

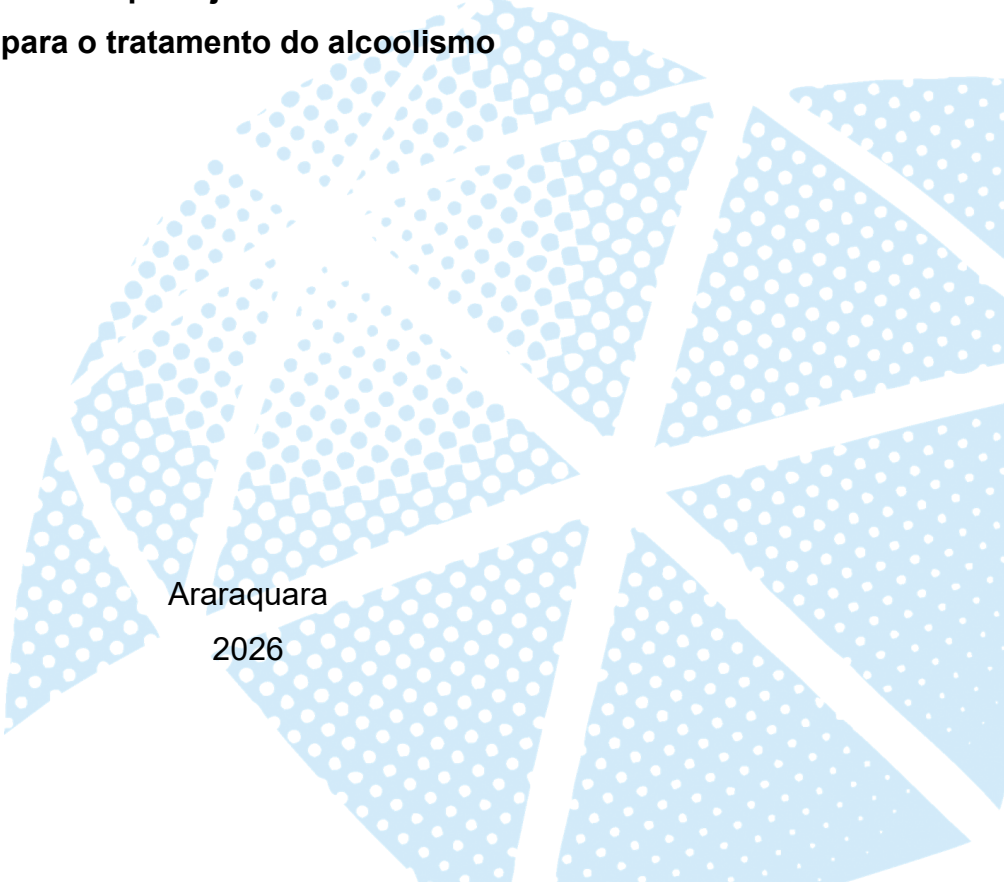
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
Instituto de Química - Câmpus de Araraquara

IZABELLE NAKAMATSU COELHO

**Estudos computacionais de características e requisitos estruturais dos
receptores opioides visando o planejamento de novos candidatos a fármacos
para o tratamento do alcoolismo**

Araraquara

2026



IZABELLE NAKAMATSU COELHO

**ESTUDOS COMPUTACIONAIS DE CARACTERÍSTICAS E REQUISITOS
ESTRUTURAIS DOS RECEPTORES OPIOIDES VISANDO O PLANEJAMENTO
DE NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA O TRATAMENTO DO
ALCOOLISMO**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara, para obtenção do título de Mestra em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior

Araraquara

2026

C672e

Coelho, Isabelle Nakamatsu

Estudos computacionais de características e requisitos estruturais dos receptores opióides visando o planejamento de novos candidatos a fármacos para o tratamento do alcoolismo / Isabelle Nakamatsu Coelho. -- Araraquara, 2026

116 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Araraquara

Orientador: Nailton Monteiro do Nascimento Junior

1. Química Farmacêutica. 2. Simulação (Computadores). 3. Relação estrutura-atividade (Bioquímica). 4. Alcoolismo. 5. Alcoolismo Tratamento. I. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa contribui para os ODS 3 (Saúde e Bem-Estar), 9 (Inovação) e 12 (Consumo Responsável), ao propor novas estratégias terapêuticas para o alcoolismo por métodos computacionais sustentáveis, promovendo inovação científica, redução de custos, formação qualificada e impacto social, econômico e educacional.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Estudos computacionais de características e requisitos estruturais dos receptores opioides visando o planejamento de novos candidatos à fármacos para o tratamento do alcoolismo

AUTORA: IZABELLE NAKAMATSU COELHO

ORIENTADOR: NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Química, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. NAILTON MONTEIRO DO NASCIMENTO JUNIOR (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara - IQAr

Prof^a. Dr^a. ISABELE RODRIGUES NASCIMENTO (Participação Presencial)
Departamento de Bioquímica e Química Orgânica / UNESP / Câmpus de Araraquara - IQAr

Prof. Dr. ADRIANO MARQUES GONÇALVES (Participação Presencial)
Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde / Universidade de Araraquara - UNIARA

Araraquara, 06 de março de 2026.

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO	
	IZABELLE NAKAMATSU COELHO 05/02/2001
Nacionalidade	Brasileira
Nome em citações bibliográficas:	Nakamatsu, Izabelle Nakamatsu, I.
Endereço profissional	Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Química, Campus de Araraquara Departamento de Química Orgânica e Bioquímica Rua Francisco Degni, 55 Quitandinha, Araraquara – SP CEP 14800-900
Currículo Lattes	http://lattes.cnpq.br/4563156487324350
FORMAÇÃO ACADÊMICA	
2024/2026	Mestrado em Química Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
2019/2023	Graduação em Química Tecnológica Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS	
BRAZILIAN SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY (BRAZMEDCHEM), 12., 2025. (Armação de Búzios – RJ). Identification of key residues involving antagonist activity at μ, k and δ opioid receptors targeting the Alcohol Use Disorder treatment. 2025. BRAZILIAN SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY (BRAZMEDCHEM), 12., 2025. (Armação de Búzios – RJ). Drug Discovery Weekend, 2025. ESCOLA DE VERÃO EM QUÍMICA FARMACÊUTICA MEDICINIAL – PROFESSOR ELIEZER BARREIRO (EVQFM-EB), 2026 (Rio de Janeiro – RJ). Otimização Multi Paramétrica Aplicada à Descoberta de Fármacos, 2026. ESCOLA DE VERÃO EM QUÍMICA FARMACÊUTICA MEDICINIAL – PROFESSOR ELIEZER BARREIRO (EVQFM-EB), 2026 (Rio de Janeiro – RJ). Inteligência Artificial Aplicada à Descoberta de Fármacos, 2026.	

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou em todas as decisões. À minha mãe, Luiza Massako Nakamatsu, que sempre foi meu modelo feminino de sucesso e em quem me espelho até hoje. Ao meu pai, Renato Costa Coelho, que me deu colo em todos os momentos e faz com que eu me sinta uma garotinha mesmo já adulta. À minha madrinha-mãe, Lucia Massae Nakamatsu, que me ensinou que o amor sempre será nossa maior virtude e que a vida está muito além da nossa própria existência. À minha irmã caçula, Lavínia Sayuri dos Santos Nakamatsu, que me motiva a ser sempre melhor e a quem dedico o mundo que estou construindo.

À minha irmã, Gabrielle Nakamatsu Coelho, com quem compartilho a vida desde sempre e para sempre. Minha quase gêmea, que desde que chegou me fez esquecer o período de 1 ano, 1 mês e 2 dias que vivi sozinha. Você me entende apenas pelo olhar, me conforta com um toque e acredita em mim mais do que todos, incluindo eu mesma. Obrigada por ser meu trevo de quatro folhas, meu abraço casa.

À minha melhor amiga, Flávia Marques de Oliveira, que caminha comigo há uma década e que embarcou comigo nessa vida em Araraquara. Seu apoio foi fundamental durante todas essas etapas que vivemos juntas, obrigada por partilhar momentos, choros, festas, passeios, aventuras, piadas e até mesmo casas comigo.

Ao meu companheiro, Victor Hugo Moraes de Castro, que me motivou a entrar na Pós-Graduação e foi minha base ao longo desses anos. Você entrou na minha vida no momento certo e desde então eu vivo uma vida leve ao seu lado. Com você sinto que sou grande ao ponto de conquistar o mundo!

Aos meus colegas do LaQMedSOMM, Daniel, Edith, Thainá, Giovanni, Mirela e Hilário, com quem pude dividir a rotina, os cafés com fofoca, viagens, treinamentos, piadas internas e muitas risadas. Em especial agradeço aos veteranos Daniel e Edith, que me ensinaram além das paredes do laboratório, espero que esses laços durem além dos nossos anos de pós-graduandos.

Ao meu orientador, Profº. Drº. Nailton Monteiro do Nascimento Júnior, por depositar em mim a confiança de desenvolver este projeto e pelos ensinamentos ao longo desses anos.

À Banca de Qualificação, Profº. Drº. Cauê Benito Scarim e Profº. Drº. Marcelo Tadeu Marim, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp Araraquara, pelas contribuições em meu projeto e participação em minha formação.

À Banca Examinadora, Profº. Drº. Adriano Marques Gonçalves, da Universidade de Araraquara, e Profª. Drª. Isabele Rodrigues Nascimento, do Instituto de Química da Unesp Araraquara, pela avaliação e contribuição na construção deste exemplar.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Processo 2018/00187-7) pelos recursos fornecidos.

“Somos mosaicos infinitos
das infinitas mulheres
que lutaram pelo direito
de ser o que são.

Nascente de rio,
todas nós”

(Flávia Campos, 2020, p. 104)

RESUMO

O consumo de álcool foi amplamente difundido globalmente, estando associado a elevadas taxas de morbidade e mortalidade, além de impactos socioeconômicos significativos. Classificado como carcinogênico do grupo 1, seu uso crônico está relacionado ao desenvolvimento de diversas condições clínicas, incluindo doenças cardiovasculares, neoplasias e transtornos psiquiátricos. Apesar da elevada prevalência dos transtornos por uso de álcool (TUA) (*Alcohol Use Disorders* – AUD), um número reduzido de fármacos é aprovado para seu tratamento, em parte devido à heterogeneidade dos perfis clínicos dos pacientes. Neste trabalho, foram identificados requisitos estruturais chave para a identificação de substâncias com potencial atividade biológica frente aos receptores opioides, alvos relevantes no tratamento de AUD, por meio de abordagens *in silico*. A docagem molecular foi empregada para caracterizar os requisitos estruturais e padrões de interação necessários ao reconhecimento dos ligantes pelos receptores. A partir desses dados, foram gerados modelos computacionais utilizando descritores de interação baseados em *fingerprints*, implementados no método dbCICA. Os resultados evidenciaram que os receptores opioides apresentaram perfis de interação específicos e consistentes com a literatura, permitindo a identificação de padrões moleculares relevantes para a modulação desses alvos. A utilização dos *fingerprints*, calculados nesse projeto a partir da ferramenta LUNA, mostrou-se eficaz na captura dessas interações, promovendo melhora significativa na capacidade preditiva dos modelos construídos via dbCICA. Essa abordagem possibilitou a otimização da seleção de descritores e o refinamento dos modelos, resultando em maior discriminação entre compostos ativos e inativos. Dessa forma, o uso integrado de docagem molecular, *fingerprints* do LUNA e sua aplicação em modelos de interação pelo dbCICA demonstrou ser uma estratégia robusta para a identificação e priorização de candidatos com potencial terapêutico para o tratamento de AUD.

Palavras-chave: alcoolismo, receptores opioides, docagem molecular, *fingerprints*, dbCICA, mapa farmacofórico.

ABSTRACT

Alcohol consumption was widely prevalent worldwide and was associated with high rates of morbidity and mortality, as well as significant socioeconomic impacts. Classified as a Group 1 carcinogen, its chronic use was related to the development of various clinical conditions, including cardiovascular diseases, neoplasms, and psychiatric disorders. Despite the high prevalence of Alcohol Use Disorders (AUD), only a limited number of drugs were approved for their treatment, partly due to the heterogeneity of patients' clinical profiles. In this study, key structural requirements for the identification of substances with potential biological activity toward opioid receptors, relevant targets in the treatment of AUD, were identified using in silico approaches. Molecular docking was employed to characterize the structural requirements and interaction patterns necessary for ligand recognition by these receptors. Based on these data, computational models were generated using interaction descriptors derived from fingerprints, implemented through the dbCICA method. The results showed that opioid receptors exhibited specific interaction profiles consistent with the literature, enabling the identification of molecular patterns relevant for target modulation. The use of fingerprints, calculated in this study using the LUNA tool, proved effective in capturing these interactions, leading to a significant improvement in the predictive performance of the models built via dbCICA. This approach enabled the optimization of descriptor selection and refinement of the models, resulting in better discrimination between active and inactive compounds. Thus, the integrated use of molecular docking, LUNA-derived fingerprints, and their application in interaction models via dbCICA proved to be a robust strategy for the identification and prioritization of candidates with therapeutic potential for the treatment of AUD.

Keywords: alcoholism, opioid receptors, molecular docking, fingerprints, dbCICA, pharmacophoric map.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema simplificado da metabolização do etanol a acetato.	19
Figura 2 – Relação da porcentagem de óbitos causados pela ingestão de álcool em 2019	21
Figura 3 - a) Representação de uma subunidade do receptor b) Representação do receptor, um dímero composto de duas subunidades c) Vista do interior da estrutura de sete hélices.	28
Figura 4 - Fluxograma de processo simplificado da docagem molecular	29
Figura 5 - Exemplo das matrizes binárias. As linhas representam as interações, agrupadas pelo ligante, e as colunas representam os átomos do sítio ativo.....	39
Figura 6 - Exemplo da matriz binária. As linhas representam os ligantes, a segunda coluna representa os valores de pKi e as demais colunas representam o conjunto interação-aminoácido do sítio ativo.	39
Figura 7 - Divisão de grupos para mutações no método dbCICA.....	42
Figura 8 - Sobreposição do sítio ativo dos receptores opioides. Carbonos e volume do sítio em azul claro para a subunidade κ , em laranja para a subunidade μ e em verde para a subunidade δ , respectivamente. Átomos de nitrogênio em azul escuro, de oxigênio em vermelho e de enxofre em amarelo. Átomos de hidrogênio omitidos para maior clareza.....	44
Figura 9 - a) Interação receptor-ligante na estrutura 4DKL. b) Fórmula estrutural do ligante BF0, de K_i : <10 nM.	45
Figura 10 - Sobreposição entre o ligante original da estrutura 4DKL e o melhor resultado da redocagem calculado pela função GoldScore.	46
Figura 11 - Interações iônicas nos resíduos do sítio ativo. Interação com o resíduo D147 (ASP/83) prevalente entre os ligantes mais ativos.	47
Figura 12 - <i>Fingerprints</i> positivos do modelo dbCICA para o receptor opioide μ . a) EIFP3878; b) EIFP3053; c) EIFP2145; d) EIFP3338. Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	50
Figura 13 - Sobreposição dos ligantes mais ativos no sítio ativo do receptor μ . Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	51

Figura 14 - Mapa farmacofórico do modelo dbCICA para o receptor opioide μ , obtido a partir dos EIFP. Átomos de carbono em cinza, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	52
Figura 15 - a) Interações receptor-ligante no 4N6H. b) Fórmula estrutural do ligante EJ4, de K_i : 0,510 nM. Átomos de carbono, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios omitidos para melhor clareza.	53
Figura 16 - Sobreposição entre o ligante original da estrutura 4N6H e o melhor resultado da redocagem calculado pela função ChemPLP. Átomos de carbono da pose original do ligante em magenta e da pose obtida pela redocagem em laranja. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	54
Figura 17 - Interações iônicas nos resíduos do sítio ativo. Interação com o resíduo D128 prevalente entre os ligantes mais ativos.	55
Figura 18 - Fingerprints positivos do modelo dbCICA para o receptor opioide δ . a) HIFP1379; b) HIFP2559; c) HIFP1255; d) HIFP4068. Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	58
Figura 19 - Sobreposição dos ligantes no sítio ativo do receptor opioide δ . Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	59
Figura 20 - Mapa farmacofórico do modelo dbCICA para o receptor opioide δ , obtido a partir dos HIFP. Átomos de carbono do receptor em cinza, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	60
Figura 21 - a) Interação receptor-ligante na estrutura 4DJH. b) Fórmula estrutural do ligante JDC, de K_i : 0,500 nM.....	61
Figura 22 - Sobreposição entre o ligante original da estrutura 4DJH e o melhor resultado da redocagem calculado pela função ChemPLP. Átomos de carbono da pose original do ligante em magenta e da pose obtida pela redocagem em amarelo. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	62
Figura 23 - Interações iônicas nos resíduos do sítio ativo. Interação com o resíduo D138 não é prevalente entre os ligantes mais ativos.	63

Figura 24 - Fingerprints positivos do modelo dbCICA para o receptor opioide κ . a) HIFP2505; b) HIFP2673; c) HIFP3381; d) HIFP3202. Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	66
Figura 25 - Sobreposição dos ligantes no sítio ativo do receptor opioide κ . Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.....	67
Figura 26 - Mapa farmacofórico do modelo dbCICA para o receptor opioide κ , obtido a partir dos HIFP. Átomos de carbono, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Coordenadas do centro de referência para a ancoragem molecular	36
Tabela 2 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide μ , obtido a partir dos EIFP.	49
Tabela 3 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide δ , obtido a partir do HIFP.	57
Tabela 4 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide κ , obtido a partir do EIFP.	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Farmacoterapias atualmente administradas e suas propriedades	24
Quadro 2 - Farmacoterapias promissoras em fase de testes ou desenvolvimento e suas propriedades	25
Quadro 3 - Exemplos de receptores segundo sua classificação. Em negrito, as funções obtidas a partir do GOLD	32
Quadro 4 - Parâmetros de cálculo do algoritmo genético.....	40
Quadro 5 - Melhores modelos gerados pelo dbCICA para o receptor opioide μ	48
Quadro 6 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide μ , obtido a partir dos contatos.....	48
Quadro 7 - Melhores modelos gerados pelo dbCICA para o receptor opioide δ	56
Quadro 8 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide δ , obtido a partir dos contatos.....	56
Quadro 9 - Melhores modelos gerados pelo dbCICA para o receptor opioide κ	64
Quadro 10 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide κ , obtido a partir dos contatos.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D-QSAR	<i>3D quantitative structure activity relationship</i> , relação estrutura atividade quantitativa tridimensional
AUD	<i>Alcohol Use Disorders</i> Desordens por Abuso de Álcool
CPU	<i>central processing unit</i> , unidade de processamento central
dbCICA:	<i>docking-based comparative intermolecular contacts analysis</i> , análise comparativa de contatos intermoleculares baseada em ancoragem molecular
ECFP	<i>Extended Connectivity Fingerprints</i>
EIFP	<i>Extended Interaction Fingerprints</i>
EMA	<i>European Medicines Agency</i> , agência europeia de medicamentos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> , administração de alimentos e medicamentos
FIFP	<i>Filtered Interaction Fingerprints</i>
FP	<i>Fingerprints</i>
GABA	<i>Ácido gama-aminobutírico</i>
HIFP	<i>Hybrid Interaction Fingerprints</i>
K_i	constante de dissociação do complexo enzima-inibidor
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
RAM	<i>random access memory</i> , memória de acesso aleatório
RMSD	<i>root mean square deviation</i> , raiz quadrada do desvio quadrático
ROC	<i>receiver-operator characteristic curve</i> , curva característica de operação do receptor
SBDD	<i>structure-based drug design</i> , design de fármacos baseado em estrutura
SNC	sistema nervoso central

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1	FARMACOTERAPIA DO ALCOOLISMO	22
3.1.1	Farmacoterapias aprovadas para o tratamento do alcoolismo	22
3.1.2	Farmacoterapias em desenvolvimento para tratamento do alcoolismo	24
3.2	ALVOS TERAPÊUTICOS RELACIONADOS AO TRATAMENTO DO ALCOOLISMO.....	26
3.2.1	Receptores Opioides	27
3.3	MODELAGEM MOLECULAR NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS	28
3.3.1	Ancoragem Molecular	29
3.3.2	Validação de modelos de Docagem Molecular	32
3.3.3	Análise comparativa de contatos intermoleculares baseada em Ancoragem Molecular (dbCICA).....	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	HARDWARE UTILIZADO	34
4.2	OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS ESTRUTURAS TRIDIMENSIONAIS DOS RECEPTORES E DOS LIGANTES UTILIZADOS	35
4.3	ANCORAGEM MOLECULAR	36
4.4	OBTENÇÃO DOS CONTATOS INTERMOLECULARES	38
4.5	VALIDAÇÃO POR DBCICA	40
4.6	OBTENÇÃO DOS FINGERPRINTS	42
4.7	CONSTRUÇÃO DO MAPA FARMACOFÓRICO	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	RECEPTORES OPIOIDES DO SUBTIPO M.....	44
5.2	RECEPTORES OPIOIDES DO SUBTIPO Δ	53
5.3	RECEPTORES OPIOIDES DO SUBTIPO K	61
6	CONCLUSÃO.....	68

1 INTRODUÇÃO

Em 2016, cerca de 2,4 bilhões de pessoas consumiram bebidas alcoólicas com frequência, o que representa 32,5% da população mundial (1). Em 2017, a indústria de álcool arrecadou mais de \$1,5 trilhões em vendas mundialmente (*Euromonitor International*, 2018). A disseminação do uso de álcool, fácil acesso à população e sua comercialização formaram um “ambiente alcoólico” fortemente associado a impactos à saúde (2). O consumo de álcool por adolescentes, uso durante a gravidez, *binge drinking*¹ e outras formas de consumo abusivo são classificados neste projeto como *Alcohol Use Disorders* (AUD), no Brasil traduzido como Transtornos por Uso de Álcool (TUA), caracterizadas pela falta de controle sobre o consumo de álcool e um padrão crônico e crescente de uso, apesar dos danos significativos à saúde (3). A AUD é o transtorno de abuso de substância mais comum, com cerca de 400 milhões de pessoas acima de 15 anos acometidas em 2019 (4) e sua complexidade está associada à interação entre fatores genéticos, neurobiológicos, psicológicos e ambientais, o que dificulta o desenvolvimento de estratégias terapêuticas plenamente eficazes. Apesar da existência de opções farmacológicas aprovadas, como dissulfiram, acamprosato e naltrexona, as taxas de resposta clínica permanecem limitadas, reforçando a necessidade de identificação de novos alvos moleculares e de candidatos a fármacos mais seletivos e eficazes.

No contexto neurobiológico do alcoolismo, os receptores opioides desempenham papel central na modulação dos circuitos de recompensa, motivação e reforço associados ao consumo de álcool (3). A ativação do sistema opioide endógeno pelo álcool contribui para os efeitos prazerosos da substância, enquanto a modulação farmacológica desses receptores pode reduzir o consumo. Nesse sentido, antagonistas ou moduladores parciais de receptores opioides, como a naltrexona, demonstram eficácia clínica parcial, o que justifica o interesse contínuo no estudo estrutural e funcional desses alvos visando ao planejamento de novos candidatos a fármacos para o tratamento do alcoolismo e outras desordens associadas ao consumo de álcool (5,6).

A partir da análise detalhada das interações intermoleculares entre ligantes e seus alvos biológicos, torna-se possível propor modificações estruturais que

¹ Consumo de 4 doses de bebida alcoólica para mulheres e 5 doses para homens, em um intervalo de 2h

maximizem afinidade, seletividade e propriedades farmacocinéticas desejáveis. No cenário atual, abordagens computacionais têm assumido papel estratégico na química medicinal, permitindo a triagem virtual de grandes bibliotecas de compostos, a redução de custos experimentais e a priorização racional de candidatos promissores para estudos *in vitro* e *in vivo*.

Entre essas abordagens, a docagem molecular destaca-se como ferramenta amplamente empregada para prever modos de ligação, orientações espaciais e afinidades relativas de ligantes em sítios ativos ou alostéricos de proteínas. O programa GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*) utiliza algoritmos genéticos para explorar de forma eficiente o espaço conformacional do ligante, considerando a flexibilidade rotacional e diferentes funções de pontuação. Essa metodologia permite avaliar múltiplas poses de ligação e identificar interações relevantes, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, contatos aromáticos e forças eletrostáticas, fornecendo subsídios importantes para a compreensão do reconhecimento molecular entre ligantes e receptores opioides (7).

Contudo, a simples análise visual de poses geradas pela docagem nem sempre é suficiente para caracterizar, de maneira quantitativa e reprodutível, os padrões de interação responsáveis pela atividade biológica. Nesse contexto, metodologias baseadas em interações tornam-se particularmente relevantes. A abordagem dbCICA (*docking based Comparative Intermolecular Contacts Analysis*) fundamenta-se na comparação sistemática de padrões de interações intermoleculares entre conjuntos de ligantes ativos e inativos, permitindo a identificação de interações críticas para a atividade. Essa metodologia considera não apenas a presença ou ausência de contatos específicos, mas também sua frequência e relevância estatística ao longo de um conjunto de complexos proteína-ligante (8).

A partir dos contatos, torna-se possível calcular diferentes tipos de *fingerprints* de interação, que codificam de forma padronizada as interações observadas nos complexos moleculares. Neste trabalho foram aplicadas três formas distintas de *fingerprints*, desenvolvidos a partir do ECFP (do inglês “*Extended Connectivity Fingerprint*”) por Fassio et. al por meio da aplicação do *toolkit* LUNA: os EIFP (*Extended Interaction Fingerprints*) representam um conjunto expandido de descritores que incluem diferentes classes de interações, como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas, aromáticas e eletrostáticas, levando em conta informações geométricas e químicas detalhadas; já os HIFP (*Hybrid Interaction*

Fingerprints) combinam características estruturais do ligante com informações de interação, permitindo uma representação mais rica e discriminativa do reconhecimento molecular; finalmente, os FIFP (*Filtered Interaction Fingerprints*) resultam da aplicação de critérios de filtragem estatística ou química, retraindo apenas as interações mais relevantes para a diferenciação entre compostos ativos e inativos (9).

Esses *fingerprints* constituem a base para a construção de modelos farmacofóricos derivados de interações, os quais descrevem, em termos espaciais e químicos, os requisitos mínimos necessários para o reconhecimento molecular pelo alvo. Diferentemente dos farmacóforos clássicos baseados apenas em ligantes, os mapas farmacofóricos derivados de complexos proteína-ligante incorporam explicitamente informações do sítio de ligação, aumentando o poder preditivo do modelo. Esses mapas podem ser utilizados como ferramentas de triagem virtual, permitindo a seleção de compostos que satisfaçam simultaneamente os requisitos geométricos e químicos essenciais para a interação com receptores opioides.

Dessa forma, a integração entre docagem molecular por GOLD, análise de interações via dbCICA, cálculo de EIFP, HIFP e FIFP e a geração de mapas farmacofóricos constitui uma estratégia robusta de planejamento racional de fármacos. Essa abordagem possibilita não apenas a compreensão aprofundada dos determinantes moleculares envolvidos na modulação de receptores opioides associados ao alcoolismo, mas também a identificação e priorização de novos candidatos a fármacos com potencial terapêutico. No contexto desta dissertação, tais metodologias são aplicadas de maneira sistemática com o objetivo de contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas no tratamento do transtorno por uso de álcool.

2 OBJETIVOS

Este trabalho visa a identificação de substâncias com interação com os receptores opióides *delta*, *mu* e *kappa*, com potencial atividade biológica para tratamentos do alcoolismo e AUD. Para isso, busca-se, especificamente: (i) validar um modelo computacional para cada receptor; (ii) avaliar, para cada receptor, as interações de ligantes bioativos da literatura visando validação complementar; (iii) propor, por meio do modelo associado às interações dos ligantes mais ativos, um

mapa farmacofórico que considere as principais interações associadas à atividade em cada receptor.

3 REVISÃO DA LITERATURA

O consumo do álcool teve início na Pré-História, por meio do domínio sobre a agricultura e a invenção da cerâmica no período Neolítico. O armazenamento de grãos e frutas em jarros promoveu a fermentação dos açúcares e sua conversão em pequenas quantidades de etanol, com o primeiro registro encontrado em vasos de cerâmica na vila chinesa Jiahu, há mais de 9.000 anos (10), mesmo período de surgimento da cerveja e do vinho no mediterrâneo. A produção e consumo de bebidas fermentadas tornou-se amplamente difundido devido à pouca disponibilidade de água potável, às propriedades relaxantes do álcool e ao seu uso como suplemento alimentar, por se tratar de carboidratos de alto índice calórico (11). O consumo das bebidas fermentadas rapidamente se popularizou devido ao seu uso social, uma vez que o baixo teor alcóolico permitia o equilíbrio entre os efeitos socialmente positivos, como relaxamento e sociabilidade, e os negativos, como a agressividade e perda de bom senso(11). Porém, com o aprimoramento de técnicas de destilação e purificação, a popularização de bebidas destiladas no século XVIII mudou drasticamente sua forma de consumo, evidenciando seus efeitos negativos (12).

O consumo excessivo de bebidas alcóolicas ao longo dos próximos dois séculos despertou preocupação das organizações governamentais, tendo como marco a implementação da Lei Seca nos Estados Unidos em 1920, que durou 12 anos e teve resultados controversos (13). Em meio a necessidade de regulamentação do consumo de álcool, é publicada em 1952 a primeira edição do DSM-I (do inglês "*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*"), definindo o alcoolismo como doença, cujo conceito é posteriormente incorporado à Classificação Internacional das Doenças (CID) pela Organização Mundial da Saúde. A classificação mais atual de desordens associadas ao consumo de álcool é definida pela publicação do CID-11, organizadas sob o código 6C40 (14,15).

Alcohol Use Disorder (AUD), também conhecida como Síndrome de Abuso do Álcool, é uma condição crônica caracterizada pela ingestão constante e abusiva de álcool, apesar dos prejuízos corporais e psicológicos acarretados. De forma generalizada, a AUD começa com o uso recreativo do álcool, que evolui ao consumo

regular e culmina no consumo diário em grandes quantidades, muitas vezes para evitar os sintomas de abstinência (16). Esse consumo é conhecido como consumo episódico excessivo de álcool (em inglês “*binge drinking*”), estado atingido quando o organismo registra concentrações de álcool no sangue acima de 0,08 mg/L. Para atingir esses valores, deve-se consumir, em um intervalo de 2 h, quatro ou cinco doses de bebida alcoólica por mulheres ou homens, respectivamente (17).

A AUD é considerada uma síndrome de abuso de substância por enquadrar três fatores de diagnóstico: compulsão pelo consumo, sintomas de abstinência em situações de ingestão reduzida ou nula e reações emocionais negativas em momentos de privação (do inglês “*hyperkatifeia*”) (16).

Ao ser ingerido, o álcool é rapidamente absorvido pelo estômago e intestino, sendo distribuído facilmente pela corrente sanguínea devida a sua natureza hidrofílica. O principal órgão envolvido na digestão do álcool é o fígado, responsável pela metabolização do etanol. Primeiramente é promovida a oxidação pela enzima álcool desidrogenase (ADH) para a obtenção do acetaldeído (AcH), componente extremamente tóxico mesmo em pequenas quantidades; a aldeído desidrogenase (ALDH) converte o acetaldeído em acetato, que é facilmente quebrado em moléculas de água e dióxido de carbono (18). Em casos mais incomuns, a conversão em acetaldeído pode ser realizada pela enzima P450 2E1 (CYP2E1), porém é necessária a ingestão de grandes quantidades de etanol. O processo de metabolização pode ser visualizado de forma esquemática pela Figura 1:

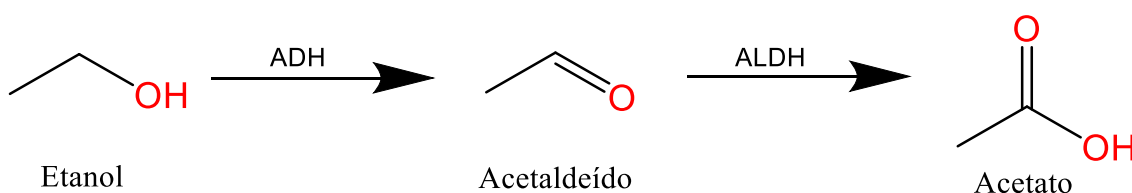


Figura 1 - Esquema simplificado da metabolização do etanol a acetato.

Fonte: elaborado pela própria autora.

Nota: ADH – álcool desidrogenase; ALDH – aldeído desidrogenase.

O Instituto Nacional de Abuso de Álcool e Alcoolismo (do inglês *National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism*, NIAAA), nos Estados Unidos, afirma que apesar da rápida conversão do acetaldeído em acetato, sua toxicidade é evidente ao analisar os tecidos do fígado, que sofrem danos pelo contato (17). A metabolização do álcool também é realizada, mesmo que em menor escala, no pâncreas, cérebro e

trato gastrointestinal, cujos tecidos também apresentam danos. Algumas pesquisas indicam que efeitos psicológicos e comportamentais atribuídos ao etanol podem estar relacionados ao acetaldeído, como falta de coordenação, perda de memória e sonolência (19).

No contexto mundial, o consumo de etanol *per capita* em adultos acima de 15 anos em 2023 foi de 8,5 L, o que representa um aumento de 54,5% em relação ao ano de 2019 (20,21). O abuso de álcool foi responsável por 2,6 milhões de mortes em 2019, com maior incidência entre homens. É a principal causa de óbitos em pessoas entre 15-49 anos (10%); a sétima maior causa de mortes e deficiências; está diretamente relacionado ao desenvolvimento de mais de 200 doenças e lesões; e é um carcinogênico sem nível de consumo seguro (1,4).

As principais causas de óbitos associados a AUD em 2019 foram doenças relacionadas ao trato digestivo (22,0%), lesões não intencionais (19,8%) e doenças cardiovasculares (17,8%); as outras causas podem ser analisadas na Figura 2. A AUD pode estar associada a distúrbios psicológicos (como o uso de drogas ilícitas, depressão, transtorno bipolar, fobias, transtornos de personalidade antissocial e borderline), bem como a problemas psicossomáticos e físicos (como doenças hepáticas, pancreatite, cânceres de cabeça e pescoço, rins, cólon e reto, além de comportamentos auto lesivos, agressividade, violência e suicídio) (22).

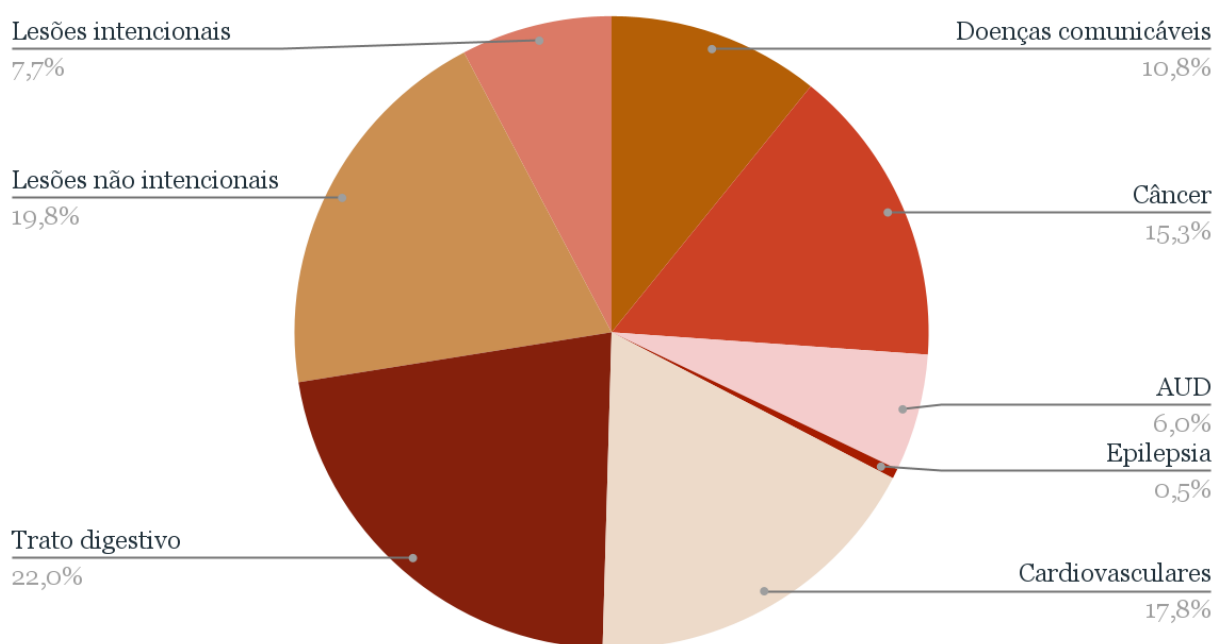


Figura 2 – Relação da porcentagem de óbitos causados pela ingestão de álcool em 2019

Fonte: Adaptado de KRANZLER, 2018 (22).

Segundo o *Global Burden of Disease Study* (1), para ambos os sexos o consumo de álcool tem efeito direto no aparecimento de doenças e deficiências, com distintas proporções ao longo dos anos. Após os 50 anos, o câncer é a principal causa de mortes, responsável por 27,1% dos óbitos femininos e 18,9% dos masculinos, e é interessante destacar que infarto, derrame e câncer de fígado, listados como principais doenças em mulheres acima de 80 anos, já são comuns em homens acima dos 50. Os estudos apontam que o abuso de álcool influencia a saúde de homens de maneira mais intensa que em mulheres, sendo esses três vezes mais acometidos por doenças e deficiências provenientes do consumo. O resultado é esperado, uma vez que o consumo abusivo de bebidas alcoólicas é muito maior entre a população masculina. A revisão levou em conta homens e mulheres de condições geográficas, sociais, econômicas e etárias variadas, e o resultado em todos os casos leva à conclusão de que não há valor de consumo capaz de minimizar os riscos à saúde. Dessa maneira, pode-se afirmar que não há dose mínima segura de álcool (1,23).

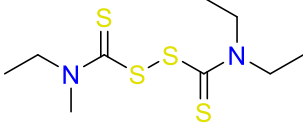
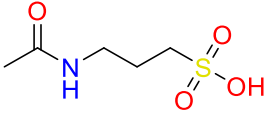
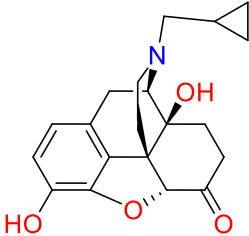
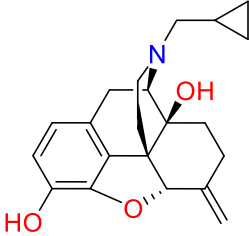
3.1 Farmacoterapia do Alcoolismo

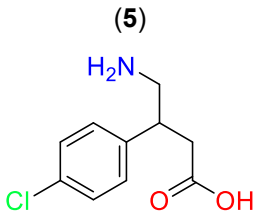
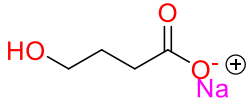
Apesar do importante risco à saúde pública, é estimado que apenas 7% dos adultos com AUD nos Estados Unidos recebem tratamento farmacoterapêutico associado, ou não, ao tratamento psicoterapêutico; na Europa são menos de 10%. O uso de fármacos no tratamento é limitado por diversas questões, como a falta de treinamento e conhecimento dos fármacos por parte dos profissionais de saúde, percepção da baixa eficácia de algumas medicações e a relutância em prescrever e administrar medicamentos gerada pelo estigma envolvendo o distúrbio (24). O tratamento para AUD possui muitas variáveis, diferindo consideravelmente entre pacientes e escolha de medicamentos. A privação total do consumo de álcool (forçada ou autoinduzida), comumente chamada abstinência, embora desejável, é raramente alcançada (16%) e evidências não a apoiam como única abordagem. Nem todos os indivíduos com AUD possuem a abstinência como objetivo em sua recuperação; apenas 2-6% das metas estabelecidas em centros de tratamento são alcançar a abstinência do álcool. Dessa forma, cada vez mais é buscada a recuperação não abstinente, com objetivo de reduzir o consumo de álcool e o abuso em situações extremas, com tratamento focado na redução e controle de danos.

A seguir, são descritas algumas farmacoterapias para o tratamento de AUD aprovadas ou em desenvolvimento, com breve explicação de sua ação e mecanismo, estudos pré-clínicos e clínicos e expectativas para sua administração.

3.1.1 Farmacoterapias aprovadas para o tratamento do alcoolismo

Atualmente, a *US Food and Drug Administration* (FDA) possui apenas três medicações aprovadas para tratamento de AUD: dissulfiram (1), acamprosato (2) e naltrexona (3). A Agência Europeia de Medicina (EMA) reconhece os mesmos três compostos com acréscimo do nalmefeno (4). O uso das medicações possui efeitos modestos e são subutilizadas no tratamento, não sendo o foco principal – apenas 1,6% dos adultos com AUD receberam tratamento acompanhado de farmacoterapias comprovadas (25). O baclofeno (5) e oxibato de sódio (6), apesar de não aprovados pela FDA e EMA, são utilizados para tratamento por algumas instituições em países europeus. Apesar da emergente recuperação não abstinente, a medicação mais usada no tratamento do AUD permanece sendo o dissulfiram, composto administrado estritamente para tratamento dos efeitos da abstinência.

Fármaco	Mecanismo de ação	Resultado esperado	Resultados pré-clínicos	Resultados clínicos
(1)  Dissulfiram	Inibidor da aldeído desidrogenase e da dopamina beta-hidroxilase	Atingir e manter abstinência	Efeito para altas taxas de consumo, mas não moderadas Uso crônico de álcool induz intolerância	Consumo de álcool reduzido sob administração supervisionada
(2)  Acamprosato	Regula a atividade do sistema glutamatérgico	Atingir e manter abstinência	Redução do consumo e dos efeitos de abstinência	Redução da chance de reincidência e aumento da duração da abstinência
(3)  Naltrexona	Antagonista opióide	Atingir e manter abstinência e reduzir consumo	Redução do <i>binge drinking</i> e dos efeitos motores do consumo	Redução da chance de reincidência e do <i>binge drinking</i> e efeitos colaterais modestos
(4)  Nalmefeno	Antagonista e agonista parcial opióide	Reduzir consumo	Redução de vontade, <i>binge drinking</i> e neuro inflamação	Redução do <i>binge drinking</i> e consumo de álcool

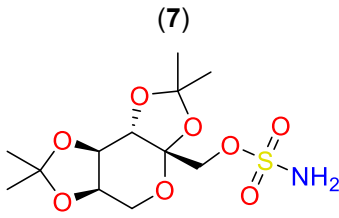
(5)  Baclofeno	Agonista do GABA_B que reduz a atividade da dopamina	Atingir e manter abstinência	Redução de consumo	Redução da chance de reincidência e de consumo exagerado
(6)  Oxibato de sódio	Modula atividade GABA	Atingir abstinência e reduzir sintomas de crises	Redução dos efeitos de abstinência	Eficiente contra crises de abstinência

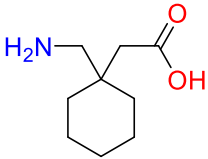
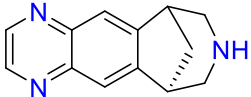
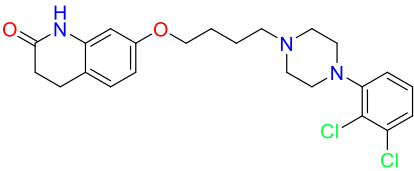
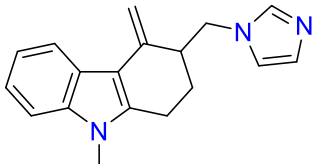
Quadro 1 - Farmacoterapias atualmente administradas e suas propriedades

Fonte: adaptada de Burnette, 2022 (24) e Mackillop, 2022 (26).

3.1.2 Farmacoterapias em desenvolvimento para tratamento do alcoolismo

Os fármacos contidos no Quadro 2 são aprovados pela FDA para outras aplicações e se mostraram eficazes ou promissores para o tratamento de AUD, de forma que estão sendo estudados e em fase de desenvolvimento para sua reproposta, por exemplo uso *off-label*.

Fármaco	Mecanismo de ação	Resultado esperado	Resultados pré-clínicos	Resultados clínicos
(7)  Topiramato	Inibe atividade do sistema glutamatérgico e estimula atividade GABA	Atingir abstinência e reduzir consumo	Redução de consumo em roedores	Redução de álcool ingerido diariamente e de dias de muita ingestão. Aumento dos dias de abstinência.
(8)	Inibe atividade nos canais de cálcio	Atingir abstinência	Redução ou aumento do consumo	Redução de consumo e aumento do

 Gabapentina		e reduzir consumo		tempo de abstinência. Aumento dos sintomas de crises.
(9)  Vareniclina	Agonista da acetilcolina $\alpha 4\beta 2$	Reduzir consumo	Redução da procura por álcool, consumo e <i>binge drinking</i>	Redução de consumos exagerados e consumo diário. Aumento do consumo em fumantes
(10)  Aripiprazol	Agonista parcial do receptor de dopamina e antagonista do receptor 5-HT2A	Reduzir consumo	Redução do consumo	Redução de consumos exagerados e aumento de abstinência
(11)  Ondansetrona	Antagonista do receptor 5-HT3	Atingir abstinência e reduzir consumo	Redução de consumo	Redução de consumo diário e aumento de abstinência em pacientes com AUD precoce

Quadro 2 - Farmacoterapias promissoras em fase de testes ou desenvolvimento e suas propriedades

Fonte: adaptada de BURNETTE, 2022 (24) e MACKILLOP, 2022 (26).

A heterogeneidade do AUD indica ser improvável a prescrição de um único composto que seja eficaz para tratamento de todos os pacientes. Portanto, surge a necessidade do desenvolvimento de novas opções de tratamento, que sejam diversas e eficazes nos mais variados quadros clínicos. Assim, é esperado que o uso de tratamento com fármacos tenha maior aderência e eficácia, suprimindo a necessidade das demandas.

3.2 Alvos terapêuticos relacionados ao tratamento do Alcoolismo

O álcool promove ação depressora no Sistema Nervoso Central (SNC), causando interferência na transmissão dos impulsos nervosos. Os efeitos neurológicos podem ser observados a partir das interações que envolvem os receptores gabaérgicos (GABA), glutamatérgicos (N-metil-D-Aspartato (NMDA)), sistema serotoninérgico (5-HT), opióides e dopaminérgicos (27).

Os receptores GABA são divididos pela nomenclatura A, B e C e são ativados pelo ácido gama-aminobutírico (GABA), principal neurotransmissor no SNC adulto. São estruturas heterogêneas formadas por cinco subunidades, que cercam um cloreto central. Receptores GABA_A e GABA_C são ionotrópicos, ativados por ligantes; e receptores GABA_B são metabotrópicos, acoplados à proteína G. Um dos alvos prováveis do álcool no SNC é o GABA_A, cuja ativação promove a entrada de íons cloreto e causa efeitos anestésicos, sedativos e ansiolíticos (28). Estudos conduzidos por Martz et al. em 1983 comprovam a relação direta entre os efeitos do álcool no organismo e a função GABAérgica, onde o aumento da função potencializa o efeito do álcool e sua redução promove a diminuição. Outro importante estudo, conduzido por Tatebayashi et al. (1998), comprova que o etanol aumenta a frequência de abertura dos canais mediados pelo GABA, interferindo também na frequência de aberturas e sua duração. Estudos pré-clínicos relacionam os receptores GABA a respostas comportamentais, como a compulsão pelo álcool, hiperalgesia induzida pela abstinência, aumento na ansiedade e alteração de funções cognitivas (29).

Estudos em ratos demonstraram que o etanol interage com os receptores de acetilcolina, o que eleva os níveis de acetilcolina na área tegmental ventral (VTA), facilitando o fluxo de dopamina no nucleus accumbens (NAc). Tal estímulo é visto como reforço positivo, apesar de ser apontado que a modulação dos receptores nicotínicos localizados no hipocampo e amígdala induz efeitos negativos (30). Os estímulos a esse grupo de receptores também estão ligados ao consumo de nicotina, o que pode explicar o alto índice de consumo de álcool e tabaco (29). A satisfação advinda do consumo do álcool deve-se à liberação de dopamina e serotonina, diretamente atrelados ao sistema de recompensa no cérebro. A dopamina é indiretamente liberada pelo estímulo aos receptores nicotínicos e pela ativação dos receptores GABA centrais, responsáveis pela neurotransmissão dopaminérgica

mesolímbica. Estudos conduzidos por Lovinger (31) correlacionam o consumo agudo de álcool com maior ativação dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃ e o consumo prolongado com aumento na expressão de outros subtipos, como o 5-HT₂.

3.2.1 Receptores Opióides

Os receptores opióides (OR) pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), e estão amplamente distribuídos no Sistema Nervoso Central e Periférico. Além de sua relação com o controle de dor e analgesia, estão relacionados a diversas atividades biológicas, como o Sistema de Recompensa, controle do humor, estresse, apetite e resposta imune. São classificados em quatro subtipos: delta (δ OR), mu (μ OR), kappa (κ OR) e por último nociceptin (NOPR), que apesar de participar de diversas modulações, não será abordado neste trabalho por não participar do Sistema de Recompensa e analgesia (32,5).

Os OR apresentam a estrutura esperada de GPCRs, com sete hélices transmembranas (TM), conectadas à membrana plasmática por três alças extracelulares e três alças intracelulares (33). A sequência e arranjo das hélices determina o subtipo a qual pertencem, e a união de dois subtipos forma o dímero que constitui o receptor, conforme ilustrado pela Figura 3. Estudos realizados por Wang demonstram a semelhança entre as estruturas dos receptores, cuja parcela intracelular, quando acoplada a uma proteína G_i, pode ser sobreposta de maneira satisfatória. As interações se mostraram similares e a sobreposição de resíduos mostrou estruturas quase idênticas nas TM3, TM5, TM6 e seus resíduos. As distinções de estrutura são mais evidentes no receptor μ OR, o que pode explicar sua maior interação e sensibilidade a morfínicos e analgésicos, enquanto os receptores δ OR e κ OR apresentam atividade quando expostos a maiores concentrações (6).

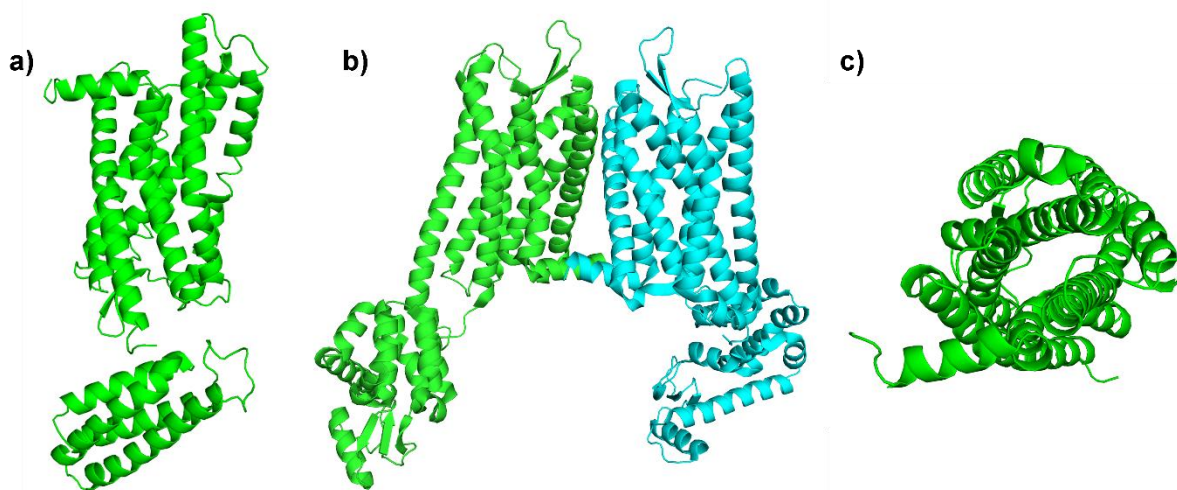


Figura 3 - a) Representação de uma subunidade do receptor **b)** Representação do receptor, um dímero composto de duas subunidades **c)** Vista do interior da estrutura de sete hélices.

Nota: imagem obtida por meio do software pyMOL, com estruturas obtidas no Protein Data Bank, PDB ID: 4DKL.

3.3 Modelagem Molecular no planejamento de fármacos

Com o avanço tecnológico, a indústria farmacêutica tem empregado cada vez mais ferramentas de triagem *in silico*, por se tratar de uma técnica mais barata e rápida de obtenção de bons compostos *hits* e *leads*, etapa inicial no desenvolvimento de novos fármacos. Técnicas de caracterização estrutural, como a cristalografia por raios X e Ressonância Magnética Nuclear (RMN), fornecem informações mais precisas sobre as interações receptor-ligante, que são fundamentais para o planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, em inglês “*Structure-Based Drug Design*”) (34). Dentre as técnicas empregadas, a ancoragem molecular (AM), ou docagem molecular, permite simular diferentes conformações e orientações na interação ligante-receptor para obtenção de poses, que são expressas numericamente em funções de pontuação para permitir o ranqueamento de afinidade da interação do ligante com o sítio ativo do alvo (35,36). A ancoragem molecular pode ser simplificada em algumas etapas fundamentais, ilustradas na Figura 4: a escolha do alvo e obtenção de sua estrutura tridimensional, triagem dos ligantes e otimização de sua estrutura, docagem do ligante no sítio de ligação do alvo e obtenção das poses e suas respectivas funções de pontuação, ranqueamento das poses baseado nos valores obtidos pelas funções e seleção de um pequeno grupo de candidatos que alcançaram as posições mais altas.

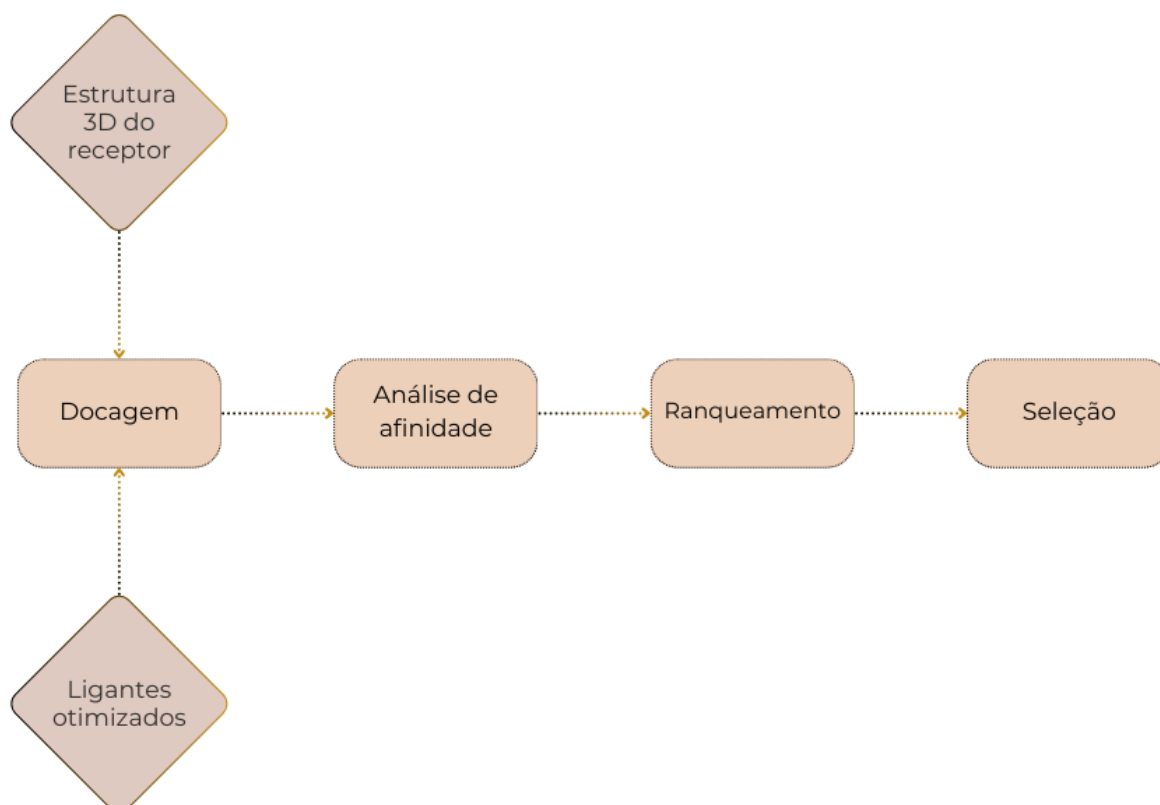


Figura 4 - Fluxograma de processo simplificado da docagem molecular

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3.1 Ancoragem Molecular

A primeira etapa da AM é baseada na obtenção das estruturas tridimensionais (3D) do receptor e dos ligantes em bancos de dados, onde estão muitas vezes disponíveis de forma gratuita. Tais bancos contêm de centenas a milhares de macromoléculas, portanto é necessário refinar a busca e adicionar filtros que direcionam a pesquisa à obtenção de ligantes promissores. Comumente são selecionados ligantes que obedecem a Regra dos 5 de Lipinski, com bioatividade já conhecida e cujas estruturas já estão integralmente elucidadas (34).

Para a obtenção do receptor, pode-se usar os bancos de dados disponíveis e é preferível a escolha de uma estrutura onde o receptor esteja complexado com um ligante com interações no sítio ativo de interesse da pesquisa. É importante ressaltar que a resolução da estrutura interfere diretamente com a qualidade da pesquisa, sendo recomendada a escolha de estruturas com resoluções abaixo de 2,0 Å. A fim

de reproduzir as interações com maior precisão e obter maiores valores de afinidade, é necessário empregar ferramentas para modelar a estrutura dos ligantes e receptor em prol de promover melhor atracamento no sítio de ligação, como adicionar hidrogênios ao ligante, remover águas que não participam das interações, adequar os estados de protonação e ajustar a tautomeria e estereoisomeria do sítio de ligação e dos ligantes (37).

Para estimar a conformação e orientação espacial na interação ligante-receptor, os programas de AM utilizam algoritmos de busca conformacional, que variam parâmetros estruturais do ligante relacionados aos graus de liberdade rotacional, torsional e translacional do ligante. A busca conformacional pode ser empregada pelo método sistemático ou estocástico (38).

A busca pelo método sistemático varia gradualmente a conformação dos ligantes, o que gera variação nos parâmetros estruturais. O algoritmo indica a pose de ligação mais provável a partir da interação de mínima energia, que é obtida após a exploração das possibilidades de interação no espaço energético conformacional. Uma problemática atribuída ao método é o aumento exponencial de combinações possíveis à medida que é atribuído maior grau de liberdade ao ligante, mas que é superada pela fragmentação da estrutura do ligante e ancoragem desses fragmentos de forma individual. Ademais, o resultado obtido por ser referente ao mínimo de energia local e não ao global da estrutura, de forma que é necessário iniciar a varredura a partir de diferentes pontos na superfície do receptor. Para maximizar as possibilidades de obtenção do mínimo de energia global, o método estocástico parte de um conjunto de diferentes conformações do ligante, cujos parâmetros estruturais são modificados aleatoriamente para explorar ao máximo o espaço energético conformacional. Essa exploração mais ampla aumenta o custo computacional associado, sendo um fator importante de limitação no emprego da técnica (38).

Após as simulações da AM, as poses obtidas são ranqueadas a partir de funções de pontuação, valores numéricos atribuídos pela avaliação de fatores físico-químicos envolvidos na interação receptor-ligante, como interações intermoleculares, dessolvatação e efeitos entrópicos. Quanto mais fatores avaliados, mais precisa é a função de pontuação, contudo a demanda computacional aumenta proporcionalmente à quantidade de variáveis do cálculo, reduzindo sua produtividade. Assim, o ideal é fornecer um equilíbrio entre precisão e velocidade de processamento, principalmente quando a técnica é empregada na varredura de um grande grupo de ligantes. No início

de 1990, quando as primeiras funções surgiram, sua classificação seguiu três categorias: empíricas, baseadas em conhecimento e baseadas no campo de força, porém pesquisas conduzidas por Liu e Wang (39) propõem a necessidade de uma quarta categoria, baseada em descritores.

3.3.1.1 Funções de pontuação

As funções de pontuação baseadas no campo de força, ou baseadas na Física, consideram parâmetros físicos relacionados à interação atômica, uma vez que o campo de força foi reconhecido como ferramenta importante na modelagem de macromoléculas (40). A análise baseava-se na energia não covalente, como as interações de Van der Waals e energia eletrostática, devido à natureza das interações receptor-ligante e contabilizava aos cálculos também as interações de Hidrogênio. A princípio, as funções eram aplicadas apenas a cálculos da energia potencial na fase gasosa, o que não representa a totalidade da energia livre na interação receptor-ligante, porém foram posteriormente ampliadas e aplicadas em termos da energia de solvatação. Os parâmetros podem ser obtidos a partir de dados experimentais ou por cálculos *ab initio*, porém o método é desafiador por depender da previsão correta da natureza da energia livre de ligação, considerar os efeitos do solvente na ligação e depender dos cálculos *ab initio* (38,39).

As funções de pontuação empíricas, ou baseadas na regressão, calculam a aptidão da ligação receptor-ligante ao contabilizar a contribuição individual de variáveis que interferem energeticamente na ligação, como as interações de Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações iônicas e apolares, entropia e etc. Os cálculos são realizados através de um modelo estatístico baseado em regressão linear múltipla alimentado com dados conhecidos de afinidade de um conjunto de complexos. As maiores vantagens do método são o controle de variáveis no cálculo, que permite a customização do modelo para contemplar as necessidades do estudo e a velocidade do processamento, que entrega resultados mais rápidos. No entanto, é preciso ressaltar que tais funções dependem da reprodutibilidade das afinidades já conhecidas e que sua aplicação só é possível em modelos de padrão de interação receptor-ligante mais comuns (38,39).

As funções de pontuação baseadas em conhecimento, ou no potencial de força média, somam potenciais estatísticos relacionados à interação receptor-ligante, que

são dependentes da distância em que os átomos estão separados. Nessa abordagem são analisados pares de átomos e a frequência em que ocorre contato entre eles é tomada como medida de sua distribuição energética. É considerada uma interação energeticamente favorável quando a frequência de contato de um par é maior que no estado de referência; e desfavorável quando é menor. Para obter os valores de referência é comumente utilizado um banco de dados de interações já conhecidas para a formação de uma base de conhecimento. Por não dependerem de reprodutibilidade ou cálculos *ab initio*, oferecem bom equilíbrio entre precisão e velocidade, porém são mais eficientes para reproduzir as poses de interação receptor-ligante do que as energias de ligação (38,39).

As funções de pontuação baseadas em descritores, ou em aprendizado de máquina (*machine learning*), aplicam análises baseadas na Relação Quantitativa entre Estruturas e Atividade (QSAR, do inglês *Quantitative Structure-activity Relationship*), que estima as propriedades do ligante a partir da sua estrutura molecular. Caso o receptor e o ligante possam ser codificados em determinados descritores, então a QSAR pode ser aplicada para derivar modelos estatísticos capazes de calcular a afinidade da interação. Algumas pesquisas indicam que a previsão das interações calculadas por esse método é mais precisa quando comparada a outras funções (39). São apresentados alguns exemplos de funções no Quadro 3, com ênfase nas utilizadas na presente pesquisa:

Campo de força	Empíricas	Conhecimento	Descritores
ChemPLP (41)	PLP (42)	DrugScore (43)	NNScore (44)
GoldScore (45)	ChemScore (46)	IT-Score (47)	RF-Score (48)
MedusaScore (49)	GlideScore (50)	ASP (39)	ID-Score (51)

Quadro 3 - Exemplos de receptores segundo sua classificação. Em negrito, as funções obtidas a partir do GOLD

3.3.2 Validação de modelos de Docagem Molecular

A docagem molecular, apesar da praticidade de aplicação, requer atenção quanto aos parâmetros escolhidos, que devem ser validados. A validação de um

protocolo de ancoragem molecular pode ser realizada de três formas distintas: a redocagem, a curva de características de operação do receptor (ROC) e a Relação Quantitativa entre Estruturas Tridimensionais e Atividade (3D-QSAR).

A validação é essencial para garantir sua aplicabilidade, e os três protocolos não são excludentes, podendo ser aplicados para aumentar a confiabilidade da metodologia. Nesse trabalho foram aplicados a redocagem e a uma metodologia 3D-QSAR de análise comparativa de contatos intermoleculares baseada em ancoragem (dbCICA), conforme descrito na próxima seção. A curva ROC não foi aplicada devido à limitação do conjunto de ligantes de atividade conhecida frente aos receptores, cuja pouca quantidade não é suficiente para garantir sensibilidade do método.

3.3.3 Análise comparativa de contatos intermoleculares baseada em Ancoragem Molecular (dbCICA)

A análise comparativa de contatos intermoleculares baseada em ancoragem molecular é uma metodologia de pós processamento dos dados de ancoragem que se baseia na quantidade e qualidade dos contatos entre uma série de ligantes ancorados e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação. Isso se dá através da implementação de um algoritmo genético que avalia se o conjunto de parâmetros escolhido é capaz de alinhar os ligantes de maneira que os mais ativos estejam próximos de átomos distintos dos observados para ligantes de menor atividade e vice-versa. Assim, é possível afirmar que uma condição de ancoragem é válida caso o conjunto de contatos para uma série de ligantes ativos seja corretamente indicado. A análise se baseia na constatação de que, em geral, funções de pontuação tem boa capacidade preditiva quanto à reprodução dos modos de ligação observados experimentalmente, o que indica que é possível correlacionar poses ancoradas com a bioatividade. Um ligante com alta afinidade frente a uma macromolécula deve satisfazer certas interações críticas dentro do sítio de ligação, de modo que a identificação de tais contatos críticos não só auxilia na validação do protocolo de ancoragem molecular como traz à tona quais átomos e, conseqüentemente, quais contatos são essenciais para o reconhecimento molecular. Os contatos críticos obtidos podem ser utilizados na construção de mapas farmacofóricos que codifiquem as características químicas e estéricas necessárias para o reconhecimento molecular,

e tais mapas podem ser utilizados na triagem virtual de compostos potencialmente ativos ainda não identificados (8).

No dbCICA, um contato intermolecular é definido com base na distância entre os átomos do ligante e do sítio de ligação contanto que ele esteja dentro de uma distância limite predefinida, considerando todos os átomos envolvidos explicitamente. Entende-se que tais distâncias interatômicas sejam representações adequadas da interação que causa a proximidade entre tais átomos. O algoritmo busca por uma combinação de contatos críticos que seja diretamente proporcional à afinidade dos ligantes e permite a atribuição de pesos aos contatos, o que representa maior relevância dos mesmos para o reconhecimento molecular. Além disso, também são identificados contatos de correlação negativa com a bioatividade, caracterizando choques estéricos (8).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Após pesquisa bibliográfica, a primeira etapa dos estudos computacionais foi a utilização de estruturas dos receptores co-cristalizadas com ligantes da literatura.

O tratamento das estruturas e análise das interações foi realizado pelo programa *Discovery Studio Visualizer* (DSV). Para as aplicações das técnicas de docagem molecular, foi utilizado o *software* GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*), por fornecer funções de pontuação eficientes e resultados de docagem consistentes (52,35,7) e estar disponível gratuitamente por meio de parceria com Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). O GOLD emprega o método estocástico através do algoritmo genético (GA), que supera a problemática dos altos custos associados aplicando conceitos de seleção natural e teoria da evolução, mimetizando a evolução (38).

4.1 Hardware utilizado

Todos os cálculos realizados durante este trabalho foram realizados em uma estação de trabalho com sistema operacional Windows 11, processador Intel® Core™ i7-12700H, CPU de 2,30 GHz, base 64 bits (x64) e 16 GB de memória RAM da marca DELL.

4.2 Obtenção e preparação das estruturas tridimensionais dos receptores e dos ligantes utilizados

Primeiramente, foram obtidas as estruturas dos receptores opioides através da plataforma *Protein Data Bank*, elucidadas a partir da técnica de difratometria de raios-X, de subtipos *delta* (PDB ID: 4N6H, resolução 1,80 Å), *mu* (PDB ID: 4DKL, resolução 2,80 Å) e *kappa* (PDB ID: 4DJH, resolução 2,90 Å)(53,54,55). As estruturas dos receptores *mu* e *kappa* foram escolhidos apesar da resolução não ser muito alta, pois para o primeiro receptor, o ligante complexado é análogo a um dos compostos aprovados para tratamento, o naltrexano, e para o segundo receptor, a estrutura era a melhor opção de resolução de origem humana. O ligante de referência complexado no subtipo *delta* é o naltrindole, um antagonista extremamente seletivo a esse subtipo, no subtipo *mu* é a β -funaltrexamina (β -FNA) e no subtipo *kappa* é o JDTIC.

Para validar os modelos computacionais, é necessária sua aplicação a moléculas com atividade conhecida frente aos receptores alvo. O critério de seleção das moléculas foi embasado nos valores de afinidade (K_i), buscando ensaios que utilizaram protocolos semelhantes para a obtenção do seu valor, sendo selecionadas as que tinham sua estereoquímica absoluta bem definida. Ao comparar o conjunto de moléculas com atividade em cada receptor, a maioria das moléculas se repete em pelo menos dois dos três grupos. A semelhança entre as estruturas das subunidades torna possível a afinidade de uma mesma molécula aos três sítios, com as diferenças justificando os diferentes valores de K_i . Para o receptor *delta* foram selecionadas 78 moléculas com K_i entre 0,23 nM e 52,20 μ M, para o receptor *mu* foram selecionadas 92 moléculas com K_i entre 0,024 nM e 26,60 μ M e para o receptor *kappa* foram selecionadas 87 moléculas com K_i entre 0,02 nM e 25,41 μ M. Os valores de K_i foram convertidos para pK_i para correlacionar linearmente a bioatividade dos ligantes com a variação de energia livre. As estruturas das moléculas e seus valores de K_i podem ser consultados no Apêndice A. As estruturas tridimensionais dos ligantes foram obtidas por meio do banco de dados do ChEMBL, com posterior determinação dos estados de protonação para pH 7,4 através do *software OpenBabel* (v. 3.1.0) e realização dos cálculos de minimização de energia pelo MOPAC2016. Todas as moléculas foram salvas em formato .mol2 utilizando código "LIG_[1-99]", conforme determinado pelo Anexo A.

4.3 Ancoragem molecular

Uma vez que as estruturas estão co-cristalizadas com um ligante conhecido, para validar o modelo computacional foi realizada uma etapa de redocagem. Nesse método é realizada a ancoragem molecular do receptor e o ligante, de forma a avaliar se a capacidade preditiva do modelo é satisfatória. A avaliação é feita tomando os dados obtidos pelo *Root Mean Square Deviation* (RMSD), que prevê a orientação espacial do ligante em comparação a um ligante de referência; e pelas interações com os aminoácidos citados na seção anterior.

O arquivo .pdb foi submetido a ancoragem molecular no *software* GOLD para análise de todas as suas funções de pontuação, de modo a selecionar a que melhor prediz a pose e as interações determinadas experimentalmente. As coordenadas de referência são únicas para cada receptor e foram obtidas a partir da análise do sítio ativo em que cada ligante de referência interage, conforme a Tabela 1 abaixo. O raio de docagem foi fixado em 10 Å para os três receptores, valor obtido após a análise dos raios das interações do ligante e análise do grupo de moléculas de ligantes, que foram medidas e constatou-se que nenhuma é grande o suficiente para se posicionar fora do volume da esfera definida para o sítio ativo, e para aumentar as possibilidades de conformações foram realizadas 100 poses.

Tabela 1 - Coordenadas do centro de referência para a ancoragem molecular

PDB ID	Eixo x	Eixo y	Eixo z
4DKL	-27,996879	-13,204273	-11,084121
4N6H	-5,910935	-69,366581	70,805839
4DJH	60,378030	-24,647364	-4,998424

Fonte: elaborado pela própria autora.

Os arquivos dos complexos baixados do PDB foram abertos em um programa de visualização para análise do modo de interação dos ligantes, visando a identificação dos resíduos de aminoácidos que realizam interações no sítio ativo do receptor, conforme descrito a seguir. As interações de interesse foram selecionadas baseadas na literatura, de forma a demarcar quais são os resíduos de interesse para

a atividade biológica e qual interação é fundamental nesses resíduos. Essas são as referências para a validação do modelo computacional, que visa garantir a reprodutibilidade das interações após a docagem.

No software GOLD, foram adicionados os hidrogênios necessários e removidas as moléculas de água que não participam das interações, conforme observado pelo DVS e descrito na seção acima. Os ligantes também foram removidos, para otimização do tempo de estudos computacionais. Para as etapas de redocagem, foi definida a seguinte rotina no programa:

- I. Carregamento do arquivo em formato .pdb;
- II. Adição de hidrogênios conforme os parâmetros GOLD;
- III. Remoção de moléculas de água que não participam das interações, mantendo uma molécula de água para o receptor *kappa*;
- IV. Remoção dos ligantes;
- V. Adição do ligante e configuração de sua liberdade conformacional;
- VI. Seleção de sua estrutura como referência;
- VII. Determinação do raio de 10 Å;
- VIII. Definição de 100 poses;
- IX. Determinação da função de pontuação;
- X. Desabilitar a função de terminação;
- XI. Rodagem dos cálculos.

A rotina foi aplicada a todos os receptores para as quatro funções de pontuação, obtendo assim uma lista de 100 poses por função, elencadas pelo seu RMSD. A próxima etapa foi a escolha da função de pontuação que melhor representa a interação para cada receptor, usada como referência na docagem por ligantes da literatura e posterior análise dos resultados. Após a escolha da função de pontuação, foi realizada outra etapa de validação do modelo frente a ligantes da literatura que já possuem atividade comprovada nos receptores.

A ancoragem dos ligantes otimizados foi realizada conforme a rotina descrita na seção anterior, mantendo a configuração de 100 poses e utilizando para cada receptor a função de pontuação com melhor desempenho na etapa de redocagem. Para cada ligante foi escolhida a pose com maior pontuação, e entende-se que o melhor *ranking* define a pose que representa as melhores interações.

Dessa forma, para cada conjunto de moléculas foi extraído o complexo ligante-receptor com maior pontuação. Os arquivos foram salvos em formato .mol2 e agrupados para posterior uso no cálculo de contatos intermoleculares.

4.4 Obtenção dos contatos intermoleculares

Na modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de fármacos, a obtenção dos complexos por meio do GOLD não equivale ao cálculo de interações intermoleculares considerando todos os parâmetros de reconhecimento molecular. Conforme descrito anteriormente, as funções de pontuação são aproximações da energia livre de ligação e cada uma é calculada levando em consideração diferentes parâmetros físicos, transformando-os em um valor numérico, o que impõe limitações aos cálculos de estimativas das interações no complexo. De maneira semelhante, quando o arquivo de um complexo gerado na docagem é aberto em um visualizador, como o DSV, as interações exibidas são uma interpretação gráfica aproximada, baseada na distância dos átomos e seus ângulos. Para superar a limitação dos cálculos de interações intermoleculares, foi aplicado a este projeto o LUNA Toolkit (9), uma ferramenta desenvolvida especificamente para calcular de forma sistemática as interações intermoleculares de complexos biomoleculares.

Por não possuir uma interface gráfica, o LUNA requer o carregamento dos arquivos do complexo já docado, etapa realizada conforme as rotinas de docagem anteriormente descritas. Para que o *toolkit* realize os cálculos, é necessário o carregamento separado do arquivo da macromolécula e da micromolécula, de forma que os complexos obtidos pelo GOLD foram fragmentados nessas duas partes. Devido à docagem dos receptores de maneira rígida, o arquivo usado pelo LUNA foi o mesmo frente a todos os cálculos, enquanto a estrutura dos ligantes foi selecionada baseada no complexo cuja pose obteve o maior valor bruto da função de pontuação.

Os cálculos de interação retornam uma tabela que correlaciona o átomo do ligante e o átomo do receptor, bem como o tipo de interação que é formada, tratado como contato nesta pesquisa. Os contatos recebem atribuição 1 em uma matriz com os átomos do ligante e os resíduos de aminoácido do receptor, enquanto os espaços vazios são preenchidos com 0, formando uma matriz de contatos conforme exemplificado na Figura 5.

entry	interaction	A/A/53	A/N/63	A/N/86	A/D/152	A/D/83	A/C/153	A/C/153A/	A/C/76A/C/A/Q/60	A/E/165	A/G/415	A/H/387
LIG_04	Amide-aromatic stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Anion-electrophile	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0
LIG_04	Antiparallel multipolar	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Cation-nucleophile	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Cation-pi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
LIG_04	Chalcogen bond	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Chalcogen-pi	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
LIG_04	Displaced face-to-edge pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Displaced face-to-face pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Displaced face-to-slope pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Edge-to-edge pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Edge-to-face pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Edge-to-slope pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Face-to-edge pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
LIG_04	Face-to-face pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Face-to-slope pi-stacking	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Halogen bond	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Halogen-pi	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Hydrogen bond	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LIG_04	Hydrophobic	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0

Figura 5 - Exemplo das matrizes binárias. As linhas representam as interações, agrupadas pelo ligante, e as colunas representam os átomos do sítio ativo.

A matriz de contatos é então rearranjada de maneira que as linhas representem um ligante e as colunas representam a interação e o resíduo de aminoácido do receptor, de forma a reunir todas as interações do grupo de ligantes em um único arquivo. Foi adicionado o valor de pK_i na coluna à direita do ligante e os dados foram ordenados em razão da ordem decrescente desse valor, conforme a Figura 6.

molecules	pK _i value	A/TYR/416/Edge-to-face pi-stacking	A/ILE/386/Unfavorable nucleophile-nucleophile	A/TYR/11/Hydrophobic	A/TYR/416/Unfavorable anion-nucleophile
LIG_1	7.62	0	0	0	0
LIG_17	7.62	0	0	0	0
LIG_88	7.284	0	0	0	0
LIG_42	6.959	0	0	0	0
LIG_30	6.91	0	0	0	0
LIG_9	6.8	0	0	0	0
LIG_37	6.699	0	0	0	0
LIG_51	6.678	0	0	0	0
LIG_13	6.658	0	0	0	0
LIG_38	6.585	0	0	0	0
LIG_48	6.553	0	0	0	0
LIG_25	6.553	0	0	0	0
LIG_04	6.495	0	0	0	0
LIG_65	6.444	0	0	0	0
LIG_53	6.232	0	0	0	0
LIG_62	6.155	0	0	0	0
LIG_18	6.155	0	0	0	0
LIG_64	6.041	0	0	0	0
LIG_49	6.018	0	0	0	0

Figura 6 - Exemplo da matriz binária. As linhas representam os ligantes, a segunda coluna representa os valores de pK_i e as demais colunas representam o conjunto interação-aminoácido do sítio ativo.

A fim de eliminar ruído estatístico, foram retiradas as colunas com valores de variância menor ou igual a zero (≤ 0), colunas vazias e as fortemente correlacionadas ($|r| \geq 0,85$), de forma a garantir maior capacidade de generalização do modelo.

4.5 Validação por dbCICA

O algoritmo genético foi então aplicado por meio da interface do *software* MatLab (v. 2007b). Primeiramente, os contatos são regredidos frente aos seus valores de K_i , de forma a determinar se a interação dos átomos com o sítio ativo afeta a atividade biológica positiva ou negativamente. Os contatos positivos são separados para primeira análise, enquanto os negativos tiveram seu formato invertido, 0 trocados por 1 e 1 trocados por 0, e foram retirados para análise posterior. O algoritmo executou os cálculos baseado nos comandos preenchidos conforme o Quadro 4 abaixo, cujos valores representam os parâmetros que foram alterados em relação às configurações padrões.

Parâmetro	Valor definido
Ordem de cálculo	Positivos depois negativos
Características positivas	De 4 a 10
Características negativas	10
Algoritmo genético	Sim
População	200
Fração de cruzamento	0,8
Gerações	2000
Coefficiente de correlação	5-fold r^2
Peso para características	Sim
Tratar cada número de maneira independente	Sim
Parâmetro	Valor definido
Ordem de cálculo	Positivos depois negativos

Quadro 4 - Parâmetros de cálculo do algoritmo genético.

A execução dos cálculos é composta por 4 etapas: criação, cruzamento, mutação e ajuste. Os cálculos são iniciados pelos contatos positivos, submetendo-os ao algoritmo genético em busca do conjunto ideal que explique a variação da bioatividade.

A primeira etapa é a criação de uma população inicial de 200 cromossomos que representam quantos contatos são somados, de maneira a cada um representar uma combinação possível. O processo de criação é completamente randomizado e atribui pesos à soma dos contatos também de maneira aleatória, constituindo a primeira geração do algoritmo. A etapa de cruzamento gera proles da próxima geração a partir da população já existente, criando pares de cromossomos a partir do material genético de pares de cromossomos da geração anterior. Simultaneamente a função de mutação causa alterações aleatórias no material genético de um cromossomo. Aos cromossomos gerados é atribuído um coeficiente de correlação *5-fold* r^2 como função de ajuste, classificando-os de acordo com esse valor. O cromossomo com maior valor de correlação é classificado como “elite” e é automaticamente inserido na próxima geração.

A função de ajuste selecionada, *5-fold* r^2 , ranqueia os cromossomos a partir da divisão randomizada do grupo total de treinamento em 5 grupos, onde 4 deles formam o conjunto de treinamento e 1 grupo forme o conjunto de teste. O conjunto de ajuste é então utilizado para construir um submodelo, que é aplicado ao grupo de teste para prever seu pKi. Essa operação é realizada 5 vezes, de maneira a garantir que o grupo de teste seja composto por moléculas que foram inclusas nos grupos de treinamento em outras operações, conforme esquematizado na Figura 7. Os valores de predição dos cinco submodelos são comparados com os valores reais e utilizados para determinar o *5-fold* r^2 de cada cromossomo.

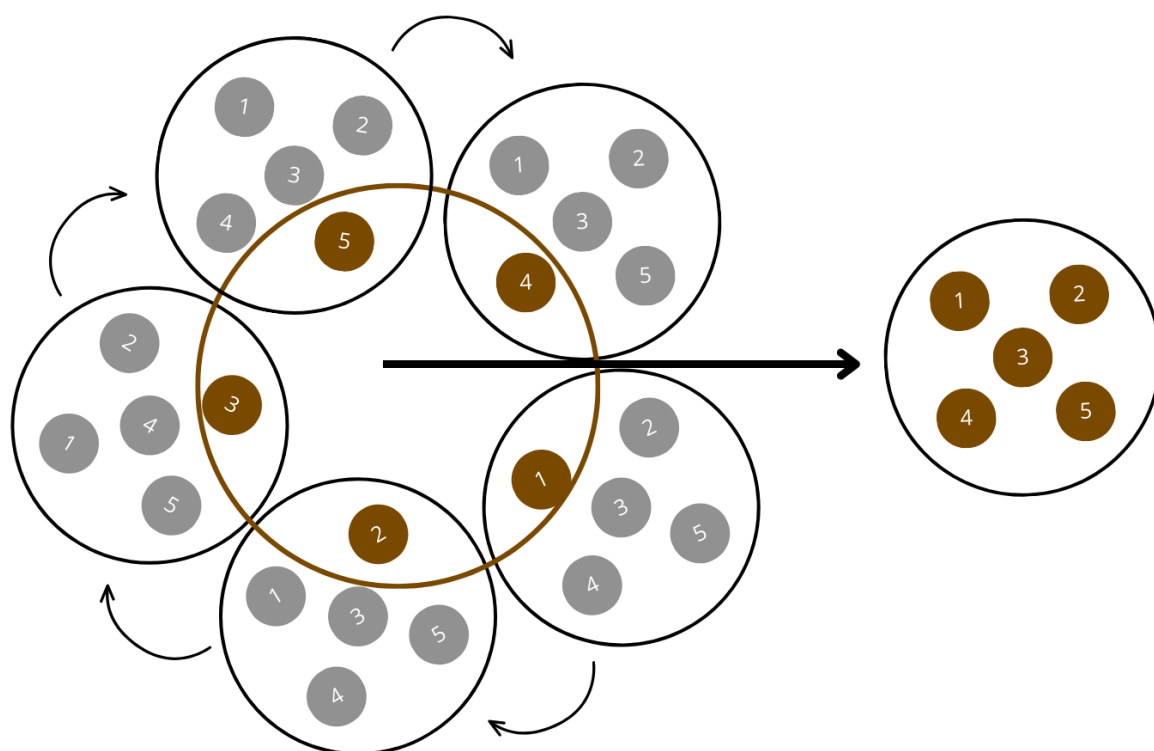


Figura 7 - Divisão de grupos para mutações no método dbCICA.

De acordo com os parâmetros inseridos, as gerações seguem o mesmo padrão de distribuição de proles: 1 elite e 199 cromossomos adicionais, cuja fração de cruzamento de 0,8 representa 159 cromossomos e os 40 remanescentes sofrem mutações. O algoritmo opera de maneira a manter sempre a população fixa em 200 cromossomos durante as 2000 gerações. Ao final de todas as iterações, o cromossomo com maior valor de *5-fold* r^2 representa o melhor modelo. Dentro do modelo, além de estarem descritas como contatos positivos e negativos, são atribuídos pesos de 1 a 3 às interações, de maneira que interações com maiores pesos representam maior interferência na bioatividade. Para esta pesquisa, foram salvos os 10 melhores modelos para cada receptor.

4.6 Obtenção dos FINGERPRINTS

As interações obtidas a partir do LUNA foram aplicadas de duas maneiras distintas: transformadas em código binário, conforme descrito na seção 4.5, para aplicação no dbCICA e transformadas em *Fingerprints*, para aplicação dos EIFP, FIFP e HIFP no dbCICA. A segunda aplicação foi planejada baseada na extrapolação do

método tradicional do dbCICA, assumindo que a maior robustez dos descritores a partir de *Fingerprints* deve gerar um modelo de 3D-QSAR mais preciso.

4.7 Construção do mapa farmacofórico

Os resultados obtidos através do dbCICA foram utilizados para construir o mapa farmacofórico de cada receptor. Para a construção foram obtidos os clusters dos FP apontados pelo melhor modelo do dbCICA, tanto os positivos quanto os negativos. Em seguida, foi aberto cada FP em todos os ligantes, formando uma sobreposição de ligantes a fim de compreender as interações contidas no *shell*. Essas informações foram utilizadas para compor o mapa farmacofórico, com os contatos negativos compondo as esferas de exclusão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os receptores opioides possuem estrutura muito semelhante, com muitos resíduos conservados entre as três estruturas, especialmente o sítio ativo. Ao longo deste estudo, as estruturas tridimensionais dos três subtipos foram alinhadas e comparadas, a fim de refinar sua compreensão. A sobreposição pode ser vista na Figura 8, onde estão destacadas as sobreposições mais relevantes para a atividade deste projeto. Conforme pode ser observado, a sobreposição do volume do sítio ativo entre os subtipos μ , em laranja, e δ , em verde, é muito alinhada e indica um sítio muito conservado, enquanto o subtipo κ possui seu sítio voltado ao lado oposto, com a abertura para a entrada de ligantes virada a resíduos não conservados. Em linhas pontilhadas pretas são destacados espaços que não representam uma sobreposição completa, mas espaços que permitem interações de mesma espécie, apesar dos resíduos diferentes.

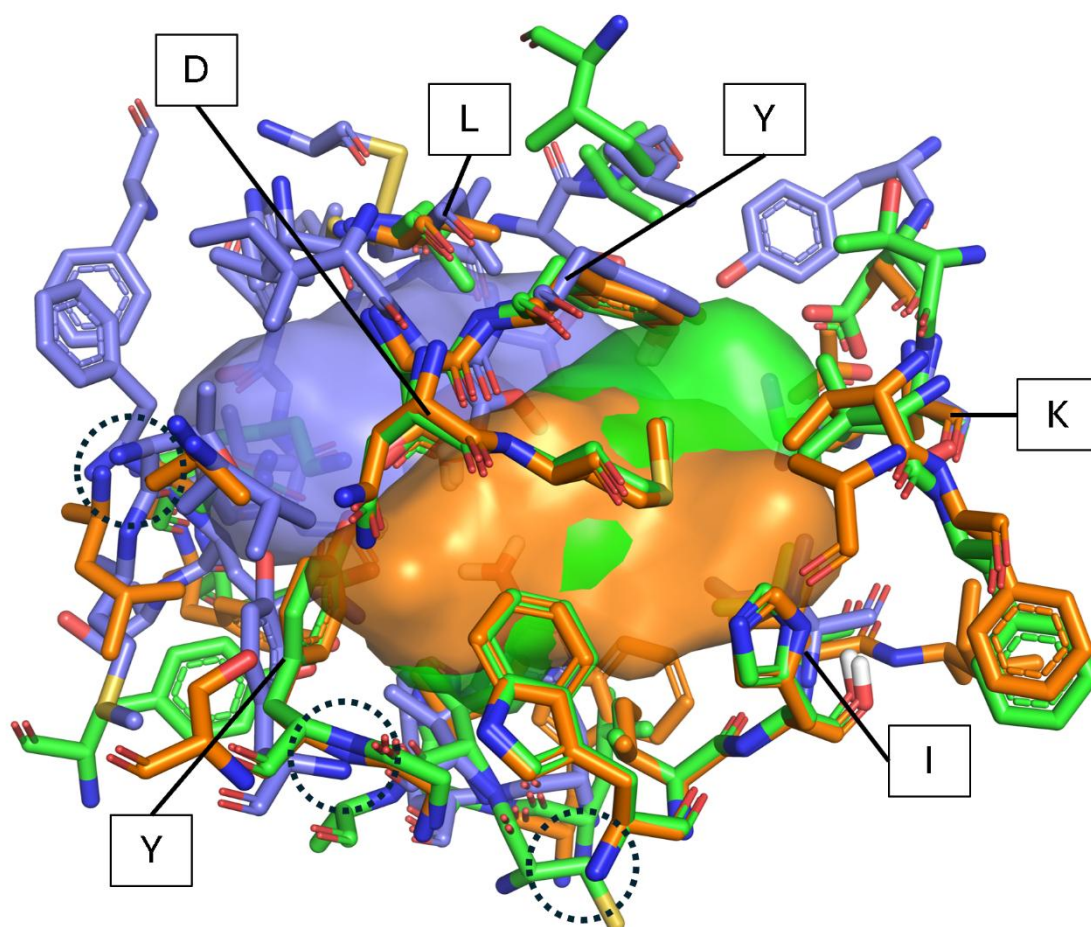


Figura 8 - Sobreposição do sítio ativo dos receptores opioides. Carbonos e volume do sítio em azul claro para a subunidade κ , em laranja para a subunidade μ e em verde para a subunidade δ , respectivamente. Átomos de nitrogênio em azul escuro, de oxigênio em vermelho e de enxofre em amarelo. Átomos de hidrogênio omitidos para maior clareza.

Com a semelhança estrutural tanto dos receptores quanto dos ligantes, abaixo são discutidos os resultados mais relevantes desta pesquisa, separados por subtipo.

5.1 Receptores opioides do subtipo μ

A Figura 9 representa o PDB ID 4DKL, estrutura do receptor μ -opioide co-cristalizado com o ligante β -funaltrexamina. Conforme descrito em literatura, há interações-chave relevantes para a atividade biológica de moléculas nos receptores opioides, dentre as quais é possível observar no complexo 4DKL: a interação π - π entre os anéis do ciclopropano e do resíduo W148 (4,01 Å), o grupo amina protonado interage ionicamente com o resíduo D147 (2,63 Å), o ligante forma uma ligação de hidrogênio com o resíduo Y148 (3,18 Å).

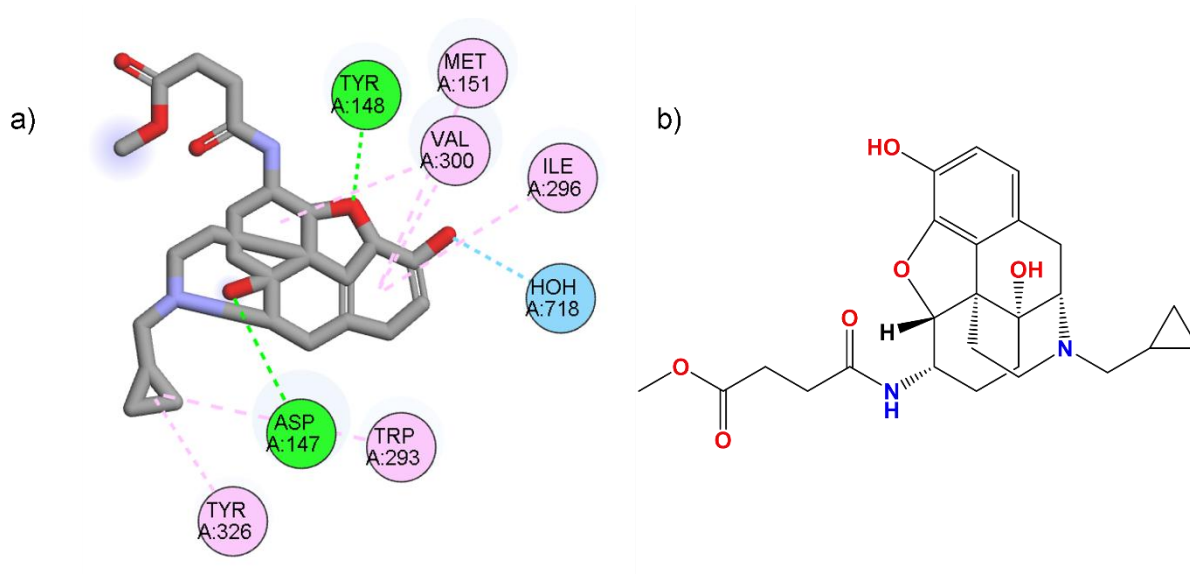


Figura 9 - a) Interação receptor-ligante na estrutura 4DKL. **b)** Fórmula estrutural do ligante BF0, de K_i : <10 nM.

Fonte: **a)** Gerada pelo autor com DSV e **b)** PBD.

A partir dos complexos obtidos pela etapa de validação preliminar da rotina computacional, o melhor resultado foi obtido por meio da função *GoldScore*, que gerou uma pose de RMSD 1,1181 Å, conforme pode ser observado na Figura 10. Além do valor bruto de RMSD, para definir a função de pontuação foi analisada a sobreposição entre o ligante obtido pela redocagem e o ligante original, de maneira a observar se as interações chave foram reproduzidas e se o cálculo por meio da função de pontuação é capaz de deduzir corretamente a posição do ligante no sítio. Dessa maneira, a função *GoldScore* foi selecionada para ser utilizada na etapa de docagem dos ligantes da literatura, previamente otimizados.

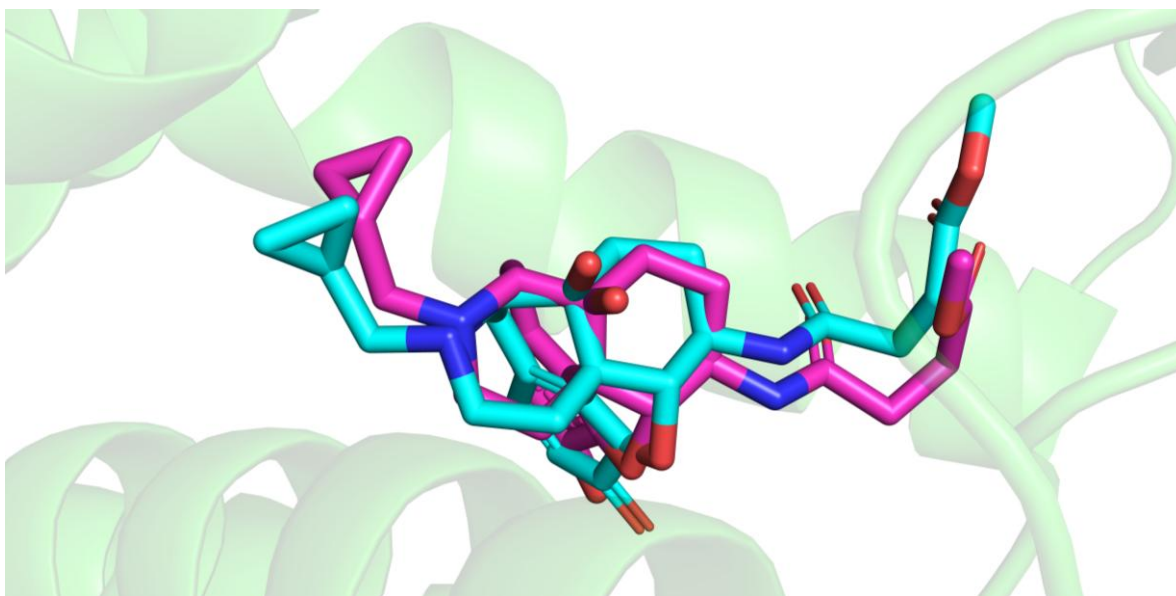


Figura 10 - Sobreposição entre o ligante original da estrutura 4DKL e o melhor resultado da redocagem calculado pela função GoldScore.

Átomos de carbono da pose original do ligante em magenta e da pose obtida na redocagem em ciano. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

O complexo de melhor pontuação foi selecionado para cada ligante, e suas estruturas foram usadas no LUNA para calcular as interações intermoleculares frente ao sítio ativo do receptor. É válido destacar que a metodologia foi capaz de detectar interações já descritas na literatura, como as interações iônicas com o resíduo D147, renomeado pelo *software* como A/D/83, entre os ligantes de maior atividade, como demonstrado na Figura 11. Foram gerados gráficos semelhantes para cada interação, totalizando 31, disponíveis no Apêndice B.

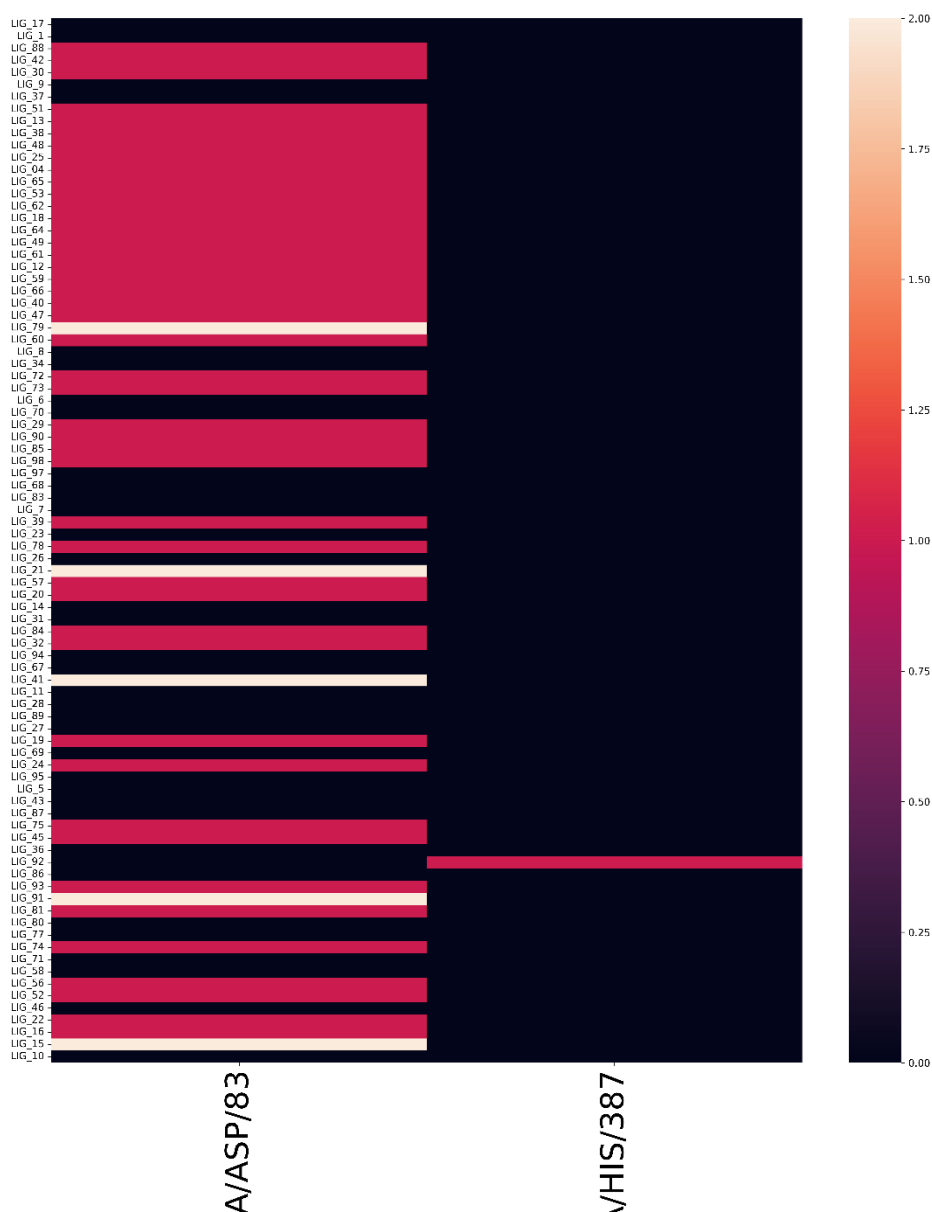


Figura 11 - Interações iônicas nos resíduos do sítio ativo. Interação com o resíduo D147 (ASP/83) prevalente entre os ligantes mais ativos.

As interações, transformadas previamente em código binário, foram também utilizadas para o cálculo dos *Fingerprints*. O dbCICA retornou os 10 melhores modelos para cada conjunto de dados, totalizando 40 modelos, cujos melhores 5 modelos estão expostos no quadro 5. A eficiência do uso de *Fingerprints* como descritores pode ser evidenciada pela diferença nos valores de *5-fold* r^2 , onde o melhor modelo gerado a partir dos contatos intermoleculares tem pontuação muito abaixo de todos os modelos gerados a partir dos três descritores baseados em *Fingerprint*. É importante ressaltar que dentro da metodologia dbCICA, os valores de *5-fold* r^2 são usados para ranquear os modelos, e não como uma propriedade a ser avaliada individualmente. Para melhor

compreensão de valores de *5-fold* r^2 , os modelos estão disponíveis do Apêndice B. A seguir, é discutido o melhor modelo obtido a partir das duas aplicações.

Modelo	EIFP	FIFP	HIFP	EIFP	FIFP	...	Contatos
<i>5-fold</i> r^2	0,79695	0,78648	0,77157	0,75695	0,72296	...	0,55221

Quadro 5 - Melhores modelos gerados pelo dbCICA para o receptor opioide μ .

O melhor modelo obtido a partir dos contatos retornou um valor de *5-fold* r^2 de 0,55221, o que indica que o modelo é capaz de explicar cerca de 55% dos valores de K_i . É esperado que o modelo não tenha resultado muito elevado, visto que correlaciona um descritor simples, de contatos positivos e negativos, com a bioatividade, uma propriedade complexa. O Quadro 6 sumariza os contatos relevantes no modelo, apresentando-os conforme o seu resíduo de aminoácido e o peso atribuído.

Peso	Interação intermolecular	Resíduo	POSITIVOS				NEGATIVOS																																			
			2	Face-to-slope pi-stacking	TYR84		2	Cation-nucleophile	GLY415		1	Cation-nucleophile	LYS169		1	Hydrophobic	HIS387		1	Anion-electrophile	ASP83		1	Hydrophobic	HIS387		1	Cation-nucleophile	MET87		1	Face-to-slope pi-stacking	TRP383		1	Cation-pi	PHE218		1	Unfavorable nucleophile-nucleophile	MET87	

Quadro 6 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide μ , obtido a partir dos contatos.

Conforme analisado, todos os modelos obtidos a partir de descritores baseados em *Fingerprints* tiveram melhor desempenho do que os baseados em contatos. Dentre eles, o destaque é dado aos EIFP, cujos modelos receberam valores maiores de *5-fold* r^2 . A Tabela 2 destaca os *Fingerprints* relevantes no modelo de melhor pontuação e os pesos a eles atribuídos.

Tabela 2 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide μ , obtido a partir dos EIFP.

Código EIFP	POSITIVOS					NEGATIVOS									
	Peso	3878	3053	2145	3338	3228	1325	3761	1323	634	1420	3330	3030	2697	2547
	2		2	3	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Código do EIFP e seu respectivo peso, atribuído pelo modelo.

A análise feita puramente a partir do valor de *5-fold* r^2 é que o modelo gerado a partir do EIFP é o que melhor descreve a correlação entre as interações dentro do sítio e a bioatividade do ligante frente ao receptor. Porém, para que possa ser afirmado que a metodologia baseada em *Fingerprints* é mais eficiente na correlação, é necessário comparar os dois modelos e identificar quais interações os EIFP representa. As interações indicadas pelos *shells* do melhor modelo englobam não apenas os contatos do modelo gerado a partir das interações, mas outros contatos valiosos para a construção de um mapa farmacofórico mais robusto. A seguir são comparados os contatos obtidos pelo modelo do Quadro 6 e os *Fingerprints* obtidos pelo modelo da Tabela 2.

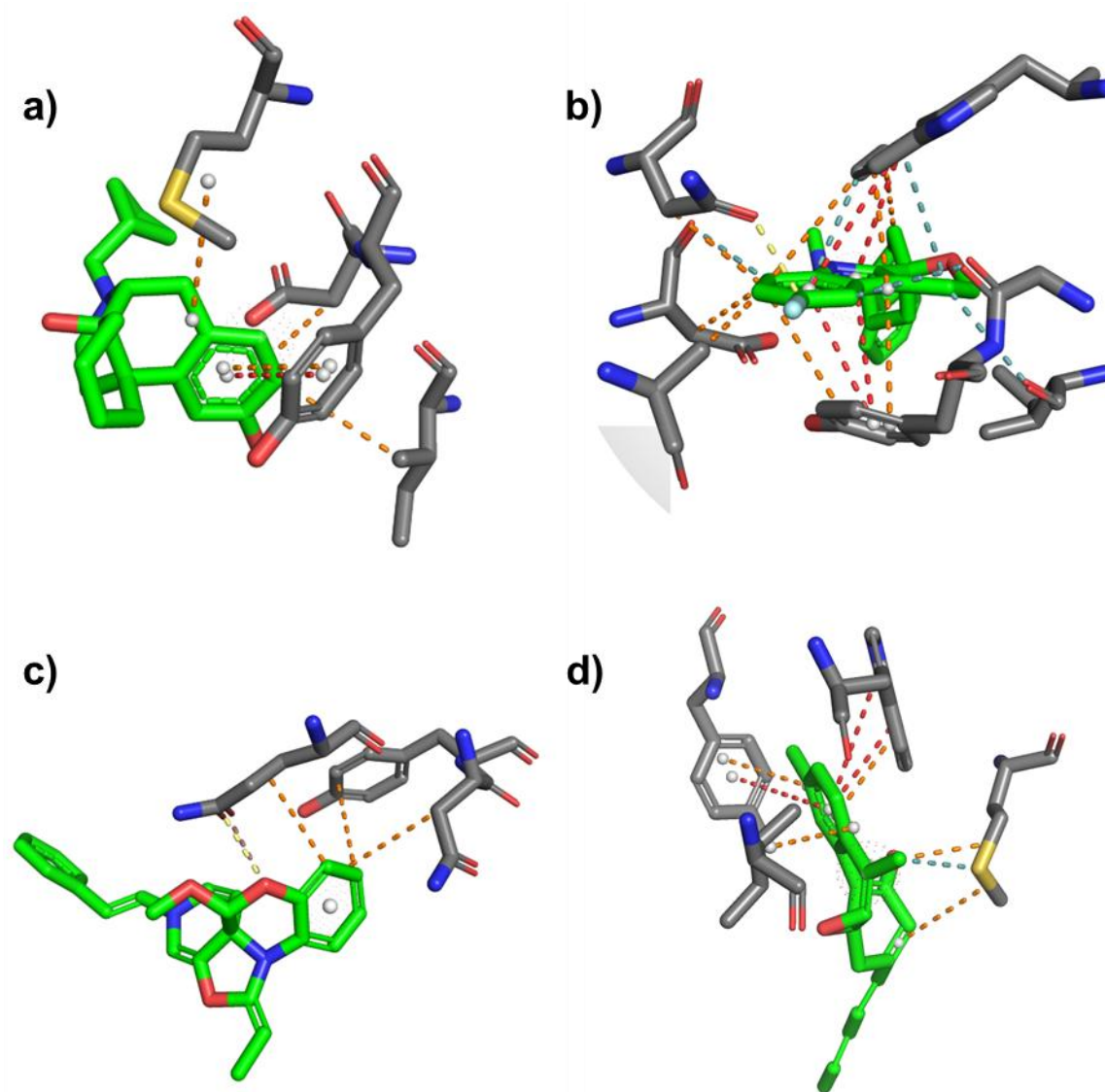


Figura 12 - *Fingerprints* positivos do modelo dbCICA para o receptor opioide μ . **a)** EIFP3878; **b)** EIFP3053; **c)** EIFP2145; **d)** EIFP3338. Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

A Figura 12 apresenta a sobreposição dos ligantes mais ativos no sítio do receptor μ , evidenciando a tendência a se alinharem aos resíduos específicos, estabilizando-se por meio de interações chave. O alinhamento comprova as interações contidas nos *Fingerprints* do modelo, visto que estão presentes na ancoragem dos ligantes com atividade comprovada. A sobreposição dos ligantes na Figura 13, os *Fingerprints* na Figura 12 e o modelo gerado pelo dbCICA na Tabela 2 foram utilizados para formular um mapa farmacofórico capaz de reunir as condições espaciais e estruturais necessárias para a atividade no receptor.

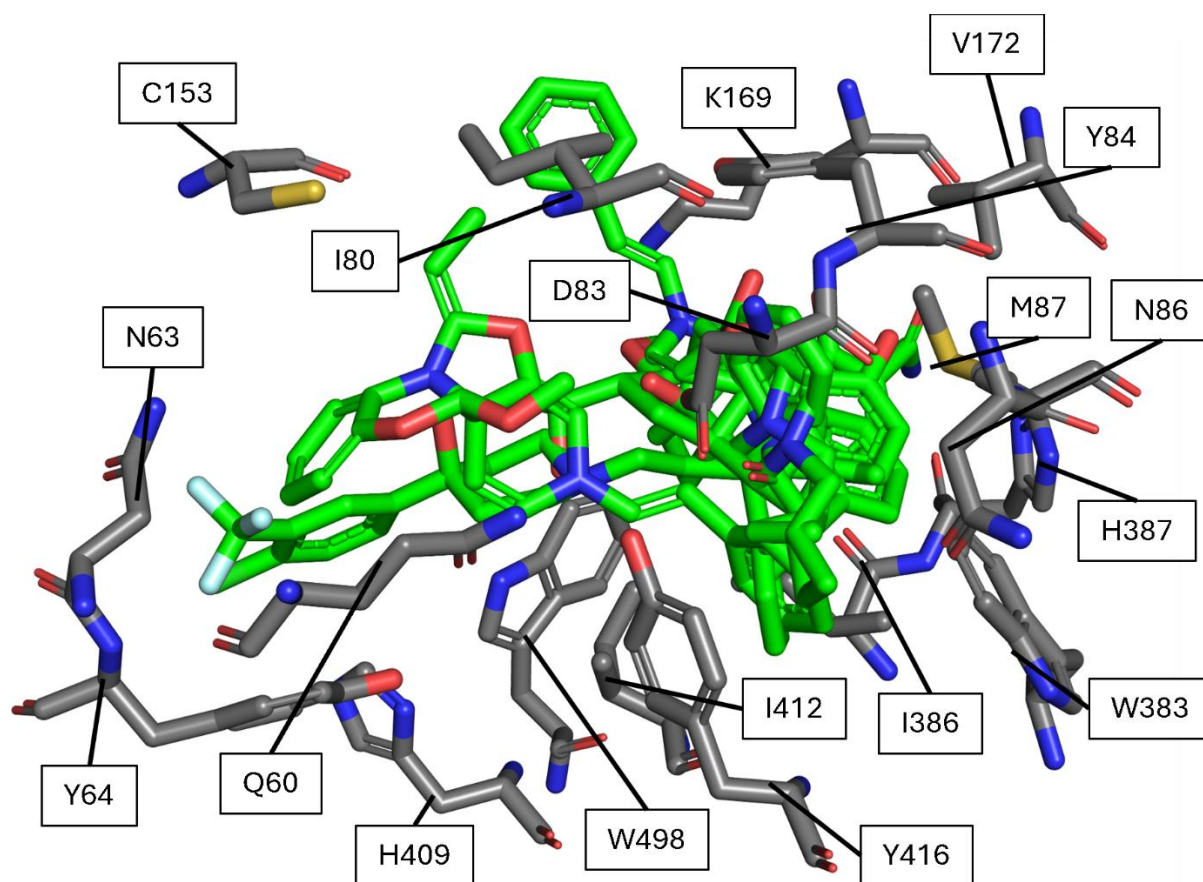


Figura 13 - Sobreposição dos ligantes mais ativos no sítio ativo do receptor μ . Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

Ao observar os *Fingerprints* positivos, pode-se notar a recorrência do contato com o resíduo Y84 na estabilização do ligante no sítio ativo. O modelo evidencia duas esferas e interação com o resíduo, sendo que todos os ligantes com atividade no receptor realizam interação aromática com o anel do resíduo em uma das duas esferas, acima ou abaixo. Observa-se a necessidade de um nitrogênio próximo ou dentro do anel do ligante, para que seja formada uma interação iônica com o resíduo vizinho D83. A interação do ligante com os dois resíduos vizinhos é responsável por grande parte da estabilização do ligante no sítio ativo. Além da necessidade de um anel aromático na estrutura do ligante, também é necessário que sua estrutura tenha volume adequado para se acomodar no sítio ativo, de maneira que seja largo o suficiente para se acomodar entre os resíduos W838 e I412 por meio de interações hidrofóbicas, e uma interação de hidrogênio com o resíduo H387. A última esfera de interação ocorre em circunstâncias específicas, quando o ligante é longo e se projeta

para fora do sítio, sendo a interação ânion- π como resíduo Q60 capaz de estabilizar a sua orientação para que a região de atividade esteja voltada ao sítio.

As esferas de exclusão, em sua grande maioria, representam interações negativas envolvendo o anel aromático do ligante deslocando em direções distintas ao resíduo Y84 e interações hidrofóbicas que deslocam o ligante para fora do espaço de interação com os resíduos D83 e Y84. Também são restritas as interações π - π com o resíduo W838. Os 10 *Fingerprints* de interações negativas para o modelo repetiam muitas dessas interações, de maneira que a sobreposição de duas ou mais esferas foi convertida em apenas uma, a fim de evitar a poluição visual do mapa.

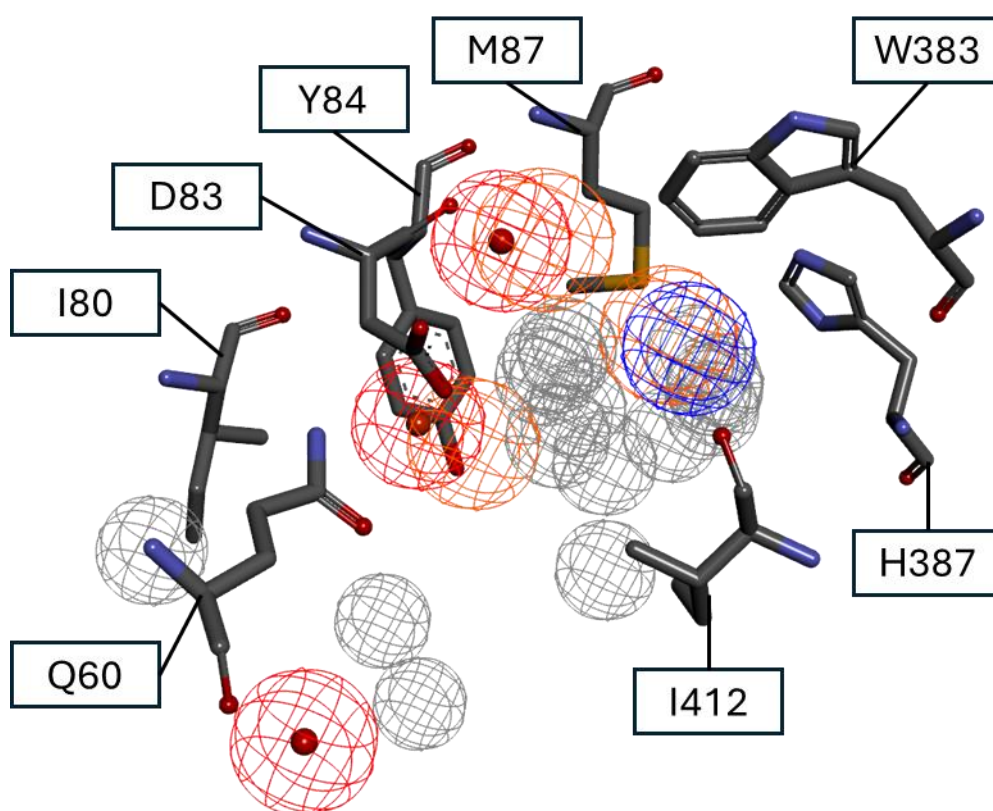


Figura 14 - Mapa farmacofórico do modelo dbCICA para o receptor opioide μ , obtido a partir dos EIFP. Átomos de carbono em cinza, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza. Esferas cinza são esferas de exclusão, esferas laranjas representam características de anéis aromáticos, esferas vermelhas representam interações hidrofóbicas e esferas azuis representam interações iônicas.

5.2 Receptores opioides do subtipo δ

A Figura 15 representa o PDB ID 4N6H, estrutura do receptor δ -opiíide co-cristalizado com o ligante Naltrindole (PDB ID EJ4). De interações relevantes, vale ressaltar: o ciclopropano forma uma ligação π - π com o resíduo Y308 (4,03 Å), o grupo amina protonado interage ionicamente com o resíduo D128 (2,87 Å), o anel indólico forma uma ligação π - π com o resíduo W284 (5,35 Å) e V281 (4,40 Å). A interação de hidrogênio com a HOH1312 (2,88 Å) também é importante.

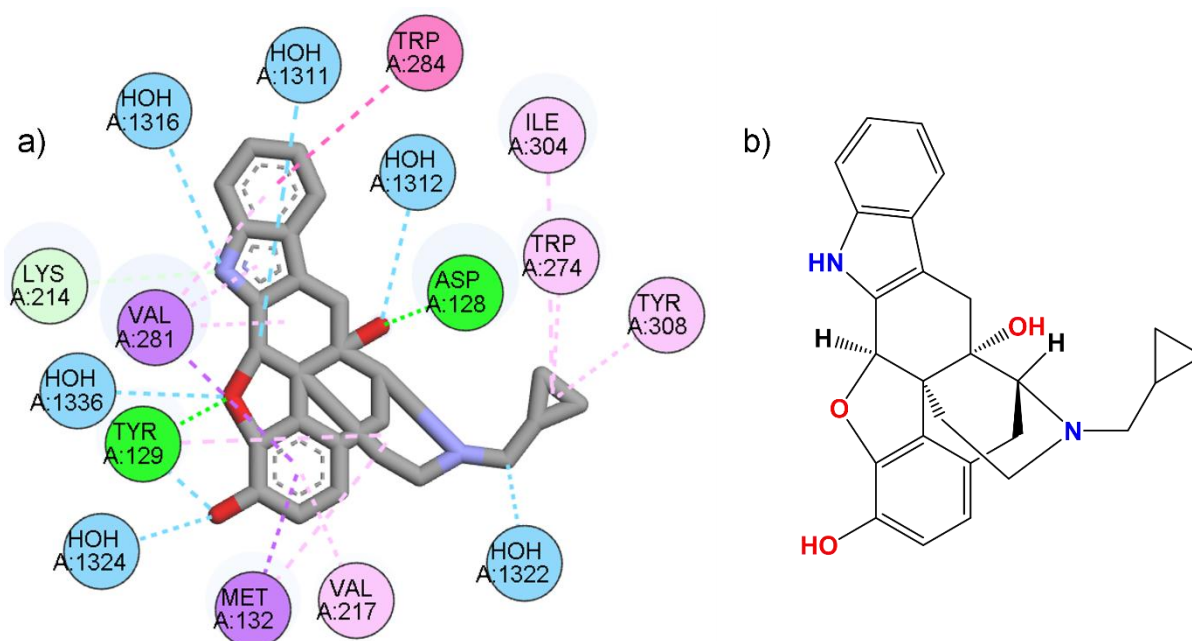


Figura 15 - a) Interações receptor-ligante no 4N6H. **b)** Fórmula estrutural do ligante EJ4, de K_i : 0,510 nM. Átomos de carbono, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

Fonte: **a)** Gerada pelo autor com DSV e **b)** PDB.

A partir dos complexos obtidos pela etapa de validação preliminar da rotina computacional, o melhor resultado foi obtido por meio da função *ChemPLP*, que gerou uma pose de RMSD 0,1308 Å, com sobreposição quase exata, conforme pode ser observado na Figura 16. Além do valor bruto de RMSD, para definir a função de pontuação foi analisada a sobreposição entre o ligante obtido pela redocagem e o ligante original, de maneira a observar se as interações chave foram reproduzidas e se o cálculo por meio da função de pontuação é capaz de deduzir corretamente a posição do ligante no sítio. Dessa maneira, a função *ChemPLP* foi selecionada para ser utilizada na etapa de docagem dos ligantes da literatura, previamente otimizados.

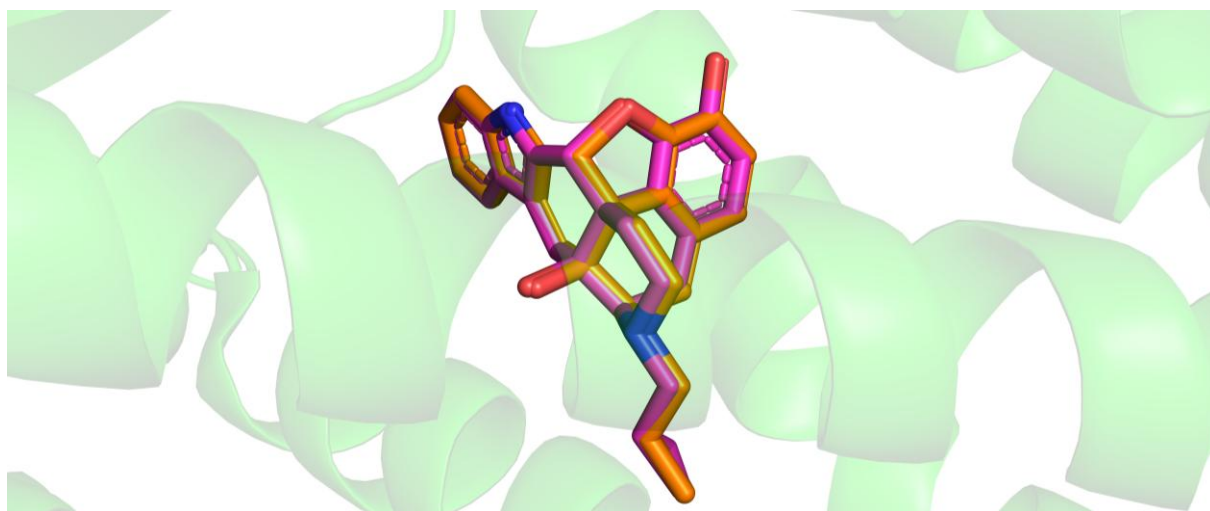


Figura 16 - Sobreposição entre o ligante original da estrutura 4N6H e o melhor resultado da redocagem calculado pela função ChemPLP. Átomos de carbono da pose original do ligante em magenta e da pose obtida pela redocagem em laranja. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

O complexo de melhor pontuação foi selecionado para cada ligante, e suas estruturas foram usadas no LUNA para calcular as interações intermoleculares frente ao sítio ativo do receptor. É válido destacar que a metodologia foi capaz de detectar interações já descritas na literatura, como as interações iônicas com o resíduo D128, renomeado pelo *software* como A/ASP/128, entre os ligantes de maior atividade, como demonstrado na Figura 17. Foram gerados gráficos semelhantes para cada interação, totalizando 31, disponíveis no Apêndice B.

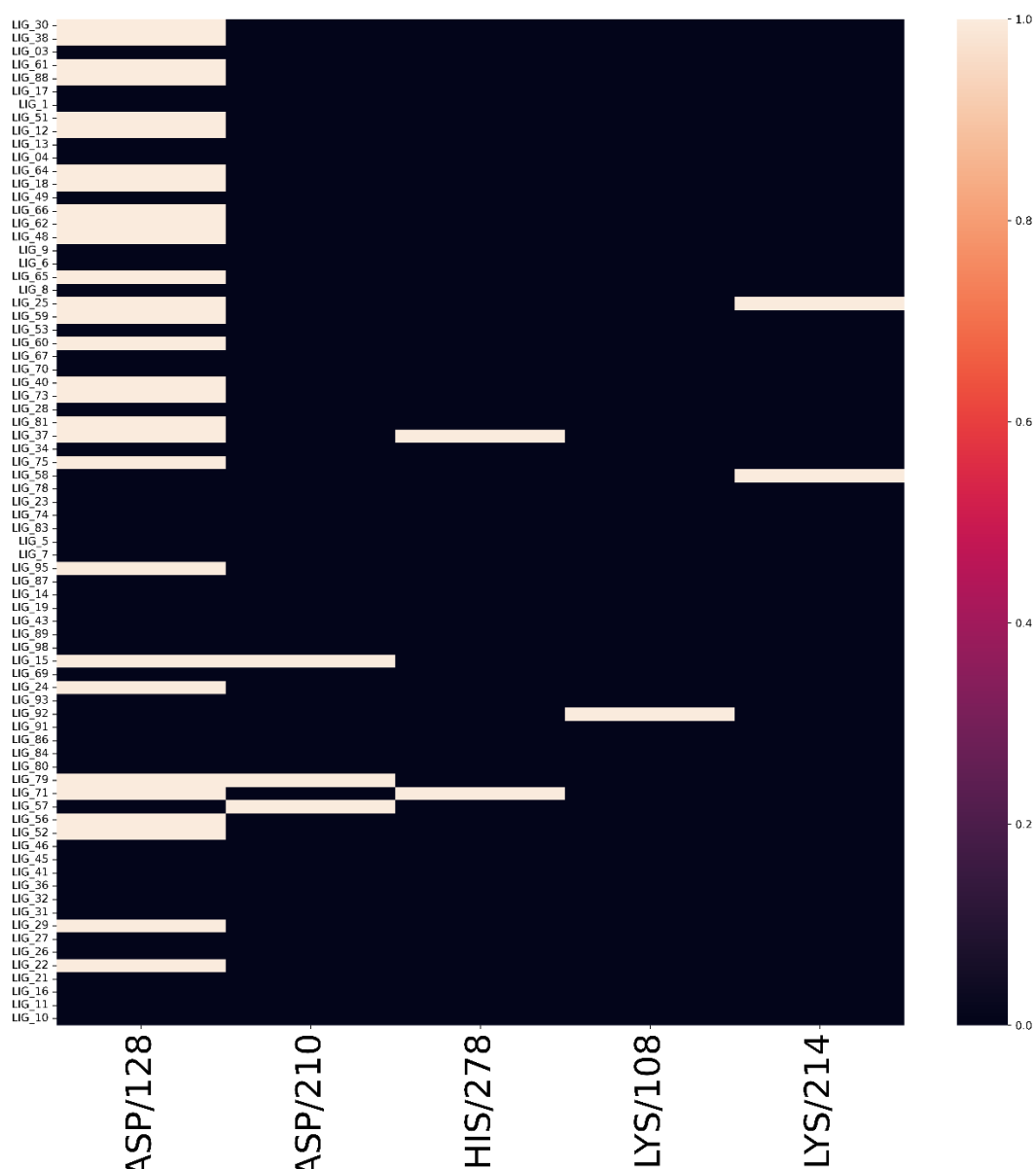


Figura 17 - Interações iônicas nos resíduos do sítio ativo. Interação com o resíduo D128 prevalente entre os ligantes mais ativos.

As interações, transformadas previamente em código binário, foram também utilizadas para o cálculo dos *Fingerprints*. O dbCICA retornou os 10 melhores modelos para cada conjunto de dados, totalizando 40 modelos. No Quadro 7 são expostos os 5 melhores modelos, cuja distribuição entre os 3 tipos de *Fingerprints* é bem homogênea. A eficiência do uso de *Fingerprints* como descritores pode ser evidenciada pela diferença nos valores de *5-fold* r^2 , onde o melhor modelo gerado a partir das interações intermoleculares tem pontuação muito abaixo de todos os modelos gerados a partir dos três descritores baseados em *Fingerprint*. É importante ressaltar que dentro da metodologia dbCICA, os valores de *5-fold* r^2 são usados para

ranquear os modelos, e não como uma propriedade a ser avaliada individualmente. Para melhor compreensão de valores de *5-fold* r^2 , os modelos estão disponíveis do Apêndice B. A seguir, é discutido o melhor modelo obtido a partir das duas aplicações.

Modelo	HIFP	EIFP	FIFP	HIFP	EIFP	...	Contatos
<i>5-fold</i> r^2	0,85057	0,82506	0,81739	0,74431	0,74081	...	0,62944

Quadro 7 - Melhores modelos gerados pelo dbCICA para o receptor opioide δ .

O melhor modelo obtido a partir dos contatos retornou um valor de *5-fold* r^2 de 0,62944, o que indica que o modelo é capaz de explicar cerca de 63% dos valores de K_i . É esperado que o modelo não tenha resultado muito elevado, visto que correlaciona um descritor simples, de contatos positivos e negativos, com a bioatividade, uma propriedade complexa. O Quadro 8 sumariza os contatos relevantes no modelo, apresentando-os conforme o seu resíduo de aminoácido e o peso atribuído.

Resíduo	POSITIVOS				NEGATIVOS									
	LEU300	GLY307	LYS108	MET132	SER45	THR213	ASP128	HIS278	ASP210	TYR308	PHE218	TYR129	MET199	MET132
Interação intermolecular	Weak hydrogen bond	Weak hydrogen bond	Hydrogen bond	Cation-nucleophile	Weak hydrogen bond	Hydrogen bond	Repulsive	Aydrogen bond	Ionic	Cation-nucleophile	Hydrophobic	Cation-nucleophile	Hydrophobic	Hydrophobic
Peso	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Quadro 8 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide δ , obtido a partir dos contatos.

Conforme analisado, todos os modelos obtidos a partir de descritores baseados em *Fingerprints* tiveram melhor desempenho do que os baseados em contatos. Dentre eles, o destaque é dado aos HIFP, cujo modelo recebeu maior valor de *5-fold*

r^2 . A Tabela 3 destaca os *Fingerprints* relevantes no modelo de melhor pontuação e os pesos a eles atribuídos.

Tabela 3 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide δ , obtido a partir do HIFP.

Código HIFP	POSITIVOS				NEGATIVOS									
	1379	2559	1255	4068	3228	2416	3174	2235	245	1889	420	1281	2483	388
Peso	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Código do EIFP e seu respectivo peso, atribuído pelo modelo.

A análise feita puramente a partir do valor de *5-fold* r^2 é que o modelo gerado a partir do HIFP é o que melhor descreve a correlação entre as interações dentro do sítio e a bioatividade do ligante frente ao receptor, sendo capaz de descrever cerca de 85% da interação. Porém, para que possa ser afirmado que a metodologia baseada em *Fingerprints* é mais eficiente na correlação, é necessário comparar os dois modelos e identificar quais interações os HIFP representa. As interações indicadas pelos *shells* do melhor modelo englobam não apenas os contatos do modelo gerado a partir das interações, mas outros contatos valiosos para a construção de um mapa farmacofórico mais robusto. A seguir são comparados os contatos obtidos pelo modelo do Quadro 8 e os *Fingerprints* obtido pelo modelo da Tabela 3

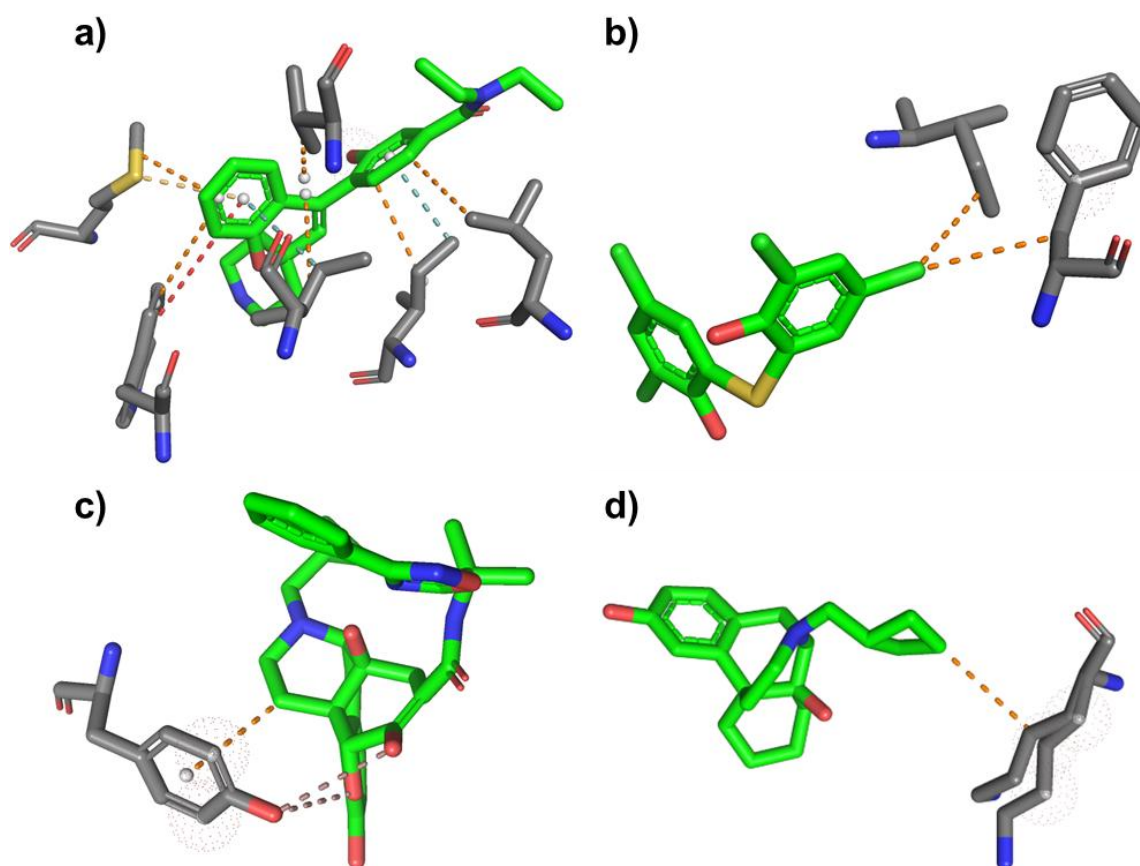


Figura 18 - Fingerprints positivos do modelo dbCICA para o receptor opioide δ . **a)** HIFP1379; **b)** HIFP2559; **c)** HIFP1255; **d)** HIFP4068. Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

A Figura 18 apresenta a sobreposição dos ligantes mais ativos no sítio do receptor δ , evidenciando a tendência a se alinharem aos resíduos específicos, estabilizando-se por meio de interações chave. O alinhamento comprova as interações contidas nos *Fingerprints* do modelo, visto que estão presentes na ancoragem dos ligantes com atividade comprovada. A sobreposição dos ligantes na Figura 18, os *Fingerprints* na Figura 17 e o modelo gerado pelo dbCICA na Tabela 3 foram utilizados para formular um mapa farmacofórico capaz de reunir as condições espaciais e estruturais necessárias para a atividade no receptor.

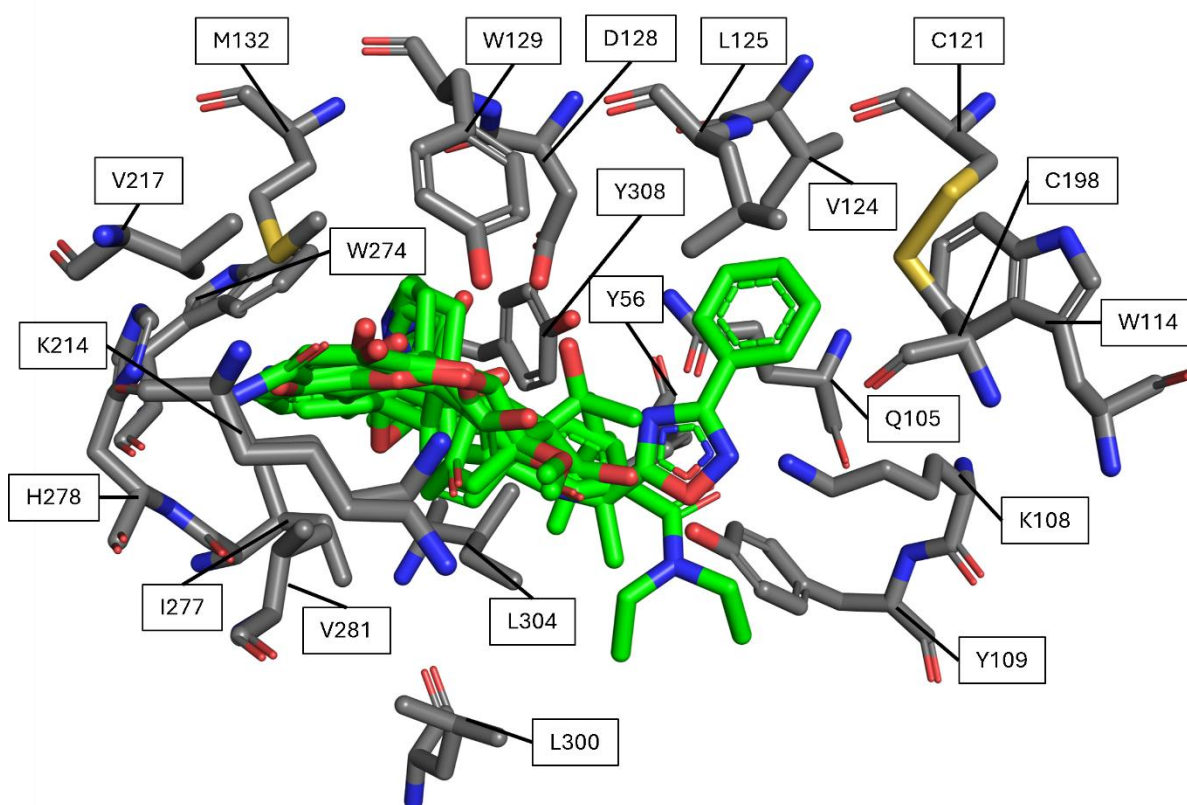


Figura 19 - Sobreposição dos ligantes no sítio ativo do receptor opioide δ . Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

Ao observar os *Fingerprints* positivos, pode-se notar a recorrência do contato com o resíduo Y129 na estabilização do ligante no sítio ativo. O modelo evidencia interação aromática com o resíduo, com a necessidade de um nitrogênio próximo ou dentro do anel do ligante, para que seja formada uma interação iônica com o resíduo vizinho D128. A interação do ligante com os dois resíduos vizinhos é responsável por grande parte da estabilização do ligante no sítio ativo. Ao contrário do receptor π , o sítio tivo do receptor δ contém um espaço menor, com interações mais aproximadas. A estabilização na interação com o resíduo W274 por meio da presença de um anel aromático ou grupo positivamente ionizado. Para o alinhamento do ligante no sítio ativo, interações hidrofóbicas estabilizam o ligante entre os resíduos L300 e I282, permitindo maior interação com os resíduos de interesse D128 e Y129.

As esferas de exclusão, em sua grande maioria, representam interações negativas envolvendo o anel aromático do ligante deslocando em direções distintas

ao resíduo Y129 e interações hidrofóbicas que deslocam o ligante para fora do espaço de interação com os resíduos D128 e Y129. Também são restritas as interações π - π com o resíduo W274. Os 10 *Fingerprints* de interações negativas para o modelo repetiam muitas dessas interações, de maneira que a sobreposição de duas ou mais esferas foi convertida em apenas uma, a fim de evitar a poluição visual do mapa.

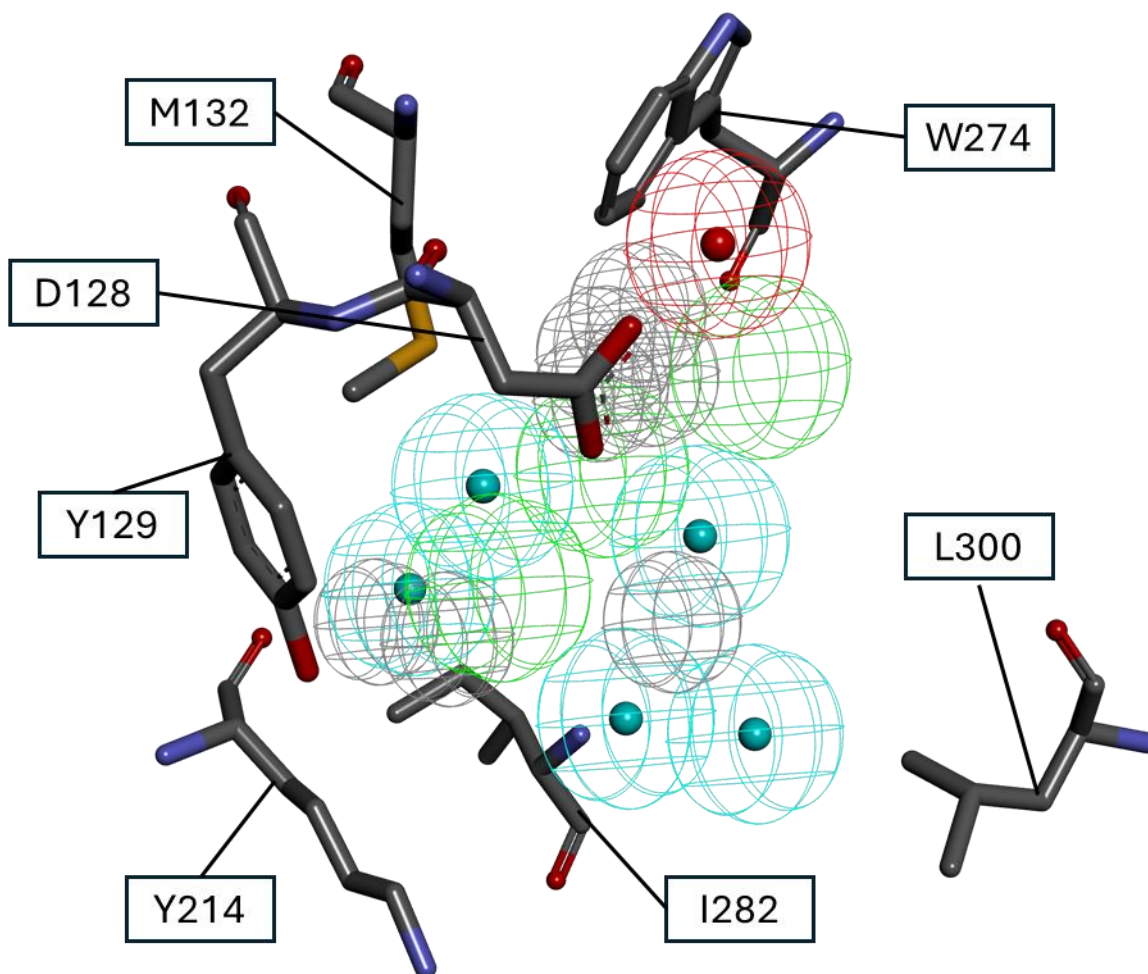


Figura 20 - Mapa farmacofórico do modelo dbCICA para o receptor opioide δ , obtido a partir dos HIFP. Átomos de carbono do receptor em cinza, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

Esferas cinzas representam esferas de exclusão, esferas azuis interações hidrofóbicas, esferas verdes interações de anéis aromáticos e esferas vermelhas doador de hidrogênio.

5.3 Receptores opioides do subtipo κ

A Figura 21 representa o PDB ID 4DJH, estrutura do receptor δ -opiíide co-cristalizado com o ligante Maraviroc (PDB ID JDC). De interações relevantes, vale ressaltar: os grupos amino interagem ionicamente com o resíduo D138 (2,65 Å; 2,34 Å; 2,31 Å), o anel aromático forma interações de hidrogênio com o resíduo Y139 (3,87 Å) e H291 (5,81 Å). A interação de hidrogênio com a HOH1314 (2,83 Å) também é importante.

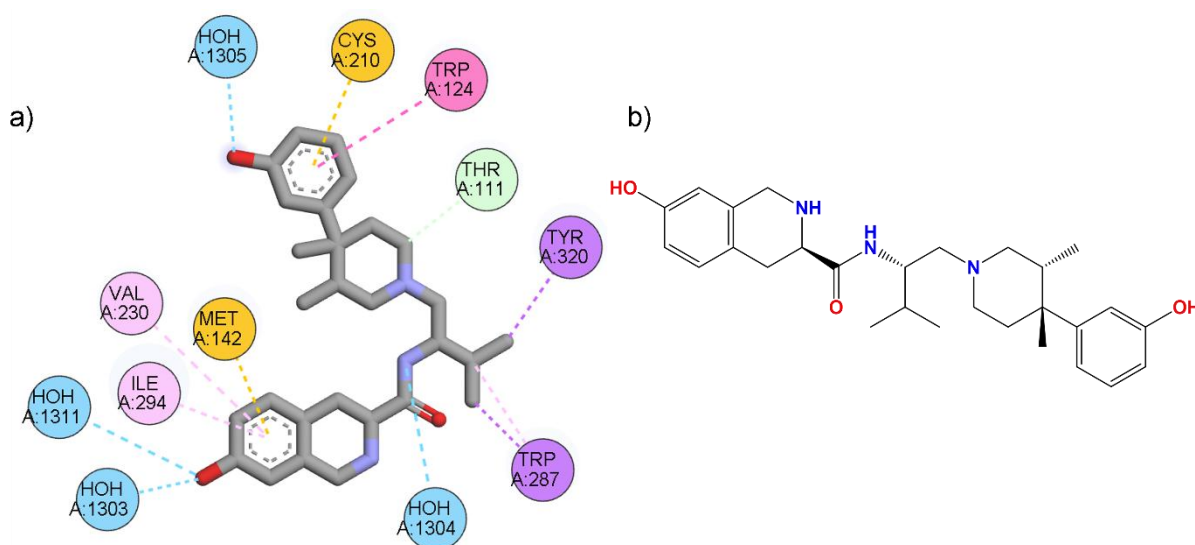


Figura 21 - a) Interação receptor-ligante na estrutura 4DJH. **b)** Fórmula estrutural do ligante JDC, de K_i : 0,500 nM.

Fonte: **a)** Gerada pelo autor com DSV e **b)** PDB.

A partir dos complexos obtidos pela etapa de validação preliminar da rotina computacional, o melhor resultado foi obtido por meio da função *ChemPLP*, que gerou uma pose de RMSD 0,3907 Å, conforme pode ser observado na Figura 22. Além do valor bruto de RMSD, para definir a função de pontuação foi analisada a sobreposição entre o ligante obtido pela redocagem e o ligante original, de maneira a observar se as interações chave foram reproduzidas e se o cálculo por meio da função de pontuação é capaz de deduzir corretamente a posição do ligante no sítio. Dessa maneira, a função *ChemPLP* foi selecionada para ser utilizada na etapa de docagem dos ligantes da literatura, previamente otimizados.

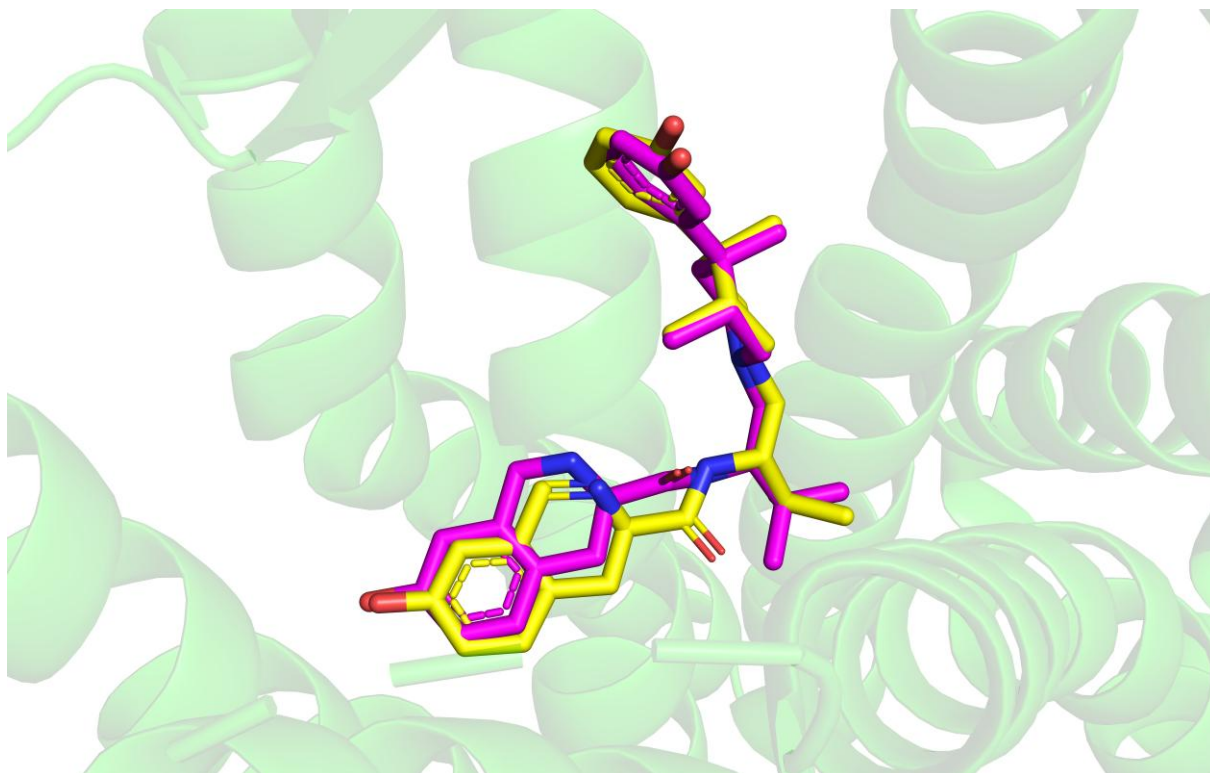


Figura 22 - Sobreposição entre o ligante original da estrutura 4DJH e o melhor resultado da redocagem calculado pela função ChemPLP. Átomos de carbono da pose original do ligante em magenta e da pose obtida pela redocagem em amarelo. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

O complexo de melhor pontuação foi selecionado para cada ligante, e suas estruturas foram usadas no LUNA para calcular as interações intermoleculares frente ao sítio ativo do receptor. É válido destacar que a metodologia foi capaz de detectar interações já descritas na literatura, e a interação com o resíduo D138, muito importante para a atividade nos outros subtipos, não está diretamente relacionada a atividade no subtipo kappa, sendo menos recorrente entre os ligantes mais ativos. Foram gerados gráficos semelhantes para cada interação, totalizando 31, disponíveis no Apêndice B.

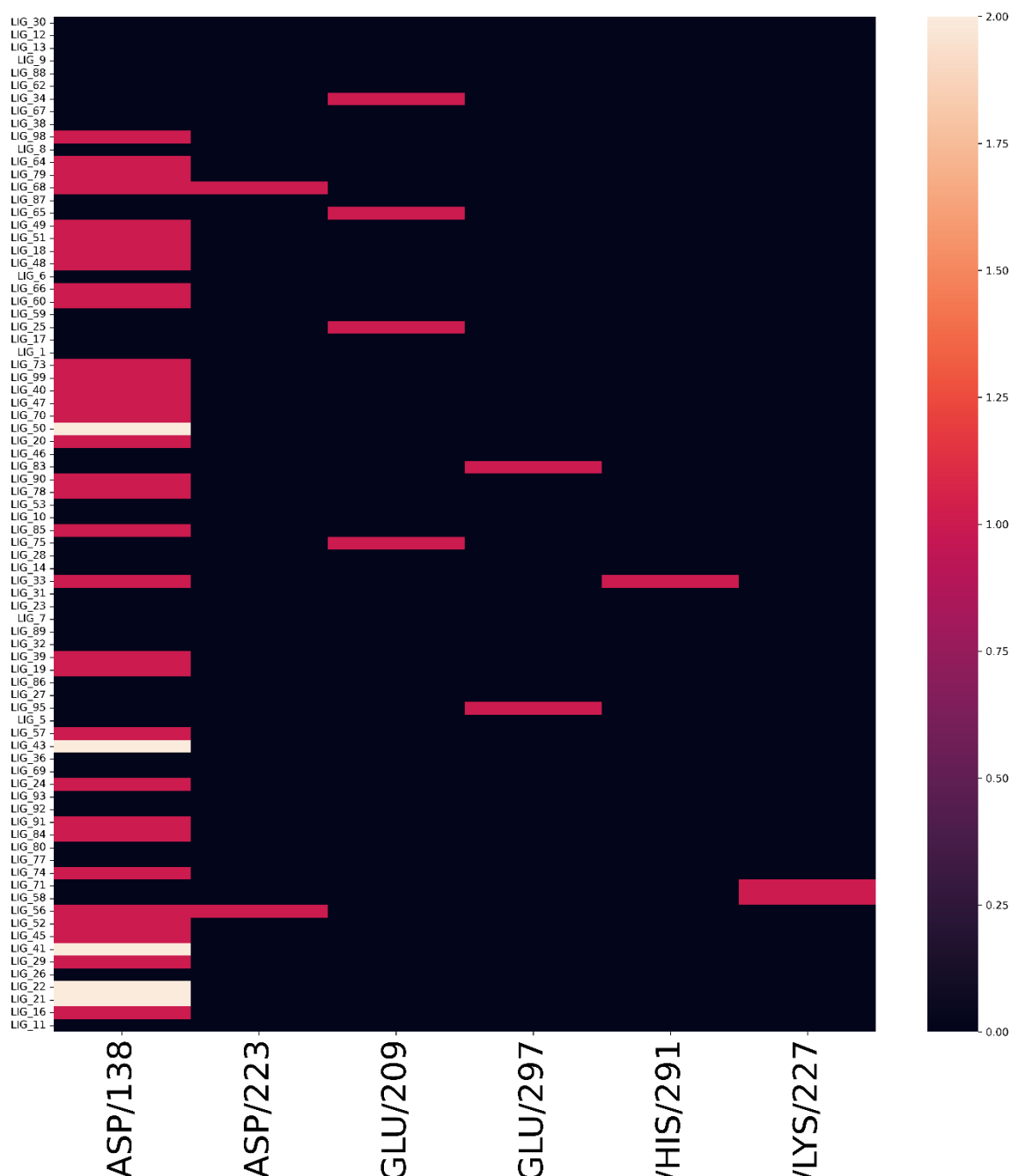


Figura 23 - Interações iônicas nos resíduos do sítio ativo. Interação com o resíduo D138 não é prevalente entre os ligantes mais ativos.

As interações, transformadas previamente em código binário, foram também utilizadas para o cálculo dos *Fingerprints*. O dbCICA retornou os 10 melhores modelos para cada conjunto de dados, totalizando 40 modelos. No Quadro 5 são expostos os 5 melhores modelos, evidenciando a importância dos EIFP, que compõem 60% dos resultados. A eficiência do uso de Fingerprints como descritores pode ser evidenciada pela diferença nos valores de *5-fold* r^2 , onde o melhor modelo gerado a partir das interações intermoleculares tem pontuação muito abaixo de todos os modelos gerados

Dentre eles, o destaque é dado aos EIFP, cujos modelos receberam valores maiores de *5-fold* r^2 . A Tabela 5 destaca os *Fingerprints* relevantes no modelo de melhor pontuação e os pesos a eles atribuídos.

Tabela 4 - Modelo de melhor pontuação do dbCICA para o receptor opioide κ , obtido a partir do EIFP.

Código EIFP	POSITIVOS					NEGATIVOS								
	2505	2673	3381	3202	2595	850	2161	967	1061	3419	3767	135	492	601
Peso	2	1	2	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Código do EIFP e seu respectivo peso, atribuído pelo modelo.

A análise feita puramente a partir do valor de *5-fold* r^2 é que o modelo gerado a partir do EIFP é o que melhor descreve a correlação entre as interações dentro do sítio e a bioatividade do ligante frente ao receptor. Porém, para que possa ser afirmado que a metodologia baseada em *Fingerprints* é mais eficiente na correlação, é necessário comparar os dois modelos e identificar quais interações os EIFP representa. As interações indicadas pelos *shells* do melhor modelo englobam não apenas os contatos do modelo gerado a partir das interações, mas outros contatos valiosos para a construção de um mapa farmacofórico mais robusto. A seguir são comparados os contatos obtidos pelo modelo do Quadro 6 e os *Fingerprints* obtido pelo modelo da Tabela 5.

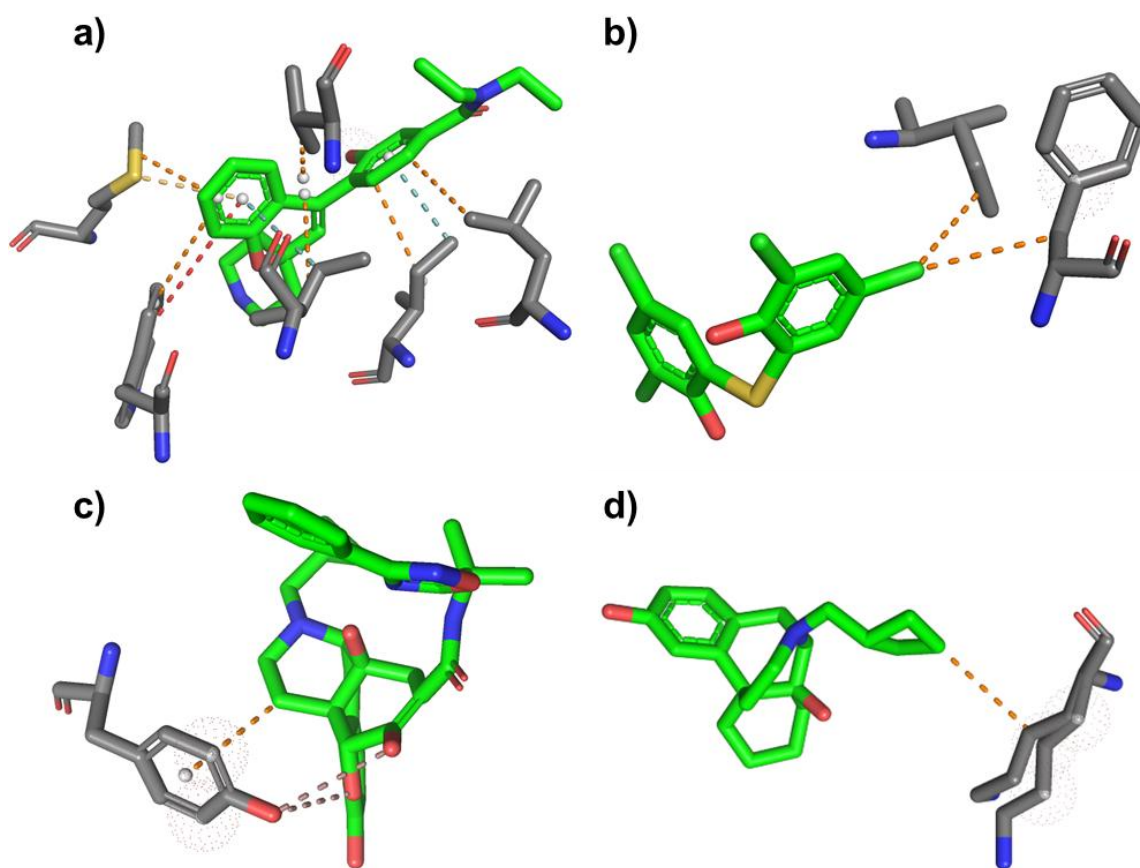


Figura 24 - Fingerprints positivos do modelo dbCICA para o receptor opioide κ . a) HIFP2505; b) HIFP2673; c) HIFP3381; d) HIFP3202. Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

A Figura 25 apresenta a sobreposição dos ligantes mais ativos no sítio do receptor κ , evidenciando a tendência a se alinharem aos resíduos específicos, estabilizando-se por meio de interações chave. O alinhamento comprova as interações contidas nos *Fingerprints* do modelo, visto que estão presentes na ancoragem dos ligantes com atividade comprovada. A sobreposição dos ligantes na Figura 25, os *Fingerprints* na Figura 24 e o modelo gerado pelo dbCICA na Tabela 4 foram utilizados para formular um mapa farmacofórico capaz de reunir as condições espaciais e estruturais necessárias para a atividade no receptor.

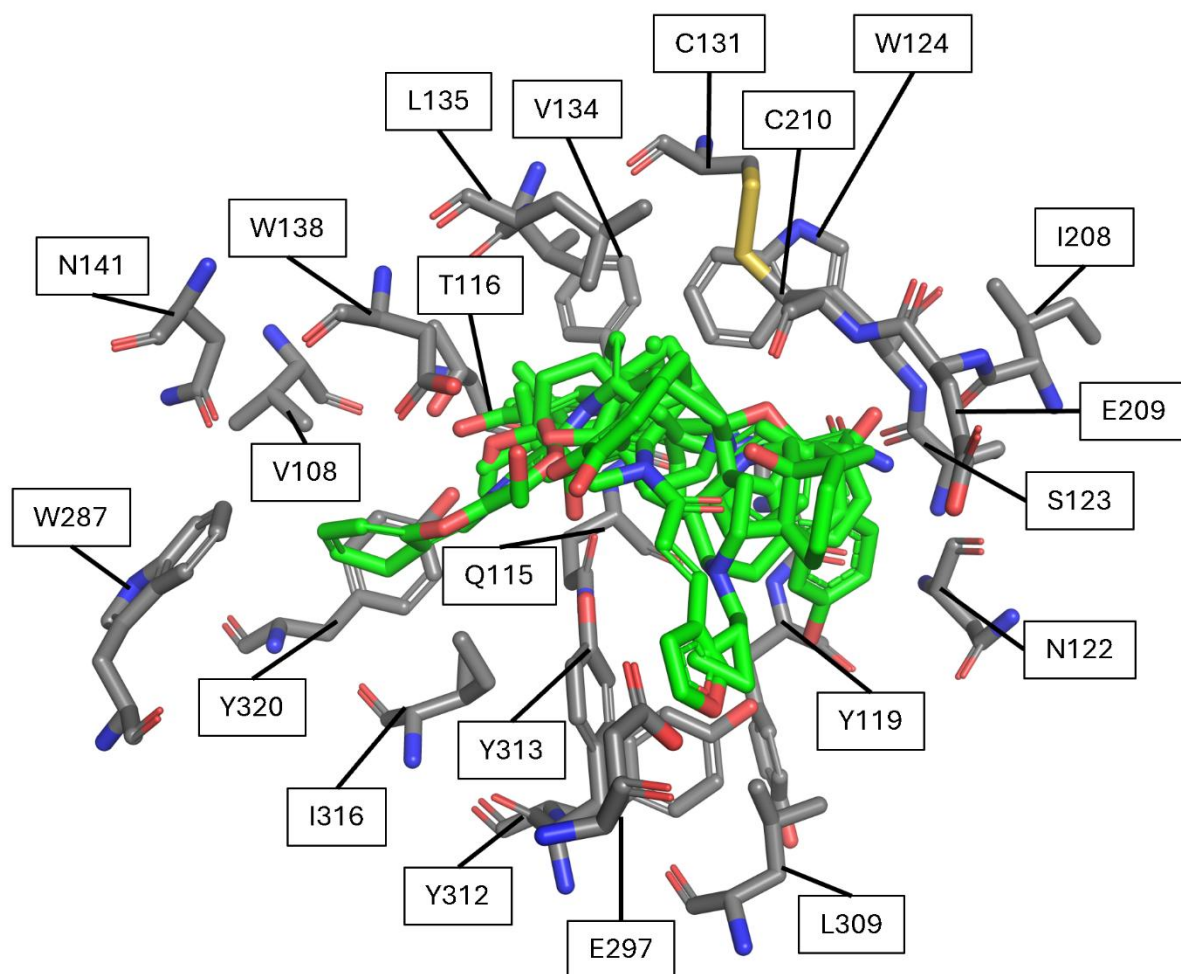


Figura 25 - Sobreposição dos ligantes no sítio ativo do receptor opioide κ . Átomos de carbono do receptor em cinza e dos ligantes em verde. Átomos de nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

Ao observar os *Fingerprints* positivos, pode-se notar a recorrência do contato com o resíduo Y139 na estabilização do ligante no sítio ativo, mesmo que sua presença não ocorra entre os ligante mais ativos. A interação com o resíduo D138 ao lado também não parece afetar a atividade das moléculas com grande intensidade. A estabilização do ligante no sítio ativo depende da interação com outro resíduo de tirosina, dessa vez o Y320, por meio de anéis aromáticos. As interações hidrofóbicas ao redor do espaço de interação aromática grante o encaixe eficiente do ligante no sítio, com recorrência de contatos no reídulo M132.

As esferas de exclusão, em sua grande maioria, representam interações negativas envolvendo o anel aromático do ligante deslocando em direções distintas ao resíduo Y320 e interações hidrofóbicas que deslocam o ligante para fora do espaço de interação com os resíduos Y139 e Y320. Também são restritas as interações π - π

com o resíduo W287. Os 10 *Fingerprints* de interações negativas para o modelo repetiam muitas dessas interações, de maneira que a sobreposição de duas ou mais esferas foi convertida em apenas uma, a fim de evitar a poluição visual do mapa.

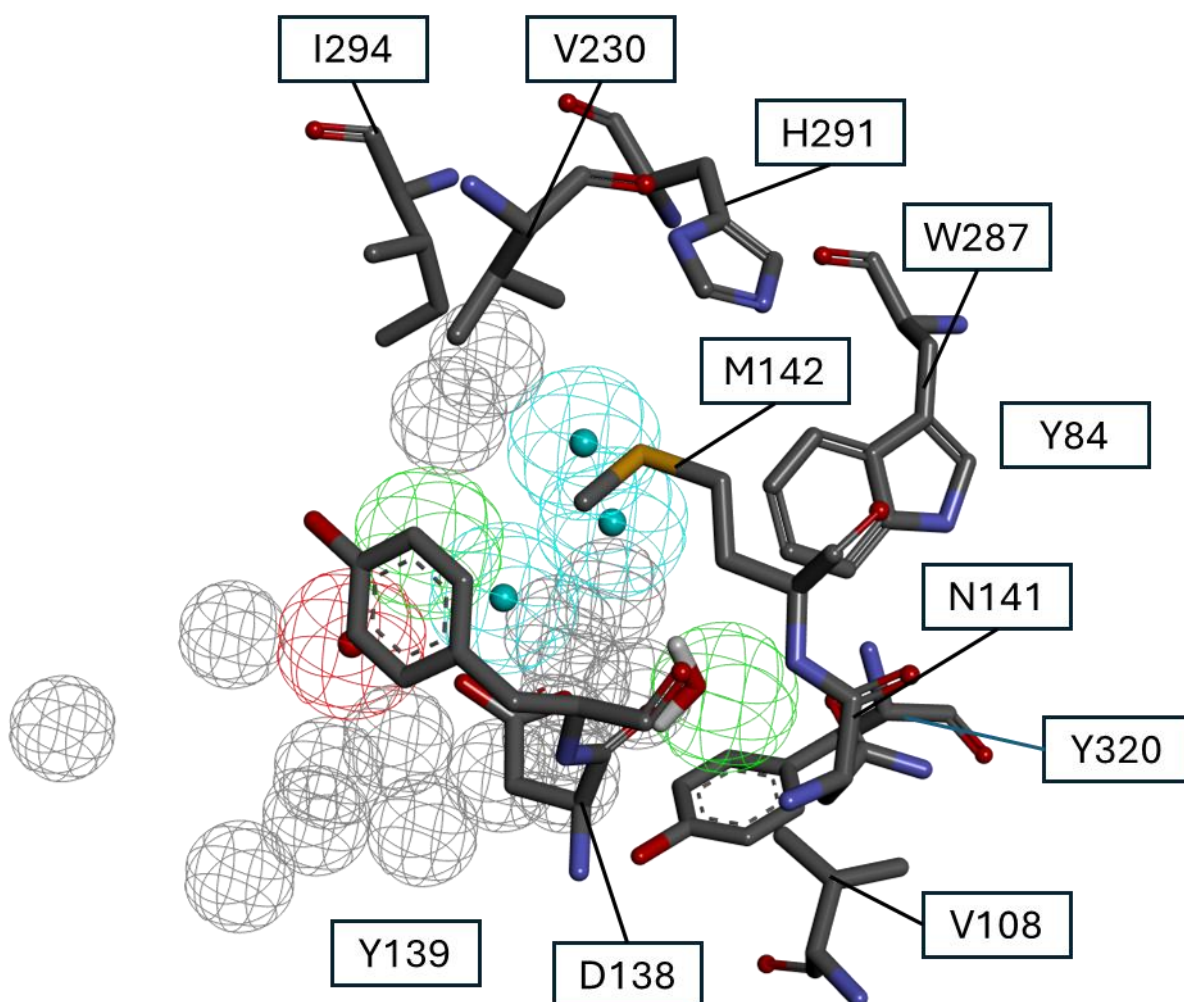


Figura 26 - Mapa farmacofórico do modelo dbCICA para o receptor opioide κ , obtido a partir dos HIFP. Átomos de carbono, nitrogênio em azul, oxigênio em vermelho, enxofre em amarelo e hidrogênios omitidos para melhor clareza.

Esferas cinzas representam esferas de exclusão, esferas azuis interações hidrofóbicas, esferas verdes interações de anéis aromáticos e esferas vermelhas doador de hidrogênio.

6 CONCLUSÃO

A metodologia de aplicação dos *Fingerprints* como base de dados ao dbCICA retorna valores mais satisfatórios de explicação da correlação estrutura e atividade biológica, sendo possível afirmar que é mais efetiva e precisa na correlação. Apesar

da semelhança estrutural, as diferenças de resíduos e posição dos resíduos conservados explica a diferença de atividade biológica de um mesmo ligante quando ancorado nos três receptores. Todos os três sítios demonstram a necessidade de um anel aromático na estrutura do ligante, que é responsável, junto a uma área de interação hidrofóbica, por estabilizar o ligante na sequência de resíduos DY.

Para o receptor μ é importante a interação com os resíduos D147 e Y148; para o receptor δ é importante a interação com os resíduos D128 e Y129; e para o receptor κ é importante a interação com o resíduo Y139. Os resultados semelhantes são esperados, visto que as estruturas dos receptores são semelhantes e o conjunto de ligantes para treinamento dos modelos é o mesmo. Porém, resultados distintos de atividade de um mesmo ligante frente aos alvos podem ser explicados pelas interações específicas de cada sítio ativo, como o menor volume para os receptores δ e κ e a necessidade de ligantes maiores para estabilização no dítio do receptor μ . A semelhança maior entre os receptores de subtipos δ e μ , com a sobreposição de resíduos-chave mais alinhada, pode explicar a mesma interação entre o ligante e cada sítio ativo. Também é importante destacar o papel de resíduos específicos de cada receptor, que são de fundamental importância para a atividade da biomolécula; os resíduos W838, I412 e H387 para o receptor μ ; os resíduos W274, L300 e I282 para o receptor δ e os resíduos Y320 e M132 para o receptor κ .

REFERÊNCIAS

- [1] GRISWOLD, M. G. et al. Alcohol use and burden for 195 countries and territories, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. **The Lancet**, v. 392, n. 10152, p. 1015–1035, set. 2018.
- [2] BABOR, T. F. Alcohol: no ordinary commodity. Em: **Alcohol: no ordinary commodity**. 12. ed. [s.l.] Addiction, 2022. v. 117p. 3024–3036.
- [3] CARVALHO, A. F. et al. Alcohol use disorders. **The Lancet**, v. 394, n. 10200, p. 781–792, ago. 2019.
- [4] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global status report on alcohol and health and treatment of substance use disorders**. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240096745>>.
- [5] DOMI, A. et al. Targeting the Opioid Receptors: A Promising Therapeutic Avenue for Treatment in “Heavy Drinking Smokers”. **Alcohol and Alcoholism**, v. 56, n. 2, p. 127–138, 24 fev. 2021.
- [6] OSWALD, L. M.; WAND, G. S. Opioids and alcoholism. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 339–358, abr. 2004.
- [7] JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.
- [8] TAHA, M. O. et al. Docking-Based Comparative Intermolecular Contacts Analysis as New 3-D QSAR Concept for Validating Docking Studies and in Silico Screening: NMT and GP Inhibitors as Case Studies. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 3, p. 647–669, 28 mar. 2011.
- [9] FASSIO, A. V. et al. Prioritizing Virtual Screening with Interpretable Interaction Fingerprints. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 62, n. 18, p. 4300–4318, 26 set. 2022.
- [10] MCGOVERN, P. E. et al. Fermented beverages of pre- and proto-historic China. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 51, p. 17593–17598, 21 dez. 2004.
- [11] VALLEE, B. L. Alcohol in human history. Em: JANSSON, B. et al. (Eds.). **Toward a Molecular Basis of Alcohol Use and Abuse**. Basel: Birkhäuser Basel, 1994. p. 1–8.
- [12] WOLF, A.; BRAY, G. A.; POPKIN, B. M. A short history of beverages and how our body treats them. **Obesity Reviews**, v. 9, n. 2, p. 151–164, mar. 2008.
- [13] MIRON, J. **The Effect of Alcohol Prohibition on Alcohol Consumption**. Cambridge, MA: National Bureau of Economic Research, maio 1999. Disponível em: <<http://www.nber.org/papers/w7130.pdf>>. Acesso em: 9 dez. 2025.

- [14] SAUNDERS, J. B. et al. Alcohol Use Disorders in ICD-11: Past, Present, and Future. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 43, n. 8, p. 1617–1631, ago. 2019.
- [15] WORLD HEALTH ORGANIZATION. **6C40 Disorders due to use of alcohol**. Disponível em: <<https://icd.who.int/browse/2025-01/mms/en#1676588433>>. Acesso em: 8 dez. 2025.
- [16] KOOB, G. F. Drug Addiction: Hyperkatifeia/Negative Reinforcement as a Framework for Medications Development. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 163–201, jan. 2021.
- [17] NATIONAL INSTITUTE ON ALCOHOL ABUSE AND ALCOHOLISM. **Understanding Alcohol Drinking Patterns**. Disponível em: <<https://www.niaaa.nih.gov/alcohols-effects-health/alcohol-drinking-patterns>>. Acesso em: 9 jul. 2025.
- [18] EDENBERG, H. J. The genetics of alcohol metabolism: role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase variants. **Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 30, n. 1, p. 5–13, 2007.
- [19] QUERTEMONT, E.; DIDONE, V. Role of acetaldehyde in mediating the pharmacological and behavioral effects of alcohol. **Alcohol Research & Health: The Journal of the National Institute on Alcohol Abuse and Alcoholism**, v. 29, n. 4, p. 258–265, 2006.
- [20] SHIELD, K. et al. National, regional, and global statistics on alcohol consumption and associated burden of disease 2000–20: a modelling study and comparative risk assessment. **The Lancet Public Health**, v. 10, n. 9, p. e751–e761, set. 2025.
- [21] OECD. **Health at a Glance 2025: OECD Indicators**. [s.l.] OECD Publishing, 2025.
- [22] KRANZLER, H. R.; SOYKA, M. Diagnosis and Pharmacotherapy of Alcohol Use Disorder: A Review. **JAMA**, v. 320, n. 8, p. 815, 28 ago. 2018.
- [23] BRYAZKA, D. et al. Population-level risks of alcohol consumption by amount, geography, age, sex, and year: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2020. **The Lancet**, v. 400, n. 10347, p. 185–235, jul. 2022.
- [24] BURNETTE, E. M. et al. Novel Agents for the Pharmacological Treatment of Alcohol Use Disorder. **Drugs**, v. 82, n. 3, p. 251–274, 1 fev. 2022.
- [25] JONES, D. et al. Health information, messaging and warnings on alcohol packaging: a focus group study with young adult drinkers in Scotland. **Addiction Research & Theory**, v. 29, n. 6, p. 469–478, 2 nov. 2021.
- [26] MACKILLOP, J. et al. Hazardous drinking and alcohol use disorders. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 8, n. 1, 22 dez. 2022.

- [27] WONG, D. V. T. et al. **ÁLCOOL E NEURODESENVOLVIMENTO: ASPECTOS GENÉTICOS E FARMACOLÓGICOS. Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 1, 25 ago. 2008.
- [28] LOBO, I. A.; HARRIS, R. A. GABAA receptors and alcohol. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 90, n. 1, p. 90–94, jul. 2008.
- [29] DHARAVATH, R. N. et al. GABAergic signaling in alcohol use disorder and withdrawal: pathological involvement and therapeutic potential. **Frontiers in Neural Circuits**, v. 17, 20 out. 2023.
- [30] PATKAR, O. L. et al. The effect of varenicline on binge-like ethanol consumption in mice is $\beta 4$ nicotinic acetylcholine receptor-independent. **Neuroscience Letters**, v. 633, p. 235–239, out. 2016.
- [31] LOVINGER, D. M. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: past, present and future. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 356, n. 3, p. 267–282, 22 ago. 1997.
- [32] WANG, Y. et al. Structures of the entire human opioid receptor family. **Cell**, v. 186, n. 2, p. 413–427.e17, jan. 2023.
- [33] PIERCE, K. L.; PREMONT, R. T.; LEFKOWITZ, R. J. Seven-transmembrane receptors. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 639–650, set. 2002.
- [34] CHENG, T. et al. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery: a Problem-Centric Review. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 1, p. 133–141, mar. 2012.
- [35] WANG, Z. et al. Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n. 18, p. 12964–12975, 2016.
- [36] BATISTA, V. S. **Estudos computacionais envolvendo os receptores nicotínicos de acetilcolina dos subtipos $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 3\beta 4$ e $\alpha 7$ através da análise comparativa de contatos intermoleculares baseada em ancoragem molecular (dbCICA)**. Araraquara: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 20 dez. 2022.
- [37] ANDERSON, A. C. The Process of Structure-Based Drug Design. **Chemistry & Biology**, v. 10, n. 9, p. 787–797, set. 2003.
- [38] FERREIRA, L. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 22 jul. 2015.
- [39] LIU, J.; WANG, R. Classification of Current Scoring Functions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 3, p. 475–482, 23 mar. 2015.
- [40] BROOKS, B. R. et al. CHARMM: A program for macromolecular energy, minimization, and dynamics calculations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 4, n. 2, p. 187–217, jun. 1983.

- [41] EMILIO MATEEV. VALIDATION THROUGH RE-DOCKING, CROSS-DOCKING AND LIGAND ENRICHMENT IN VARIOUS WELL-RESOLUTED MAO-B RECEPTORS. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 13, n. 3, [s.d.].
- [42] VERKHIVKER, G. et al. Empirical free energy calculations of ligand-protein crystallographic complexes. I. Knowledge-based ligand-protein interaction potentials applied to the prediction of human immunodeficiency virus 1 protease binding affinity. **Protein Engineering Design and Selection**, v. 8, n. 7, p. 677–691, 1 jul. 1995.
- [43] GOHLKE, H.; HENDLICH, M.; KLEBE, G. Knowledge-based scoring function to predict protein-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 295, n. 2, p. 337–356, jan. 2000.
- [44] DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. NNScore: A Neural-Network-Based Scoring Function for the Characterization of Protein–Ligand Complexes. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 10, p. 1865–1871, 25 out. 2010.
- [45] JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking 1 Edited by F. E. Cohen. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, abr. 1997.
- [46] ELDRIDGE, M. D. et al. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 11, n. 5, p. 425–445, set. 1997.
- [47] HUANG, S.; ZOU, X. An iterative knowledge-based scoring function to predict protein–ligand interactions: I. Derivation of interaction potentials. **Journal of Computational Chemistry**, v. 27, n. 15, p. 1866–1875, 30 nov. 2006.
- [48] DURRANT, J. D.; MCCAMMON, J. A. NNScore 2.0: A Neural-Network Receptor–Ligand Scoring Function. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 51, n. 11, p. 2897–2903, 28 nov. 2011.
- [49] YIN, S. et al. MedusaScore: An Accurate Force Field-Based Scoring Function for Virtual Drug Screening. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 48, n. 8, p. 1656–1662, 1 ago. 2008.
- [50] FRIESNER, R. A. et al. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 1 mar. 2004.
- [51] LI, G.-B. et al. ID-Score: A New Empirical Scoring Function Based on a Comprehensive Set of Descriptors Related to Protein–Ligand Interactions. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 3, p. 592–600, 25 mar. 2013.

- [52] SU, M. et al. Comparative Assessment of Scoring Functions: The CASF-2016 Update. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 2, p. 895–913, 25 fev. 2019.
- [53] FENALTI, G. et al. **1.8 A Structure of the human delta opioid 7TM receptor (PSI Community Target): 4n6h.** , 25 dez. 2013. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00004n6h>. Acesso em: 13 fev. 2026
- [54] MANGLIK, A. et al. **Crystal structure of the mu-opioid receptor bound to a morphinan antagonist: 4dki.** , 21 mar. 2012. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00004dki>. Acesso em: 13 fev. 2026
- [55] WU, H. et al. **Structure of the human kappa opioid receptor in complex with JDTic: 4djh.** , 21 mar. 2012. Disponível em: <https://www.wwpdb.org/pdb?id=pdb_00004djh>. Acesso em: 13 fev. 2026

ANEXO A – GRÁFICOS DE RAMACHANDRAN

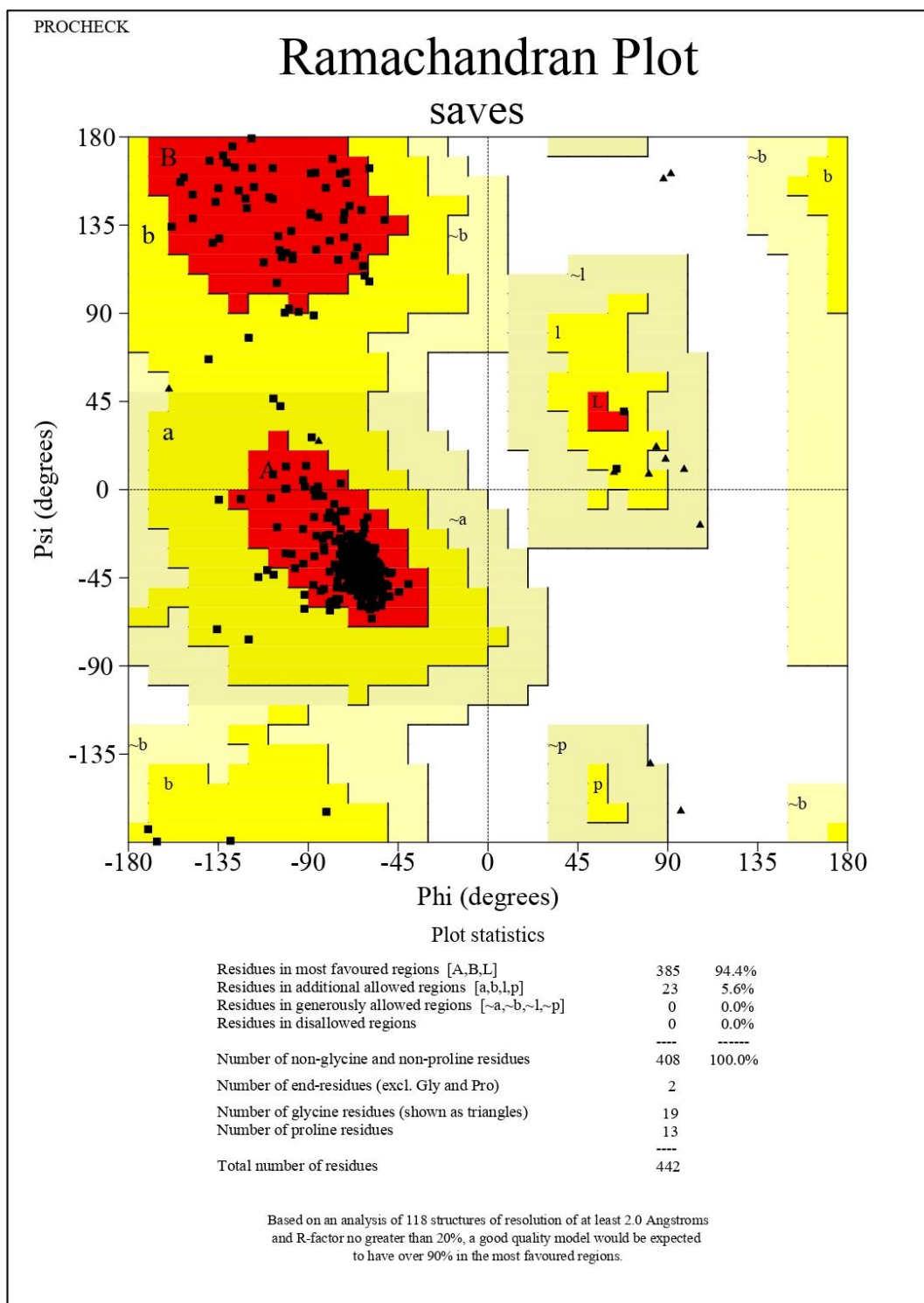


Gráfico de Ramachandran para a estrutura 4DKL

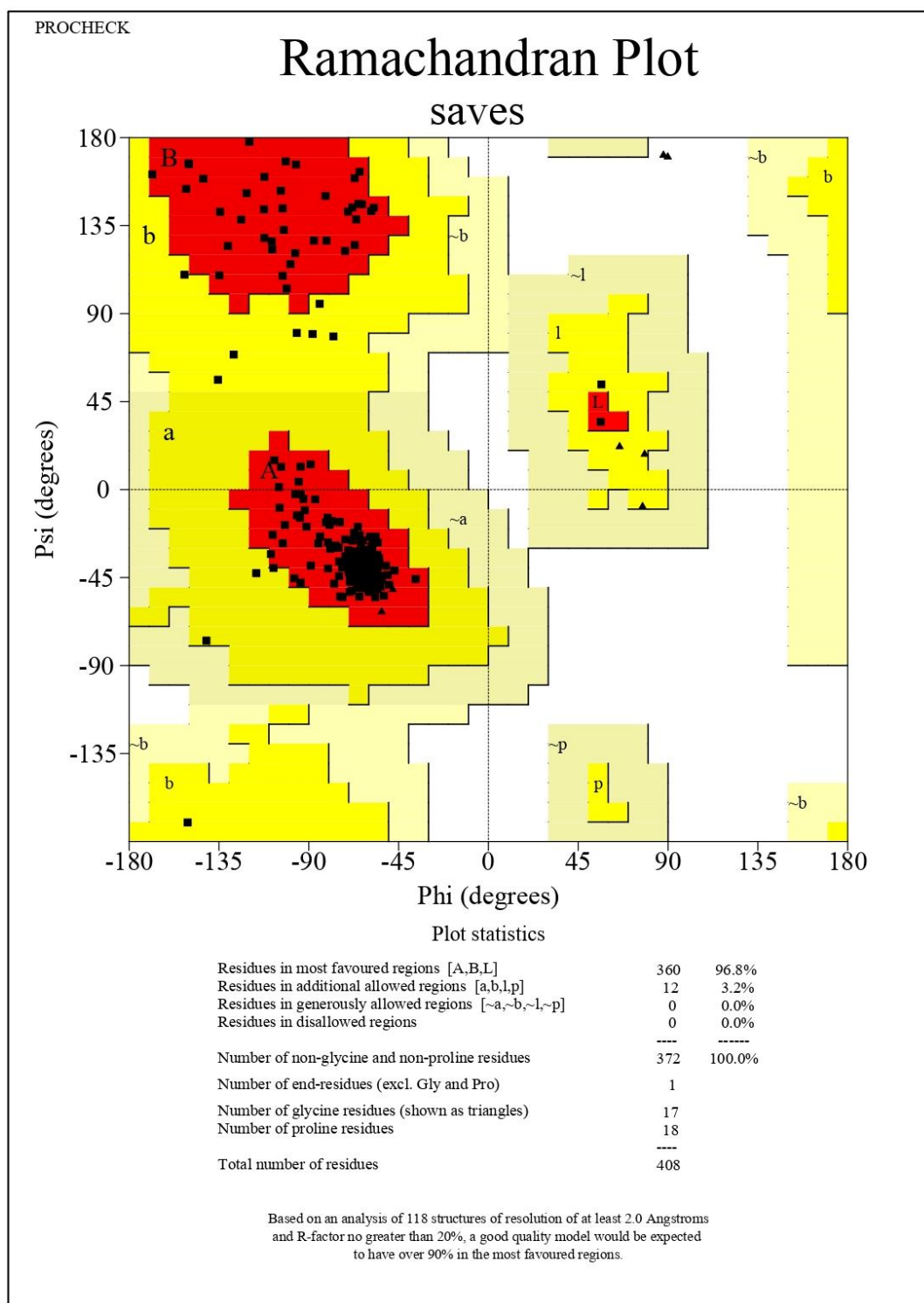


Gráfico de Ramachandran para a estrutura 4N6H

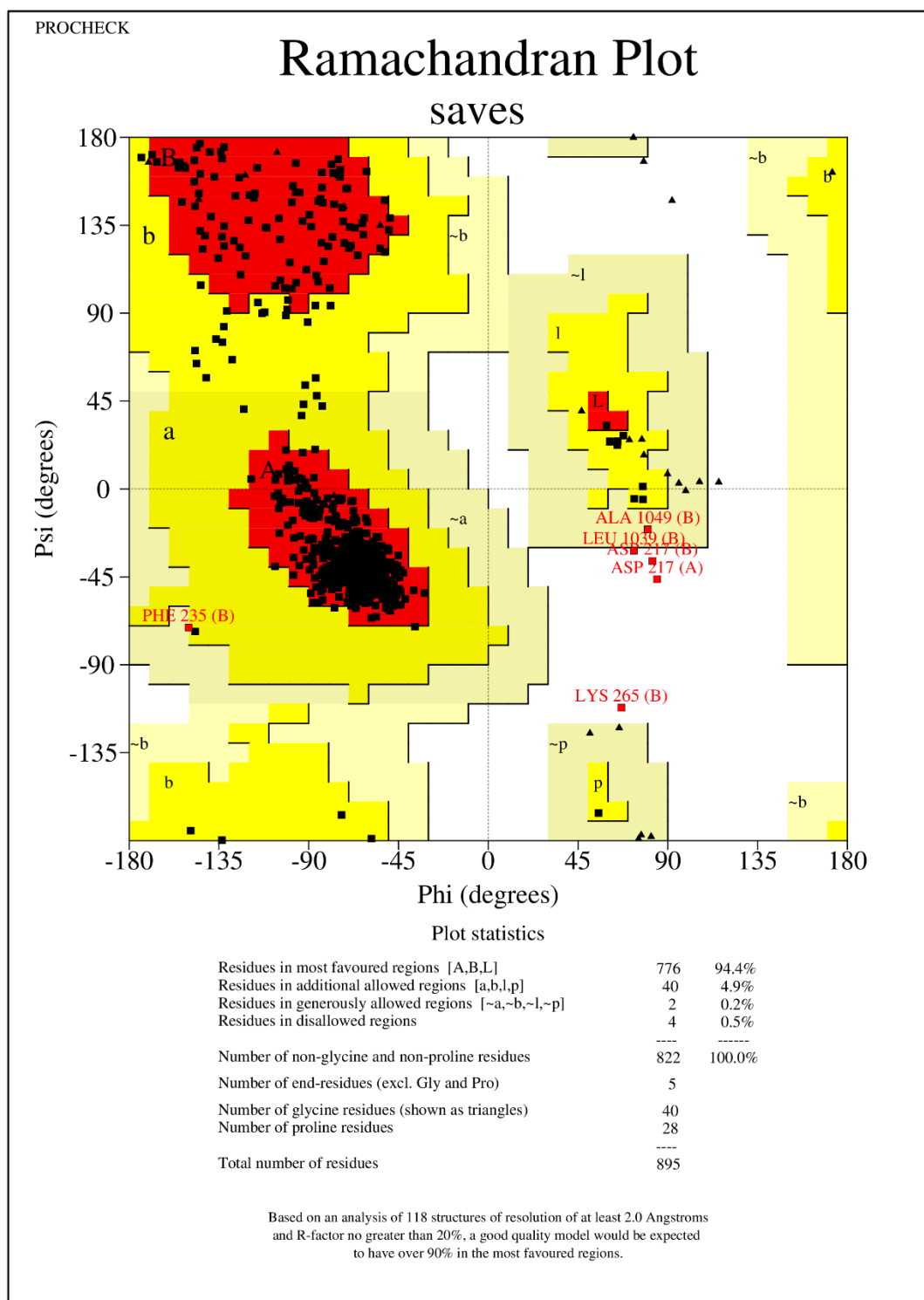
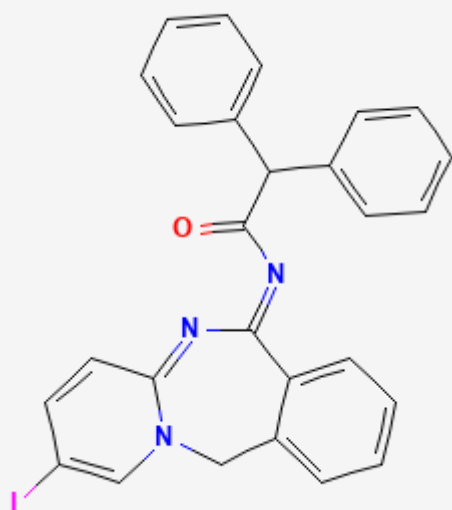
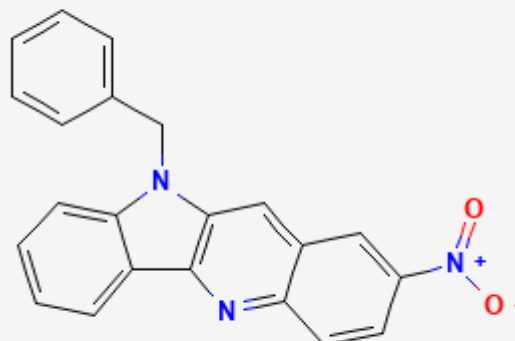


Gráfico de Ramachandran para a estrutura 4N6H

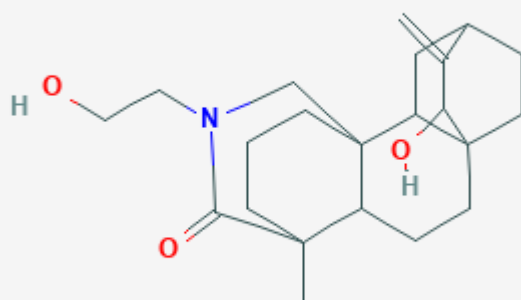
ANEXO A – ESTRUTURAS E SUAS RESPECTIVAS ATIVIDADES



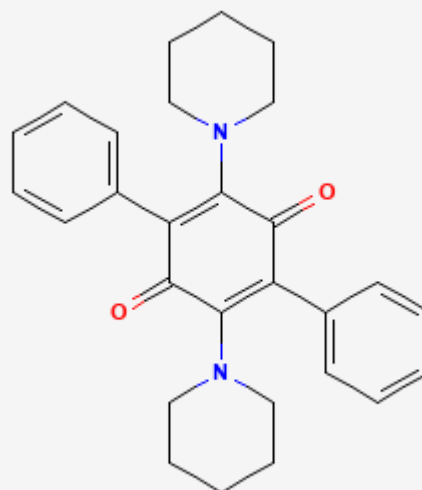
CHEMBL2311157 (LIG_01)
 κ_i (μM)
 $\delta = 3,28 \mid k = 43,1 \mid \mu = 0,024$



CHEMBL561339 (LIG_02)
 κ_i (μM)
 $\delta = 2,7$



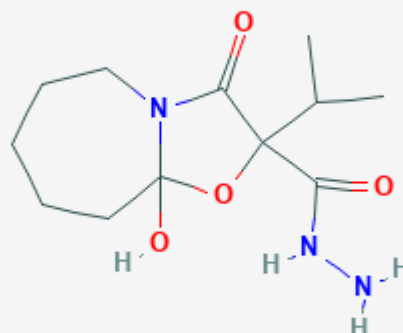
CHEMBL494480 (LIG_03)
 κ_i (μM)
 $\delta = 0,84$



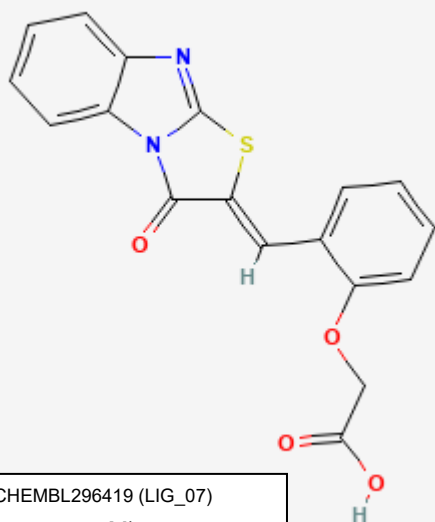
CHEMBL270190 (LIG_04)
 κ_i (μM)
 $\delta = 12 \mid k = 100 \mid \mu = 0,32$



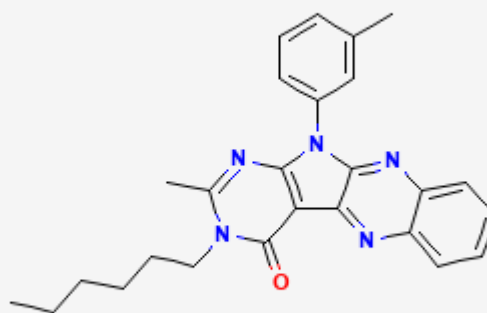
CHEMBL633 (LIG_05)
 κ_i (μM)
 $\delta = 2825 \mid k = 6672 \mid \mu = 7728$



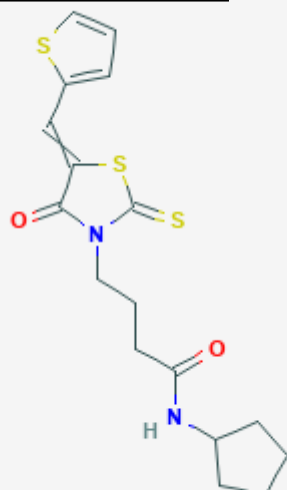
CHEMBL1190199 (LIG_06)
 κ_i (μM)
 $\delta = 100 \mid k = 5,6 \mid \mu = 100$



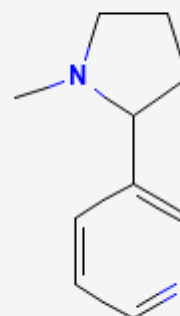
CHEMBL296419 (LIG_07)
 K_i (μM)
 $\delta = 4575 \mid k = 2646 \mid \mu = 606$



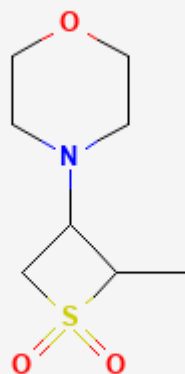
CHEMBL1921847 (LIG_08)
 K_i (μM)
 $\delta = 122 \mid k = 0,8 \mid \mu = 16,4$



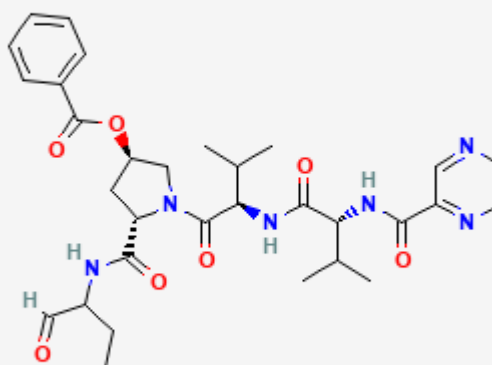
CHEMBL3137313 (LIG_09)
 K_i (μM)
 $\delta = 100 \mid k = 0,12 \mid \mu = 0,16$



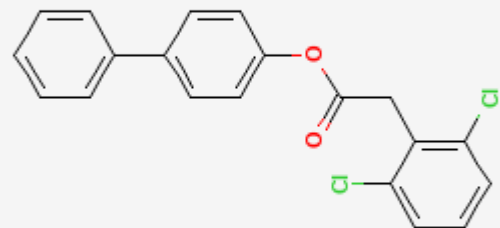
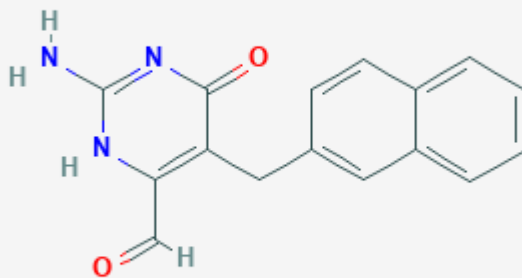
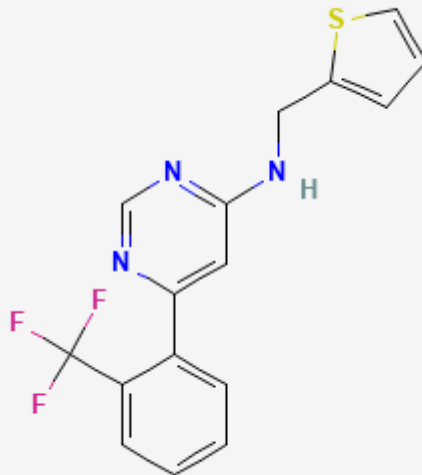
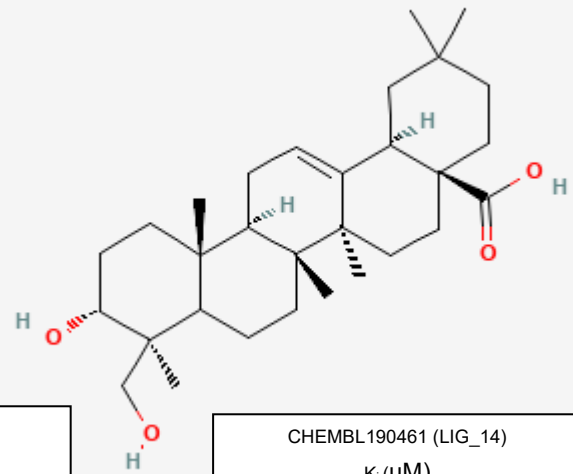
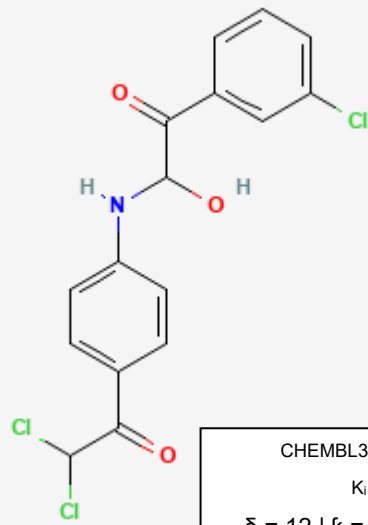
CHEMBL942 (LIG_10)
 K_i (μM)
 $k = 1000$

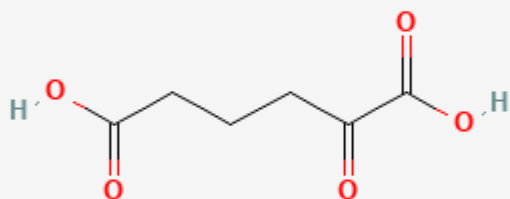


CHEMBL290106 (LIG_11)
 K_i (μM)
 $\mu = 2236$

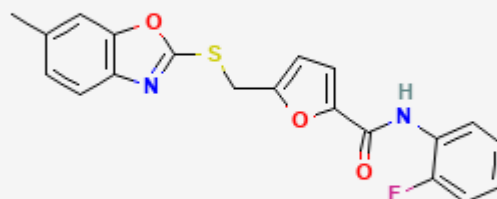


CHEMBL511142 (LIG_12)
 K_i (μM)
 $\delta = 4,5 \mid k = 0,07 \mid \mu = 1,5$

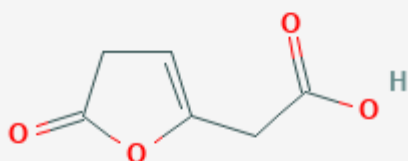




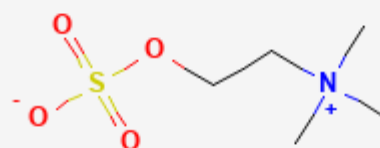
CHEMBL71 (LIG_19)

 K_i (μM) $\delta = 7365 \mid k = 4433 \mid \mu = 5844$ 

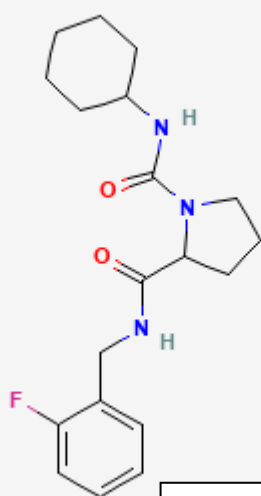
CHEMBL1200776 (LIG_20)

 K_i (μM) $k = 444,22 \mid \mu = 1295$ 

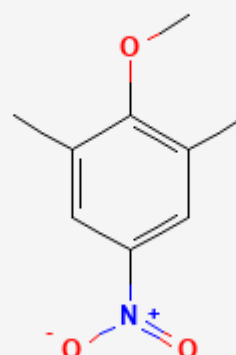
CHEMBL104 (LIG_23)

 K_i (μM) $\delta = 1755 \mid k = 2521 \mid \mu = 731$ 

CHEMBL485 (LIG_24)

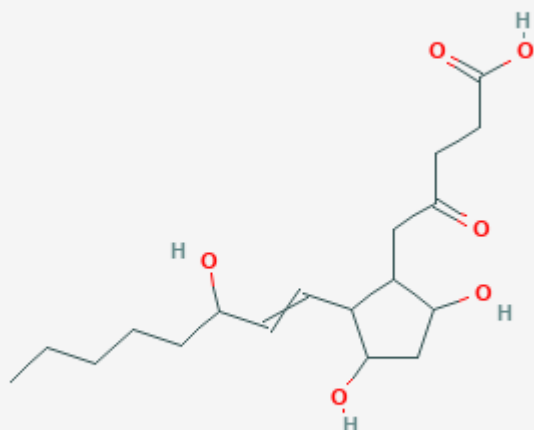
 K_i (μM) $\delta = 52207 \mid k = 25411 \mid \mu = 6300$ 

CHEMBL3219616 (LIG_25)

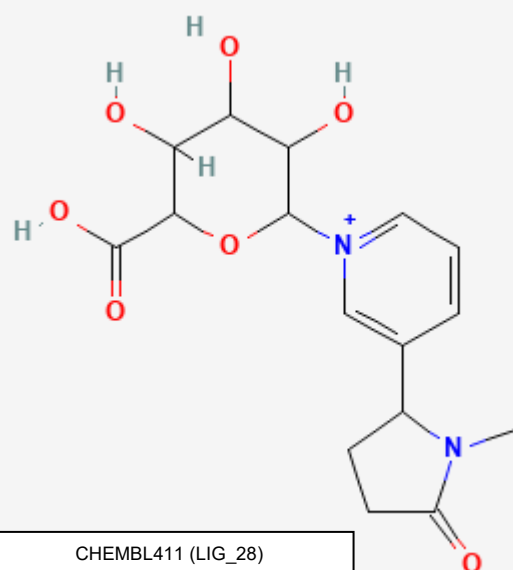
 K_i (μM) $\delta = 170 \mid k = 42 \mid \mu = 0,28$ 

CHEMBL139835 (LIG_26)

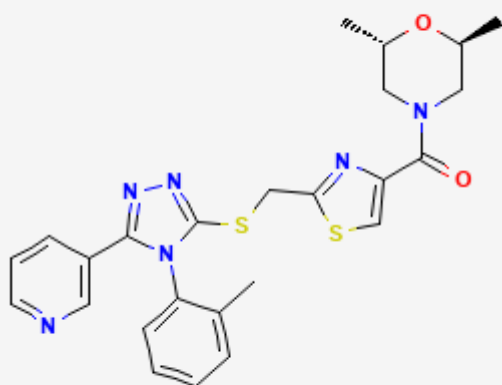
 K_i (μM) $\mu = 886$



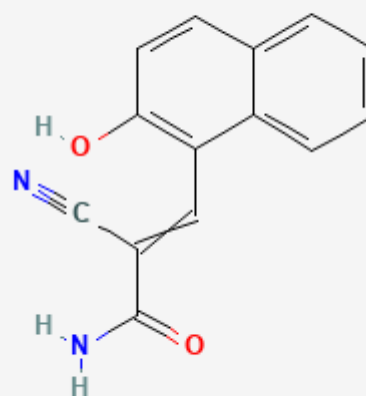
CHEMBL1479 (LIG_27)

 κ_i (μM) $k = 6207 \mid \mu = 5715$ 

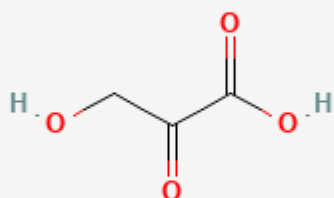
CHEMBL411 (LIG_28)

 κ_i (μM) $\delta = 958 \mid k = 1825 \mid \mu = 2345$ 

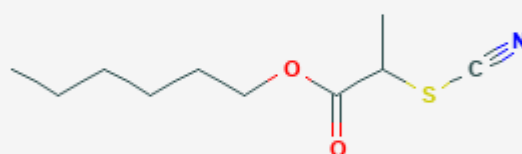
CHEMBL1200517 (LIG_29)

 κ_i (μM) $\mu = 154$ 

CHEMBL281786 (LIG_30)

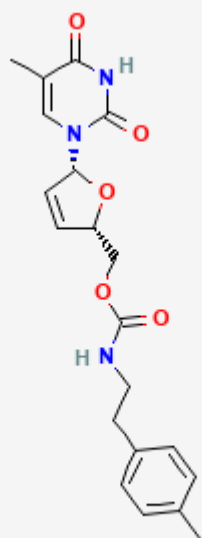
 κ_i (μM) $\delta = 0,23 \mid k = 0,02 \mid \mu = 0,12$ 

CHEMBL964 (LIG_31)

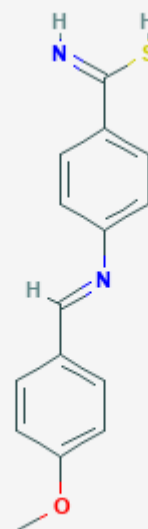
 κ_i (μM) $k = 2441 \mid \mu = 1425$ 

CHEMBL219916 (LIG_32)

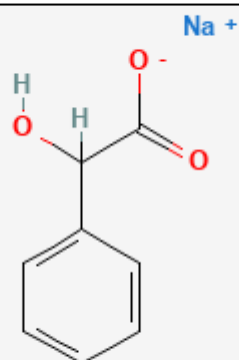
 κ_i (μM) $k = 2798 \mid \mu = 1712$



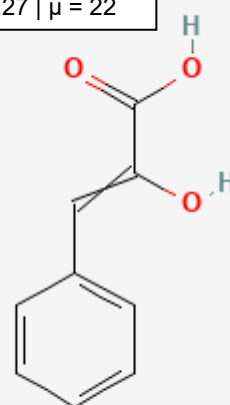
CHEMBL502182 (LIG_33)

 $\kappa_i (\mu\text{M})$ $k = 2383$ 

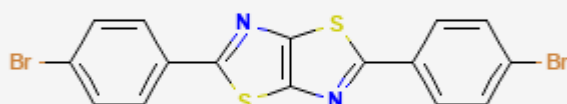
CHEMBL318859 (LIG_34)

 $\kappa_i (\mu\text{M})$ $\delta = 1000 \mid k = 0,27 \mid \mu = 22$ 

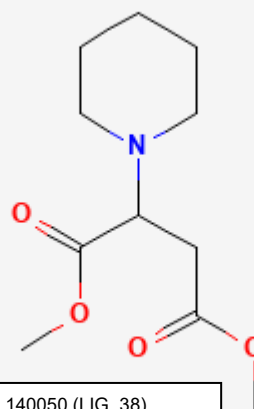
CHEMBL8234 (LIG_35)

 $\kappa_i (\mu\text{M})$ $\delta = 6,9 \mid k = 1000 \mid \mu = 9,43$ 

CHEMBL961 (LIG_36)

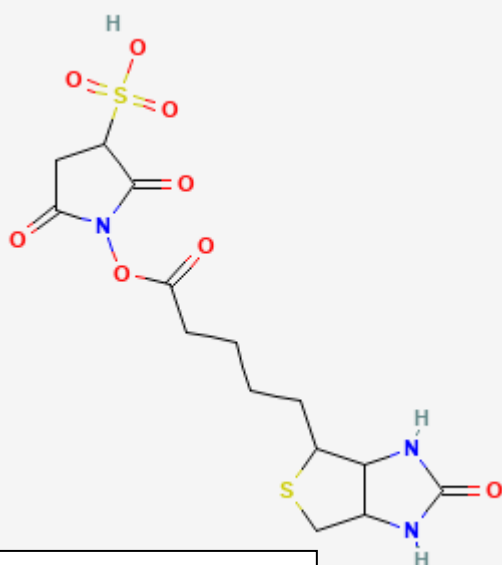
 $\kappa_i (\mu\text{M})$ $k = 10358 \mid \mu = 10867$ 

CHEMBL312040 (LIG_37)

 $\kappa_i (\mu\text{M})$ $\delta = 1000 \mid \mu = 0,2$ 

CHEMBL140050 (LIG_38)

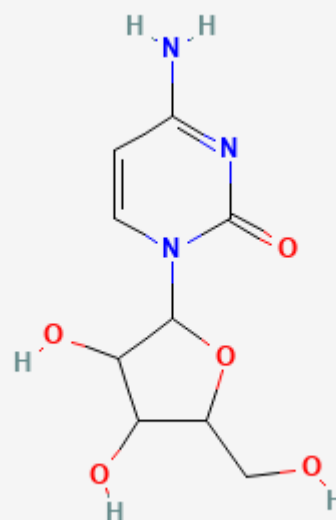
 $\kappa_i (\mu\text{M})$ $\delta = 0,27 \mid k = 0,5 \mid \mu = 0,26$



CHEMBL83894 (LIG_39)

κ_i (μM)

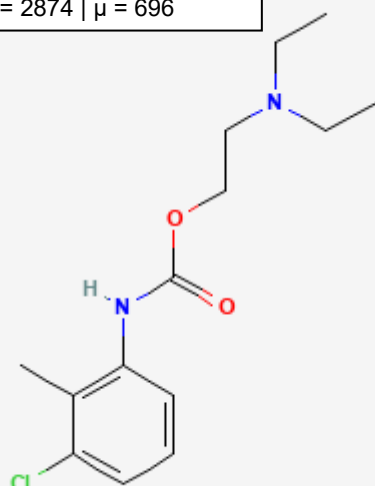
$k = 2874 \mid \mu = 696$



CHEMBL596 (LIG_40)

κ_i (μM)

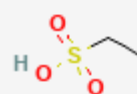
$\delta = 717 \mid k = 196,5 \mid \mu = 3,97$



CHEMBL30008 (LIG_41)

κ_i (μM)

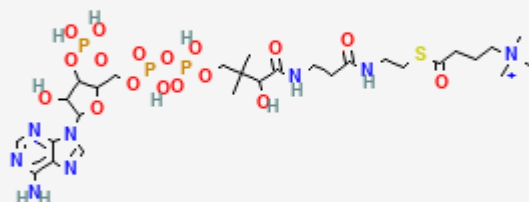
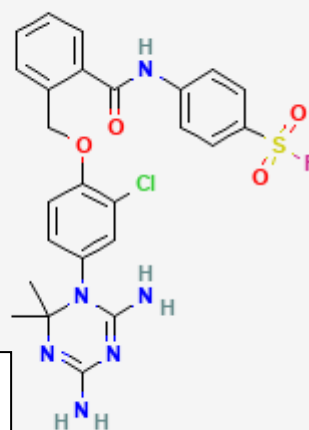
$\mu = 2125$



CHEMBL421665 (LIG_42)

κ_i (μM)

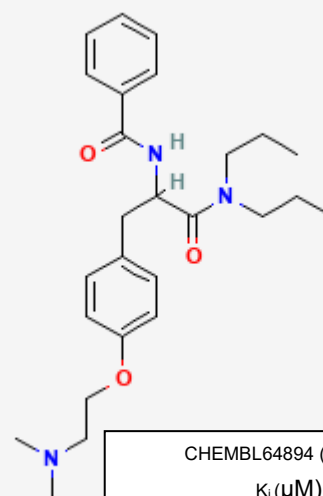
$\mu = 0,11$



CHEMBL726 (LIG_43)

κ_i (μM)

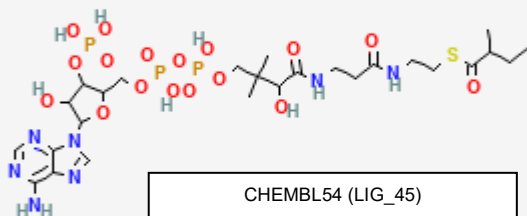
$\delta = 8473 \mid k = 9891 \mid \mu = 8421$



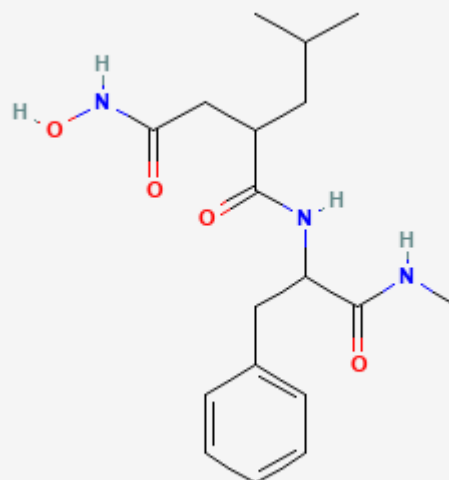
CHEMBL64894 (LIG_44)

κ_i (μM)

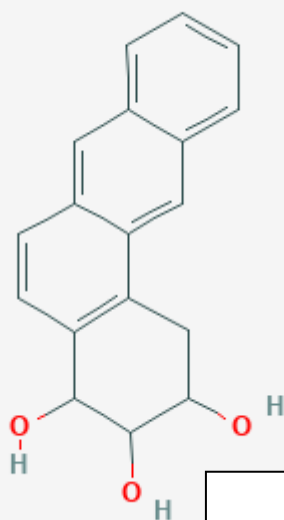
$k = 616 \mid \mu = 871$



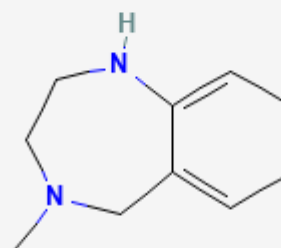
CHEMBL54 (LIG_45)

 $K_i (\mu\text{M})$ $\mu = 10000$ 

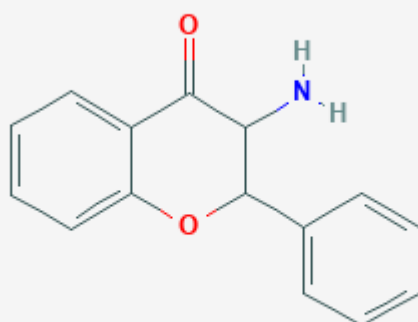
CHEMBL1289 (LIG_46)

 $K_i (\mu\text{M})$ $k = 459$ 

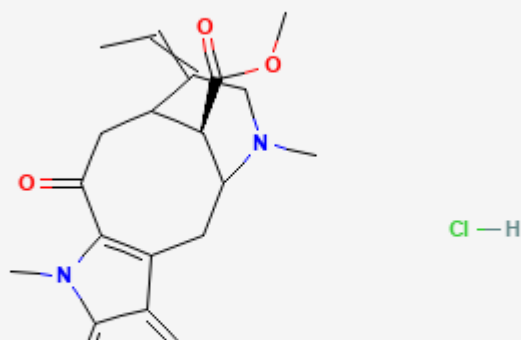
CHEMBL1457 (LIG_47)

 $K_i (\mu\text{M})$ $k = 260 \mid \mu = 9,5$ 

CHEMBL398707 (LIG_48)

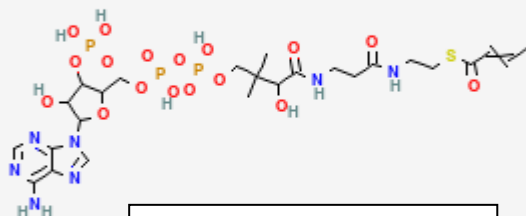
 $K_i (\mu\text{M})$ $\delta = 38 \mid k = 2,8 \mid \mu = 0,28$ 

CHEMBL415247 (LIG_49)

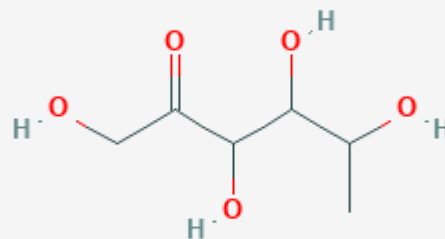
 $K_i (\mu\text{M})$ $\delta = 29,6 \mid k = 0,41 \mid \mu = 0,96$ 

CHEMBL3039520 (LIG_50)

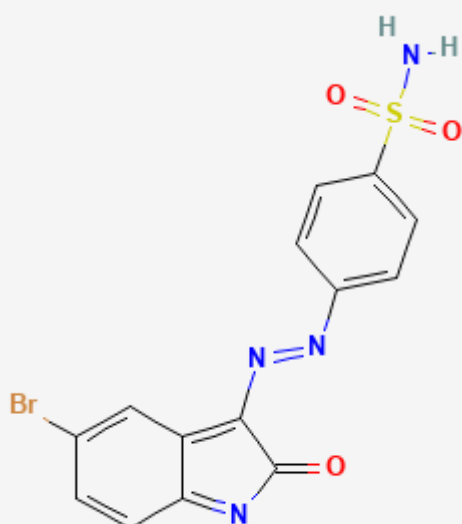
 $K_i (\mu\text{M})$ $k = 356,6$



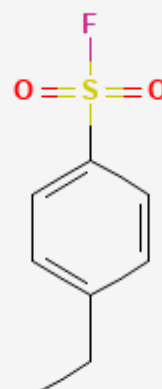
CHEMBL592 (LIG_51)

 κ_i (μM) $\delta = 4,2 \mid k = 2,3 \mid \mu = 0,21$ 

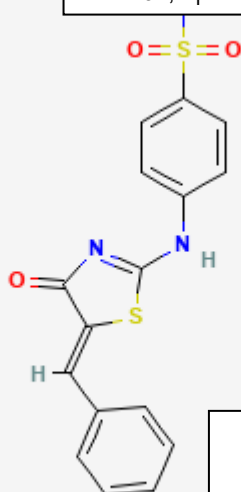
CHEMBL841 (LIG_53)

 κ_i (μM) $\delta = 316 \mid k = 1000 \mid \mu = 0,59$ 

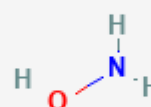
CHEMBL1707 (LIG_54)

 κ_i (μM) $\delta = 264,7 \mid k = 71,5 \mid \mu = 2587$ 

CHEMBL1701 (LIG_55)

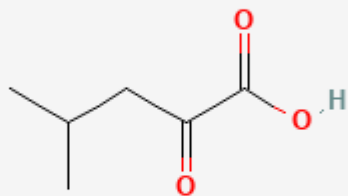
 κ_i (μM) $k = 10000 \mid \mu = 920$ 

CHEMBL1276308 (LIG_57)

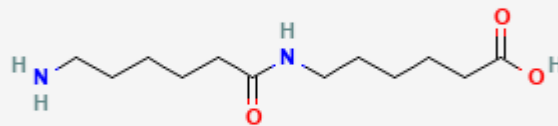
 κ_i (μM) $k = 8038 \mid \mu = 997$ 

CHEMBL787 (LIG_58)

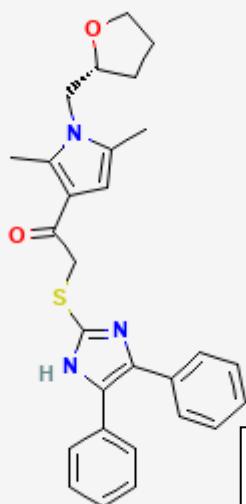
 κ_i (μM) $\delta = 1690$



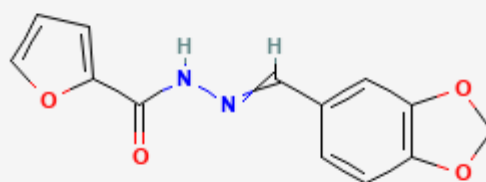
CHEMBL70 (LIG_59)
 K_i (μM)
 $\delta = 217 \mid k = 33,7 \mid \mu = 2,6$



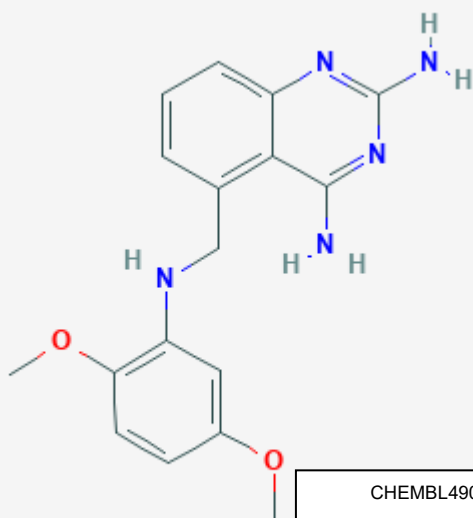
CHEMBL895 (LIG_60)
 K_i (μM)
 $\delta = 318,8 \mid k = 29,9 \mid \mu = 14,3$



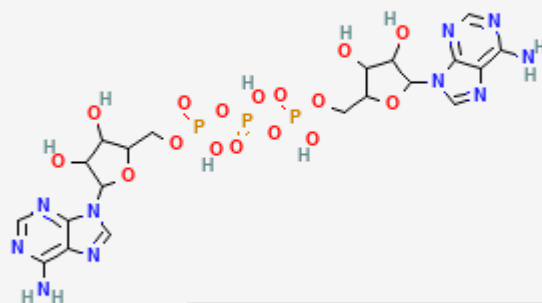
CHEMBL2105755 (LIG_61)
 K_i (μM)
 $\delta = 0,91 \mid \mu = 1,1$



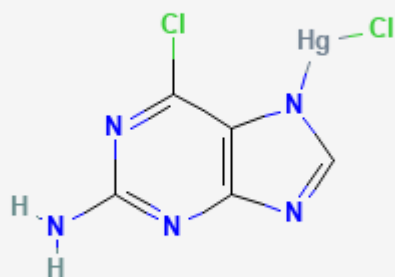
CHEMBL267495 (LIG_62)
 K_i (μM)
 $\delta = 36,5 \mid k = 0,23 \mid \mu = 0,7$



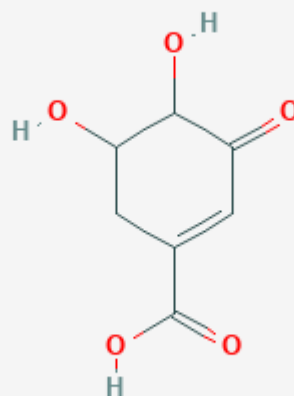
CHEMBL490665 (LIG_63)
 K_i (μM)
 $\delta = 693 \mid k = 0,24 \mid \mu = 5,9$



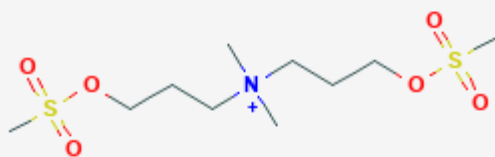
CHEMBL982 (LIG_64)
 K_i (μM)
 $\delta = 13,26 \mid k = 1,03 \mid \mu = 0,91$



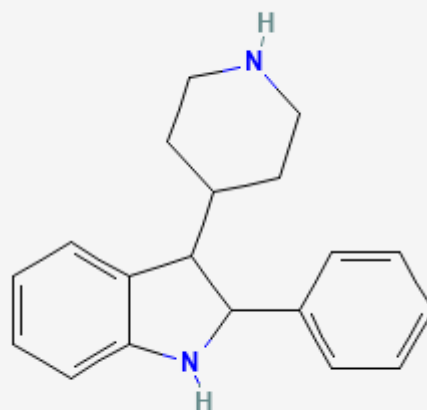
CHEMBL415284 (LIG_65)

 κ_i (μM) $\delta = 120 \mid k = 2 \mid \mu = 0,36$ 

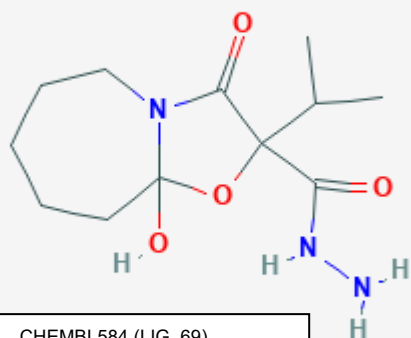
CHEMBL80 (LIG_66)

 κ_i (μM) $\delta = 32 \mid k = 15,6 \mid \mu = 3,70,7$ 

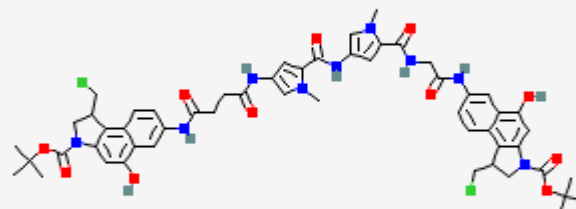
CHEMBL19019 (LIG_67)

 κ_i (μM) $\delta = 341,4 \mid k = 0,4 \mid \mu = 1995$ 

CHEMBL4592045 (LIG_68)

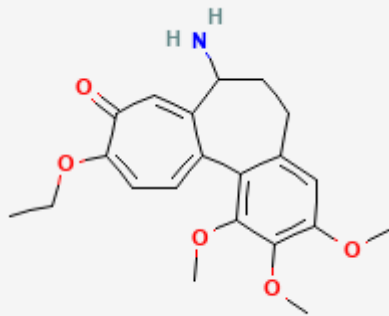
 κ_i (μM) $k = 1,5 \mid \mu = 450$ 

CHEMBL584 (LIG_69)

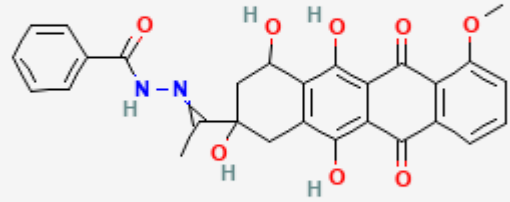
 κ_i (μM) $\delta = 23319 \mid k = 14398 \mid \mu = 5859$ 

CHEMBL 405355 (LIG_70)

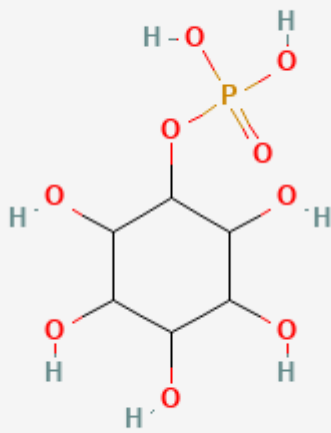
 κ_i (μM) $\delta = 399,3 \mid k = 346,8 \mid \mu = 128,5$



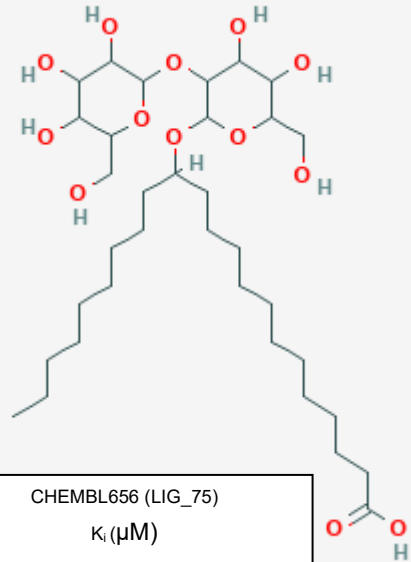
CHEMBL 346331 (LIG_72)
 κ_i (μM)
 $\mu = 35,9$



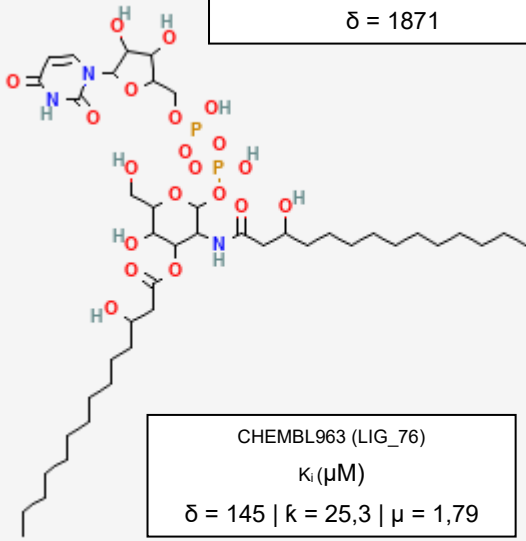
CHEMBL 427683 (LIG_73)
 κ_i (μM)
 $\delta = 764 \mid k = 73 \mid \mu = 59$



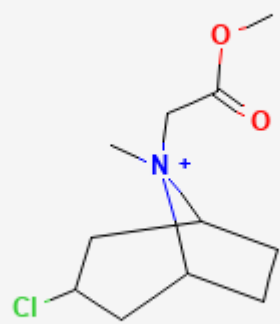
CHEMBL1262 (LIG_74)
 κ_i (μM)
 $\delta = 1871$



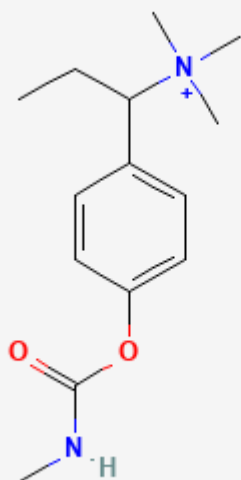
CHEMBL656 (LIG_75)
 κ_i (μM)
 $\delta = 1087 \mid k = 1658 \mid \mu = 10000$



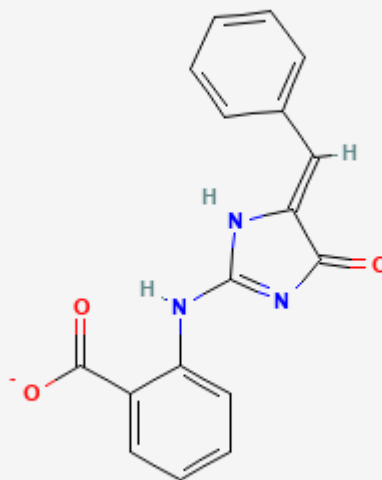
CHEMBL963 (LIG_76)
 κ_i (μM)
 $\delta = 145 \mid k = 25,3 \mid \mu = 1,79$



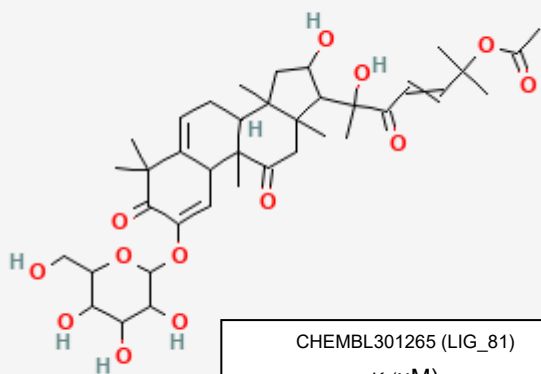
CHEMBL428647 (LIG_77)
 κ_i (μM)
 $\delta = 1481$



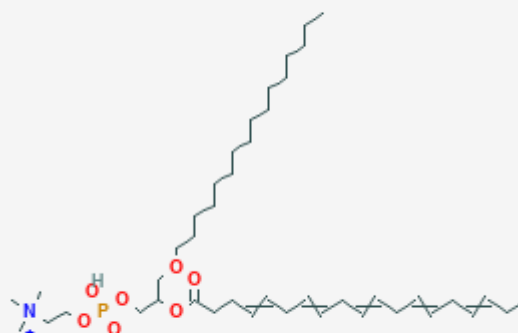
CHEMBL47050 (LIG_78)
 κ_i (μM)
 $\delta = 1714 \mid k = 1000 \mid \mu = 867$



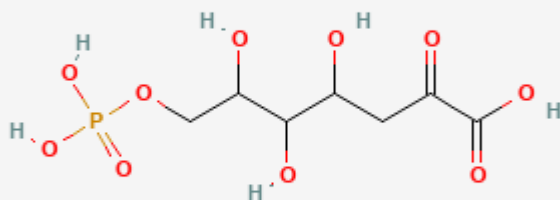
CHEMBL1818341 (LIG_79)
 κ_i (μM)
 $k = 1,23 \mid \mu = 10$



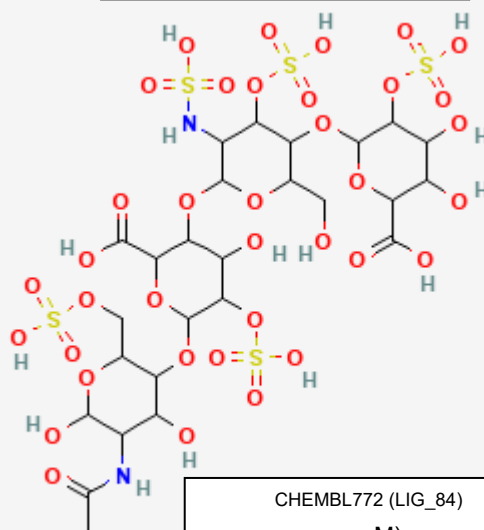
CHEMBL301265 (LIG_81)
 κ_i (μM)
 $\delta = 1000$



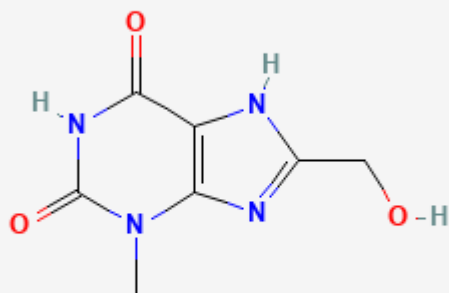
CHEMBL1558 (LIG_82)
 κ_i (μM)
 $\mu = 1791$



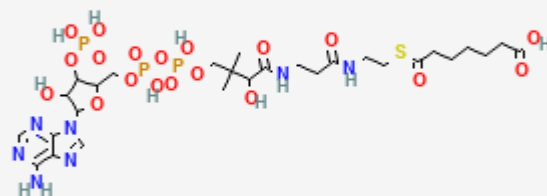
CHEMBL81 (LIG_83)
 κ_i (μM)
 $\delta = 2342 \mid k = 641 \mid \mu = 477$



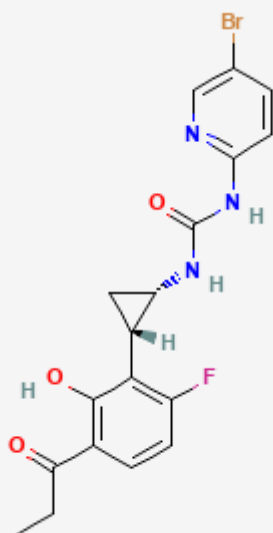
CHEMBL772 (LIG_84)
 κ_i (μM)
 $\mu = 1686$



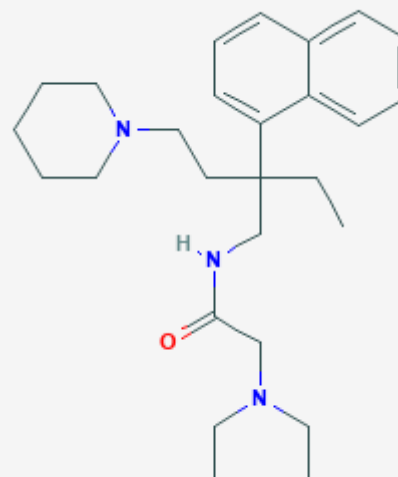
CHEMBL267777 (LIG_85)

 κ_i (μM) $k = 1445 \mid \mu = 344,3$ 

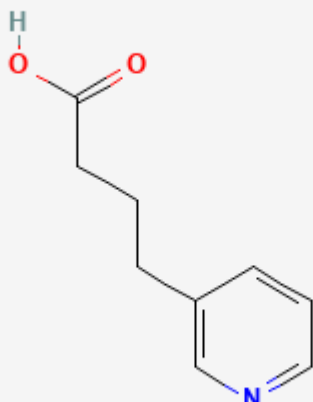
CHEMBL163 (LIG_86)

 κ_i (μM) $k = 5462 \mid \mu = 26606$ 

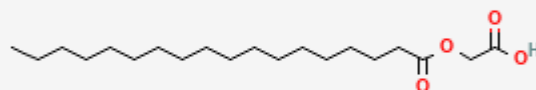
CHEMBL445332 (LIG_87)

 κ_i (μM) $\delta = 5790 \mid k = 1,9 \mid \mu = 10000$ 

CHEMBL426084 (LIG_88)

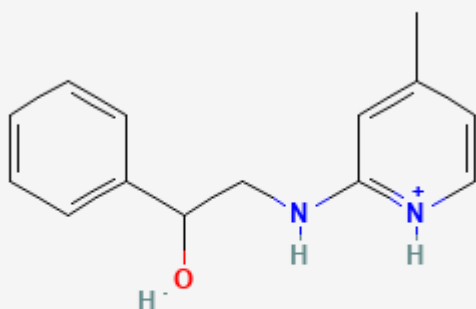
 κ_i (μM) $\delta = 2,6 \mid k = 0,23 \mid \mu = 0,05$ 

CHEMBL114 (LIG_89)

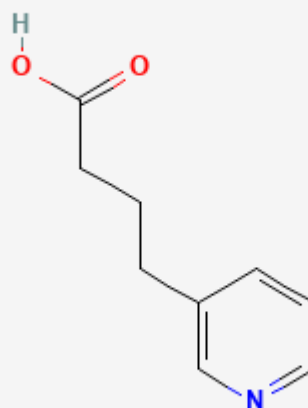
 κ_i (μM) $\delta = 9930 \mid k = 2780 \mid \mu = 3907$ 

CHEMBL79834 (LIG_90)

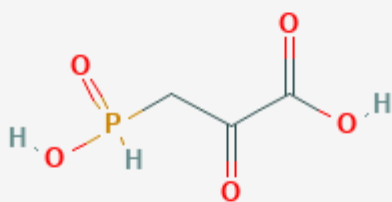
 κ_i (μM) $k = 913,9 \mid \mu = 155,5$



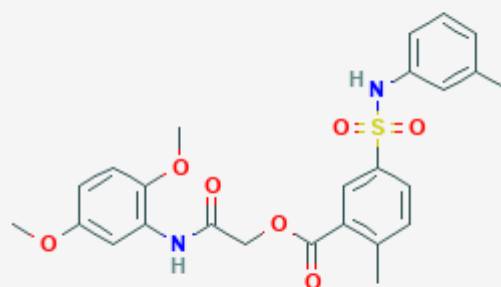
CHEMBL18797 (LIG_92)

 κ_i (μM) $\mu = 13667$ 

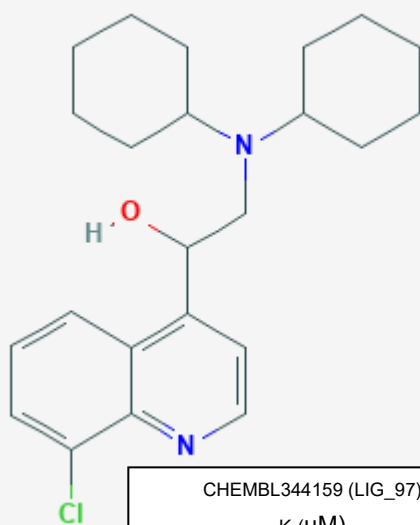
CHEMBL114 (LIG_94)

 κ_i (μM) $\delta = 9930 \mid k = 2780 \mid \mu = 3907$ 

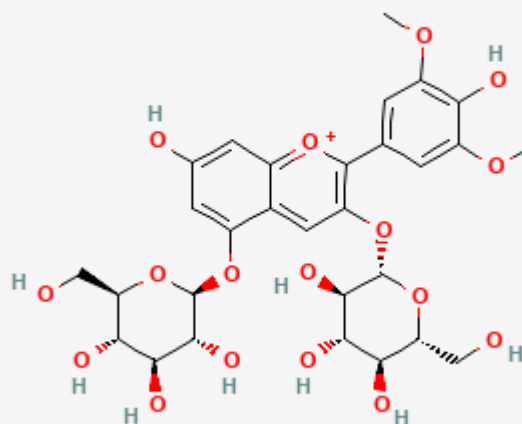
CHEMBL83 (LIG_95)

 κ_i (μM) $\delta = 4702 \mid k = 6252 \mid \mu = 7142$ 

CHEMBL2107572 (LIG_96)

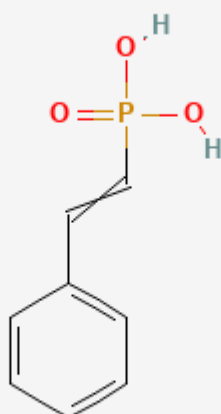
 κ_i (μM) $k = 1403 \mid \mu = 2205,5$ 

CHEMBL344159 (LIG_97)

 κ_i (μM) $\mu = 410$ 

CHEMBL441765 (LIG_98)

 κ_i (μM) $\delta = 10000 \mid k = 0,69 \mid \mu = 370$

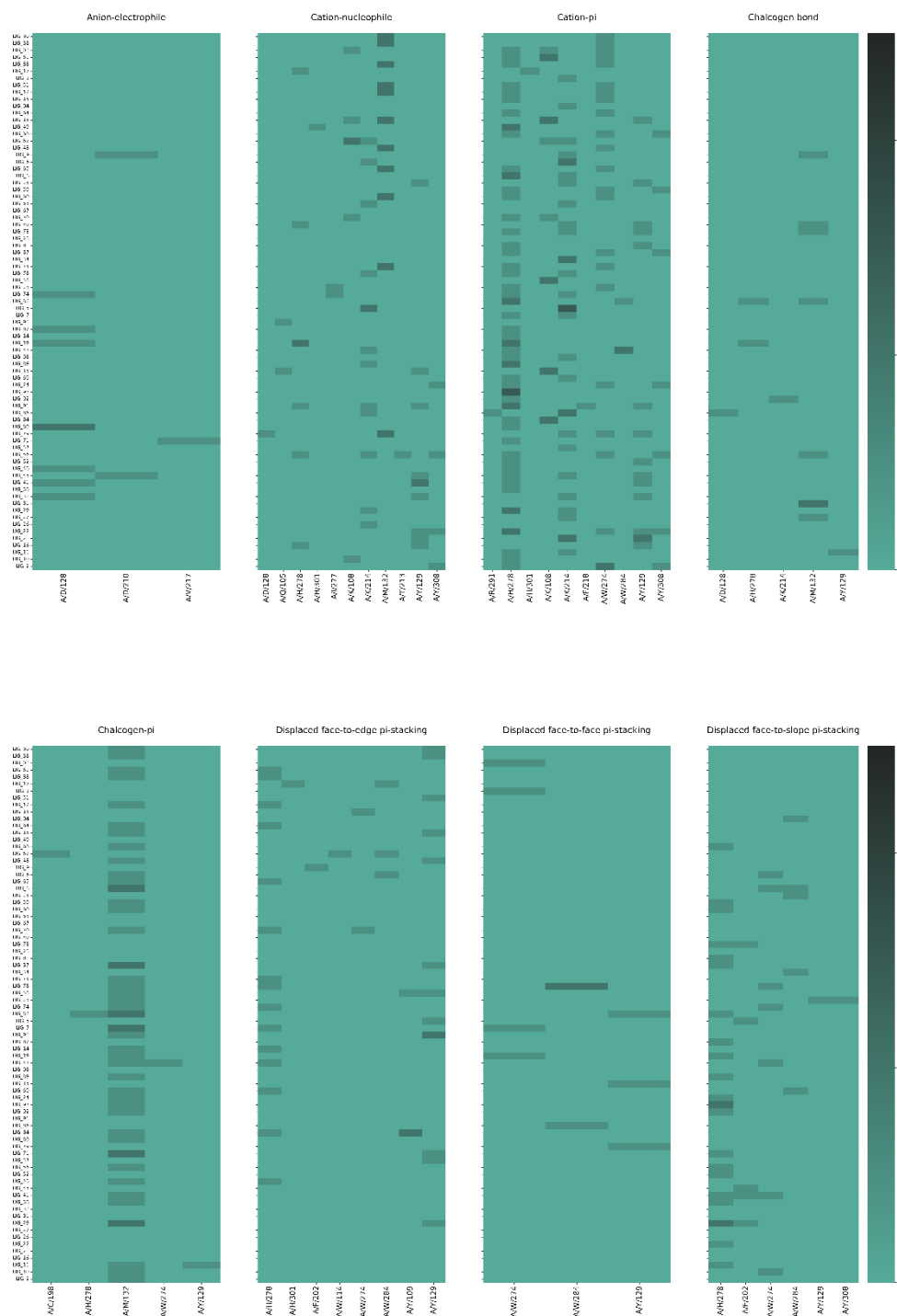


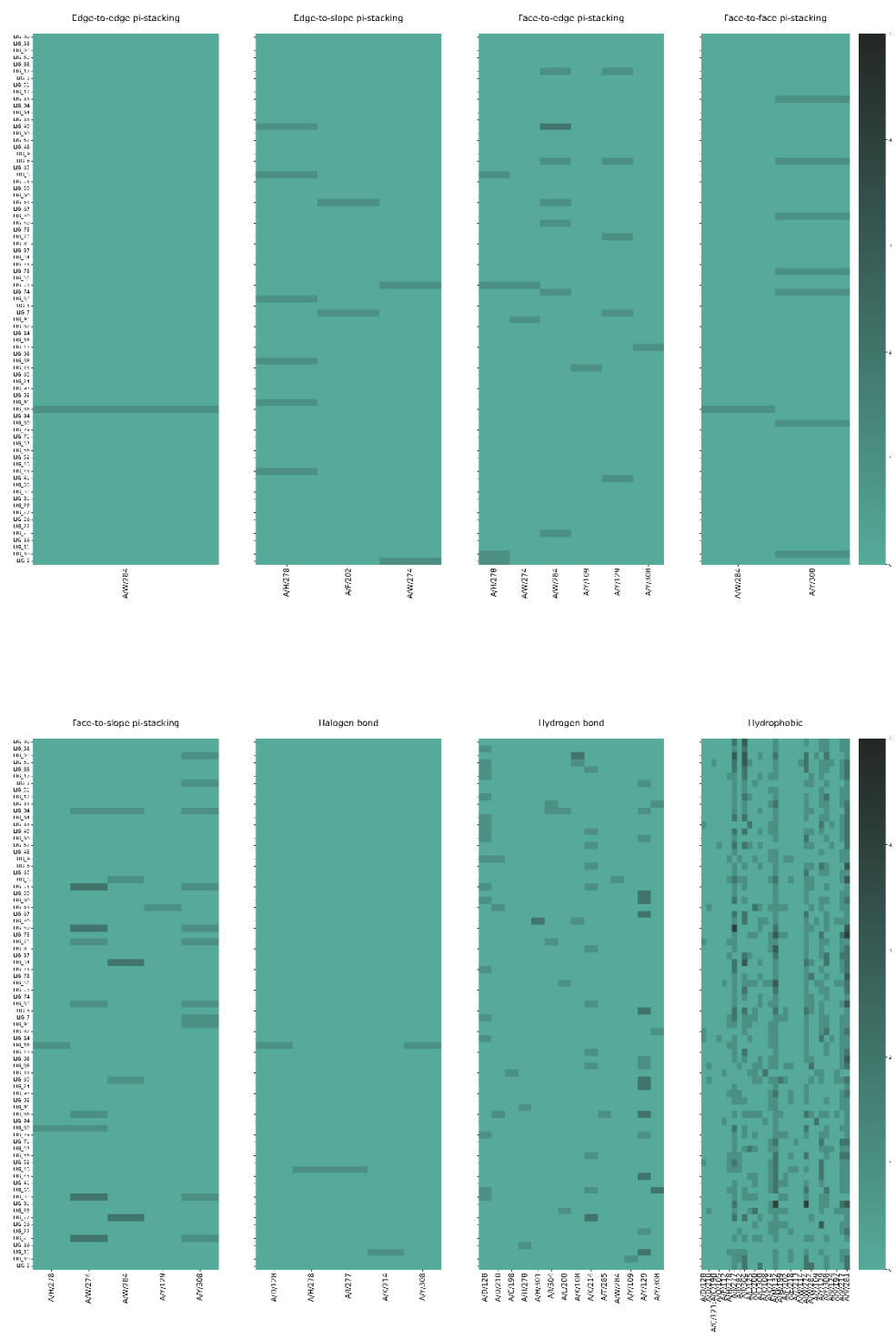
CHEMBL74355 (LIG_99)

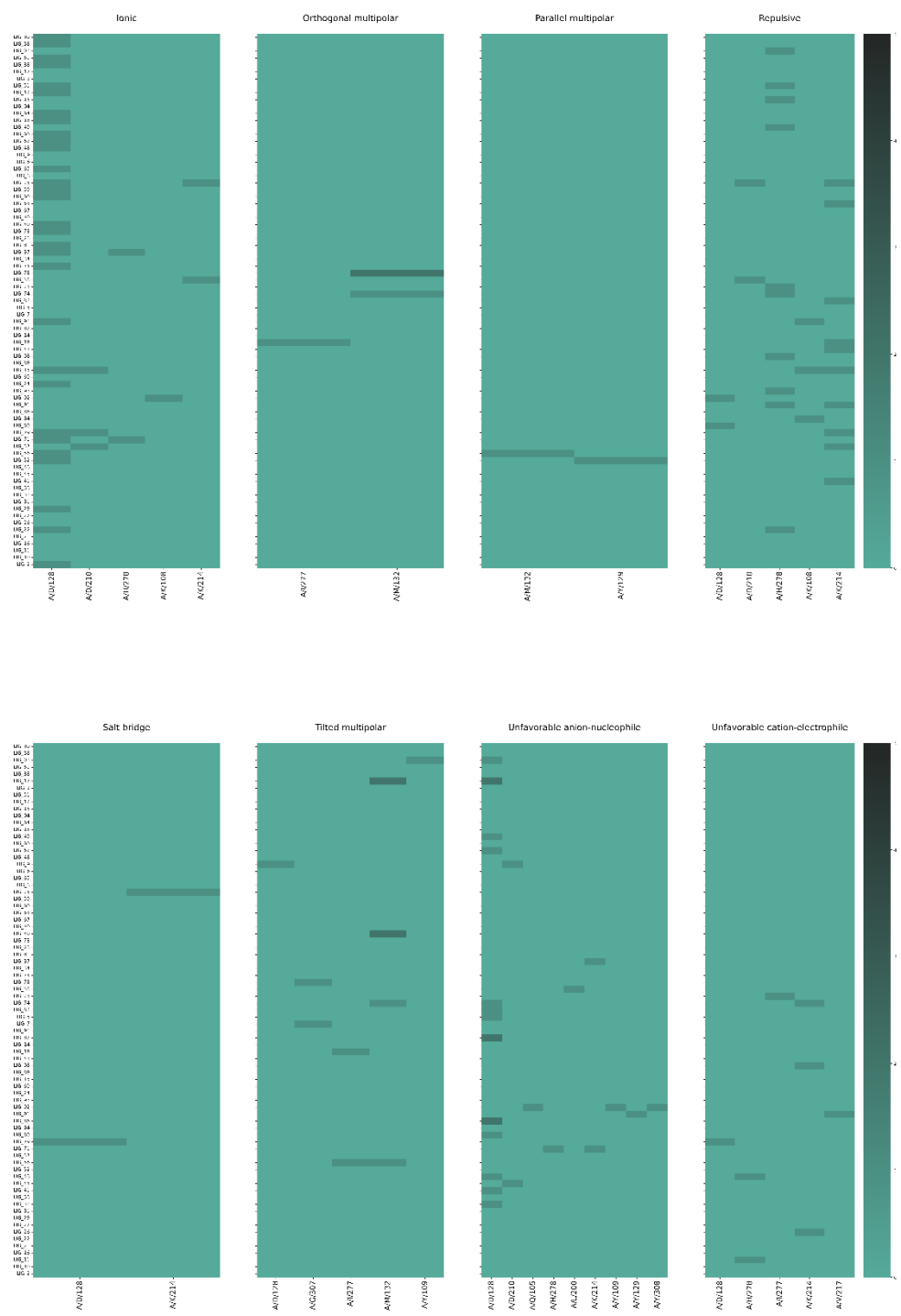
K_i (μM)

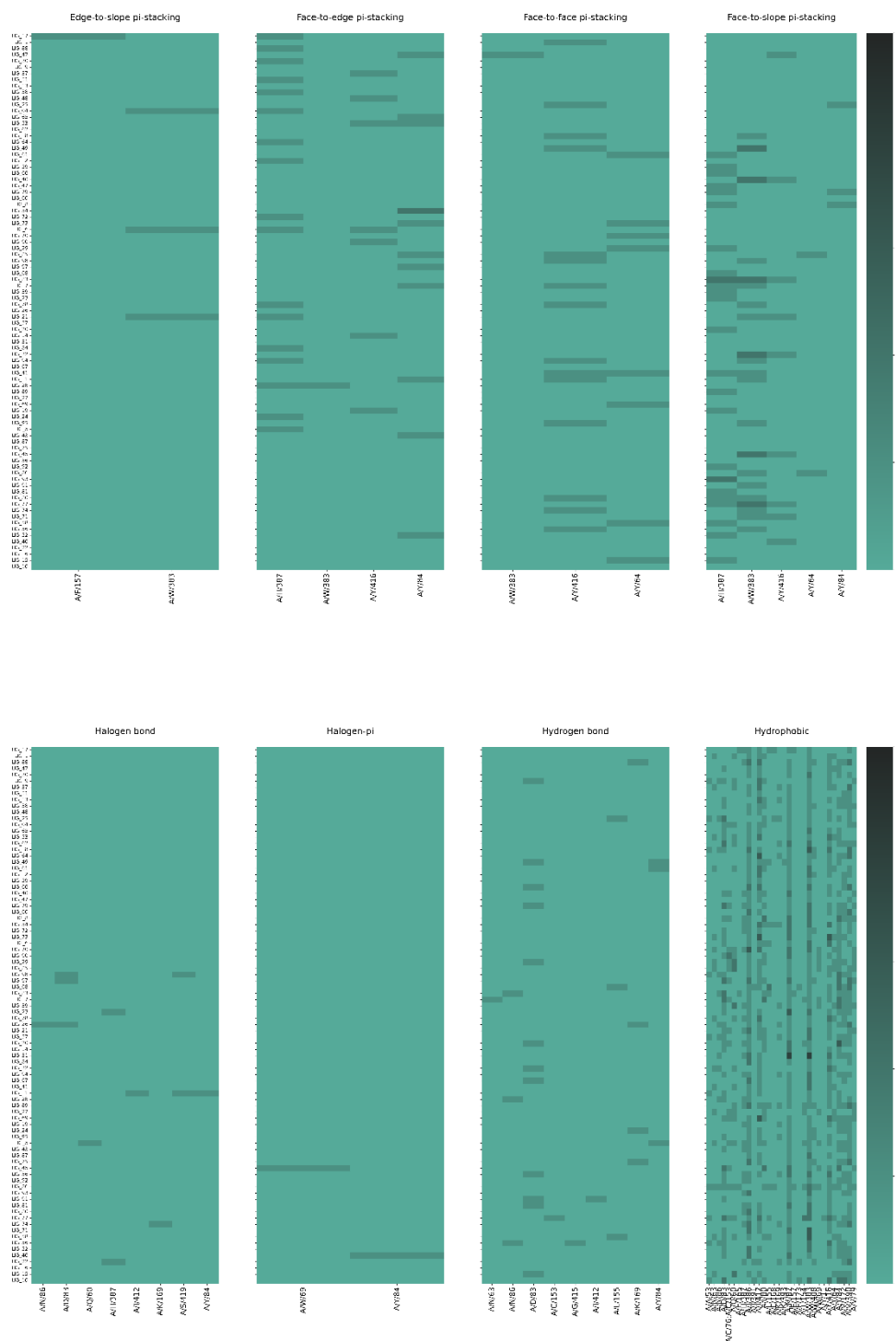
$k = 102,7$

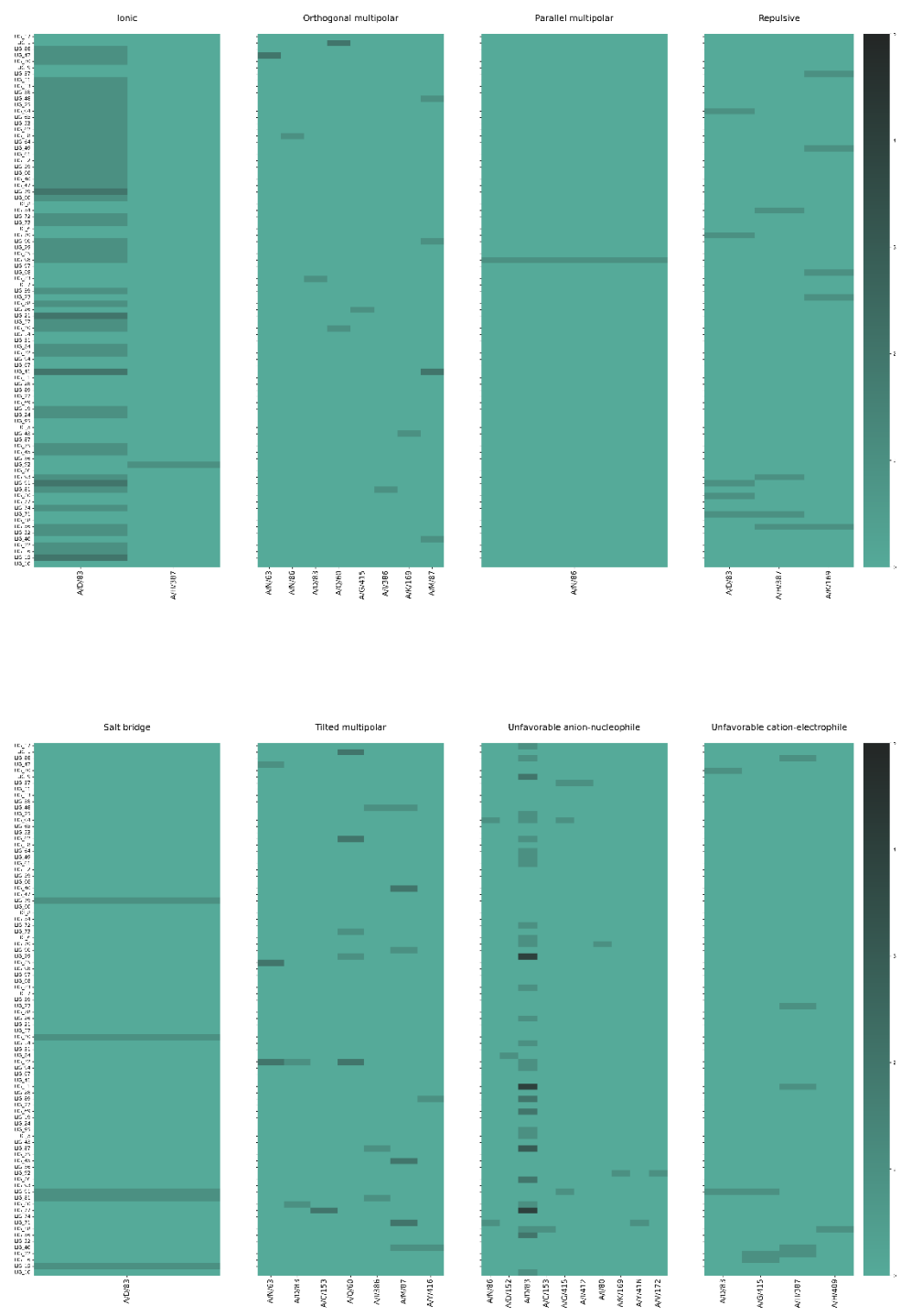
APÊNDICE A I – INTERAÇÕES CALCULADAS PARA O RECEPTOR DELTA

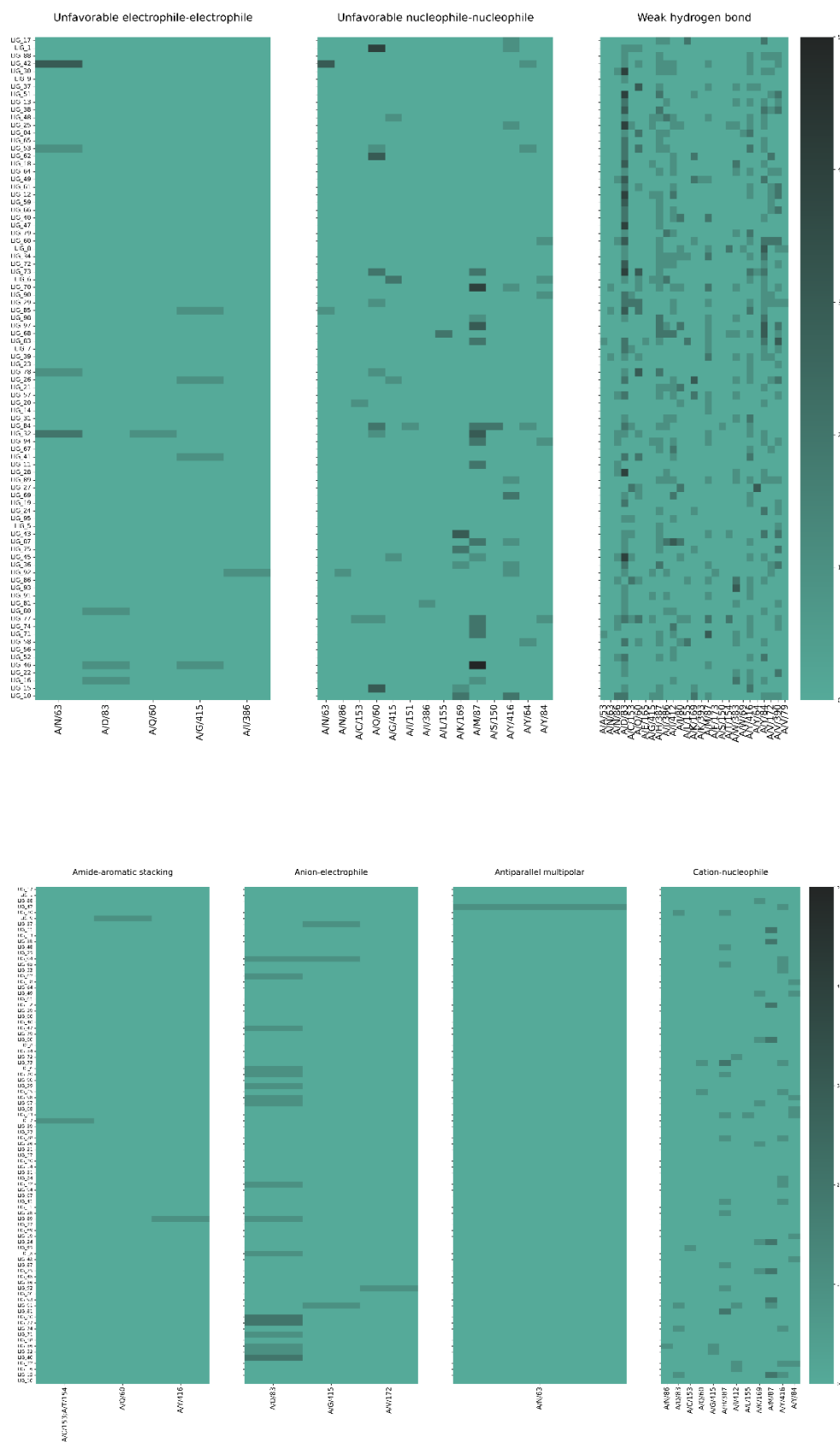




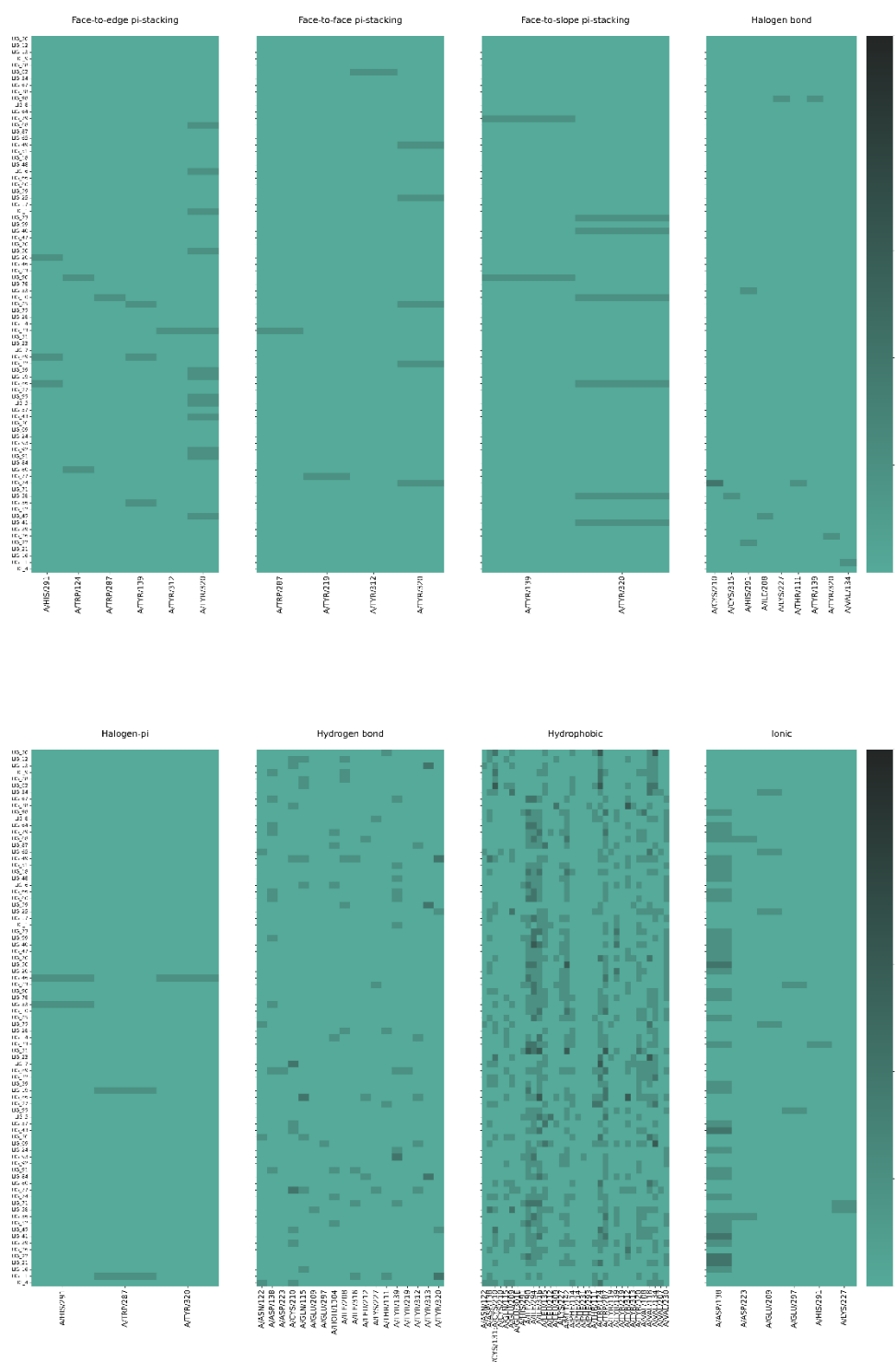


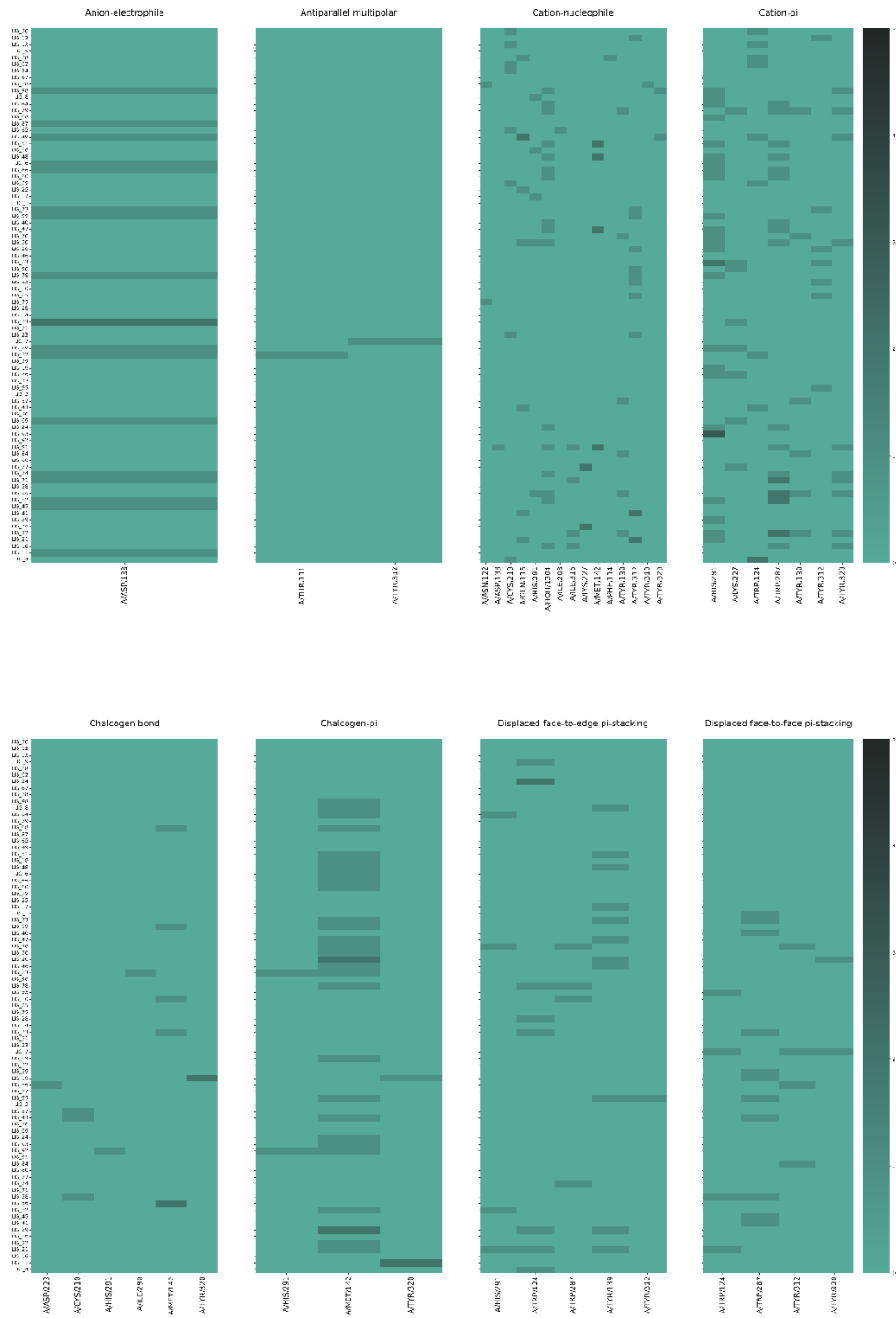






APÊNDICE A III – INTERAÇÕES CALCULADAS PARA O RECEPTOR KAPPA





not_EIFP60	not_EIFP49	not_EIFP13	not_EIFP37	not_EIFP34	not_EIFP10	not_EIFP96	not_EIFP21	not_EIFP85	not_EIFP25
not_FIFP48	not_FIFP17	not_FIFP15	not_FIFP35	not_FIFP26	not_FIFP81	not_FIFP16	not_FIFP11	not_FIFP29	not_FIFP11
not_HIFP21	not_HIFP27	not_HIFP24	not_HIFP79	not_HIFP11	not_HIFP39	not_HIFP31	HIFP3827	HIFP3827	HIFP3827
EIFP317	EIFP317	EIFP1750	EIFP2764	EIFP2764	EIFP3030	EIFP3030	EIFP3030	EIFP1055	EIFP1055
EIFP1759	EIFP1491	EIFP1278	EIFP1278	EIFP1278	EIFP495	EIFP495	EIFP3130	EIFP3130	EIFP2077
FIFP3659	FIFP3659	FIFP1765	FIFP3240	FIFP3240	FIFP429	FIFP429	FIFP2039	FIFP667	FIFP667
not_FIFP93	FIFP2291	FIFP2291	FIFP3029	FIFP3029	FIFP3029	FIFP1765	FIFP1765	FIFP2277	FIFP2277
not_FIFP13	not_FIFP36	not_FIFP11	FIFP40	FIFP2121	FIFP3175	FIFP3175	FIFP3175	FIFP4077	FIFP4077
HIFP1632	HIFP1632	HIFP1632	HIFP1117	HIFP1117	HIFP1117	HIFP920	HIFP920	HIFP906	HIFP906
not_EIFP96	not_EIFP27	not_EIFP31	not_EIFP25	EIFP1750	EIFP1750	EIFP778	EIFP778	EIFP778	EIFP3202
HIFP2450	HIFP64	HIFP3198	HIFP3198	HIFP3198	HIFP357	HIFP357	HIFP222	HIFP222	HIFP4060
not_HIFP33	not_HIFP11	not_HIFP90	HIFP2893	HIFP2893	HIFP187	HIFP187	HIFP1759	HIFP1759	HIFP1632
not_EIFP92	not_EIFP36	not_EIFP21	not_EIFP25	EIFP2075	EIFP4072	EIFP1602	EIFP1602	EIFP470	EIFP470
not_HIFP18	not_HIFP31	HIFP2495	HIFP2495	HIFP64	HIFP64	HIFP64	HIFP1555	HIFP1555	HIFP1555
not_EIFP38	not_EIFP38	not_EIFP20	not_EIFP24	not_EIFP82	not_EIFP21	not_EIFP97	not_EIFP85	not_EIFP28	not_EIFP25
not_EIFP21	not_EIFP97	EIFP679	EIFP2764	EIFP2943	EIFP2943	EIFP1146	EIFP1146	EIFP1146	EIFP522
not_HIFP33	not_HIFP16	not_HIFP91	not_HIFP91	not_HIFP31	HIFP2168	HIFP2168	HIFP40	HIFP40	HIFP3463
not_FIFP28	not_FIFP12	not_FIFP27	not_FIFP25	not_FIFP13	FIFP10	FIFP10	FIFP1765	FIFP3875	FIFP3875
not_FIFP18	not_FIFP14	not_FIFP33	not_FIFP11	not_FIFP93	not_FIFP29	not_FIFP11	FIFP3501	FIFP3501	FIFP4077
not_FIFP11	not_FIFP81	not_FIFP25	not_FIFP33	not_FIFP27	not_FIFP20	FIFP2173	FIFP2173	FIFP2173	FIFP4070
not_HIFP28	not_HIFP10	not_HIFP31	HIFP1946	HIFP1946	HIFP1946	HIFP3827	HIFP3827	HIFP3827	HIFP2447
not_A/TRP/	not_A/GLN/	not_A/TRP/	not_A/LYS/	not_A/ILE/3	not_A/CYS/	not_A/SER/	not_A/VAL/	not_A/HIS/	A/ASP/138/
A/ILE/290/	A/ILE/290/	A/TRP/124/	A/TRP/124/	A/TRP/124/	A/TRP/124/	A/TRP/124/	A/TRP/124/	A/ASP/138/	A/ASP/138/
not_A/TYR/	not_A/ILE/3	not_A/ILE/3	not_A/GLY/	not_A/SER/	not_A/TYR/	not_A/LYS/	A/THR/111/	A/ASP/138/	A/ASP/138/
not_A/TYR/	not_A/ASP/	A/TYR/313/	A/TYR/313/	A/ASP/138/	A/ASP/138/	A/CYS/210/	A/CYS/210/	A/CYS/210/	A/ILE/208/
not_A/ILE/3	not_A/GLY/	not_A/ILE/2	not_A/TYR/	A/ILE/208/	A/ASP/138/	A/ASP/138/	A/ASP/138/	A/MET/142/	A/LEU/309/
not_A/TYR/	not_A/ILE/3	not_A/GLN/	not_A/HIS/	not_A/CYS/	A/MET/142/	A/MET/142/	A/LYS/227/	A/LYS/227/	A/TRP/124/
A/VAL/118/	A/VAL/118/	A/TYR/139/	A/TYR/139/	A/CYS/210/	A/CYS/210/	A/CYS/210/	A/ILE/208/	A/ILE/208/	A/ILE/208/

APÊNDICE B II – MODELOS GERADOS PELO DBCICA PARA O RECEPTOR MU

[illegible]

