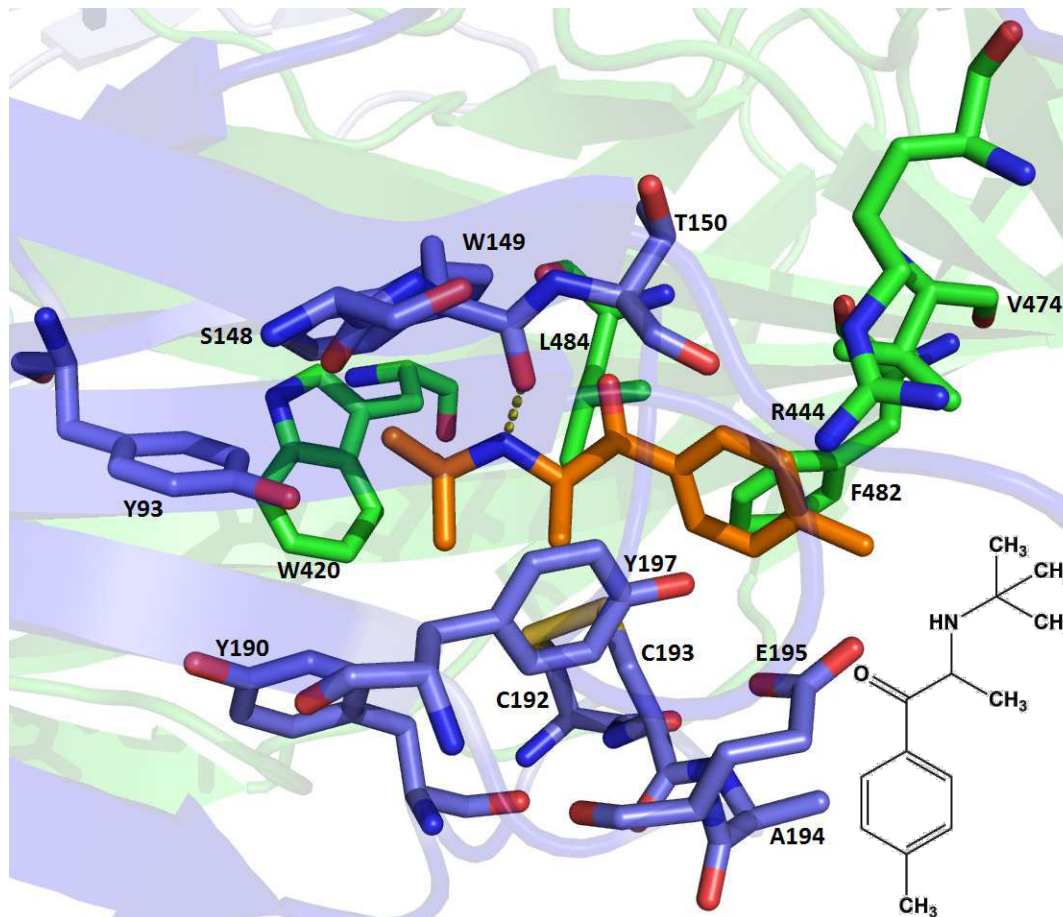
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **28** está relacionada na Tabela 26.

Tabela 26 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **28**.

28	
Pose	Pontuação
9	31,4477
2	31,3498
4	30,8830
10	30,4039
7	30,0252
3	29,6805
5	29,3372
8	27,3921
1	25,8029
6	20,9721

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 9 está representado na Figura 32.

Figura 32 - Interações do ligante **28** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função ASP indica a ocorrência de uma interação do tipo cátion- π envolvendo o nitrogênio protonável de **28** e o resíduo W149 da região (+) do sítio ativo. Esse mesmo átomo de nitrogênio participa como doador em uma ligação de hidrogênio onde o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 atua como aceptor, sendo a distância entre os átomos envolvidos 2,25 Å.

O ligante **28** apresenta $Cl_{50} = 17 \mu M$ frente ao receptor estudado.³⁴

3.7.9 Ancoramento molecular do ligante 29

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **29** está relacionada na Tabela 27.

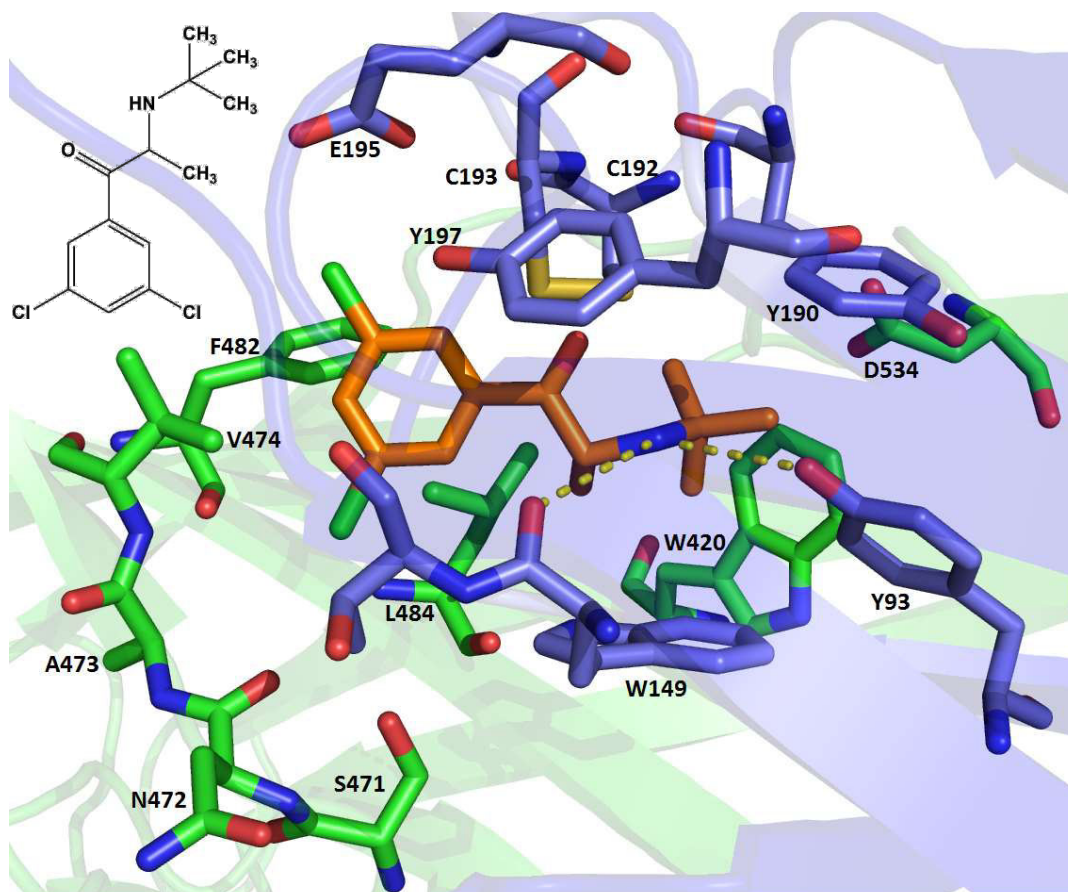
Tabela 27 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **29**.

29	
Pose	Pontuação
10	30,6247

9	28,2472
2	26,3692
7	24,7493
5	23,6074
4	20,6637
1	19,9332
8	19,6190
3	19,0062
6	18,4415

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 6 está representado na Figura 33.

Figura 33 - Interações do ligante **29** com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional prevê duas ligações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 33, sendo o átomo de nitrogênio protonável do ligante o doador de hidrogênio em ambos os casos. A primeira delas envolve o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 como aceptor e a segunda o oxigênio da função

hidroxila do resíduo Y93, com 3,91 Å e 3,28 Å de separação entre os átomos envolvidos, respectivamente. O mesmo átomo de nitrogênio participa também de interações cátion- π com a cadeia lateral do resíduo W149. O resíduo F482 participa de um empilhamento-T com a subunidade aromática do ligante.

O ligante **29** apresenta $CI_{50} = 19 \mu M$ frente ao receptor estudado.³⁴

3.7.10 Ancoramento molecular do ligante 30

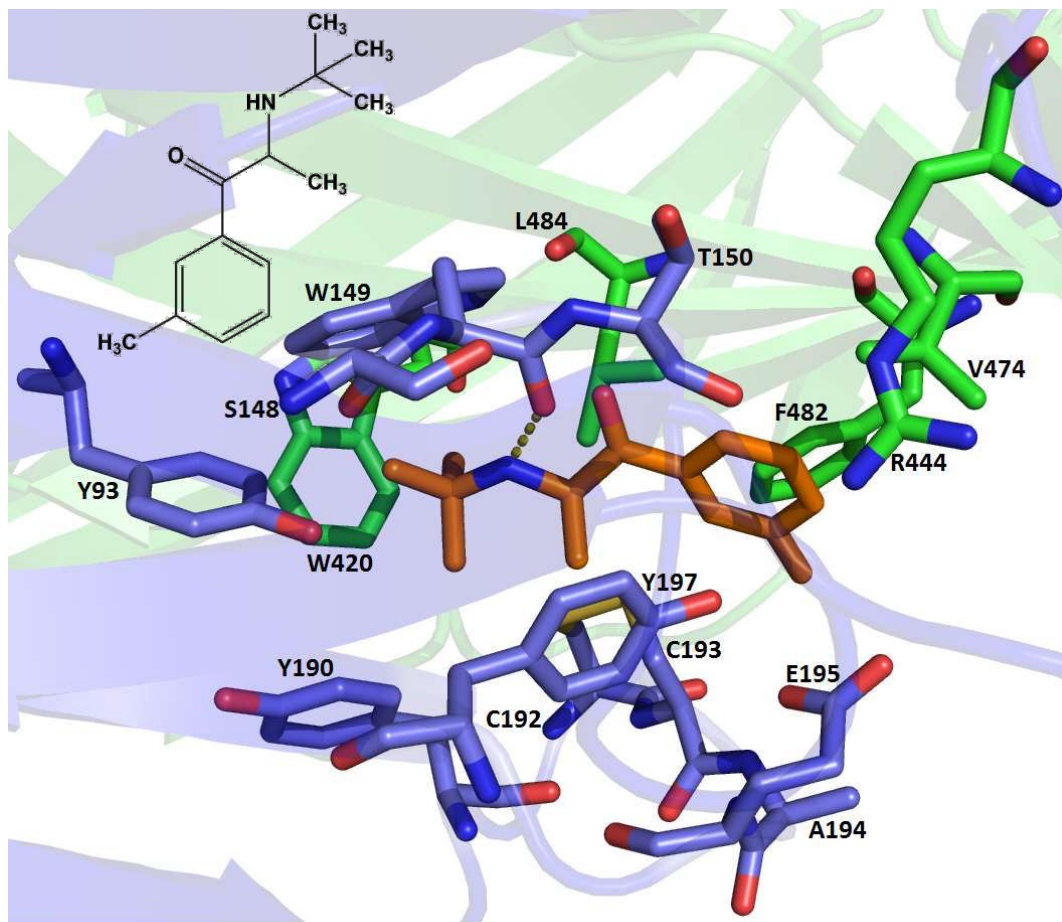
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **30** está relacionada na Tabela 28.

Tabela 28 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **30**.

30	
Pose	Pontuação
10	31,6463
9	30,9840
8	29,7137
5	29,2760
3	27,9753
1	27,0407
4	26,9005
7	26,8353
2	19,6235
6	19,4209

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 10 está representado na Figura 34.

Figura 34 - Interações do ligante **30** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP indica a presença de uma interação de hidrogênio entre o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio protonável de **30** e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149, com distância de 2,75 Å entre os participantes. O nitrogênio mencionado participa também de interações cátion- π com os resíduos W149 e Y197 pertencentes ao lado (-) do sítio ativo. A função também prevê que a subunidade aromática do ligante participa de um empilhamento-T com o resíduo F482.

O ligante **30** apresenta $Cl_{50} = 19 \mu M$ frente ao receptor em questão.³⁴

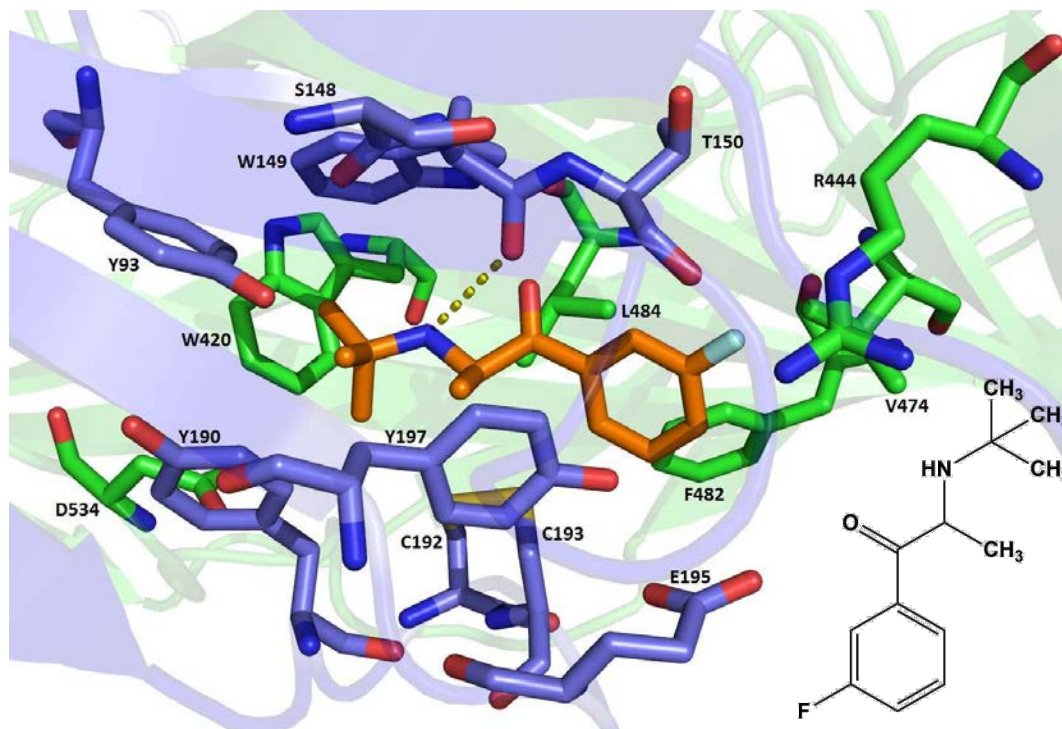
3.7.11 Ancoramento molecular do ligante 31

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **31** está relacionada na Tabela 29.

Tabela 29 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **31**.

31	
Pose	Pontuação
1	31,4403
5	30,8340
9	30,3316
3	29,7004
4	29,4425
8	48,9812
2	28,9644
10	28,1834
7	27,6082
6	24,9392

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 1 está representado na Figura 35.

Figura 35 - Interações do ligante **31** com o receptor e estrutura bidimensional.

A função de pontuação ASP prediz a presença de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 e o hidrogênio ligado ao nitrogênio protonado do ligante **31**, com distância entre os átomos

mencionados igual a 3,38 Å. De acordo com o modelo computacional, esse mesmo átomo de nitrogênio também pode participar de interações cátion- π com a cadeia lateral do resíduo W149. O resíduo F482 participa de um empilhamento-T com a subunidade aromática do ligante.

O ligante **31** apresenta $CI_{50} = 21$ nM para o receptor estudado.³⁴

3.7.12 Ancoramento molecular do ligante 32

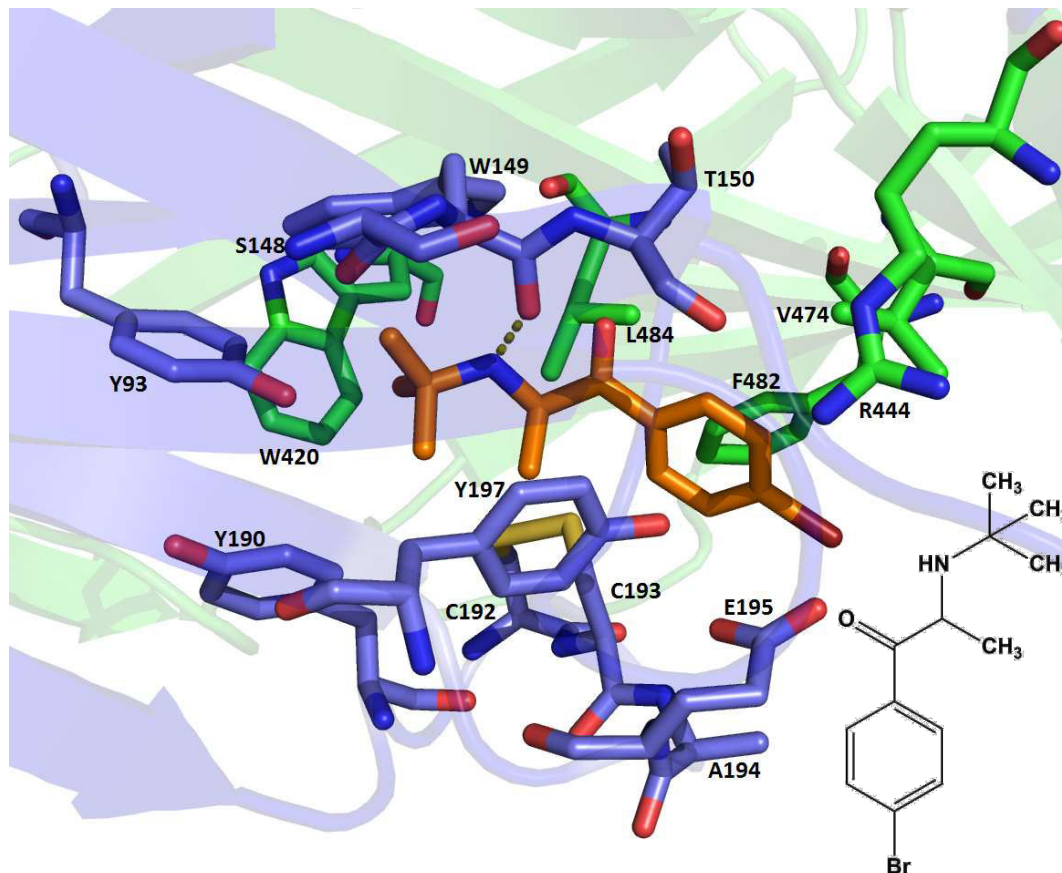
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **32** está relacionada na Tabela 30.

Tabela 30 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **32**.

32	
Pose	Pontuação
2	31,9256
4	31,4580
10	31,0583
3	30,8737
9	30,8433
7	30,1289
6	29,9306
5	28,8109
8	28,2525
1	28,0468

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 2 está representado na Figura 36.

Figura 36 - Interações do ligante **32** com o receptor e estrutura bidimensional.



Para o complexo mostrado na Figura 36 a função de pontuação ASP indica a ocorrência de uma ligação de hidrogênio, sendo o átomo de nitrogênio do ligando o doador de hidrogênio e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 o aceptor, com 2,09 Å de separação entre os átomos participantes. A função prevê também uma interação cátion- π entre o nitrogênio já citado e a cadeia lateral do resíduo W149.

O ligante **32** apresenta $CI_{50} = 23 \mu M$ frente ao receptor analisado.³⁴

3.7.13 Ancoramento molecular do ligante 33

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **33** está relacionada na Tabela 31.

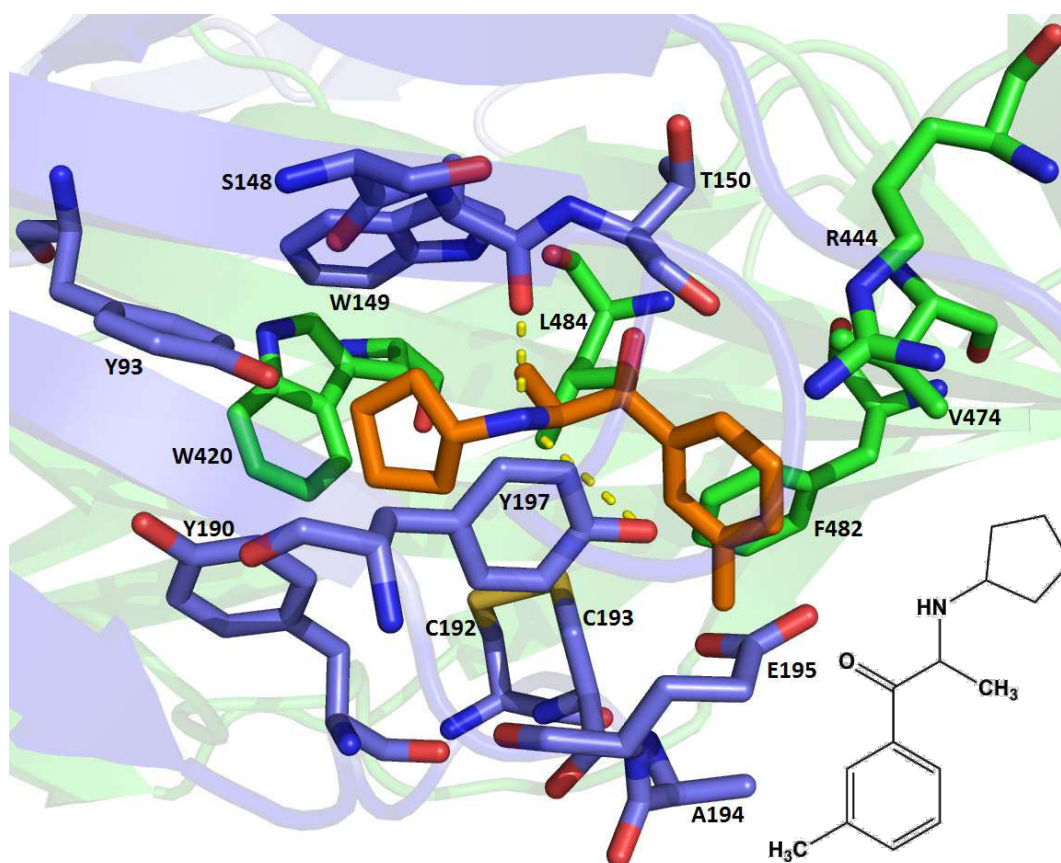
Tabela 31 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **33**.

33	
Pose	Pontuação
7	37,1212

8	36,8629
10	36,7803
2	36,7538
5	25,5999
3	35,0793
1	34,0793
4	33,9472
6	33,4526
9	32,4969

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 7 está representado na Figura 38.

Figura 37 - Interações do ligante **33** com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional prevê duas ligações de hidrogênio envolvendo o nitrogênio protonado de **33**, com este átomo atuando como doador em ambas. Na primeira delas o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 atua como aceptor, sendo a distância entre os átomos participantes 1,71 Å. O átomo aceptor da

segunda ligação de hidrogênio é o oxigênio hidroxílico do resíduo Y197, com 2,96 Å de separação entre os envolvidos. O nitrogênio protonado do ligante participa de interações do tipo cátion- π com a cadeia lateral do resíduo Y197.

O ligante **33** apresenta $CI_{50} = 25 \mu M$ para o receptor estudado.³⁴

3.7.14 Ancoramento molecular do ligante 34

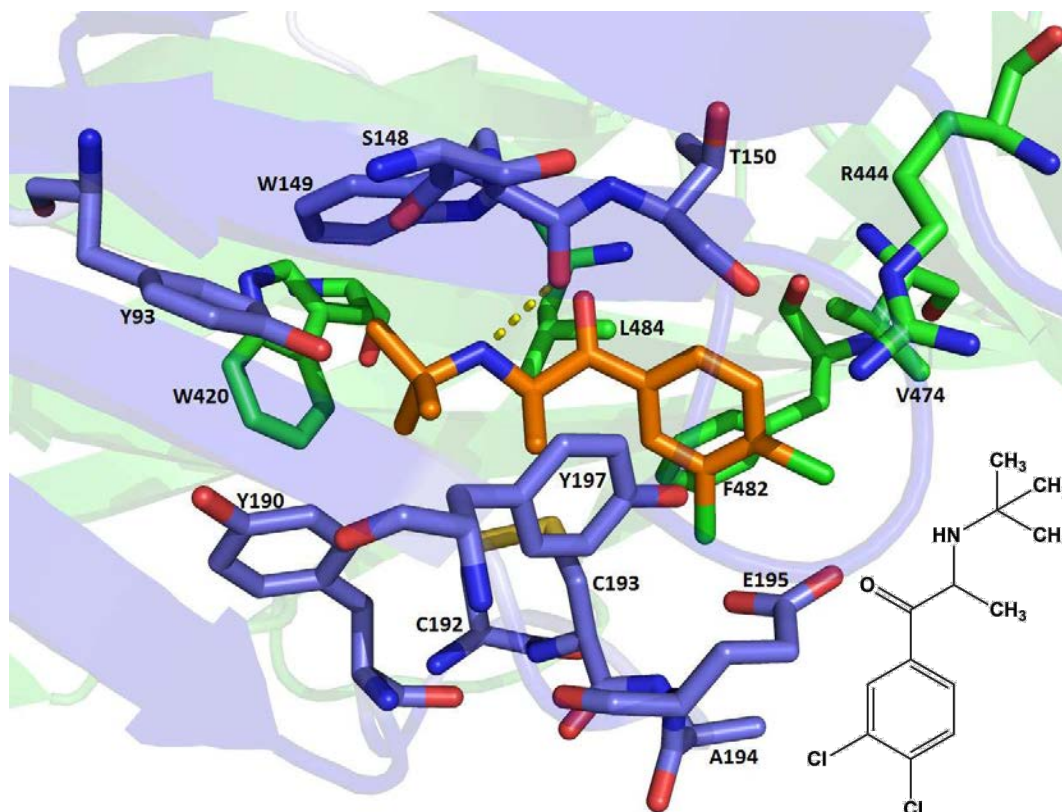
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **34** está relacionada na Tabela 32.

Tabela 32 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **34**.

34	
Pose	Pontuação
4	32,9576
6	29,9301
8	29,1034
3	29,0189
1	26,6442
9	25,2317
2	24,0372
5	23,2088
7	20,8305
10	20,3022

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 4 está representado na Figura 38.

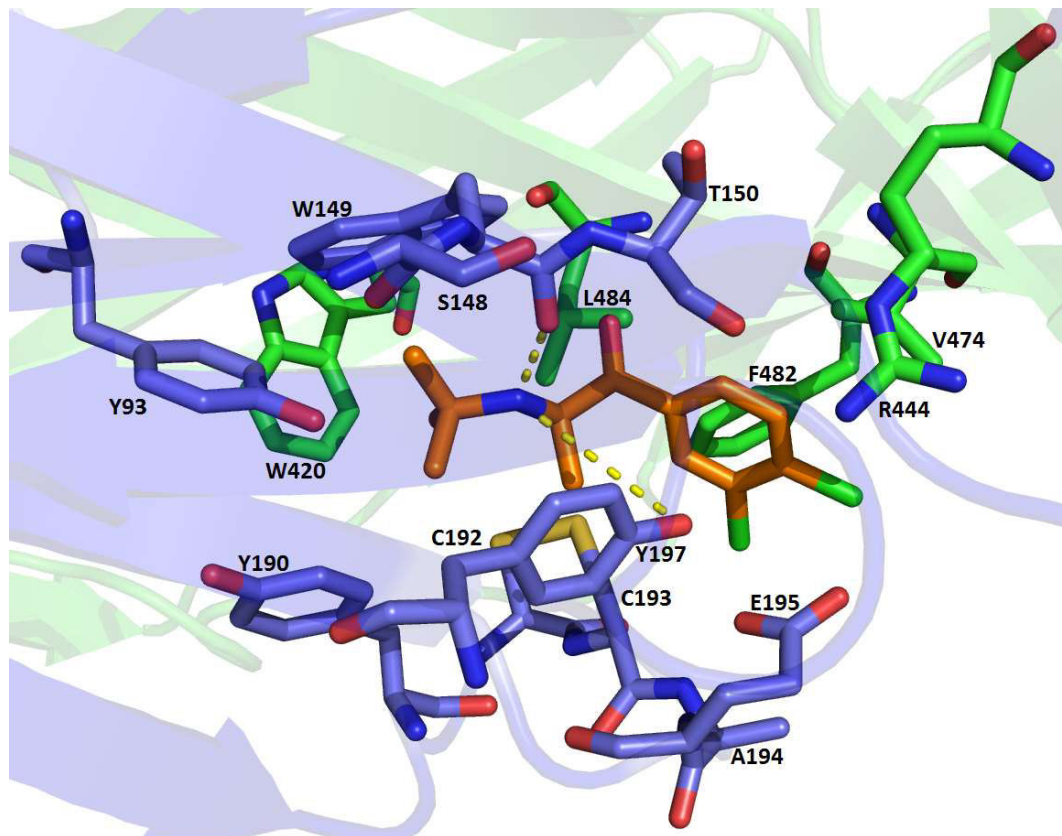
Figura 38 - Interações do ligante **34** na pose 4 com o receptor e estrutura bidimensional.



Para a pose 4, a função de pontuação ASP indica que o nitrogênio protonável do ligante participe como doador em uma ligação de hidrogênio com um átomo de oxigênio da ligação peptídica do resíduo W149, pertencente à subunidade $\alpha 4$ do sítio ativo. A distância entre os participantes é de 2,38 Å. Esse átomo de nitrogênio pode participar de interações cátion- π com a cadeia lateral do resíduo W149. É possível que a cadeia lateral ácida do resíduo E195 interaja com o anel aromático do ligante devido à deficiência eletrônica causada pelos dois cloro-substituintes em uma interação do tipo ânion- π .

A diferença considerável entre as pontuações da pose 4 e 6 torna necessária uma análise de ambas para o melhor entendimento da situação. O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 6 está representado na Figura 39.

Figura 39 - Interações do ligante **34** na pose 6 com o receptor.



Para a pose mostrada na Figura 39, a função ASP prediz uma ligação de hidrogênio adicional envolvendo o nitrogênio protonável de **34** como doador e o oxigênio da função hidroxila da cadeia lateral do resíduo Y197 como aceitor, com distância de 3,99 Å entre os envolvidos. A ligação de hidrogênio comum aos dois complexos tem distância entre os participantes igual a 1,96 Å para a pose 6. O nitrogênio protonável participa também de mais uma interação cátion- π envolvendo a cadeia lateral do resíduo Y197.

O ligante **34** apresenta $CI_{50} = 29 \mu M$ frente ao receptor em questão.³⁴

3.7.15 Ancoramento molecular do ligante 35

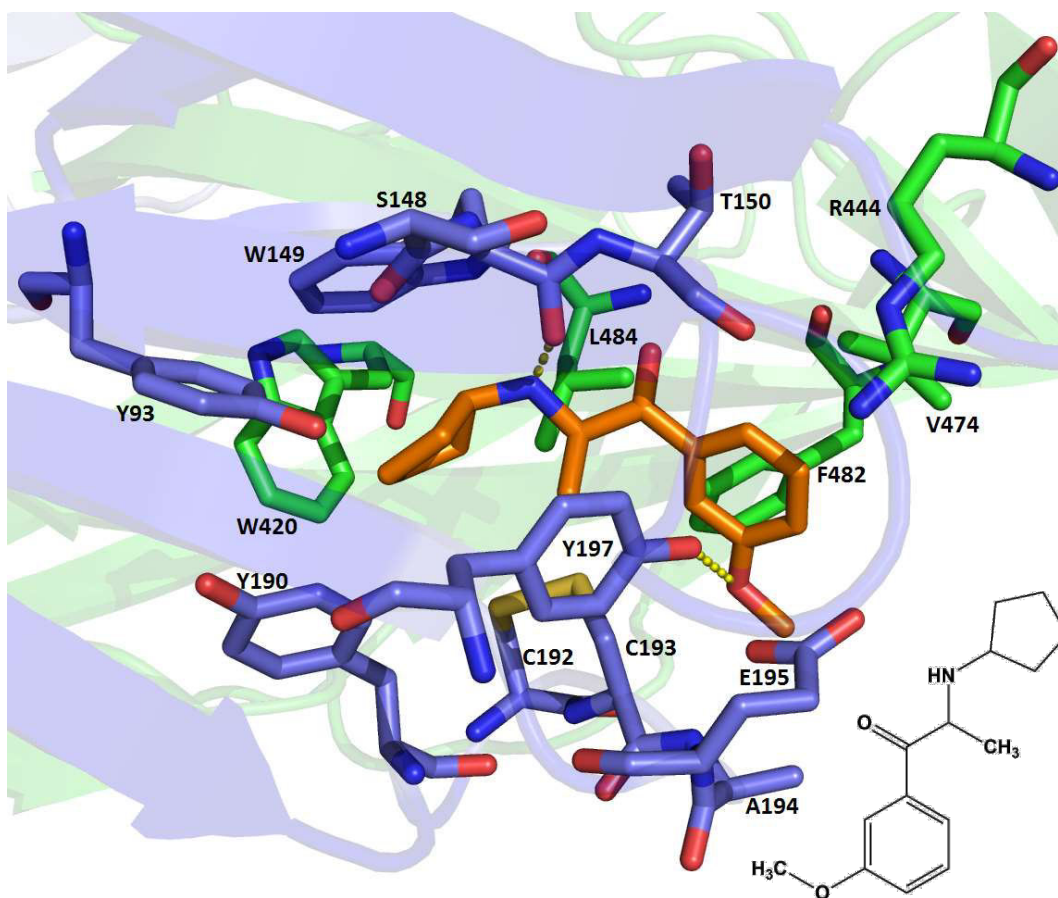
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **35** está relacionada na Tabela 33.

Tabela 33 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **35**.

Pose	Pontuação
9	41,8526
1	40,3891
6	39,4932
8	38,1434
5	38,0482
4	37,7698
10	37,1154
3	34,3282
7	33,0668
2	31,1085

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 9 está representado na Figura 40.

Figura 40 - Interações do ligante **35** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função de pontuação ASP prevê duas interações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 40. A primeira delas envolve o nitrogênio protonado do ligante como doador e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149

como aceptor, com distância de 1,75 Å entre os átomos participantes. A segunda tem como átomo aceptor o oxigênio do grupo metoxila de **35** e o oxigênio hidroxílico da cadeia lateral do resíduo Y197 como doador, sendo que os átomos estão separados por 3,99 Å. O nitrogênio protonado do ligante pode ainda participar de interações cátion- π envolvendo a cadeia lateral do resíduo W149. A cadeia lateral do resíduo F482 pode participar de um empilhamento-T com a subunidade aromática de **35**.

O ligante **35** apresenta $CI_{50} = 31 \mu M$ para o receptor analisado.³⁴

3.7.16 Ancoramento molecular do ligante 36

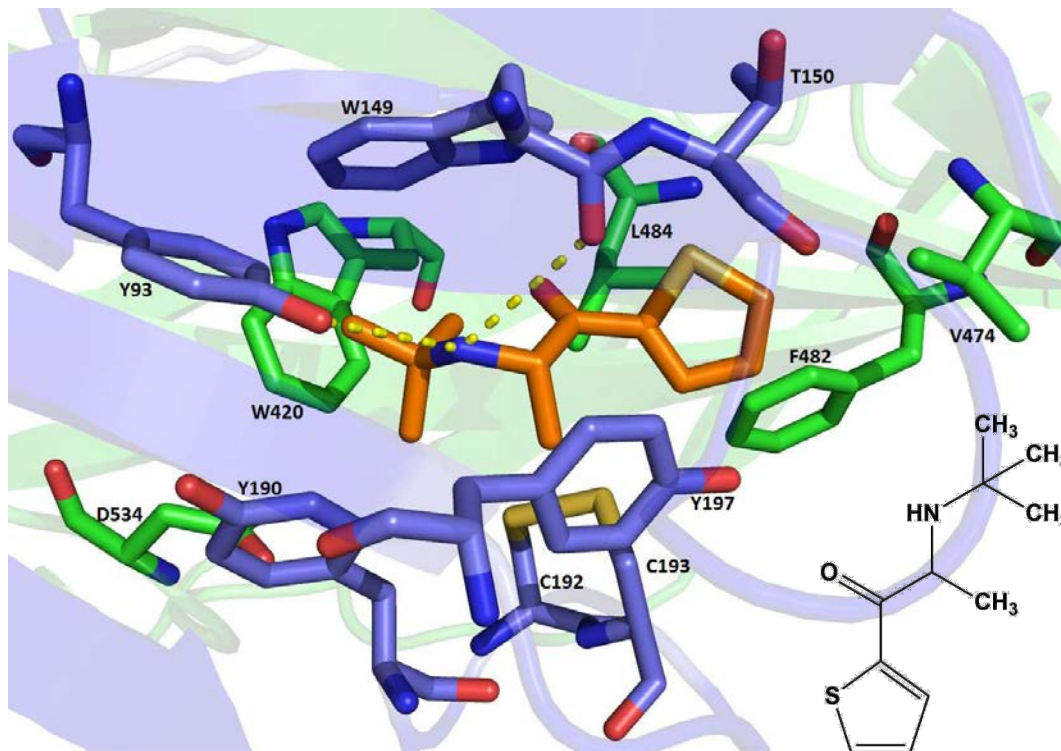
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **36** está relacionada na Tabela 34.

Tabela 34 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **36**.

36	
Pose	Pontuação
4	28,8173
3	28,3896
10	27,8006
6	27,3447
8	26,7260
7	26,2902
1	25,5684
2	24,9406
5	24,5791
9	23,2511

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 4 está representado na Figura 41.

Figura 41 - Interações do ligante **36** com o receptor e estrutura bidimensional.



De acordo com o modelo, o nitrogênio protonável de **36** participa como doador em duas ligações de hidrogênio. A primeira delas tem comoceptor o oxigênio hidroxílico da cadeia lateral do resíduo Y93. A distância entre os participantes é de 3,26 Å. O receptor de hidrogênio da segunda ligação é o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149, com 3,32 Å de separação entre os envolvidos. O nitrogênio protonado participa também de interações cátion- π com as cadeias laterais dos resíduos W420, Y190 e W149. O resíduo F482 pode participar de um empilhamento-T com o anel tiofênico.

O ligante **36** apresenta $CI_{50} = 32 \mu M$ frente ao receptor estudado.³⁴

3.7.17 Ancoramento molecular do ligante 37

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **37** está relacionada na Tabela 35.

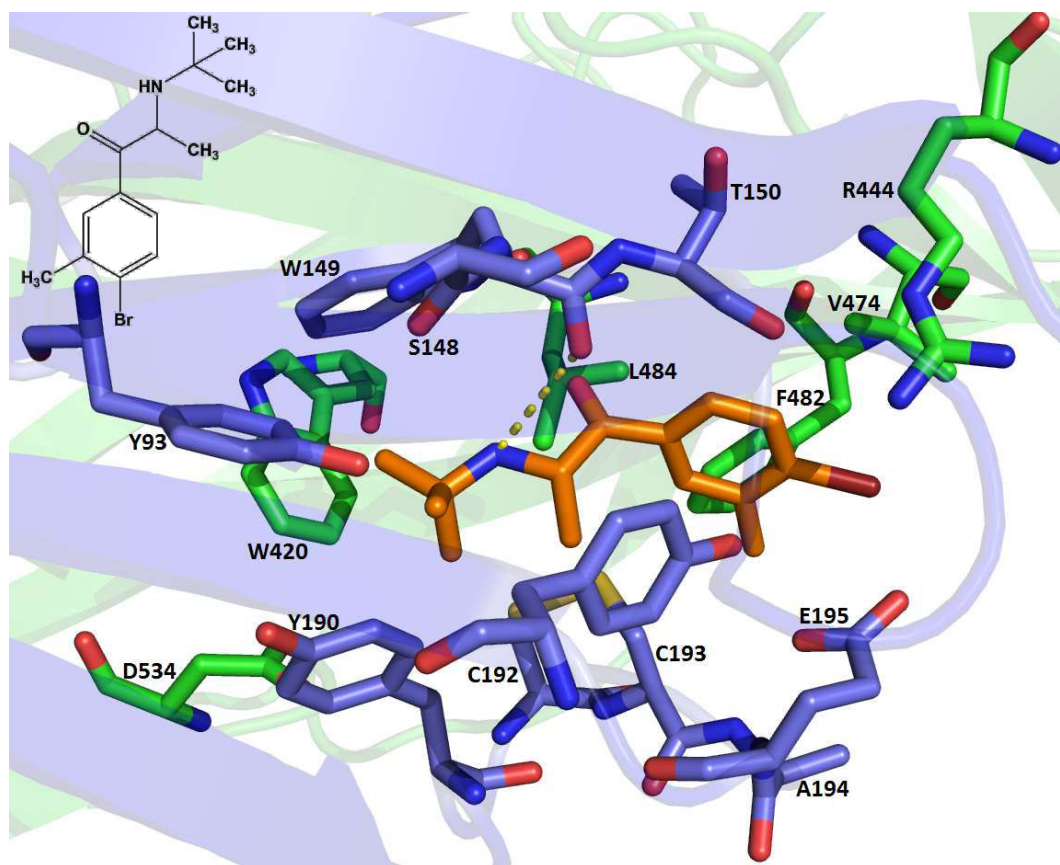
Tabela 35 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **37**.

37	
Pose	Pontuação
6	30,1356

8	29,9814
3	29,7227
2	29,5727
4	28,6064
7	28,4755
1	26,8487
5	26,1196
10	26,0082
9	18,3262

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 6 está representado na Figura 42.

Figura 42 - Interações do ligante **37** com o receptor e estrutura bidimensional.



O modelo computacional indica a ocorrência de uma ligação de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 42, com o nitrogênio protonado do ligante atuando como doador de hidrogênio e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 atuando como aceptor. A distância entre os participantes é de 3,09 Å. Esse

mesmo átomo de nitrogênio participa de interações cátion- π com a cadeia lateral do resíduo W149. O modelo prevê um possível empilhamento- π entre o sistema aromático do ligante o resíduo F482.

O ligante **37** apresenta $CI_{50} = 32 \mu M$ frente ao receptor analisado.³⁴

3.7.18 Ancoramento molecular do ligante 38

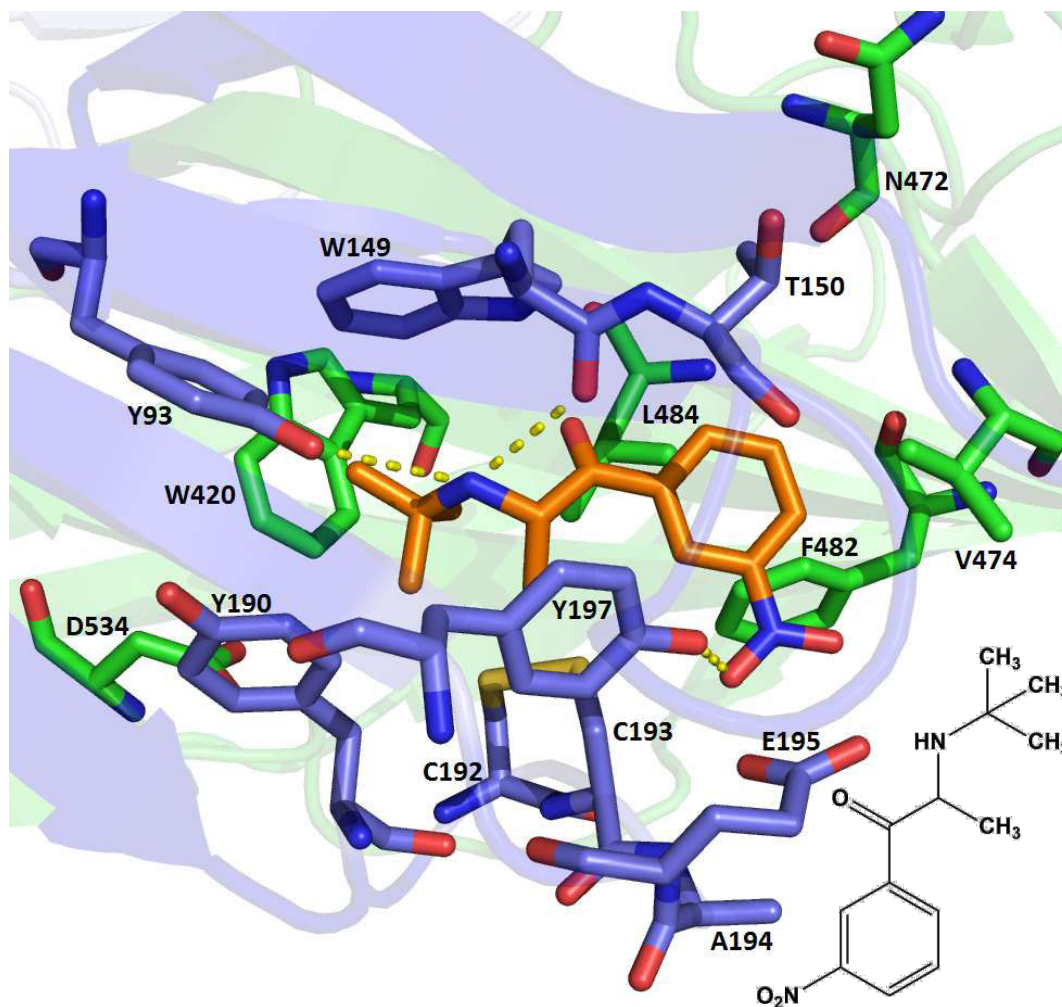
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **38** está relacionada na Tabela 36.

Tabela 36 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **38**.

38	
Pose	Pontuação
3	34,0702
7	32,9852
4	32,8107
10	32,5419
1	30,9522
5	30,4768
8	27,9281
9	26,1406
2	25,8724
6	23,4509

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 3 está representado na Figura 43.

Figura 43 - Interações do ligante **38** com o receptor e estrutura bidimensional.



Para a pose mostrada na Figura 43, a função de pontuação ASP indica a ocorrência de três ligações de hidrogênio. O doador de hidrogênio na primeira delas é o nitrogênio protonado de **38** e o aceptor é o oxigênio da cadeia lateral do resíduo Y93, com 3,42 Å entre os átomos participantes. O mesmo átomo de nitrogênio participa novamente como doador na segunda ligação de hidrogênio, sendo o oxigênio carbonílico da ligação peptídica e W149 o aceptor e com distância de 3,31 Å entre os átomos envolvidos. Por fim, o doador da terceira ligação é o oxigênio hidroxílico da cadeia lateral do resíduo Y197 e o aceptor é o oxigênio pertencente ao grupo nitro do ligante, com 2,68 Å de separação entre os participantes. O modelo computacional indica que o nitrogênio ionizado do ligante participa de interações cátion- π com as cadeias laterais dos resíduos W149 e Y197. O anel aromático do ligante participa também de interações aromáticas de empilhamento-T com a cadeia lateral do resíduo F482.

O ligante **38** apresenta $CI_{50} = 36 \mu M$ frente a receptor estudado.³⁴

3.7.19 Ancoramento molecular do ligante 39

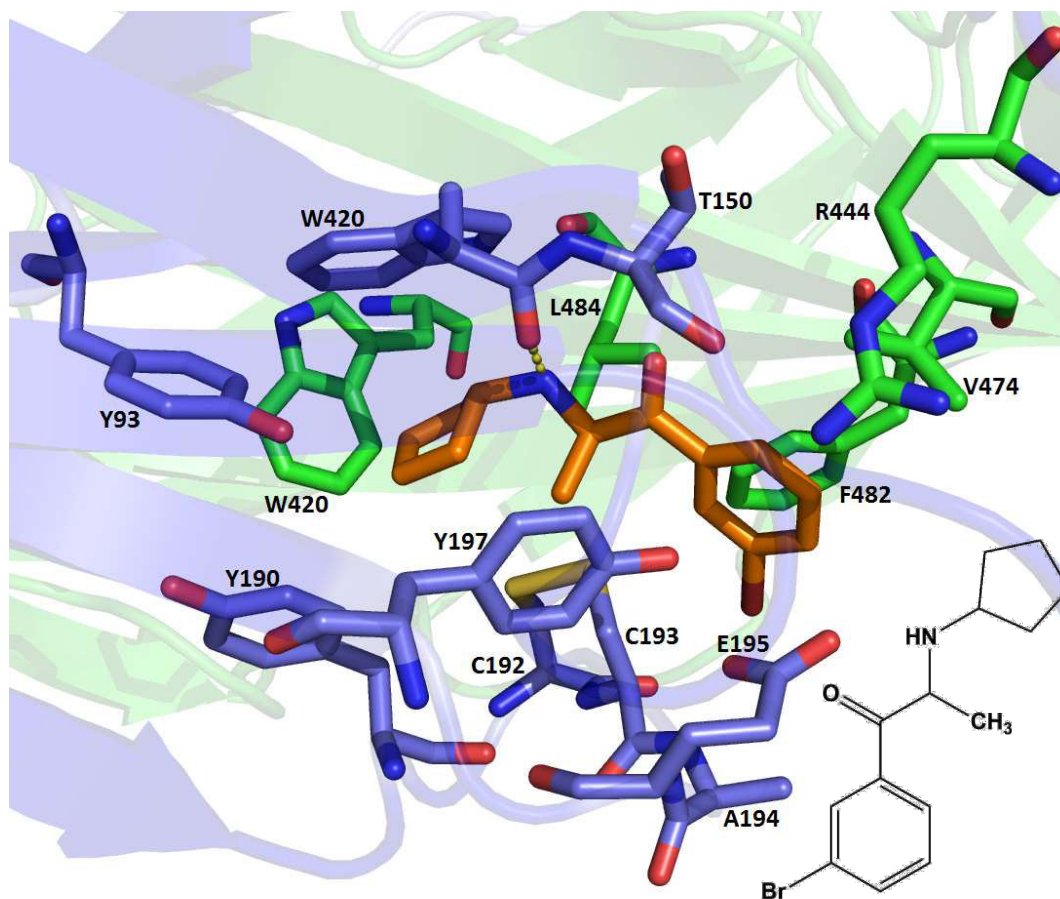
A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **39** está relacionada na Tabela 37.

Tabela 37 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **39**.

39	
Pose	Pontuação
7	34,9132
3	34,5109
9	34,1186
1	33,5620
4	30,2925
5	30,1593
10	29,7981
8	29,6013
6	29,4607
2	28,0245

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 7 está representado na Figura 44.

Figura 44 - Interações do ligante **39** com o receptor e estrutura bidimensional.



A função ASP prediz a ocorrência de uma ligação de hidrogênio com o nitrogênio protonável do ligante atuando como doador de hidrogênio e o oxigênio carbonílico da ligação peptídica do resíduo W149 como aceitor. A distância entre os participantes é de 1,88 Å. O mesmo átomo de nitrogênio também participa de interações cátion- π com as cadeias laterais dos resíduos W149 e Y197, ambos integrantes do lado (+) do sítio ativo. A cadeia lateral ionizada do resíduo E195 pode interagir com a subunidade aromática do ligante devido à deficiência eletrônica provocada pelo átomo de bromo em uma interação do tipo ânion- π .

O ligante **39** apresenta $Cl_{50} = 44 \mu\text{M}$ frente ao receptor estudado.³⁴

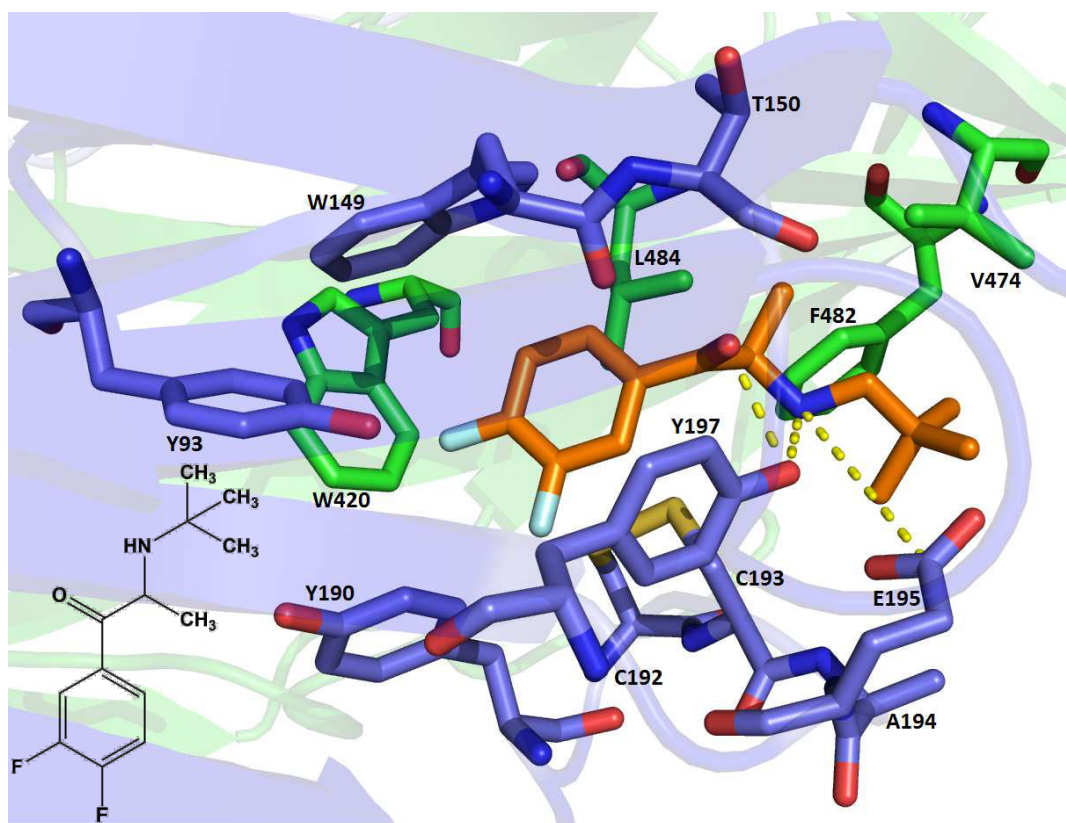
3.7.20 Ancoramento molecular do ligante 40

A pontuação obtida para cada pose utilizando a função de pontuação ASP para o ligante **40** está relacionada na Tabela 38.

Tabela 38 - Dados de pontuação obtida através da função ASP para o ligante **40**.

40	
Pose	Pontuação
1	34,7969
4	33,8963
7	33,4362
8	33,1466
5	33,1407
10	33,0983
9	32,8311
3	32,3673
2	28,9048
6	22,6959

O complexo ligante-receptor obtido da pose de docking 1 está representado na Figura 45.

Figura 45 - Interações do ligante **40** com o receptor e estrutura bidimensional.

O modelo computacional indica a ocorrência de três ligações de hidrogênio para o complexo mostrado na Figura 45. O nitrogênio protonado do ligante atua como doador de hidrogênio em duas delas, a primeira com o oxigênio da cadeia lateral de

Y197 como aceptor e a segunda com a cadeia lateral ionizada do resíduo E195 exercendo essa função, sendo que essa interação possui também caráter iônico. A distância entre os participantes é de 2,09 Å e 3,58 Å, respectivamente. Por fim, a terceira ligação tem como aceptor de hidrogênio o oxigênio carbonílico de **40** e como doador o oxigênio hidroxílico da cadeia lateral do resíduo Y197, com 2,01 Å de distância entre os átomos envolvidos. A função ASP também prevê que o nitrogênio ionizado do ligante pode participar de interações cátion- π com a cadeia lateral de F482.

O ligante **40** Cl_{50} = 45 μ M frente ao receptor em questão.³⁴

3.8 Comparação entre as interações previstas pela função ASP

Na Tabela 39 estão relacionadas as principais interações previstas pela função de pontuação ASP para os ligantes clássicos dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$, bem como propriedades farmacológicas experimentais obtidas da literatura, sendo que ED e CL se referem ao esqueleto e cadeia lateral do resíduo de aminoácido, respectivamente e com os valores relativos a concentrações sendo da ordem de nM.

Tabela 39 - Interações previstas pela função ASP para os ligantes clássicos dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$, propriedades farmacológicas e pontuação obtida para as poses analisadas.

Ligante	Resíduo	Tipo de interação	Região	Ki	Cl_{50}	CE_{50}	Pontuação
3	W149	Ligação de H	ED	0,6	1,2	-	35,1694
	W149	Cátion- π	CL				
	Y197	Cátion- π	CL				
4	W149	Ligação de H	CL	2	50	2000	33,4331
	W149	Cátion- π	CL				
	Y93	Ligação de H	CL				
5	Y197	Ligação de H	CL	0,12	38,9	950	43,1506
	Y197	Cátion- π	CL				
	Y93	Ligação de H	CL				
	W149	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
6	W149	Cátion- π	CL	0,014	1,06	-	35,9315
	W420	Cátion- π	CL				
	Y197	Ligação de H	CL				
	Y93	Ligação de H	CL				

As interações tomadas como mais relevantes são as que estão presentes para o complexo nicotina-receptor, visto que esse é um dado experimental. O resíduo W149 aparenta ser o de maior importância, uma vez que interage em todos os complexos de ligantes bem estabelecidos desse receptor aqui mostrados. Ainda não existem estudos de mutagênese sítio-dirigida para esse tipo de receptor que comprovem essa afirmação, mas dados obtidos através de modelos homólogos indicam que, de fato, existe um resíduo triptofano essencial ao funcionamento correto do receptor. Entretanto, é necessário levar em consideração que as AChBP apresentam diferenças significativas entre si, principalmente na região (-) do sítio ativo, sendo necessários estudos mais aprofundados a respeito dos nAChRs humanos para corroborar essa hipótese.¹² Apesar disso, os dados experimentais que a estrutura cristalográfica fornece são mais relevantes do que os de um estudo de mutagênese sítio-dirigida, podendo-se então considerar essa interação essencial. Conforme será visto para os próximos ligantes, interações envolvendo esse resíduo são previstas com frequência.

Quanto à relação entre a pontuação obtida e atividades/afinidade dos ligantes, nota-se que a função de pontuação retornou valores maiores para os ligantes com K_i menor nessa série e que não há relação aparente entre os valores de CI_{50} e CE_{50} com a pontuação. Isso pode ser explicado com base na forma que a função ASP utiliza para avaliar as poses de ancoramento molecular. De um modo geral, a função avalia as poses com base na frequência de contatos entre o ligante e o receptor, penalizando interações desfavoráveis e tomando como estado de referência uma situação onde não existam interações. Dessa forma, é possível que um dado como K_i possa ser corretamente previsto pelo modelo, pois é uma medida de afinidade pelo receptor. Já os dados de CI_{50} e CE_{50} não dependem necessariamente da intensidade das interações, mas sim de uma curva obtida a partir de várias concentrações, resultando em um dado de potência e não de afinidade. Entretanto, nota-se que o padrão descrito não se aplica ao ligante **6**, que apresenta afinidade alta pelo receptor e obteve uma pontuação mais baixa do que o esperado (0,014 nM).

A maioria das interações apresentadas para esse conjunto de complexos ocorre envolvendo resíduos da subunidade $\alpha 4$, o que está de acordo com dados da literatura que indicam essa subestrutura como a principal desse sítio ativo.

Na Tabela 40 estão relacionadas as principais interações previstas pela função de pontuação ASP para os ligantes análogos da sazetidina-A (**7**), bem como

propriedades farmacológicas experimentais obtidas da literatura, sendo que ED e CL se referem a espinha dorsal e cadeia lateral do resíduo de aminoácido, respectivamente e com os valores relativos a concentrações sendo da ordem de nM.

Tabela 40 - Interações previstas pela função ASP para **7** e seus análogos, propriedades farmacológicas e pontuação obtida para as poses analisadas.

Ligante	Resíduo	Tipo de Interação	Região	Ki	Cl ₅₀	CE ₅₀	Pontuação
7	Y93	Ligação de H	CL	0,4	4,8	5,8	44,2933
	A194	Ligação de H	ED				
	W420	Cátion- π	CL				
	W149	Cátion- π	CL				
	Y190	Cátion- π	CL				
8	W420	Cátion- π	CL	0,05	5,5	6,2	43,7677
	Y190	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
9	Y93	Ligação de H	CL	0,1	5,6	17,5	45,6860
	W420	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
10	A194	Ligação de H	ED	0,1	8,6	8,8	48,3805
	Y197	Ligação de H	CL				
	E195	Ligação de H	CL				
	Y93	Ligação de H	CL				
	Y93	Ligação de H	CL				
11	Y93	Ligação de H	CL	0,1	9,4	10,2	44,5399
	Y197	Ligação de H	CL				
	K442	Ligação de H	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
	W420	Cátion- π	CL				
	W149	Cátion- π	CL				
	Y190	Cátion- π	CL				
12	E195	Ligação de H	CL	0,2	11,3	10,2	46,7536
	Y93	Ligação de H	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
13	Y93	Ligação de H	CL	0,31	16	25	47,2335
	W149	Ligação de H	ED				
	A194	Ligação de H	ED				
	E195	Ligação de H	CL				
	W420	Cátion- π	CL				
	W149	Cátion- π	CL				

	Y190	Cátion- π	CL				
	Y197	Cátion- π	CL				
14	Y93	Ligação de H	CL	1,7	18,2	15,7	49,5029
	Y197	Ligação de H	CL				
	W420	Cátion- π	CL				
	W149	Cátion- π	CL				
	Y197	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
15	Y93	Ligação de H	CL	0,4	19,1	18,2	49,8524
	Y197	Ligação de H	CL				
	W149	Cátion- π	CL				
	W420	Cátion- π	CL				
	Y190	Cátion- π	CL				
16	Y93	Ligação de H	CL	0,7	19,6	23,3	49,5684
	Y197	Ligação de H	CL				
	Y190	Cátion- π	CL				
	W420	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
17	Y93	Ligação de H	CL	0,4	22,2	19,1	42,9535
	Y197	Ligação de H	CL				
	W420	Cátion- π	CL				
	Y190	Cátion- π	CL				
	W149	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
18	Y93	Ligação de H	CL	0,4	32	51	46,0546
	S148	Ligação de H	ED				
	W149	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
19	Y93	Ligação de H	CL	0,6	32	43	47,5220
	W149	Ligação de H	ED				
	W149	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				
20	Y93	Ligação de H	CL	0,37	44	110	47,9000
	W149	Ligação de H	ED				
	E195	Ligação de H	CL				
	K442	Ligação de H	CL				
	W149	Cátion- π	CL				
	Y190	Cátion- π	CL				
	F482	Empilhamento-T	CL				

Para os análogos do ligante **7**, tem-se um conjunto de resíduos de aminoácidos que aparecem em diversos complexos: W149, W420, Y93, Y197 e Y190 pertencentes ao lado (+) do sítio ativo e W420 e F482 do lado (-).

No que diz respeito à quantidade de interações presentes para essa série de compostos, nota-se que elas ocorrem em maior quantidade do que nos complexos de ligantes clássicos dos nAChRs. Isso ocorre devido ao tamanho dos ligantes e quantidade de grupos funcionais presentes nos mesmos. Em acordo com essa observação, os valores de pontuação obtidos através da função de pontuação ASP são, em geral, maiores do que os calculados para os demais compostos do trabalho. Tomando como base somente a quantidade das interações presentes em cada complexo ligante-receptor aqui mostrado é de se esperar que os ligantes que apresentem maior quantidade das mesmas tenham maior pontuação, o que não ocorre em todos os casos. Isso se deve ao fato da função de pontuação utilizada considerar também penalizações devido a interações desfavoráveis ao retornar uma pontuação.

O padrão de relação entre as pontuações calculadas pela função ASP, K_i e propriedades farmacológicas novamente se mostra não linear quando se observa a totalidade do conjunto de dados mostrado na Tabela 40. No que diz respeito a relação entre K_i e a pontuação, nota-se que para essa série de ligantes a função ASP não retornou valores de pontuação que condizem com o K_i dos ligantes utilizados, semelhantemente ao caso da epibatidina (**6**) apresentado anteriormente. Nesse ponto, cabe ressaltar que a faixa varrida das propriedades farmacológicas nessa série não foi muito extensa, de modo que se torna difícil analisar quantitativamente essa relação uma vez que compostos de pouca afinidade, inativos ou pouco ativos não foram analisados. Assim, são necessários estudos que utilizem uma faixa maior das propriedades aqui apresentadas para confirmar a capacidade de predição das mesmas pela função de pontuação ASP.

Na Tabela 41 estão relacionadas as principais interações previstas pela função de pontuação ASP para os ligantes análogos da bupropiona, bem como propriedades farmacológicas experimentalmente obtidas, sendo que ED e CL se referem a espinha dorsal e cadeia lateral do resíduo de aminoácido, respectivamente, com os valores relativos a concentrações sendo da ordem de μM .

Tabela 41 - Interações previstas pela função ASP para **21** e seus análogos, propriedades farmacológicas e pontuação obtida para as poses analisadas.

Ligante	Resíduo	Tipo de interação	Região	Cl ₅₀	Pontuação
21	W149	Ligação de H	ED	12	28,6382
	Y197	Ligação de H	CL		
	Y197	Cátion- π	CL		
	W149	Cátion- π	CL		
22	A194	Ligação de H	CL	7,7	21,0437
	F482	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
23	Y93	Ligação de H	CL	8,6	25,3861
	W149	Ligação de H	CL		
	W149	Cátion- π	CL		
	Y197	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
24	W149	Ligação de H	ED	9,2	32,7468
	W149	Cátion- π	CL		
	Y197	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
25	Y197	Ligação de H	CL	9,8	21,2487
	E195	Ligação de H	CL		
	A194	Ligação de H	ED		
	K526	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento- π	CL		
26	E195	Ligação de H	CL	10	24,9833
	Y197	Ligação de H	CL		
	A194	Ligação de H	CL		
	F482	Empilhamento- π	CL		
27	W149	Ligação de H	ED	15	29,2171
	W149	Cátion- π	CL		
	Y197	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
28	W149	Ligação de H	ED	17	31,4477
	W149	Cátion- π	CL		
29	W149	Ligação de H	ED	19	30,6247
	Y93	Ligação de H	CL		
	W149	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
30	W149	Ligação de H	ED	19	31,6463
	W149	Cátion- π	CL		

	Y197	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
31	W149	Ligação de H	ED	21	31,4403
	W149	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
32	W149	Ligação de H	ED	23	31,9256
	W149	Cátion- π	CL		
33	W149	Ligação de H	ED	25	37,1212
	Y197	Ligação de H	CL		
	Y197	Cátion- π	CL		
34	W149	Ligação de H	CL	29	32,9576
	W149	Cátion- π	CL		
	E195	Ânion- π	CL		
35	W149	Ligação de H	ED	31	42,8526
	Y197	Ligação de H	CL		
	W149	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
36	Y93	Ligação de H	CL	32	28,8173
	W149	Ligação de H	CL		
	W420	Cátion- π	CL		
	Y190	Cátion- π	CL		
	W149	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento-T	CL		
37	W149	Ligação de H	ED	32	30,1356
	W149	Cátion- π	CL		
	F482	Empilhamento- π	CL		
38	Y93	Ligação de H	CL	36	34,0702
	W149	Ligação de H	ED		
	Y197	Ligação de H	CL		
	W149	Cátion- π	CL		
	Y197	Cátion- π	CL		
39	W149	Ligação de H	ED	44	34,9132
	W149	Cátion- π	CL		
	Y197	Cátion- π	CL		
	E195	Ânion- π	CL		
	F482	Empilhamento- π	CL		
40	Y197	Ligação de H	CL	45	43,7969
	E195	Ligação de H	CL		
	Y197	Ligação de H	CL		
	F482	Cátion- π	CL		

Para os análogos do ligante **21**, tem-se que as interações que mais se repetem envolvem os resíduos W149 e Y197 do lado (+) do sítio ativo e o resíduo F482 do lado (-).

Os valores de pontuação indicados pela função de pontuação ASP para essa série de compostos foram, em geral, menores do que os apresentados para os demais ligantes analisados. Isso está em acordo com os dados de CI_{50} obtidos da literatura para essa série de compostos, que são menos ativos que os demais compostos apresentados. Assim, analisando a totalidade dos dados de CI_{50} mostrados nesse trabalho cabe ressaltar que apesar da relação entre pontuação e CI_{50} não ser linear, o modelo computacional parece apto a indicar ao menos grandes diferenças nessa propriedade.

4 CONCLUSÕES

O trabalho aqui descrito fez uso da estrutura cristalográfica dos nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$ (PDB ID: 5KXI) e do software GOLD® para realizar estudos de ancoramento molecular com ligantes clássicos desse receptor e séries de análogos com a finalidade de avaliar as interações preditas pelo modelo computacional e assim confirmar sua capacidade preditiva.

O modelo foi validado através da redocagem do ligante **3**, para o qual a função de pontuação ASP apresentou melhor desempenho com base na posição dos átomos do ligante co-cristalizado (RMSD) e foi utilizada nos cálculos subsequentes.

No que diz respeito às interações principais observadas, nota-se que os resíduos que interagem no complexo nicotina-receptor (W149 e Y197) costumam aparecer com frequência nos ligantes ancorados pela função ASP, o que indica boa capacidade preditiva da função para essa propriedade.

Quanto a valores de propriedades farmacológicas medidos experimentalmente, são necessários estudos complementares que envolvam uma faixa maior dos mesmos para confirmar a capacidade preditiva da função de pontuação utilizada. Apesar disso, os dados aqui mostrados indicam que o programa tem potencial para realizar predições desse tipo, uma vez que, em geral, retornou pontuações menores para ligantes menos ativos.

Ao fim do trabalho, nota-se que o modelo necessita de refinamentos. É possível aumentar a precisão das previsões do modelo utilizando um método de reavaliação (*rescore*) dentro do próprio software. Outro fator que pode mudar consideravelmente os resultados é a realização do ancoramento molecular no modo flexível. Também é interessante validar o modelo quanto à capacidade do mesmo de prever a seletividade dos ligantes frente a outros subtipos dos nAChRs como, $\alpha 7$ e $\alpha 3\beta 4$.

REFERÊNCIAS

- 1 JENSEN, A. A.; FRØLUND, B.; LILJEFORS, T.; KROGSGAARD-LARSEN, P. Neuronal nicotinic acetylcholine receptors: structural revelations, target identifications, and therapeutic inspirations. **J. Med. Chem.**, v. 48, n. 15, 4705-4745, 2005.
- 2 HÖGGER, P.; SADÉE, W.; LAMEH, J. The muscarinic acetylcholine receptors. **Biomembranes**, v. 2B, p. 301-320, 1996.
- 3 HOGG, R. C.; RAGGENBASS, M.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. **Rev. Physiol., Biochem. Pharmacol.**, v. 147, p. 1-46, 2003.
- 4 QUIK M.; ZHANG, D.; MCGREGOR, M.; BORDIA, T. Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. **Biochem. Pharmacol.**, v. 97, n. 4, p. 399-407, 2015.
- 5 GOTTI, C.; CLEMENTI, F.; FORNARI, A.; GAIMARRI, A.; GUIDUCCI, S.; MANFREDI, I.; MORETTI M.; PEDRAZZI, P; PUCCI, L.; ZOLI, M. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 78, n. 7, p. 703-711, 2009.
- 6 DINELEY, K. T.; PANDYA, A. A.; YAKEL, J. L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 36, n. 2, p. 96-108, 2015.
- 7 GOTTI, C.; ZOLI, M.; CLEMENTI, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 27, n. 9, p. 482-491, 2006.
- 8 UNWIN, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at a 4 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 364, n. 4, p. 967-989, 2005.
- 9 GOTTI, C.; CLEMENTI, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. **Prog. Neurobiol.**, v. 74, n. 6, p. 363-369, 2004.
- 10 STOKES, C.; TREININ, M.; PAPKE, R. L. Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 36, n. 8, p. 514-523, 2015.
- 11 AUERBACH, A. Activation of endplate acetylcholine receptors by agonists. **Biochem. Pharmacol.**, v. 97, n. 4, p. 601-608, 2015.
12. DAJAS-BAILADOR, F.; WONNACOTT, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 35, n. 6, p. 317-324, 2004.
- 13 LAX, P.; FUCILE, S.; EUSEBI, F. Ca²⁺ Permeability of human heteromeric nAChRs expressed by transfection in human cells. **Cell Calcium**, v. 32, n. 2, p. 53-58, 2002.

14 GOTTI, C.; MORETTI, M.; GAIMARRI, A.; ZANARDI, A.; CLEMENTI, F.; ZOLI, M. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, n. 8, p. 1102-1111, 2007.

15 HURST, R.; ROLLEMA, H.; BERTRAND, D. Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 137, n. 1, p. 22-54, 2013.

16 PAPKE, R. L. Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors. **Biochem. Pharmacol.**, v. 89, n. 1, p. 1-11, 2014.

17 ALBUQUERQUE, E. X.; PEREIRA, E. F. R.; ALKONDON, M.; ROGERS, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev.**, v. 89, n. 1, p. 73-120, 2009.

18 WALLACE, T. L.; BERTRAND, D. Neuronal $\alpha 7$ nicotinic receptors as a target for the treatment of Schizophrenia. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 124, p. 79-111, 2015.

19 BILLEN, B.; SPURNY, R.; BRAMS, M.; VAN ELK, R.; VALERA-KUMMER, S.; YAKEL, J. L.; VOETS, T.; BERTRAND, D.; SMIT, A. B.; ULENS, C. Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 109, n. 23, p. 9173-9178, 2012.

20 BOURNE, Y.; SULZENBACHER, G.; RADIC, Z.; ARÁOZ, R.; REYNAUD, M.; BENOIT, E.; ZAKARIAN, A.; SERVENT, D.; MOLGÓ, J.; TAYLOR, P.; MARCHOT, P. Marine macrocyclic imines, pinnatoxins A and G: structural determinants and functional properties to distinguish neuronal $\alpha 7$ from muscle $\alpha 12 \beta \gamma \delta$ nAChRs. **Structure**, v. 23, n. 6, p. 1106-1115, 2015.

21 SPURNY, R.; DEBAVEYE, S.; FARINHA, A.; VEYS, K.; VOS, A. M.; GOSSAS, T.; ATACK, J.; BERTRAND, S.; BERTRAND, D.; DANIELSON, U. H.; TRESADERN, G.; ULENS, C. Molecular blueprint of allosteric binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. **P. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 112, n. 19, p. E2543-E2552, 2015.

22 MORALES-PEREZ, C. L.; NOVIELLO, C. M.; HIBBS, R. E. X-Ray structure of the human $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptor. **Nature**, v. 538, p. 411-415, 2016.

23 ELDRIDGE, M. D.; MURRAY, C. W.; AUTON, T. R.; PAOLINI, G. V.; MEE, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **J. Comput.-Aided Mol. Des.**, v. 11, n. 5, p. 425-445, 1997.

24 BAXTER, C. A.; MURRAY, C. W.; CLARK, D. E.; WESTHEAD, D. R.; ELDRIDGE, M. D. Flexible docking using tabu search and an empirical estimate of binding affinity. **Proteins**, v. 15, n. 33, p. 367-382, 1998.

25 MOOJI, W. T.; VERDONK, M. L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. **Struct. Func. Bioinf.**, v. 62, n. 2, p. 272-287, 2005.

- 26 KORB, O.; STÜTZLE, T.; EXNER, T. E. Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 49, n. 1, p. 84-96, 2009.
- 27 FAUNDEZ-PARRAGUEZ, M.; FARIAS-RABELO, N.; GONZALEZ-GUTIERREZ, J. P.; ETCHEVERRY-BERRIOS, A.; ALZATE-MORALES, J.; ADASME-CARREÑO, F. A.; VARAS, R.; BERMUDEZ, I.; ITURRIAGA-VAZQUEZ, P. Neonicotinic analogues: selective antagonists for $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 21, n. 10, p. 2687-2694, 2013.
28. YU, L. F.; ZHANG, H. K.; CALDARONE, B. J.; EATON, J. B.; LUKAS, R. J.; KOZIKOWSKI, A. P. Recent developments in novel antidepressants targeting $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptors. **J. Med. Chem.**, v.57, n. 20, p. 8204-8223, 2014.
29. YU, L. F.; EATON, J. B.; FEDOLAK, A.; ZHANG, H. K.; HANANIA, T.; BRUNNER, D.; LUKAS, R. J.; KOZIKOWSKI, A. P. Discovery of highly potent and selective $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) partial agonists containing an isoxazolylpyridine ether scaffold that demonstrate antidepressant-like activity. Part II. **J. Med. Chem.**, v.55, n. 22, p. 9998-10009, 2013.
- 30 LIU, Y.; RICHARDSON, J.; TRAN, T.; AL-MUHTASIB, N.; XIE, T.; YENUGONDA, V. M.; SEXTON, H. G.; REZVANI, A. H.; LEVIN, E. D.; SAHIBZADA, N.; KELLAR, K. J.; BROWN, M. L.; XIAO, Y.; PAIGE, M. Chemistry and pharmacological studies of 3-alkoxy-2,5-disubstituted-pyridinyl compounds as novel selective $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor ligands that reduce alcohol intake in rats. **J. Med. Chem.**, v. 56, n. 7, p. 3000-3011, 2014.
- 31 SUN, Q.; YE, C. Q.; YE, J.; LI, C. L.; CHENG, T. M.; LI, R. T. Unique spirocyclopiperazinium salt III: further investigation of monospirocyclopiperazinium (MSPZ) salts as potential analgesics. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 17, n. 22, p. 6245-6249, 2007.
- 32 ZHANG, H.; TÜCKMANTEL, W.; EATON, J. B.; YUEN, P. W.; YU, L. F.; BAJJURI, K. M.; FEDOLAK, A.; WANG, D.; GHAVAMI, A.; CALDARONE, B.; PATERSON, N. E.; LOWE, D. A.; BRUNNER, D.; LUKAS, R. J.; KOZIKOWSKI, A. P. Chemistry and behavioral studies identify chiral cyclopropanes as selective $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor partial agonists exhibiting an antidepressant profile. **J. Med. Chem.**, v. 55, n. 2, p. 717-724, 2012.
- 33 ZHANG, H. K, YU, L. F.; EATON, J. B.; WHITEAKER, P.; ONAJOLE, O. K.; HANANIA, T.; BRUNNER, D.; LUKAS, R. J.; KOZIKOWSKI, A. P. Chemistry, pharmacology, and behavioral studies identify chiral cyclopropanes as selective $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor partial agonists exhibiting an antidepressant profile. Part II. **J. Med. Chem.**, v. 56, n. 13, p. 5495-5504, 2013.
- 34 CARROLL, F. I.; BLOUGH, B. E.; MASCARELLA, S. W.; NAVARRO, H. A.; EATON, J. B.; LUKAS, R. J.; DAMAJ, M. I. Synthesis and biological evaluation of bupropion analogues as potential pharmacotherapies for smoking cessation. **J. Med. Chem.**, v. 53, n. 5, p. 2204-2214, 2010.

35 ZHANG, H. K.; EATON, J. B.; YU, L. F.; NYS, M.; MAZZOLARI, A.; VAN ELK, R.; SMIT, A. B.; ALEXANDROV, V.; HANANIA, T.; SABATH, E.; FEDOLAK, A.; BRUNNER, D.; LUKAS, R. J.; VISTOLI, G.; ULENS, C.; KOZIKOWSKI, A. P. Insights into the structural determinants required for high-affinity binding of chiral cyclopropane-containing ligands to $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptors: an integrated approach to behaviorally active nicotinic ligands. **J. Med. Chem.**, v. 55, n. 18, p. 8028-8037, 2012.

36 LIU, J.; EATON, J. B.; CALDARONE, B.; CAVINO, K.; RUIZ, C.; TERRY, M.; FEDOLAK, A.; WANG, D.; GHAVAMI, A.; LOWE, D. A.; BRUNNER, D.; LUKAS, R. J.; KOZIKOWSKI, A. P. Discovery of isoxazole analogues of sazetidine-a as selective $\alpha 4\beta 2$ -nicotinic acetylcholine receptor partial agonists for the treatment of depression. **J. Med. Chem.**, v. 54, n. 20, p. 7280-7288, 2011.

37 DEUTHER-CONRAD, W.; PATT, J. T.; FEUERBACH, D.; WEGNER, F.; BRUST, P.; STEINBACH, J. Norchloro-fluoro-homoepibatidine: specificity to neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes in vitro. **Il Farmaco**, v. 59, n. 10, p. 785-792, 2004.

Artigo

Receptores Nicotínicos de Acetilcolina dos Subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$: Características, Participação em Processos Patogênicos e Compostos Bioativos**Batista, V. S.; Nascimento-Júnior, N. M.****Rev. Virtual Quim.*, 2016, 8 (5), 1721-1739. Data de publicação na Web: 11 de julho de 2016<http://rvq.sbq.org.br>**The $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptors: Characteristics, Role in Pathogenic Processes and Bioactive Compounds**

Abstract: Neuronal nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs) are potential targets for the treatment of several central nervous system disorders, including Alzheimer's disease, Parkinson's disease and schizophrenia. On this review will be discussed the main characteristics of the nAChRs, more specifically of the $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ subtypes, examples of bioactive compounds that act on these receptors and structure-activity relationships of some compounds on their respective target receptors.

Keywords: Medicinal chemistry; nicotinic acetylcholine receptors; bioactive compounds; structure-activity relationship.

Resumo

Os receptores nicotínicos de acetilcolina neuronais (nAChRs) são alvos em potencial para o tratamento de diversas doenças do sistema nervoso central (SNC), incluindo doença de Alzheimer, doença de Parkinson e esquizofrenia. Nesta revisão serão abordadas as características principais dos nAChRs, mais especificamente dos subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$, exemplos de compostos bioativos que atuam nesses receptores e a relação estrutura-atividade de alguns compostos em seus respectivos receptores alvo.

Palavras-chave: Química medicinal; receptores nicotínicos de acetilcolina; compostos bioativos; relação estrutura-atividade.

* Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM), Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara, CEP 14800-060, Araraquara-SP, Brasil.

✉ nailtonjr@gmail.com

DOI: [10.21577/1984-6835.20160114](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160114)

Receptores Nicotínicos de Acetilcolina dos Subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$: Características, Participação em Processos Patogênicos e Compostos Bioativos

Victor de Sousa Batista, Nailton M. Nascimento-Júnior*

Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM), Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, Campus Araraquara, CEP 14800-060, Araraquara-SP, Brasil.

* nailtonjr@gmail.com

Recebido em 23 de março de 2016. Aceito para publicação em 6 de julho de 2016

1. Introdução
2. A relação estrutura-atividade de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo $\alpha 7$
3. A relação estrutura-atividade de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo $\alpha 4\beta 2$
4. A relação estrutura-atividade de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo $\alpha 3\beta 4$
5. Conclusão

1. Introdução

Os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) são parte do grupo de receptores do neurotransmissor endógeno acetilcolina (ACh) **(1)** (**Figura 1**) que abrange, além dos já mencionados nAChRs, os receptores muscarínicos de acetilcolina (mAChRs), sendo os mAChRs receptores metabotrópicos que possuem alta afinidade pela muscarina **(2)** e baixa afinidade pela nicotina **(3)**, sendo o comportamento inverso observado nos nAChRs. Quanto a fisiologia da neurotransmissão colinérgica, a ativação dos mAChRs pela toxina do cogumelo *Amanita*

muscaria, a muscarina **(2)**, ocorre em um período de tempo relativamente longo, da ordem de milissegundos a segundos, enquanto os nAChRs são receptores ionotrópicos que são ativados em intervalos de tempo da ordem de sub-microssegundos a microssegundos pela molécula de nicotina **(3)**,¹⁻³ comumente proveniente da planta *Nicotiana tabacum*. Os nAChRs podem ser divididos em dois grupos, os receptores nicotínicos musculares e os neuronais,^{4,5} com os nAChRs neuronais majoritariamente expressos pelos subtipos $\alpha 7$, $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$, podendo exercer funções variadas como regulação de excitabilidade neuronal e liberação de neurotransmissores.⁶⁻⁸

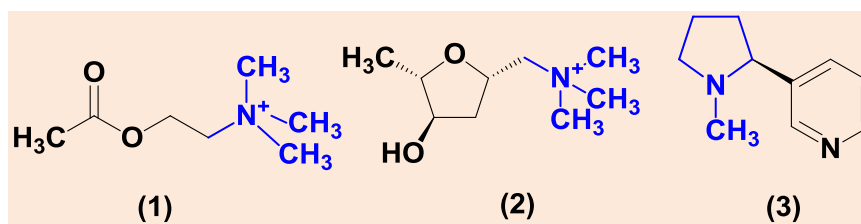


Figura 1. Estruturas das moléculas de acetilcolina (1), muscarina (2) e nicotina (3)

Estruturalmente, os nAChRs neuronais são glicoproteínas grandes (aproximadamente 290 kDa) que apresentam cinco subunidades transmembranares arranjadas em torno de um poro central permeável a cátions^{3,7,9} e fazem parte da família dos canais iônicos cys-

loop, que inclui também os nAChRs musculares, receptores de ácido gama aminobutírico (4) (GABA_A e GABA_C), receptores de glicina (5) e receptores de serotonina (5-HT₃) (6) (Figura 2).^{7,10}

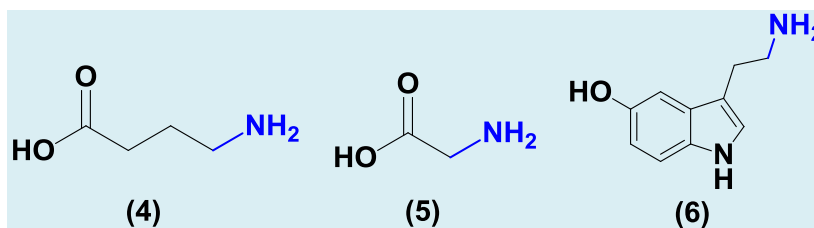


Figura 2. Estruturas das moléculas de ácido gama amino-butírico (4), glicina (5) e serotonina (6)

Cada receptor nicotínico de acetilcolina (nAChR) é dividido em três domínios: um grande domínio extracelular *N*-terminal onde encontram-se os sítios ortostéricos, um poro transmembranar e um pequeno domínio intracelular, tendo esse conjunto um comprimento total de aproximadamente 160 Å.⁹ Os nAChRs neuronais apresentam uma grande variedade de funções biológicas que estão relacionadas com as diversas combinações possíveis entre as subunidades α e β , a saber, α ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) e β ($\beta 2$ - $\beta 4$), podendo estas combinações serem homoméricas, como os receptores $\alpha 7$, $\alpha 8$ e $\alpha 9$ ou heteroméricas, como os receptores $\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7\alpha 8^*$, $\alpha 9\alpha 10^*$, $\alpha 6\beta 2^*$, $\alpha 3\beta 4^*$, entre outros, com a presença obrigatória de uma subunidade α no receptor.^{3,5,7} O asterisco representa a possibilidade de outras subunidades no complexo. Classifica-se as subunidades como α ou não- α baseando-se na presença ou ausência, respectivamente,

de cisteínas vicinais ligadas por pontes dissulfeto no domínio extracelular do receptor.¹¹

Ao interagirem com seu neurotransmissor endógeno **1** ou com um agonista, a estrutura dos nAChRs muda de conformação, de modo que é possível descrever, muito simplificada, o processo de ativação do receptor em três etapas: **(a)** a conformação fechada, onde o receptor está apto a interagir com um agonista e não há a passagem de cátions pelo poro permeável, **(b)** a conformação aberta, onde o receptor já interagiu com um agonista e permite a passagem de cátions em um intervalo de tempo da ordem de milissegundos e **(c)** a conformação dessensibilizada, onde o receptor novamente deixa de permitir a passagem de cátions pelo poro central.¹² O poro central é permeável a cátions monovalentes e bivalentes, principalmente sódio e cálcio.^{13,14,15} Estudos sugerem que ao

retornar da conformação dessensibilizada para a conformação fechada não ocorre a passagem pela conformação aberta, indicando um processo cíclico. Os mesmos estudos mostram também que existem múltiplos estados conformacionais fechado, aberto e dessensibilizado conectados em uma sequência complexa que ainda precisa ser elucidada para a compreensão completa do comportamento macroscópico de alguns nAChRs.¹²

O sítio ortostérico dos nAChRs neuronais encontra-se no domínio extracelular do receptor, nas interfaces entre as subunidades α e as demais subunidades que os constituem, de modo que as subunidades desse tipo são o componente primário do sítio ativo e as subunidades do tipo β são responsáveis pela parte complementar do mesmo, como exemplificado na **Figura 3**, sendo que a permeabilidade a cátions e

afinidade por determinado ligante bioativo variam grandemente em função dos componentes complementares do receptor.^{16,17,18} Além disso, os nAChRs costumam apresentar uma subunidade assessora que não participa ativamente da formação do sítio ortostérico mas influencia nas propriedades farmacológicas e biofísicas do receptor.⁷ Dessa forma, fica clara a abundância de configurações possíveis para os nAChRs, uma vez que as diversas subunidades existentes podem se combinar em inúmeras configurações. Além do sítio ortostérico, os nAChRs apresentam também diversos sítios alostéricos onde moléculas específicas podem interagir com o receptor e potencializar ou inibir a ativação causada por um agonista,¹⁹ sendo esta uma das possíveis abordagens utilizadas no planejamento de novas substâncias bioativas que tem como alvo os nAChRs.

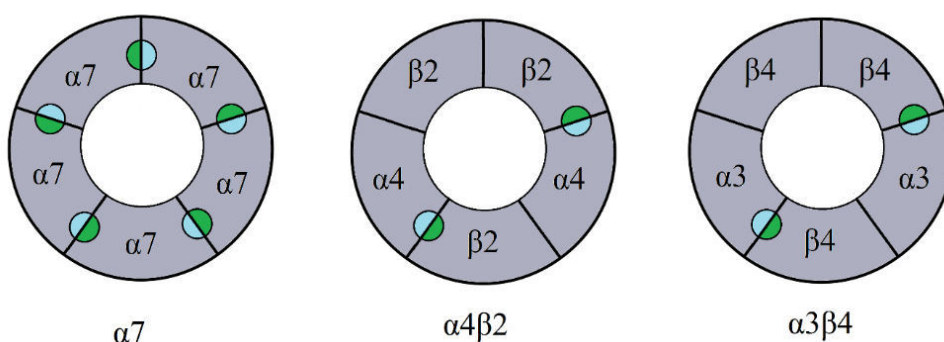


Figura 3. Representação dos nAChRs neuronais abordados nesse artigo e seus sítios ortostéricos, com a face principal em azul e a face complementar em verde. Outros arranjos entre mesmas subunidades apresentadas também são possíveis. Adaptado de Gotti e colaboradores³

Por conta da grande variedade de funções dos nAChRs neuronais, estes são fundamentais no entendimento e tratamento de diversas doenças neuropsiquiátricas, como a síndrome de Tourette, autismo, déficit de atenção, doença hiperativa, esquizofrenia, epilepsia, depressão, ansiedade, doença de Alzheimer e doença de Parkinson, conforme pode ser observado na **Tabela 1**.^{6,8,10,20-25}

Até o presente momento, ainda não existem estruturas cristalográficas completas para os nAChRs neuronais dos mamíferos. A maior parte do conhecimento estrutural sobre esses receptores é proveniente do estudo de proteínas ligantes de acetilcolina (AChBP) homólogas obtidas de espécies de peixe como a *Torpedo marmorata* (PDB ID: 1OED), espécies moluscos como a *Lymnaea stagnalis* (PDB ID: 1UW6) e *Aplysia californica*

(PDB ID: 2BYN) e das proteínas procarióticas GLIC (canal iônico ligante-dependente da cianobactéria *Gloeobacter violaceus*, PDB ID: 4NPQ) e ELIC (canal iônico ligante-

dependente da bactéria *Erwinia chrysanthemi*, PDB ID: 2VL0), entre outras.^{2,9,18,22,26-28}

Tabela 1. Possíveis receptores alvo no tratamento de algumas desordens neurológicas e região do cérebro afetada pela doença. Dados obtidos de Jensen e colaboradores²⁵

Desordem	Receptor	Região do cérebro
Epilepsia	$\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$, $\beta 4^*$, $\alpha 5^*$	Cortex frontal, Hipocampo
Doença de Alzheimer	$\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$	Cortex, Hipocampo
Esquizofrenia	$\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 7^*$	Hipocampo
Ansiedade	$\alpha 4^*$, $\alpha 7^*$	Hipocampo
Doença de Parkinson	$\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$	Sistema nigroestriatal
Dependência da nicotina	$\alpha 4\beta 2^*$, $\alpha 6\beta 2\beta 3^*$, $\beta 4$	Sistema mesolímbico

2. A relação estrutura-atividade de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo $\alpha 7$

Em geral, a localização dos nAChRs neuronais do tipo $\alpha 7$ no cérebro se conserva entre diferentes espécies de mamíferos, apesar de diferenças significativas terem sido reportadas entre roedores e primatas em regiões associadas a cognição e processamento sensorial. Esses receptores são expressos grandemente nas regiões do hipocampo, córtex, substância negra e cerebelo.²²

Estudos recentes com roedores indicam que agonistas parciais e totais dos nAChRs $\alpha 7$ são eficientes no tratamento de distúrbios neurológicos como a esquizofrenia^{22,29} e o mal de Parkinson e também no controle de desordens motoras provocadas por medicamentos, como as discinesias induzidas por levodopa que surgem no decorrer do tratamento do mal de Parkinson.^{6,24}

Os nAChRs neuronais do tipo $\alpha 7$ são estruturalmente e funcionalmente distintos dos demais nAChRs, apresentando menor afinidade por nicotina e acetilcolina que os

demais, dessensibilização rápida e alta permeabilidade a Ca^{2+} , o que lhes permite regular diversos mecanismos celulares que dependem desse cátion.^{6,19} São constituídos exclusivamente por alças transmembranares do subtipo $\alpha 7$, o que confere a eles uma maior quantidade de sítios ortostéricos do que os demais nAChRs neuronais.^{16,30} A ativação dos nAChRs $\alpha 7$ desencadeia aumento na liberação de glutamato no hipocampo, demonstrando a importância desses receptores para os mecanismos sinápticos glutamatérgicos e modulação dos circuitos neurais do sistema nervoso central (SNC).^{31,32}

Uma das características dos nAChRs $\alpha 7$ é a sua sensibilidade única ao antagonista α -Bungarotoxina (α -Btx) produzido pela cobra *Bungarus multicinctus*, que se liga permanentemente a esse receptor e impede a abertura do canal iônico, sendo que a utilização dessa substância em conjunto com técnicas de autorradiografia foi essencial na determinação inicial da localização desse receptor no SNC.^{3,7,22}

Existem diversos compostos bioativos que atuam nos nAChRs $\alpha 7$ descritos na literatura, como exemplificado na **Figura 4**. O composto **7** faz parte de uma série de derivados contendo a subunidade estrutural dibenzosuberila inicialmente proposta por

Ulens e colaboradores³³ como um ligante do sítio ortostérico dos nAChRs $\alpha 7$ que apresentou alta afinidade ($K_i = 63,09$ nM) em estudos *in silico* e que não apresentava interação significativa com os nAChRs $\alpha 4\beta 2$ em estudos de deslocamento utilizando o radioligante [³H]epibatidina. Entretanto, os dados obtidos *in vitro* em conjunto com análises já mencionadas mostram que **7** atua como um inibidor não competitivo dos nAChRs $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 2$, bem como dos receptores 5-HT₃, indicando que **7** atua em sítios alostéricos dos receptores dessa família através de um mecanismo comum, provavelmente impedimento estérico do poro iônico central.

A bradaniclina (**8**) é um agonista parcial desenvolvido pela Targacept Inc. que apresenta alta afinidade pelos nAChRs $\alpha 7$ e baixa afinidade pelo receptor de serotonina 5-HT₃. Testes preliminares utilizando roedores sugeriam que **8** apresentava potencial para o tratamento das três categorias de sintomas da esquizofrenia (positivos, negativos e cognitivos) e também efeitos sinérgicos com outros medicamentos antipsicóticos, como a clozapina (Clozaril®, Fazacol®). A substância também foi considerada um medicamento em potencial para o tratamento de Alzheimer e transtorno de déficit de atenção com hiperatividade, mas apesar dos resultados positivos em roedores o composto não obteve aprovação nos testes clínicos para nenhuma das três desordens.³⁴

O estilbeno substituído(**9**) inicialmente foi proposto por Gotti e colaboradores³⁵ como um potente antagonista competitivo e seletivo dos nAChRs $\alpha 7$ presentes em cérebros de galinhas ($Cl_{50} = 119$ nM), mas em estudos posteriores por Angelantonio e colaboradores³⁶ demonstrou-se que **9** também atua nos nAChRs $\alpha 3\beta 4^*$ presentes em células do tipo cromafim de roedores, sendo o enantiômero de configuração *R* mais

potente do que seu atípodo ótico nessa situação ($Cl_{50} = 0,33$ μ M e $1,5$ μ M, respectivamente). Em estudos subsequentes, Gotti e colaboradores³⁷ demonstraram que o composto apresenta maior afinidade por nAChRs $\alpha 7$ de mamíferos, expressos em oócitos da espécie *Xenopus*, do que por nAChRs $\alpha 7$ de aves. Esses dados combinados evidenciam que existem diferenças de seletividade e especificidade significativas entre receptores provenientes de espécies distintas.

O composto **10** foi desenvolvido por Zheng e colaboradores³⁸ tendo como alvo os nAChRs do subtipo $\alpha 9\alpha 10$, que se acredita estarem associados dores crônicas nas regiões do sistema nervoso periférico (SNP). A molécula **10** apresentou inibição adequada do receptor alvo ($Cl_{50} = 0,56$ nM) e também do subtipo $\alpha 7$ (Figura 4), ambos expressos em oócitos da espécie *Xenopus*, mas devido à natureza altamente polar da subunidade estrutural catiônica espera-se que o composto apresente dificuldades em ultrapassar a barreira hematoencefálica (BHE). Essa característica torna muito mais interessante o estudo da molécula visando os nAChRs $\alpha 9\alpha 10$, que não estão presentes no SNC. O composto **11** é um peptídeo sintético derivado da classe das α -conotoxinas (α -Ctxs) documentado por Whiteaker e colaboradores³⁹ como um antagonista potente e seletivo dos nAChRs $\alpha 7$. As α -Ctxs naturais são peptídeos pequenos, contendo entre 13 e 19 resíduos de aminoácidos, produzidos por gastrópodes do gênero *Conus* e altamente seletivas para alguns tipos de nAChRs. O peptídeo **11** se liga reversivelmente ao receptor, com recuperação total da sensibilidade após 15 minutos, além de inibir tanto receptores de roedores quanto de humanos com potência comparável, o que faz com que esse antagonista seja potencialmente útil no estudo das funções dos nAChRs $\alpha 7$.⁴⁰

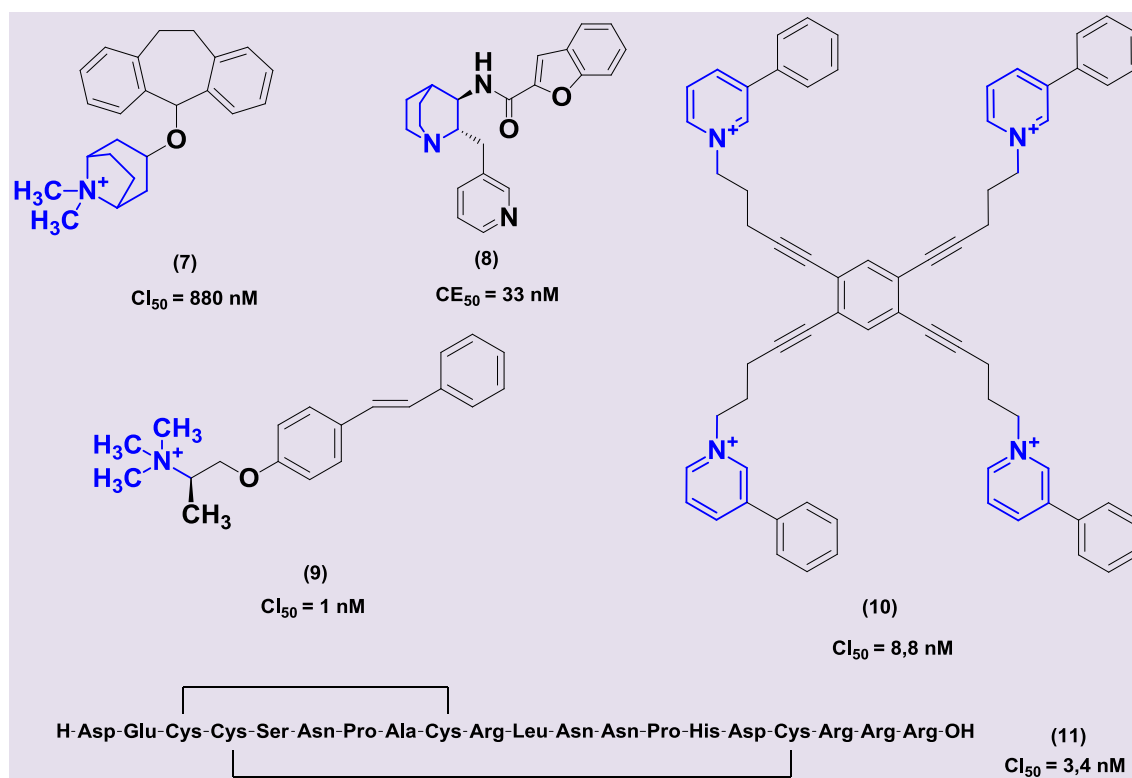


Figura 4. Estrutura química dos compostos **7**³³, **8**⁴¹, **9**³⁷, **10**³⁸, **11**⁴⁰, os quais atuam nos nAChRs do subtipo $\alpha 7$

Na **Figura 5** está representada uma quinuclidina substituída (**12**), análoga da bradaniclina (**8**), e alguns análogos estruturais obtidos por Mazurov e colaboradores⁴² que auxiliam no entendimento de como estes análogos estruturais se relacionam com a afinidade pelo nAChR $\alpha 7$. Substituições realizadas na região do anel piridínico (destacado em vermelho) alteram consideravelmente a afinidade do composto pelo receptor alvo devido a fatores estereoeletrônicos. A troca do substituinte 3-piridina **12** pelos substituintes 2-piridina **13**, 3-quinolina **16**, 2-furano **17** ou benzofuran-2-il **18** resulta em diminuição ou perda de afinidade. Esta perda de afinidade possivelmente se deve a existência de ligações de hidrogênio intramoleculares que conferem uma potencial restrição conformacional aos derivados **13**, **17** e **18** ou fatores estéricos, no caso dos derivados **16** e **18**, dificultando a interação com o sítio ativo.

No caso do composto **15**, a diminuição da afinidade pode estar relacionada à perda da

interação entre a subunidade piridínica e a cadeia lateral de um dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo, podendo as interações cátion- π e hidrofóbicas serem as responsáveis pela interação entre a molécula e o biorreceptor alvo. Há pouca diferença de afinidade entre os compostos **12** e **14** devido a semelhança estrutural, visto que não há perda do ponto aceptor de ligação de hidrogênio e a aromaticidade é conservada. A substituição do grupo 4-bromobenzeno (destacado em azul) pelos grupos 4-fluorobenzeno **19** e benzeno **20** não resultou em perda de afinidade significativa, indicando que um halogênio na posição *para* em relação à cadeia principal é dispensável, provavelmente sendo as interações hidrofóbicas ou cátion- π as contribuições mais relevantes para a afinidade pelo receptor. Os compostos **21** e **22** tem menor afinidade por conta do tamanho dos substituintes. A substituição da função carbamato (destacada em verde) pelas funções carbamida **23** e amida **24** não resultou em diminuição significativa da

afinidade pelo receptor devido à semelhança entre esses três grupos, mas a substituição

pela sulfonamida teve como resultado pronunciada redução da afinidade.

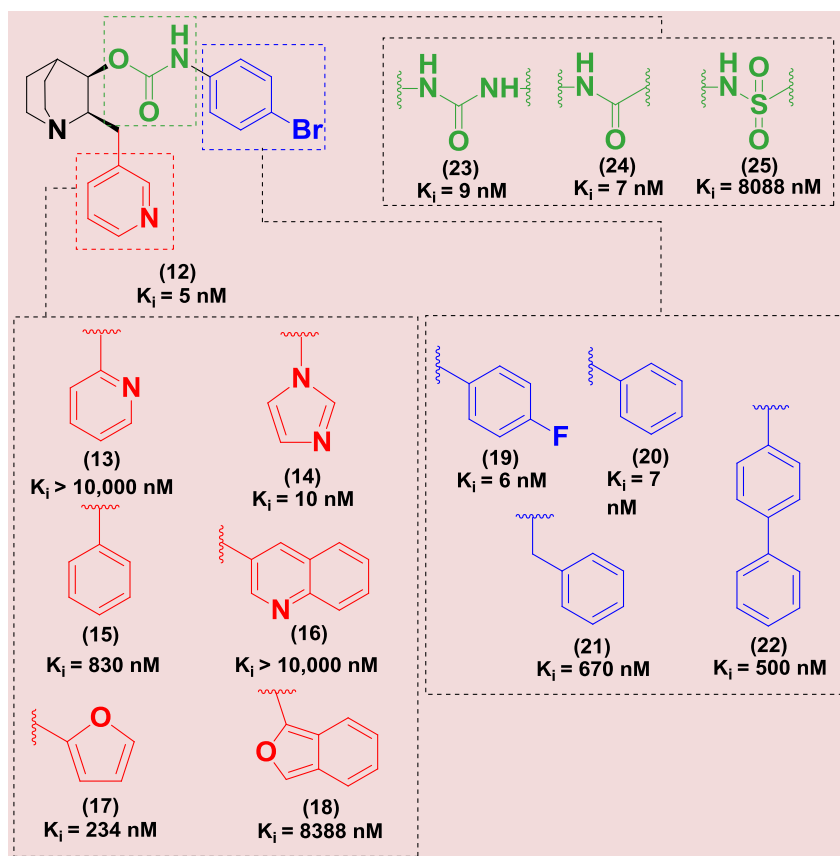


Figura 5. Modificações realizadas por MAZUROV *et al.*, (2005)⁴² na quinuclidina substituída **(12)** com seus respectivos valores de K_i frente ao nAChR $\alpha 7$

3. A relação estrutura-atividade de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo $\alpha 4\beta 2$

Os nAChRs $\alpha 4\beta 2$ são o subtipo predominante no SNC dos mamíferos.^{43,44} Esse tipo de receptor é altamente sensível a acetilcolina **(1)** e nicotina ($CI_{50} = 1,2 \text{ nM}$)⁴⁵ **(3)**, estando estreitamente relacionado ao processo de desenvolvimento de dependência a esta substância em tabagistas.^{43,44} Quando expostos a nicotina e outros agonistas totais ou parciais por longos períodos de tempo sofrem um processo chamado suprarregulação em resposta a

dessensibilização progressiva provocada, sendo esse efeito muito mais pronunciado nesse receptor do que nos demais nAChRs neuronais.^{7,16,18} A ativação dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$ aumenta a liberação de dopamina no sistema mesolímbico, proporcionando a sensação de recompensa característica de diversas drogas de abuso.⁴⁶

Estudos bioquímicos e eletrofisiológicos indicam que os nAChRs $\alpha 4\beta 2$ existem em razões estequiométricas distintas, podendo ser constituídos por duas subunidades α e três unidades β ($(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$), resultando em dois sítios ortostéricos nas interfaces $\alpha 4/\beta 2$, ou por três subunidades α e duas subunidades β ($(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$), resultando em três sítios ortostéricos e sendo esse terceiro sítio localizado na interface $\alpha 4/\alpha 4$ e

apresentando baixa afinidade por acetilcolina e outros agonistas.⁴⁴ As duas relações estequiométricas são diferentes no que diz respeito a cinética de dessensibilização, permeabilidade a cálcio, condutância unitária, sensibilidade a exposição crônica de nicotina e sensibilidade a diversos agonistas. As curvas concentração-resposta da acetilcolina são diferentes para cada estequiometria, sendo que o receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ apresenta uma curva bifásica (**Figura 6b**) característica devido a presença de sítios ortostéricos com afinidades distintas pelo neurotransmissor e o receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ apresenta uma curva concentração-resposta monofásica (**Figura 6a**). O receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ apresenta menor sensibilidade a agonistas em comparação com a outra estequiometria possível, uma vez que é necessária a presença de agonistas em todos os sítios ortostéricos para que o mesmo seja completamente ativado.^{30,43,47,48}

Ambas as formas do receptor estão presentes no SNC dos mamíferos, com estudos indicando que a estequiometria preferencialmente presente no cérebro humano é a de menor sensibilidade e que a proporção entre as duas varia quando ocorre exposição crônica a nicotina, aumentando a quantidade de receptores mais sensíveis com o passar do tempo.^{44,47}

Além de mais suscetível a nicotina, o receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ também é mais suscetível a dessensibilização causada por exposição prolongada a baixas concentrações dessa substância, enquanto o receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ apresenta maior permeabilidade a íons Ca^{2+} e cinética de dessensibilização mais rápida.⁴⁹ Além destas duas estequiometrias presentes no SNC, nas regiões do córtex e corpo estriado existe uma subpopulação desse receptor que contém a subunidade $\alpha 5$ na forma $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$.¹⁶

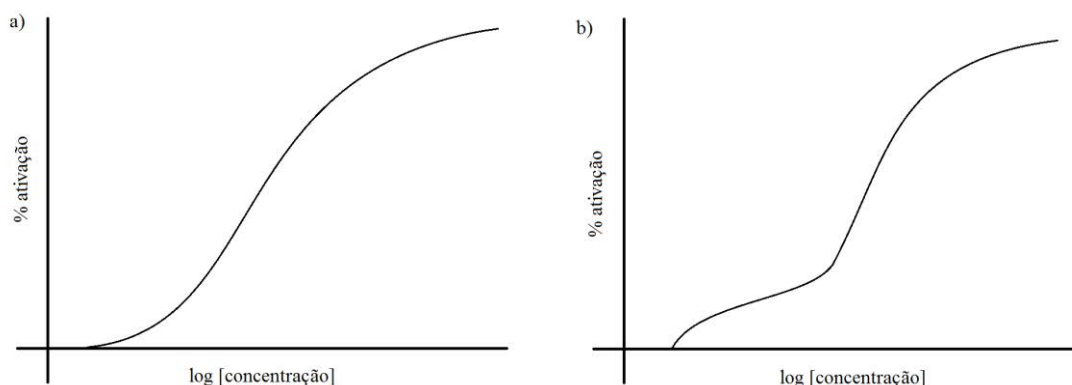


Figura 6. Curvas típicas de resposta monofásica (a) e bifásica (b)

Na **Figura 7** estão representados alguns compostos bioativos que atuam nos nAChRs $\alpha 4\beta 2$. A epibatidina (**26**) é um alcaloide que ocorre naturalmente na pele de sapos da espécie *Epipedobates tricolor* nativos do Equador.⁵⁰ A substância é tóxica, com propriedades analgésicas atribuídas à interação com os nAChRs $\alpha 4\beta 2$ e causando paralisia através da interação com os mAChRs, podendo ser letal. A toxicidade acentuada da epibatidina (**26**) e sua baixa seletividade entre os nAChRs impossibilitou a

sua utilização para fins terapêuticos, mas a substância é largamente utilizada em diversos estudos acadêmicos, como análises de deslocamento de radioligantes, estudos da relação estrutura-atividade de análogos de **26** e avaliação das propriedades farmacológicas desses análogos.^{33,51-53} O fármaco vareniclina (Champix®, Chantix®) (**27**) é um agonista parcial dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$ sintetizado por Coe e colaboradores⁵⁴, inspirado no produto natural (-)-citisina, que diminui a liberação de dopamina induzida por

nicotina e induz a baixa liberação deste neurotransmissor no período de abstinência, obtendo aprovação para ser comercializado na Europa e EUA no ano de 2006 pela empresa farmacêutica Pfizer®.⁴⁶ O fármaco **27** é um agonista total dos nAChRs dos subtipos $\alpha 7$ e $\alpha 4\beta 4$ e parcial do subtipo $\alpha 3\beta 4$.^{55,56} Atualmente, a vareniclina (**27**) e a bupropiona (Zyban®) são os únicos fármacos que não contém nicotina (**3**) aprovados pelo FDA para o tratamento da dependência da nicotina (**3**).

O composto TC-8831 (**28**) é um agonista dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$ e $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ sintetizado por STRACHAN *et al.*, (2014)⁵⁷ que apresenta boa afinidade por ambos os receptores ($K_i = 3$ e 21 nM, respectivamente) (Figura 7). Estudos realizados em primatas indicam que **28** tem efeitos positivos no tratamento das discinesias induzidas por levodopa comumente presentes durante a utilização desse medicamento para o tratamento do

mal de Parkinson.^{58,59} O composto neonicotínico (**29**) foi sintetizado por FAUNDEZ-PARRAGUES *et al.*, (2013)⁴⁵, apresentando boa inibição dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$, mas com baixa seletividade entre os subtipos desse receptor. Apresenta também baixa afinidade pelos nAChRs $\alpha 7$ ($Cl_{50} = 2,6$ μ M). A sazetidina-A (**30**) é um agonista seletivo dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$ que possui efeito analgésico e antidepressivo.^{60,61} O composto apresenta atividade agonista total no receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ e pouca atividade agonista no receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$. Especula-se que a substância converta boa parte dos receptores $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ altamente sensíveis para o estado dessensibilizado após uma exposição curta, sendo este o mecanismo responsável por seu longo efeito *in vivo*.⁶² Há evidências de que parte da liberação dopaminérgica provocada pela sazetidina-A (**29**) ocorra devido a ativação de nAChRs $\alpha 6\beta 2^*$.⁶³

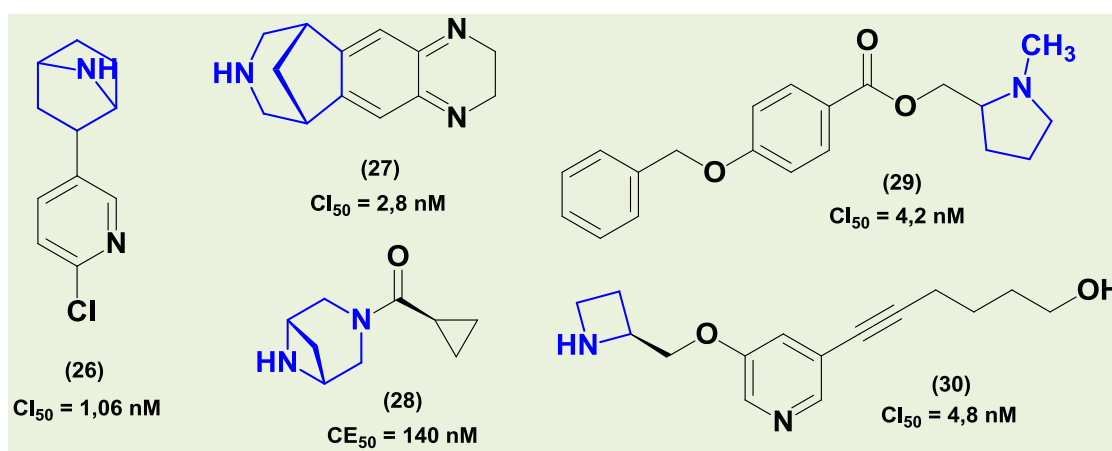


Figura 7. Estrutura química dos compostos bioativos **26**⁶⁴, **27**⁵⁵, **28**⁵⁷, **29**⁴⁵, **30**⁶⁵, os quais atuam nos nAChRs $\alpha 4\beta 2$

Tomando como ponto de partida o éster neonicotínico (**31**), análogo da molécula **29**, tem-se representada na Figura 8 algumas modificações realizadas por Faundez-Parragues e colaboradores⁴⁵ a respeito das quais podem ser feitas algumas considerações sobre a relação estrutura-atividade entre **31** e seus análogos estruturais e o receptor alvo (nAChR $\alpha 4\beta 2$). Primeiramente, os compostos sintetizados

apresentam afinidade e atividade muito maiores no receptor heteromérico $\alpha 4\beta 2$ do que no receptor homomérico $\alpha 7$ (K_i e $Cl_{50} > 1000$ nM para todos os compostos). Isso se deve provavelmente à subunidade N-metilpiperidina (em azul), também presente na nicotina (**3**), que em pH fisiológico se encontra protonada e pode interagir com o receptor nAChR $\alpha 4\beta 2$ através de interações cátion- π . As substituições realizadas sugerem

que a interação entre o receptor e a região destacada da molécula **31** é de caráter hidrofóbico, uma vez que as alterações que introduziram substituintes de maior hidrofiliidade, como a quinolina **37**, piridinas substituídas **36** e **38** e nitrobenzeno **32** levaram a menores afinidades e potência. Substituições do grupo benzeno por subunidades mais hidrofóbicas produziram compostos com afinidade e potência igual ou maior, como pode ser observado para os compostos **29**, **34** e **35**.

O composto **33** em particular apresentou comportamento incompatível com o dos demais compostos dessa série, uma vez que a 3-fenilamina possui maior hidrofiliidade quando comparada ao benzeno. Logo, além de interações hidrofóbicas, a presença de um potencial doador e aceptor de ligações de hidrogênio favorece uma interação entre o composto e o receptor alvo, possibilidade esta que pode ser reforçada ao observarmos que o composto de maior afinidade dessa série, **29**, possui um oxigênio aceptor de ligação de hidrogênio em uma posição próxima à do nitrogênio da molécula **33**.

Interessantemente, alguns dos compostos sintetizados apresentaram potência inibitória diferenciada em relação às estequiometrias possíveis do receptor alvo. A molécula **31** apresenta maior potência inibitória para a estequiometria $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ (2,5 μM) do que para as estequiometrias $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ (313 μM) e $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ (52,3 μM). Substituindo o grupo benzeno pelo grupo 3-fenilamina **33** obtém-se uma pequena diminuição da inibição para o receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ (4,3 μM), uma grande redução de atividade para a estequiometria $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ (480 μM) e um aumento significativo para a estequiometria $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ (1,02 μM). O composto **35** apresenta uma baixa afinidade para o receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ (3,6 μM) em comparação com **31** e aumento significativo para as estequiometrias $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ (6,0 μM) e $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ (95 μM). Por fim, a molécula **29** apresentou aumento de inibição para as estequiometrias $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ (3,6 μM) e $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 5$ (17,8 μM) e diminuição para o receptor $(\alpha 4\beta 2)_2\beta 2$ (25,8 μM) em comparação com **31**.

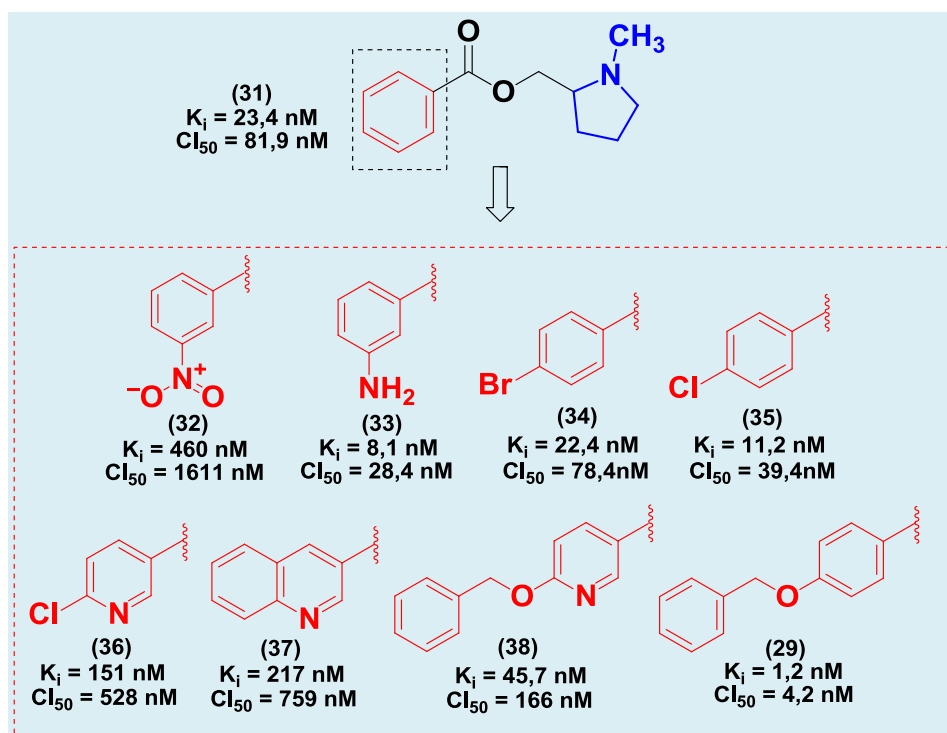


Figura 8. Modificações realizadas por FAUNDEZ-PARRAGUES *et al.*, (2013)⁴⁵ no composto neonicotínico (**31**) e seus respectivos valores de K_i e Cl_{50} para o nAChR $\alpha 4\beta 2$

4. A relação estrutura-atividade de ligantes de receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) do subtipo $\alpha 3\beta 4$

Os nAChRs subtipo $\alpha 3\beta 4$ estão localizados principalmente nas regiões do gânglio sensorial e autônomo, na habênula medial e núcleo interpeduncular.^{56,66,67} Estudos feitos com roedores, envolvendo agonistas e antagonistas parciais, indicam que esse receptor pode estar associado com dependência de diversas drogas de abuso, como nicotina, álcool, cocaína e metanfetamina.^{56,67,68} Também existem evidências de que esse receptor está envolvido no mecanismo que causa diminuição de apetite em tabagistas, sendo este um possível alvo para o planejamento de fármacos de controle de peso e antiobesidade.⁶⁹

As estruturas de alguns compostos bioativos que atuam nos nAChRs $\alpha 3\beta 4$ estão representadas na **Figura 9**. O composto **39**⁷⁰ é um antagonista dos nAChRs $\alpha 3\beta 4$ análogo da bupropiona, um fármaco utilizado no tratamento da dependência de nicotina e como antidepressivo. A substância **39** é um inibidor de recaptação de dopamina e norepinefrina mais potente do que a molécula base, sugerindo possível atividade antidepressiva. Apresenta também CI_{50} no receptor $\alpha 3\beta 4$ menor (0,62 μM) do que o bupropiona (1,8 μM). O composto **40** é uma quinuclidina substituída disponível comercialmente cujas propriedades farmacológicas foram avaliadas por Kombo e colaboradores.⁷⁰ Ademais, **40** é um antagonista não competitivo dos nAChRs $\alpha 3\beta 4$ que também apresenta propriedades

anti-histamínicas semelhantes a antagonistas de histamina com estrutura similar, como a quifenadina (Fenkarol®).

O composto **41** foi sintetizado por Yu e colaboradores⁷¹ como um agonista dos nAChRs $\alpha 4\beta 2$ ($K_i = 4,6$ nM), apresentando maior afinidade e atividade sobre esse receptor do que nos nAChRs $\alpha 3\beta 4$. Estudos com roedores mostraram que o composto apresenta boa atividade antidepressiva e testes farmacocinéticos não fornecem dados relacionados a toxicidade. OAT-1001 (**42**) foi o primeiro composto a apresentar boa afinidade e seletividade pelos nAChRs $\alpha 3\beta 4$ em relação aos demais nAChRs.⁷² A substância **42** é um agonista parcial nos nAChRs $\alpha 3\beta 4$ que causa dessensibilização do receptor em concentrações nas quais provoca uma corrente interna, gerando um efeito global antagonista, o que classifica o composto como um antagonista funcional desse receptor.^{56,73} A substância **42** e seus análogos são candidatos em potencial para o tratamento da dependência em nicotina (**1**). O composto RegIIA (**43**) é uma α -Ctx presente no veneno do gastrópode *Conus regius* que antagoniza os nAChRs $\alpha 3\beta 4$. Essa toxina **43** também afeta o subtipo $\alpha 7$, mas não tem efeito em receptores do subtipo $\alpha 4\beta 2$. Adicionalmente, **43** apresenta uma sequência de aminoácidos praticamente idêntica a sequência da toxina OmIA da espécie *Conus omia*, diferindo apenas na presença de um resíduo de glicina adicional na região C-terminal da OmIA. Essa pequena diferença confere as toxinas perfis de seletividade distintos. Essa toxina é uma ferramenta em potencial para o estudo das funções do receptor $\alpha 3\beta 4$ nos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da dependência da nicotina, uma vez que não interage com os nAChRs do subtipo $\alpha 4\beta 2$.

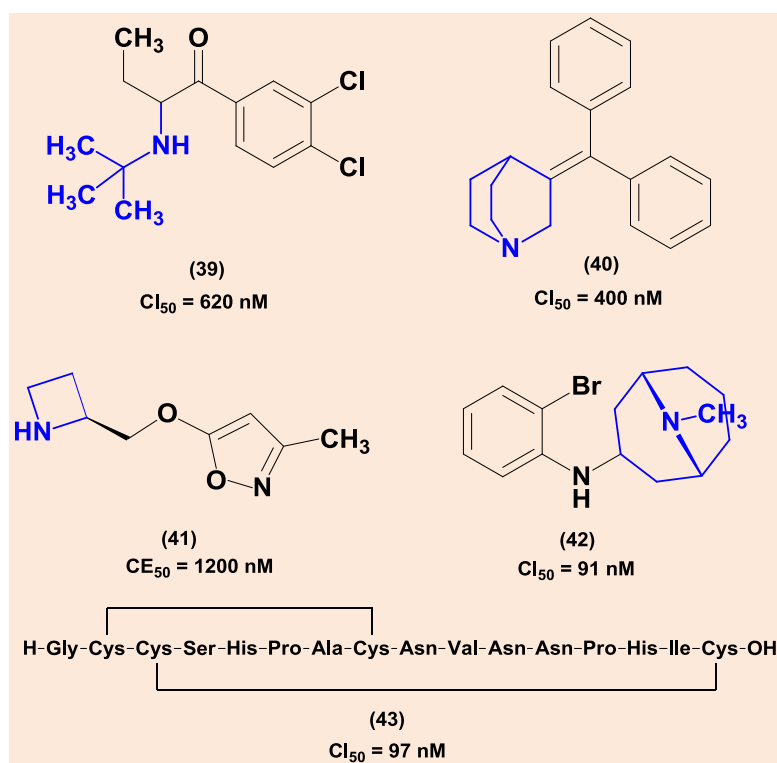


Figura 9. Estrutura química dos compostos bioativos **39**⁷⁴, **40**⁷⁰, **41**⁷¹, **42**⁵⁶, **43**⁷⁵, os quais atuam nos nAChRs $\alpha 3\beta 4$

A **Figura 10** apresenta uma série de compostos **44-54** sintetizados por Zaveri e colaboradores⁶⁶ que auxiliaram no entendimento da relação estrutura-atividade entre ligantes azabicíclicos e o receptor alvo (nAChRs $\alpha 3\beta 4$). A diidroindolinona substituída (**44**) (SR16584) apresenta alta afinidade pelo nAChRs $\alpha 3\beta 4$ e é seletiva para esse subtipo, sendo inativa frente ao subtipo $\alpha 4\beta 2$. A substituição da subunidade nonano aza-bicíclica de **44** por subunidades azepanobicíclicas **45** e **46** resultou em grande redução da afinidade pelo receptor alvo para **45** e em perda da afinidade para **46**, mantendo também a falta de afinidade pelo receptor $\alpha 4\beta 2$ em ambos os compostos ($K_i > 10.000$), provavelmente em decorrência de diferenças estéricas nesse biciclo, uma vez que o nitrogênio protonável dessa região estará localizado abaixo do plano do anel de seis membros, desfavorecendo as interações com o receptor. Além disso, é possível observar que a subunidade nonano aza-bicíclica apresenta interações mais favoráveis com o receptor do que a subunidade octano aza-bicíclica **49**, visto que também houve

uma diminuição considerável da afinidade pelo nAChRs $\alpha 3\beta 4$ em relação ao composto **44** e que a falta de afinidade pelo receptor $\alpha 4\beta 2$ se manteve inalterada. A substituição do grupo destacado em **44** por estruturas piperidínicas substituídas nos compostos **47** e **48** resultou em moléculas sem afinidade em ambos os receptores, indicando incompatibilidade desta subunidade estrutural frente ao receptor alvo.

A substituição da subunidade diidroindolinona (em vermelho) pela 3-piridina, juntamente com a incorporação de uma subunidade éster resultam em perda de afinidade pelo subtipo $\alpha 3\beta 4$, como pode ser observado no composto **50**. O composto **51** apresenta boa afinidade pelos subtipos $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 4\beta 2$ ($K_i = 10,4 \text{ nM}$), mas a substituição do grupo 3-piridina pelo grupo 3-quinolina **52** resulta em diminuição de afinidade por ambos os receptores ($K_i = 423 \text{ nM}$ para o subtipo $\alpha 4\beta 2$) devido a fatores estéricos. Nos compostos **53** e **54**, a substituição da 3-piridina **53** pela 3-quinolina **54**, simultaneamente com a troca da posição da

ligação dupla no anel azabíclico resultam em diminuição da afinidade para ambos os receptores, novamente por fatores estéricos, apesar da diminuição ser muito menos pronunciada para o subtipo $\alpha 4\beta 2$, pelo qual as moléculas apresentam elevada afinidade

($K_i = 1,95$ nM para **53** e $K_i = 29,3$ nM para **54**). Esses resultados, em conjunto com o par **51** e **52** sugerem que o sítio ortostérico do subtipo $\alpha 4\beta 2$ é capaz de acomodar ligantes um pouco mais volumosos do que o sítio do receptor $\alpha 3\beta 4$.

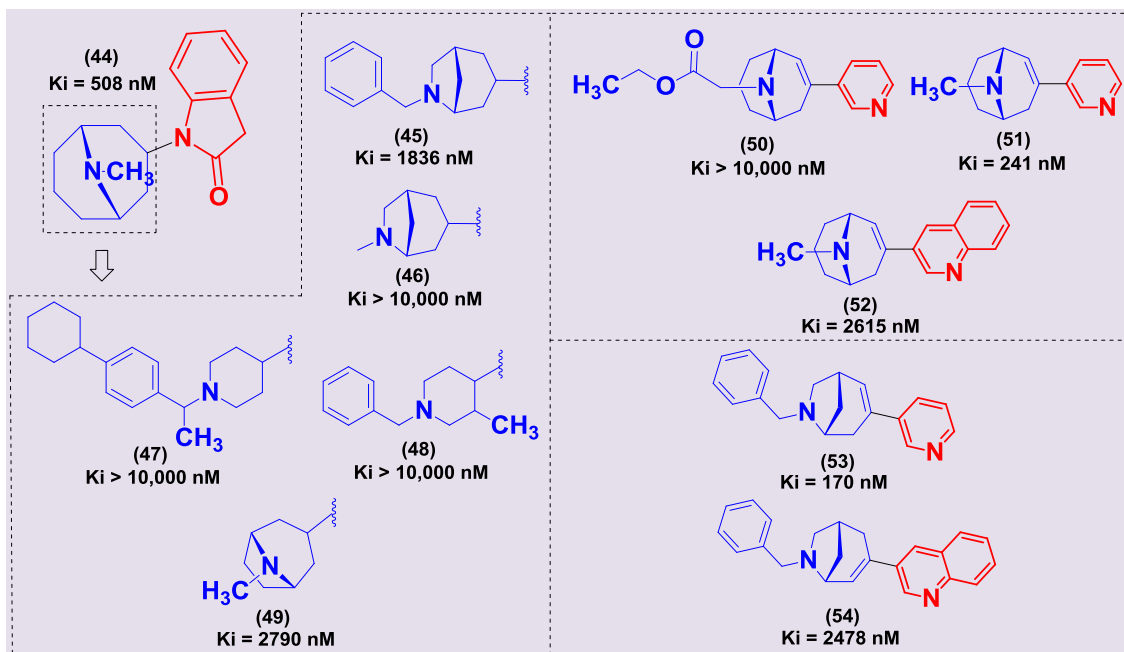


Figura 10. Modificações realizadas por ZAVERI et al., (2010)⁶⁶ no composto azabíclico (**41**) e seus respectivos valores de K_i

5. Conclusão

Os nAChRs neuronais dos subtipos $\alpha 7, \alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$ são alvos promissores para o tratamento de diversas desordens do SNC, apresentando ampla quimiodiversidade de ligantes, variados resultados de bioatividade (K_i , CI_{50} , EC_{50} , etc.), informações referentes a atividade intrínseca (agonista plena, agonista parcial e antagonista) e toxicidade, assim como sobre atuação nos sítios ortostéricos e alostéricos dos nAChRs. Estas informações podem ser utilizadas na obtenção de novos candidatos a fármacos mais promissores. Neste contexto, um dos desafios mais pertinentes envolvendo o estudo desses receptores é o desenvolvimento de compostos bioativos que sejam mais eficazes, seletivos e com problemas de toxicidades

reduzidos ou eliminados. No aspecto estrutural, a avaliação adequada da contribuição de cada subunidade do receptor ($\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$ e $\beta 4$) para a atividade de diferentes ligantes bioativos também merece destaque, visando a melhor compreensão da interação ligante-biorreceptor alvo de forma mais detalhada (nAChRs $\alpha 7, \alpha 4\beta 2$ e $\alpha 3\beta 4$).

Agradecimentos

Agradecemos os órgãos de fomento à pesquisa que apoiam o Laboratório de Química Medicinal, Síntese Orgânica e Modelagem Molecular (LaQMedSOMM). INCT – INOFAR. Processo: CNPq 573.564/2008-6 e FAPERJ E-

26/170.020/2008. **PROPe – UNESP**. Primeiros Projetos. Processo: # 840.

Referências Bibliográficas

- ¹ Dani, J. A.; Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annual Reviews Pharmacology Toxicology* **2007**, 47, 699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ² Albuquerque, E. X.; Pereira, E. F. R.; Alkondon, M.; Rogers, S. W. Mammalian Nicotinic Acetylcholine Receptors: From Structure to Function. *Physiological Reviews* **2009**, 89, 73. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³ Gotti, C.; Zoli, M.; Clementi, F. Brain nicotinic acetylcholine receptors: native subtypes and their relevance. *Trends in Pharmacological Sciences* **2006**, 27, 482. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴ Högger, P.; Sadée, W.; Lameh, J. The muscarinic acetylcholine receptors. *Biomembranes* **1996**, 28, 301. [[CrossRef](#)]
- ⁵ Hogg, R. C.; Raggenbass, M.; Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors: from structure to brain function. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* **2003**, 147, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁶ Quik, M.; Zhang, D.; McGregor, M.; Bordia, T. Alpha7 nicotinic receptors as therapeutic targets for Parkinson's disease. *Biochemical Pharmacology* **2015**, 97, 399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁷ Gotti, C.; Clementi, F.; Fornari, A.; Gaimarri, A.; Guiducci, S.; Manfredi, I.; Moretti, M.; Pedrazzi, P.; Pucci, L.; Zoli, M. Structural and functional diversity of native brain neuronal nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology* **2009**, 78, 703. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁸ Dineley, K. T.; Pandya, A. A.; Yakel, J. L. Nicotinic ACh receptors as therapeutic targets in CNS disorders. *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, 36, 96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁹ Unwin, N. Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at a 4Å resolution.

Journal of Molecular Biology **2005**, 346, 967. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ¹⁰ Gotti, C.; Clementi, F. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Progress in Neurobiology* **2004**, 74, 363. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹¹ Stokes, C.; Treinin, M.; Papke, R. L. Looking below the surface of nicotinic acetylcholine receptors. *Trends in Pharmacological Sciences* **2015**, 36, 514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹² Auerbach, A. Activation of endplate acetylcholine receptors by agonists. *Biochemical Pharmacology* **2015**, 97, 601. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹³ Dajas-Bailador, F.; Wonnacott, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* **2004**, 25, 317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁴ Lax, P.; Fucile, S.; Eusebi, F. Ca²⁺ Permeability of human heteromeric nAChRs expressed by transfection in human cells. *Cell Calcium* **2002**, 32, 53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁵ Nutter, T. J.; Adams, D. J. Monovalent and divalent cation permeability and block of neuronal nicotinic receptor channels in rat parasympathetic ganglia. *The Journal of General Physiology* **1995**, 105, 701. [[PubMed](#)]
- ¹⁶ Gotti, C.; Moretti, M.; Gaimarri, A.; Zanardi, A.; Clementi, F.; Zoli, M. Heterogeneity and complexity of native brain nicotinic receptors. *Biochemical Pharmacology* **2007**, 74, 1102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁷ Hurst, R.; Rollema, H.; Bertrand, D. Nicotinic acetylcholine receptors: From basic science to therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics* **2013**, 137, 22. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁸ Papke, R. L. Merging old and new perspectives on nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **2014**, 89, 1. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ¹⁹ Chatzidaki, A.; Millar, N. S. Allosteric modulation of nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **2015**, 97, 408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁰ Deutsch, S. I.; Burket, J. A.; Urbano, R. M.; Benson, A. D. The α7 nicotinic acetylcholine receptor: A mediator of pathogenesis and therapeutic target in autism spectrum disorders and Down syndrome. *Biochemical*

Pharmacology **2015**, 97, 363. [CrossRef] [PubMed]

²¹ Lombardo, S.; Maskos, U. Role of the nicotinic acetylcholine receptor in Alzheimer's disease pathology and treatment. *Neuropharmacology* **2015**, 96, 255. [CrossRef] [PubMed]

²² Wallace, T. L.; Bertrand, D. Neuronal $\alpha 7$ Nicotinic Receptors as a Target for the Treatment of Schizophrenia. *International Review of Neurobiology* **2015**, 124, 79. [CrossRef] [PubMed]

²³ Kutlu M. G.; Parikh V.; Gould, T. J. Nicotine Addiction and Psychiatric Disorders. *International Review of Neurobiology* **2015**, 124, 171. [CrossRef] [PubMed]

²⁴ Quik, M.; Bordia, T.; Zhang D.; Perez, X. A. Nicotine and Nicotinic Receptor Drugs: Potential for Parkinson's Disease and Drug-Induced Movement Disorders. *International Review of Neurobiology* **2015**, 124, 247. [CrossRef] [PubMed]

²⁵ Jensen, A. A.; Frølund, B.; Liljefors, T.; Krogsgaard-Larsen, P. Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Structural Revelations, Target Identifications and Therapeutic Inspirations. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, 48, 4705. [CrossRef] [PubMed]

²⁶ Billen, B.; Spurny, R.; Brams, M.; van Elk, R.; Valera-Kummer, S.; Yakel, J. L.; Voets, T.; Bertrand, D.; Smit, A. B.; Ulens, C. Molecular actions of smoking cessation drugs at $\alpha 4 \beta 2$ nicotinic receptors defined in crystal structures of a homologous binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2012**, 109, 9173. [CrossRef] [PubMed]

²⁷ Bourne, Y.; Sulzenbacher, G.; Radic, Z.; Aráoz, R.; Reynaud, M.; Benoit, E.; Zakarian, A.; Servent, D.; Molgó, J.; Taylor, P.; Marchot, P. Marine macrocyclic imines, pinnatoxins A and G: structural determinants and functional properties to distinguish neuronal $\alpha 7$ from muscle $\alpha 1_2 \beta \gamma \delta n$ AChRs. *Structure* **2015**, 23, 1106. [CrossRef] [PubMed]

²⁸ Spurny, R.; Debaveye, S.; Farinha, A.; Veys, K.; Vos, A. M.; Gossas, T.; Atack, J.; Bertrand, S.; Bertrand, D.; Danielson, U. H.; Tresadern, G.; Ulens, C. Molecular blueprint of allosteric

binding sites in a homologue of the agonist-binding domain of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2015**, 112, E2543. [CrossRef] [PubMed]

²⁹ Kohlhaas, K. L.; Robb, H. M.; Roderwald, V. A.; Rueter, L. E. Nicotinic modulation of auditory evoked potential electroencephalography in a rodent neurodevelopmental model of schizophrenia. *Biochemical Pharmacology* **2015**, 97, 482. [CrossRef] [PubMed]

³⁰ Wang, J.; Kuryatov, A.; Sriram, A.; Jin, Z.; Kamenecka, T. M.; Kenny, P. J.; Lindstrom, J. An Accessory Agonist Binding Site Promotes Activation of $\alpha 4 \beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Biological Chemistry* **2015**, 290, 13907. [CrossRef] [PubMed]

³¹ Cheng, Q.; Yakel, A. L. The effect of $\alpha 7$ nicotinic receptor activation on glutamatergic transmission in the hippocampus. *Biochemical Pharmacology* **2015**, 97, 439. [CrossRef] [PubMed]

³² Koukouli, F.; Maskos, U. The multiple roles of the $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in modulating glutamatergic systems in the normal and diseased nervous system. *Biochemical Pharmacology* **2015**, 97, 378. [CrossRef] [PubMed]

³³ Ulens, C.; Akdemir, A.; Jongejan, A.; van Elk, R.; Bertrand, S.; Perrakis, A.; Leurs, R.; Smit, A. B.; Sixma, T. K.; Bertrand, D.; de Esch, J. P. Use Of Acetylcholine Binding Protein In The Search For Novel $\alpha 7$ Nicotinic Receptor Ligands. In Silico Docking, Pharmacological Screening, And X-Ray Analysis. *Journal of Medicinal Chemistry* **2009**, 52, 2372. [CrossRef] [PubMed]

³⁴ Sítio Adis Insight. Disponível em <<http://adisinsight.springer.com/drugs/800026693>>. Acesso em: 20 janeiro 2016.

³⁵ Gotti, C.; Balestra, B.; Moretti, M.; Rovati, G. E.; Maggi, L.; Rossoni, G.; Berti, F.; Villa, L.; Pallavicini, M.; Clementi, F. 4-oxystilbene compounds are selective ligands for neuronal nicotinic acetylcholine α Bungarotoxin receptors. *British Journal of Pharmacology* **1998**, 124, 1197. [CrossRef] [PubMed]

- ³⁶ Di Angelantonio, S.; Nistri, A.; Moretti, M.; Clementi, F.; Gotti, C. Antagonism of nicotinic receptors of rat chromaffin cells by *N,N,N*-trimethyl-1-(4-trans-stilbenoxy)-2-propylammonium iodide: a patch clamp and ligand binding study. *British Journal of Pharmacology* **2000**, *129*, 1771. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁷ Gotti, C.; Carbonnelle, E.; Moretti, M.; Zwart, R.; Clementi, F. Drugs selective for nicotinic receptor subtypes: a real possibility or a dream? *Behavioural Brain Research* **2000**, *113*, 183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁸ Zheng, G.; Zhang, Z.; Dowell, C.; Wala, E.; Dwoskin, L. P.; Holtman, J. R.; McIntosh, J. M.; Crooks, P. A. Discovery of non-peptide, small molecule antagonists of $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors as novel analgesics for the treatment of neuropathic and tonic inflammatory pain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2011**, *21*, 2476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁹ Whiteaker, P.; Christensen, S.; Yoshikami, D.; Dowell, C.; Watkins, M.; Gulyas, J.; River, J.; Olivera, B. M.; McIntosh, J. M. Discovery, Synthesis, And Structure Activity of a Highly Selective $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist. *Biochemistry* **2007**, *46*, 6628. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁰ Innocent, N.; Livingstone, P. D.; Hone, A.; Kimura, A.; Young, T.; Whiteaker, P.; McIntosh, J. M.; Wonnacott, S. α Conotoxin ArIB[V11L, V16D] is a potent and selective antagonist at rat and human native $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2008**, *327*, 529. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴¹ Mazurov, A. A.; Speake, A. D.; Yohannes, D. Discovery and Development of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Modulators. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *54*, 7943. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴² Mazurov, A.; Klucik, J.; Miao, L.; Phillips, T. Y.; Seamans, A.; Schmitt, J. D.; Hauser, T. A.; Johnson, R. T.; Miller, C. 2-(Arylmethyl)-3-substituted quinuclidines as selective $\alpha 7$ nicotinic receptor ligands. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2005**, *15*, 2073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴³ Mazzaferro, S.; Benallegue, N.; Carbone, A.; Gasparri, F.; Vijayan, R.; Biggin, P. C.; Moroni, M.; Bermudez, I. Additional Acetylcholine (ACh) Binding Site at $\alpha 4/\alpha 4$ Interface of $(\alpha 4\beta 2)_2\alpha 4$ Nicotinic Receptor Influences Agonist Sensitivity. *The Journal of Biological Chemistry* **2011**, *286*, 31043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁴ Nelson, M. E.; Kuryatov, A.; Choi, C. H.; Zhou, Y.; Lindstrom, J. Alternate Stoichiometries of $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology* **2003**, *63*, 332. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁵ Faundez-Parraguez, M.; Farias-Rabelo, N.; Gonzalez-Gutierrez, J. P.; Etcheverry-Berrios, A.; Alzate-Morales, J.; Adasme-Carreño, F.; Varas, R.; Bermudez, S.; Iturriaga-Vasquez, P. Neonicotinic analogues: Selective antagonists for $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Bioorganic Medicinal Chemistry* **2013**, *21*, 2687. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁶ Niaura, R.; Jones, C. J.; Kirkpatrick, P. Varenicline. *Nature Reviews Drug Discovery* **2006**, *5*, 537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁷ Son, C. D.; Moss, F. J.; Cohen, B. N.; Lester, H. A. Nicotine Normalizes Intracellular Subunit Stoichiometry of Nicotinic Receptors Carrying Mutations Linked to Autosomal Dominant Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy. *Molecular Pharmacology* **2009**, *75*, 1137. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁸ Harpsøe, K.; Ahring, P. K.; Christensen, J. K.; Jensen, M. L.; Peters, D.; Balle, T. Unraveling the High-and Low-Sensitivity Agonist Responses of Nicotinic Acetylcholine Receptors. *The Journal of Neuroscience* **2011**, *31*, 10759. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁴⁹ Grupe, M.; Grunnet, M.; Bastlund, J. F.; Jensen, A. A. Targeting $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors in Central Nervous System Disorders: Perspectives on Positive Allosteric Modulation as a Therapeutic Approach. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* **2015**, *116*, 187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ⁵⁰ Gerzanich, V.; Peng, X.; Wang, F.; Wells, G.; Anand, T.; Fletcher, S.; Lindstrom, J. Comparative Pharmacology of Epibatine: A Potent Agonist for Neuronal Nicotinic

Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology* **1995**, *48*, 774. [PubMed]

⁵¹ Dallanoce, C.; Matera, C.; Pucci, L.; Gotti, C.; Clementi, F.; De Amici, M.; De Micheli, C. Synthesis and binding affinity at $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors of new analogs of epibatidine and epiboxidine containing the 7-azabicyclo[2.2.1]hept-2-ene ring system. *Bioorganic & Medicinal Letters* **2012**, *22*, 829. [CrossRef] [PubMed]

⁵² Mu, L.; Drandarov, K.; Bisson, W. H.; Schibig, A.; Wirz, C.; Schubiger, P. A.; Westera, G. Synthesis and binding studies of epibatidine analogues as ligands for the nicotinic acetylcholine receptors. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, *41*, 640. [CrossRef] [PubMed]

⁵³ Carroll, F. I. Epibatidine structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2004**, *14*, 1889. [CrossRef] [PubMed]

⁵⁴ Coe, J. W.; Brooks, P. R.; Vetelino, M. G.; Wirtz, M. C.; Arnold, E. P.; Huang, J.; Sands, S. B.; Davis, T. I.; Lebel, L. A.; Fox, V. B.; Shrikhande, A.; Heym, J. H.; Shaeffer, E.; Rollema, H.; Lu, Y.; Mansbach, R. S.; Chambers, L. K.; Rovetti, C. C.; Shulz, D. W.; Tingley, F. D.; O'Neill, B. T. Varenicline: An $\alpha 4\beta 2$ Nicotinic Receptor Partial Agonist for Smoking Cessation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *48*, 3474. [CrossRef] [PubMed]

⁵⁵ Arias, H. R.; Feuerbach, D.; Targowska-Duda, K.; Kackzor, A. A.; Poso, A.; Jozwiak, K. Pharmacological and molecular studies on the interaction of varenicline with different nicotinic acetylcholine receptor subtypes. Potential mechanism underlying partial agonism at human $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 3\beta 4$ subtypes. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* **2015**, *1848*, 731. [CrossRef] [PubMed]

⁵⁶ Cippitelli, A.; Wu, J.; Gaiolini, K. A.; Mercatelli, D.; Schoch, J.; Gorman, M.; Ramirez, A.; Ciccocioppo, R.; Khroyan, T. V.; Yasuda, D.; Zaveri, N. T.; Pascual, C.; Xie, X.; Toll, L. AT-1001: A High-Affinity $\alpha 3\beta 4$ nAChR Ligand With Novel Nicotine-Suppressive Pharmacology. *British Journal of*

Pharmacology **2015**, *172*, 1834. [CrossRef] [PubMed]

⁵⁷ Strachan, J. P.; Kombo, D. C.; Mazurov, A.; Heemstra, R.; Bhatti, B. S.; Akiredt, R.; Murthy, S.; Miao, L.; Jett, J. E.; Speake, J.; Bencherif, M. Identification and pharmacological characterization of 3,6-diazabicyclo[3.1.1]heptane-3-carboxamides as novel ligands for the $\alpha 4\beta 2$ and $\alpha 6/\alpha 3\beta 2\beta 3$ nicotinic acetylcholine receptors (nAChRs). *European Journal of Medicinal Chemistry* **2014**, *86*, 60. [CrossRef] [PubMed]

⁵⁸ Johnston, T. H.; Hout, P.; Fox, S. H.; Koprach, J. B.; Szeliga, K. T.; Jamed, J. W.; Graef, J. D.; Letchworth, S. R.; Jordan, K. G.; Hill, M. P.; Brotchiem, J. M. TC-8831, a nicotinic acetylcholine receptor agonist, reduces L-DOPA-induced dyskinesia in the MPTP macaque. *Neuropharmacology* **2013**, *73*, 337. [CrossRef] [PubMed]

⁵⁹ Zhang, D.; Mallela, A.; Sohn, D.; Carroll, F. I.; Bencherif, M.; Letchworth, S.; Quik, M. Nicotinic Receptor Agonist Reduce L-DOPA-Induced Dyskinesias in a Monkey Model of Parkinson's Disease. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **2013**, *347*, 225. [CrossRef] [PubMed]

⁶⁰ Cucchiari, G.; Xiao, Y.; Gonzales-Sulser, A.; Kellar, K. J. Analgesic Effects of Sazetidine-A, a New Nicotinic Cholinergic Drug. *Anesthesiology* **2008**, *109*, 512. [CrossRef] [PubMed]

⁶¹ Kozikowski, A. P.; Eaton, J. B.; Bajjuri, K. M.; Chellapan, A. K.; Chen, Y.; Karadi, S.; He, R.; Caldarone, B.; Manzano, M.; Yuen, P. W.; Lukas, R. J. Chemistry and Pharmacology of Nicotinic Ligands Based on 6-[5-(Azetidin-2-ylmethoxy)pyridine-3-yl]hex-5-yn-1-ol (AMOP-H-OH) for Possible Use in Depression. *ChemMedChem* **2009**, *4*, 1279. [CrossRef] [PubMed]

⁶² Xiao, Y.; Tuan, E.; Yasuda, R. P.; Sahibzada, N.; Wolfe, B. B.; Horton, L.; Tran, T.; Al-Muhtasib, N.; Iwueze, A. F.; Dipietro, J. R.; Xie, T.; Paige, M.; Brown, M. L.; Kellar, K. J. Pharmacological properties of sazetidine-A, a selective ligand of $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptors. *Biochemical Pharmacology* **2011**, *82*, 1029. [CrossRef]

- ⁶³ Zwart, R.; Carbone, A. L.; Moroni, M.; Bermudez, S.; Mogg, A. J.; Folly, E. A.; Broad, L. M.; Williams, A. C.; Zhang, D.; Ding, C.; Heinz, B. A.; Sher, E. Sazetidine-A Is a Potent and Selective Agonist at Native and Recombinant $\alpha 4 \beta 2$ Nicotinic Acetylcholine Receptors. *Molecular Pharmacology* **2008**, *73*, 1838. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁴ Sun, Q.; Yue, C. Q.; Ye, J.; Li, C. L.; Cheng, T. M.; Li, R. T. Unique spirocyclopiperazinium salt III: Further investigation of monospirocyclopiperazinium (MSPZ) salts as potential analgesics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2007**, *17*, 6245. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁵ Zhang, H.; Tückmantel, W.; Eaton, A. B.; Yuen, P. W.; Yu, L. F.; Bajjuri, K. M.; Fedolak, A.; Wang, D.; Ghavami, A.; Caldarone, B.; Paterson, N. E.; Lowe, D. A.; Brunner, D.; Lukas, R. J.; Kozikowski, A. P. Chemistry and Behavioral Studies Identify Chiral Cyclopropanes as Selective $\alpha 4 \beta 2$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor Partial Agonist Exhibiting an Antidepressant Profile. *Journal of Medicinal Chemistry* **2011**, *55*, 717. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁶ Zaveri, N.; Jiang, F.; Olsen, C.; Polgar, W.; Toll, L. Novel $\alpha 3 \beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor-Selective Ligands. Discovery, Structure-Activity Studies, and Pharmacological Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 8187. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁷ Cipitelli, A.; Brunori, G.; Gaiolini, K. A.; Zaveri, N. T.; Toll, L. Pharmacological Stress Is Required For The Anti-Alcohol Effect Of The $\alpha 3 \beta 4^*$ Nachr Partial Agonist AT-1001. *Neuropharmacology* **2015**, *93*, 229. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁸ Glick, S. D.; Maisonneuve, I. M.; Kitchen, B. A.; Fleck, M. W. Antagonism of $\alpha 3 \beta 4$ nicotinic receptors as a strategy to reduce opioid and stimulant self-administration. *European Journal of Pharmacology* **2002**, *438*, 99-105. [CrossRef] [PubMed]
- ⁶⁹ Mineur, Y. S.; Abizaid, A.; Rao, Y.; Salas, R.; DiLeone, R. J.; Gündisch, D.; Diano, S.; De Biasi, M.; Horvath, T. L.; Gao, X. B.; Picciotto, M. R. Nicotine Decreases Food Intake Through Activation of POMC Neurons. *Science* **2011**, *332*, 1330 [CrossRef] [PubMed]
- ⁷⁰ Kombo, D. C.; Hauser, T. A.; Grinevich, V. P.; Melvin, M. S.; Strachan, J. P.; Sidach, S. S.; Chewing, J.; Fedorov, N.; Tallapragada, K.; Breining, S. R.; Mileer, C. H. Pharmacological properties and predicted binding mode of arylmethylenequinuclidine-like derivatives at the $\alpha 3 \beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor (nAChR). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2013**, *23*, 1450. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷¹ Yu, L. F.; Tückmantel, W.; Eaton, J. B.; Caldarone, B.; Fedolak, A.; Hanania, T.; Brunner, D.; Lukas, R. J.; Kozikowski, A. P. Identification of Novel $\alpha 4 \beta 2$ -Nicotinic Acetylcholine Receptor (nAChRs) Agonists Based on an Isoxazole Ether Scaffold that Demonstrate Antidepressant-like Activity. *Journal of Medicinal Chemistry* **2012**, *55*, 812. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷² Toll, L.; Zaveri, N. T.; Polgar, W. E.; Jiang, F.; Khroyan, T. V.; Zhou, W.; Xie, X.; Stauber, G. B.; Costello, M. R.; Leslie, F. M. AT-1001: A High Affinity and Selective $\alpha 3 \beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Antagonist Blocks Nicotine Self-Administration in Rats. *Neuropsychopharmacology* **2012**, *37*, 1367. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷³ Zaveri, N. T.; Bertrand, S.; Yasuda, D.; Bertrand, D. Functional Characterization of AT-1001, an $\alpha 3 \beta 4$ Nicotinic Acetylcholine Receptor Ligand. At Human $\alpha 3 \beta 4$ and $\alpha 4 \beta 2$ nAChR. *Nicotine and Tobacco Research* **2015**, *17*, 361 [CrossRef] [PubMed]
- ⁷⁴ Carroll, F. I.; Blough, B. E.; Mascarella, S. W.; Navarro, H. A.; Eaton, J. B.; Lukas, R. J.; Damaj, M. I. Synthesis and Biological Evaluation of Bupropion Analogues as Potential Pharmacotherapies for Smoking Cessation. *Journal of Medicinal Chemistry* **2010**, *53*, 2204. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷⁵ Franco, A.; Kompella, S. N.; Akondi, K. B.; Melaun, C.; Daly, N. L.; Luetje, C. W.; Alewood, P. F.; Craik, D. J.; Adams, D. J.; Marí, F. RegIIA: An $\alpha 4/7$ -conotoxin from the venom of *Conus regius* that potently blocks $\alpha 3 \beta 4$ nAChRs. *Biochemical Pharmacology* **2012**, *83*, 419. [CrossRef] [PubMed]