



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Planejamento e validação anti-proliferativa e anti-leishmania, de novos híbridos trifuncionalizados unidos através do anel 1,2,3-triazol e compostos similares.

Leonardo Bruno Federico

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química**.

RIBEIRÃO PRETO -SP

2016

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Leonardo Bruno Federico
ISBN: 978-84-9163-733-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48974>

LEONARDO BRUNO FEDERICO

Planejamento e validação anti-proliferativa e anti-leishmania, de novos híbridos trifuncionalizados unidos através do anel 1,2,3-triazol e compostos similares.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e a Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud da Universidad de Granada, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química** e em Farmácia, Área: **Química del medicamento**

Orientadores: Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva
Joaquín María Campos Rosa

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO

Leonardo Bruno Federico

Planejamento e validação anti-proliferativa e anti-leishmania, de novos híbridos tri-funcionalizados unidos através do anel 1,2,3-triazol e compostos similares.

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e a Escuela de Doctorado de Ciencias de la Salud da Universidad de Granada, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área: **Química** e em Farmácia, Área: **Química del medicamento**

Orientadores: Carlos Henrique Tomich de Paula da
Silva
Joaquín María Campos Rosa

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICATÓRIA

*À minha família pelo carinho,
compreensão e por todo esforço e apoio
empenhado para que este objetivo fosse
alcançado.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva e Joaquín Campos Rosa, pelo suporte, ensinamento, incentivo e convite para a realização deste projeto, além do acolhimento durante esses anos de trabalho.

Ao idealizador deste projeto Fernando Cidade Torres e a todos que contribuíram para o desenvolvimento do mesmo.

À minha família, por todo incentivo e apoio

À minha grande amiga, companheira e namorada Melina Teles França Sampaio pelo amor, apoio, carinho e incentivo.

Aos meus amigos do Laboratório Computacional de Química Farmacêutica (LCQF), Ricardo, João, Jonathan e Breno pelas trocas de experiências, pelas parcerias e pelo convívio dentro e fora do ambiente de trabalho.

Aos amigos que fazem parte do nosso ambiente de trabalho, Luiz, Marcelo, Peterson, Claudia, Susi, Ana, Talita, Ana Luisa, Andreza, Paulo, Carla, Carol e Raphael, por todos momentos de alegria.

Aos amigos que fiz na Universidad de Granada, Eugênia, Cesar, Manme e José, agradeço por toda hospitalidade, acolhimento e ajuda.

Aos amigos que fiz no exterior, Pablo, Manolo, Nieves, Michel, Joel, Francesca, David, inclusive os brasileiros, Alexandre, Gisele, Enrico, Ana e Ana Luz, e também aos que compartilhei moradia neste período, Paola, Ricardo, Mariana e Sarah, obrigado por toda troca experiência e vivencia, pela convivência que este período nos proporcionou e por todo apoio.

Ao CNPq e a CAPES pelo financiamento do projeto e pela bolsa concedida.

À Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP-RP) e a Facultad de Farmácia da Universidad de Granada (UGR), pelo suporte e infraestrutura.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação e da Secretaria de Pós-Graduação do Programa de Pós-Graduação em Química, em especial a Lâmia, por todo auxílio e ajuda.

Meus Sinceros Agradecimentos!

*“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.
Esses que fazeres se encontram um no corpo do outro.
Enquanto ensino continuo buscando, reprocurando.
Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago
e me indago. Pesquiso para constatar, constatando,
intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso
para conhecer o que ainda não conheço e comunicar
ou anunciar a novidade” (Freire, 2002).*

RESUMO

Federico, L. B. **Planejamento e validação anti-proliferativa e anti-leishmania, de novos híbridos tri-funcionalizados unidos através do anel 1,2,3-triazol e compostos similares**. 2016. 165f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

As concepções de moduladores da dinâmica dos microtúbulos, que levam ao bloqueio do ciclo celular, e de bloqueadores de canais de cálcio tipo – L (C_{av}), tais como o 1,4-dihidropiridinas e análogos, que diminuem a resistência do organismo humano aos tratamentos quimioterápicos através da inibição da proteína de transmembrana P-gp, são estratégias importantes tanto para terapias anticâncer quanto para leishmanicida. Esta abordagem tem mostrado resultados interessantes na diminuição da resistência à quimioterapia em câncer chamada de MDR (do inglês *Multi Drug Resistance*), além de também serem uma estratégia importante para controlar a fase inicial da leishmaniose. Diante desse contexto, e baseado no estudo de Ueki 2013 e colaboradores que, a partir de estudos anteriores, os quais relatam a superexpressão das enzimas estona deacetilase (HDAC) e catepsina L (CTSL) em células tumorais, propuseram um pró-fármaco seletivo, planejado a partir de um espaçador de lisina acetilada, que garante a liberação do fármaco seletivamente nas células tumorais, trabalhamos no desenvolvimento de uma nova proposta de pró-fármaco trifuncional. Nossa proposta foi desenvolvida a partir de estudos de triagem virtual, baseados em ligantes e em estrutura, predição das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADME/Tox) e também técnicas de bioinformática para a construção de um modelo de canal de cálcio, devido à inexistência de estruturas, do mesmo, que estivessem depositadas no banco de dados de proteínas PDB (Protein Data Bank). Dessa forma, selecionamos potenciais *hits* bloqueadores do canal de cálcio e de moduladores da tubulina, que futuramente farão parte de uma nova proposta de pró-fármaco trifuncional. Paralelamente, nosso grupo de síntese colaborador sintetizou, através de técnicas de "Click Chemistry" e reações de Mitsunobu multicomponentes, uma biblioteca de novos híbridos trifuncionais, os quais, após estudos de atividade biológica, foram avaliados (*in silico*) frente à estrutura da tubulina, e os compostos mais promissores desta biblioteca serviram de base para novos estudos de triagem virtual e consequente obtenção de novos *hits* na luta contra o câncer e a leishmaniose.

Palavras-chave: antineoplásicos, leishmanicida, MDR, canal de cálcio, tubulina, triagem virtual

Resumen

Federico, L. B. **Planificación y validación antiproliferativa y anti-leishmania de nuevos híbridos tri funcionalizado unidos a través del anillo 1,2,3-triazol y similares.** 2016. 165f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Los conceptos de modulación de la dinámica de los microtúbulos, que conducen a la obstrucción del ciclo celular y de los bloqueadores de los canales de calcio tipo L - (CAV), como las 1,4-dihidropiridinas y análogos, que reducen la resistencia del cuerpo humano a los tratamientos quimioterápicos mediante la inhibición de la proteína transmembrana P-gp, son estrategias importantes para terapias contra el cáncer y también leishmania. Este enfoque ha dado resultados interesantes en una menor resistencia a la quimioterapia del cáncer llamado MDR (inglés: Multi Drug Resistance), al mismo tiempo que es una estrategia importante para controlar la etapa inicial de la leishmaniasis. En este contexto, y con base en el estudio de Ueki 2013 y colaboradores que, a partir de estudios anteriores, donde ha sido reportado la sobreexpresión de las enzimas histona Estona (HDAC) y catepsina L (CTSL) en las células tumorales, han propuesto un profármaco selectivo, planificado desde un enlace/link de lisina acetilado, que asegura la liberación del fármaco selectivamente en las células tumorales, nosotros hemos trabajado para desarrollar una nueva propuesta de profármaco trifuncional. Nuestro propósito ha sido desarrollado en estudios basados en cribados virtuales (basado en ligantes y en estructura), predicción de las propiedades farmacocinéticas y toxicológicas (ADME / Tox) y también técnicas en bioinformática para la construcción de un modelo de canal de calcio, este debido a la inexistencia de estructuras de este tipo en el banco de datos de proteínas PDB (Protein Data Bank). Por lo tanto, hemos seleccionado *hits* bloqueadores de los canales de calcio y *hits* moduladores de la tubulina, que en el futuro serán parte de una nueva propuesta de profármaco trifuncional. Del mismo modo, nuestro grupo colaborador de síntesis ha sintetizado, utilizando técnicas de "Click Chemistry y reacciones de Mitsunobu de múltiples componentes, una biblioteca de nuevos híbridos trifuncionales que, después de los estudios de actividad biológica, fueron también evaluados contra la estructura de la tubulina (por estudios de química computacional), y los compuestos más prometedores de esta biblioteca sirvieron como base para nuevos estudios de cribado virtual, con vistas a obtener nuevos *hits* en la lucha contra el cáncer y leishmaniasis.

Palabras clave: antineoplásicos, leishmanicida, MDR, canales de calcio, tubulina, cribado virtual

ABSTRACT

Federico, L. B. **Design, anti-proliferative and anti-leishmanial evaluation of new tri-functionalized hybrids linked through a 1,2,3-triazole moiety and similar compounds.** 2016. 165f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The concepts of modulating microtubule dynamics, and calcium channel L-types (CAV) blockers are important strategies for anticancer and antileishmanial therapies. Microtubule modulators that blocks the cell cycle and the calcium channel blockers, such as, 1,4-dihydropyridines and analogues, reduce the resistance of the human body to chemotherapeutic treatments by inhibiting transmembrane P-gp protein. This approach has shown interesting results in reduced resistance to chemotherapy in cancer called MDR (Multi Drug Resistance), and an important strategy for controlling the early stage of leishmaniasis. In this context, we work to develop a new proposal for trifunctional prodrug. We have based on the study of Ueki 2013 and collaborators, which, from earlier studies with reported overexpression of both deacetylase estona enzymes (HDACs) and cathepsin L (CTSL) in tumor cells, proposed a selective prodrug. This selective prodrug have been now designed by us considering an acetylated lysine link/spacer, which ensures the release of the drug selectively in tumor cells. Our work was to develop, through virtual screening studies (ligand- and structure-based virtual screening), prediction of the pharmacokinetic and toxicological properties (ADME /Tox) and also to use bioinformatics techniques for building of a calcium channel model, due to lack of structures thereof deposited in the Protein Data Bank. Thus, we have selected novel potential hits calcium channel blockers as well as hits tubulin modulators, which, in the future, they will be part of a new proposal for prodrug trifunctional. Similarly, our collaborator group on synthesis has prepared a library of new trifunctional hybrids, using Click Chemistry and Mitsunobu multicomponent reactions. We have evaluated these compounds regarding a tubulin activity (by using computational chemistry studies), after biological activity studies already realized, and the most promising compounds from this library have served as basis for new virtual screening studies in the fight against cancer and leishmaniasis.

Keywords: antineoplastic, leishmanicidal, MDR, calcium channel blockers, tubulin, virtual screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo dos substratos identificados por sofrerem ação da: MDR1, MRP e MXR: BIS, Bisantrene; CA, Calceína; CA-AM, Calceína-AM; COL, Colchicina; DNR, Daunorrubicina; DOX, Doxorrubicina; EPI, Epirubicina; LTC4, Leucotrieno C4; LYS, LysoTracker; MTX, Metotrexato; MX, Mitoxantrona; NEM-GS, N-ethyl maleimida glutationa; PRA, Prazosina; RHO, Rodamina 123; TXL, Taxol; TOP, Topotecano; VBL, Vinblastina; VER, Verapamil; VP-16, Etoposide³ 25

Figura 2. (a) Fases da divisão celular: **G1** ou Pré-sintética, o intervalo anterior à síntese de DNA; **S**, Síntese de DNA; **G2** ou pós sintética, o intervalo entre a síntese de DNA e início da mitose; **M**, Período da Mitose; **G0** ou não-proliferativa, a fase de repouso; **R**, Ponto de Restrição período de Início ou não da síntese. Adaptado de Robert A. Weinberg 1996⁷⁷ (b) Classes de medicamentos utilizados no tratamento de neoplasias de acordo com cada fase do ciclo celular⁷⁵ 31

Figura 3. Organização dos heterodímeros α -tubulina e β -tubulina, originando um protofilamento que, por sua vez, se organiza para dar origem a um microtúbulo. Adaptado de: Downing, 2000⁸⁹ 34

Figura 4. Dinâmica de instabilidade dos microtúbulos podendo observar os dímeros GTP-tubulina em vermelho, GDP-tubulina em cinza e os períodos: (a) de crescimento rápido devido à alta concentração tubulina-GTP período em que a taxa de crescimento supera a hidrólise, (b) quando a oferta de GTP-tubulina não é elevada a hidrólise se equipara ao crescimento e ocorre a diminuição da terminação GTP-tubulina, (c) fenômeno de catástrofe ocorrido devido as fracas interações entre o GDP-tubulina no microtúbulo e (d) fenômeno de resgate, incorporação de novos dímeros GTP-tubulina⁸⁸ 36

Figura 5. (a) Modelo esquemático dos fármacos que interagem com a tubulina e promovem a estabilização e desestabilização dos microtúbulos.²⁸ (b) Representação em 3D (com Diagrama *Ribbons*) da localização dos sítios da colchicina (amarelo), da vimblastina (cinza), do taxol (verde), do GDP (vermelho) e do GTP (azul) na estrutura da tubulina. 37

Figura 6. Estruturas 2D de: (a) Taxol¹⁰², (b) vincristina, (c) vimblastina e (d) colchicina 38

Figura 7. Representação esquemática das subunidades de um modelo de canal de cálcio, na qual, podem ser observadas as subunidades formadoras do canal de cálcio. Destaca-se a subunidade $\alpha 1$ que é a subunidade formadora do poro¹¹² 40

Figura 8. Representação esquemática da porcentagem de identidade sequencial entre as famílias dos canais de cálcio, bem como as nomenclaturas atual e antiga¹¹³ 41

Figura 9. Representação esquemática da subunidade $\alpha 1$ do canal de cálcio tipo-L, visualização dos segmentos e alças, bem como da organização dos mesmos formando a unidade estrutural. 42

Figura 10. Representação esquemática do processo de liberação seletiva do fármaco em células tumorais ³⁰	44
Figura 11. Representação esquemática da proposta de moléculas inibidoras da tubulina, onde não ocorreria a ação das P-gp, com seletividade para células tumorais.	44
Figura 12. Esquema representativo das técnicas utilizadas para descoberta de fármacos baseados nos ligantes e na estrutura. Baseado em Sliwoski e colaboradores, 2014 ¹²³ e Liao e colaboradores, 2011 ¹²⁹	48
Figura 13. Esquema representativo sobre as categorias de VS: (a) VS clássico, (B) VS em paralelo, (c) VS interativo e (d) VS integrado. Os funis representam os protocolos utilizados e os balões, os ensaios experimentais.	49
Figura 14. Fluxograma utilizado para os estudos de triagem virtual para a obtenção de hits para compor o núcleo inibidor do canal de cálcio (Estratégia1).	55
Figura 15. Fluxogramas gerais utilizados para obtenção de <i>hits</i> que irão compor o núcleo inibidor da tubulina de nossa proposta. (a) Estratégia 2 e (b) Estratégia 3	56
Figura 16. Fluxograma geral utilizado para obtenção de <i>hits</i> que irão compor o núcleo inibidor da tubulina de nossa proposta.	57
Figura 17. Representação esquemática do método de geração de confôrmeros utilizado pelo Glide ^{160,161}	62
Figura 18. Análise do ligante feita pelo Glide. (a) Representação dos grupos rotâmeros e núcleos, (b) determinação do ponto central ^{160,161}	63
Figura 19. Representação esquemática do algoritmo genético utilizado pelo GOLD ... 64	
Figura 20. Representação do Diagrama de <i>Ramachandran</i> de uma dada proteína.	77
Figura 21. Representação dos ângulos ϕ, ψ de um aminoácido na cadeia principal de uma proteína ¹⁹³	78
Figura 22. Representação esquemática da Estratégia1 de triagem virtual utilizada para a seleção de compostos com potenciais atividades inibitórias do canal de cálcio.	80
Figura 23. Representação esquemática das subunidades e dos segmentos utilizados para a construção do modelo de canal de cálcio do tipo-L. Em azul, os segmentos S5, P e S6 das quatro subunidades modeladas que, juntas, formam a região central do poro do canal de cálcio.	82
Figura 24. Resultado obtido pelo algoritmo <i>protein Blast</i> , para a entrada Q13936 isoforma20.	82
Figura 25. Visualização do modelo 3 (a-c) excluído e modelo 2 (b-d). As setas roxas indicam a alça posicionada de forma incorreta na geração do modelo 3 e posicionada corretamente na geração do modelo 2.	85

- Figura 26. Resumo da avaliação estereoquímica do modelo selecionado e construído por homologia estrutural para o canal de cálcio do tipo-L - hipótese 1 do modelo2. (a) e o respectivo Diagrama de *Ramachandran* (b)..... 87
- Figura 27. Representação *Ribbons* do modelo construído de canal de cálcio do tipo-L sinalizando as regiões de interações utilizadas/observadas nos estudos de *docking*. (a) Região alostérica e (b) poro central..... 90
- Figura 28. Representação em *Ribbons* dos seguimentos IIIS5, IIIP, IIIS6, IVS5, IVP e IVS6 com os resultados da validação do centroide no poro central feita com o auxílio dos programas (a) **GOLD** e (b)**Glide**. 91
- Figura 29. Sobreposição dos melhores resultados de validação do centroide para a região alostérica com (a) **GOLD** e (b) **Glide**. 91
- Figura 30. Representação estrutural 2D do ligante (*R*)-*Bay K 8644* modificado, utilizado como referência para os estudos de triagem virtual por similaridade. 93
- Figura 31. Representação dos modos de interação do composto selecionado **ZINC7563** na região do poro central (a-c) e alostérica em (b-d) em duas e três dimensões, obtidas como resultado do programa **GOLD**..... 96
- Figura 32. Representação dos modos de interação do composto selecionado **Omega18035** na região do poro central (a-c) e alostérica em (b-d) em duas e três dimensões, obtidas como resultado do programa **GOLD**..... 97
- Figura 33. Representação dos modos de interação do composto selecionado **ZINC03876174** na região do poro central (a-c) e alostérica em (b-d) em duas e três dimensões, obtidas como resultado do programa **Glide**. 98
- Figura 34. Representação dos modos de interação do composto selecionado **ZINC1281** na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b-d) em duas e três dimensões. 99
- Figura 35. Representação dos modos de interação do composto selecionado **ZINC125031** na região alostérica com o programa **Glide** (a) e **GOLD** (b-c) em duas e três dimensões. 100
- Figura 36. Representação dos modos de interação do composto selecionado **Omega16616** na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b) em duas e três dimensões. 101
- Figura 37. Representação dos modos de interação do composto selecionado **Omega19776** na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b-d) em duas e três dimensões. 102
- Figura 38. Representação dos modos de interação do composto selecionado **Omega26335** na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b-d) em duas e três dimensões. 103

- Figura 39. Representação dos modos de interação do composto selecionado **BindingDB28699** na região do poro central com o programa **Glide** (a) em três dimensões e (b) em duas..... 104
- Figura 40. Estruturas planas dos compostos selecionados com potencial atividade bloqueadora do canal de cálcio..... 105
- Figura 41. Representação em duas dimensões dos ligantes **colchicina** e **BAL27862** utilizados como referência para os estudos de similaridade..... 106
- Figura 42. Representação em *Ribbons* da interface do sítio da colchicina na região alfa e beta da tubulina identificando a alça T5 (azul) em α e a alça T7(vermelho), as hélices H7 (verde) e H8 (amarelo) e as folhas beta S8 (laranja) e S9 (rosa) em β 106
- Figura 43. Representação *Ribbons* da interface do sítio da colchicina na região alfa e beta da tubulina no identificando resíduos (vermelho) responsáveis pela interação da colchicina (rosa) e os resíduos (azul escuro) responsáveis pela interação do ligante **BAL27862** (azul claro)..... 107
- Figura 44. Representação em *Ribbons* da sobreposição das estruturas PDB ID4O2A e 4O2B onde podemos observar a movimentação da alça T7 e do resíduo Lys352. 108
- Figura 45. Visualização dos resultados de validação (*redocking*): (a) **BAL27862** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID:4O2B e (b) **colchicina** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID: 4O2A obtidos pelo programa **Glide**..... 108
- Figura 46. Visualização dos resultados de validação (*redocking*): (a) **BAL27862** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID:4O2B e (b) **colchicina** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID: 4O2A obtidos pelo programa **GOLD**. 109
- Figura 47. Representação esquemática da Estratégia2 de triagem virtual utilizada para a seleção de compostos com potenciais atividades moduladoras da tubulina..... 110
- Figura 48. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A e os valores de RMSD e máxima diferença entre átomos. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de *docking* com o **GOLD** e em azul com o **Glide**. 114
- Figura 49. Representação em duas dimensões dos compostos selecionados através dos estudos de *docking* na estrutura PDB ID: 4O2A. 115
- Figura 50. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2B. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de *docking* com o **GOLD** e em azul com o **Glide**. 117
- Figura 51. Representação em duas dimensões dos compostos selecionados através dos estudos de *docking* na estrutura PDB ID: 4O2B 118
- Figura 52. Representação esquemática da Estratégia3 de triagem virtual utilizada para a seleção de compostos com potenciais atividades moduladoras da tubulina..... 120

- Figura 53. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na Estratégia3 com a interface $\alpha\beta$ -tubulina na estrutura PDB ID:4O2A. Em verde, o ligante cristalográfico **BAL27862** e em laranja o resultado apresentado pelo **GOLD**. 122
- Figura 54. Representação em três e em duas dimensões (esquemática) das propostas de interações obtidas em estudos de *docking* do composto **Omega2918** com a região $\alpha\beta$ -tubulina. 123
- Figura 55. Representação em três e em duas dimensões das propostas de interações obtidas em estudos de *docking* do composto **Omega1933** com a região $\alpha\beta$ -tubulina.. 124
- Figura 56. Representação em três e em duas dimensões das propostas de interações obtidas em estudos de *docking* do composto **Omega3815** com a região $\alpha\beta$ -tubulina.. 124
- Figura 57. Representação em duas dimensões dos 10 *hits* selecionados através da **Estratégia3**..... 125
- Figura 58. Representação das estruturas em duas dimensões dos compostos planejados por nossa equipe de síntese..... 126
- Figura 59. Visualização da sobreposição do ligante cristalográfico **Bal27862** (ciano) do resultado da pose de docking gerada para o composto **PDJ26** (amarelo) obtidas nas simulações dos programas **Glide** e **GOLD**, respectivamente. 130
- Figura 60. Visualização da sobreposição do ligante cristalográfico **Bal27862** (ciano) do resultado da pose de docking gerada para o composto **PDJ27** (amarelo) obtidas nas simulações dos programas **Glide** e **GOLD**, respectivamente. 131
- Figura 61. Visualização da sobreposição do ligante cristalográfico **Bal27862** (ciano) do resultado da pose de docking gerada para o composto **PDJ29** (amarelo) obtidas nas simulações dos programas **Glide** e **GOLD**, respectivamente. 132
- Figura 62. Esquema representativo da sequência de triagem virtual nomeada como Estratégia4 134
- Figura 63. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ26** na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de docking com o **GOLD** e em azul com o **Glide**. 137
- Figura 64. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ27** na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de docking com o **GOLD** e em azul com o **Glide**. 138
- Figura 65. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ29** na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A. Em vermelho os resultados obtidos com simulações de docking com o **GOLD** e em azul com o **Glide**..... 140

Figura 66. Representação em 2D dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ26** 141

Figura 67. Representação em 2D dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ27** 142

Figura 68. Representação em 2D dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ29** 143

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência, Mortalidade e Estimativa de casos de câncer para distintas regiões mundiais para o ano de 2012 feita pelo projeto GLOBOCAN da IARC ^{66,67}	27
Tabela 2. Classificação dos subgêneros da Leishmaniose, agrupados na classificação de Novo e Velho Mundo	33
Tabela 3. Avaliações das interações ocorridas entre os tipos de átomos do ligante e do receptor pela função PLP ^{162,166}	68
Tabela 4. Relação entre os valores de pontuação e as distâncias entre as interações.	69
Tabela 5. Sequência Q13936 isoforma 20 utilizado para entrada no programa <i>protein Blast</i>	82
Tabela 6. Sobreposição feita através do programa Maestro a qual é possível observar as regiões de alça (<i>C-coil</i>) e hélice (<i>H-helix</i>).....	84
Tabela 7. Alinhamento das sequências de aminoácidos Q13936 (CAC1 Human) e 2A9H.	84
Tabela 8. Resultados da validação por recuperação de compostos com IC ₅₀ conhecidos na região do poro central para o programa (a) GOLD e (b) Glide	92
Tabela 9. Resultados da validação por recuperação de compostos com IC ₅₀ conhecidos na região alostérica para o programa (a) GOLD e (b) Glide	92
Tabela 10. Relação entre dos compostos sobreviventes após os estudos de LBVS com o ligante referência (R)-Bay K 8644 modificado	94
Tabela 11. Classificação e valor de pontuação dos contaminantes recuperados para a estrutura 4O2A utilizando o programa Glide e GOLD, respectivamente.	109
Tabela 12. Classificação e valor de pontuação dos contaminantes recuperados para a estrutura 4O2B utilizando o programa Glide e GOLD , respectivamente.	109
Tabela 13. Relação dos compostos sobreviventes em cada base de dados em estudo após os estudos de LBVS (Estratégia2)	111
Tabela 14. Relação dos compostos sobreviventes em cada base de dados em estudo após as duas triagens executadas na Estratégia3	120
Tabela 15. Resultados de pontuação obtidos através das simulações de docking pelos programas Glide (<i>XP GlideScore</i>) e GOLD (<i>GOLD ChemPLP</i>) e IC ₅₀	129
Tabela 16. Relação dos compostos sobreviventes em cada base de dados em estudo após os estudos de LBVS (Estratégia4)	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADME/Tox	Absorção, distribuição, metabolização, excreção, toxicidade
C _a v	Canal de cálcio dependente de voltagem
CCDC	<i>The Cambridge Crystallographic Data Centre</i>
CMBI	<i>Centre for Molecular and Biomolecular Informatics</i>
CTSL	Catepsina L
DHPs	dihidropiridinas
EMBL-EBI	<i>European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HDAC	<i>Histone deacetylase</i>
HTS	<i>High-throughput screening</i>
HVA	<i>High-voltage-activated</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LBDD	<i>Ligand-Based Drug Design</i>
LBVS	<i>Ligand-based virtual screening</i>
LC	Leishmaniose cutânea
LT	Leishmaniose tegumentar
LV	Leishmaniose visceral
LVA	<i>Low-voltage activated</i>
MDCK	<i>Madin-Darby canine kidney</i>
MDR	<i>Multi-drug resistance</i>
MM	<i>Molecular mechanic</i>
MRP1	<i>Multidrug resistance protein 1</i>
MXR	<i>Mitoxantrone-resistance protein,</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTDs	<i>Neglected Tropical Diseases</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P-gp	P-glicoproteína

QM	<i>Quantum Mechanics</i>
QSAR	<i>Quantitative structure–activity relationships</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
SBDD	<i>Structure-based Drug Design</i>
SBVS	<i>Structure-Based Virtual Screening</i>
SLC	<i>Solute Carriers</i>
UCFS	University of California San Francisco
VS	<i>Virtual Screening</i>

SUMÁRIO

1. Introdução	21
1.1. Resistencia a Múltiplos Fármacos (MDR).....	23
1.2. Câncer	26
1.3. Leishmaniose	31
1.4. O alvo farmacológico principal: a Tubulina.	34
1.5. O alvo farmacológico secundário: o canal de cálcio dependente de voltagem (Cav)	38
1.6. Fundamentação da hipótese: seletividade através da lisina acetilada.	43
1.7. Métodos Computacionais	45
2. Objetivos	50
2.1. Objetivos gerais	50
2.2. Objetivos específicos	50
3. Metodologia	54
3.1. Programas e metodologia computacionais	57
3.1.1. Preparação das bases de dados - Omega	58
3.1.2. Desenho de fármacos baseados em ligantes - ROCS e EON	60
3.1.3. Desenho de fármacos baseado na estrutura - GLIDE e GOLD	61
3.1.4. Predição das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (QikProp e DEREK)	70
3.2. Modelagem de proteínas por homologia	72
3.2.1. Pesquisa por sequências homólogas – Blast ;.....	73
3.2.2. Alinhamentos das sequências – Clustal Omega	74
3.2.3. Construção do modelo – Modeller ;.....	75
3.2.4. Avaliação – WhatIf e Procheck	76
3.2.5. Visualização gráfica - Maestro	78

4. Discussão dos resultados	79
4.1. Tarefa1	79
4.1.1. Triagem Virtual para descoberta de compostos bloqueadores do canal de cálcio (Estratégia1)	79
<i>Desenvolvimento do modelo de Canal de cálcio tipo-L, por homologia estrutural.</i> .	80
<i>Etapa de alinhamento</i>	81
<i>Etapa de construção do modelo</i>	85
<i>Etapa de avaliação do modelo</i>	86
<i>Etapa de validação do modelo</i>	87
<i>Triagem virtual para inibidores do canal de cálcio.</i>	92
4.1.2. Triagem virtual para moduladores da Tubulina a partir de dados reportados na literatura (Estratégias 2 e 3)	105
<i>Discussão dos resultados obtidos na Estratégia2</i>	110
<i>Discussão dos resultados obtidos na Estratégia 3</i>	119
4.2. Tarefa2	126
4.2.1. Estudo relação estrutura atividade dos compostos PDJs e FCT.....	126
4.2.2. Triagem virtual de moduladores da tubulina a partir de dados experimentais (Estratégia4).....	133
5. Conclusões e Perspectivas Futuras	145
5.1. Referentes à Tarefa1(Estratégia1)	145
5.2. Referentes à Tarefa1 (Estratégias2 e 3)	145
5.3. Referentes à Tarefa2 (Estratégia4)	146
5.4. Considerações finais e perspectivas futuras.....	146
6. Referencias Bibliográficas.....	148
7. Anexos.....	160
7.1. Dados Suplementares.....	161
Anexo 1. Alinhamento entre as sequências PDB ID:4LTO e QIso20 feitas com o programa Clustal Omega	160

Anexo 2 Alinhamento entre as sequências PDB ID:2A9H PDB ID:4LTO e QIso20 feitas com o programa Clustal Omega	160
Anexo 3. Resultados (ainda não publicados) dos ensaios biológicos feitos para a atividade leishmanicida.	161
Anexo 4. Gráficos relativos a Curva Dose Resposta relativos as atividades leishmanicidas dos compostos sintetizados por nosso grupo de síntese e o controle Anfotericina B.	161
Anexo 5. Esquemas gráficos dos resultados (ainda não publicados) obtidos em ensaios biológicos para a atividade antineoplásica dos compostos PDJ15, PDJ16, PDJ17, FCT1, PDJ26, PDJ27, PDJ28 e PDJ29.....	164
7.2. Produções Científicas.....	166

1. Introdução

O desenvolvimento de novos fármacos contra doenças neoplásicas e doenças negligenciadas, como o câncer e a leishmaniose, respectivamente, é uma das prioridades atuais da área de ciências da vida. A dificuldade nesta área de pesquisa está em descobrir novos agentes seletivos a células de tumor e ao parasita, capazes de inibir proliferação dos mesmos, mas sem causar toxicidade geral.

O uso da quimioterapia tradicional para o tratamento do câncer e da leishmaniose ainda é muito limitado. Um dos maiores desafios, e também a principal responsável por casos de insucessos nos tratamentos quimioterápicos contra essas enfermidades, é a chamada “resistência a múltiplos fármacos” (MDR do inglês: *multi-drug resistance*). A MDR é responsável por impedir o paciente em obter respostas ao tratamento quimioterápico em detrimento da diminuição da concentração de fármacos no meio intracelular e, por consequência, em seus locais de ação. O principal e mais estudado meio pelo qual isso acontece, é decorrente à ação da proteína de transmembrana P-glicoproteína (P-gp) que é responsável pelo efluxo de fármacos e xenobióticos do meio intracelular¹⁻⁵.

O perfil epidemiológico das doenças neoplásicas e da leishmaniose são distintos. Enquanto o câncer é um problema de saúde mundial e responsável por 1 a cada 7 casos de óbito no mundo, a leishmaniose, que ainda é uma das doenças mais negligenciadas do mundo, atinge principalmente os países de baixa renda e em desenvolvimento, sendo responsável por cerca de 2 milhões de novos casos por ano⁶⁻⁸.

Segundo a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês: *International Agency for Research on Cancer*), da Organização Mundial da Saúde (OMS), foi estimado em 2012 um número de 14,1 milhões de casos de câncer no mundo, dos quais 8,2 milhões de pessoas vieram a óbito. Ainda segundo a OMS, estima-se para o ano de 2030 um número de 21,4 milhões de pacientes com câncer, dentre os quais 13,2 milhões de pessoas falecerão^{7,8}. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para os anos de 2014 e 2015 aproximadamente 576 mil casos de pessoas com o diagnóstico de câncer, e este perfil se agravará nos próximos anos em virtude do processo de mudança demográfica que ocorre no Brasil, o qual agrava a ocorrência das doenças crônico-degenerativas⁸.

Em relação aos dados epidemiológicos da leishmaniose, a OMS convocou em março de 2010 um Comitê de Peritos sobre Leishmaniose para emissão de um relatório técnico atualizado sobre a leishmaniose, em virtude da escassez desses dados. Como resultado, puderam estimar um total de 98 países com transmissão de leishmaniose endêmica, totalizando de 0,2 a 0,4 milhões de casos de leishmaniose visceral (LV) e 0,7 a 1,2 milhões de casos de leishmaniose tegumentar (LT), por ano. Ainda foi relatado, que mais de 90% dos casos globais de LV estão hoje em apenas 6 países: Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão Meridional, Etiópia e Brasil^{9,10}.

Atualmente estima-se 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose por ano no mundo, sendo 300 mil de LV, com cerca de 20 mil a 50 mil casos de morte ao ano, e 1 milhão de LT¹¹. No Brasil, a média de casos de LV entre os anos de 2005 a 2009 foi de 3.679, de 3.558 casos por ano de 2010 a 2012, e de 24684 casos por ano de LT no período de 2005 a 2009^{6,12}. Estes altos números de incidência, bem como, a gravidade desta enfermidade, exprime a necessidade de descobrimento e estudo de novos agentes contra esta parasitose.

Os pontos em comum entre as duas patologias citadas acima, i.e. o câncer e a leishmaniose, são a utilização da tubulina como potencial alvo farmacológico¹³⁻²¹ e, em muitos casos, a ocorrência de MDR ao se utilizar essa estratégia de tratamento²²⁻²⁴. Além dos medicamentos em uso para o tratamento do câncer, existe uma vasta literatura sobre a utilização de compostos moduladores da tubulina com atividades leishmanicida, tais como derivados de dinitroanilina e benzimidazóis^{20,25-27}. Em particular, os benzimidazóis têm sido planejados para interagir com a tubulina no sítio da colchicina, o qual é uma região potencialmente promissora da tubulina. Este sítio acomoda moléculas com menor lipofilicidade, quando comparados aos alcaloides da vinca, por exemplo, além de diferentes estudos relatarem que alguns fármacos que interagem nesta região detêm a propriedade de superar a MDR^{28,29}.

Em virtude dos dados apresentados acima, a presente Tese doutoral tem por objetivo o planejamento, com vistas ao desenvolvimento, de novos agentes capazes de modular a ação da tubulina e não sofrerem ação da P-gp, e como consequência, não sofrerem MDR. Nosso grupo de pesquisa liderado pelos professores Drs. Carlos H. T. P. Silva (FCFRP/USP) e Joaquín Campos Rosa (Facultad de Farmácia, Universidad de Granada, Espanha) estuda a proposta de um pró-fármaco duplo constituído por um núcleo com características semelhantes às dihidropiridinas (DHPs), responsáveis pela inibição

da P-gp, e outro com características semelhantes à colchicina, responsável pelo efeito citotóxico ocasionado pela inibição da tubulina. Estes dois núcleos serão ligados por lisina acetilada, visando à seletividade para as células tumorais. Dessa forma, propomos um pró-fármaco cuja intenção é ser seletivo às células tumorais, citotóxico e não sofrer MDR.

Nossa proposta está baseada no estudo de Ueki³⁰ 2013 e colaboradores, que a partir de estudos anteriores, os quais relatam a superexpressão das enzimas estona deacetilase (HDAC)³¹⁻³³ e catepsina L (CTSL)^{34,35} em células tumorais, propuseram um pró-fármaco seletivo para células tumorais, planejado a partir de um *link* de lisina acetilada. A ação destas duas enzimas, quando superexpressas, liberam o fármaco seletivamente nas células tumorais.

Para o desenvolvimento e o estudo dos dois núcleos que farão parte da nossa proposta, bem como a avaliação e o estudo das propostas do nosso grupo de síntese, utilizamos técnicas computacionais de planejamento de fármacos³⁶⁻³⁹. Foram utilizadas técnicas de Ligand-based Drug Design (LBDD), Structure-based Drug Design (SBDD), predição das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (ADME/Tox), além de técnicas de bioinformática.

1.1. Resistencia a Múltiplos Fármacos (MDR)

A MDR foi primeiramente observada em 1976 por Juliano e Ling⁴⁰, que notaram correlação entre a diminuição da permeabilidade da colchicina em células tumorais de ovário de hamsters e o aumento da expressão de P-glicoproteínas. Estudos posteriores identificaram a existência de duas formas de ocorrência da MDR: a inata, chamada de intrínseca, e a que se desenvolve durante o tratamento quimioterápico, neste caso chamada de resistência adquirida. No caso da MDR inata, as células tumorais desenvolvem uma diferenciação celular ou uma variação genética no início da formação do tumor, o que implica em não haver resposta pelo paciente aos medicamentos, desde o início do tratamento. Já a MDR adquirida aparece no decorrer do tratamento, devido à proliferação de células com variáveis raras, tornando o paciente resistente aos medicamentos no decorrer do tratamento^{41,42}.

O conceito de MDR é genérico, isto é, ele não está relacionado apenas a uma classe de medicamentos ou a um alvo específico, o que intriga ainda mais os pesquisadores da área. Em outras palavras, fármacos sem nenhuma familiaridade estrutural ou farmacológica podem estar envolvidos no fenômeno da MDR. Tal fato se relaciona com os fatores envolvidos que podem ser decorrentes da diminuição do influxo ou aumento do efluxo dos fármacos pelas membranas, alterações no alvo molecular, alterações no metabolismo do fármaco, sequestro de fármacos por vesículas, aumento dos mecanismos de reparo do DNA e incapacidade da célula em sofrer apoptose²⁻⁵.

No que diz respeito à MDR relacionada com a passagem de fármacos pelas membranas, as vias que afetam a diminuição da concentração de fármaco no meio intracelular podem estar relacionadas com a ação de mais de 400 transportadores de membranas. Estes transportadores são agrupados em duas grandes famílias: a família de transportadores de soluto (SLC, do inglês *solute carriers*) e a superfamília ABC (do inglês *ATP-binding cassette*), da qual já foram identificados 48 transportadores que agem de formas distintas. A ação da SLC, relacionada à MDR, causa diminuição do influxo de fármacos para o interior das células, o contrário se observa na ação da superfamília ABC, a qual age diminuindo a concentração de fármacos no interior das células, ocasionado pelo efluxo dos mesmos^{3,43,44}.

A primeira e mais estudada proteína transportadora da superfamília ABC foi a P-glicoproteína (P-gp, MDR1 ou ABC B1). Em seguida foram identificadas outras proteínas transportadoras dessa família, que foram divididas em 7 classes (A-G). As que conferem a propriedade de exercer a MDR estão presentes nas classes A, B, C e G, sendo as principais: a MRP1 (do inglês *multidrug resistance protein 1*, também chamada de ABC C1), e pela ação da proteína resistente a mitoxantrona MXR (do inglês *mitoxantrone-resistance protein*, também chamada de ABC G2)^{3,5,45-47}. Muitos quimioterápicos importantes já foram identificados como substratos para essas classes de transportadores e podem ser observados na Figura 1³.

Dentro da superfamília família ABC, a P-glicoproteína é a classe mais amplamente estudada⁴⁸. Isto deve-se à descoberta da superexpressão dessa proteína em células tumorais e à redução de sua concentração no ambiente intracelular de fármacos tais como antraciclinas, alcaloides da vinca e taxanos. Abundantemente expressa na mucosa intestinal, no epitélio do fígado, placenta e barreira hematoencefálica, a função da P-gp está relacionada com o transporte de toxinas e xenobióticos (moléculas

lipofílicas) para o meio extracelular, forma pela qual os alcaloides da vinca são excretados para fora das células^{2,49-52}. Dessa forma, uma estratégia para a diminuição do efluxo de quimioterápicos seria a modulação da ação da P-gp, a qual pode ocorrer por três formas distintas: (1) inibição competitiva, não competitiva ou alostérica, (2) interferindo na hidrólise do ATP ou (3) alterando a integridade das membranas lipídicas⁴⁹.

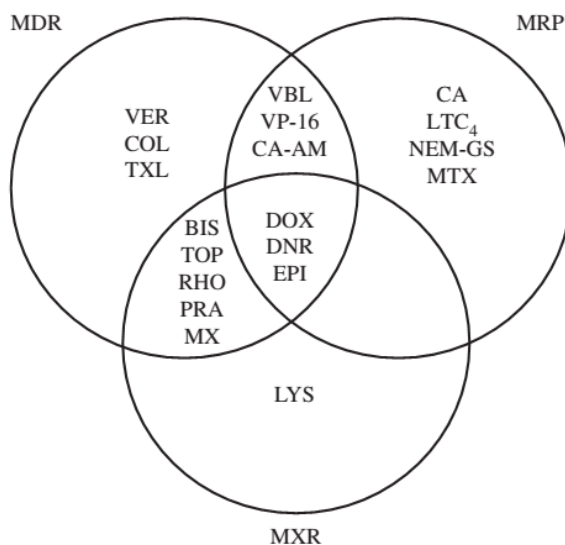


Figura 1. Esquema representativo dos substratos identificados por sofrerem ação da: MDR1, MRP e MXR: BIS, Bisantrene; CA, Calceína; CA-AM, Calceína-AM; COL, Colchicina; DNR, Daunorrubicina; DOX, Doxorubicina; EPI, Epirrubicina; LTC₄, Leucotrieno C₄; LYS, LysoTracker; MTX, Metotrexato; MX, Mitoxantrona; NEM-GS, N-ethyl maleimida glutationa; PRA, Prazosina; RHO, Rodamina 123; TXL, Taxol; TOP, Topotecano; VBL, Vinblastina; VER, Verapamil; VP-16, Etoposide³.

A descoberta de fármacos capazes de inibir a ação da P-gp foi dada através de estudos que revelaram o aumento da concentração dos quimioterápicos no meio intracelular através da associação dos mesmos com bloqueadores de canal de Ca²⁺. Zhou, 2005 e colaboradores⁵³ demonstraram este fato em um de seus estudos, no qual se testou a ação de 24 DHPs e a acumulação do quimioterápico mitoxantrona em células tumorais. Estes pesquisadores constataram que os bloqueadores do canal de cálcio são também agentes anti-resistência e demonstram uma nova alternativa no desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de câncer.

A primeira geração de moduladores da P-gp estudada inclui os bloqueadores de canal de cálcio, sendo o Verapamil o primeiro representante desta classe⁵⁴. Outros bloqueadores de canal de cálcio, tais como a nifedipina e diltiazem, posteriormente

estudados, também revelaram a propriedade de modular a P-gp. O que torna essa geração de fármacos ineficaz para o combate a MDR é concentração para a modulação da P-gp, que é de 5 a 50 μM , contra 0,4 a 1,2 μM , para os efeitos cardiovasculares e de 2 a 6 μM para os efeitos tóxicos. Outros representantes desta geração são os antagonistas da calmodulina (trifluoperazina e clorpromazina) e os imunossupressores (ciclofosfamida A)⁵⁵

A segunda geração de inibidores da P-gp é composta por análogos do Verapamil, mais potentes e menos tóxicos, mas ainda não eficientes, pois a concentração para inibição da P-gp é de 1 a 2 μM . Ainda, essa geração de inibidores da P-gp demonstrou desvantagens farmacocinéticas por competir com outros quimioterápicos pela enzima P450⁵⁶.

Estudos de análise combinatória e relação estrutura-atividade deram origem à terceira geração de inibidores da P-gp, que são fármacos com menor concentração de ação, porém falharam em estudos clínicos de fase III⁵⁷. Frente às três gerações de inibidores da P-gp, as DHPs ainda são amplamente estudadas na tentativa de se propor um fármaco capaz de ser seletivo à P-gp, o que significa ter uma baixa afinidade pelos canais de cálcio⁵⁷⁻⁶⁰.

1.2. Câncer

Segundo a OMS, câncer é um termo genérico adotado para um grupo de mais de 200 doenças, as quais apresentam em comum, multiplicação e crescimento celular descontrolados. Estas células deixam de responder aos estímulos fisiológicos e detêm a propriedade de invadir outros órgãos ou tecidos, caracterizando a metástase. Também comumente chamadas de células neoplásicas, as células de câncer podem se acumular e formar um tumor que pode ser benigno, de crescimento lento e que não acarreta dano ao organismo, ou maligno, o qual as células que o compõe se dividem rapidamente e causam danos ao organismo^{7,61-64}.

Dependendo do tecido de origem, o câncer recebe denominações distintas: (a) carcinoma derivado de tecidos epiteliais, podendo ser ainda subdividido em adenocarcinoma, carcinoma de células basais, carcinoma de células escamosas e carcinoma de células de transição; (b) sarcoma, derivado de tecidos ósseos, músculos ou

cartilagem ou vasos sanguíneos; (c) leucemias provenientes dos tecidos formadores de células do sangue; (d) linfomas e mielomas, os quais começam nas células do tecido imunitário; (e) cérebro e medula espinhal, conhecidos como câncer do sistema nervoso central. Eles ainda podem ser classificados de acordo com o órgão onde se inicia a neoplasia, sendo assim, classificados como: câncer de colo retal, câncer de mama, câncer de pulmão, e outros ^{63,64}.

O projeto GLOBOCAN da IARC forneceu estimativas de alta qualidade sobre a localização geográfica, sexo e estimativas de novos casos em 5 anos podendo ser observado na Tabela 1. Estes dados demonstram o agravante aumento dos números de incidência de câncer no mundo, de acordo com a previsão para os próximos cinco anos, além de relatar a alta taxa de mortalidade da doença, não sendo diferenciada pelo sexo. O fator preocupante, que faz o câncer ser uma das doenças mais estudadas no mundo, é o fato desta doença ser uma das causas mais comuns de mortalidade e morbidade mundial, chegando ao número de 8 milhões de mortes registradas em 2012 e podendo ter um aumento de 70% até 2030 ⁶⁵⁻⁶⁷.

Tabela 1. Incidência, Mortalidade e Estimativa de casos de câncer para distintas regiões mundiais para o ano de 2012 feita pelo projeto GLOBOCAN da IARC ^{66,67}.

Número Estimado	Homens			Mulheres			Ambos Sexos		
	Casos	Mortes	Previsão para 5anos	Casos	Mortes	Previsão para 5anos	Casos	Mortes	Previsão para 5anos
Mundo	7410	4653	15296	6658	3548	17159	14068	8202	32455
Regiões mais desenvolvidas	3227	1592	8550	2827	1287	8274	6054	2878	16823
Regiões menos desenvolvidas	4184	3062	6747	3831	2261	8885	8014	5323	15632
OMS Região Africana (AFRO)	265	205	468	381	250	895	645	456	1363
OMS Região Pan-Americana (PAHO)	1454	677	3843	1429	618	4115	2882	1295	7958
OMS Região Mediterrâneo Oriental (EMRO)	263	191	461	293	176	733	555	367	1194
OMS Região Europeia (EURO)	1970	1081	4791	1744	852	4910	3715	1933	9701
OMS Região do Sudeste Asiático (SEARO)	816	616	1237	908	555	2041	1724	1171	3278
OMS Região do Pacífico Ocidental (WPRO)	2642	1882	4493	1902	1096	4464	4543	2978	8956
Membros do IARC (24 países)	3689	1900	9193	3349	1570	9402	7038	3470	18595
Estados Unidos da América	825	324	2402	779	293	2373	1604	617	4775
China	1823	1429	2496	1243	776	2549	3065	2206	5045
Índia	477	357	665	537	326	1126	1015	683	1790
União Europeia (EU-28)	1430	716	3693	1206	561	3464	2635	1276	7157

No Brasil o INCA faz a publicação, a cada 2 anos, das estimativas de novos casos de câncer com base em dados gerados pelos Registros de Câncer de Base Populacional. Em 2014 foi estudada a prevalência de 19 tipos de câncer, selecionados de acordo com a

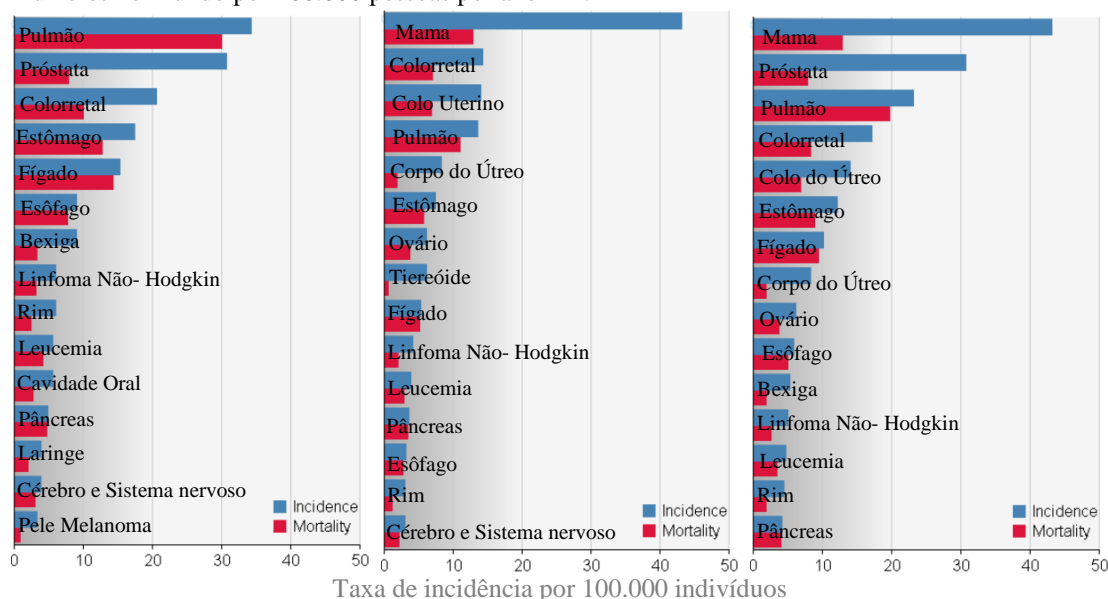
magnitude e impacto. Tal estudo pode demonstrar, entre outros dados, uma estimativa de 68.800 homens com câncer de próstata, sendo o tipo de câncer mais incidente entre os homens brasileiros, no mundo. Pela estimativa de 2012 do GLOBOCAN, identificou esse tipo de câncer como o segundo mais incidente entre os homens, atingindo cerca de 1,1 milhões de pessoas, e representando 6,25% do total mundial. Entre as mulheres brasileiras, estima-se o número de 57.120 casos de câncer de mama, sendo considerado o tipo mais incidente entre as mulheres, com um total de 1,67 milhões no mundo, segundo a GLOBOCAN⁶⁵⁻⁶⁸.

Outro dado comparativo importante que podemos observar nos estudos da GLOBOCAN é um panorama geral de análise das estimativas dos tipos de câncer por 100.000 indivíduos, por ano, e ainda, podemos comparar os dados obtidos pelo mesmo estudo no Mundo e Brasil (Gráfico 2)⁶⁵⁻⁶⁸. Estes gráficos nos permitem analisar de forma clara quais são os tipos de câncer com maior incidência e mortalidade. No caso das análises feitas no mundo podemos observar a agressividade do câncer no pulmão, que detém uma alta incidência e mortalidade nos homens, assim como, as neoplasias no fígado, esôfago, leucemias, pâncreas e sistema nervoso, tanto para homens quanto para mulheres, que não detêm uma elevada incidência, porém os dados de mortalidade e incidência são próximos. No caso das neoplasias de próstata e mama podemos observar a alta incidência da doença, sendo o de mama o mais incidente, porém ambos detêm uma baixa mortalidade.

A mesma análise feita para os dados obtidos no Brasil (Gráfico 2) nos revela a alta incidência das neoplasias de próstata e mama e também a baixa mortalidade das mesmas. Porém o que chama a atenção são as taxas de incidência das neoplasias de próstata e mama, que detêm as taxas de incidência por 100.000 indivíduos, mais alta quando comparada das taxas mundiais.

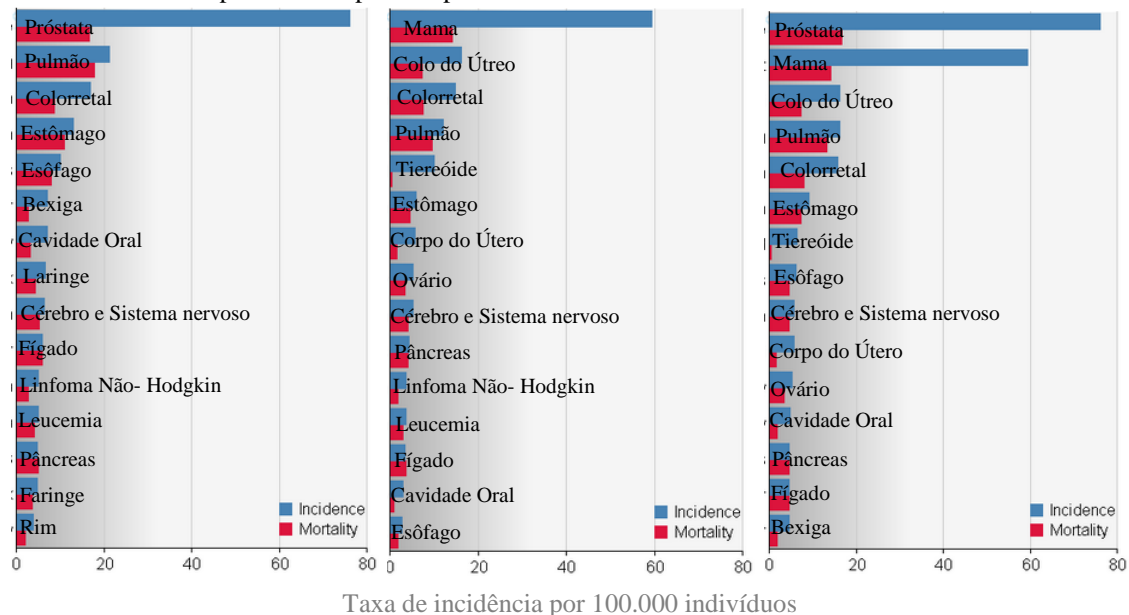
Assim como existem variados tipos de câncer, o tratamento para essa enfermidade é baseado na particularidade de cada uma dessas neoplasias e no grau de avanço da doença. A quimioterapia é um dos métodos mais utilizados no combate do câncer, mas muitas vezes se faz necessário a combinação de tratamentos, como a quimioterapia associada a radioterapia, e ainda intervenções cirúrgicas como a mastectomia no caso do câncer de mama e transplantes em alguns casos de leucemia^{62,64,69-71}.

Gráfico 1. Representação da incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais atingidos entre os homens e mulheres no Mundo por 100.000 pessoas por ano ^{66,67}.



Legenda: O gráfico (a) diz respeito aos dados obtidos para os homens, (b) mulheres e (c) ambos os sexos. A cor azul representa a incidência e vermelho a mortalidade de cada tipo de câncer.

Gráfico 2. Representação da incidência e mortalidade dos tipos de câncer mais atingidos entre os homens e mulheres no Brasil por 100.000 pessoas por ano ^{66,67}.



Legenda: O gráfico (a) diz respeito aos dados obtidos para os homens, (b) mulheres e (c) ambos os sexos. A cor azul representa a incidência e vermelho a mortalidade de cada tipo de câncer.

O surgimento do que chamamos hoje de quimioterapia teve seu início com Paul Ehrlich, no século XIX, o qual iniciou estudos de substâncias químicas para um alvo específico e, dessa forma, contribuiu para a transição entre a farmacologia experimental e a terapia farmacológica, que por sua vez conduziu ao nascimento da quimioterapia. As

contribuições de Ehrlich tiveram início em 1891, quando o mesmo começou a estudar os efeitos antimaláricos do azul de metileno, e em 1904, quando começou a estudar infecções por tripanosomas, linha de pesquisa essa que culminou na introdução do conceito de quimioterapia, avançando até ser laureado com o Prêmio Nobel de 1908 e posteriores indicações em 1912 e 1913 por suas contribuições à quimioterapia^{72,73}.

A quimioterapia moderna teve seu início em 1942, com a utilização do gás mostarda para o tratamento de um paciente com Linfoma não-Hodgkin, sendo este o primeiro agente alquilante descoberto. Posteriormente, em 1948 Sydney Farber descobriu uma nova via de combate ao câncer, através da utilização de análogos de folato (Metotrexato) para o tratamento da leucemia, e posteriormente foi descoberta a ação desta classe de medicamentos para outros tipos de câncer. A terapia combinada teve seu início em 1973, quando Emil Frei e colaboradores utilizaram pela primeira vez a associação de metotrexato com leucovorin para o tratamento osteosarcoma⁷⁴.

Posteriores e sucessivos avanços culminaram no modo atual de tratamento quimioterápico. Hoje, os tratamentos quimioterápicos e pesquisas na área levam em consideração as possíveis intervenções que podem ser feitas no ciclo de multiplicação celular (Figura 2a) e ao conhecimento das classes dos fármacos que agem em cada uma dessas fases (Figura 2b)⁷⁵.

A quimioterapia para o tratamento do câncer é projetada para explorar as diferenças entre células normais e células neoplásicas, e dessa forma, os objetivos deste tipo de terapia incluem a utilização de um medicamento que pode especificamente causar apoptose ou, ainda, alterar o fenótipo maligno de células de câncer sem gerar efeito significativo sobre as células normais. Sendo assim, uma das formas de conseguir a morte celular é interrompendo o fluxo mitótico através da interação de estruturas químicas com diferentes etapas do ciclo celular, como por exemplo os microtúbulos, particularmente com a proteína $\alpha\beta$ -tubulina. Os microtúbulos permanecem como um dos poucos alvos macromoleculares validados para o planejamento de compostos com atividade antineoplásica. A tubulina, por ser a principal proteína associada com a formação do fuso mitótico, faz da mesma um importante alvo de planejamento de ligantes para o tratamento do câncer, com alguns agentes terapêuticos a ela direcionada e aprovados para o tratamento de diversos tipos de câncer, tais como, o paclitaxel (Taxol®), docetaxel (Taxotere®), vincristina (Oncovin®) e vinblastina (Velban®)⁷⁶.

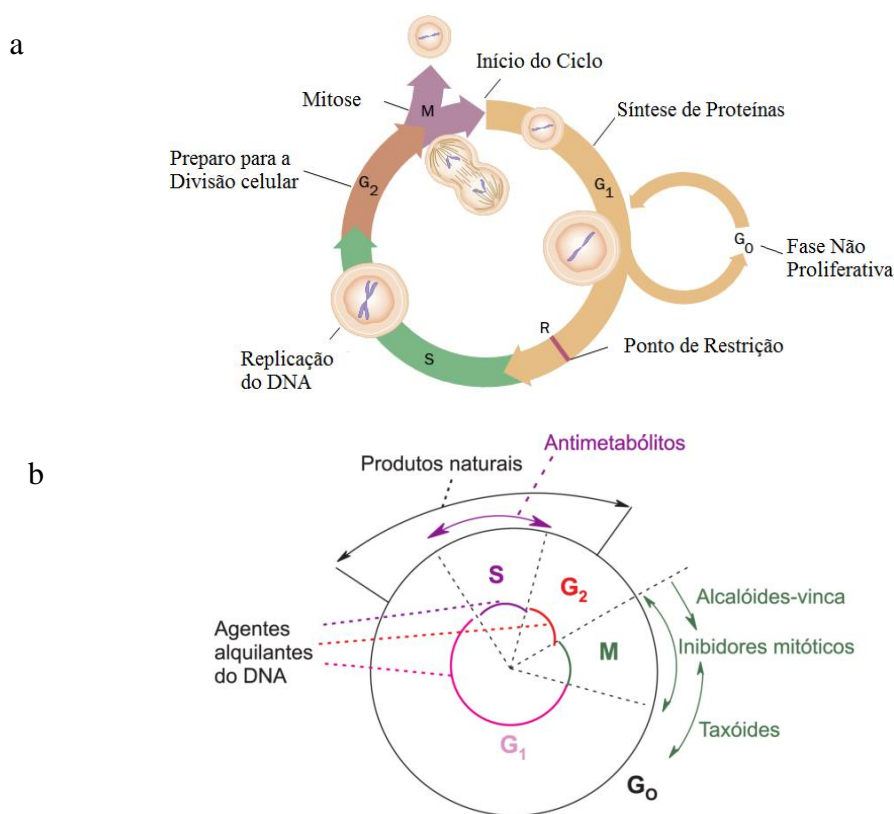


Figura 2. (a) Fases da divisão celular: **G₁** ou Pré-sintética, o intervalo anterior à síntese de DNA; **S**, Síntese de DNA; **G₂** ou pós sintética, o intervalo entre a síntese de DNA e início da mitose; **M**, Período da Mitose; **G₀** ou não-proliferativa, a fase de repouso; **R**, Ponto de Restrição período de Início ou não da síntese. Adaptado de Robert A. Weinberg 1996⁷⁷ (b) Classes de medicamentos utilizados no tratamento de neoplasias de acordo com cada fase do ciclo celular⁷⁵.

1.3. Leishmaniose

Segundo a OMS, as doenças tropicais negligenciadas (NTDs, do inglês *Neglected Tropical Diseases*) são um grupo de doenças transmissíveis que ocorrem, em sua maioria, em países de climas tropical e subtropical e que afetam principalmente as populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com os vetores transmissores. Neste contexto, a leishmaniose se destaca por ser uma das doenças mais negligenciadas do mundo, endêmica em 98 países, 3 territórios e 5 continentes a qual afeta principalmente os países pobres e em desenvolvimento, com um número de cerca de 2 milhões de casos anuais e deixando mais de 350 milhões de pessoas em risco⁶, e com alta incidência de casos no Brasil⁹.

A leishmaniose é uma doença parasitária e letal causada por parasitas hemoflagelados do gênero *Leishmania spp.*. O ciclo de vida deste parasita é heterógeno,

o qual participam dois tipos de hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado, e seu vetor é a fêmea do mosquito *Lutzomyia longipalpis*. Tal doença se transmite através da picada da fêmea do mosquito flebotomíneo contaminada com as formas promastigotas da doença, as quais rapidamente se transformam em formas amastigotas após invadirem as células reticulo-endoteliais do hospedeiro. Nos macrófagos, as formas amastigotas se reproduzem ativamente até causar a ruptura tecidual, característica marcante da doença. A forma amastigota serve de estagio infectante para a fêmea do flebotomíneo, que se transforma em promastigota em seu intestino médio e migra para o interior da glândula salivar, pronta para infectar um novo hospedeiro, fechando assim o ciclo de vida do parasita^{10,78-80}.

Existem atualmente cerca de 20 espécies de *Leishmania* identificadas que podem infectar humanos⁸¹. No Brasil, já foram reconhecidas 7 espécies *Leishmania* e muitas dessas podem infectar humanos (Tabela 2). Cada uma destas espécies produz uma grande variedade de manifestações clínicas e são agrupadas de acordo com forma que se manifestam, podendo ser: a leishmaniose visceral (LV), a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose muco cutânea⁶. No Brasil a LC é conhecida como “leishmaniose tegumentar americana” (LTA) causada por três espécies principais a *L. amazonensis*, a *L. guyanensis* e a *L. braziliensis*. A forma visceral também é conhecida como kala-azar, a qual no Brasil trata-se da espécie *L. chagasi*, e sua principal sintomatologia é a perda de peso substancial, inchaço do baço e do fígado, além de anemia⁸².

Uma classificação ainda mais abrangente separa a leishmaniose em dois grandes grupos, de acordo com a região geográfica onde são encontradas: Leishmaniose do Velho Mundo (encontradas na bacia do Mediterrâneo, Oriente Médio e África) e Leishmaniose do Novo Mundo (encontradas no México, América Central e América do Sul)^{10,79}. O gênero da *Leishmania* é subdividido ainda em dois subgêneros, com base no seu desenvolvimento nos flebotomos: o subgênero *Leishmania*, o qual se desenvolve no intestino médio e anterior, e o subgênero *Viannia*, o qual se desenvolve no intestino posterior, aderido na parede do piloro⁶. No Brasil, das 7 espécies já identificadas, 6 são do subgênero *Vannia* e 1 do subgênero *Leishmania*⁸².

Tabela 2. Classificação dos subgêneros da Leishmaniose, agrupados na classificação de Novo e Velho Mundo

Subgênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
	<i>L. infantum</i>	<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killickia</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoia</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. venezuelensis</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. garnhamia</i>	<i>L. naïffi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensis</i>	

O tratamento atual para leishmaniose é o mesmo utilizado desde a década de 40. Os medicamentos de primeira escolha são: antimoniato-N-metil-glumina (Glucantime®), estibogluconato (Pentostam®) de sódio e a anfotericina B. Vale ressaltar que esses medicamentos apresentam potencial de toxicidade cardíaca, hepática, pancreática e renal⁸² e, ainda, o parasita pode adquirir resistência a esses medicamentos os tornando ineficazes para o tratamento⁸³. Diante dessa situação, pesquisadores buscam novas entidades farmacológicas e alvos moleculares que possam tratar ou barrar o avanço da doença, tais como os inibidores da tubulina. A tubulina é um promissor alvo farmacológico para o tratamento da leishmaniose, em que sua atuação está na modulação da atividade dos microtúbulos: fármacos que impeçam a dinâmica dos microtúbulos, interrompem o fluxo mitótico e, dessa forma, ocasionam o impedimento da divisão dos protozoários, impedindo a progressão da doença^{27,84-86}.

1.4. O alvo farmacológico principal: a Tubulina.

O crescimento, a divisão, a organização e o ciclo de vida celular em organismos eucarióticos são dependentes de uma rede complexa de filamentos poliméricos, chamada de citoesqueleto, a qual tem como elementos-chave os microtúbulos. Os microtúbulos são os principais componentes do fuso mitótico, e são formados através da organização de duas proteínas glomerulares, os monômeros α -tubulina e β -tubulina, que se unem formando o heterodímero $\alpha\beta$ -tubulina que, por sua vez, se une a outros heterodímeros em forma linear, originando um protofilamento. A organização de 13 protofilamentos em paralelo dá origem a uma forma cilíndrica e oca, chamada de microtúbulo (Figura 3)⁸⁷⁻⁸⁹.

Os microtúbulos são polimerizados a partir do centrosomo e são responsáveis pela separação dos cromossomos no processo de divisão celular. Seu comportamento é influenciado por sua atividade ATPásica e, dessa forma, a hidrólise de nucleosídeo trifosfato (GTP) é o fator determinante que pode aumentar ou diminuir a taxa de regulação da dinâmica de formação que ocorre através da hidrólise do GTP em GDP (nucleosídeo difosfato + fosfato). A energia liberada pela hidrólise é utilizada para promover mudanças na forma e na conformação da estrutura dos microtúbulos, que por sua vez acarreta em mudança da afinidade da estrutura. Uma terminação GTP-tubulina é mais hermética do que uma GDP-tubulina, devido ao fato dos protofilamentos ligados ao GTP serem retos e com múltiplos contatos laterais^{88,90}.

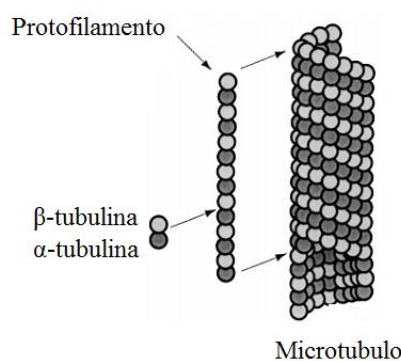


Figura 3. Organização dos heterodímeros α -tubulina e β -tubulina, originando um protofilamento que, por sua vez, se organiza para dar origem a um microtúbulo. Adaptado de: Downing, 2000⁸⁹

As terminações dos microtúbulos recebem duas denominações diferentes, dependendo do monômero que está exposto, e determinam tanto as dinâmicas de

polimerização quanto as de despolimerização. Quando o monômero β -tubulina está exposto à terminação, é chamada de “terminação *plus*” (+), e quando o monômero exposto é o α -tubulina, a terminação é chamada de “terminação *minus*” (-). Tais terminações influenciam no processo de formação e dissociação da estrutura, e dessa forma, a terminação *plus* é responsável pela formação do microtúbulo, apresentando uma dinâmica mais acelerada (quando há abundância de dímeros livres) do que a *minus*, local onde ocorre a perda de subunidades quando a estrutura não está estável⁸⁸.

Os dímeros de tubulina tem uma baixa taxa de hidrólise, sendo então, predominante a forma GTP-tubulina quando existe uma abundancia dos mesmos livres no citosol. Ao iniciar a formação do microtúbulo, a atividade GTPásica aumenta e a β -tubulina passa ao estado de GDP-tubulina, podendo ser notado um estado de encurvamento. Porém, na terminação *plus*, como a hidrólise ainda não ocorreu, é encontrada a forma GTP-tubulina. A importância da terminação GTP-tubulina ou GDP-tubulina deve-se à influência na dinâmica de instabilidade da proteína, e desse modo podemos observar a presença da forma GDP-tubulina nas partes centrais do microtúbulo, e GTP-tubulina nas terminações^{87-89,91,92}.

A dinâmica de polimerização e despolimerização dos microtúbulos é chamada de dinâmica de instabilidade, e é o fator responsável por promover o crescimento e o encurtamento dos microtúbulos. Ela pode ser descrita como uma função combinada de quatro fatores: (1) a taxa de crescimento dos microtúbulos, (2) a taxa de redução, (3) a frequência de transição de um estado de crescimento para um estado de encurtamento rápido ("catástrofe") e, (4) inversamente, a frequência de transição de um estado de encurtamento de um crescente ("resgate"), tal como apresentados na Figura 4. Quando a taxa de montagem da tubulina ultrapassa a velocidade de hidrólise, ocorre a formação de um capuz de GTP- tubulina e isso restringe o crescimento dos microtúbulos e restringe também a curvatura dos protofilamentos. Por outro lado, quando ocorre a hidrólise, este capuz é removido e os protofilamentos se tornam instáveis, ocasionando o encurtamento dos microtubulos^{90,93}.

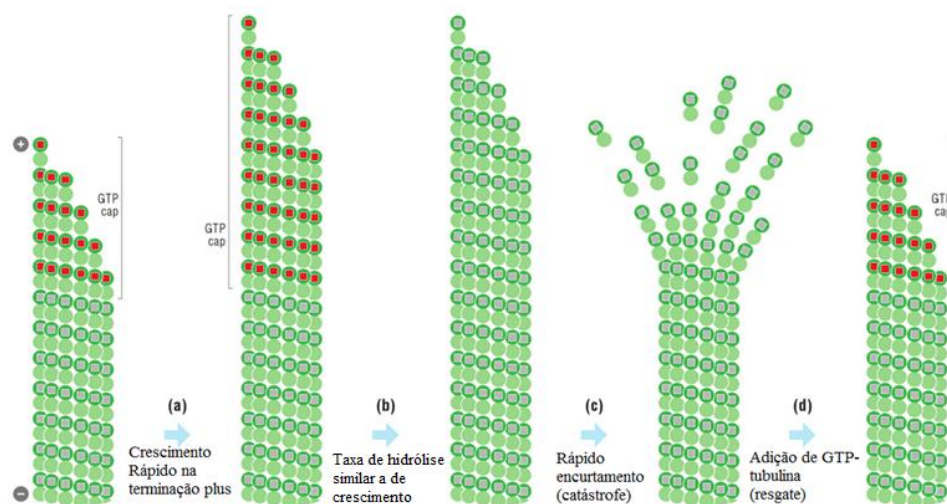


Figura 4. Dinâmica de instabilidade dos microtúbulos podendo observar os dímeros GTP-tubulina em vermelho, GDP-tubulina em cinza e os períodos: (a) de crescimento rápido devido à alta concentração tubulina-GTP período em que a taxa de crescimento supera a hidrólise, (b) quando a oferta de GTP-tubulina não é elevada a hidrólise se equipara ao crescimento e ocorre a diminuição da terminação GTP-tubulina, (c) fenômeno de catástrofe ocorrido devido as fracas interações entre o GDP-tubulina no microtúbulo e (d) fenômeno de resgate, incorporação de novos dímeros GTP-tubulina⁸⁸.

Como, tanto a dinâmica quanto a estabilidade dos microtúbulos estão ligadas à organização da divisão celular quando o mesmo se encontra na transição das fases de metáfase e anáfase, uma intervenção nestes processos bloquearia o processo de divisão e culminaria na apoptose celular. Dessa forma, a modulação da dinâmica dos microtúbulos se torna uma poderosa via para a ação de fármacos antineoplásicos, visto que, uma das estratégias de combate ao câncer é interromper o processo de divisão celular, que se encontra acelerado e desordenado. Estudos na topografia da estrutura da tubulina culminaram na identificação de três distintos locais de interação de fármacos, quais podem ser observados na

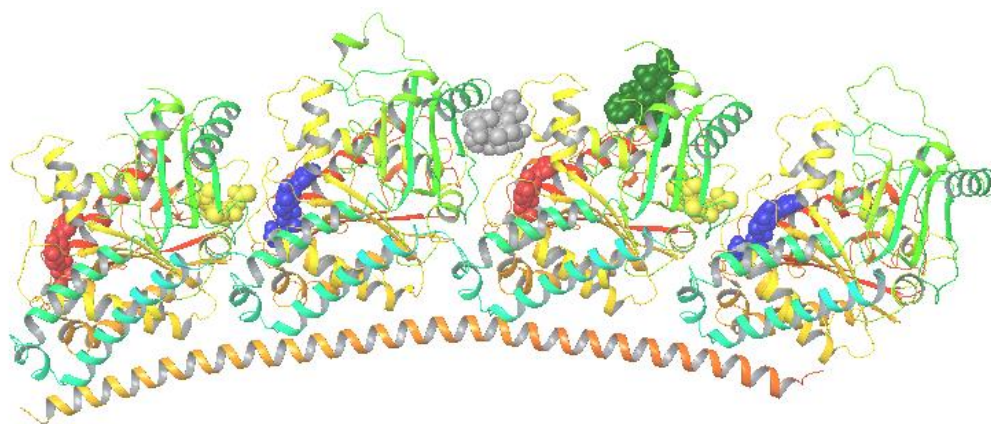


Figura 5 ^{28,94-98}.

As regiões de interações da tubulina são nomeadas de acordo com o conhecimento de estruturas que se ligam a ela e podem atuar como estabilizadores ou desestabilizadores dos microtubulos. Atualmente, são conhecidos três locais de interação da tubulina: o sítio do Taxol®, o dos alcaloides da vinca (vincristina e vimblastina) e o sítio da colchicina, o qual, este último, tem sido amplamente estudado como uma alternativa aos sítios do taxol e alcaloides da vinca em virtude de alojar moléculas de baixo peso molecular e menor lipofilicidade, além de uma menor tendência a sofrer ação da MDR^{28,94,99}.

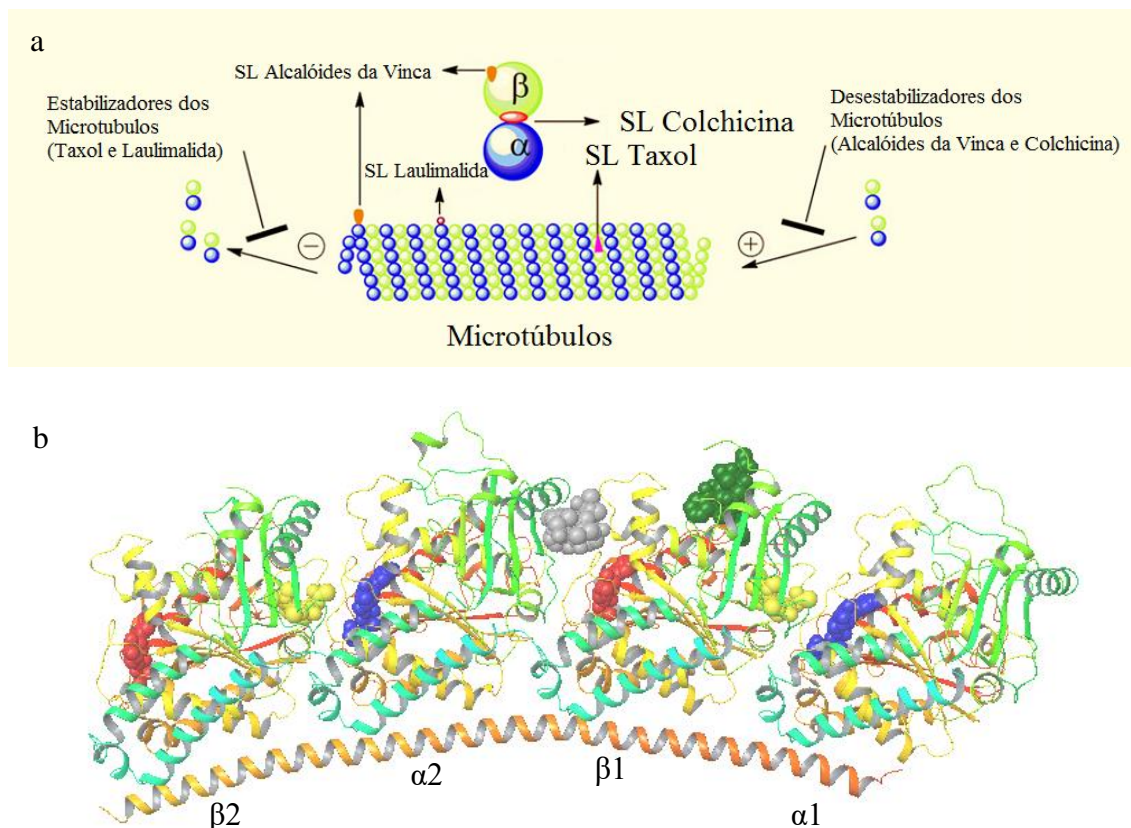


Figura 5. (a) Modelo esquemático dos fármacos que interagem com a tubulina e promovem a estabilização e desestabilização dos microtubulos.²⁸ (b) Representação em 3D (com Diagrama *Ribbons*) da localização dos sítios da colchicina (amarelo), da vimblastina (cinza), do taxol (verde), do GDP (vermelho) e do GTP (azul) na estrutura da tubulina.

O principal membro da classe dos estabilizadores dos microtúbulo é o Paclitaxel (Taxol® -

Figura 6a). Isolado em 1962, e com o mecanismo de ação molecular desvendado na década de 80, o Taxol foi aprovado pelo agência americana de vigilância sanitária (FDA do inglês: Food and Drug Administration) como medicamento para o tratamento do câncer somente em 1992. A ação estabilizadora da classe dos taxanos está na interação dos mesmos com a subunidade β -tubulina, a qual estabiliza a forma GTP-tubulina,

impedindo a conversão deste em GDP-tubulina. A hidrólise da GTP-tubulina para gerar a GDP-tubulina é um processo que libera energia, sendo este o fator de instabilidade dos microtúbulos. Ao estabilizar a forma GTP-tubulina, os protofilamentos perdem a capacidade de se enrolarem, assumindo uma conformação estendida, favorável à incorporação de novas subunidades $\alpha\beta$ -tubulina, e assim favorecendo a estabilização⁹⁴. Outro fator observado com a ação dos taxanos é a estabilização da alça M presente na β -tubulina, a qual, por sua vez, favorece os contatos laterais entre as subunidades $\alpha\beta$ -tubulina⁸⁹.

A principal desvantagem dos taxanos, e o que limita o desenvolvimento de novos compostos com propriedades farmacológicas similares ao taxol, além da toxicidade e a hipersensibilidade ocasionada por esses fármacos, é o fato de sofrerem a ação da P-gp e, assim, desenvolverem a MDR⁹⁴.

Os dois principais membros da classe dos moduladores da tubulina que agem desestabilizando os microtúbulos são: os alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina) e a colchicina, ambos apresentados na

Figura 6b-d. Os alcalóides da vinca interagem com a β -tubulina, próximo à região de ocupação do GTP, o qual, por sua vez, tem a função de impedir a hidrólise do GTP em GDP. Os alcalóides da vinca se ligam aos dímeros $\alpha\beta$ -tubulina, antes mesmo da formação da tubulina, modificando sua conformação para uma forma mais curva, assim impedindo a união a outros dímeros e consequente formação dos microtúbulos^{94,100}.

Já a colchicina e os compostos que agem neste domínio interagem na região de interface do dímero $\alpha\beta$ -tubulina, contínuo ao domínio de ligação do GTP da α -tubulina. A interação da colchicina ocorre antes da formação do polímero, gerando um complexo final com elevada energia de ativação. Este complexo é incorporado na formação do microtúbulos e interrompe a formação do mesmo por impedir os contatos laterais entre os protofilamentos^{94,100,101}.

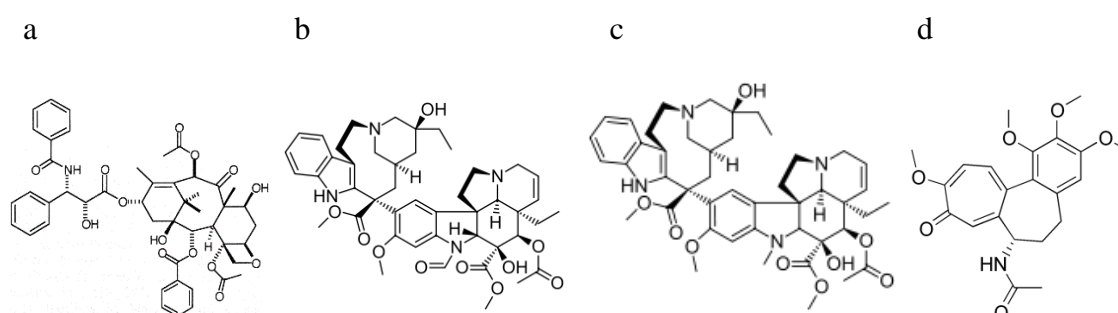


Figura 6. Estruturas 2D de: (a)Taxol¹⁰², (b)vincristina, (c)vimblastina e (d) colchicina

1.5. O alvo farmacológico secundário: o canal de cálcio dependente de voltagem (Ca_v)

A sinalização elétrica e química dos sistemas biológicos é dependente da regulação dos íons Ca^{2+} , Na^+ e K^+ através de canais iônicos. O canal de cálcio dependente de voltagem (Ca_v ou também chamado de VDCCs, do inglês *voltage-dependent channel calcium*), regula o influxo de íons Ca^{2+} no meio intracelular, e este atua como um dos principais mensageiros químicos celulares, desencadeando alguns processos vitais, tais como contração muscular, secreções glandulares, transmissão sináptica e expressão gênica¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Os Ca_v regulam três importantes funções: a inativação dependente de voltagem, a inativação dependente de cálcio e a facilitação dependente de cálcio. A inativação dependente de voltagem e de cálcio regulam os níveis de cálcio intracelular, e a facilitação dependente de cálcio é um processo pelo qual ocorre a abertura do canal. A abertura do canal pode proceder através de um aumento de Ca^{2+} basal ou por uma “memória de curto prazo”, o que provoca uma rápida abertura por subseqüentes estimulações^{103,106,107}.

Os canais de cálcio foram primeiramente divididos em duas classes, dependendo das diferenças eletrofisiológicas (cinética de abertura e fechamento, além de condutância), e podem ser classificados como canais de ativação por alta voltagem (HVA, do inglês *high-voltage-activated*) ou de canais de ativação por baixa voltagem (LVA, do inglês *low-voltageactivated*)¹⁰⁸. O HVA apresenta uma alta voltagem de ativação, uma larga condutância e uma lenta inativação. Estão presentes em células cardíacas, bem como nos músculos lisos e esqueléticos. O LVA também é ativado por um potencial de membrana, porém muito mais elevado, apresenta uma pequena condutância e inativa rapidamente¹⁰⁹.

Os canais do tipo HVA ainda recebem uma subdivisão em “tipos”, podendo ser do tipo L, N, P/Q e R, esta classificação baseia-se: (1) na cinética de ativação e inativação, (2) na especificidade ao íon e (3) na sensibilidade a drogas e toxinas. Por exemplo, o canal de cálcio do tipo-L tem um limiar de ativação entre -30 e -10 mV, uma faixa de inativação de -60 a -10 mV, uma taxa de inativação maior do que 500 msec, é seletivo aos íons Ba^{2+}

e Ca^{2+} , é bloqueado pelos íons divalentes Cd^{2+} e Ni^{2+} , e a fenilalquilamina é um antagonista desse tipo de canal. Seguindo esta nomenclatura, o canal LVA também é chamado de tipo-T. Os tipos L e T encontram-se presentes em todo o sistema cardiovascular bem como no sistema nervoso central, enquanto os tipos N, P/Q e R localizam-se no tecido neuronal¹⁰⁸⁻¹¹¹.

Cada canal de cálcio é formado por quatro ou cinco subunidades, a saber: α_1 (170 kDa), α_2 (150 kDa), β (52 kDa), δ (17-25 kDa) e γ (32 kDa), que podem ser observadas na representação esquemática apresentada na Figura 7. A subunidade α_1 é a subunidade formadora do poro, aonde se encontra o sensor de voltagem e sítios de regulação do canal, de fármacos e de toxinas. Dependendo do tipo do canal, ele ainda pode apresentar uma subunidade β intracelular, uma subunidade $\alpha_2\delta$ ligada por pontes dissulfeto e uma subunidade de transmembrana γ . As subunidades podem ser codificadas por genes distintos e, assim, expressar isoformas diferentes, diferenciando-se com respeito ao local de aparecimento e às propriedades farmacológicas¹⁰³.

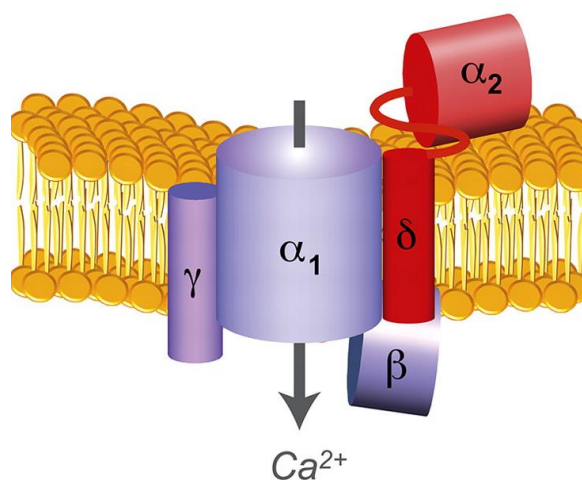


Figura 7. Representação esquemática das subunidades de um modelo de canal de cálcio, na qual, podem ser observadas as subunidades formadoras do canal de cálcio. Destaca-se a subunidade α_1 que é a subunidade formadora do poro¹¹².

Afim de facilitar a apreciação outrora dificultada pelas recentes descobertas de novas isoformas da subunidade α_1 , uma nomenclatura baseada na distinção dos canais de potássio foi desenvolvida para os canais de cálcio. Tal nomenclatura inicia-se com o símbolo principal Ca_v , representando o canal de cálcio dependente de voltagem, seguido por um número que indica a família do canal (1-3), e por sua vez seguido por outro

número (1-4), o qual, este último, representa a isoforma da subunidade alfa (que apresenta funções e distribuições distintas). Podemos observar a representação da referida nomenclatura na Figura 8, além da identidade sequencial entre as isoforma e a nomenclatura antiga, apresentada entre parênteses¹¹³. Tal nomenclatura tem por finalidade identificar a função e a distribuição dos canais, sendo que os canais do tipo-L estão representados pela família Ca_v1 , a isoforma $Ca_v1.1$ é encontrada nos músculos esqueléticos, a isoforma $Ca_v1.2a$ é prevalente em músculos cardíacos, a $Ca_v1.2b$ em músculos lisos e a $Ca_v1.2c$ no cérebro e na glândula adrenal¹¹³.

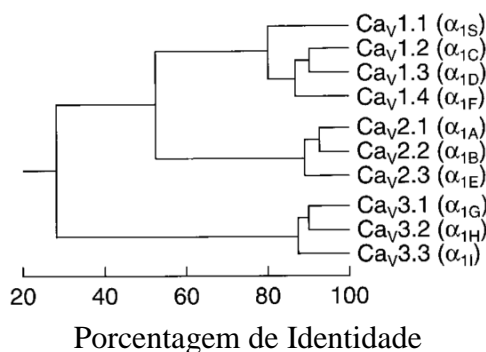


Figura 8. Representação esquemática da porcentagem de identidade sequencial entre as famílias dos canais de cálcio, bem como as nomenclaturas atual e antiga¹¹³.

O principal papel dos estudos das isoformas e elucidação das mesmas está na importância da subunidade α_1 . Tal importância deve-se ao fato desta subunidade ser a formadora do poro do canal e ponto de interação de moléculas de cunho farmacológico e toxicológico¹⁰⁵.

A organização estrutural da subunidade α_1 está compreendida em quatro domínios (I-IV) que se repetem, e cada domínio é formado por seis segmentos de membrana (S1-S6), sendo que, entre os segmentos S5 e S6 há a presença de uma alça chamada *P-loop*. Entre os seis domínios, se destacam o domínio S4, que é o sensor de ativação por voltagem e responsável por abrir o poro, bem como os segmentos S5, S6 e o *P-loop*, os quais formam a parte interna do poro. Pela Figura 9 demonstra-se a organização de forma genérica de uma subunidade α_1 , bem como a representação e organização dos segmentos e alças.

Diferentemente dos canais de potássio, em que as sequências de aminoácidos dos quatro domínios que formam o poro são simétricas, o canal de cálcio apresenta uma variação em sua sequência. Os domínios I e II apresentam 27 (53%) resíduos idênticos,

os domínios I e III 30 (51%), os domínios I-IV 24 (55%), os domínios II e III 27 (51%), os domínios II e IV 26 (55%) e os domínios III e IV 21 (48%)¹¹⁴.

Os canais de cálcio desempenham importantes funções biofísicas e fisiopatológicas no organismo humano. Por regular a entrada e saída de cálcio das células, as alterações no comportamento dos canais podem modificar as propriedades elétricas das membranas e, assim, aumentar ou diminuir a excitabilidade das células, e ainda modificar múltiplas vias de sinalização celular, as quais são dependentes de cálcio. Diante deste fato, como as alterações nas dinâmicas de funcionamento dos canais de cálcio podem resultar em desordem crônicas graves, tais como distúrbios neurológicos, cardíacos e musculares, diversos pesquisadores estudam compostos químicos com características farmacológicas capazes de modular a atividade dos canais de cálcio, na tentativa de sanar algumas enfermidades^{110,115}.

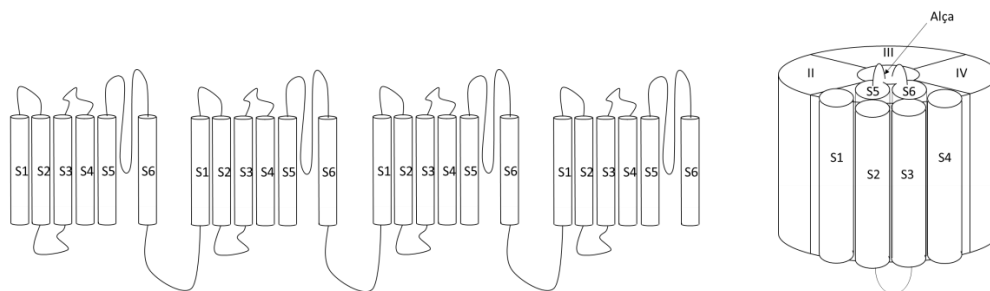


Figura 9. Representação esquemática da subunidade $\alpha 1$ do canal de cálcio tipo-L, visualização dos segmentos e alças, bem como da organização dos mesmos formando a unidade estrutural.

Paralelamente aos estudos de inibição direta do canal de cálcio, a estrutura do canal de cálcio e de seus inibidores tem sido utilizadas para o estudo do fenômeno de resistência a fármacos. A esse fato deve-se a descoberta do bloqueador do canal de cálcio do tipo L, verapamil, ser capaz de modular a ação da P-gp e, dessa forma, ser também capaz de contornar a MDR. Ensaios *in vitro* relataram o aumento da acumulação intracelular de muitos fármacos antineoplásicos em numerosas linhas celulares. Sendo assim, os bloqueadores de canais de cálcio do tipo-L se tornam uma importante ferramenta de estudo no campo dos medicamentos antineoplásicos^{49,116}.

Atualmente, uma estratégia geral para superar a MDR tem sido a coadministração de fármacos capazes de modular a P-gp juntamente com fármacos antineoplásicos¹¹⁷.

Alguns relatos demonstram que a coadministração de fármacos antineoplásicos com inibidores da P-gp aumenta a efetividade do tratamento, como por exemplo, a administração simultânea de tariquidar e paclitaxel resultou numa maior citotoxicidade em células de câncer do ovário quando comparada a uma dose isolada de paclitaxel, em que este se mostrou ineficaz, demonstrando uma significativa reversão da MDR. A inibição da P-gp conduziu a um aumento da acumulação de fármacos antineoplásicos no interior da célula e produziu a citotoxicidade celular esperada¹¹⁸.

O primeiro modulador da P-gp identificado foi o bloqueador do canal de cálcio do tipo-L, o verapamil, que faz parte da primeira geração de moduladores da P-gp, juntamente com nifedipina, felodipine, isradipine, nicardipine, diltiazem, os antagonistas de calmodulina, o antibiótico eritromicina, bem como antimaláricos derivados de quinina, entre outros^{55,119}. Zhou e colaboradores, 2005⁵³ relataram em um de seus estudos a utilização conjunta de 25 dihidropiridinas sintetizadas e piridinas correspondentes com 4 dihidropiridinas disponíveis comercialmente (niguldine, nicardipina, nifedipina e nitrendipina) na acumulação intracelular do mitoxantrona (um agente anti-câncer) para tratamento do câncer de mama e câncer de pulmão. Os resultados indicaram que 24 dos 25 compostos sintetizados produziram um aumento significativo de acúmulo de mitoxantrona em ambas as linhas celulares. Estes resultados indicaram que a utilização de bloqueadores de cálcio derivados de 1,4-dihidropiridinas e análogos como agentes anti-resistência para o tratamento do câncer são uma alternativa no desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do câncer⁵³. Porém, como já dito anteriormente, a concentração usual dos inibidores do canal de cálcio para inibição da P-gp é cardiotoxicidade, exigindo pesquisa de novas estratégias para a utilização desses fármacos com tal finalidade⁵⁵.

1.6. Fundamentação da hipótese: seletividade através da lisina acetilada.

A proposta que norteia nesse trabalho, e que é tema central do projeto-mãe ao qual o mesmo está vinculado, baseia-se no estudo de Ueki e colaboradores, 2013³⁰. Tais pesquisadores propuseram uma nova estratégia de pró-fármaco para a terapia do câncer, a qual faz uso do aumento seletivo da HDAC e das atividades produzidas desta protease em células cancerosas malignas.

Ueki e seus colaboradores prepararam um agente citotóxico mascarado pelo acoplamento de um grupo lisina acetilado com o antibiótico puromicina, um potente inibidor de síntese de proteínas, que induz a terminação prematura das cadeias de polipeptídio em crescimento do ribossomo e, dessa maneira, consegue matar a maioria das células prontamente. O pró-fármaco é ativado sequencialmente pelas ações da HDAC e da protease endógena da CTSL, ambas enzimas presentes em concentrações elevadas nas células de tumor. Dessa forma, ao remover o grupo acetila e, em seguida, o grupo lisina, a promicina é liberada seletivamente dentro das linhas celulares de câncer (Figura 10)³⁰.

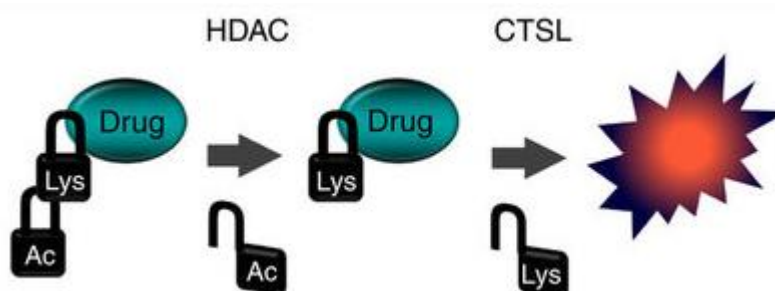


Figura 10. Representação esquemática do processo de liberação seletiva do fármaco em células tumorais³⁰

Partindo da premissa que a incorporação de uma lisina acetilada a um fármaco citotóxico confere ao mesmo seletividade a células tumorais, bem como que a inibição da P-gp interrompe o fenômeno da MDR causada pelo uso contínuo de fármacos moduladores da tubulina e, ainda, que DHPs são fármacos inibidores da P-gp, ainda que esses podem causar cardiotoxicidade nas doses determinadas para a inibição da mesma, propusemos uma série de pró-fármacos tri-funcionalizados contendo as seguintes características (e assim ilustrado na Figura 11):

- Um núcleo que tenha características similares à DHP e, portanto, responsável pela inibição da P-gp;
- Um núcleo com características semelhantes aos inibidores de tubulina (colchicina, por exemplo) responsáveis pelo efeito citotóxico causado por inibição da tubulina;
- Um conector/espaçador para esses dois núcleos, composto de uma lisina acetilada, com o intuito de garantir a seletividade para com as células tumorais.

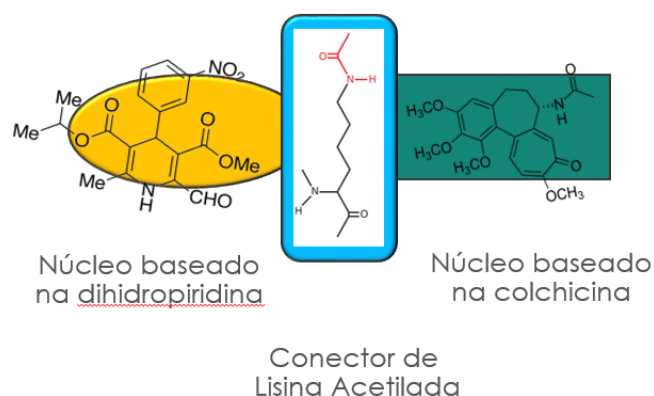


Figura 11. Representação esquemática da proposta de moléculas inibidoras da tubulina, onde não ocorreria a ação das P-gp, com seletividade para células tumorais.

Em suma, dentro dos interesses desse projeto-mãe e dessa tese de Doutorado, foi proposta a síntese, avaliação biológica e modelagem de uma biblioteca de fármacos trifuncionalizados, os quais podem ser seletivos a células tumorais, apresentando propriedades antiproliferativas e leishmanicidas e, que dessa forma, não sofra o fenômeno de resistência (MDR).

Nossos estudos estão divididos basicamente em duas frentes de trabalhos. Uma com caráter majoritário de síntese, e outra com caráter majoritário de modelagem/planejamento computacional de candidatos a fármacos. Estas duas frentes de trabalho estão totalmente integradas e, dessa forma, proporcionam a racionalização e melhor desempenho no planejamento e descobrimento de novos candidatos a fármacos, com interesse em câncer e leishmaniose.

Os estudos de modelagem computacional aqui apresentados e que seguem ao longo do projeto-mãe têm por objetivo propor novos protótipos provenientes de diferentes bases de dados de compostos comerciais, explorando uma grande diversidade química. Adicionalmente, é também objetivo estudar/propor os modos de interação dos compostos já sintetizados (e queles em vias de síntese) pelo grupo de síntese, buscando o melhor entendimento/racionalização da relação estrutura-atividade destes compostos.

Através dos estudos de modelagem obtivemos três séries de *hits* provenientes dos estudos de triagem virtual. Esses compostos são comercialmente disponíveis e já foram comprados, e terão suas atividades comprovadas em estudos *in vitro* frente aos alvos moleculares em estudo, com vistas a posterior otimização molecular.

1.7. Métodos Computacionais

O processo de desenvolvimento de novos fármacos é uma atividade longa e custosa. Especialistas estimam que para um novo medicamento ser lançado no mercado há um financiamento de aproximadamente R\$ 800 milhões, contabilizando os insucessos e a propaganda, investidos ao longo de 10 a 15 anos. Os primeiros anos da pesquisa por novas entidades farmacêuticas destinam-se a fase de descoberta de moléculas bioativas, chamadas de *hits*, que são geralmente identificadas através de triagens reais ou virtuais^{120,121}.

Com o avanço da tecnologia computacional, tanto no que diz respeito a hardware quanto ao desenvolvimento de programas, as técnicas de descoberta de fármacos assistidas por computador foram impulsionadas e estão ganhando cada vez mais importância e espaço, devido ao fato, das mesmas, reduzirem o tempo gasto com as triagens tradicionais e garantirem, cada vez mais, resultados satisfatórios^{122,123}. Segundo líderes de grupos de pesquisas de grandes indústrias farmacêuticas, a química computacional faz parte do processo atual de desenvolvimento fármacos e não existe o desenvolvimento de um novo fármaco sem o auxílio da mesma¹²⁴.

Diversos termos são utilizados para referenciar os estudos de descoberta de novos fármacos quando os mesmos são obtidos por vias virtuais. Geralmente esses termos são siglas de expressões em inglês, como: desenho de fármacos assistidos por computador (CADD do inglês: *Computer-Aided Drug Design*), desenho de fármacos por computador (CDD do inglês: *Computer Drug Design*), modelagem molecular assistida por computador (CAMM do inglês: *Computer-Aided Molecular Modeling*) e desenvolvimento e descoberta de fármacos assistidos por computador (CADDD do inglês: *Computer-Aided Drug Discovery and Development*). Tais estudos também são referenciados somente por: desenho racional de fármacos, descoberta de fármacos *in silico* e desenho racional de fármacos assistidos por computador. Todos esses termos designam os mesmos objetivos em comum: a utilização do desenvolvimento computacional para impulsionar o desenvolvimento de fármacos, a extração do máximo de informações químicas e biológicas de ligantes e alvos moleculares para identificar e otimizar novos fármacos e também por predizerem a farmacocinética e a toxicologia de compostos em estudos¹²².

Diversas abordagens podem ser executadas no processo CADD. A metodologia adotada dependerá da quantidade de informações e dados sobre determinada patologia a ser estudada, da dinâmica de trabalho de cada pesquisador, do poder do aparato computacional do centro de pesquisa e do tempo disponível. Essas abordagens são embasadas em informações prévias reportadas sobre os ligantes ou sobre a estrutura do receptor, e dessa forma, são chamadas de descoberta de fármacos baseadas nos ligantes ou descoberta de fármacos baseadas nos receptores (SBDD e LBDD do inglês: *Structure-Based Drug Design*, *Ligand-Based Drug Design*).

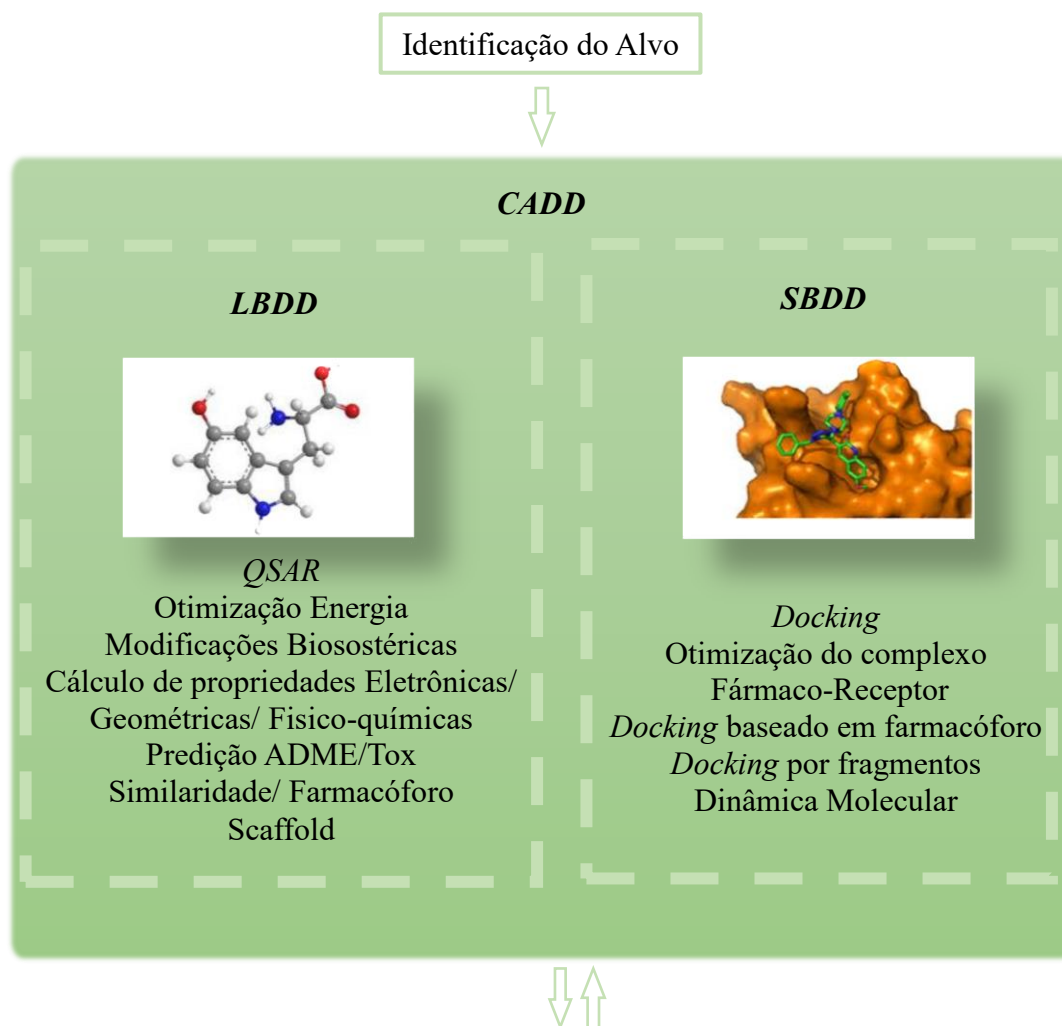
Quando não existem estruturas cristalográficas de um receptor em estudo em banco de dados, ou quando a resolução desde é inadequada para o uso em CADD, uma das alternativas é basear o estudo em técnicas que privilegiam dados de ligantes reportados na literatura. Dessa forma faz-se o uso de técnicas de LBDD as quais podem abordar estudos de triagem virtual baseada no ligante (LBVS do inglês: *ligand-based virtual screening*), através das similaridades (por forma e por eletrostática), estudos de padrões farmacofóricos (chamados de farmacóforo), estudos de previsões farmacocinéticas e toxicológicas e estudos de modelos de relação quantitativa estrutura atividade (QSAR do inglês: *Quantitative structure–activity relationships*).

As técnicas de LBDD ainda podem ser utilizadas para otimização de compostos líderes, ou de fármacos, através de estudos de otimização energia, modificações biossotéricas e cálculo de propriedades eletrônicas, geométricas e físico-químicas^{123,125}.

A identificação de um alvo farmacológico, obtido através de estudos de cristalografia de raios-X, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ou ainda através de estudos de homologia estrutural de proteínas, nos permite uma ampliação nos estudos de descoberta de fármacos utilizando as técnicas de SBDD. Dessa forma, podemos explorar o ambiente de interação do fármaco-receptor nos estudos de triagem virtual (VS do inglês: *virtual screening*), o qual passa a ser chamado de triagem virtual baseado na estrutura (SBVS do inglês: *Structure-Based Drug Design*). Para tal, podem ser utilizados estudos de simulações de *docking*, ou ainda estudos de *docking* baseados no farmacóforo. Ainda em relação aos estudos de SBDD, podem ser utilizadas técnicas de otimização do complexo-fármaco receptor e estudos de dinâmica molecular^{126–128}. Os possíveis estudos utilizando as técnicas de LBDD e SBDD podem ser observados na Figura 12^{123,125–128}.

A diversidade de técnicas em CADD permitem a utilização das mesmas sob três perspectivas: (1) filtrar uma grande base de dados de compostos com atividades farmacológicas para identificar *hits* que poderão ter sua atividade biológica avaliada em ensaios *in vitro* (SBVS e LBVS), (2) otimizar compostos líderes e (3) desenho de novos compostos a partir de grupos funcionais estrategicamente posicionados, podendo ser através de fragmentos, ou não, chamados de *de novo*¹²³. Duas das três perspectivas abordadas pelos estudos de CADD foram aplicadas nesse trabalho, sendo elas, os estudos de VS e os de otimização de compostos líderes.

Sob o pretexto de otimizar os compostos provenientes do nosso grupo de síntese utilizaremos técnicas de SBDD para buscar o entendimento dos modos de interação desses compostos com o receptor, e dessa forma, teremos embasamento para novas propostas de compostos e bibliotecas. Com a finalidade de propor novos inibidores para os dois alvos farmacológicos estudados (dois núcleos de nossa proposta) utilizaremos estudos de LBVS e SBVS.



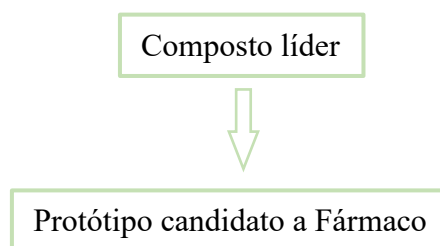


Figura 12. Esquema representativo das técnicas utilizadas para descoberta de fármacos baseados nos ligantes e na estrutura. Baseado em Sliwoski e colaboradores, 2014¹²³ e Liao e colaboradores, 2011¹²⁹

Didaticamente os estudos de VS se comportam como sucessivos filtros aplicados a grandes grupos de moléculas, contidas em bases de dados, afim de se obter ao final uma quantidade pequena de *hits*. Com o decorrer dos anos, a forma de se trabalhar com de VS sofreu modificações, partindo de uma metodologia simples e direta chamada de VS clássica passando a formas mais integradas, como o VS em paralelo, VS interativo e VS integrado.

O VS clássico consiste na redução de um grande número de moléculas a um pequeno grupo através de camadas de filtragem que priorizam alguma característica, como por exemplo a forma e o volume de um ligante. As estruturas que estão em acordo com a estrutura referência seguem para a próxima filtragem, as em desacordo são rejeitadas. O VS em paralelo trabalha através da combinação de resultados obtidos em filtrações clássicas distintas. A intensão de uso dessa técnica é que as filtrações se complementam e a vantagem é aumentar o desempenho e diminuir a quantidade de falsos positivos.

Em relação ao VS interativo, podemos dizer que a interação que deriva o nome é decorrente dos resultados de ensaios *in vitro* durante os estudos *in silico*. Em outras palavras, os resultados de uma triagem seguem para estudos *in vitro* e os compostos com boa atividade seguem como ponto de partida para novas triagens. Por fim, o VS integrado ocorre perante a integração de métodos *in silico* com técnicas de triagem de alta produtividade (HTS do inglês: *High-throughput screening*). Um esquema representativo das referidas técnicas de VS podem ser observadas na Figura 13¹³⁰. Em nossos estudos abordamos as metodologias: VS clássico, VS paralelo e VS interativo, as quais serão detalhadas a seguir.

a b c d

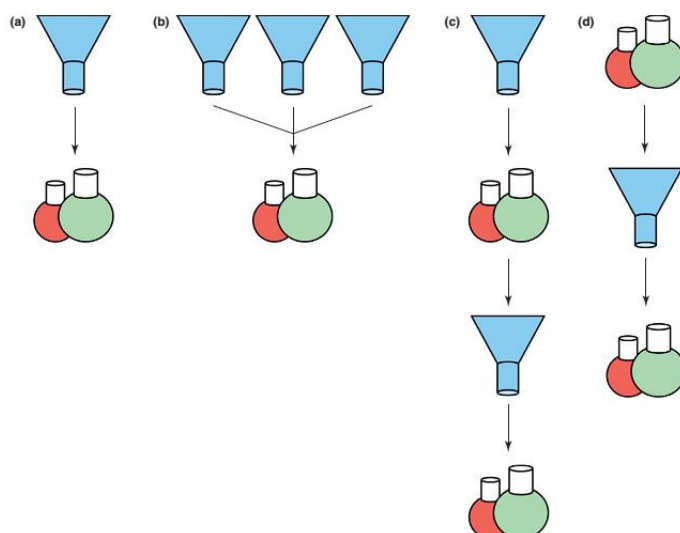


Figura 13. Esquema representativo sobre as categorias de VS: (a) VS clássico, (b) VS em paralelo, (c) VS iterativo e (d) VS integrado. Os funis representam os protocolos utilizados e os balões, os ensaios experimentais.

2. Objetivos

2.1. Objetivos gerais

Em virtude dos moduladores de tubulina serem um dos principais medicamentos utilizados no combate a diversos tipos de neoplasias e também no combate a leishmaniose, mas terem seus efeitos limitados pela ação da MDR, o objetivo central desta tese está no planejamento racional de candidatos a pró-fármacos moduladores da tubulina que não sofram o fenômeno da MDR e ainda sejam seletivos a células malignas de câncer.

Como objetivos iniciais (que denominamos como **Tarefa 1**) dessa Tese, temos o planejamento de novos compostos com características farmacológicas para compor cada um dos dois núcleos de nossa ideia central. Para tal, propuseram-se estudos de modelagem molecular, utilizando técnicas de triagem virtual baseada em estrutura e em ligantes (*SBVS* e *LBVS*), visando a obtenção de novas estruturas moduladoras da tubulina e bloqueadoras do canal de cálcio (para inibir a P-gp) com apropriadas características farmacocinéticas e toxicológicas (preditas *in silico*).

Como objetivos complementares (que denominamos como **Tarefa 2**), propôs-se estudar e racionalizar por modelagem molecular (*docking*, em particular) os resultados de atividade biológica obtidos com os compostos que fossem preparados em laboratório, junto ao grupo colaborador. A ideia é analisar as potenciais interações entre esses compostos e a tubulina, racionalizando os diferentes resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, com vistas a novas propostas de otimização molecular dos protótipos, além da utilização destes compostos como referência de mais um estudo de triagem virtual.

2.2. Objetivos específicos

- Planejamento de 4 estratégias distintas de métodos computacionais para cada uma das triagens virtuais executadas. Para a **Tarefa1** os objetivos incluem a execução de 3 estratégias (**Estratégias1-3**), e para **Tarefa2**, apenas uma (**Estratégia 4**);
- Tratamento de 6 bases de dados e geração da biblioteca de confôrmeros utilizados nos estudos de triagem virtual;

Para os estudos do núcleo inibidor da P-gp (Estratégia 1)

- Desenvolvimento, validação e avaliação de uma proposta de canal de cálcio do tipo-L através de técnicas de modelagem de proteínas por homologia estrutural;
- Estudos de triagem virtual baseado no ligante (similaridade por forma e eletrostática) para a investigação de compostos com propriedades inibidoras do canal de cálcio;
- Predição das atividades farmacocinéticas e toxicológicas (ADME/Tox) dos compostos selecionados;
- Análise dos modos de ligação propostos por *docking* para os compostos selecionados no sítio ligante do modelo do canal de cálcio construído;
- Seleção final dos melhores candidatos a compor o núcleo responsável pela inibição do canal de cálcio da proposta, através de inspeção visual dos modos de interação propostos nos estudos de simulações de *docking* para posterior comprovação da atividade através de ensaios *in vitro*.

Para os estudos do núcleo inibidor da Tubulina

- Estudo e busca no banco de dados *Protein Data Bank* (PDB) por estruturas da tubulina com desejável alta resolução e com ligantes no sítio da colchicina;

Estratégia 2

- Estudos de triagem virtual baseado no ligante, em 6 bases de dados, utilizando como referências os ligantes das estruturas cristalográficas PDB ID:4O2A e PDB ID: 4O2B, através de estudos de similaridade por forma e eletrostática;
- Triagem virtual feita a partir das predições das propriedades ADME/Tox dos compostos selecionados;
- Estudos de simulações de *docking* com os compostos selecionados e as proteínas provenientes dos complexos cristalográficos PDB ID:4O2A e PDB ID: 4O2B;

- Triagem virtual feita por inspeção visual dos resultados das simulações de *docking*;
- Seleção final dos melhores candidatos a compor o núcleo responsável pela modulação da tubulina da proposta para posterior comprovação da atividade através de ensaios *in vitro*.

Estratégia 3

- Estudos de simulações de *docking*, em 3 bases de dados, com a estrutura da proteína proveniente de PDB ID: 4O2B, e seleção dos 100 melhores resultados;
- Triagem virtual feita a partir das predições das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas dos compostos selecionados;
- Triagem virtual feita por inspeção visual dos resultados das simulações de *docking*;
- Seleção final dos melhores candidatos a compor o núcleo responsável pela modulação da tubulina da proposta para posterior comprovação da atividade através de ensaios *in vitro*.

Para os estudos a partir dos resultados do nosso grupo de síntese (Estratégia4)

- Simulações de *docking* e análise das propostas de interações das bibliotecas propostas por nossa equipe de síntese, nas estruturas cristalográficas PDB ID:4O2A e PDB ID: 4O2B;
- Utilização da pose obtida nos estudos de *docking* para novos estudos de triagem virtual baseada no ligante (similaridade de forma e eletrostática) para a investigação de novos compostos similares aos que obtiveram bons resultados de atividade anticâncer *in vitro* das bibliotecas sintetizadas pelo grupo colaborador de síntese;
- Triagem virtual feita a partir das predições das propriedades ADME/Tox dos compostos selecionados;
- Estudos de simulações de *docking* com os compostos selecionados e a proteína proveniente do complexo cristalográfico PDB ID:4O2A;

- Triagem virtual feita por inspeção visual dos resultados das simulações de *docking*;
- Seleção final dos melhores candidatos para posterior comprovação da atividade através de ensaios *in vitro*.

3. Metodologia

Como dito anteriormente, para o desenvolvimento da nossa proposta utilizamos tanto técnicas LBDD quanto de SBDD. Porém, como foram abordados dois estudos distintos, um objetivando a obtenção de novos *hits* utilizando como referência ligantes cristalográficos e outro objetivando o entendimento dos modos de interação de compostos já sintetizados por nossa equipe de síntese, bem como sua relação estrutura atividade, e utilização dos mesmos como referência para mais um estudo de triagem virtual, nosso trabalho foi dividido em duas tarefas.

Para a execução da **Tarefa1**, que consiste na obtenção de *hits* que irão compor cada um dos dois núcleos de nossa proposta inicial (o inibidor do canal de cálcio e o modulador da tubulina), utilizamos as abordagens LBVS e SBVS em bases de dados de compostos farmacêuticos. A **Tarefa1** é composta por 3 estratégias que serão detalhadas a seguir.

Devido à ausência de estruturas do canal de cálcio reportadas em banco de dados de estruturas cristalográficas, propusemos uma estrutura de canal de cálcio através de estudos de modelagem de proteínas por homologia. Em detrimento a essa situação, apesar do modelo ter obtido ótimos resultados de avaliação e validação, demos maior enfoque para os estudos de LBDD, a qual nomeamos de **Estratégia 1**.

A **Estratégia 1** consiste em uma triagem inicial de milhões de compostos presentes em 6 bases de dados através da similaridade por forma. A segunda triagem executada foi através da similaridade eletrostática e os compostos sobreviventes seguiram por uma triagem relacionada as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas preditas. Por fim, os compostos sobreviventes foram triados através de simulações de *docking* e as propostas dos modos de interações foram analisadas através de uma inspeção visual, obtendo ao cabo, a seleção dos *hits*. O fluxograma geral utilizado para a **Estratégia1** pode ser observado na Figura 14.

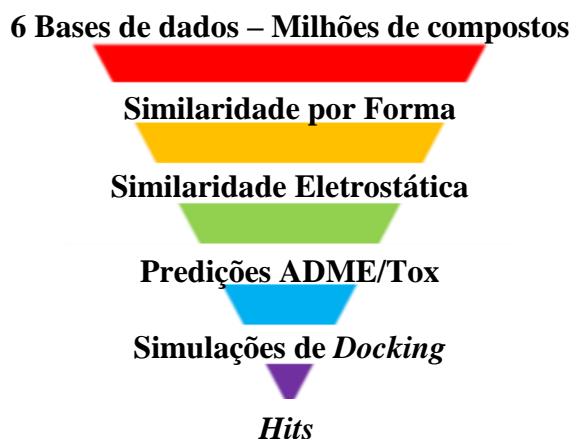


Figura 14. Fluxograma utilizado para os estudos de triagem virtual para a obtenção de hits para compor o núcleo inibidor do canal de cálcio (**Estratégia1**).

Como identificamos no banco de dados PDB duas estruturas de complexos cristalográficos com ligantes no sítio da colchicina de alta resolução (PDB ID:4O2A e PDB ID: 4O2B), optamos em dar maior enfoque para os estudos de SBDD aos estudos de obtenção de *hits* para compor o núcleo modulador da tubulina. Sendo assim, para a obtenção de *hits* que irão compor o núcleo inibidor da tubulina, repetimos a mesma estratégia utilizada para os *hits* inibidores do canal de cálcio, porém utilizando como referência os complexos citados, e a nomeamos de **Estratégia 2**.

Ainda para a obtenção de *hits* com características moduladoras da tubulina, fizemos uma nova abordagem, chamada de **Estratégia 3**. Para execução da **Estratégia 3** diminuimos o número de compostos iniciais utilizando apenas 3 bases de dados. A primeira triagem virtual foi realizada através de estudos de SBVS, utilizando a estrutura da tubulina PDB 4O2A e, a partir dos resultados das simulações de *docking*, os compostos resultantes tiveram suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas preditas. A seleção final dos compostos foi feita com base em uma inspeção visual relacionada às interações dos ligantes com os resíduos da cavidade do sítio, levando em consideração os valores de pontuação obtidos nos resultados de *docking*. Os fluxogramas gerais utilizados para as **Estratégia 2 e 3** podem ser observados na Figura 15, (a) e (b).

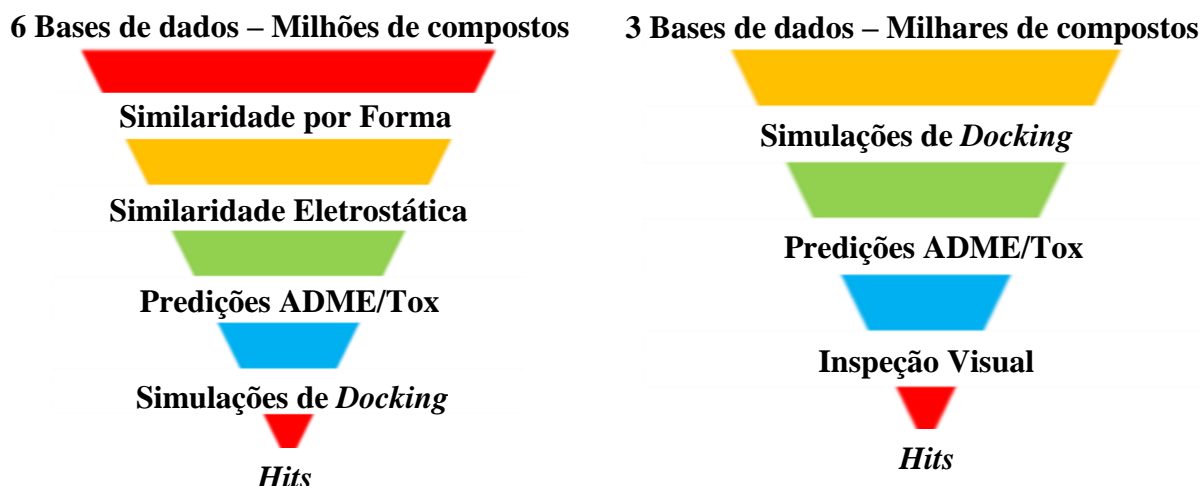


Figura 15. Fluxogramas gerais utilizados para obtenção de *hits* que irão compor o núcleo inibidor da tubulina de nossa proposta. (a) **Estratégia 2** e (b) **Estratégia 3**.

Os estudos realizados na **Tarefa2** consistem em estudos com as estruturas propostas e sintetizadas de nossa equipe de síntese. Dois estudos foram realizados: um estudo de *docking* com esses compostos frente à estrutura da tubulina e um estudo de LBVS (**Estratégia4**) com as estruturas que obtiveram resultados satisfatórios em ensaios *in vitro* de inibição da tubulina.

A proposta de se fazer um estudo de simulações de *docking* com as estruturas sintetizadas por nossa equipe de síntese é buscar o entendimento do modo de interação dessas estruturas com o sítio da colchicina na tubulina. Dessa forma, baseando-se nas propostas das poses (orientação + conformação) obtidas nos resultados de *docking* buscamos entender o sucesso e o insucesso desses compostos. Vale ressaltar que este estudo será de suma importância para as próximas propostas de bibliotecas de nossa equipe.

Ainda em relação a **Tarefa 2** foi realizada a **Estratégia 4** de triagem virtual. Esta estratégia consiste em estudos de LBVS utilizando como referência os compostos que obtiveram resultados satisfatórios nos ensaios *in vitro* de atividade anticâncer. Inicialmente foi realizado uma simulação de *docking* para determinar a conformação ótima dessas estruturas que foram utilizadas como referência nos estudos de LBVS.

A primeira triagem virtual executada na **Estratégia 4** foi uma triagem virtual por forma. Os estudos seguiram, assim como nas outras estratégias, através da triagem virtual

eletrostática seguindo pela predição das propriedades ADME/Tox. Após estas análises os sobreviventes tiveram seus modos de interação propostos por simulações de *docking*. A seleção final foi baseada na inspeção visual dos resultados obtidos nas simulações de *docking*, dos quais selecionamos os compostos que obtiveram coerência entre os modos de interações propostos. O fluxograma geral da **Estratégia 4** pode ser observado na Figura 16.

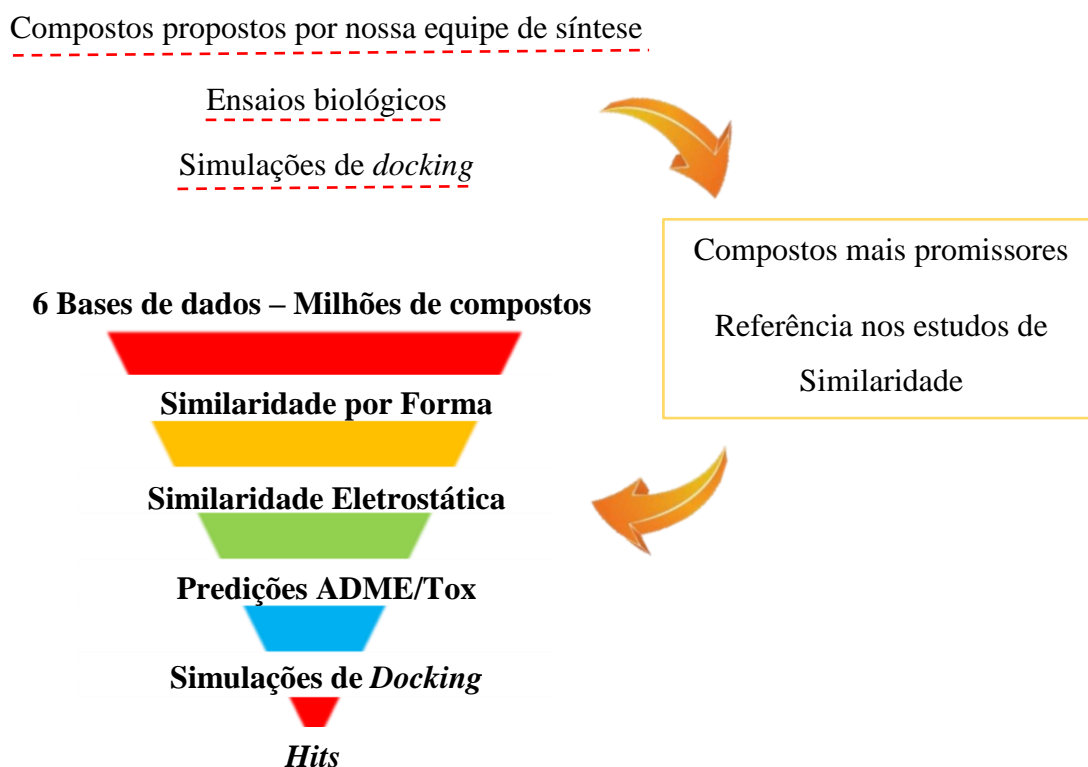


Figura 16. Fluxograma geral utilizado para obtenção de *hits* que irão compor o núcleo inibidor da tubulina de nossa proposta.

3.1. Programas e metodologia computacionais

O ponto em comum em todas as estratégias de nossa pesquisa está na triagem inicial de um montante de milhões de moléculas presentes em 3 ou 6 bases de dados de compostos químicos com características farmacológicas disponíveis para compra. As bases de dados utilizadas foram: *Maybridge* subdivisão *Screening Collection*¹³¹, *ZINC* subdivisões produtos naturais e *Drug database*¹³², *Chembridge* subdivisões *DIVERSet™-EXPEXPRESS-Pick™ Collection (DIVERSet™-EXP)*, *DIVERSet CORE Library (DIVERSet™-CL)*¹³³ e *BindingDB drug database*¹³⁴.

Todas as bases de dados foram preparadas através da utilização do programa **OMEGA**¹³⁵ (**Open Eye**). Os estudos de LBDD foram realizados com o auxílio dos programas **ROCS**¹³⁶ e **EON**¹³⁷ (**Open Eye**). As predições das propriedades ADME/Tox foram feitas com os programas **QikProp**¹³⁸ (**Schrodinger**) e **DEREK**¹³⁹ (**Lhasa**). Os estudos de SBDD foram realizados com a utilização dos programas **GLIDE**¹⁴⁰ (**Schrodinger**) e **GOLD**¹⁴¹ (**Cambridge Crystallographic Data Centre-CCDC**).

Para a geração do modelo de canal de cálcio por estudos de homologia utilizamos o servidor online **BLAST** (**National Center for Biotechnology Information - NCBI**)^{142,143} para a pesquisa de sequências homologas, **CLUSTAL Omega** (**European Bioinformatics Institute EMBL-EBI**)¹⁴⁴ para o alinhamento das sequências, **Modeller** (**University of California San Francisco - UCFS**)¹⁴⁵ para construção do modelo, **Maestro** (**Schrodinger**)¹⁴⁶ para a visualização gráfica e para a validação do modelo os webservers **WhatIf** (**Centre for Molecular and Biomolecular Informatics - CMBI**)^{147,148} e **ProCheck** (**EMBL-EBI**)¹⁴⁹.

3.1.1. Preparação das bases de dados - *Omega*

A análise conformacional dos ligantes presentes em uma base de dados é um dos primeiros e mais importantes passos nos estudos de planejamento e desenvolvimento de fármacos *in silico*. A estabilidade do ligante e do alvo molecular, afim de formar o complexo, envolvem mutuas adaptações exigindo da flexibilidade de ambos, de modo que, os grupos funcionais do ligante se posicionem corretamente, e a uma distância ótima, dos resíduos de aminoácidos dos receptores, para que, dessa forma, ocorra a interação¹⁵⁰. Sendo assim, uma vez que a conformação de um ligante no complexo difere da conformação de energia mínima, explorar o máximo de possibilidades dessas adaptações se torna uma importante atividade em diversas metodologias utilizadas nos estudos de LBDD e SBDD¹⁵¹.

Diversos programas computacionais utilizados em estudos de compostos bioativos apresentam uma etapa preliminar de geração de confôrmeros, outros são especializados em fazer somente esta etapa, como o programa **OMEGA** da empresa **OpenEye**. O **OMEGA** é um programa destinado a geração de confôrmeros em três dimensões com uma alta eficácia na obtenção da conformação bioativa entre os confôrmeros gerados, e com baixo desprendimento computacional.

O **OMEGA** utiliza em sua metodologia a geração de confôrmeros de forma sistemática baseada no conhecimento, e trabalha em três fases. A primeira destina-se à montagem da estrutura em 3D a partir de uma biblioteca de fragmentos. A segunda fase baseia-se na numeração de todas as torções rotativas usando valores de um banco de dados presente no programa. Por fim, o programa analisa a estrutura quanto à sua geometria e aos valores energéticos.

A biblioteca de fragmentos do **OMEGA** é gerada através da fragmentação de moléculas presente em um extenso banco de dados atentando-se a sistemas de anéis contínuos e ligantes lineares. Cada fragmento pode ter um ou mais confôrmeros, dependendo da estabilidade do anel. Para determinação dos confôrmeros é formada uma matriz de distância de ligações com base em uma tabela de ligações de fragmentos, posteriormente são ajustados os comprimentos de ligação e finalmente minimizados com base em um campo de força MMFF94 ajustado. Posteriormente as rotações são ajustadas comparativamente aos dados de ângulos e energias torcionais de uma biblioteca de torção derivadas da análise de um conjunto de estruturas cristalinas.

Para gerar uma estrutura em 3D os fragmentos são montados sobrepondo os fragmentos do banco de dados em uma molécula de referência, caso seja inexistente um fragmento o programa destina-se a gera-lo. Cada nova ligação formada que detém uma liberdade rotacional é comparada à tabela de ângulos e rotações. Novas torções são geradas na molécula afim de gerar uma grande quantidade de confôrmeros, atentando aos choques e duplicações.

Por fim, o programa analisa a energia das estruturas através de uma função de pontuação MMFF94 modificada e, a partir da molécula de menor energia (mínimo global), todas as outras tem o RMSD comparado a ela, sendo eliminadas as que saírem da parametrização do usuário. Vale ressaltar que em nenhuma etapa a estrutura dos confôrmeros é minimizada, pois a ocorrência de uma minimização compactaria a estrutura o que não condiz com as estruturas observadas nos complexos cristalográficos^{135,152}.

Os parâmetros do **OMEGA** utilizados para este estudo foram os otimizados (padrão), exceto para a geração de confôrmeros - modificada para até 300/molécula, energia de tensão (acima do mínimo global de energia) de até 9 kcal/mol, e um *cut-off*

para identidade de confôrmeros de 0.6 Å (desvio médio quadrático, RMSD), segundo protocolo otimizado por Carlos H. T. P. Silva.

3.1.2. Desenho de fármacos baseados em ligantes - **ROCS** e **EON**

Os estudos de LBVS tem como base a busca de informações, químicas e/ou geométricas, em ligantes com atividade biológica conhecida, afim de encontrar novas estruturas ativas por apresentarem características semelhantes a elas. A forma que os ligantes ativos se encontram no sítio de interação (conformação bioativa) é uma característica determinante para a atividade biológica de uma molécula, visto que o sítio de interação dos receptores farmacológicos apresenta uma cavidade que impõe ao ligante uma determinada forma para efetuar a interação. Sendo assim, o espaço tridimensional do ligante é uma das características necessárias para que se ocorra a formação do complexo¹⁵³.

O programa **ROCS** baseia-se na ideia de que a comparação entre dois compostos é dada através da sobreposição de seus volumes. Tal programa leva em consideração a distribuição de carga eletrônica nas regiões periféricas para assim avaliar os efeitos estéricos críticos no reconhecimento molecular. Para o cálculo dos volumes, o **ROCS** inicialmente representa a molécula referência como um conjunto de esferas de inserção e a superfície exposta dessas esferas são os fatores determinantes do seu volume molecular¹⁵⁴. Dessa forma, a utilização do programa **ROCS** destina-se à triagem virtual por forma, através da comparação da conformação e volume de um composto (referência) com a conformação e volume de compostos presentes em bancos de dados.

Em sequência ao **ROCS**, outra triagem por similaridade que pode ser executada é através da comparação dos mapas de potencial eletrostáticos das moléculas. Após o alinhamento e seleção dos compostos quanto à forma, os resultados podem seguir como arquivos de entrada para o programa **EON**. Um composto é identificado ao programa como referência e o **EON** tem por objetivo a comparação e classificação dos compostos através dos respectivos mapas de superfície eletrostática. O uso em conjunto dos dois programas tem revelado compostos promissores para o tratamento de distintas patologias¹⁵⁵. Os parâmetros adotados para o **ROCS** e o **EON** foram os otimizados (padrão).

3.1.3. Desenho de fármacos baseado na estrutura - **GLIDE** e **GOLD**

Em nossos estudos de SBDD e SBVS utilizamos os programas **GOLD** e **Glide** das empresas **CCDC** e **Schrodinger**, respectivamente. A proposta de utilização de dois programas para os estudos de *docking* baseia-se no fato que tais programas trabalham de formas distintas e são programas bem conceituados em estudos de avaliações de programas de *docking*. Dessa forma, ao comparar os resultados obtidos pelos dois programas aumentamos a confiabilidade e as chances de sucesso em nossos estudos.

Em termos gerais, os estudos de *docking* são cálculos de afinidade entre uma molécula, chamada de ligante, e a região de interação de um alvo macromolecular, chamado de receptor. Esses estudos têm como base a resolução de duas problemáticas: a determinação do posicionamento que o ligante pode assumir na cavidade em estudo chamada de pose (conformação e orientação) e a pontuação dessas possibilidades encontradas. Esses dois componentes são chamados de ancoragem e pontuação.

Em muitos estudos de avaliação de programas de *docking* a problemática da ancoragem do ligante é sempre bem avaliada, tanto para o **GOLD** quanto para o **Glide**. A evolução em processamento computacional e o paralelismo em busca em banco de dados e na automação por pesquisas sistemáticas, aumentaram a eficiência nessa etapa do estudo. A maior dificuldade que estes programas encontram é a etapa de pontuação, isto é, classificar corretamente as poses mais efetivas, ou no caso de estudos de SBVS, distinguir ligantes com e sem atividade¹⁵⁶⁻¹⁵⁹

Para determinar o posicionamento dos ligantes na cavidade em estudo cada programa adota um algoritmo distinto. Os algoritmos mais utilizados são os de busca sistemática, os algoritmos genéticos ou os baseados no método Monte Carlo. Sendo que, o programa **Glide** utiliza um algoritmo de busca sistemática associado ao método Monte Carlo, e o **GOLD** utiliza o algoritmo genético.

O método sistemático utilizado pelo **Glide**, representado na Figura 17, inicia-se com a construção de uma “rede” (*grid*) na região de interação do receptor que determina a forma e as propriedades do receptor. Em cada ponto dessa rede é feita a análise dos tipos de interações que podem ocorrer devido a presença dos átomos existentes, fornecendo assim, informações de diferentes campos (como interação eletrostática, van

der Waals, hidrofóbica/hidrofílica, etc.) que provêm progressivamente pontuações mais acurados para a pose do ligante. Posteriormente a essa etapa inicial, o programa passa para a etapa de geração de confôrmeros, os quais serão analisadas nesta região.

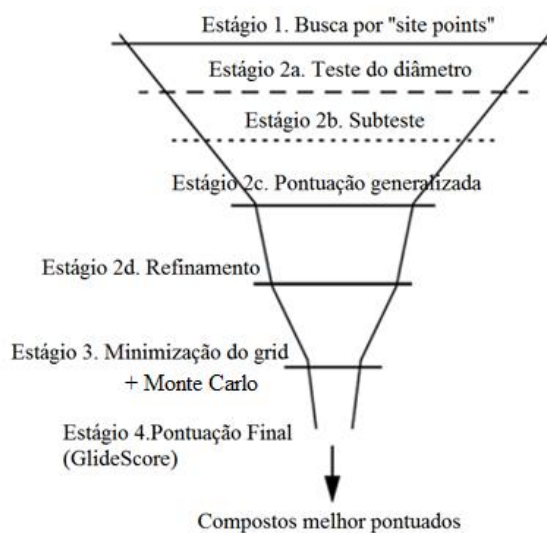


Figura 17. Representação esquemática do método de geração de confôrmeros utilizado pelo Glide^{160,161}

O início da geração de confôrmeros é dado pela geração de conjuntos de conformações para cada ligante em estudo. O número de conformações é variado de acordo com o número de ligações livres presentes nos ligantes. Para a determinação deste conjunto, a estrutura do ligante é analisada e separada em núcleo e em “grupos rotâmeros” (Figura 18a) e cada ligante tem seu ponto central determinado (Figura 18b). Todas as conformações são ancoradas e pontuadas, sendo realizadas buscas exaustivas de orientações na cavidade do sítio até a determinação final.

A busca inicia-se com *site points* (pontos que podem ocorrer interações) tanto do ligante (utilizando o centro do ligante) quanto do receptor e estes são comparados. Caso ocorra correspondência entre a conformação gerada e a cavidade em análise, a conformação é levada adiante.

O segundo passo (2a) avalia o posicionamento dos átomos do ligante dentro da cavidade do receptor, no que diz respeito aos choques estéricos, não permitindo que estes ocorram. Seguindo para o passo 2b, a análise feita é em relação às rotações sobre o diâmetro do ligante. Neste estágio é construído um subconjunto que é capaz de fazer

ligações de hidrogênio ou ligações metálicas e o ligante recebe uma pontuação em relação as ligações efetuadas. Se a pontuação é boa o suficiente, todas as interações com o receptor são marcadas, e os ligantes seguem para a etapa 2c.

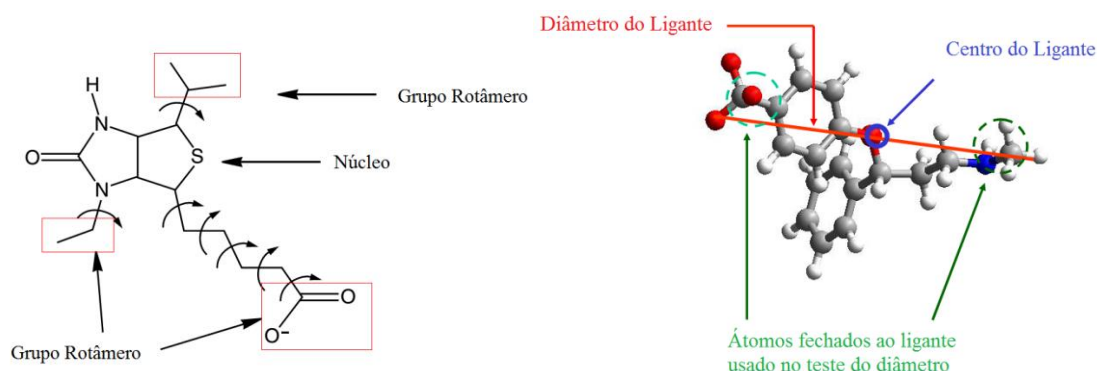


Figura 18. Análise do ligante feita pelo Glide. (a) Representação dos grupos rotâméricos e núcleos, (b) determinação do ponto central^{160,161}.

A etapa 2c, é chamada de pontuação “gananciosa”, pois a pontuação real de cada átomo depende não só da sua posição em relação ao receptor, mas também sobre a melhor pontuação possível que poderia ficar movendo $\pm 1 \text{ \AA}$ em x, y ou z. Utiliza-se uma função de pontuação discreta de *ChemScore* a qual reconhece interações hidrofóbica, ligações de hidrogênio, interações metálicas e ainda penaliza maus contatos (estéricos). Para finalizar a etapa 2, em 2d, é feito um refinamento movimentando o ligante $\pm 1 \text{ \AA}$ em x, y ou z e repontuando o mesmo. Esta etapa reduz um número de aproximadamente 5000 conformêros para aproximadamente 400.

No terceiro estágio ocorre uma minimização de energia utilizando o campo de força OPLS-AA Van der Waals em conjunto com as redes eletrostáticas. Por fim, utiliza-se o algoritmo de Monte Carlo para explorar os mínimos de energia nas proximidades de torção para um pequeno número de poses de baixa energia (3 a 6 melhores poses) e assim, orientar os grupos periféricos. No quarto e último estágio, as poses são novamente pontuadas através da função de pontuação *GlideScore* ou *XP Glide Score*, descritas a seguir^{160,161}.

A etapa de geração de conformêros feita pelo **GOLD** ocorre através da utilização do algoritmo genético. O processo ocorre gerando populações de ligantes com conformações aleatórias. Cada ligante dessa população é ancorado diversas vezes sob

diversas orientações e é pontuado através de uma função de pontuação, a qual o **GOLD** nomeia de “*fitness score*”. O **GOLD** possibilita a escolha de cinco funções de pontuação, que serão descritas a seguir.

Para geração de confôrmeros, inicialmente o programa cria uma população de confôrmeros aleatória para cada ligante. Cada membro dessa população é codificado e tal codificação é chamada de cromossomo. Os cromossomos detêm informações sobre os átomos do ligante, tais como, a possibilidade de fazer ligações de hidrogênio com o receptor, as regiões hidrofóbicas e as conformações das hidroxilas. Cada cromossomo detêm três genes, os quais representam as liberdades translacionais, rotacionais e conformacionais. A cada cromossomo é atribuído uma pontuação baseado na afinidade de interação como receptor e os cromossomos dentro da população são classificados.

Na tentativa de gerar conformações mais eficientes (seleção natural) os cromossomos fazem o uso de operadores genéticos, tais como, mutações e recombinações (*crossover*). Sucessivas etapas ocorrem até a geração da população final. A Figura 19 é uma representação esquemática do algoritmo genético utilizado pelo **GOLD**¹⁶².

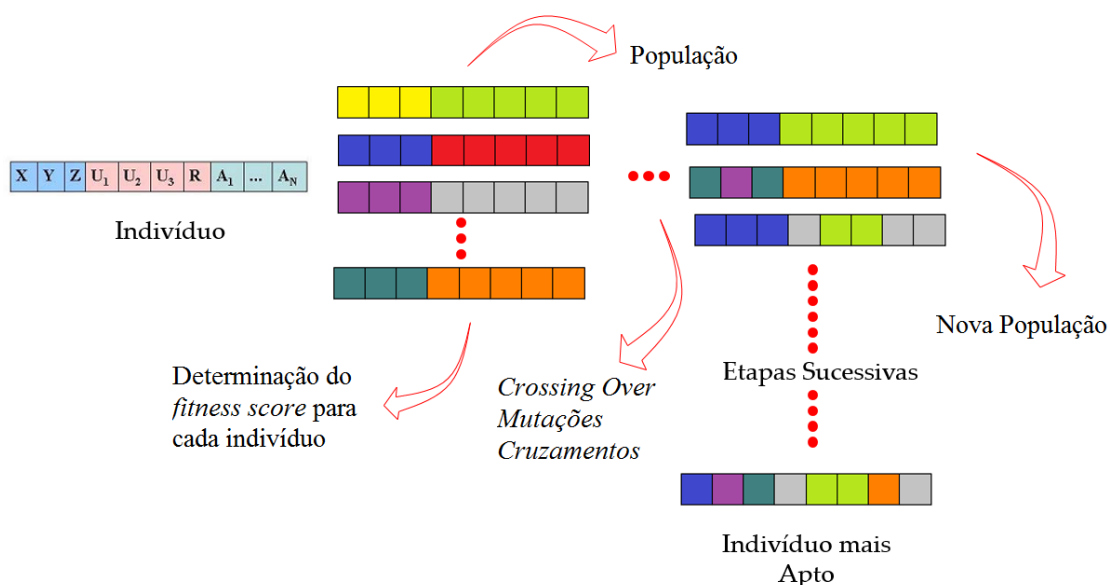


Figura 19. Representação esquemática do algoritmo genético utilizado pelo **GOLD**.

As avaliações dos modelos com modos de ligações corretos para cada ligante em estudo, dependem da etapa mais cautelosa e difícil nos programas de *docking*, a classificação através da função de pontuação. As funções de pontuação são distintas para cada programa podendo adotar metodologias baseadas no conhecimento, baseadas no

consenso (utilizando funções em combinação), combinadas com dados experimentais, através de uma abordagem baseada em mecânica molecular, através da combinação com mecânica quântica (como mecânica quântica/ mecânica molecular-QM/MM), específicas para determinados alvos ou através de “impressões digitais”¹⁵⁶⁻¹⁵⁹.

A função de pontuação adotada pelo **Glide** é uma função de pontuação composta baseada em mecânica molecular, chamada de *GlideScore*. O **Glide** utiliza uma função de pontuação modificada e ampliada da função empírica *ChemScore* que pode ser observada na Equação 1¹⁶³.

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_0 + \Delta G_{hbond} \sum_{il} g1(\Delta r)g2(\Delta\alpha) + \Delta G_{metal} \sum_{aM} f(r_{aM}) + \Delta G_{lipo} \sum_{LL} f(r_{LL}) + \Delta G_{rot} H_{rot}$$

Equação 1. Função de escore *ChemScore*.

$$H_{rot} = 1 + 1/N_{rot} \sum_r (P_{nl}(r) + P'_{nl}(r))/2$$

Equação 2. Definição do termo **Hrot** da função de escore *ChemScore*.

Os coeficientes de cada termo da função de escore *ChemScore* são obtidos por meio de regressão com base em 82 complexos, para os quais são conhecidas as afinidades de ligação. O termo da energia de ligação de hidrogênio (ΔG_{hbond}), $\sum_{il} g1 g2$ foi obtida através do cálculo de todas as possibilidades de ligações de hidrogênio entre os ligantes (i) e os receptores (l). O termo $g1(\Delta r)$ é o desvio em ligações de hidrogênio entre H...O/N de comprimento 1,85Å e $g2(\Delta\alpha)$ é o desvio do ângulo de ligação de hidrogênio OH...N ou NH...O, a partir do seu valor ideal de 180°.

No termo referente às ligações metálicas (ΔG_{metal}), a função $f(r)$ representa funções que pontuam em 1,00 as distâncias ou ângulos que se encontram dentro dos limites nominais e valores entre 1,00 e 0,00 para distâncias ou ângulos que se encontram fora dos limites normais, mas no interior, em limiares maiores. É um simples termo de contato entre as medidas das distâncias (r_{aM}) entre todos os átomos possíveis de ligações metálicas entre o ligante (a) e o receptor (M). A contribuição das interações lipofílicas também é calculada por uma função $f(r)$ entre todos os átomos lipofílicos dos ligantes (l) e do receptor (L). Por fim, são calculadas as energias das ligações rotacionais

($\Delta G_{rot} H_{rot}$) através da Equação 2 definidas para ligações sp3-sp3 e sp2-sp3 que estão em contato com o receptor por ambos os lados. N_{rot} representa o número de ligações rotáveis e P_{nl} , a porcentagem de átomos não lipofílicos em cada lado da ligação rotacional¹⁶³.

Para compor a função de escore *GlideScore* (Equação 3), foram acrescentadas à função *ChemScore* cálculos da energia de interação do complexo ligante-receptor, calculada por mecânica molecular, e energia de tensão do ligante. Além destes acréscimos a fração mecânica molecular da função *GlideScore* foi modificada, devido ao fato da otimização geral do complexo não poder estar relacionada a apenas um ligante em particular. Afim de, acomodar uma maior gama de ligantes em uma cavidade, geralmente pequena, de uma estrutura rígida de proteína a função *GlideScore* diminuiu a importância do campo de força raios de Van der Walls da proteína e/ou do ligante.

$$\begin{aligned} \Delta G_{bind} = & \Delta G_{lipo-lipo} \sum f(r_{lr}) + \Delta G_{hbond-neut-neut} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{hbond-neut-charged} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{hbond-charged-dcharged} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) \\ & + \Delta G_{max-metal-ion} \sum g(\Delta r) h(\Delta \alpha) + \Delta G_{rot} H_{rot} \\ & + \Delta G_{polar-phob} V_{polar-phob} + \Delta G_{coul} E_{coul} + \Delta G_{vdW} E_{vdW} \\ & + \text{termos de solvatação.} \end{aligned}$$

Equação 3. Função de escore *GlideScore*.

Os termos dos cálculos para as energias das interações lipofílicas e ligações de hidrogênio são as mesmas da função *ChemScore*, com a incorporação de variáveis aos cálculos das ligações de hidrogênio. O *GlideScore* diferencia as interações de hidrogênio entre átomos neutros e carregados. Outra variável adicionada permite o cálculo das ligações metálicas, a qual passa a considerar apenas ligações entre átomos aceitadores aniônicos. A função *GlideScore* acrescenta ainda para o cálculo da energia final as contribuições das interações de Coulomb e Van der Walls e os modelos de solvatação¹⁶¹.

Afim de aumentar a robustez dos resultados, o **Glide** permite o cálculo da pontuação final através de uma função da função de pontuação com uma precisão extra chamada de *XP GlideScore* (do inglês: *Extra Precision*). O diferencial do *XP GlideScore*

(Equação 4) está na aplicação de penalidades de dessolvatação nos ligantes e no receptor que contém grupos polares ou carregados e a identificação de padrões estruturais específicos que proporcionam grandes contribuições para a afinidade de ligação¹⁶⁴.

$$XP \text{ GlideScore} = E_{\text{coul}} + E_{\text{bind}} + E_{\text{vdW}} + E_{\text{penalty}}$$

$$E_{\text{binding}} = E_{\text{hyd-enclosure}} + E_{\text{hb-nn-motif}} + E_{\text{hb-cc-motif}} + E_{\text{PI}} + E_{\text{hb-pair}} \\ + E_{\text{phobc-pair}}$$

$$E_{\text{penalty}} + E_{\text{dessolv}} + E_{\text{ligand-strain}}$$

Equação 4. XP Função de escore *GLideScore*

Já o programa **GOLD** nos permite utilizar as funções: *GoldScore*, *ChemScore*, *ASP* (do inglês: *Astex Statistical Potential*), *CHEMPLP* (do inglês: *Piecewise Linear Potential*) e ainda uma função definida (e parametrizada) pelo usuário.

A função de pontuação *GoldScore* é uma função empírica e utiliza cinco parâmetros de análise (sendo um opcional): a soma da energia das ligações de hidrogênio ocorridas entre o ligante e o receptor, a soma das energias de Van der Waals entre o ligante e o receptor, a energia interna de Van der Waals do ligante, a energia de tensão de torção do ligante e a soma das energias das ligações de hidrogênio interna do ligante (opcional)¹⁶².

A função de pontuação *ASP* é uma função baseada no conhecimento e pode ser também utilizada para uma família de receptores específica. Os parâmetros adquiridos pelo *ASP* são derivados das frequências de ocorrências de interações entre átomos de ligantes com receptores, encontradas em complexos depositados no PDB. O diferencial do *ASP* sobre outras funções de pontuação estatísticas baseadas no conhecimento é a incorporação de dados relativos ao ambiente em torno dos átomos responsáveis pelas interações, o que afeta a acessibilidade do ligante ao sítio de interação.

Para melhorar a qualidade dos dados estatísticos, *ASP* utiliza informações das superfícies disponíveis que certos átomos apresentam no sítio de interação. Para tal, são utilizados termos que diferenciam a acessibilidade de diferentes tipos de átomos da

proteína e do ligante, que avaliam os volumes em torno dos átomos das proteínas na região de interação e os tipos de átomos que podem interagir em distintas regiões^{162,165}.

A função de pontuação mais robusta que pode ser utilizada pelo programa **GOLD** é a medida de potencial por partes, chamada de *CHEMPLP* (do inglês: Piecewise Linear Potential). *CHEMPLP* é uma função de pontuação baseados em dados empíricos e em campos de força, a qual os parâmetros podem ser observados na Equação 5^{162,166}.

$$\begin{aligned}
 \text{Pontuação}_{CHEMPLP} &= f_{PLP} - (f_{chem-hb} + f_{chem-cho} + f_{chem-met}) \\
 f_{PLP} &= -(w_{PLP} \cdot f_{PLP} + w_{lig-clash} \cdot f_{lig-clash} + w_{lig-tors} \cdot f_{lig-tors} + f_{chem-cov} \\
 &\quad + w_{prot} \cdot f_{chem-prot} + w_{cons} \cdot f_{cons}
 \end{aligned}$$

Equação 5. Função de escore *CHEMPLP*^{162,166}

A determinação dos valores para cada um dos parâmetros em análise pela função PLP é dependente do tipo de potencial de interação que ocorre entre átomo do ligante e do receptor, podendo ser de natureza aceptora, doadora, aceptora e doadora, metálico e não polar. Cada potencial de interação é avaliado podendo ocorrer uma repulsão, uma atração ou uma ligação de hidrogênio. A relação entre o tipo de interação e os átomos do ligante e do receptor pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3. Avaliações das interações ocorridas entre os tipos de átomos do ligante e do receptor pela função PLP^{162,166}

Tipo de átomo do Ligante	Tipo de átomo do Receptor				
	Doador	Aceptor	Doador/Aceptor	Não Polar	Metálico
Doador	Repulsão	Ligação-H	Ligação-H	Atração	Repulsão
Aceptor	Ligação-H	Repulsão	Ligação-H	Atração	Metal
Doador/Aceptor	Ligação-H	Ligação-H	Ligação-H	Atração	Metal
Não Polar	Atração	Atração	Atração	Não Polar	Atração

Cada uma das interações, dependendo da distância que estão ocorrendo, recebe uma denominação pelas letras A-F se repulsão/ atração e A-D, se puramente atrativa, conforme apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Relação entre os valores de pontuação e as distancias entre as interações.

Interação	Distância				Pontuação	
	A	B	C	D	E	F
Ligação-H	2.3	2.6	3.1	3.4	<i>wplp-hb</i>	20.0
Metal	1.4	2.2	2.6	2.8	<i>wplp-met</i>	20.0
Atração	3.4	3.6	4.5	5.5	<i>wplp-bur</i>	20.0
Não Polar	3.4	3.6	4.5	5.5	<i>wplp-nonp</i>	20.0

Interação	Distância		Pontuação	
	A	B	C	D
Repulsão	3.2	5.0	<i>wplp-rep</i> · 0.1	<i>plp-rep</i> · 20.0

Para a determinação dos valores específicos, os parâmetros são relacionados com o Gráfico 3 a se a interação é repulsiva/atrativa, e Gráfico 3b se a interação é puramente repulsiva^{162,166}.

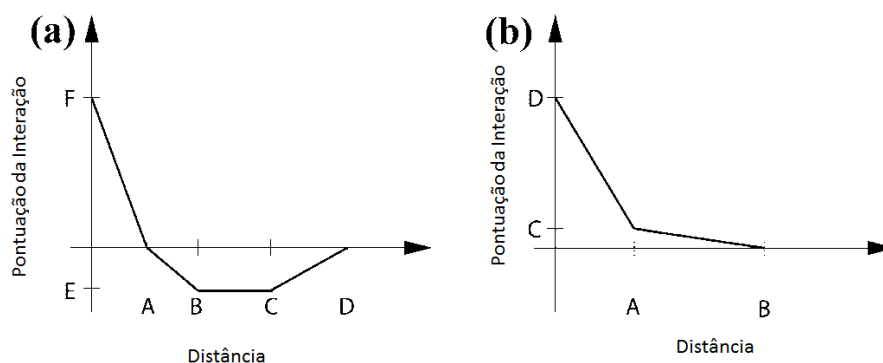


Gráfico 3. Relação entre a distancia e a pontuação para os parametros relacionados a natureza (a) repulsiva/atrativa e (b) puramente repulsiva^{162,166}

Os dois programas, **Glide** e **GOLD** foram utilizados nos estudos de triagem virtual para a realização das triagens realizadas envolvendo a estrutura de canal de cálcio gerada por homologia, e a tubulina, visto que os dois programas trabalham de formas distintas e são os mais bem avaliados em artigos que comparam a eficiências de programas de *docking* (refs. ^{158,167,168}). Além dos estudos de triagem virtual ambos os programas foram utilizados para os estudos de avaliação das propostas de relação estrutura-atividade para os compostos sintetizados pela nossa equipe de síntese.

Os resultados serão demonstrados e discutidos em capítulos posteriores. Os parâmetros utilizados para o estudo do canal foram a localização do centróide na região do poro central: $x = -3,55$; $y = -3,43$ e $z = 10,99$ com uma esfera de 10Å quando simulados com o **GOLD** e quando simulados com o **Glide** um *grid* externo de 12Å e 6Å para o *grid* interno. Na região alostérica utilizamos centroide em $x = -5,27$; $y = 0,13$; $z = 7,89$ com os mesmos valores para a esfera do **GOLD** e *grids* para o **Glide**. No que diz respeito as simulações na estrutura da tubulina utilizamos a localização do centroide em $x=17,336$; $y=63,576$ e $z=43,586$. Na simulação feita com o **GOLD** utilizamos o tamanho da esfera em 8Å e quando simulados com o **Glide** os *grids* em 12Å (externa) e 6 (interna).

Utilizamos as funções de pontuação *CHEMPLP* nas simulações com o **GOLD** e *XPGLideScore* com as efetuadas no **Glide**. Todos os outros parâmetros foram mantidos com os valores padrões dos programas.

3.1.4. Predição das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas (**QikProp** e **DEREK**)

As análises das propriedades farmacocinéticas são fatores de extrema importância no desenvolvimento de novas entidades farmacológicas, pois baixos índices de absorção, distribuição, metabolismo e excreção são uma das principais razões de insucessos em pesquisas nesta área de concentração. Além do mais, os ensaios clínicos de novas substâncias com propriedades farmacológicas são as etapas mais custosas no desenvolvimento de fármacos e a descoberta mais breve possível de baixos índices farmacocinéticos é um fator de economia, em tempo e em dinheiro, no desenvolvimento de novas substâncias biologicamente ativas¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Um dos métodos de predição de atividades farmacocinética é através do cálculo de descritores, os quais podem ser

realizados através do programa **QikProp** e que constituem importante filtro em estudos de triagem virtual¹⁷².

O programa **QikProp** da empresa **Schrodinger** faz a predição de propriedades farmacocinéticas (ADME) por meio da utilização de descritores com baixo desprendimento computacional. Tal programa analisa a estrutura da molécula como um todo, não apenas por fragmentos, e baseia suas previsões sobre a estrutura três dimensões.

Importantes propriedades farmacocinéticas podem ser preditas e comparadas a um extenso banco de dados de fármacos comercializados. Dentre estas, destacamos: $\log P_{o/w}$, $\log CACO_2$, $\log MDCK$, porcentagem de absorção oral e qualidade do modelo de absorção oral humana.

O coeficiente $\log P_{o/w}$ (coeficiente de partição octanol/ água) é um importante descritor para a predição da permeabilidade e biodisponibilidade em fármacos através do cálculo do balanço lipofílico/hidrofílico dos mesmos¹⁷³.

Um dos grandes interesses na descoberta de novos fármacos é que os mesmos sejam administrados por via oral. Para tal, esses devem ultrapassar uma série de barreiras, dentre elas, a barreira do epitélio intestinal. O $\log CACO_2$ é uma medida de absorção pela mucosa intestinal por difusão passiva, realizado através de estudos em células do epitélio intestinal diferenciadas, Caco-2 (QPPCaco). A linhagem celular Caco-2 é derivada de um carcinoma colo-retal humano e é fonte de estudo para absorção de fármacos *in-vitro*¹⁷⁴. Junto com o modelo de células Caco-2 a permeabilidade as células MDCK (do inglês: *Madin-Darby canine kidney*) também desempenham um importante fator a ser analisado no estudo de permeabilidade de fármacos *in-vitro*^{175,176}.

Outro descritor importante que podemos analisar com o programa **QikProp** é o *#star*, que corresponde ao número de violações, em todos os descritores em análise, aos intervalos comuns a 95% dos fármacos. Os valores que utilizamos como critério para a eliminação dos compostos nos estudos de triagem virtual foram: qualquer sinalização no descritor *#star*, valor de $\log P_{o/w}$ maior do que 5, $\log CACO_2$ e $\log MDCK$ abaixo de 500, Porcentagem de Absorção Oral abaixo de 80% e Qualidade do modelo de absorção oral humana diferente de “alta”.

Em relação as predições toxicológicas, utilizamos em nossos estudos o programa **DEREK** que é um programa de predição de toxicidade em moléculas baseado no

conhecimento. O programa analisa a estrutura total da molécula por similaridade 2D e indica possíveis riscos toxicológicos que as estruturas possam ter a partir da comparação da estrutura com suas regras de bases. A análise também é feita pela comparação fragmentos da estrutura da molécula com fragmentos presentes no seu banco de dados, chamados de grupamentos toxicóforos. Várias características toxicológicas estão disponíveis nas predições do **DEREK**, tais como, mutagenicidade, carcinogenicidade, sensibilização da pele, irritação, efeitos reprodutivos, neurotoxicidade, entre outras. Essa análise fornece um critério para excluir substâncias potencialmente nocivas na fase de seleção, para a síntese de compostos e futuros testes experimentais^{139,177}.

O programa **DEREK** permite optar pela espécie em qual as predições serão efetuadas, mantivemos nossas predições apenas em humanos e nosso critério de exclusão foi baseado em qualquer alerta de toxicidade segundo *Custom Prediction* e *Lhasa Prediction*.

3.2. Modelagem de proteínas por homologia estrutural

Nem sempre as estruturas de proteínas resolvidas por cristalografia de raios-X ou RMN são úteis para o planejamento de fármacos baseado em estrutura, assim como nem todas as proteínas são hábeis de serem resolvidas por essas técnicas. Quando, por exemplo, esses métodos não conseguem determinar a estrutura de um alvo terapêutico, ou mesmo quando a resolução/refinamento cristalográfico não é adequada para estudos de SBDD, duas alternativas podem ser aplicadas para o desenvolvimento teórico de um modelo de receptor: utilizando metodologias *ab-initio* ou através do método comparativo de proteínas por homologia estrutural.

O desenvolvimento de um modelo tridimensional de receptor através do método comparativo de proteínas por homologia estrutural ocorre através da comparação entre duas ou mais sequências de proteínas similares. A execução dessa técnica requer, pelo menos, uma estrutura resolvida experimentalmente e essa estrutura deve compartilhar de razoável identidade sequencial com a proteína-problema. Não obstante, o sucesso deste método depende também de um correto alinhamento entre as sequências de aminoácidos envolvidas¹⁷⁸⁻¹⁸⁰.

O sucesso e a confiabilidade dos modelos gerados por homologia estrutural de proteínas devem ao fato do *folding* de uma família de proteínas se manter relativamente conservada durante a Evolução das espécies, ainda mais do que a estrutura primária. Dessa forma, se duas sequências de aminoácidos forem similares, a estrutura tridimensional terá grandes chances de também ser. A modelagem de fármacos por homologia segue quatro passos: (1) pesquisa por sequências homólogas, (2) alinhamentos das sequências, (3) construção do modelo e (4) avaliação^{180,181}.

Para a construção de um modelo de canal de cálcio empregando-se a técnica de homologia estrutural de proteínas, utilizamos os seguintes programas para cada etapa do processo.

- Pesquisa por sequências homólogas – **protein BLAST (BLASTp)**;
- Alinhamento das sequências – **Clustal Omega**;
- Construção do modelo – **Modeller**;
- Avaliação – **WhatIf** e **Procheck**.

Por fim, incluiu-se uma etapa de validação do modelo, visto que o mesmo foi utilizado para estudos de triagem virtual baseada na estrutura. A validação foi feita utilizando os programas **Glide** e **GOLD**. Para fins de visualização gráfica dos modelos, utilizamos o programa **Schrodinger/Maestro**.

3.2.1. Pesquisa por sequências homólogas – **Blastp**;

O servidor *on-line* **BLAST** (do inglês: *Basic Local Alignment Search Tool*) disponibilizado pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) é um conjunto de ferramentas destinado a fazer pesquisas, em bancos de dados, por sequências de proteínas, ou DNA, semelhantes a uma sequência de interesse. **BLAST** utiliza um conjunto de ferramentas estatísticas e refinamentos afim de eliminar falsos positivos.^{142,143}

Para procurar semelhanças entre sequências de proteínas o programa **BLAST** através do algoritmo *protein Blast* (**Blastp**) utiliza uma busca por semelhanças de sequências de 3 aminoácidos (chamada de “*hit*”) do modelo com aqueles presentes em

bancos de dados como o PDB, como exemplo. Os alinhamentos dessas sequências recebem uma pontuação (*score*) e a sequência é expandida, em ambos os sentidos, afim de, se tentar obter uma maior pontuação.

Uma alta pontuação obtida não necessariamente indica homologia entre as sequências, com um todo. Para sanar essa dificuldade, o **BLAST** desenvolveu uma pontuação chamada de *e-value*, afim de determinar que uma sequência não foi obtida aleatoriamente. Este valor representa a probabilidade de se obter com outra sequência um alinhamento contendo a mesma pontuação. Sendo assim, menores valores de *e-value* (mais próximos de zero) representam maior a confiabilidade.

Outro resultado importante oferecido pelo **BLAST** é a porcentagem de identidade sequencial. A porcentagem de identidade mede o grau de correspondência entre duas subsequências, onde uma identidade de 25% ou superior implica semelhança de função, enquanto 18-25% de semelhança pode implicar em uma semelhança estrutural ou até de função.

A evolução do programa **BLAST** o capacitou fazer suas buscas em conjuntos de sequências, através de um algoritmo de busca que utiliza lacunas chamadas de “*gaps*” (inserções ou deleções de aminoácidos de uma sequência em relação à outra). Ainda com a etapa de refinamento utilizado pelo **BLAST**, as buscas por sequências de *hits* podem ser não sobrepostas, dessa forma, **BLAST** se torna um algoritmo eficiente na busca por sequências de proteínas homólogas.^{142,143,180,182-184}

3.2.2. Alinhamentos das sequências – *Clustal Omega*

Para executar uma etapa crucial do estudo de modelagem de proteínas por homologia estrutural, o alinhamento¹⁸⁵, utilizamos o servidor *on-line* **Clustal Omega**, oferecido pela *European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute* (EMBL-EBI). Um dos dados importantes a se obter no alinhamento das sequências é sobre quais as regiões que sofreram mutações ao longo da Evolução, como foi a mutação ocorrida e quais regiões se mantiveram conservadas, ou em outras palavras, onde ocorreram as inserções, deleções e mutações de resíduos de aminoácidos^{184,186}.

O algoritmo utilizado pelo **Clustal Omega** para o alinhamento das sequências é o do “alinhamento progressivo”. Este algoritmo realiza o alinhamento de sequências cada

vez maiores em sub alinhamentos de alta complexidade, seguindo a ordem de ramificação de uma árvore guia^{184,186}.

3.2.3. Construção do modelo – **Modeller**;

Para a construção do modelo do canal de cálcio utilizando a técnica de modelagem de proteínas por homologia estrutural, utilizamos o programa **Modeller**. Tal programa utiliza a estrutura de entrada como molde e desenvolve uma estrutura tridimensional homóloga a partir da comparação feita entre os alinhamentos oferecidos¹⁴⁵.

O **Modeller** trabalha através da comparação das restrições espaciais entre o molde (típica para proteínas da mesma família – de mesmo *fold*) e a estrutura que está sendo modelada para a sequência problema. As restrições espaciais que o **Modeller** utiliza são: as restrições entre distâncias e os ângulos diedro, restrições esteroquímicas (comprimentos e ângulos de ligação), preferências estatísticas entre os ângulos diedros e distâncias interatômicas entre átomos não ligados e restrições opcionais criadas manualmente (regras de enovelamento da estrutura secundária, experiências de ligações cruzadas, intuição, dentre outros)¹⁸⁷.

Para a tarefa a ser desenvolvida, **Modeller** trabalha em quatro passos: (1) identificação e seleção de proteínas moldes candidatas, (2) alinhamento entre a sequência e o(s) molde(s), (3) construção do modelo com base no alinhamento definido e (4) avaliação/controle da qualidade do modelo^{187,188}. Embora os dois primeiros passos sejam distintos, a identificação e seleção de moldes é um passo que por finalidade fornece um alinhamento preliminar das sequências¹⁸⁸.

A identificação inicial é responsável por encontrar sequências similares àquela que se pretende modelar, utilizando parâmetros estatísticos como o *e-value*, além da porcentagem de similaridade. Para o *e-value*, espera-se valores próximos a zero, mas um valor entre 30% e 40% garantem resultados mais precisos. As obtenções desses valores foram atingidas após um alinhamento das sequências, na Etapa 2.

A etapa de construção de um modelo de proteína através da modelagem por homologia segue através da transferência/cópia da conformação da cadeia principal da proteína molde para o modelo. Esse processo pode ocorrer utilizando os métodos: modelagem de união de corpos rígidos¹⁸⁹, pela combinação de segmentos¹⁹⁰, ou através

da satisfação de restrições espaciais¹⁹¹. No caso do **Modeller**, o método utilizado é o da satisfação das restrições espaciais que, conforme descrito anteriormente, consiste em inicialmente atribuir restrições e limitações ao novo modelo utilizando como informação o alinhamento com a proteína molde bem como sua estrutura já resolvida.

Inicialmente são avaliadas as distâncias entre os resíduos das sequências alinhadas, e posteriormente as restrições dos comprimentos de ligações, ângulos de ligação e de diedro são derivadas a partir do alinhamento com o modelo. As restrições são obtidas a partir de uma análise estatística das relações entre proteínas similares, através de dados predeterminados em estudos anteriores. Posteriormente, as restrições estereoquímicas envolvidas nas interações entre átomos não-ligados são determinadas através de uma função objetiva. Deriva-se, então, um modelo por minimização dessas restrições espaciais. Pode ocorrer, subsequentemente, uma refinação do modelo por avaliação e modelagem das regiões de alças/*loops*, com rotinas específicas do algoritmo, e finalmente o processo termina com a otimização estrutural do modelo gerado^{188,192}.

3.2.4. Avaliação da qualidade do modelo – *WhatIf* e *Procheck*.

Os servidores *on-line* **WhatIf** e **ProCheck** foram utilizados para a avaliação dos modelos de estruturas de canal de cálcio geradas com auxílio do programa **Modeller**. **Procheck** e **WhatIf** foram utilizados respectivamente para a validação estereoquímica e dos contatos atômicos.

Disponibilizado pela **EMBL-EBI** o **ProCheck** foi utilizado para a validação da estrutura geral do canal de cálcio gerada por homologia, no tocante à qualidade estereoquímica. Para esta avaliação, o **Procheck** compara os resíduos do modelo com parâmetros tipicamente observados em estruturas de proteínas de alta-resolução cristalográfica. Os parâmetros analisados foram: Diagrama de *Ramachandran*, planaridade das ligações peptídicas, medidas das interações não-ligantes (van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas) entre átomos, isto é, entre átomos que não estão ligados por ligações covalentes, distorção tetraédrica dos carbonos alfa, energias das ligações de hidrogênio e *G-Factor* (*General factor*, uma média da estereoquímica geral do modelo).

O Diagrama de *Ramachandran*¹⁹³ permite uma análise preliminar e importante de uma estrutura de proteína, porque indica erros na estrutura mais conservada da proteína, a terciária. Tal diagrama, dividido em regiões, tem por função a análise dos resíduos de aminoácidos, indicando se os mesmos estão em regiões energeticamente favoráveis ou desfavoráveis no que diz respeito às suas conformações de cadeia principal. A Figura 20 é um exemplo típico de um Diagrama de *Ramachandran*, disponibilizado no manual de uso do programa **Procheck**. No referido diagrama/gráfico, podemos observar os eixos contendo os dois principais ângulos da cadeia principal, Phi e Psi [ϕ, ψ], dispostos de 180° a -180° , e que abrangem todas as combinações energéticas possíveis desses ângulos diedros, os quais os resíduos de aminoácidos podem adquirir. A exceção fica por conta dos resíduos de glicina, pois sua cadeia lateral corresponde apenas a um átomo de hidrogênio, ou de prolina, que é um iminoácido, os quais são apresentados no diagrama por triângulos. Os ângulos ϕ, ψ na cadeia de aminoácidos podem ser observados na Figura 21.

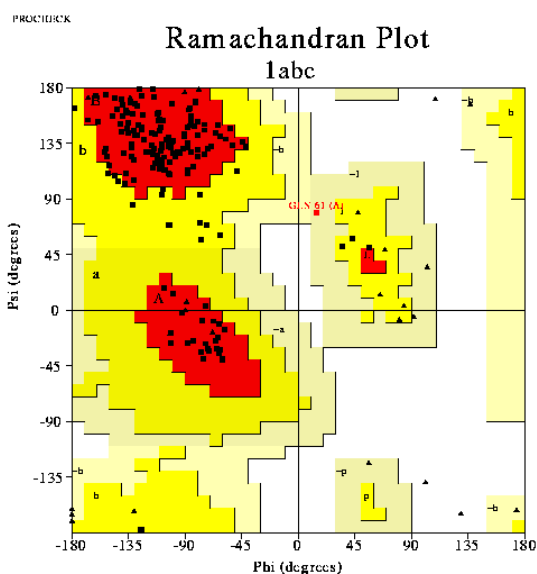


Figura 20. Representação do Diagrama de *Ramachandran* de uma dada proteína.

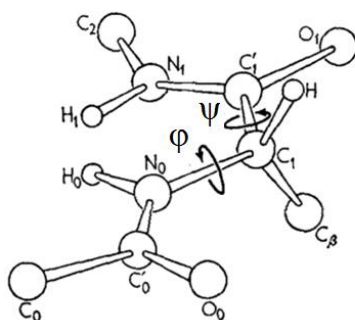


Figura 21. Representação dos ângulos ϕ, ψ de um aminoácido na cadeia principal de uma proteína ¹⁹³.

Podemos notar três diferentes cores no gráfico de *Ramachandran*: vermelha, amarela, amarela clara e branca. A cor vermelha indica a região “permitida” (ou energeticamente favorável), a cor amarela indica a região “adicionalmente permitida”, em amarelo claro está representada a região “generosamente permitida” e a região branca representa a região “proibida”¹⁹⁴. Para uma estrutura de proteína com 2Å de resolução, espera-se mais de 90% dos resíduos de aminoácidos em regiões permitidas.

3.2.5. Visualização gráfica - *Maestro*

O **Maestro** é uma interface gráfica oferecida pela empresa Schrodinger. O **Maestro** foi utilizado para visualização dos resultados do estudo de modelagem de proteínas por homologia estrutural, através da sobreposição dos modelos e verificação das regiões de deleção, se em regiões de dobra ou em hélices. O programa **Maestro** também foi utilizado para a análise visual dos resultados das simulações de *docking*, tanto para a análise e propostas das relações estrutura-atividade quanto para proporcionar a inspeção visual dos compostos resultantes dos estudos de triagem virtual.

4. Discussão dos resultados

Os resultados que obtivemos nas pesquisas de novos quimiotipos utilizados para compor os dois núcleos da estrutura do pró-fármaco idealizado originalmente no projeto-mãe precursor desse, foram baseados em estudos de triagem virtual em extensos bancos de dados, utilizando técnicas de LBDD somadas a técnicas de SBDD. Como nossa atividade foi dividida em 2 tarefas que se distinguem pelo ponto de partida, a discussão dos resultados será dividida da mesma forma. Sendo assim, a discussão da **Tarefa1**, que teve como ponto de partida dados reportados na literatura para a investigação de compostos com características inibitórias/bloqueadoras do canal de cálcio (visando a inibição da P-gp), será pautada na execução da **Estratégia1** e nos passos iniciais, o que inclui a construção do modelo de canal de cálcio necessário para o desenvolvimento da mesma. Ainda discutindo os resultados obtidos na **Tarefa1**, seguimos com mais duas estratégias (**Estratégia 2 e 3**) utilizadas para a investigação de compostos capazes de modular a atividade da tubulina.

No que diz respeito à **Tarefa2**, discutiremos o estudo dos compostos propostos por nossa equipe de síntese, os quais já detiveram dados importantes e promissores de atividade anticâncer. Nesta etapa, após o estudo das propostas dos modos de interação desses candidatos a fármacos, executamos mais uma estratégia de triagem virtual (**Estratégia4**) para a obtenção de novos compostos com potenciais atividades moduladora da tubulina. Nos tópicos a seguir discutiremos os resultados obtidos nas estratégias de cada uma das tarefas.

4.1.Tarefa1

4.1.1. Triagem Virtual para descoberta de compostos bloqueadores do canal de cálcio (**Estratégia1**)

O ponto de partida para o desenvolvimento da **Estratégia1** foi a construção de um modelo de canal de cálcio através da técnica de modelagem por homologia estrutural, visto que tal estrutura não é existente em banco de dados de estruturas de proteínas. Depois de analisada e validada, constatamos que tal estrutura detinha plenas condições de ser utilizada em nossos estudos de SBDD e, dessa forma, após a construção do modelo de canal de cálcio começamos os estudos de triagem virtual que serão explanados a seguir.

Um esquema gráfico detalhado da **Estratégia1** utilizada para os estudos de triagem virtual de compostos bloqueadores do canal de cálcio pode ser observado na Figura 22. Tal estratégia partiu de milhões de compostos presentes em 6 bases de dados, os quais sofreram sucessivas triagens até chegarmos ao montante de 9 compostos, que serão avaliados através de ensaios *in vitro*. A primeira triagem executada foi feita através da similaridade por forma, a partir da qual foram selecionados 2000 compostos com melhor índice Tanimoto para cada uma das bases de dados em estudo. Os estudos de LBVS seguiram por mais uma triagem, sendo esta executada através da triagem por potencial eletrostático, onde então foram selecionados os 100 melhores resultados através do índice Tanimoto para cada uma das bases de dados em estudo. Os compostos sobreviventes a estas triagens tiveram suas propriedades ADME/Tox preditas e os compostos que satisfizeram selecionados parâmetros de farmacocinética e toxicidade tiveram seus modos de interação propostos por simulações de *docking*.

Os modos de interação propostos nos estudos de *docking* foram analisados através de uma inspeção visual, pela qual foi possível selecionar 9 compostos candidatos a bloqueadores do canal de cálcio. Todas as etapas citadas acima serão detalhadamente explicadas nos seguintes tópicos, a começar pela construção do modelo do canal de cálcio.

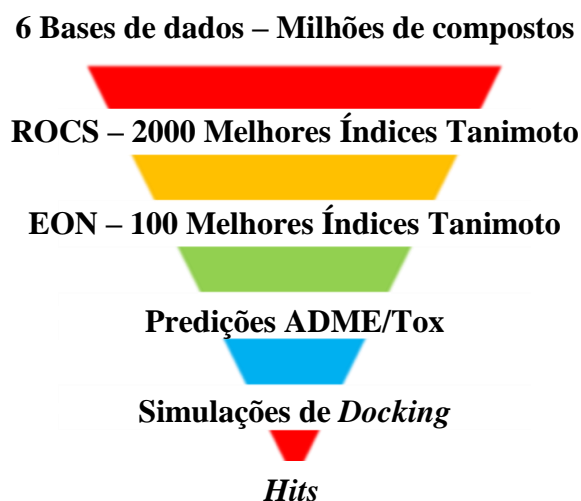


Figura 22. Representação esquemática da **Estratégia1** de triagem virtual utilizada para a seleção de compostos com potenciais atividades inibitórias do canal de cálcio.

Desenvolvimento do modelo de Canal de cálcio tipo-L, por homologia estrutural.

Para o desenvolvimento de um modelo de canal de cálcio do tipo-L utilizamos a técnica de desenvolvimento de modelos tridimensionais de proteínas através da

modelagem estrutural por homologia. Estes estudos se procedem em três passos: (1) alinhamento (sendo essa uma etapa crucial do processo¹⁸⁵), (2) construção do modelo, (3) avaliação do modelo¹⁹⁵ e, ainda, como utilizaremos o mesmo para estudos de SBVS, acrescentamos ao nosso estudo mais uma etapa, a de (4) validação.

A nossa proposta de construção de um modelo de canal de cálcio foi baseada em propostas anteriores relatadas nos estudos de Zhorov e colaboradores 2001¹⁸⁵ e Shaldam e colaboradores 2014¹⁹⁵. Zhorov e seus colaboradores propuseram em seus estudos a construção de um modelo de canal de cálcio utilizando como molde a estrutura de um canal de potássio (PDB ID:1BL8¹⁹⁶) a intenção dos seus estudos era construir um modelo de canal confiável e, a partir dele, buscar o entendimento da interação entre fármacos bloqueadores de canal de cálcio com tal alvo. Shaldam e seus colaboradores propuseram um novo modelo em um estudo mais recente baseado na estrutura do canal de potássio PDB ID:2A9H¹⁹⁷.

Etapa de alinhamento

Tendo em vista que a subunidade formadora do poro do canal de cálcio (α_1) é o local de ação de fármacos e toxinas, o desenvolvimento do nosso modelo foi limitado a esta. Dessa forma, nossa modelagem foi feita para os segmentos S5, P e S6 das quatro subunidades que juntas formam o poro do canal de cálcio, estas subunidades podem ser observadas na figura esquemática apresentado na Figura 23. Para a construção do nosso modelo foram deletadas as sequências 301-341, 1064-1095 e os dois primeiros resíduos de S6¹⁹⁵, que são alças extracelulares e não interferem no nosso objetivo, e podem diminuir a qualidade do modelo. A sequência de aminoácidos do Ca_v 1.2 foi obtida através do banco de dados de sequência de aminoácidos UniProtKB/Swiss-Prot¹⁹⁸, com código Q13936 – CAC1C Human isoforma 20.

Inicialmente, com a utilização do servidor *on-line* **BLAST**, com o algoritmo *protein blast* (**BLASTp**), identificamos uma identidade sequencial de 40% da Q13936 isoforma 20 com a estrutura PDB ID: 4LTO¹⁹⁹ e um *e-value* de 3×10^{-6} . Porém estes valores dizem respeito a apenas uma das quatro subunidades do canal, quando comparado a estrutura total encontramos uma identidade sequencial de apenas 24% e uma similaridade de 53%, ainda assim, esses valores superam aos do estudo de Shaldam e

colaboradores (19,7 % de identidade e 41,8% de similaridade). A sequência utilizada e o resultado obtido pelo **BLASTp** podem ser observados na Tabela 5 e na Figura 24

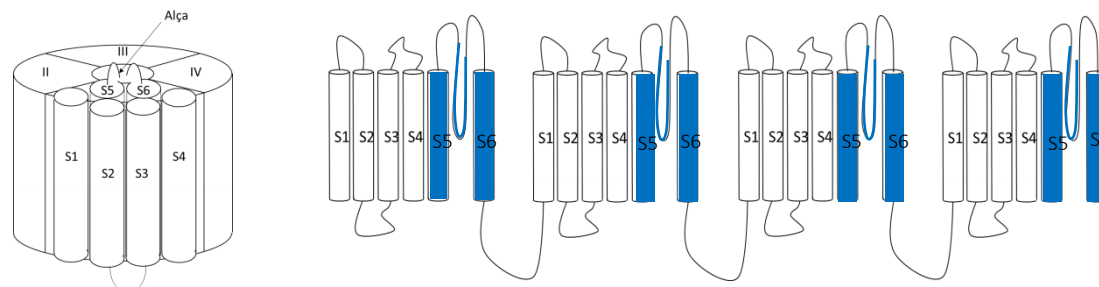


Figura 23. Representação esquemática das subunidades e dos segmentos utilizados para a construção do modelo de canal de cálcio do tipo-L. Em azul, os segmentos S5, P e S6 das quatro subunidades modeladas que, juntas, formam a região central do poro do canal de cálcio.

Tabela 5. Sequência Q13936 isoforma 20 utilizado para entrada no programa **BLASTp**.

IS5	
IKAMVPLLHIALLVLFVIIIYAIIGLELFMGKMHKT	36
IP	
CYNGITNFDNFAFAMLTVFQCITMEGWTDVLYWVNDVAVGR	77
IS6	
DWPWIYFVTLIIIGSFFVLNLVGLVLSGEFSKERE	112
IIS5	
LNSVRSIASLLLLLFLFIHIFSLGMLFGGKFNDFE	149
IIP	
MQTRRSTFDNFPQSLLTVFQILTGEDWNSVMYDGIMAYGGPSFPG	194
IIS6	
MLVCIYFIILFICGNVILLNVFLAIAVDNLADE	228
IIS5	
FVAIRTIGNIVIVTTLQFMFACIGVQLFKGKLYTC	264
III	
SDSSKFDFDNVLAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEKGPINYR	313
IIS6	
VEISIFFIYIIIIAFMMNIFVGFVIVTFQEQG	347
IVS5	
IKSFQALPYVALLIVMLFFIYAVIGMQVFGKIALNDT	384
IVP	
TEINRNNNFQTFPQAVLLLFRFCATGEAWQDIMLACMPGKKCAPESEPSNSTEGETPCGS	443
IVS6	
SFAVFYFISFYMLCAFLIINLFVAVIMDNFDYLT	477

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Chain A, Bacterial Sodium Channel In High Calcium, I222 Space Group	48.1	93.2	33%	3e-06	40%	4LTO_A

Figura 24. Resultado obtido pelo algoritmo *protein Blast*, para a entrada Q13936 isoforma20.

Com o resultado obtido pelo **BLASTp**, e agora uma nova possibilidade de molde a ser utilizado na construção do modelo de canal de cálcio, a estrutura PDB ID 4LTO, demos sequência aos estudos de construção do modelo de canal de cálcio, partindo para

a etapa dos alinhamentos, propriamente dita. Quatro propostas de alinhamento foram utilizadas, na tentativa de construirmos quatro modelos de canal de cálcio, para que, ao final, pudéssemos ter uma ampla variedade de modelos construídos e, desse modo, eleger o mais confiável. Sendo assim, os quatro alinhamentos propostos foram entre a sequência de aminoácidos Q13936 – CAC1C Human isoforma 20 e a da proteína PDB ID: 1BL8 baseado nos estudos de Zhorov e colaboradores (**alinhamento1**), com a sequência da proteína PDB ID: 2A9H baseado nos estudos de Shaldam e colaboradores (**alinhamento2**), com a sequência da proteína PDB ID: 4LTO (**alinhamento3**), e com as sequências das proteínas PDB ID: 4LTO e 2A9H (**alinhamento4**).

O alinhamento das sequências foi realizado através do servidor *on-line* **Clustal Omega** e para verificarmos a qualidade dos alinhamentos, utilizamos como referência a sobreposição das estruturas PDB ID: 2A9H e PDB ID: 1BL8 feita pelo programa **Maestro**. A sobreposição feita no **Maestro** nos permitiu visualizar onde estavam as regiões de alça e de hélices e, dessa forma, pudemos avaliar se as inserções ou deleções sugeridas pelo **Clustal Omega** apresentavam-se em regiões desfavorecidas. A Tabela 6 representa a sobreposição entre as estruturas PDB ID: 1BL8 e PDB ID: 2A9H utilizada como referência, a partir da qual podemos observar as localizações de alças e hélices.

Após analisarmos os alinhamentos obtidos pelo programa **Clustal Omega**, o **alinhamento1** baseado nos estudos de Zhorov foi prematuramente eliminado, pois não conseguimos obter qualidade para o modelo obtido com o alinhamento das sequências desta proposta. O alinhamento que posteriormente derivou o modelo de canal de cálcio mais promissor foi o **alinhamento2**, baseado nos estudos de Shaldam com a estrutura PDB ID: 2A9H, o qual pode ser observado na Tabela 7. Os **alinhamentos 3 e 4** podem ser observados nos Anexo 1 e Anexo 2.

Etapa de construção do modelo

Após a etapa de alinhamento, utilizamos o programa **Modeller** para a construção dos modelos tridimensionais do Ca_v tipo-L. Para cada um dos três alinhamentos restantes relatados acima foram geradas 3 hipóteses de modelos, as quais tiveram como primeira avaliação uma análise visual. Após a análise visual dos modelos gerados eliminamos a proposta referente ao **alinhamento3**. Podemos observar na Figura 25 que o programa **Modeller** não conseguiu posicionar corretamente a alça presente na subunidade IV S e por esta razão o modelo gerado através do **alinhamento3** foi rejeitado.

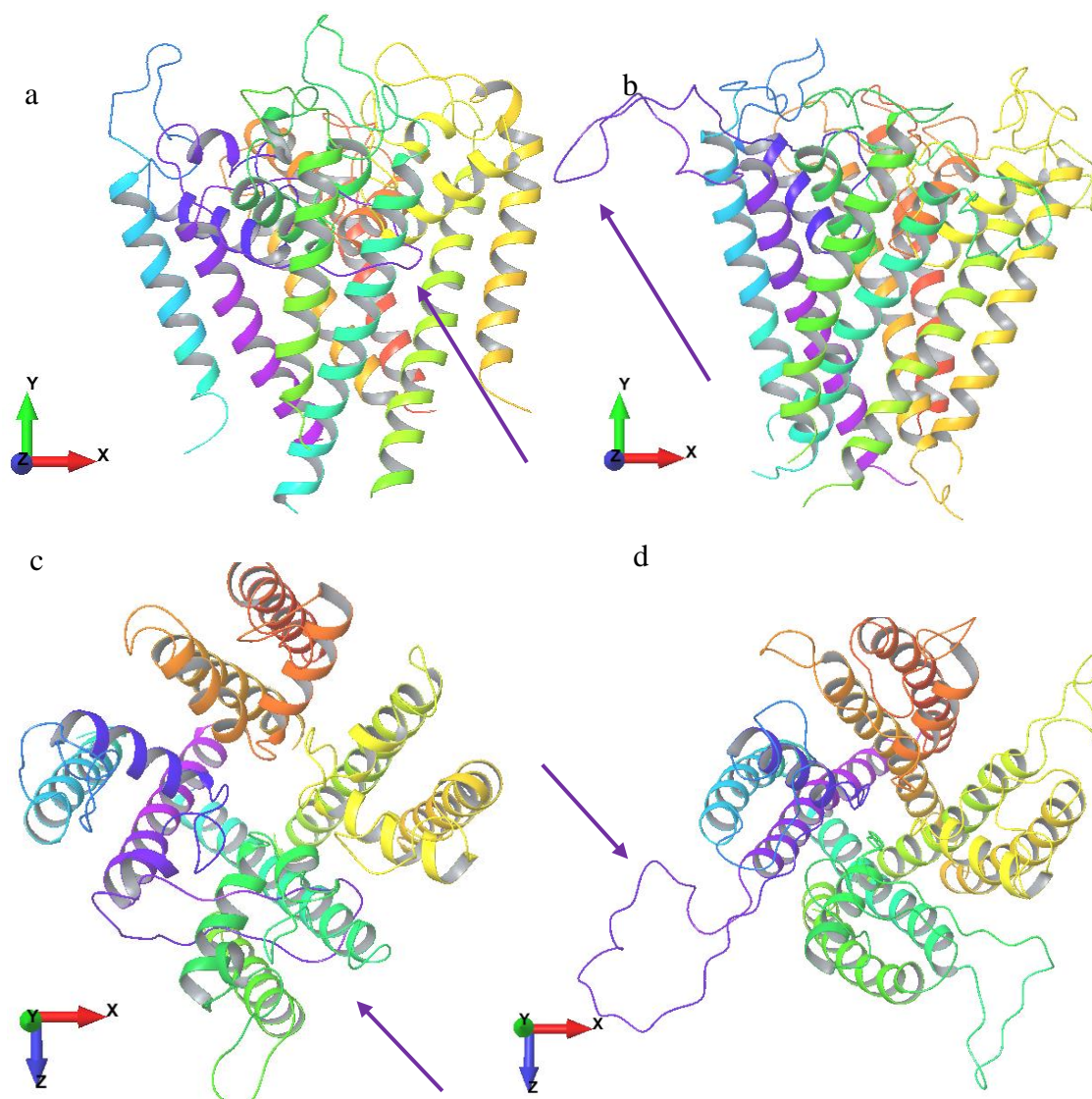


Figura 25. Visualização do modelo 3 (a-c) excluído e modelo 2 (b-d). As setas vermelhas indicam a alça posicionada de forma incorreta na geração do modelo 3 e posicionada corretamente na geração do modelo 2.

Etapa de avaliação do modelo

As três hipóteses de cada um dos dois modelos restantes (derivados dos **alinhamentos 2 e 4**) seguiram para a etapa de avaliação/controle de qualidade. Esta etapa foi executada por utilização do servidor *on-line* **WhatIf**, bem como, do programa **Procheck**. Diante dos resultados, demonstrados na Tabela 8, a hipótese melhor avaliada foi a hipótese **2** do modelo derivado pelo **alinhamento2**. O que nos levou a essa conclusão foram inicialmente os bons resultados obtidos no Diagrama de *Ramachandran* (Figura 26a), o qual não indicou ângulos phi e psi desfavoráveis para os resíduos presentes na região do sítio de interação, seguido da análise dos parâmetros de planaridade das ligações peptídicas, maus contatos atômicos, distorção tetraédrica dos carbonos alfa, energias das ligações de hidrogênio e *G-Factor*, em acordo com valores tipicamente encontrados em estruturas de proteínas com alta resolução (Figura 26b).

Tabela 8. Apresentação dos resultados de Pontuação Geral (**WhatIf**), Regiões Proibidas (*Ramachandran*) e *G-Factor* (**Procheck**), obtidos na etapa de avaliação dos modelos de canal de cálcio gerados.

Modelos	Pontuação Total (WhatIf)	Regiões Proibidas (<i>Ramachandran</i>)	G-Factor
2A9H Referência	-0,910	0	0,3
4LTO Referência	-0,717	0	-0,2
Alinhamento2 Hipótese1	-1,253	4/0,9%	-0,2
Alinhamento2 Hipótese 2	-1,210	2/0,5%	-0,2
Alinhamento2 Hipótese 3	-1,240	7/1,6%	-0,2
Alinhamento4 Hipótese 1	-1,242	4/0,9%	-0,2
Alinhamento4 Hipótese 2	-1,210	2/0,5%	-0,2
Alinhamento4 Hipótese 3	-1,253	7/1,6%	-0,2

Os parâmetros conjuntamente apresentados na Figura 26b, a seguir, ajudam a avaliar a qualidade estereoquímica geral do modelo selecionado. Podemos observar pelos gráficos que o modelo obteve valores dentro do intervalo de referência do **Procheck** e, ainda, podemos destacar que os resíduos de aminoácidos, cujos valores de **WhatIf** foram menores que -5 (indicando, pois, inadequado empacotamento desse resíduo na estrutura da proteína) não fazem parte do conjunto de aminoácidos presentes no sítio de interação do canal.

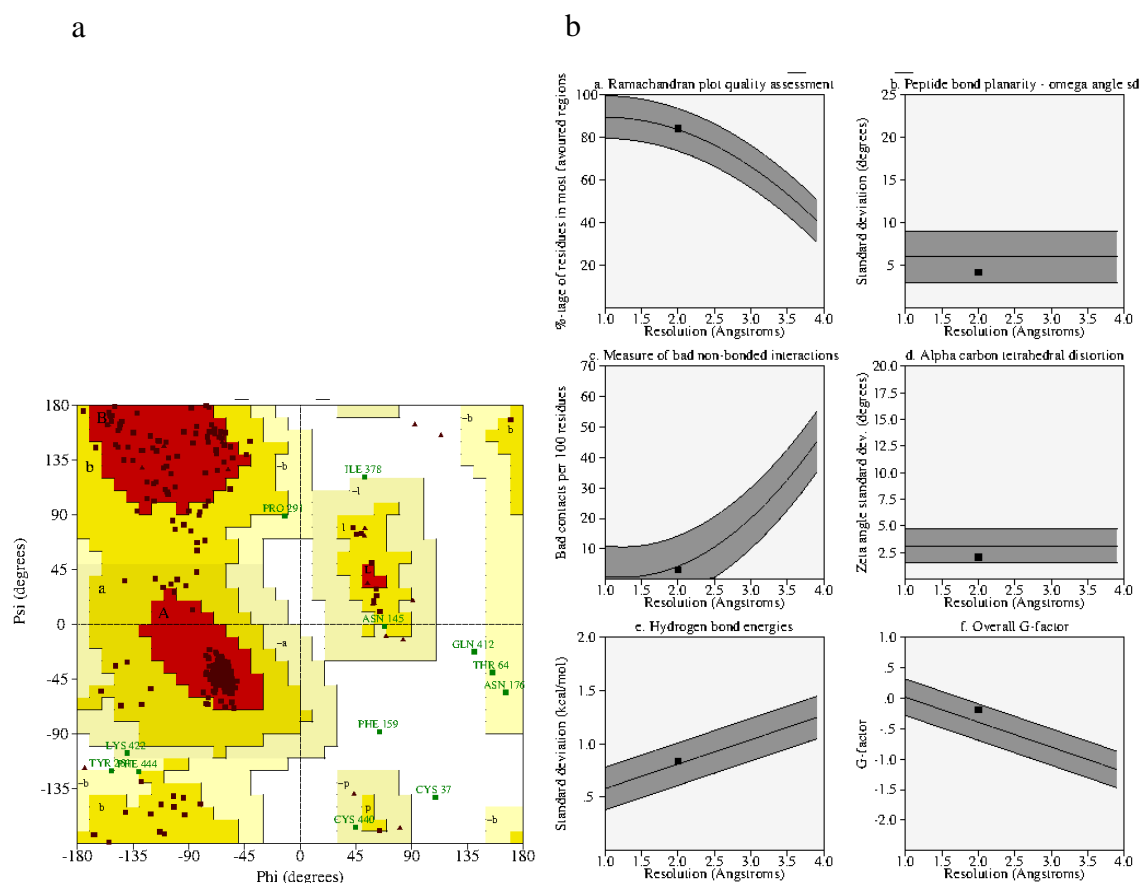


Figura 26. Resumo da avaliação estereoquímica do modelo selecionado e construído por homologia estrutural para o canal de cálcio do tipo-L - hipótese 1 do modelo2. (a) e o respectivo Diagrama de *Ramachandran* (b).

Etapa de validação do modelo

Por fim, uma vez eleito o modelo a ser utilizado nas simulações de *docking*, o avaliamos quanto à sua eficiência/robustez em estudos de triagem virtual. Para tal, inibidores de canal de cálcio, dos mais potentes e com valores de IC_{50} reportados na literatura (ditos “contaminantes”, selecionados do servidor *on-line BindingDB*) foram adicionados a uma pequena base de dados de moléculas *drug-like* quaisquer. O objetivo

é avaliar a capacidade do nosso modelo em recuperar esses ligantes e ordená-los de acordo com a pontuação da Função de Escore (a qual é determinante para a seleção dos compostos nos experimentos de triagem virtual em bases de dados), de forma coerente, bem como reproduzir o posicionamento do ligante em contato com os aminoácidos reportados na literatura como fundamentais para o bloqueio do canal de cálcio^{185,200–202}.

A definição do sitio de *docking* foi baseada em estudos reportados de mutações e modelagem molecular que relatam a importância de alguns resíduos para a interação das dihidropiridinas com o canal de cálcio bem como o posicionamento destes ligantes. Os resíduos ditos como fundamentais para a interação das DHPs com o canal de cálcio são: Tyr^{III S6 10} e Tyr^{IV S6 11}, os quais, quando substituídos por resíduos de Ala, diminuíram a ação das DHPs, o que retrata a importância da aromaticidade destes resíduos²⁰³.

Foram adicionalmente relatadas as importâncias dos resíduos Ile^{III S6 11}, Ile^{III S6 14}, Met^{III S6 19}, Ile^{IV S6 18}, Ile^{IV S6 19}, Thr^{III S5 14} e Gln^{III S5 18}. Vale ressaltar que embora os dados de estudos de mutação sejam fontes de informações precisas e importantes, eles podem não estar diretamente relacionados com a interação dos resíduos de aminoácidos com os ligantes. Uma modificação de resíduos pode acarretar em uma mudança estrutural do canal, tanto na forma quanto na flexibilidade do mesmo, alterando desse modo, a interação com o ligante ou direcionando o mesmo a outro local de ação, sem necessariamente estarem envolvidos diretamente com a interação do mesmo^{185,201}.

Diante dos estudos de mutação que sugerem os resíduos de fundamental importância para a interação das DHPs com o canal de cálcio, os pesquisadores Zhorov e colaboradores além de Cosconatti e colaboradores, através de estudos de modelação computacional, sugerem duas possibilidades do posicionamento dos ligantes: no centro do poro e na interface dos segmentos III e IV (região alostérica). Porém, vale ressaltar que as duas hipóteses não atingem todos os resíduos abordados pelos estudos de mutação, sugerindo que as mutações dos resíduos, não necessariamente, podem acarretar a modificação entre a interação do ligante com o canal de cálcio, mas talvez em uma modificação estrutural do mesmo e, assim, alterar os valores de inibição por modificação da estrutura.

Em nosso estudo levamos em consideração as duas regiões descritas como possíveis locais de interações das DHPs para inibição do canal de cálcio: alostérica

(Figura 26a) e no poro central (Figura 27b). As simulações de *docking* foram feitas através dos programas **Glide** e **GOLD** nas duas regiões descritas.

Sendo assim, dois estudos de validação foram realizados. A primeira validação foi feita afim de identificar se os dois programas, **GOLD** e **Glide**, conseguiriam manter um padrão similar/consensual no posicionamento dos ligantes obtidos com *docking*. Para tal, foi realizado um *docking* com o ligante (*R*)-Bay K 8644 nas duas regiões, poro central e alostérica, utilizando os dois programas. Os melhores resultados que obtivemos foram na região alostérica, adotando o centroide no ponto $x = -3,55$; $y = -3,43$ e $z = 10,99$, e utilizando o programa **GOLD** e uma esfera de 10 Å de raio; e o programa **Glide**, com um *grid* de externo de 12 Å de aresta, a qual limita o ligante a estar dentro dele, além de um outro interno, de 6 Å, que obriga a ter pelo menos um átomo do ligante dentro do mesmo. Para as simulações de *docking* feitas dentro do poro central do canal de cálcio, adotando-se o centro do mesmo em $x = -5,27$; $y = 0,13$; $z = 7,89$, utilizando o **GOLD** com uma esfera de 8Å; e o **Glide** com um *grid* externo de 20 Å e um interno de 10 Å. Os resultados podem ser observados nas Figura 28 e Figura 29, onde temos uma representação em *Ribbons* dos seguimentos IIS5, IIP, IIS6 e IVS5, IVP e IVS6 com os resultados obtidos com o auxílio dos programas **GOLD** (a) e **Glide** (b), no poro central e na região alostérica, respectivamente.

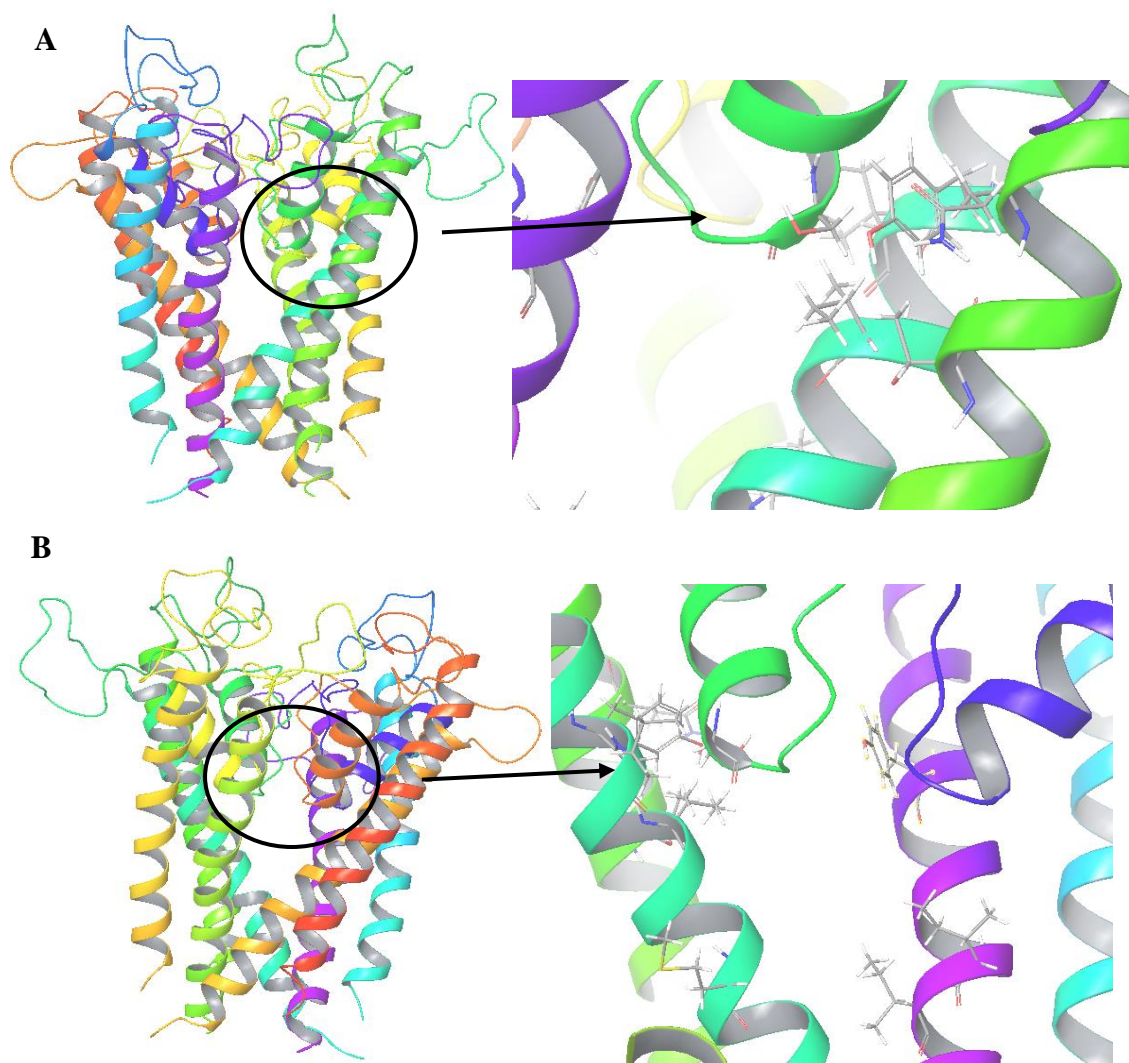


Figura 27. Representação *Ribbons* do modelo construído de canal de cálcio do tipo-L sinalizando as regiões de interações utilizadas/observadas nos estudos de *docking*. (a) Região alostérica e (b) poro central.

Podemos observar na Figura 28 (a-b) que os dois programas posicionaram de forma consensual e coerente (com a literatura) o ligante (*R*)-*Bay K 8644* no poro central. O baixo número de poses determina que com poucos “*docking runs*” o programa já identificava um baixo RMSD entre os ligantes, mas o mesmo não foi observado para a região alostérica. Obtivemos resultados satisfatórios com ambos programas, no que diz respeito à localização dos ligantes na região de interesse (alostérica), porém os mesmos não adotaram uma conformidade no posicionamento dos ligantes. Os melhores resultados da validação na região alostérica podem ser observados na Figura 29 (a-b).

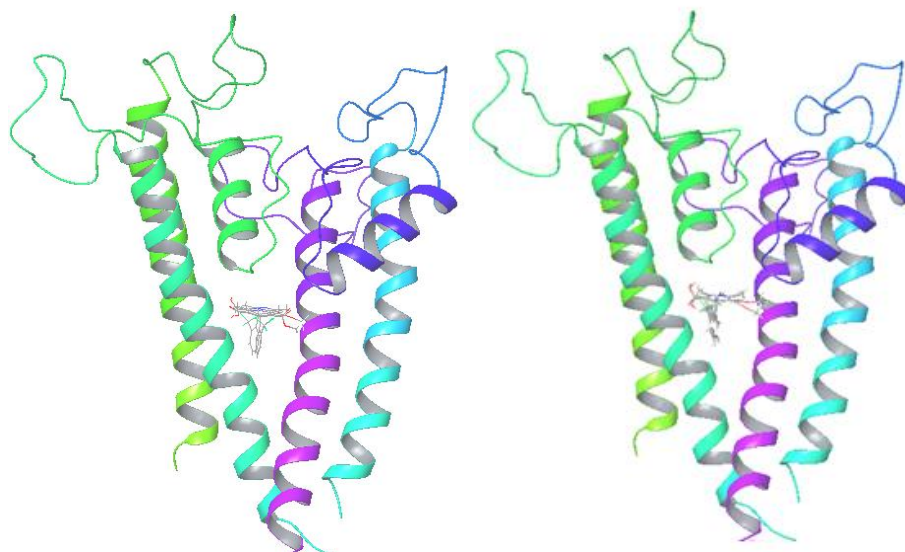


Figura 28. Representação em *Ribbons* dos seguimentos IIIS5, IIP, IIS6, IVS5, IVP e IVS6 com os resultados da validação do centroide no poro central feita com o auxílio dos programas (a) **GOLD** e (b) **Glide**.

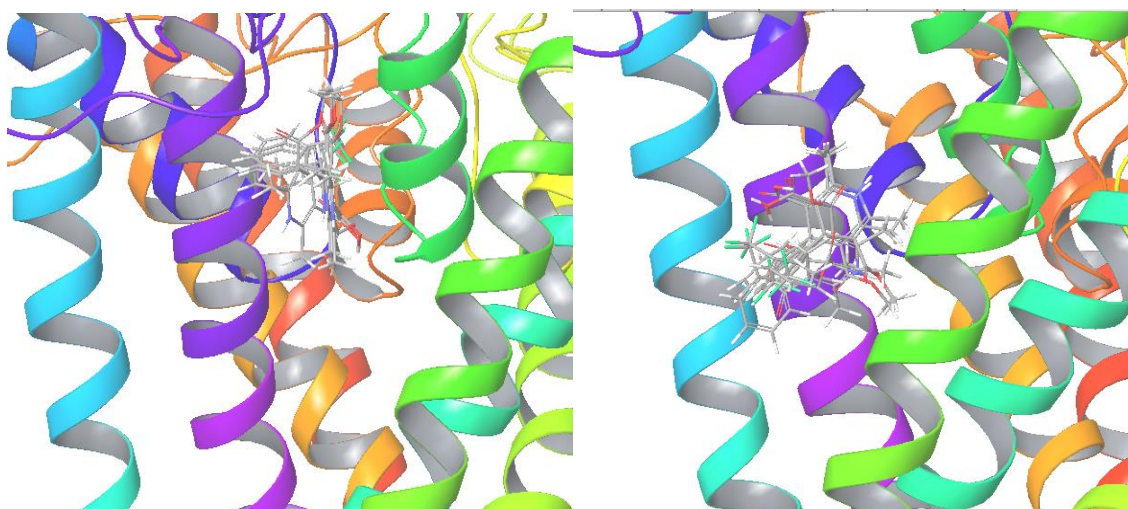


Figura 29. Sobreposição dos melhores resultados de validação do centroide para a região alostérica com (a) **GOLD** e (b) **Glide**.

O segundo estudo de validação realizado foi em relação à recuperação de ligantes com valores IC_{50} conhecidos. Em uma pequena base de dados adicionamos estruturas de DHPs com valores IC_{50} conhecidos, chamados de “contaminantes” e avaliamos a capacidade de recuperação destes compostos utilizando os diferentes programas **Glide** e **GOLD** nas regiões do poro central e alostérica. Os estudos de validação demonstraram uma boa recuperação dos ligantes com IC_{50} conhecidos nas duas regiões em estudo e com ambos programas. Os resultados podem ser observados na Tabela 9 para a região do poro

central e na Tabela 10 para a região alostérica, nas quais podemos observar a classificação de recuperação do ligante e a função de pontuação do mesmo.

Tabela 9. Resultados da validação por recuperação de compostos com IC₅₀ conhecidos na região do poro central para o programa (a)**GOLD** e (b)**Glide**.

Classificação	Title	GoldScore
1	RUCINS,12	114.001
2	RUCINS,11	105.475
9	Cosconati, (R)-Amlodipine	82.823
25	Tenti, 3n	76.665
26	Zhorov,(S)-nimodipine	76.528

Classificação	Title	XP GScore
1	Zhorov,(S)-nimodipine	-12.789
2	Galvis-Pareja	-12.481
5	Zhorov,(S)-nimodipine	-12.151
9	Cosconati, (R)-Amlodipine	-11.419
27	Mota	-9.914

Tabela 10. Resultados da validação por recuperação de compostos com IC₅₀ conhecidos na região alostérica para o programa (a)**GOLD** e (b)**Glide**.

Classificação	Nome	GoldScore
4	Galvis-Pareja	59.324
7	RUCINS	57.590
11	Mota	54.111
21	Cosconati, (S,S)-Benidipine	48.849
24	Cosconati, (R)-Bav K 8644	47.371

Classificação	Nome	XP GlideScore
38	Cosconati, (S,S)-Funidipine	-5.731
44	Tenti, 3n	-5.442
58	Rucins, 12	-4.661
63	Locatelli, 4	-4.382
65	Galvis-Pareja, 3-OH	-4.142

Diante dos resultados das avaliações e validações do modelo de canal de cálcio gerado através de estudos de homologia estrutural de proteínas podemos concluir que tal modelo está apto a ser utilizado nos posteriores estudos de SBVS. Os estudos de triagem virtual para obtenção de *hits* bloqueadores do canal de cálcio tiveram início com estudos de LBVS e finalizaram com a utilização de tal modelo em estudos de SBVS.

Triagem virtual para inibidores do canal de cálcio.

Inicialmente, as 6 bases de dados, já descritas anteriormente, foram preparadas com o programa **OMEGA**, afim de, promover a correção e explorar possíveis conformações das moléculas presentes nas bases de dados. Os parâmetros utilizados foram os otimizados (padrão), exceto para a geração de confôrmeros - modificada para até 300/molécula, energia de tensão (acima do mínimo global de energia) de até 9 kcal/mol, e um *cut-off* para identidade de confôrmeros de 0.6 Å (desvio médio quadrático, RMSD), segundo protocolo otimizado por Carlos H. T. P. Silva (*resultados não publicados*).

Após o preparo de todas as bases de dados, iniciamos os estudos de triagem virtual. A primeira triagem executada foi através da similaridade por forma com a utilização do programa **ROCS**. Utilizamos como molde o antagonista (*R*)-*Bay K 8644*²⁰¹ modificado (Figura 30), o qual apresenta um grupamento carboxílico em substituição ao grupo nitro presente no composto original. O grupamento carboxílico polar e desativador é isóstero²⁰⁴ do grupamento nitro, mas capaz de realizar ligações de hidrogênio fortes com a Ser1131 do canal de cálcio. Este composto modificado pode executar interações hidrofóbicas adicionais entre o grupo acetil, presente no mesmo e a Met1177 do canal de cálcio, interação típica observada em antagonistas do canal de cálcio.

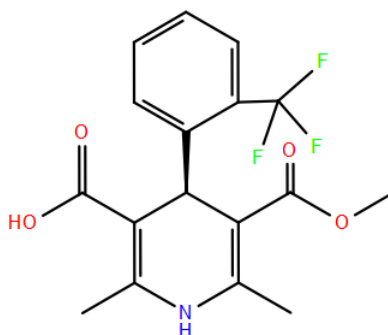


Figura 30. Representação estrutural 2D do ligante (*R*)-*Bay K 8644* modificado, utilizado como referência para os estudos de triagem virtual por similaridade.

Para a utilização do composto (*R*)-*Bay K 8644 modificado* como ligante de referência nos estudos de similaridade, sua energia foi minimizada com campo de força MMFF, tal como implementado no programa **Maestro/MacroModel**. Vale ressaltar que a escolha deste ligante em nossos estudos de similaridade deve-se ao fato do mesmo apresentar uma estrutura pequena e que detém pouca liberdade conformacional.

Com a primeira triagem, foram selecionados os 2000 melhores resultados de similaridade por forma, avaliados pelo índice de Tanimoto, em cada base de dados em estudo. Os compostos selecionados seguiram para os estudos de similaridade por potencial eletrostático com o programa **EON**, através do qual foram selecionados os 100 melhores resultados, avaliados pelo índice Tanimoto em cada base de dados em estudo.

Os compostos resultantes das triagens de similaridade (por forma e eletrostática) foram submetidos a predições de atividade farmacocinética e toxicológica (ADME/Tox) com auxílio dos programas **QikProp** e **DEREK**, respectivamente.

Os descritores analisados pelo **QikProp** foram: *#star*, $\log P_{o/w}$, $\log CACO_2$, $\log MDCK$, porcentagem de absorção oral e qualidade do modelo de absorção oral humana. Os compostos que obtiveram alguma sinalização no descritor *#star* foram rejeitados, assim como os que tiveram valor de $\log P_{o/w}$ maior do que 5, $\log CACO_2$ e $\log MDCK$ abaixo de 500, Porcentagem de Absorção Oral abaixo de 80% e Qualidade do modelo de absorção oral humana diferente de “alta”.

O próximo filtro pelo qual os compostos sobreviventes foram submetidos foi o da predição das propriedades toxicológicas. Nesta análise, foram rejeitados os compostos que, após a predição com **DEREK**, apresentaram algum alerta de toxicidade segundo *Custom Prediction* e *Lhasa Prediction*. Ao final dos estudos de LBVS a relação dos compostos sobreviventes em cada base de dado que seguiram para os estudos de simulações de *docking* podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 11. Relação entre dos compostos sobreviventes após os estudos de LBVS com o ligante referencia *(R)-Bay K 8644 modificado*

Base/ Referencia	<i>(R)-Bay K 8644 modificado</i>
<i>Drug Data ZINC</i>	9 compostos
<i>ChemBridge Diverset CL</i>	0 compostos
<i>ChamBridge Diverset EXP</i>	11 compostos
<i>FDA BindingDB</i>	7 compostos
<i>MayBridge</i>	2 compostos
<i>Naturals ZINC</i>	2 compostos

Sendo assim, os compostos sobreviventes foram analisados quanto à capacidade de interagirem com o canal de cálcio do tipo-L, através de simulações de *docking*. As simulações foram feitas com os programas **GOLD** e **Glide**, e o modelo de canal de cálcio do tipo-L criado por homologia foi utilizado como receptor. As análises dos resultados gerados serviram como critério final para a seleção dos compostos. Estes compostos seguirão em estudo com nossos colaboradores para a comprovação da atividade bloqueadora do canal de cálcio em ensaios in vitro.

Os resultados dos estudos de *docking* nos permitiram visualizar como os compostos se comportam nos dois prováveis sítios do canal de cálcio. Sendo assim, nossa seleção final se baseou prioritariamente na possibilidade dos compostos interagirem com os resíduos Tyr^{III S6 10} (Tyr322) e Gln^{III S5 14} (Gln245) quando docados na região alostérica, e com o Tyr^{IV S6 11} (Tyr453) quando docados no poro central^{185,200-202}.

Pudemos notar que ambos os programas **GOLD** e **Glide** indicaram que alguns compostos podem interagir de forma satisfatória tanto no sítio alostérico quanto no poro central, e dessa forma elegemos estes compostos como os mais promissores. São eles: o composto **ZINC7563** e **Omega18035** obtidos pelos estudos realizados com o programa **GOLD** e o composto **ZINC03876174** obtido através dos resultados nas simulações com o **Glide**.

As análises dos resultados das simulações de *docking* nos permitiram observar que o composto **ZINC7563** tem a possibilidade de fazer uma ligação de hidrogênio entre o seu oxigênio carboxílico e a hidroxila fenólica da Tyr453, com uma distância de 2,7 Å, na região do poro central. Ao ser docado na região alostérica, notamos a presença de quatro ligações de hidrogênio, sendo duas por grupos doadores do composto e duas por grupos aceitadores. Os grupos doadores de ligação de hidrogênio são a amina secundária (ponte entre os dois aromáticos), a qual interage com a carbonila da amida presente no resíduo Gln245 a uma distância de 2,9Å, e com a hidroxila do resíduo Thr242 a uma distância de 2,45Å. As ligações aceitadoras de ligação de hidrogênio ocorrem entre o nitrogênio da amida presente no resíduo Gln245 e o oxigênio desprotonado do composto, e entre a carbonila do composto e a hidroxila fenólica do resíduo Tyr322, com as distâncias de 2,4Å e 3,1Å respectivamente. Os modos de interação entre o composto **ZINC7563** e as regiões do poro central e alostérica da proteína podem ser observados na Figura 31 a (poro central) e b (alostérica) em três dimensões e em c (poro central) e d (alostérica) em duas dimensões.

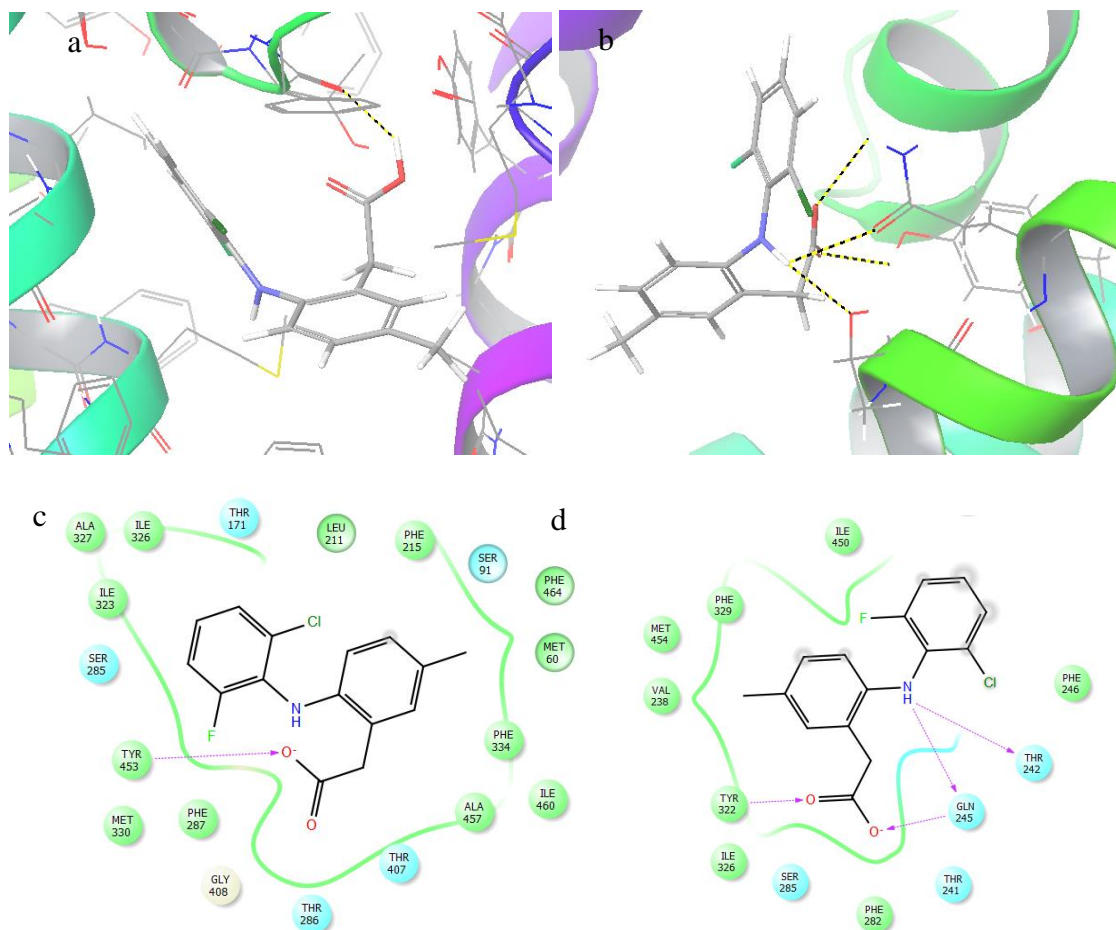


Figura 31. Representação dos modos de interação do composto selecionado **ZINC7563** na região do poro central (a-c) e alostérica em (b-d) em duas e três dimensões, obtidas como resultado do programa **GOLD**.

Nos resultados apresentados para o composto **Omega18035**, podemos observar a ocorrência de duas interações no poro central, uma ligação de hidrogênio entre o halogênio (átomo de bromo) e a hidroxila fenólica do resíduo Tyr453 observados na Figura 32a, e também uma interação pi-pi entre o anel do composto e do resíduo Phe287 (Figura 32a-c), com distâncias de 3,4 Å e 4,8 Å, respectivamente. Na região alostérica (Figura 32 b-d) observamos novamente a influência do grupo carboxílico para a ocorrência de duas ligações de hidrogênio, uma entre a carbonila do composto e a hidroxila fenólica do resíduo Tyr322 e outra entre a hidroxila do composto e o nitrogênio da amida presente no resíduo Gln245, com as distâncias de e 2,5Å e 3,1Å, respectivamente.

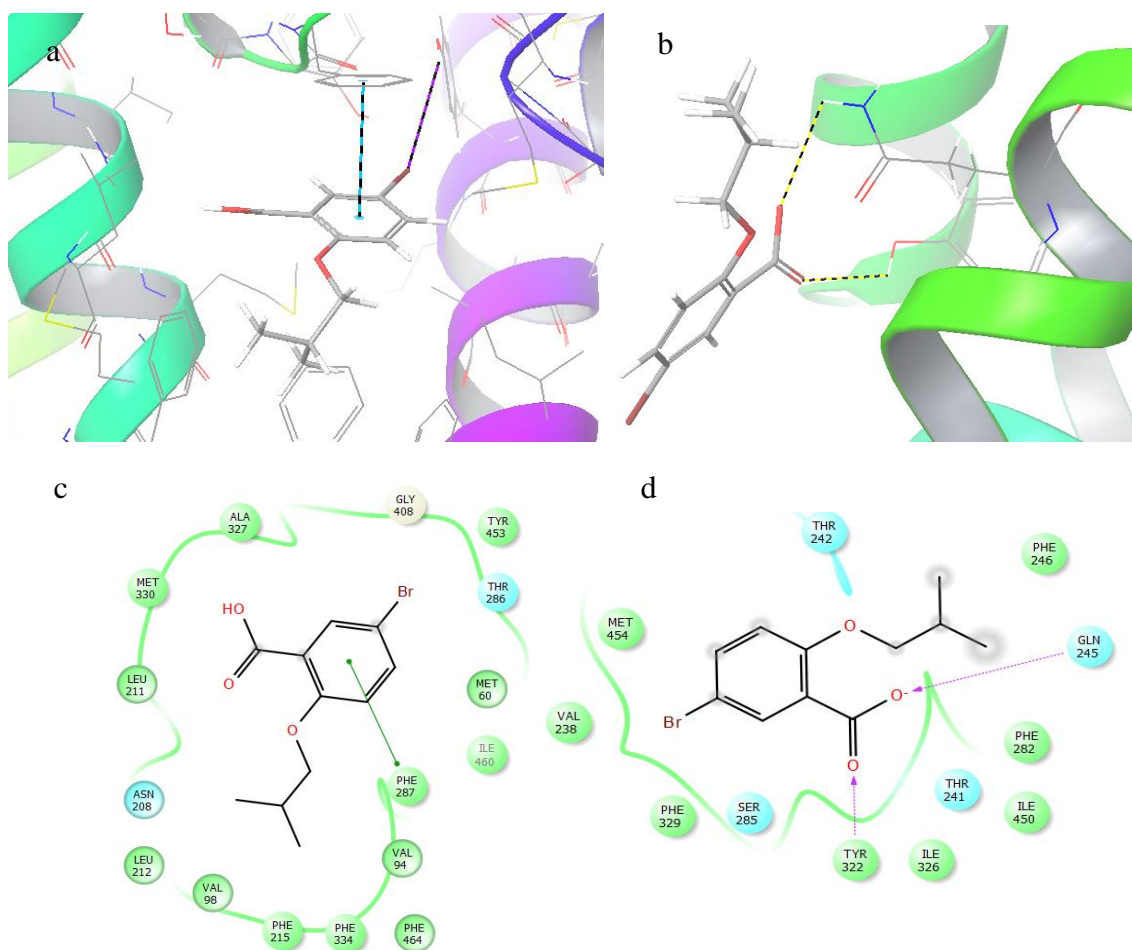


Figura 32. Representação dos modos de interação do composto selecionado **Omega18035** na região do poro central (a-c) e alostérica em (b-d) em duas e três dimensões, obtidas como resultado do programa **GOLD**.

A partir das simulações feitas com o programa **Glide** podemos observar que o composto **ZINC03876174** se destacou perante aos demais, por também demonstrar a particularidade de interagir de forma adequada, tanto no poro central (Figura 33a-c) quanto na região alostérica (Figura 33b-d). As imagens de simulações de *docking* evidenciam a importância do anel hidroxi- cromona, presente neste composto, para a que ocorra interação do mesmo com o canal de cálcio. Os resultados de *docking* relatam a ocorrência de duas interações realizadas através da hidroxila presente neste anel na região do poro central, uma interação de hidrogênio realizada com a hidroxila fenólica presente no resíduo Tyr453 e outra ligação de hidrogênio com a carbonila da cadeia principal do resíduo Thr286, além dessas duas interações o anel benzeno da cromona realiza, ainda, uma interação pi-pi com o anel benzeno do resíduo Phe464.

Na região alostérica podemos observar a ocorrência de três interações. Notamos a ocorrência de duas ligações de hidrogênio efetuadas através da hidroxila do anel hidroxi-cromona, uma com a hidroxila fenólica do resíduo Tyr322 e outra com a carbonila

presente na amida do resíduo Gln245, além de, e uma transferência de elétrons entre o anel hidroxi-cromona e o anel benzeno do resíduo Phe282.

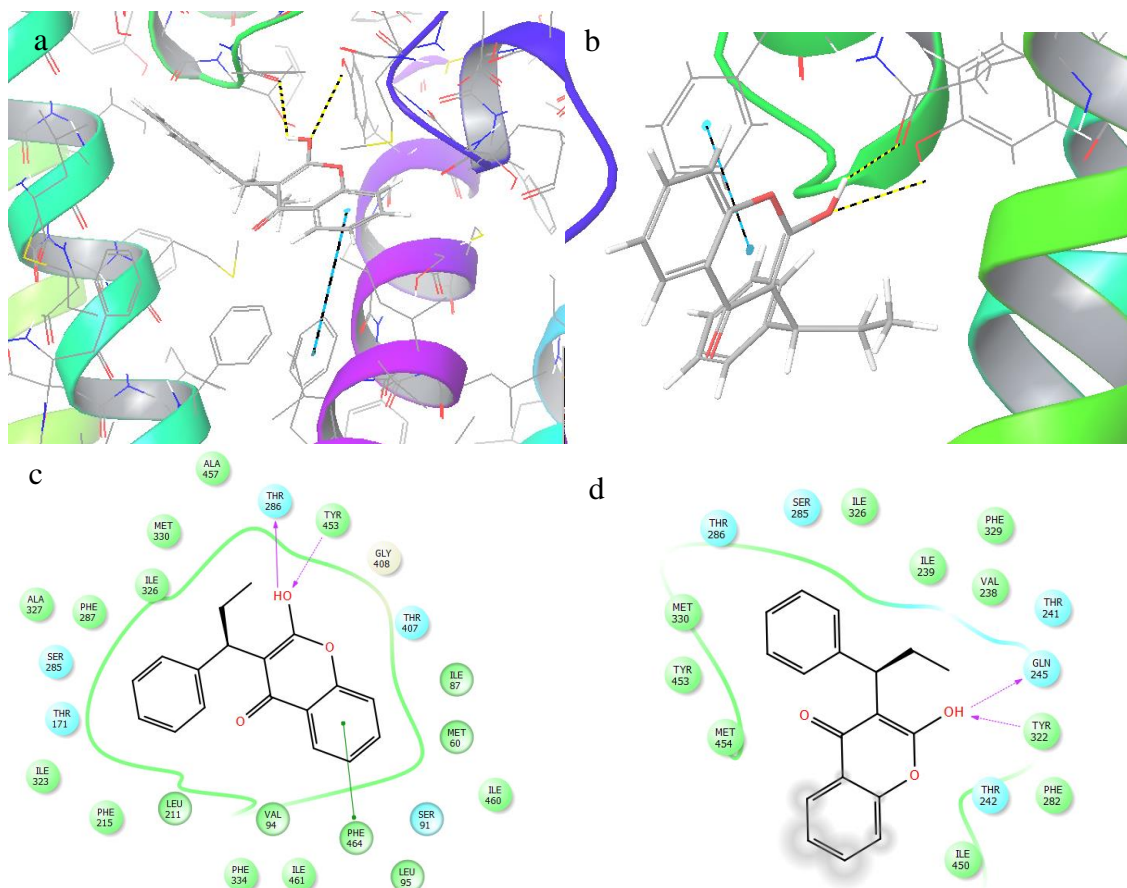


Figura 33. Representação dos modos de interação do composto selecionado **ZINC03876174** na região do poro central (a-c) e alostérica em (b-d) em duas e três dimensões, obtidas como resultado do programa **Glide**.

Ainda foram selecionados os compostos **ZINC1281**, **ZINC125031**, **Omega16616**, **Omega19776** e **Omega26335**, resultados coincidentes entre os dois programas nas simulações na região alostérica e o composto **BindingDB28699**, resultante da simulação no poro central feita com o **Glide**. As Figura 34-Figura 38 são imagens em três e duas dimensões das poses obtidas nos resultados das simulações *docking* com os programas **Glide** e **GOLD**, nas quais podemos observar as interações que ocorrem entre o ligante e os resíduos de aminoácidos do sítio.

Os resultados coincidentes são um grande indicativo de sucesso desses compostos, pois programas que operam de formas distintas tiveram a capacidade de selecionar os

mesmos compostos. Porém não observamos uma unanimidade no posicionamento dos compostos, o que diminui um pouco a qualidade da seleção.

Na interação do composto **ZINC1281** com a região alostérica podemos observar que os dois programas foram coincidentes na importância dada a amina secundária (ponte entre os dois aromáticos). O **Glide** posicionou o composto de tal forma que a referida amina fizesse duas ligações de hidrogênio, uma com a hidroxila presente no resíduo Thr242 e outra com a carbonila presente no radical amida do resíduo Gln245, já o posicionamento do **GOLD** possibilitou o composto fazer apenas uma ligação de hidrogênio com a cadeia principal do resíduo Val238. Também podemos observar uma transferência de carga entre os anéis benzeno do composto e do resíduo Phe329 na interação proposta pelo **Glide** e outras duas interações propostas pelo **GOLD**, uma ligação de hidrogênio entre a carbonila do radical ácido com a hidroxila do resíduo Tyr322 e uma ligação de hidrogênio entre o halogênio (átomo de cloro) do composto e o NH presente na amida do resíduo Gln245 (não representada na imagem em 2D).

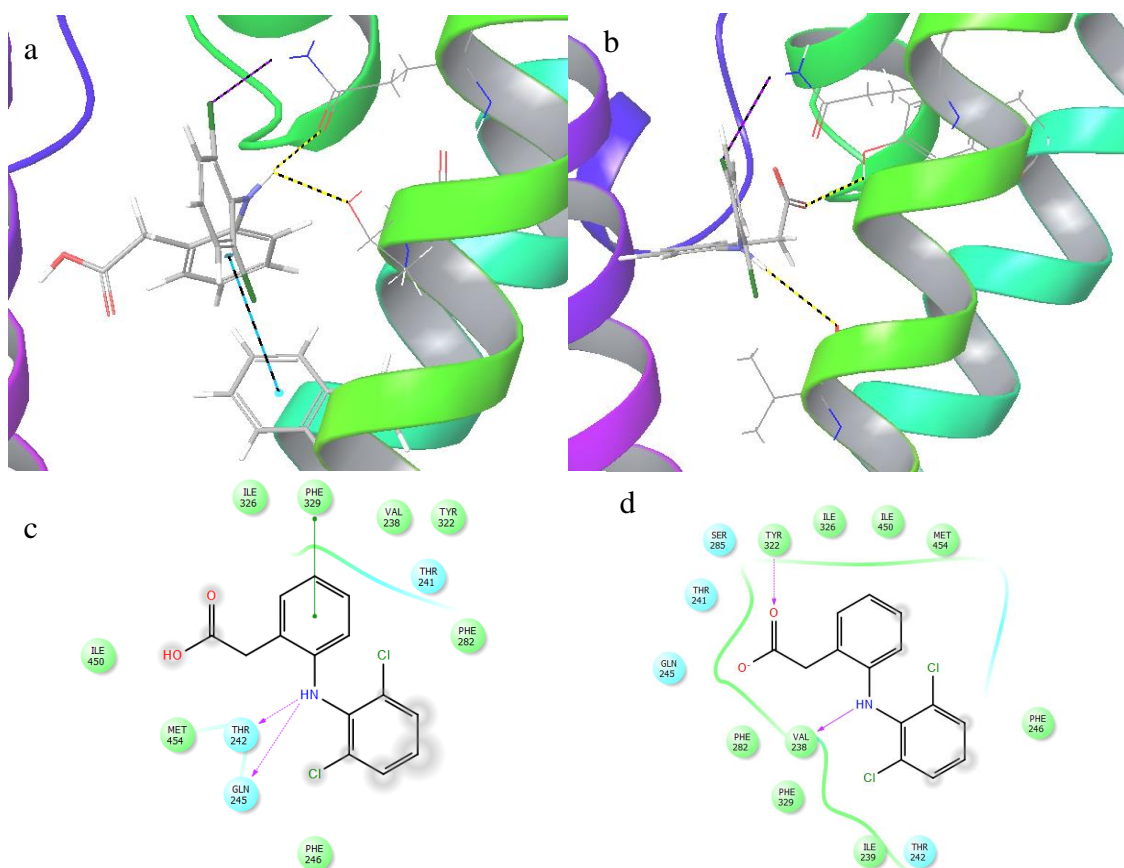


Figura 34. Representação dos modos de interação do composto selecionado **ZINC1281** na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b-d) em duas e três dimensões.

Os resultados das simulações com o composto *ZINC125031* com o **Glide** indicou apenas uma ocorrência de interação entre o ligante e o canal de cálcio, podemos observar somente a interação ocorrida entre o anel piridina do composto e o NH presente na amida do resíduo Gln245. Porém, nos resultados propostos pelo **GOLD**, podemos observar a ocorrência de quatro interações, duas ligações de hidrogênio envolvendo o grupamento ácido do composto, uma entre a carbonila do mesmo e a hidroxila fenólica presente no resíduo Tyr322 e outra entre a hidroxila deste grupamento e o NH da amida do resíduo Gln245. As outras duas ligações de hidrogênio observadas, uma aceptora e outra doadora, ocorrem entre a amina secundária presente no composto e a carbonila da amida do resíduo Gln245 e entre a mesma amina e a hidroxila do resíduo Thr242.

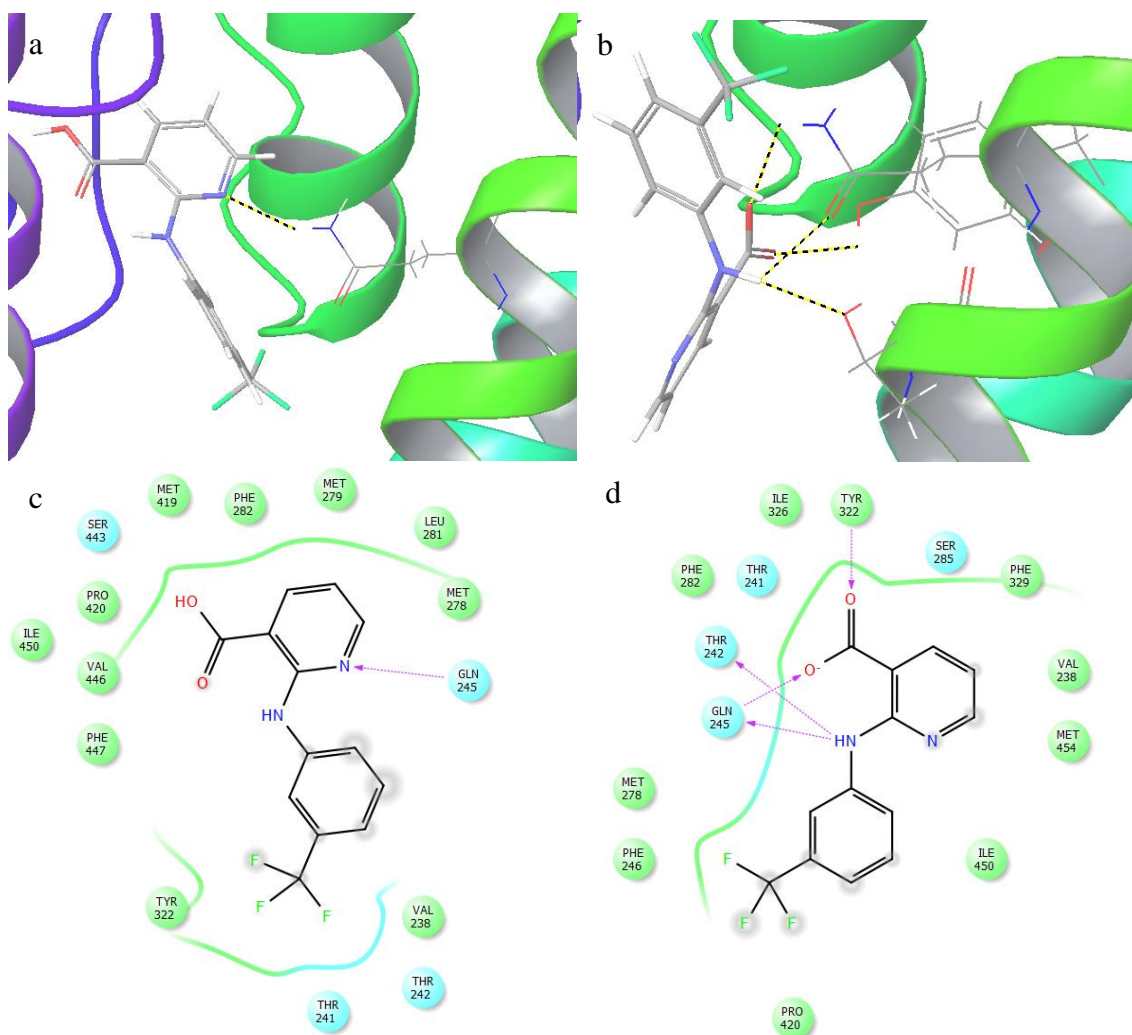


Figura 35. Representação dos modos de interação do composto selecionado *ZINC125031* na região alostérica com o programa **Glide** (a) e **GOLD** (b-c) em duas e três dimensões.

Nos resultados obtidos com o composto *Omega16616* observamos como resultado do programa **Glide** apenas uma ligação de hidrogênio aceptora entre a carbonila do composto e o NH presente na amida do resíduo Gln245. Os resultados obtidos pela simulação com o programa **GOLD** nos indicaram a possibilidade do composto *Omega16616* realizar três interações com a região alostérica do canal de cálcio. Nas imagens em três dimensões observamos o radical ácido e a carbonila presentes no composto fazendo, cada um, uma ligação de hidrogênio com o NH da amida presente no resíduo Gln245. Nas imagens em duas dimensões, o programa **Maestro** ainda nos indicou a possibilidade da amina presente no composto fazer uma adicional ligação de hidrogênio com o resíduo Gln245.

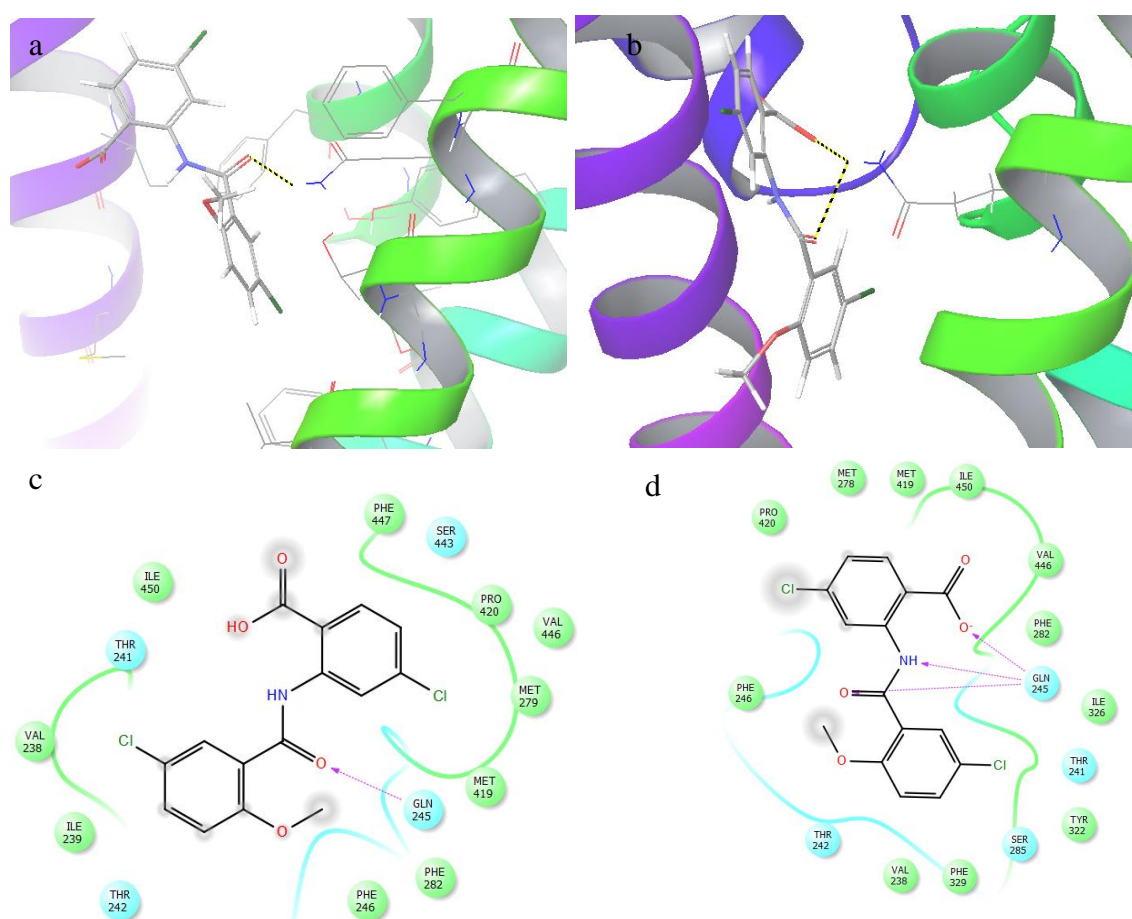


Figura 36. Representação dos modos de interação do composto selecionado *Omega16616* na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b) em duas e três dimensões.

Na visualização dos resultados obtidos para o composto *Omega19776* podemos observar mais uma vez a importância da amina secundária do composto, a qual ambos programas identificaram uma ligação de hidrogênio da mesma com a carbonila (presente

na amida) do resíduo Gln245. Além desta interação o programa **GOLD** ainda identificou a possibilidade do composto em fazer transferência de carga entre um dos seus anéis e o anel benzeno do resíduo Phe282, uma ligação de hidrogênio do grupamento ácido do composto e o nitrogênio da cadeia principal do resíduo Ile450 e uma ligação uma ligação de hidrogênio entre o halogênio (átomo de bromo) do composto e a hidroxila fenólica do resíduo Tyr322 (não representada nas imagens 2D).

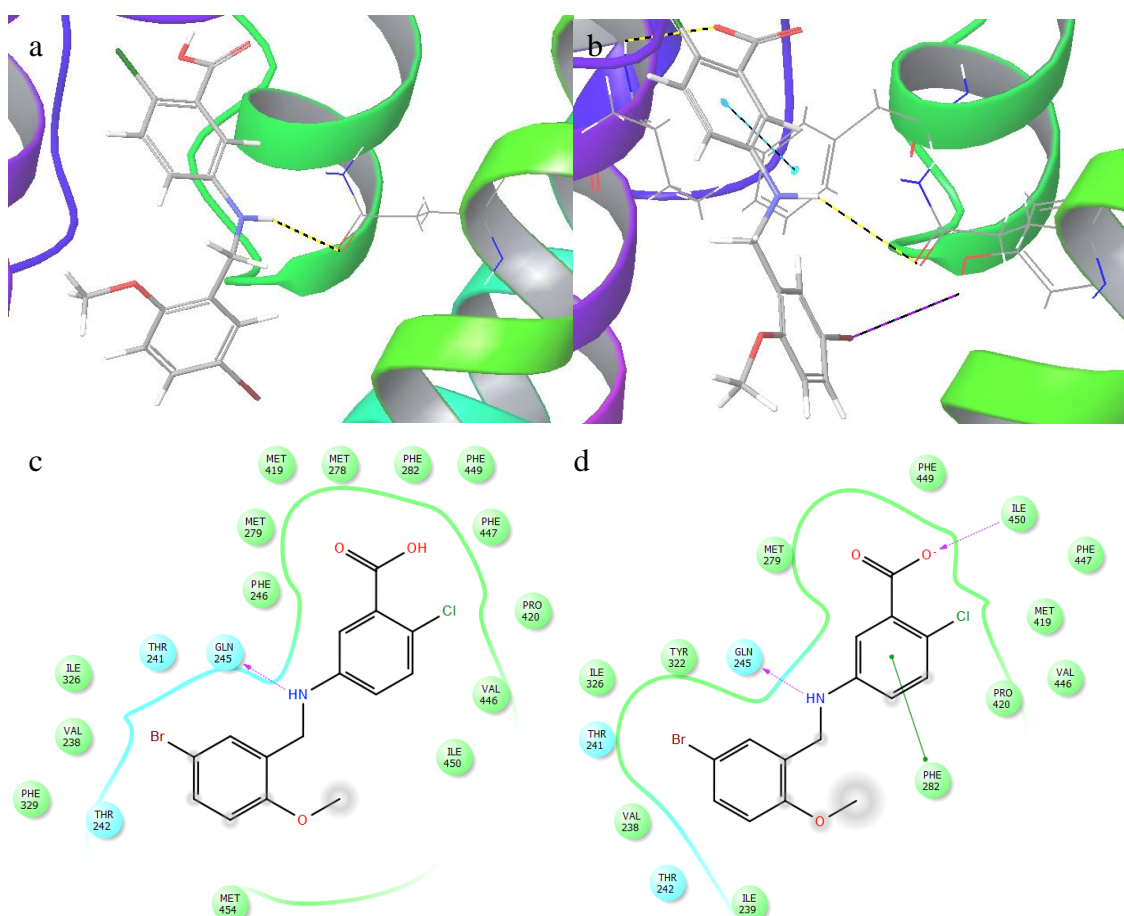


Figura 37. Representação dos modos de interação do composto selecionado *Omega19776* na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b-d) em duas e três dimensões.

No último composto em análise na região alostérica, o composto *Omega26335*, podemos observar mais uma vez a importância do grupamento ácido dos compostos para as interações com os resíduos da região alostérica. No resultado da simulação feita com o **Glide** observamos uma ligação de hidrogênio entre a hidroxila do radical ácido presente no composto com a hidroxila fenólica do resíduo Tyr322 e a carbonila da amida presente no resíduo Gln245. Nos resultados obtidos com o **GOLD** podemos observar uma interação entre a carbonila do radical ácido com a hidroxila fenólica do resíduo Tyr322,

além de mais duas interações, uma ligação de hidrogênio entre o grupamento etóxico do composto e o NH da amida presente no resíduo Gln245 e uma interação cátion-pi entre o anel do composto e o anel benzeno do resíduo Phe282.

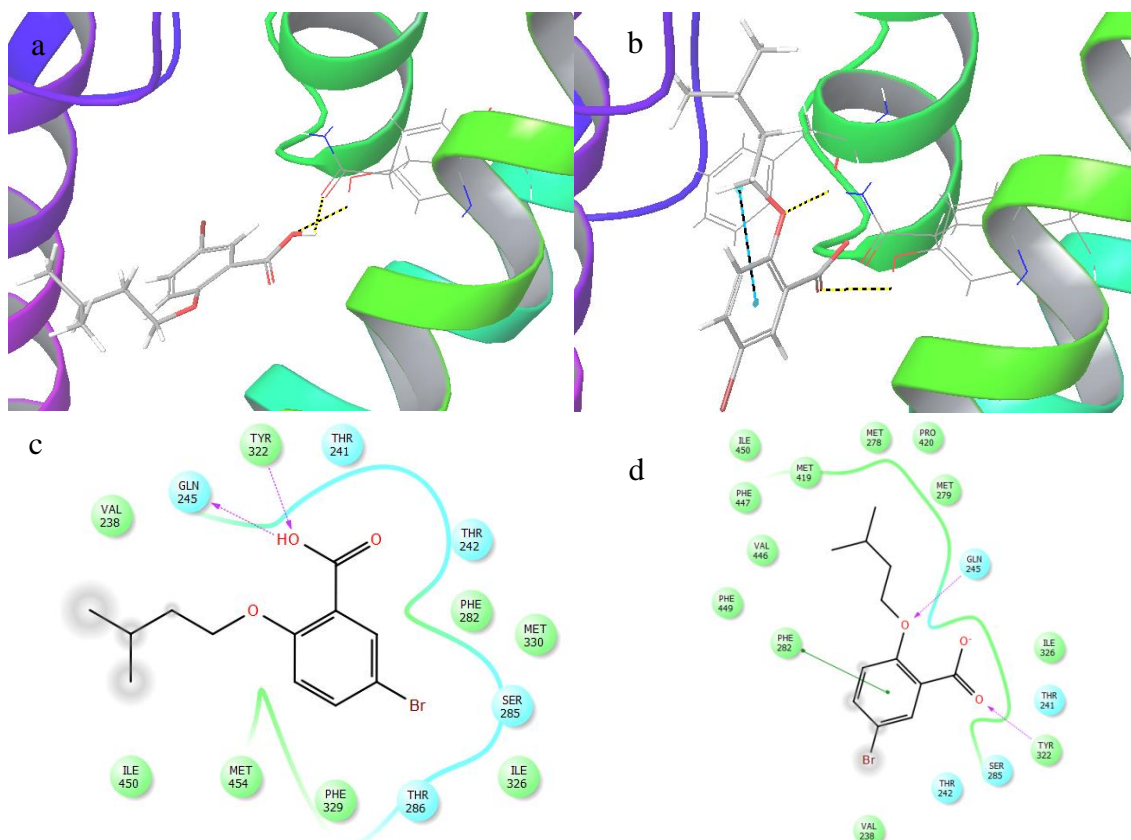


Figura 38. Representação dos modos de interação do composto selecionado *Omega26335* na região alostérica com o programa **Glide** (a-c) e **GOLD** (b-d) em duas e três dimensões.

Por fim, ainda selecionamos o composto *BindingDB28699* proveniente dos resultados apresentados pelo **Glide**. Tal composto interage na região do poro central do canal de cálcio através de três interações. Podemos observar na Figura 39 a ocorrência de duas ligações de hidrogênio entre a hidroxila e a carbonila presentes no radical ácido do composto com a carbonila da cadeia principal do resíduo Thr286 e com a hidroxila fenólica do composto Tyr453, respectivamente. Ainda observamos uma interação pi-pi entre o anel do composto e o anel benzeno presente no resíduo Phe287.

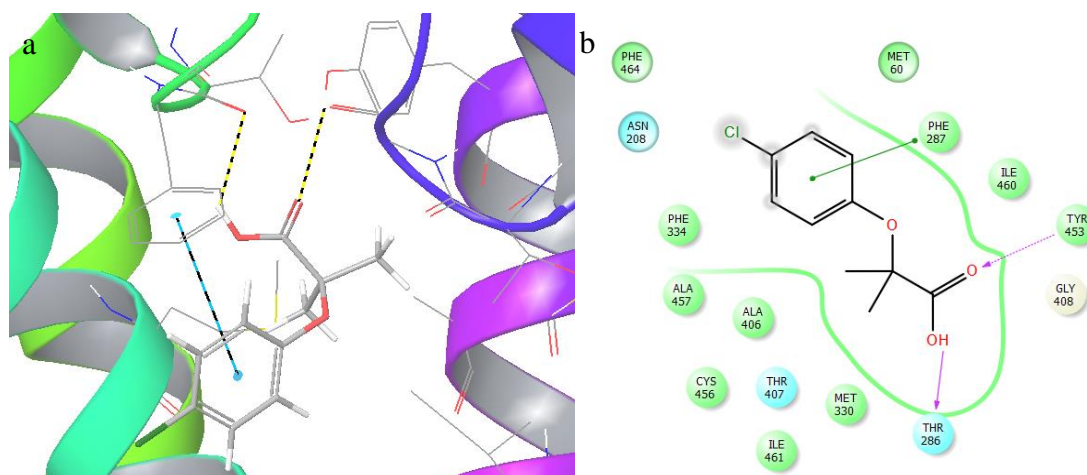


Figura 39. Representação dos modos de interação do composto selecionado **BindingDB28699** na região do poro central com o programa **Glide** (a) em três dimensões e (b) em duas.

A representação gráfica dos compostos selecionados em duas dimensões apresentadas na Figura 40, nos permite observar claramente a semelhança estrutural entre esses compostos. Os quatro principais elementos que pudemos observar nas imagens dos resultados de *docking* como prováveis locais de interação nos ligantes estão presente em todas as nove estruturas selecionadas. Podemos observar a presença de um anel aromático o qual em alguns resultados relatou a interação com anéis dos aminoácidos fenilalanina presente nas regiões alostérica e do poro central. Também observamos a presença de uma amina, um éter ou ainda o oxigênio (heteroátomo do anel hidroxi-cromona) situado na região central dos compostos, muitas vezes servindo de espaçador entre os anéis dos compostos, e sempre com um importante papel de interagir com os resíduos Tyr322 e Gln245 da região alostérica. Além da importante presença de um grupamento carboxílico, às vezes presente na forma iônica, dependendo do pH e do pKa, já relatada anteriormente como caráter fundamental para a ação antagonista e ainda a presença de um elemento eletronegativo ausente apenas no composto **ZINC3876174**.

Os compostos selecionados seguem em processo de compra e em seguida serão submetidos a ensaios *in vitro* para a comprovação da ação bloqueadora do canal de cálcio. Após a obtenção dos resultados os candidatos mais promissores serão responsáveis por formar o núcleo bloqueador do canal de cálcio da nossa proposta de pró-farmaco. Dando continuidade aos nossos estudos, o seguinte passo abordado em nossa pesquisa foi o da obtenção dos *hits* que farão parte do núcleo modulador da tubulina através dos estudos de triagem virtual.

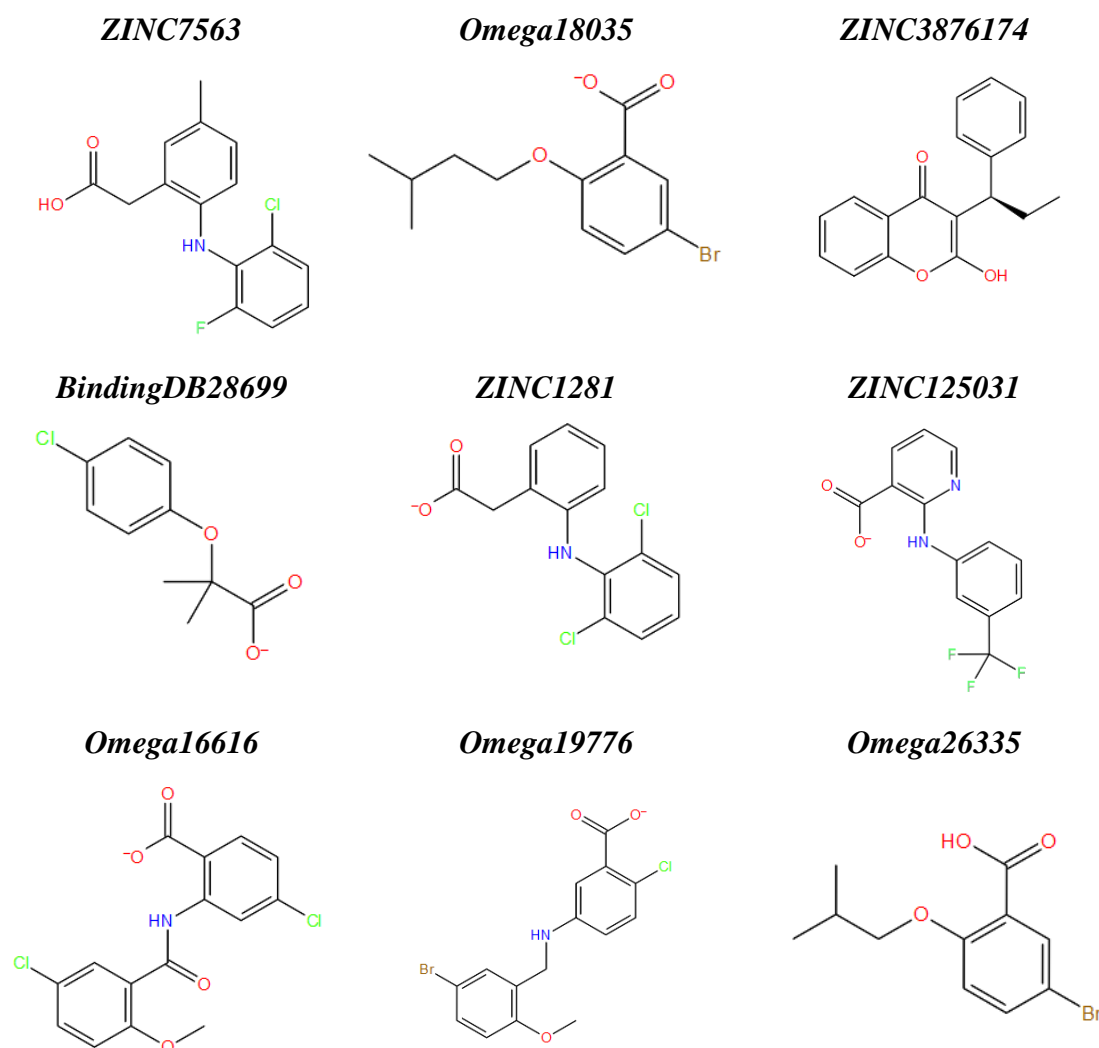


Figura 40. Estruturas planas dos compostos selecionados com potencial atividade bloqueadora do canal de cálcio.

4.1.1. Triagem virtual para moduladores da Tubulina a partir de dados reportados na literatura (*Estratégias 2 e 3*)

Nossos estudos de VS para moduladores de tubulina tiveram início em um extenso levantamento dos dados reportados no PDB para complexos da subunidade $\alpha\beta$ -tubulina. Em relação aos complexos disponíveis, identificamos os que apresentam o ligante interagindo no sítio da colchicina, e dessa foram, selecionamos para os nossos estudos os complexos com códigos PDB ID:4O2A e 4O2B. Estes complexos detêm resoluções de 2,5Å e 2,3Å, respectivamente, e serviram de base para os nossos estudos de SBVS, bem como, seus ligantes **BAL27862** e a **colchicina** foram utilizados nos estudos de LBVS.

Os ligantes dos dois complexos selecionados, o **BAL27862** (PDB ID:4O2A) e a **colchicina** (PDB ID:4O2B), podem ser observados na Figura 41. Estes dois ligantes interagem no mesmo sítio e ocupam a região de interface entre as cadeias alfa e beta, mais precisamente, ocupam as regiões S8 (313-320), S9 (351-356), T7 (244-251), H7 (224-243) e H8 (252-260) em beta e T5 (173-182) em alfa⁹⁵, as quais podem ser observadas na Figura 42.

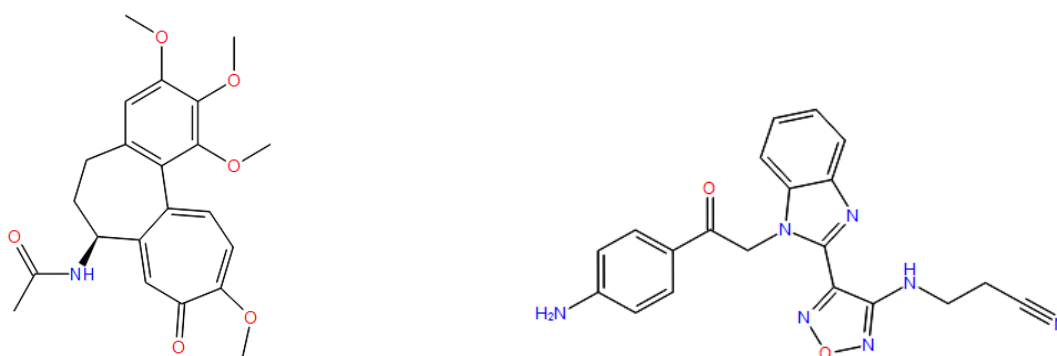


Figura 41. Representação em duas dimensões dos ligantes **colchicina** e **BAL27862** utilizados como referência para os estudos de similaridade.

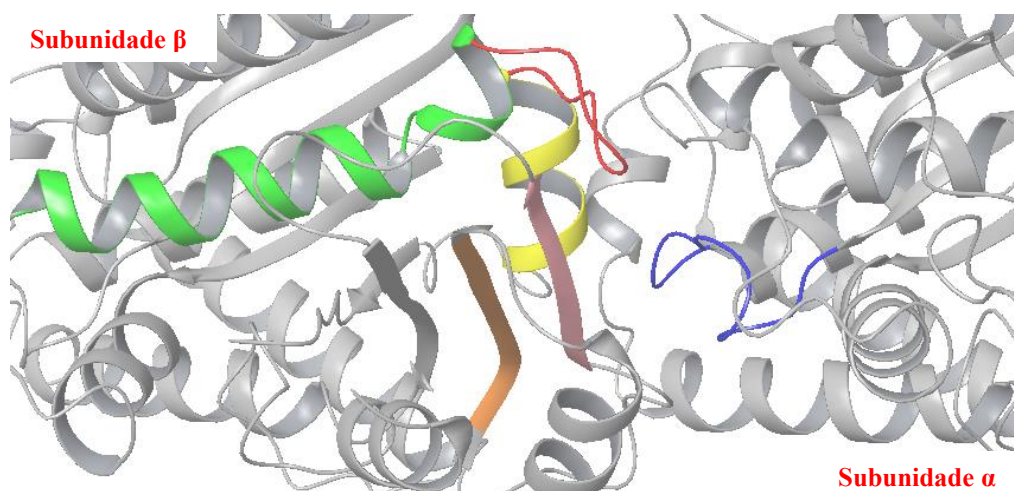


Figura 42. Representação em *Ribbons* da interface do sítio da colchicina na região alfa e beta da tubulina identificando a alça T5 (azul) em α e a alça T7 (vermelho), as hélices H7 (verde) e H8 (amarelo) e as folhas beta S8 (laranja) e S9 (rosa) em β .

A intenção do uso das duas estruturas deve-se ao fato de que as interações com cada ligante envolvem resíduos de aminoácidos distintos. Podemos observar Figura 43 a região de interação do **BAL27862** (em azul) representada pelos aminoácidos Tyr202, Val238, Lys352 da cadeia beta e Thr179 da cadeia alfa, e a região de interação da colchicina (em vermelho) que interage apenas com os aminoácidos Cys241 e Val181²⁰⁵.

Além disso, a sobreposição das estruturas nos revelou uma movimentação na alça T7, a qual já foi observada em outros estudos que relacionaram a estrutura da tubulina com e sem ligantes no sítio da colchicina²⁰⁵⁻²⁰⁷ e uma alteração na rotação da Lys352, a qual podemos observar na estrutura PDB ID 4O2A, com uma aproximação em direção ao ligante. Essas diferenças estruturais podem ser observadas na Figura 44.

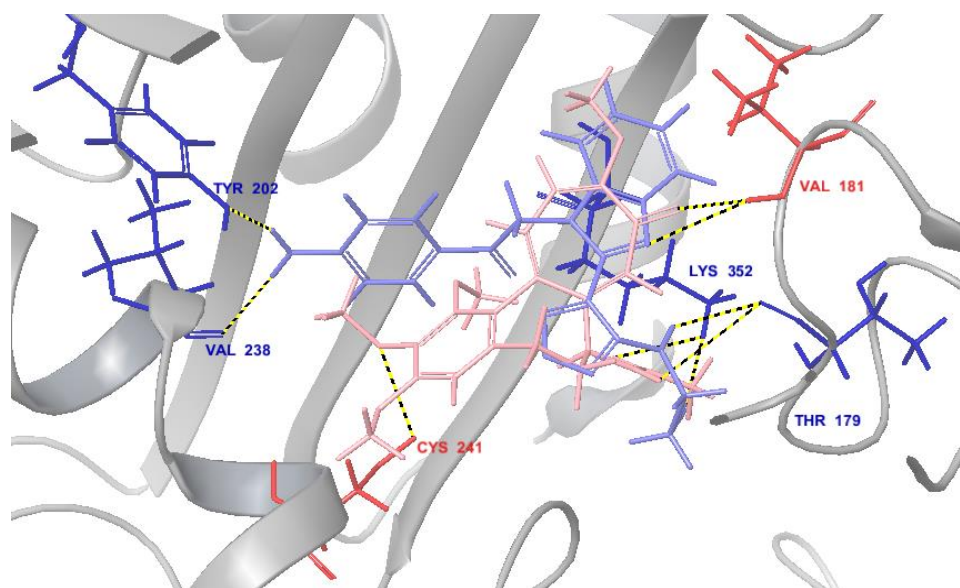


Figura 43. Representação *Ribbons* da interface do sítio da colchicina na região alfa e beta da tubulina no identificando resíduos (vermelho) responsáveis pela interação da colchicina (rosa) e os resíduos (azul escuro) responsáveis pela interação do ligante *BAL27862* (azul claro).

As duas estruturas cristalográficas PDB ID: 4O2A e 4O2B passaram por dois processos de validação de *docking* com os programas **Glide** e **GOLD**. Inicialmente foi realizado um *docking* utilizando as estruturas cristalográficas e seus inibidores, a fim de prever se tais simulações eram capazes de reproduzir a pose (conformação + orientação) cristalográfica do inibidor de cada complexo, processo chamado de *redocking*. Os resultados do *redocking* podem ser observados na Figura 45 a (*BAL27862*) e b (*colchicina*) obtidos pelo **Glide** e na Figura 46 a (*BAL27862*) e b (*colchicina*) obtidos pelo **GOLD**.

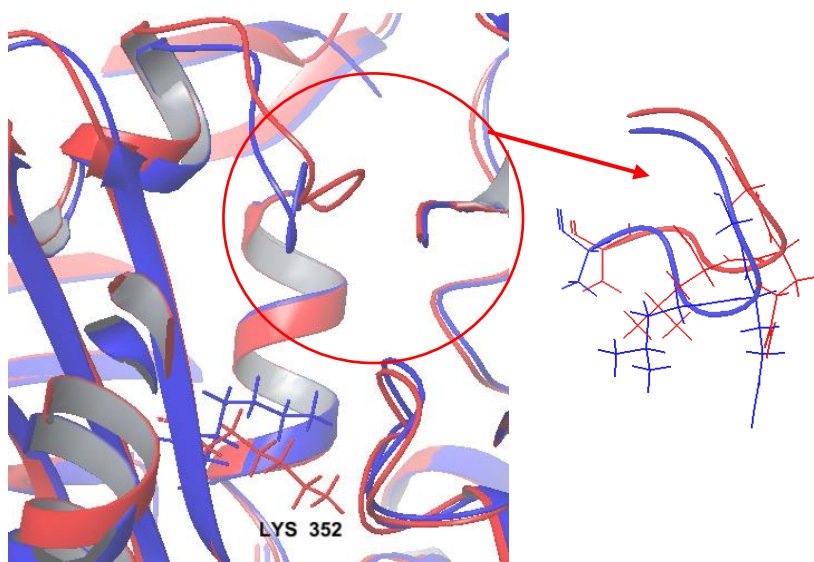


Figura 44. Representação em *Ribbons* da sobreposição das estruturas PDB ID4O2A e 4O2B onde podemos observar a movimentação da alça T7 e do resíduo Lys352.

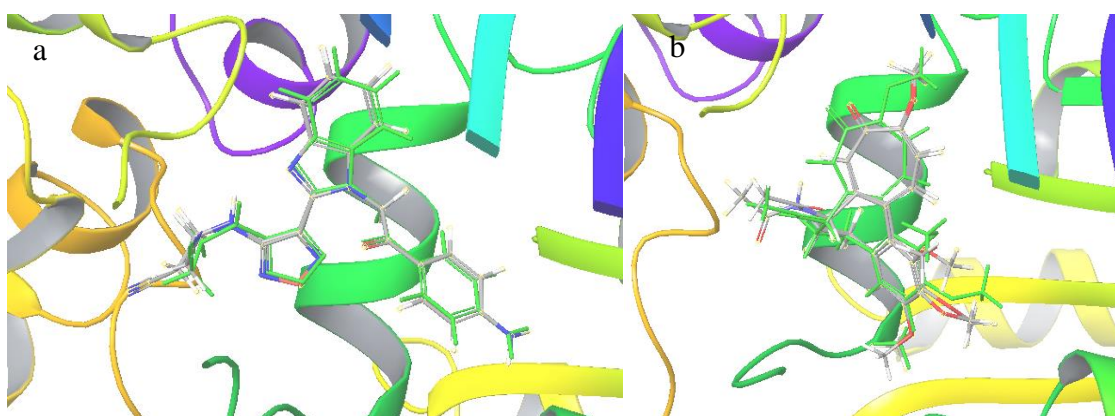


Figura 45. Visualização dos resultados de validação (redocking): (a) **BAL27862** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID:4O2B e (b) **colchicina** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID: 4O2A obtidos pelo programa **Glide**

Posteriormente, a segunda validação realizada nos permitiu avaliar a capacidade de recuperação de ligantes com IC_{50} conhecidos. Avaliamos o desempenho dos programas quanto à sua eficiência/robustez em estudos de triagem virtual. Para tal, moduladores de tubulina com valores de IC_{50} reportados na literatura foram adicionados a uma pequena base de dados qualquer de moléculas contendo propriedades *drug-like*, e avaliamos a capacidade dos programas em recuperar esses ligantes e ordena-los através da pontuação, de forma coerente.

Os resultados de ambas as validações foram satisfatórios e podem ser observados nas Tabela 12 e Tabela 13, as quais apresentam a classificação da recuperação do ligante

e o valor de pontuação. Tais resultados nos garantiram a confiabilidade na utilização dessas duas estruturas para os estudos de simulações de *docking*. Sendo assim, utilizamos o centro do *docking* em $x=17,336$; $y=63,576$ e $z=43,586$. Para o **GOLD** foi utilizado uma esfera de 8 Å e para o **Glide** um *grid* de 20 Å com um *grid* interno de 6 Å.

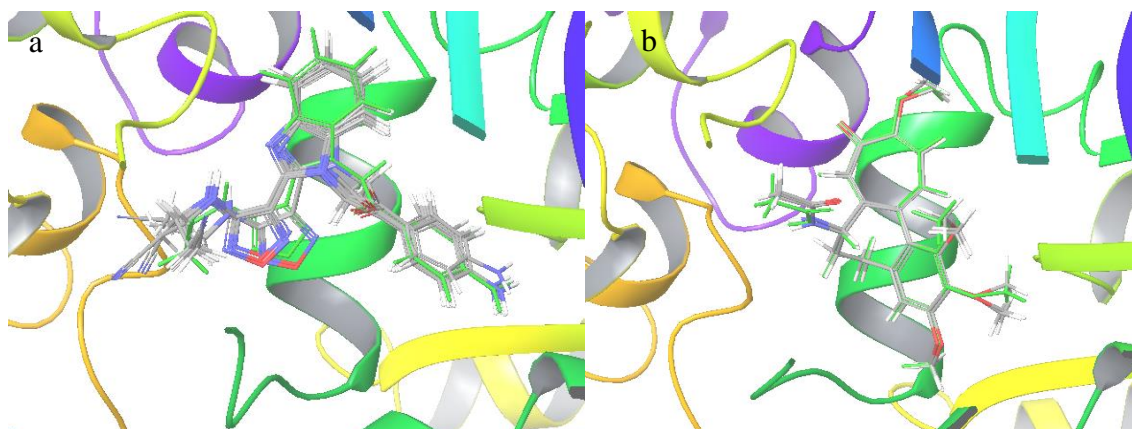


Figura 46. Visualização dos resultados de validação (*redocking*): (a) **BAL27862** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID:4O2B e (b) **colchicina** (verde) com o modelo cristalográfico PDB ID: 4O2A obtidos pelo programa **GOLD**.

Tabela 12. Classificação e valor de pontuação dos contaminantes recuperados para o modelo cristalográfico PDB ID:4O2A, utilizando o programa **Glide** e **GOLD**, respectivamente.

Classificação	Título	<i>XPGLideScore</i>	Classificação	Título	<i>GOLDScore</i>
9	Indibulin	-9.140	3	Indibulin	84362
13	AVE8062	-8.618	8	MN-029	82.390
16	Phenstatin	-8.561	19	AVE8062	74.647
31	MN-029	-7.957	29	ABT-751	69.546
36	Nocodazole	-7.574	31	Nocodazole	65.890

Tabela 13. Classificação e valor de pontuação dos contaminantes recuperados para o modelo cristalográfico PDB ID:4O2B utilizando o programa **Glide** e **GOLD**, respectivamente.

Classificação	Título	<i>GOLDScore</i>	Classificação	Título	<i>XPGLideScore</i>
11	MN-029	72.813	7	Phenstatin	72.813
12	ABT-751	72.576	9	CA-4	72.576
14	Indibulin	72.184	11	MN-029	72.184
17	ZD6126	70.585	12	ABT-751	70.585
27	CA-4	64.628	15	Indibulin	64.628

Após validada nossa metodologia para os estudos de SBVS seguimos para a execução das **Estratégias 2 e 3** de triagem virtual, propriamente ditas. Para a execução da **Estratégia 2** utilizamos como referência nos estudos de similaridade por forma e por superfície eletrostática os ligantes dos complexos selecionados. As mesmas bases de dados utilizadas no estudo do canal de cálcio, previamente preparadas, serviram para os estudos de triagem virtual para os candidatos moduladores da tubulina.

Discussão dos resultados obtidos na Estratégia2

O esquema de execução da **Estratégia 2** pode ser observado na Figura 47 e será detalhadamente explicado a seguir.

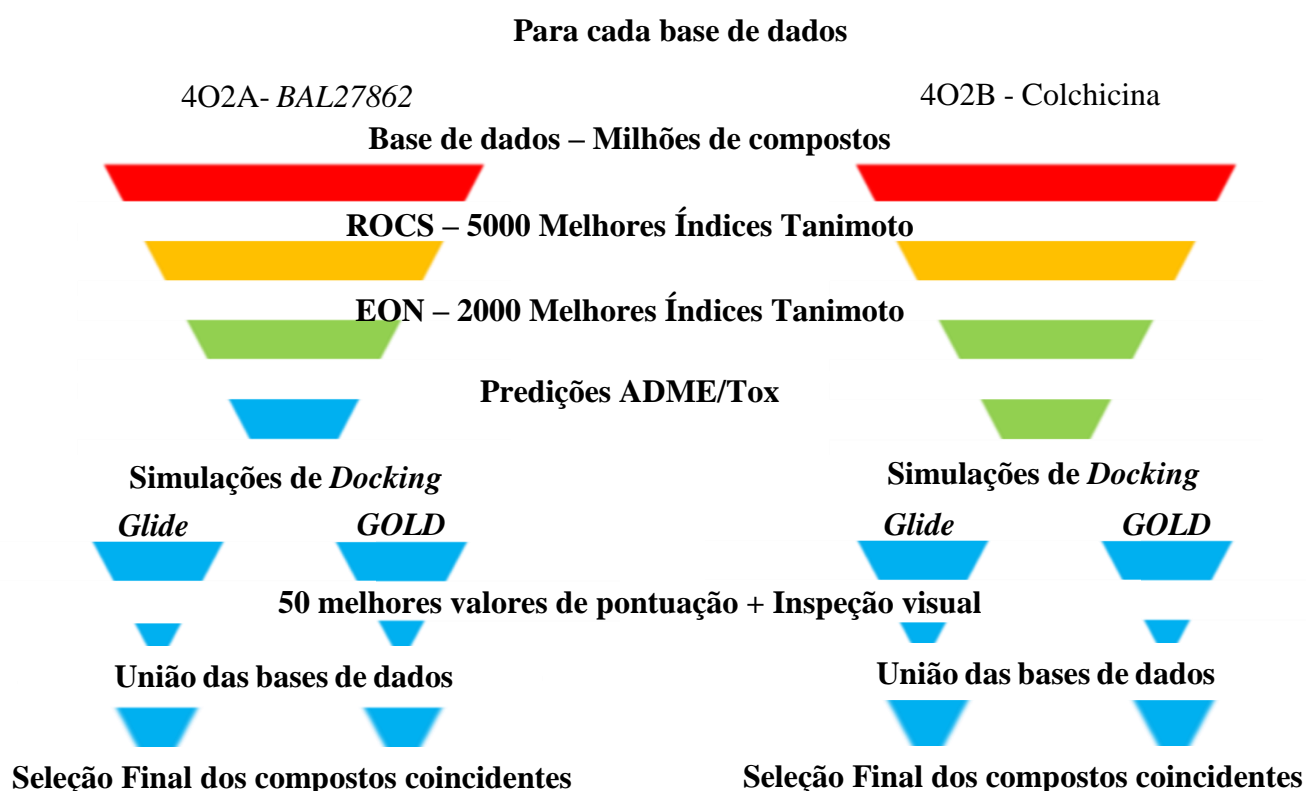


Figura 47. Representação esquemática da Estratégia2 de triagem virtual utilizada para a seleção de compostos com potenciais atividades moduladoras da tubulina.

A **Estratégia 2** foi iniciada a partir de uma triagem virtual através da similaridade por forma. Como resultado retivemos os 5000 melhores compostos avaliados pelo índice Tanimoto. Estes compostos seguiram para a triagem através da similaridade por

superfície eletrostática, pela qual, selecionamos os 2000 melhores resultados através do índice Tanimoto para cada base de dado em estudo. Sendo assim, como foram utilizadas 6 bases de dados, detínhamos para cada ligante referência um total de 12000 compostos.

Posteriormente, os compostos selecionados tiveram suas propriedades farmacocinéticas e toxicológicas preditas pelos programas computacionais **QikProp** e **DEREK** respectivamente. Assim como na **Estratégia1**, os estudos das propriedades farmacocinéticas foram analisados frente aos descritores: *#star*, $\log P_{o/w}$, $\log CACO_2$, $\log MDCK$, porcentagem de absorção oral e qualidade do modelo de absorção oral humana. Os compostos que tiveram alguma sinalização no descritor *#star* foram rejeitados, assim como os que tiveram valor de $\log P_{o/w}$ maior do que 5, $\log CACO_2$ e $\log MDCK$ abaixo de 500, Porcentagem de Absorção Oral abaixo de 80% e Qualidade do modelo de absorção oral humana diferente de “alta”.

Na análise das predições das propriedades toxicológicas, foram rejeitados os compostos que, após a predição com **DEREK**, apresentaram algum alerta de toxicidade segundo *Custom Predictions* e *Lhasa Predictions*. Ao fim destas triagens detínhamos um montante de 3097 compostos sobreviventes às triagens executadas utilizando o ligante **BAL27862** como referência e 3193 compostos sobreviventes as triagens executadas com a **colchicina** como referência. A relação de compostos sobreviventes após os estudos de LBVS, para cada base de dados utilizado, pode ser observado na Tabela 14.

Tabela 14. Relação dos compostos sobreviventes em cada base de dado em estudo após os estudos de LBVS (Estratégia2)

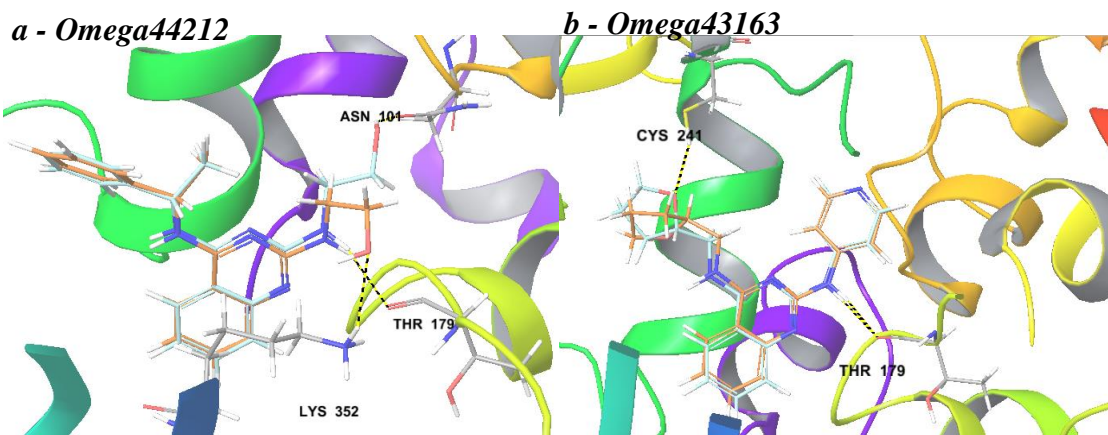
Base/ Referência	BAL27862 (PDB ID:4O2A)	Colchicina (PDB ID: 4O2B)
<i>Drug Data ZINC</i>	186 compostos	233 compostos
<i>ChemBridge Diverset CL</i>	839 compostos	868 compostos
<i>ChemBridge Diverset EXP</i>	991 compostos	788 compostos
<i>FDA BindingDB</i>	109 compostos	102 compostos
<i>MayBridge</i>	590 compostos	605 compostos
<i>Naturals ZINC</i>	382 compostos	597 compostos
TOTAL	3097 compostos	3193 compostos

Por fim, os compostos sobreviventes de cada base de dado foram utilizados para o desenvolvimento de propostas de interações através de simulações de *docking* com os programas **Glide** e **GOLD**. Para cada base de dados separamos os 50 compostos com maiores valores de pontuação e as propostas dos modos de interação foram analisadas através de uma inspeção. Foram priorizados os compostos que demonstraram uma ou mais possibilidades de interações com resíduos descritos na literatura. As bases de dados foram unidas, e assim obtivemos o montante de:

- 34 compostos para a estrutura 4O2A utilizando o programa **GOLD**;
- 78 compostos para a estrutura 4O2A utilizando o programa **Glide**;
- 55 compostos para a estrutura 4O2B utilizando o programa **GOLD**;
- 99 compostos para a estrutura 4O2B utilizando o programa **Glide**.

Os resultados obtidos em cada um dos programas para cada uma das duas simulações executadas (na estrutura PDB ID:4O2A e PDB ID: 4O2B) foram confrontados. Dessa forma, mais uma triagem foi executada, pela qual foram selecionados os compostos em que nas propostas dos modos de interação apresentaram uma ou mais interações com os resíduos descritos na literatura nas simulações com ambos programas, isto é, que apresentaram resultados coincidentes nas simulações feitas com o **Glide** e com o **GOLD** e estes compostos passaram ainda por mais uma seleção.

Por fim, para compor os *Hits* obtidos na **Estratégia 2** analisamos a semelhança no posicionamento dos compostos coincidentes frente ao sítio de interação, e o final, selecionamos 10 compostos para cada uma das estruturas em estudo como melhores indicativos de modulação da tubulina. Os resultados estão apresentados nas Figura 48, representando os modos de interação dos compostos com resíduos da interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID: 4O2A, e na Figura 49 com uma representação em duas dimensões e da mesma forma para as Figura 50 e Figura 51 para os estudos na estrutura PDB ID: 4O2B, além do RMSD (desvio médio quadrático) referente à sobreposição dos compostos e a máxima diferença entre átomos.

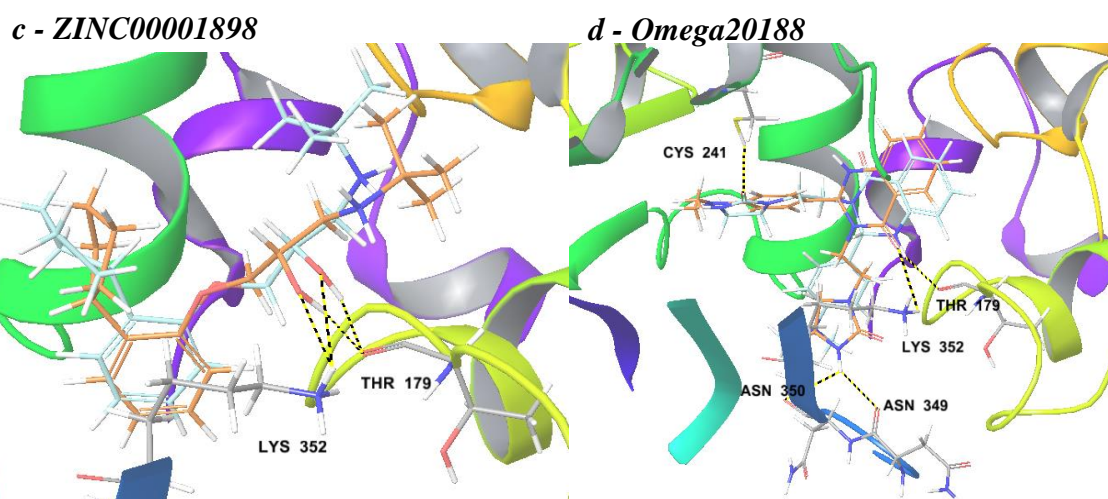


RMSD = 1,2120

Máxima diferença entre átomos = 5,4229

RMSD = 1,3732

Máxima diferença entre átomos = 3,9267

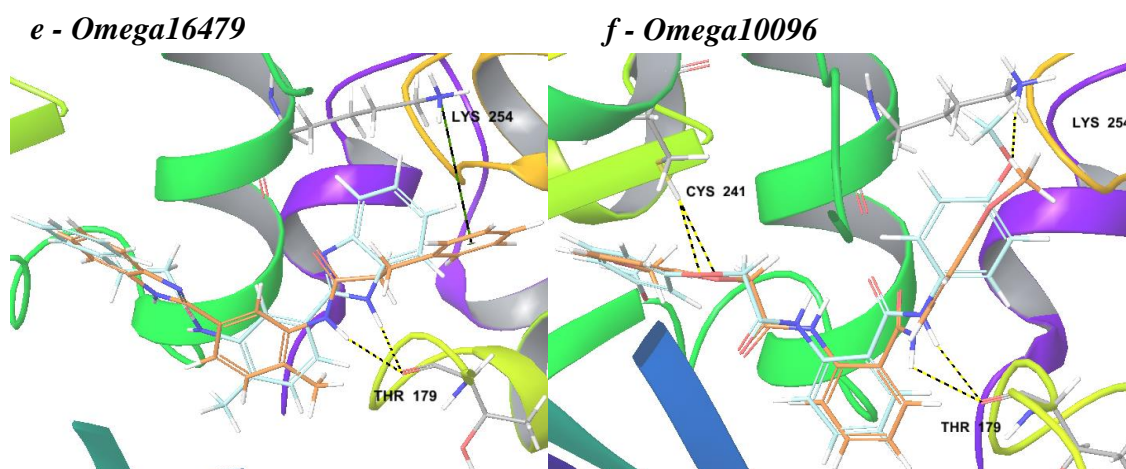


RMSD = 2,0115

Máxima diferença entre átomos = 4,9455

RMSD = 5,9161

Máxima diferença entre átomos = 11,5357



RMSD = 9,2450

Máxima diferença entre átomos = 17,2406

RMSD = 1,6335

Máxima diferença entre átomos = 4,6337

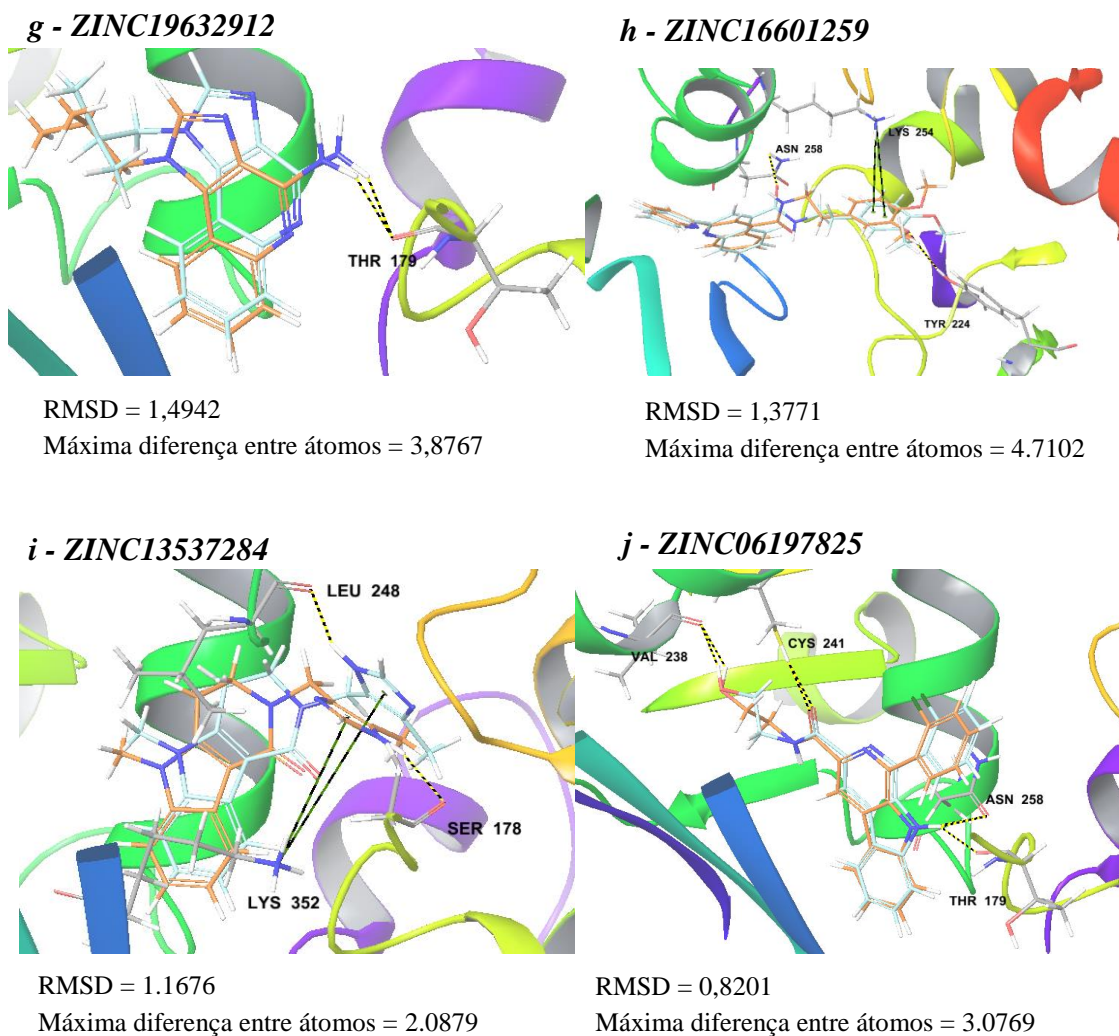


Figura 48. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A e os valores de RMSD e máxima diferença entre átomos. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de *docking* com o **GOLD** e em azul com o **Glide**.

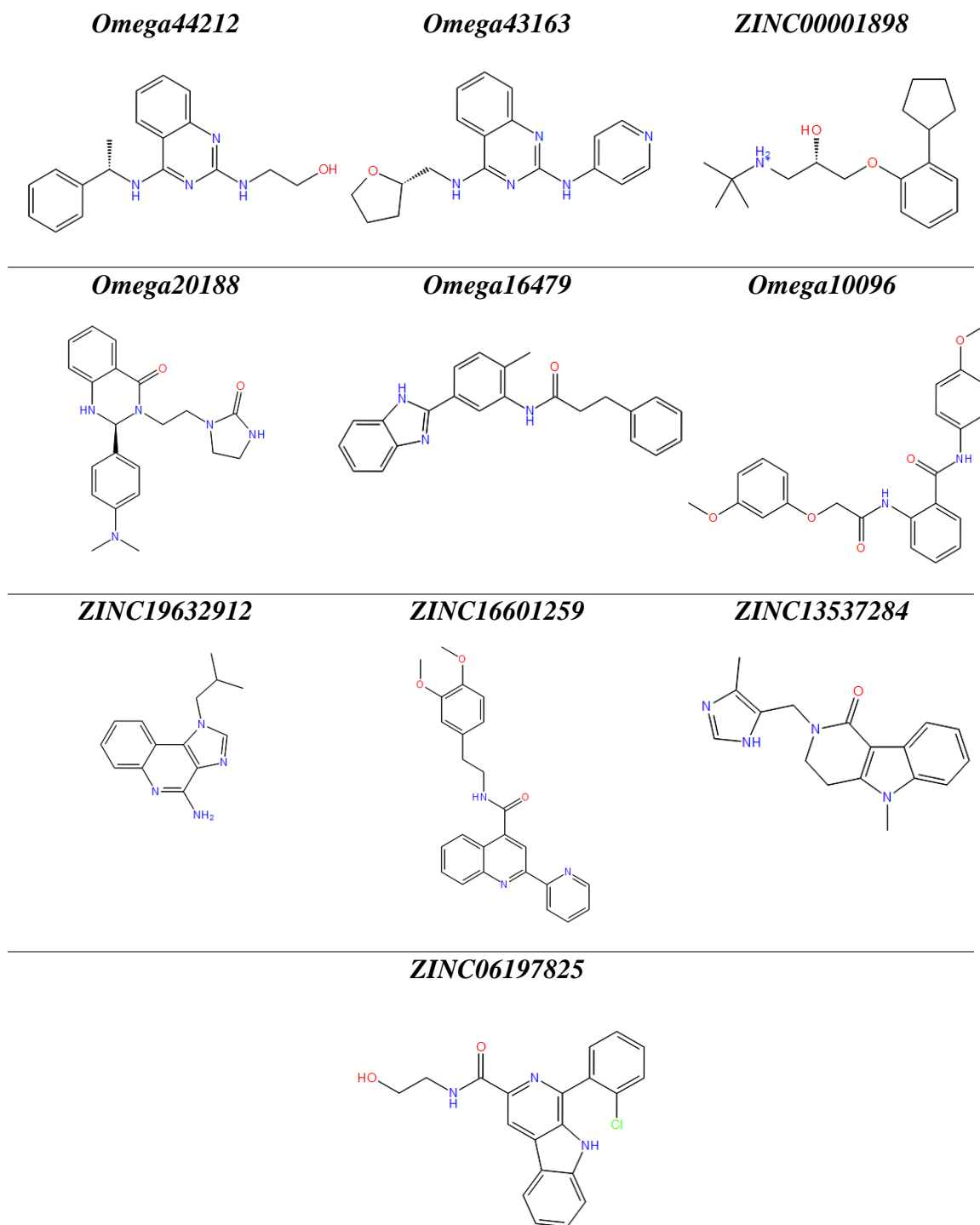
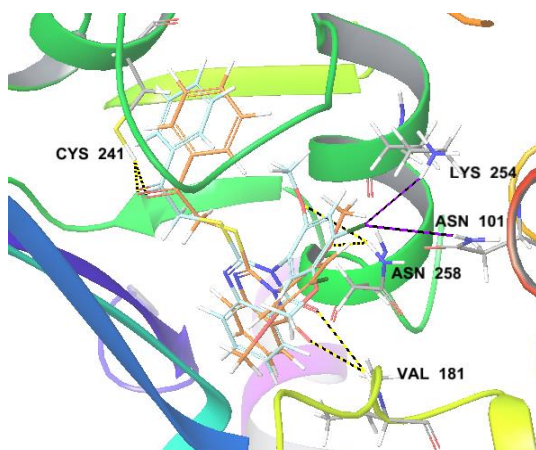
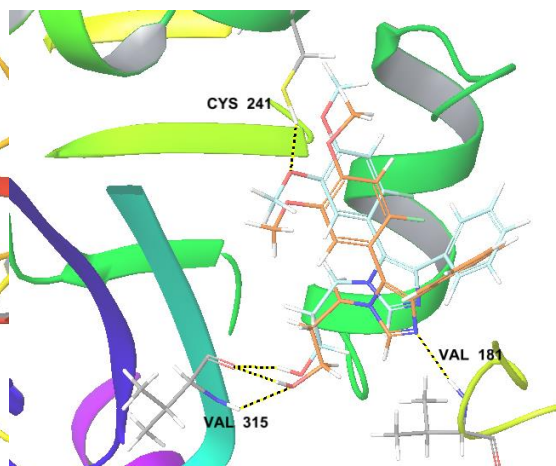


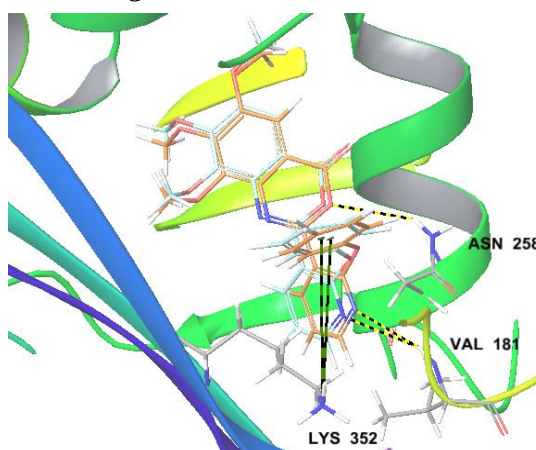
Figura 49. Representação em duas dimensões dos compostos seleccionados através dos estudos de *docking* na estrutura PDB ID: 4O2A.

a - Omega5315

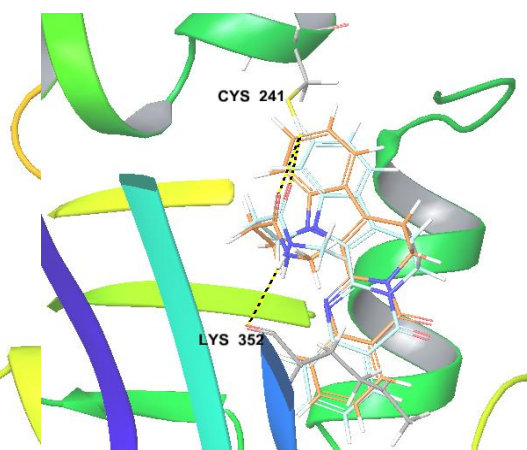
RMSD = 1, 2799
Máxima diferença entre átomos = 2,3884

b - Omega35671

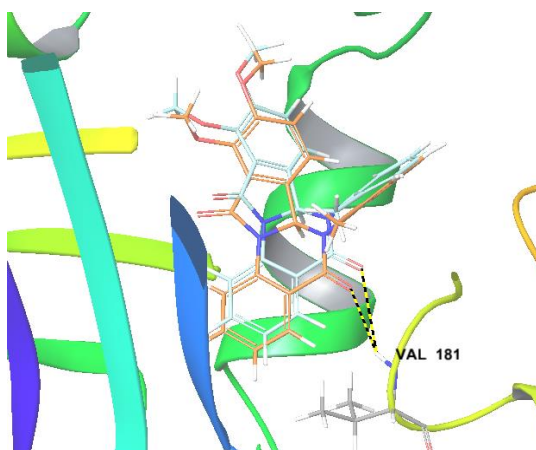
RMSD = 1, 6839
Máxima diferença entre átomos = 3,6742

c - Omega3464

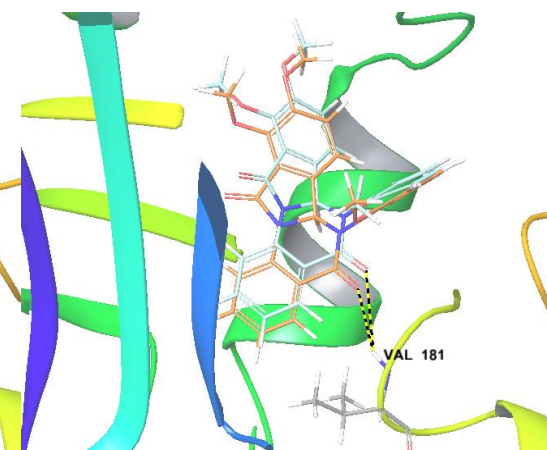
RMSD = 0,6157
Máxima diferença entre átomos = 1,2081

d - ZINC85875395

RMSD = 0,6910
Máxima diferença entre átomos = 1,5873

e - ZINC02150935

RMSD = 0,9839
Máxima diferença entre átomos = 3,6419

f - ZINC02150811

RMSD = 0,9537
Máxima diferença entre átomos = 3,6397

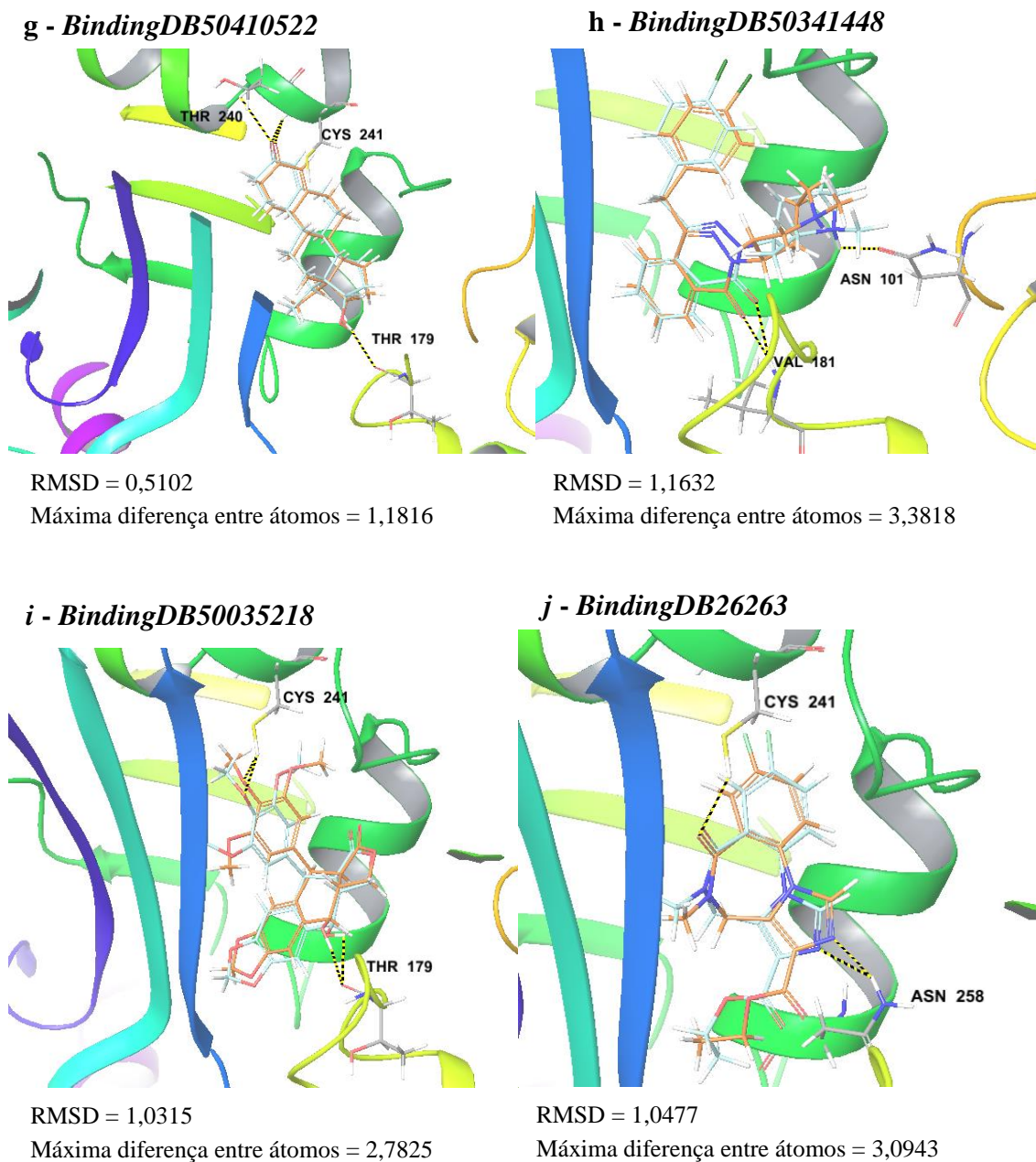


Figura 50. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2B. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de docking com o **GOLD** e em azul com o **Glide**.

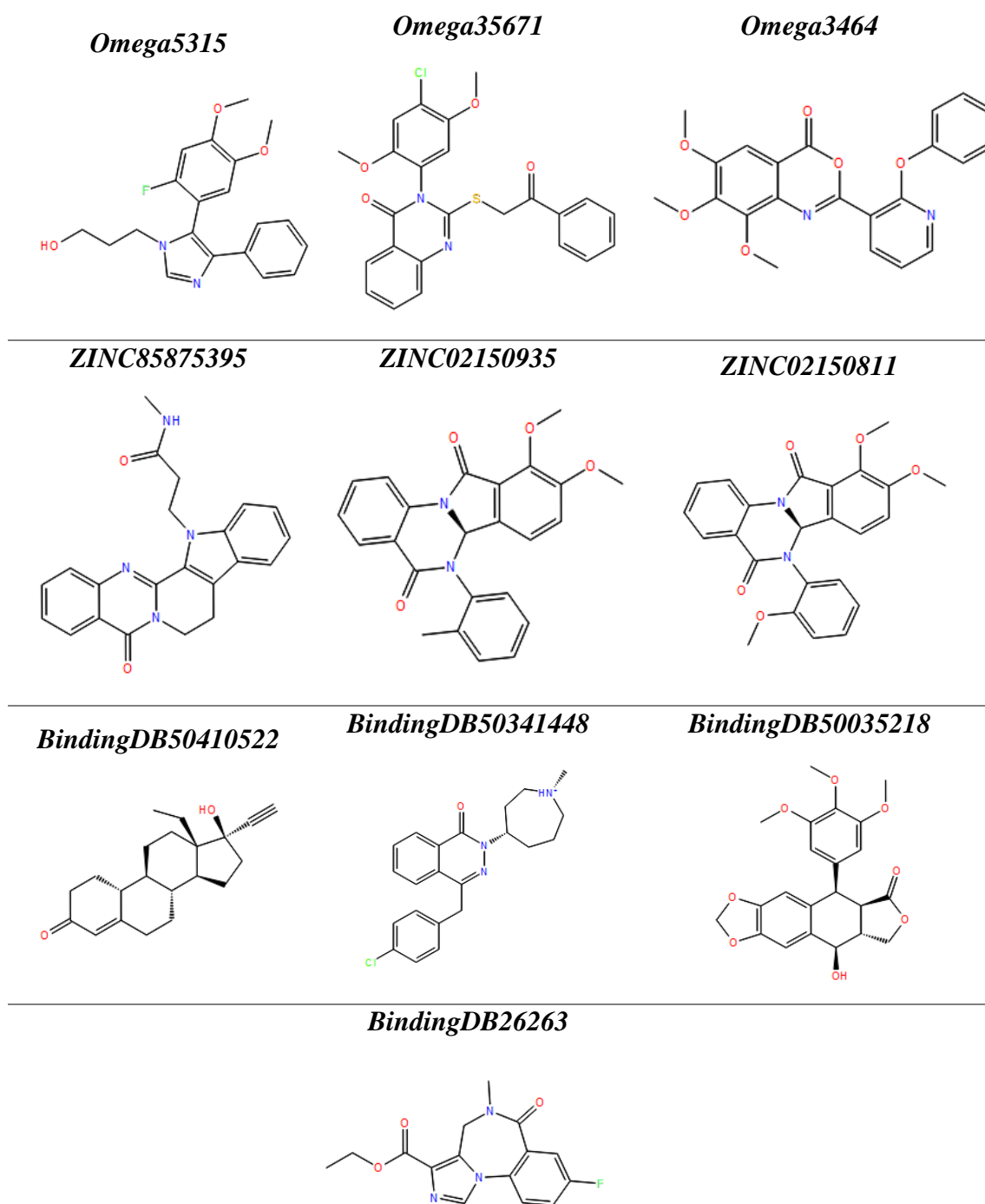


Figura 51. Representação em duas dimensões dos compostos selecionados através dos estudos de docking na estrutura PDB ID: 4O2B

As imagens em três dimensões (projetadas no plano) das sobreposições dos resultados obtidos nas simulações do **Glide** e **GOLD** nos permitem observar a semelhança entre o posicionamento dos ligantes. Na maioria das imagens podemos observar alterações muito pequenas entre os resultados dos programas, com RMSD próximos a 1, variando pouco a orientação dos ligantes. Em outros casos, em que o RMSD

é um pouco mais elevado podemos observar ou um deslocamento na pose dos ligantes ou uma variação no posicionamento nas cadeias substituintes, o que não afeta na qualidade dos resultados, visto que os grupamentos importantes para a ocorrência de interações situam-se na mesma região.

Por outro lado, as pequenas variações no posicionamento das cadeias substituintes observadas na sobreposição dos resultados demonstram dados interessantes. Em alguns casos, pequenas rotações permitiram a interação com distintos resíduos de aminoácidos, e em outros casos observamos a ausência de interação, dados que poderão ser explorados em novas propostas de candidatos a moduladores da tubulina.

Discussão dos resultados obtidos na Estratégia 3

Ainda em relação a triagem virtual de compostos com potenciais características de modulação da tubulina baseados nos dados presentes na literatura, executamos mais uma estratégia nomeada de **Estratégia 3**. Tal estratégia, foi adotada na tentativa de explorarmos uma maior diversidade de compostos, não nos referenciando pelos ligantes cristalográficos anteriormente utilizados na **Estratégia 2**. Dessa forma, eliminamos os estudos de LBVS para a **Estratégia 3**, a qual teve o ponto de partida uma triagem virtual direta feita por simulações *docking* utilizando somente o programa **GOLD** e a estrutura do modelo cristalográfico PDB ID:4O2A.

Devido ao maior desprendimento computacional da **Estratégia 3**, partimos de um número reduzido de compostos iniciais, utilizando apenas 3 bases de dados (*ChemBridge Diverset EXP*, *ChemBridge Diverset CL* e *ZINC* subdivisão de produtos naturais). Após os estudos de simulações de *docking*, os 100 melhores resultados de pontuação para cada base de dados seguiram para os estudos de predições das propriedades farmacocinéticas e toxicológicas utilizando novamente os programas **QikProp** e **DEREK** respectivamente, e assim como foram feitas nas estratégias anteriores, adotamos os mesmos critérios. Por fim, a seleção final dos compostos foi feita através de uma inspeção visual comparativa das propostas de interações obtidas nos resultados de *docking* dos compostos sobreviventes com a pose cristalográfica do ligante do complexo PDB ID: 4O2A. Um esquema gráfico da **Estratégia3** pode ser observado na Figura 52.

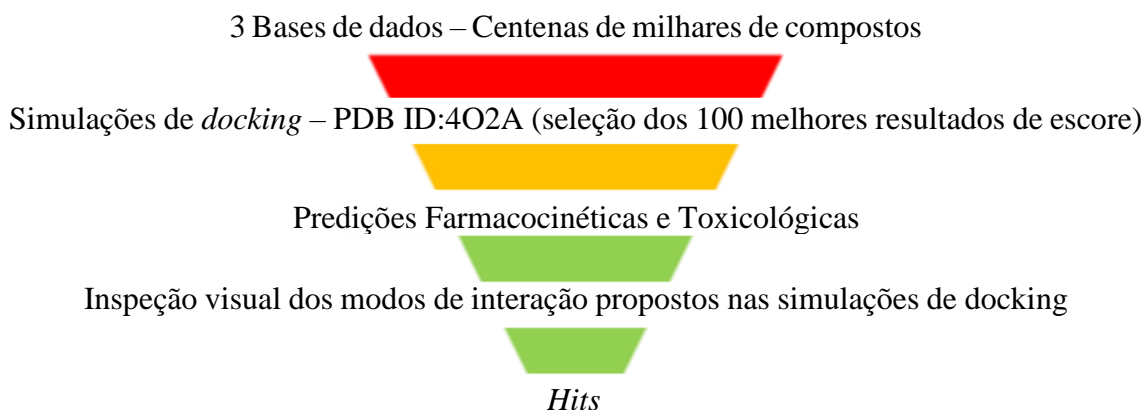


Figura 52. Representação esquemática da Estratégia3 de triagem virtual utilizada para a seleção de compostos com potenciais atividades moduladoras da tubulina.

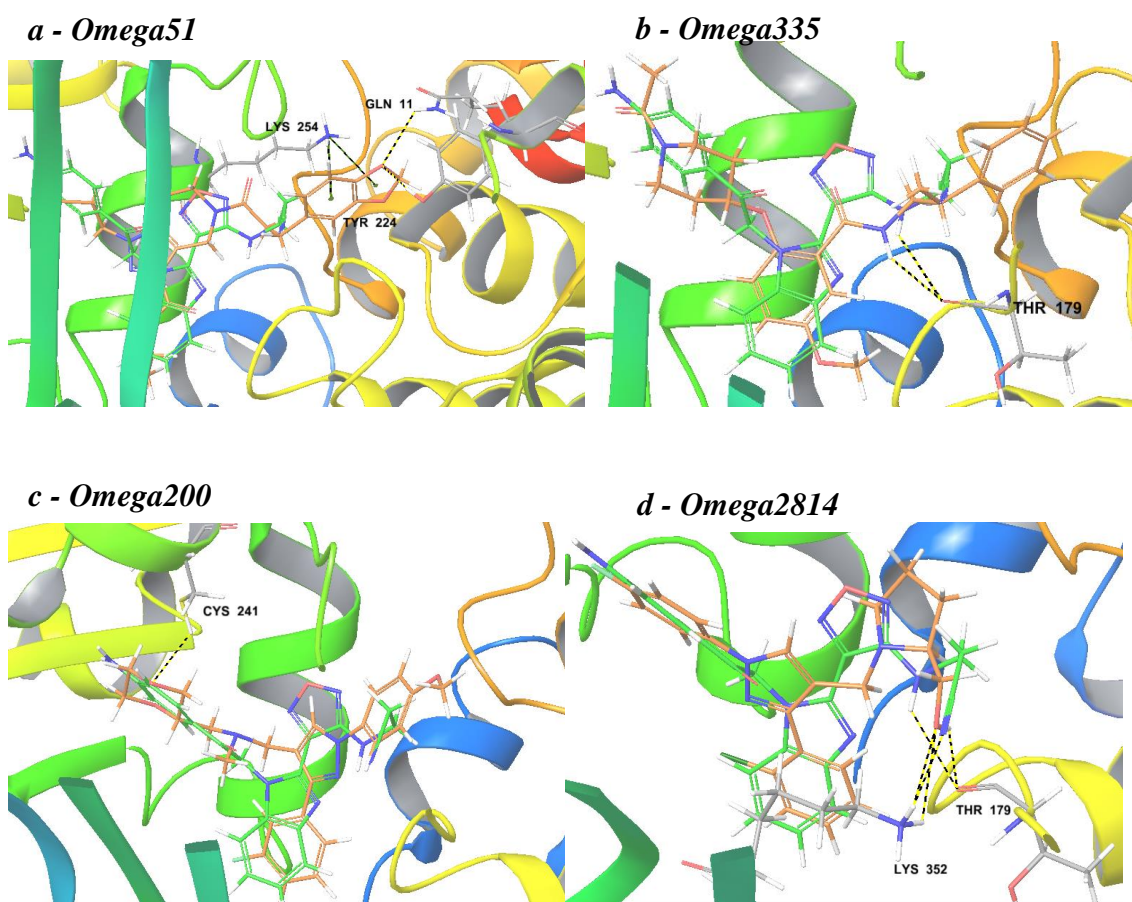
Como descrito anteriormente detínhamos 300 compostos ao fim das simulações de docking. Estes compostos foram novamente triados a partir dos resultados obtidos nas predições das propriedades ADME/Tox, e ao final destas etapas, número de sobreviventes foram reduzidos a 45 compostos. A relação entre os compostos “sobreviventes” e as bases de dados utilizados nesse estudo pode ser observada na Tabela 15.

Tabela 15. Relação dos compostos sobreviventes em cada base de dados em estudo após as duas triagens executadas na **Estratégia3**.

Base/ Referência	<i>BAL27862</i> (PDB ID:4O2A)
<i>ChemBridge Diverset CL</i>	26 compostos
<i>ChemBridge Diverset EXP</i>	14 compostos
<i>Naturals ZINC</i>	5 compostos
TOTAL	45 compostos

Os 45 compostos sobreviventes foram analisados quanto ao posicionamento similar ao ligante *BAL27862* na interface $\alpha\beta$ -tubulina, e dessa forma, reduzimos o número destes compostos para 30. Por fim, estes 30 compostos pré-selecionados passaram por mais uma inspeção visual levando em consideração a possibilidade de ocorrência de interações entre estes compostos e os resíduos da região, dando uma maior importância, quando existentes, as interações com os resíduos descritos na literatura responsáveis pela interação do *BAL27862* com a tubulina. Ao final, foram selecionamos 10 *hits*.

Podemos observar a estrutura em três dimensões dos 10 *hits* selecionados na Figura 53, bem como, as propostas de interações obtidas nas simulações de *docking* com o programa **GOLD**. Ainda foi feita uma análise do modo de interação dos 3 principais compostos dessa seleção em 3D e em 2D, identificando as interações ocorridas nas Figura 54, Figura 55 e Figura 56. Por fim, para uma melhor visualização das estruturas dos *hits* selecionados na **Estratégia3** é possível observar as mesmas em duas dimensões na Figura 57.



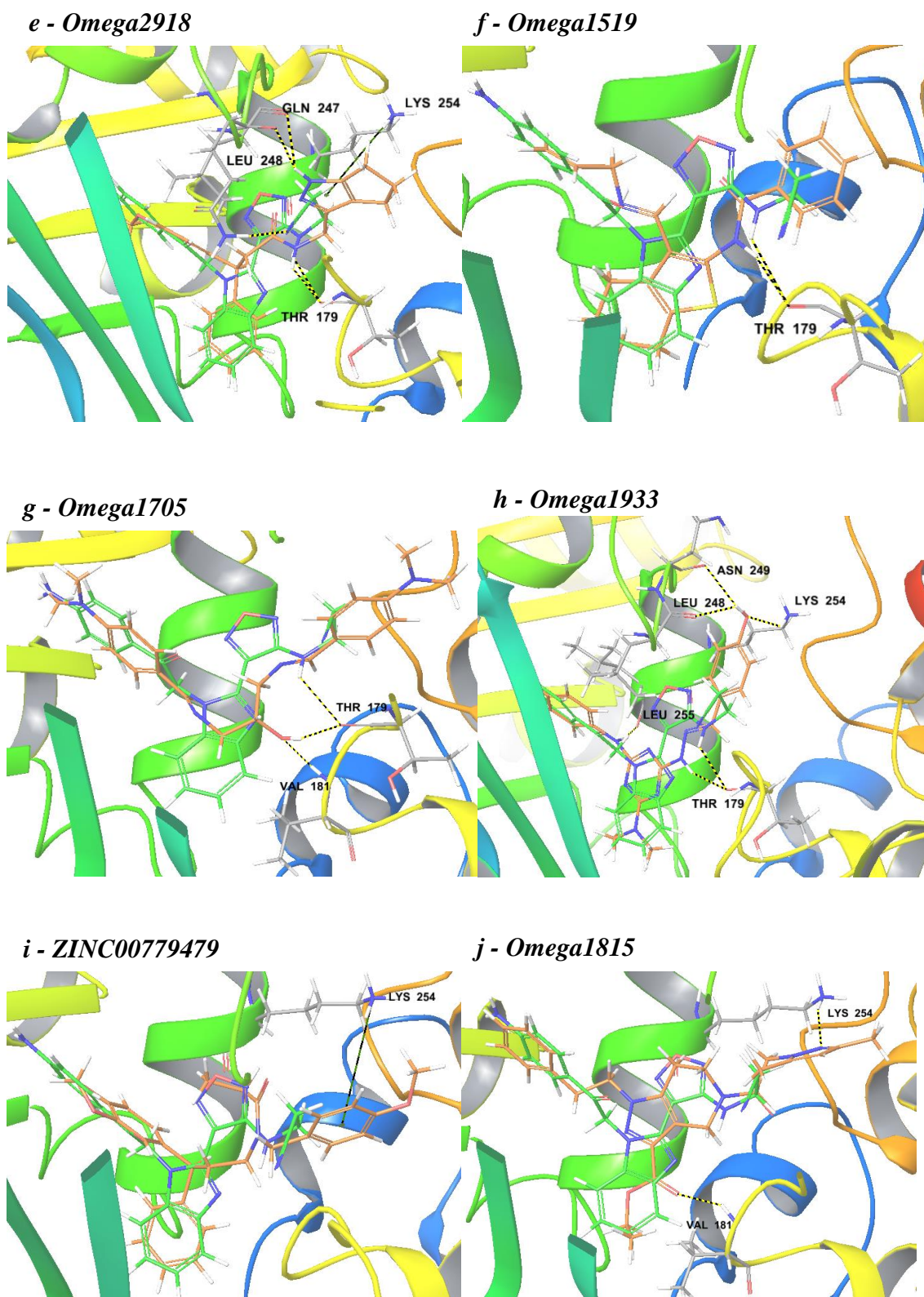


Figura 53. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na Estratégia3 com a interface $\alpha\beta$ -tubulina na estrutura PDB ID:4O2A. Em verde, o ligante cristalográfico *BAL27862* e em laranja o resultado apresentado pelo **GOLD**.

De acordo com as propostas de poses obtidas através das simulações de *docking* podemos observar a ocorrência de 4 interações entre o composto **Omega2918** e a interface $\alpha\beta$ -tubulina. Podemos observar uma ligação de hidrogênio entre o nitrogênio da amida do composto com a carboxila da cadeia principal do aminoácido Thr179 situado na cadeia alfa da tubulina, o mesmo relatado no complexo PDB ID: 4O2A. Também podemos observar três interações ocorrendo entre o anel e os átomos do anel benzoimidazol. Duas ligações de hidrogênio entre o átomo de nitrogênio presente no anel benzoimidazol com as carbonilas das cadeias principais dos resíduos Gln247 e Leu248 e uma transferência de carga entre o anel benzoimidazol e a amina da Lys254.

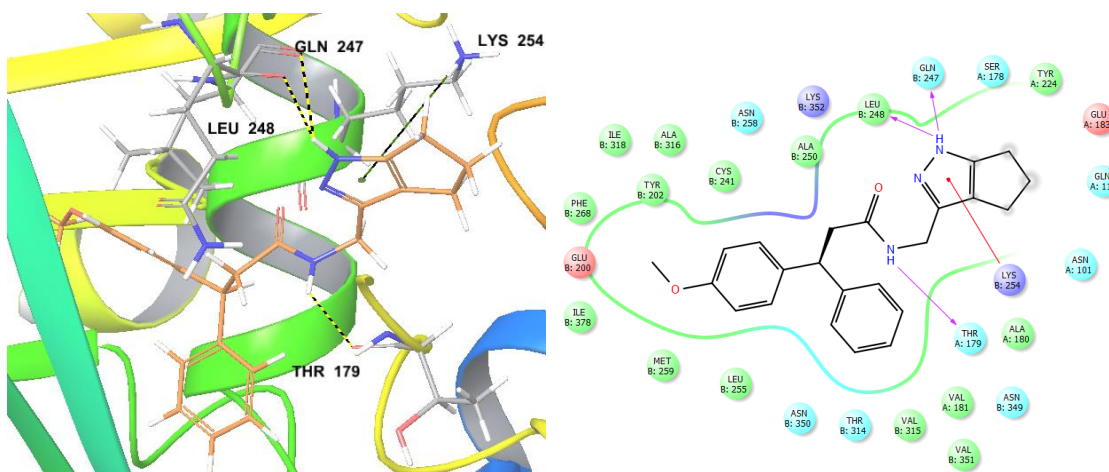


Figura 54. Representação em três e em duas dimensões (esquemática) das propostas de interações obtidas em estudos de *docking* do composto **Omega2918** com a região $\alpha\beta$ -tubulina.

A avaliação do modo de interação proposto através dos estudos de *docking* do composto **Omega1933** com a região de interface $\alpha\beta$ -tubulina nos permite observar a presença de cinco interações, sendo três ligações de hidrogênio ocorrendo entre a hidroxila fenólica do composto e as carbonilas das cadeias principais dos aminoácidos Leu255 e Asn249 e a amina da cadeia lateral do resíduo Lys254. Também observamos a importância dos nitrogênios presentes na estrutura do composto ao analisarmos a ocorrência de mais duas ligações de hidrogênio entre o composto e as carbonilas das cadeias principais dos aminoácidos Thr179 da cadeia α -tubulina (relatado no complexo PDB ID:4O2A) e a Leu255 da cadeia β -tubulina.

Por fim, ao analisarmos as propostas dos modos de interação entre o composto **Omega3815** e a tubulina observamos a presença de duas interações. Uma ligação de

hidrogênio entre a carbonila do grupamento éster do composto e a amina da cadeia principal do resíduo Val181, relatada na literatura por ser um importante aminoácido presente na interação da colchicina com a tubulina e também uma ligação de hidrogênio observada entre o nitrogênio do anel pirazol do composto e a amina presente no resíduo Lys254 da cadeia β -tubulina.

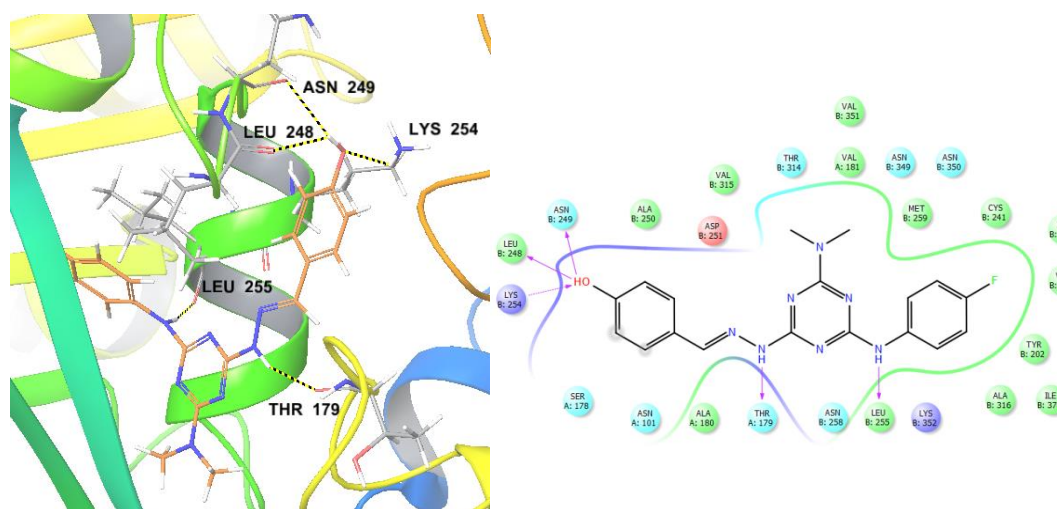


Figura 55. Representação em três e em duas dimensões das propostas de interações obtidas em estudos de *docking* do composto *Omega1933* com a região $\alpha\beta$ -tubulina.

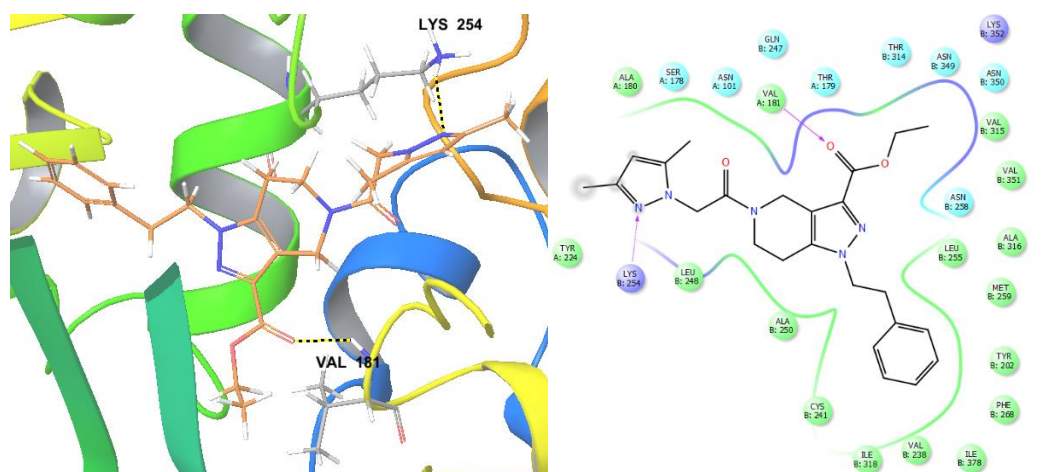


Figura 56. Representação em três e em duas dimensões das propostas de interações obtidas em estudos de *docking* do composto *Omega3815* com a região $\alpha\beta$ -tubulina.

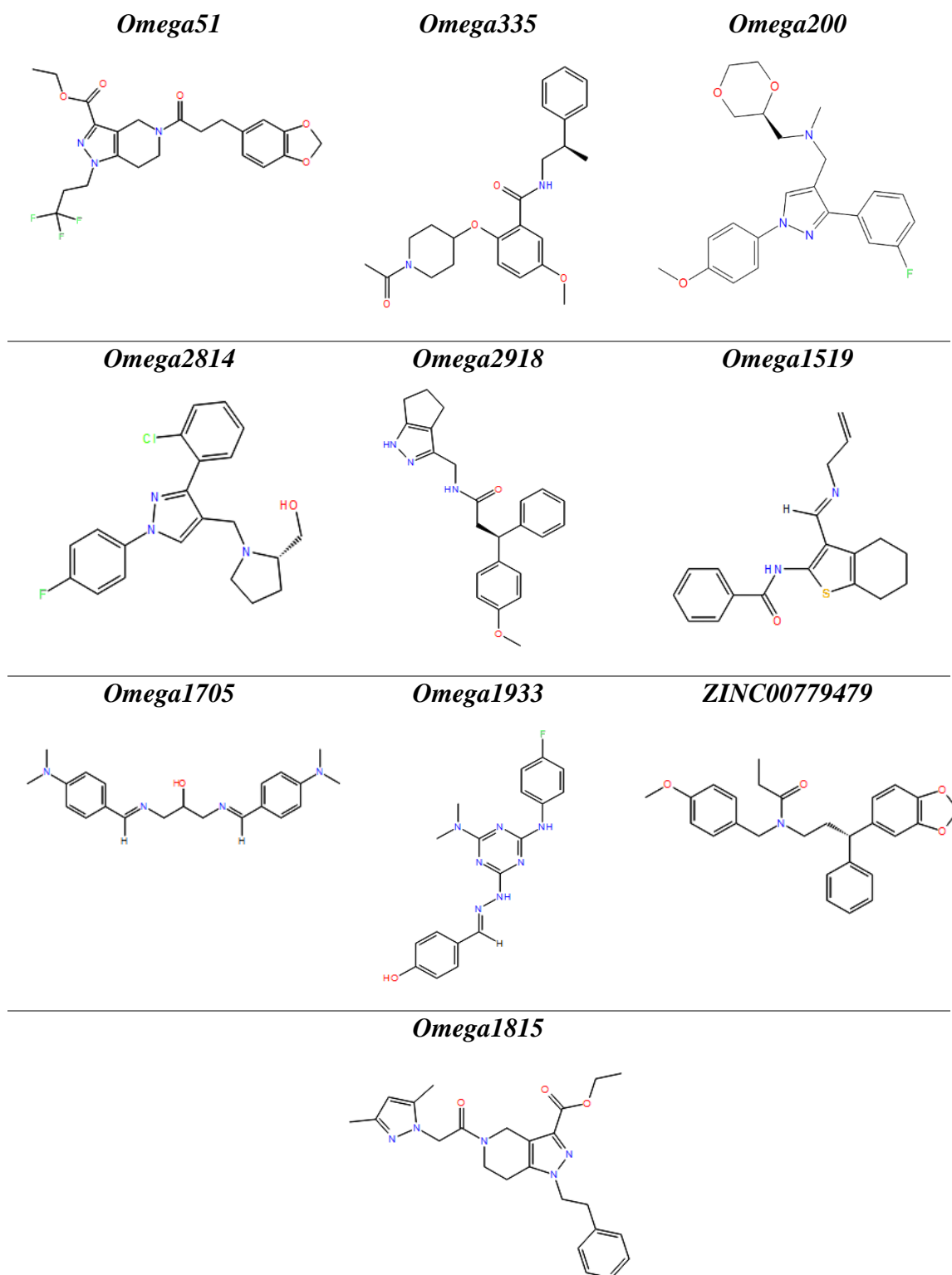


Figura 57. Representação em duas dimensões dos 10 *hits* selecionados através da **Estratégia3**.

Ao término das duas **Estratégias (2 e 3)** para seleção de compostos moduladores da tubulina, obtemos o montante de 30 compostos que seguem em processo de compra.

Futuramente estes compostos passarão por ensaios *in vitro* para assim terem suas atividades moduladoras da tubulina comprovadas e finalmente selecionarmos os compostos que irão compor o núcleo modulador da tubulina da nossa proposta final de pró-fármaco.

4.2. Tarefa 2

4.2.1. Estudo relação estrutura atividade dos compostos PDJs e FCT

Como descrito anteriormente nosso grupo de síntese propôs, sintetizou e realizou ensaios *in vitro* (através de colaboradores do nosso projeto) de 8 compostos (Figura 58) planejados para o tratamento da leishmaniose e do câncer. Em colaboração com o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) foram realizados os testes em dose-resposta contra *T. cruzi* e *Leishmania* (ambos em amastigotas intracelulares) em 2 experimentos independentes. Já os ensaios para câncer foram realizados por outros colaboradores de nosso projeto.

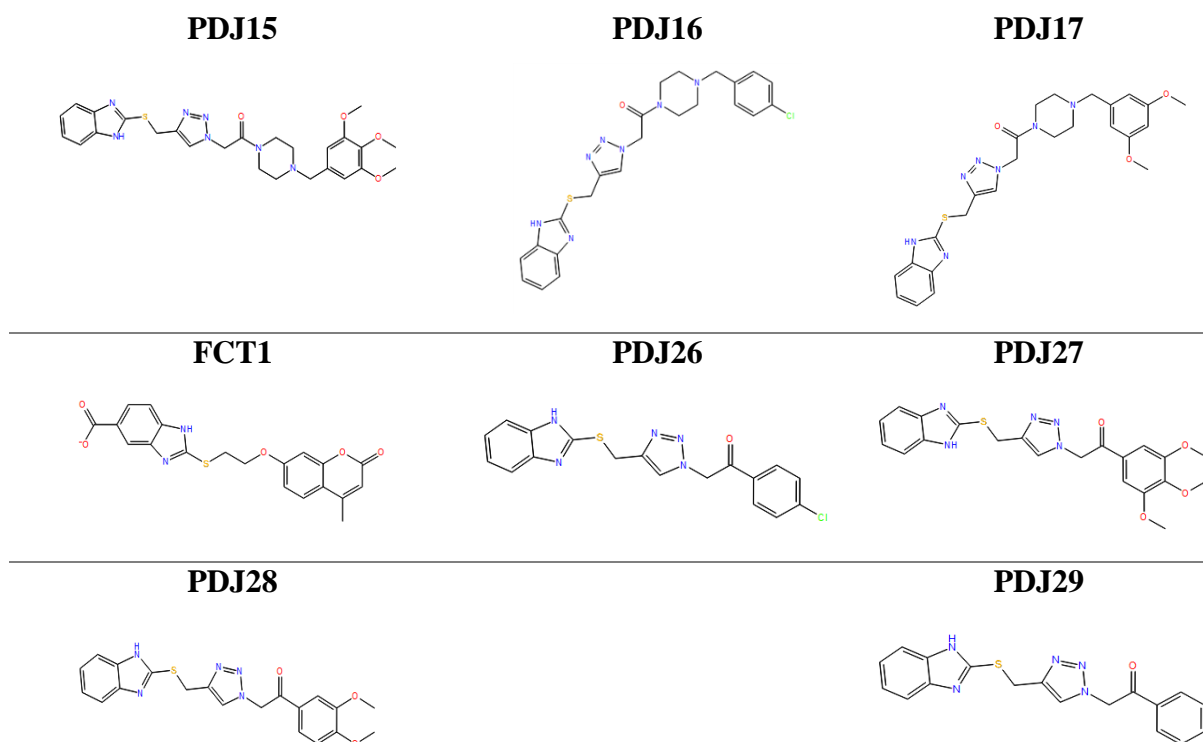


Figura 58. Representação das estruturas em duas dimensões dos compostos planejados por nossa equipe de síntese.

Os ensaios leishmanicidas foram realizados a partir de uma análise automatizada por programa. O ensaio realizado foi a partir do método descrito por Siqueira-Neto²⁰⁸ e colaboradores, 2012, modificado. Resumidamente, as linhagens celulares de macrófagos THP-1 foram semeadas em placas de 384 poços em RPMI meio completo e diferenciado com PMA durante 48 h. Em seguida, a infecção por *L. chagasi* foi realizada através da adição de uma cultura de promastigotas enriquecido-metacíclica. Após 24 horas, os compostos foram diluídos em série por um fator de dois, e adicionada às placas, a partir de 100 uM (concentração final). O veículo (0,5% DMSO) foi adicionado como controle negativo, e 10 uM anfotericina B como controle positivo, e incubou-se durante mais 48 h. As placas foram fixadas com PFA 4% e coradas com Draq 5.

A análise das placas ocorreu através da utilização da plataforma, *Opereta* perante a qual obtivemos a análise quantificada do número de células hospedeiras, a proporção de células infectadas (razão de infecção) e o número médio de parasitas por célula infectada. A atividade do composto foi medida como uma redução da razão de infecção, e normalizados para os controles. Assim, a atividade refere-se normalizados para a percentagem de redução de infecção pelo composto em comparação com os controles.

A taxa de infecção normalizada está expressa em porcentagem (%), sendo esta, o oposto da atividade e também foram obtidos os valores de média de atividade máxima (*Mean Max. Activ*) em replicatas (R1 e R2). Segundo nossos colaboradores estes parâmetros são de importante análise, visto que, para estes parasitas é desejado um composto com alta eficácia e baixo EC₅₀.

Os resultados apresentados pelos nossos colaboradores se encontram nos Anexo 3 e Anexo 4 e os mesmos nos indicaram que de maneira geral todos os compostos se mostraram pouco ativos e seletivos, com exceção do composto **PDJ26** que apresentou atividade moderada.

Em relação aos estudos biológicos realizados pelos nossos colaboradores, os mesmos compostos foram analisados perante a atividade antineoplásica em linhagens de células GBM C6 (glioblastoma multiforme) pelo método de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), descrito por Mosmann em 1983²⁰⁹. Tal método consiste em um ensaio colorimétrico baseado na viabilidade celular através da redução do sal tetrazolium MTT à formazan. O resultado da redução é uma mudança de cor do sal amarelo tetrazolium para cristais de formazan azuis/púrpura por

células com mitocôndrias metabolicamente ativas. Este ensaio tem o objetivo de testar a atividade biológica de um composto avaliando a sua capacidade de inibir o crescimento de células tumorais.

A linhagem de GBM C6 foi cultivada em placa Elisa de 96 poços e mantidas em meio DMEM (pH 7,4) contendo antibióticos penicilina/streptomicina 0,5 U/ml, e suplementadas com 5% de soro fetal bovino, e mantidas 24 horas em incubadora a 37°C, com 95% de umidade relativa e 5% de CO₂. Após a confluência das células, as células foram tratadas com as concentrações 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 e 10 µM dos compostos 15, 16, 17, FCT1, 26, 27, 28 e 29 e, depois de 24 horas, foi lavada com tampão fosfato (PBS), foi-se adicionado 90 µL de meio de cultivo e 10 µL do reagente de MTT (5 mg/ml) e, esperado 2 horas do período de incubação. A absorbância, que é diretamente proporcional à viabilidade celular, foi medida em espectrofotômetro a 570-630 nm.

Como resultado, nossos colaboradores evidenciaram a que todos os compostos em análise foram capazes em análise foram capazes de inibir o crescimento celular, indicando os compostos **PDJ26**, **PDJ27** e **PDJ29** como os mais promissores. Os gráficos obtidos como resultados de nossos colaboradores nossos colaboradores podem ser observados no

Anexo 5.

Perante aos resultados dos ensaios biológicos, divulgados por nossos colaboradores referentes as atividades leishmanicida e antineoplásica, dos compostos sintetizados por nossa equipe de síntese desenvolvemos a **Tarefa 2** de nosso trabalho. Tal tarefa, baseia-se no entendimento dos modos de interação destes compostos com o alvo macromolecular, para o qual o mesmo foi planejado (tubulina), para assim, tentarmos racionalizar os resultados obtidos. Sendo assim, foram feitas, e posteriormente analisadas, simulações de *docking* com os compostos **PDJ15**, **PDJ16**, **PDJ17**, **FCT1**, **PDJ26**, **PDJ27**, **PDJ28** e **PDJ29**, frente à estrutura da tubulina PDB ID:4O2A.

Os resultados das simulações de *docking* nos possibilitou fazer a correlação destes com os resultados experimentais. Como relatado anteriormente, todos os compostos em análise tiveram valores expressivos de atividade antineoplásica e ao analisar os resultados de pontuação de *docking* relatados na Tabela 16 junto aos valores de IC₅₀, observamos que os valores obtidos entre os compostos são próximos, tanto para as simulações com o **Glide** quanto para o **GOLD**, indicando que os compostos possuem uma capacidade de interação similar com a tubulina, reproduzindo dessa forma os resultados obtidos

experimentalmente. Vale ressaltar novamente, que os programas de docking não apresentam dificuldades em gerar poses confiáveis, porém a pontuação é teórica e tenta reproduzir a realidade²¹⁰.

Tabela 16. Resultados de pontuação obtidos através das simulações de docking pelos programas **Glide** (*XP GlideScore*) e **GOLD** (*GOLD ChemPLP*) e IC₅₀.

Composto	XP GlideScore	GOLD ChemPLP	IC ₅₀ (μ M)
BAL27862	-13.619	105.198	1.4*(²⁰⁵)
Colchicina	-8.628	80.120	1.4*(²⁰⁵)
PDJ29	-7.965	79.521	12.05
PDJ26	-7.878	79.618	16.91
PDJ27	-6.954	62.751	18.21
PDJ16	-8.689	89.231	18.43
PDJ28	-5.709	73.504	27.00
PDJ17	-7.690	90.024	27.14
PDJ15	-7.999	77.451	38.12
FCT1	-8.115	73.100	38.83

*Valores de inibição enzimática.

Além da análise dos valores da função de pontuação, fizemos a avaliação dos modos de interação dos compostos com menores valores de IC₅₀, a qual demos maior importância em nosso estudo. Fizemos a sobreposição dos resultados com as poses dos ligantes cristalográficos das estruturas PDB ID: 4O2A (**BAL27862**). Dessa forma, foi possível observar que os compostos em análise foram posicionados semelhantemente aos ligantes cristalográficos, principalmente o anel benzoimidazol, presente tanto nos compostos em análise quanto no **BAL27862**, porém notamos interações com resíduos de aminoácidos distintos.

Podemos observar na Figura 59 a sobreposição do resultado de *docking*, do composto **PDJ26** em amarelo obtido na simulação feita pelo **Glide** (esquerda) e **GOLD** (direita) com o ligante cristalográfico **BAL27862** da estrutura PDB ID:4O2A, representado em ciano. Nesta sobreposição observamos o posicionamento do anel benzoimidazol, de ambos ligantes, na mesma região, além do anel triazol proximamente a uma região que se encontra uma amina presente nas estruturas do **BAL27862**. O posicionamento adotado pelo **Glide** demonstra a possibilidade de ocorrência de duas ligações de hidrogênio entre a carbonila presente no **PDJ26** e os resíduos Lys254 da

cadeia β -tubulina e o resíduo Ans101 da cadeia α -tubulina. Estas duas interações não estão presentes no resultado obtido pelo programa **GOLD**, porém tal simulação nos atentou para a possibilidade deste composto fazer quatro importantes interações. Uma melhor acomodação do anel cloro-benzeno possibilita ao mesmo a formação de uma interação halogênica com o resíduo Tyr224 e duas transferências de carga entre o sistema aromático cloro benzeno e as lisinas Lys254 e Lys352, sendo esta última também observada na interação do ligante **BAL27862**. Por fim, um pequeno deslocamento do anel benzoimidazol o aproximou da Val315, possibilitando a ocorrência de mais uma ligação de hidrogênio.

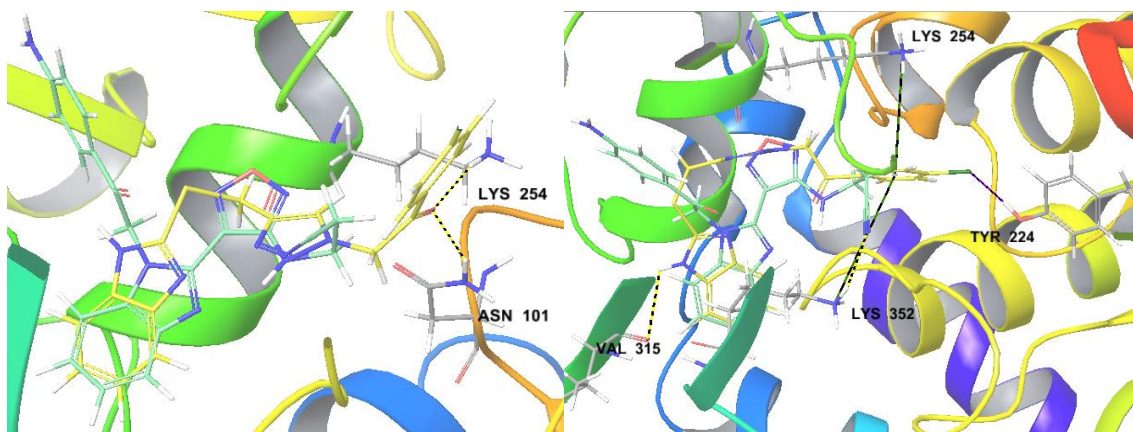


Figura 59. Visualização da sobreposição do ligante cristalográfico **Bal27862** (ciano) do resultado da pose de docking gerada para o composto **PDJ26** (amarelo) obtidas nas simulações dos programas **Glide** e **GOLD**, respectivamente.

Nos resultados obtidos para o composto **PDJ27**, representados na Figura 60, observamos novamente que os dois programas posicionaram o anel benzoimidazol do composto na mesma região que se encontra o anel benzoimidazol do ligante cristalográfico **Bal27862**. O **Glide** posicionou este anel exatamente na mesma posição que observamos na pose cristalográfica, porém como visto anteriormente, um pequeno deslocamento do anel sugerido pelo **GOLD** posiciona o ligante mais proximamente a cadeia lateral da Val315 possibilitando a ocorrência de uma ligação de hidrogênio entre os dois.

Notamos a importância de um sistema apolar como o anel trimetoxifenil e a carbonila, ambos presentes no composto **PDJ27**, na região de interface $\alpha\beta$ -tubulina devido a quantidade de resíduos polares na região. O posicionamento do anel e da

carbonila, do referido composto, sugeridos pelo **Glide** possibilita o mesmo fazer quatro interações de hidrogênio na região. As duas interações de hidrogênio que ocorrem por meio das metoxilas envolvem o oxigênio etóxico do composto e o hidrogênio do grupamento amidico presentes dos resíduos Ans249 e Gln11 e as duas interações de hidrogênio que envolvem a carbonila do composto ocorrem entre o átomo de oxigênio (do composto) e o hidrogênio amidico do resíduo Ans101 e o hidrogênio da amina presente no resíduo Lys254. O posicionamento do **GOLD** foi menos favorável à ocorrência de ligações na região, indicando somente duas ligações de hidrogênio. Uma entre o oxigênio de uma das metoxilas presentes no anel trimetoxibenzeno e o hidrogenoi amidico presente no resíduo Ans101 e outra entre o hidrogênio do anel pirimidina e a carbonila da cadeia principal do resíduo Val315.

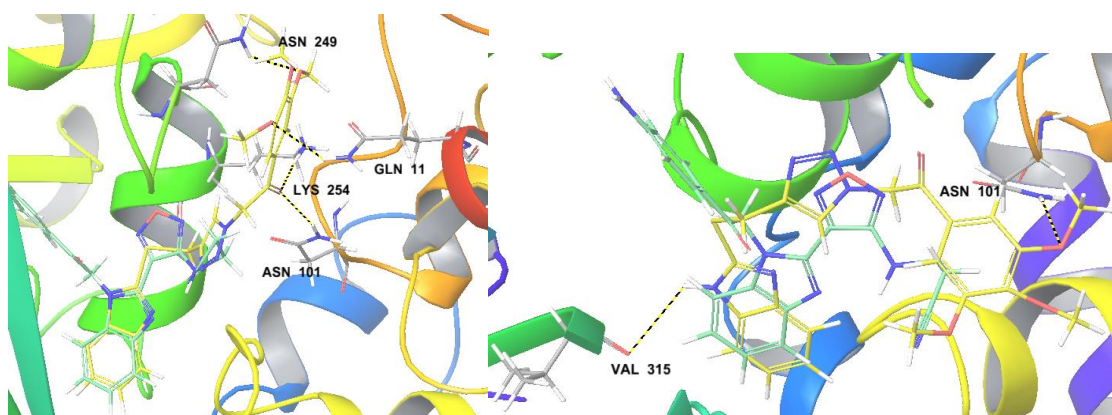


Figura 60. Visualização da sobreposição do ligante cristalográfico **Bal27862** (ciano) do resultado da pose de docking gerada para o composto **PDJ27** (amarelo) obtidas nas simulações dos programas **Glide** e **GOLD**, respectivamente.

Por fim, a última avaliação feita para as propostas dos modos de interação dos três compostos mais promissores de nossa equipe de síntese foi para o composto **PDJ29**, observado na Figura 61. Mais uma vez observamos a coerência dos programas em posicionar os compostos, quando observamos a sobreposição destes resultados com o ligante cristalográfico **Bal27862**. Podemos observar o posicionamento dos anéis benzoimidazóis do **PDJ29** e **Bal27862** na mesma região, e notamos no resultado do **Glide** o posicionamento ainda mais próximo. Além dos anéis podemos notar que os programas também direcionaram o composto pela mesma região ocupada pelo **Bal27862** posicionando o anel triazol do **PDJ29** na mesma região que observamos uma amina no ligante cristalográfico.

A principal diferença entre os resultados obtidos pelo **Glide** e **GOLD** foi a localização da carbonila presente no **PDJ29**. O **Glide** posicionou a mesma em direção aos resíduos polares Lys254 e Asn101 possibilitando a interação destes através de ligações de hidrogênio, já o **GOLD** posicionou tal carbonila similar ao direcionamento da amina primária do ligante cristalográfico possibilitando uma ligação de hidrogênio entre os mesmos e o nitrogênio da amina presente no resíduo Lys352. Além desta interação o posicionamento sugerido pelo **GOLD** possibilita uma adicional transferência de carga entre o anel aromático do **PDJ29** e a amina do resíduo Lys254.

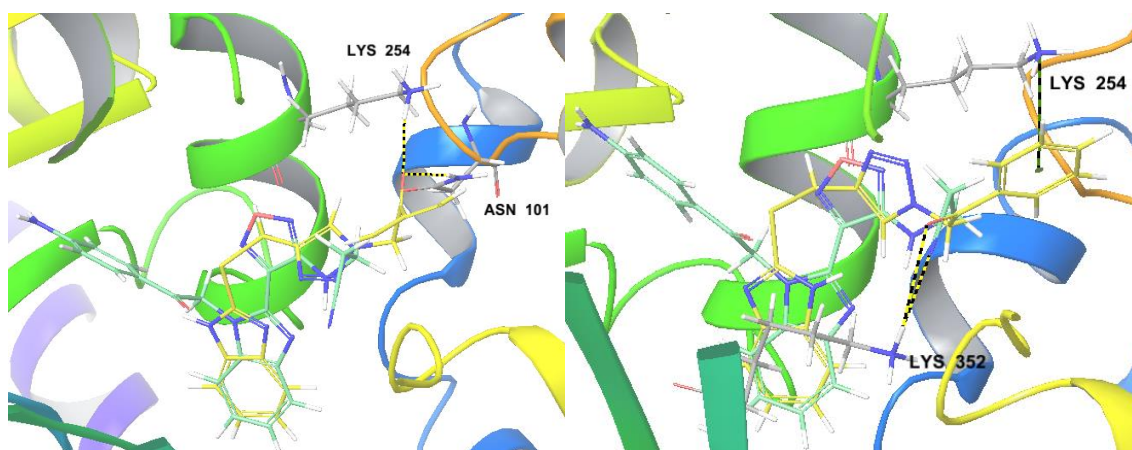


Figura 61. Visualização da sobreposição do ligante cristalográfico *Bal27862* (ciano) do resultado da pose de docking gerada para o composto **PDJ29** (amarelo) obtidas nas simulações dos programas **Glide** e **GOLD**, respectivamente.

Após a análise das propostas dos modos de interação, foi possível observar como os compostos estavam interagindo com os resíduos presentes no sítio de interação da colchicina. Observamos uma coerência nos posicionamentos dos resultados que os dois programas utilizados adotaram, além de notar a forte influência da região da interface $\alpha\beta$ -tubulina com grande quantidade de resíduos polares, influenciando nas interações com uma das terminações dos compostos de nossa equipe de síntese. Tal informação será relevante para as próximas propostas de novas bibliotecas ou de substituições nos compostos em estudo.

A carbonila e o anel triazol de nossos compostos contribuíram em algumas simulações de menor pontuação que não foram demonstradas em figuras, porém destacamos a importância dos mesmos nestas propostas por estarem posicionados em um ambiente que contém resíduos de asparagina, lisina e glutamina. Por fim, notamos também que o anel benzoimidazol dos nossos compostos, em algumas simulações, foi

passível de interações, porém as hipóteses geradas nas simulações o posicionou na mesma região que o mesmo anel do composto **BAL 27862**, uma região que não proporciona muitas possibilidades de interação.

Sendo assim, como as propostas de poses obtidas pelas simulações de *docking* geraram resultados condizentes, as mesmas serviram de ponto de partida para mais uma seleção de inibidores com potenciais propriedades moduladoras da tubulina (**Estratégia4**).

4.2.2. *Triagem virtual de moduladores da tubulina a partir de dados experimentais* (**Estratégia4**)

Para o desenvolvimento da **Estratégia4**, selecionados, a pose com maior valor de pontuação, obtida nos estudos prévios de *docking*, dos três compostos com melhor resultado de IC₅₀ em ensaios biológicos (**PDJ26**, **PDJ27** e **PDJ29**) como referência para mais uma sequência de triagem virtual, a qual pode ser observada na Figura 62.

As mesmas bases de dados, outrora utilizadas, serviram novamente como ponto de partida para nossos estudos de triagem virtual. Os compostos **PDJ26**, **PDJ27** e **PDJ29**, com sua conformação determinada nos estudos de *docking*, serviram de referência para os estudos de similaridade por forma (efetuado através do programa **ROCS**), o qual foram selecionados os 5000 melhores compostos analisados através do índice Tanimoto. Os resultados do **ROCS** serviram de entrada para a triagem feita através da similaridade por superfície eletrostática (efetuada através do programa **EON**), pela qual foram selecionados os 2000 melhores compostos analisados através do índice Tanimoto. Estes compostos selecionados passaram por mais duas triagens, as quais analisaram as propriedades farmacocinéticas (**QikProp**) e toxicológicas (**DEREK**) dos compostos sobreviventes. Após efetuadas estas triagens a relação de compostos sobreviventes por base de dado pode ser observado na Tabela 17.

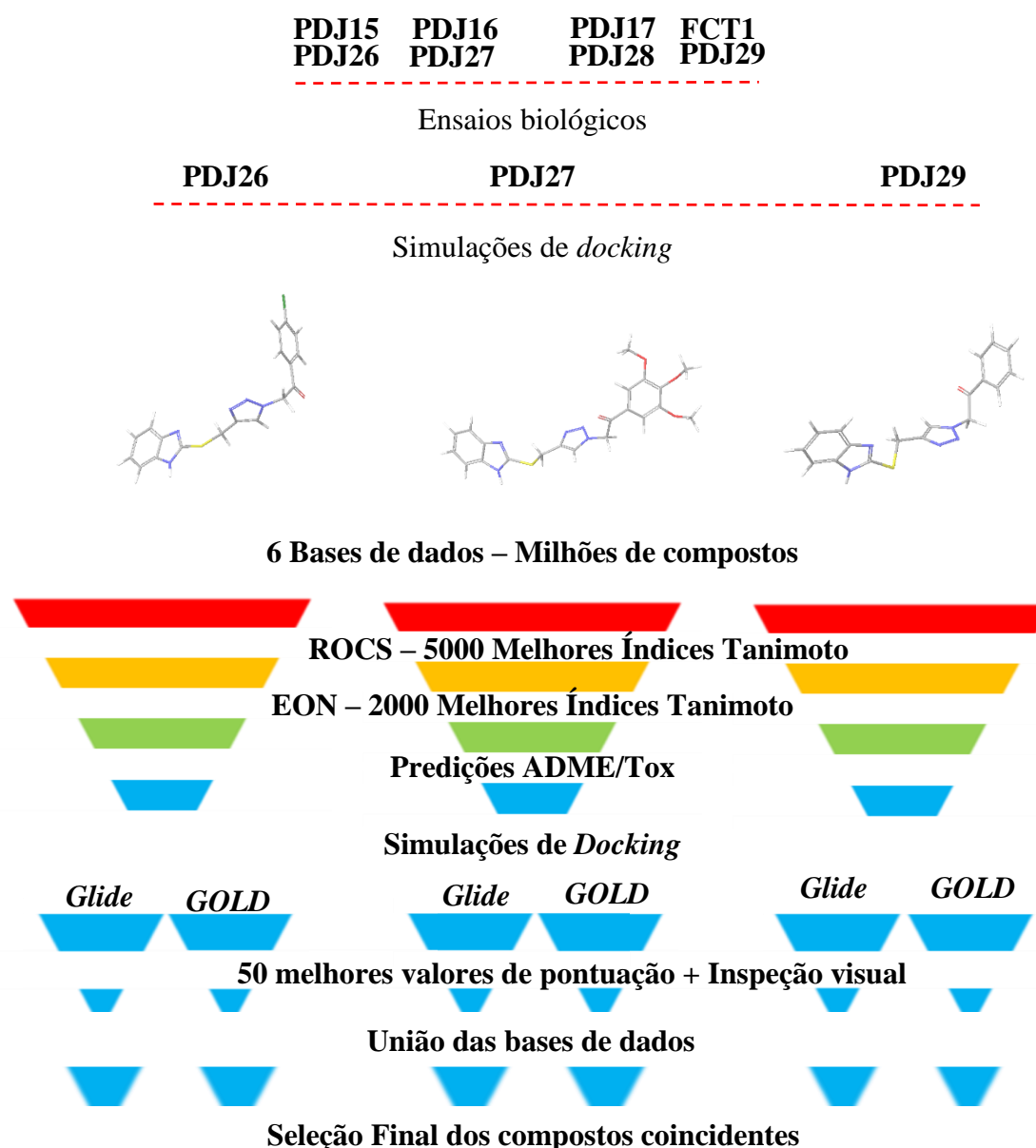


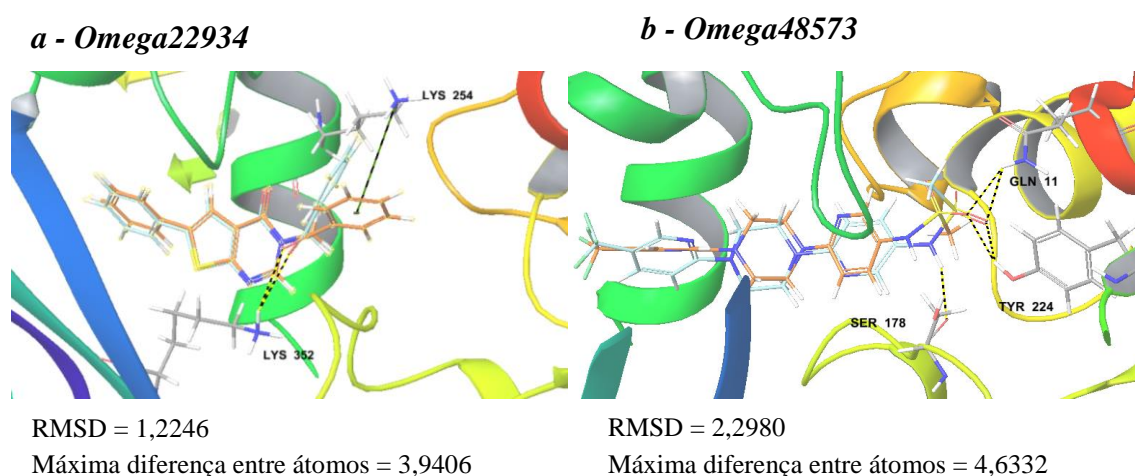
Figura 62. Esquema representativo da sequência de triagem virtual nomeada como Estratégia4

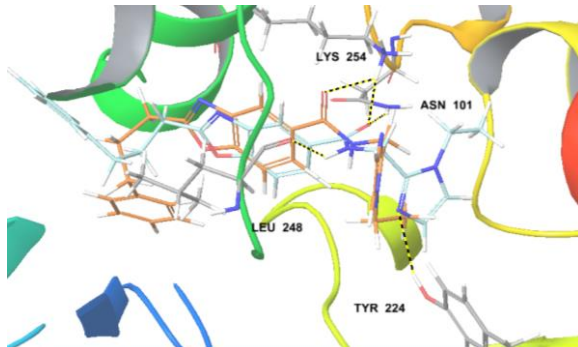
Tabela 17. Relação dos compostos sobreviventes em cada base de dado em estudo após os estudos de LBVS (Estratégia4)

Base/ Referência	PDJ26	PDJ27	PDJ29
<i>Drug Data ZINC</i>	98 compostos	121 compostos	96 compostos
<i>ChemBridge Diverset CL</i>	667 compostos	643 compostos	710 compostos
<i>ChemBridge Diverset EXP</i>	690 compostos	697 compostos	716 compostos
<i>FDA BindingDB</i>	67 compostos	63 compostos	67 compostos
<i>MayBridge</i>	339 compostos	283 compostos	335 compostos

Os compostos sobreviventes de cada base de dado tiveram seus modos de interações propostos através de simulações de *docking* com os programas **Glide** e **GOLD**. Foram selecionados em cada uma das simulações os 50 melhores compostos para cada base de dado, avaliados através dos valores de pontuação. Os resultados obtidos pelos dois programas foram comparados e os compostos coincidentes tiveram seus modos de interação avaliados através de uma inspeção visual, dessa forma, selecionamos para cada um dos ligantes utilizados como referência (**PDJ26**, **PDJ27** e **PDJ29**) dez compostos, somando ao cabo, um montante de 30 compostos que serão comprados e submetidos a ensaios *in vitro* para a comprovação da atividade moduladora da tubulina.

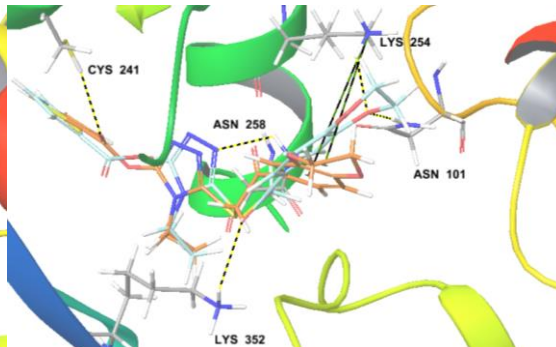
Os modos de interação dos compostos selecionados nos três estudos triagem virtual realizados na **Estratégia 4** podem ser observados nas Figura 64 e Figura 65. Nestas figuras podemos observar os resíduos de aminoácidos que as simulações sugerem como possíveis pontos de interações dos compostos com a interface $\alpha\beta$ -tubulina. Também podemos observar a coerência entre os resultados obtidos nas simulações executadas pelos programas **Glide** e **GOLD**, as quais posicionaram as estruturas basicamente na mesma região, alterando em alguns casos as extremidades dos compostos, que de certa forma é uma informação muito valiosa, pois a partir delas foi possível observar que pequenas modificações conformacionais podem abranger na mesma região diferentes resíduos. Os mesmos compostos selecionados podem ser observados em duas dimensões nas Figura 66, Figura 67 e Figura 68.



c - Omega38369

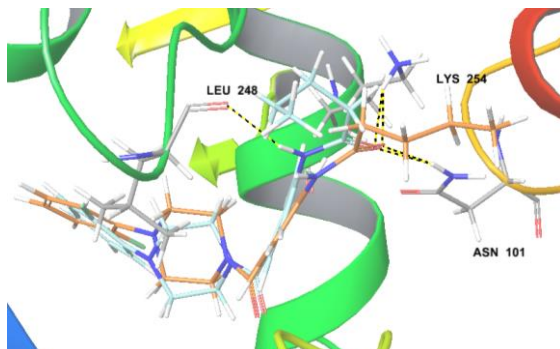
RMSD = 4,4356

Máxima diferença entre átomos = 11,1787

d - Omega20058

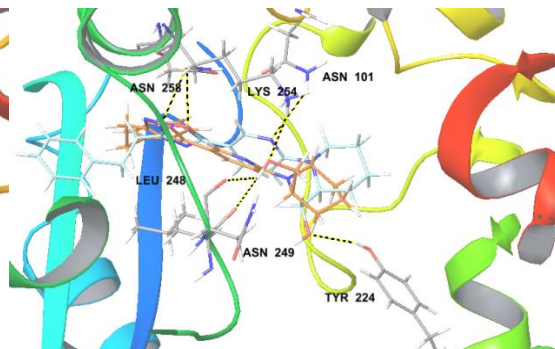
RMSD = 2,5662

Máxima diferença entre átomos = 6,1525

e - Omega14687

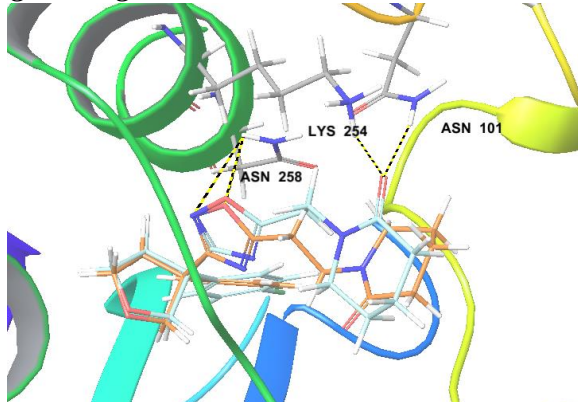
RMSD = 2,9048

Máxima diferença entre átomos = 7,1381

f - Omega5105

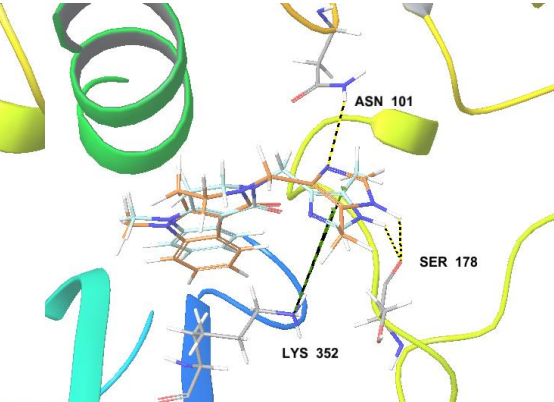
RMSD = 4,1505

Máxima diferença entre átomos = 11,6257

g - Omega1514

RMSD = 1,9532

Máxima diferença entre átomos = 4,6316

h - ZINC13537284

RMSD = 1,1269

Máxima diferença entre átomos = 1,8353

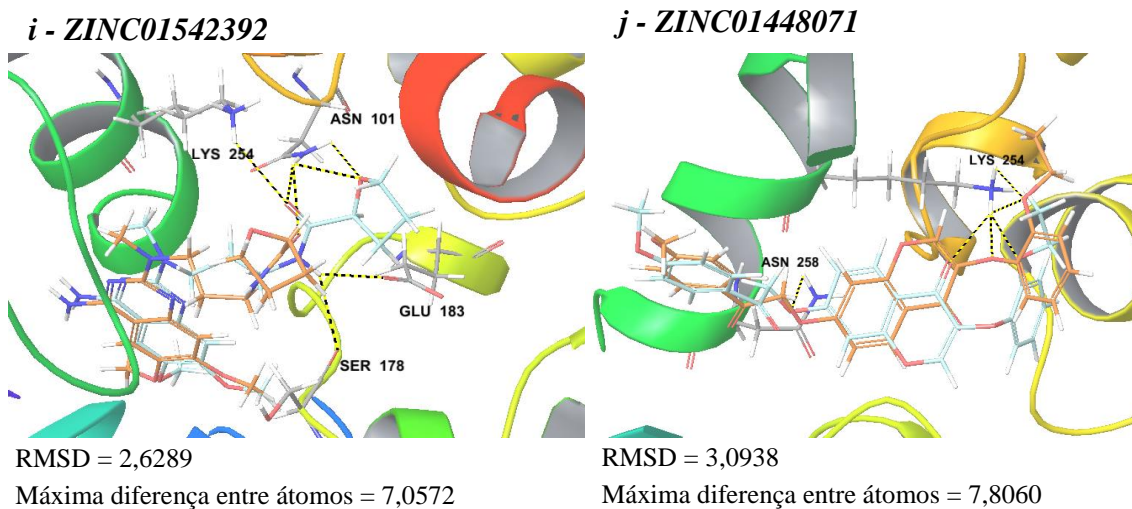
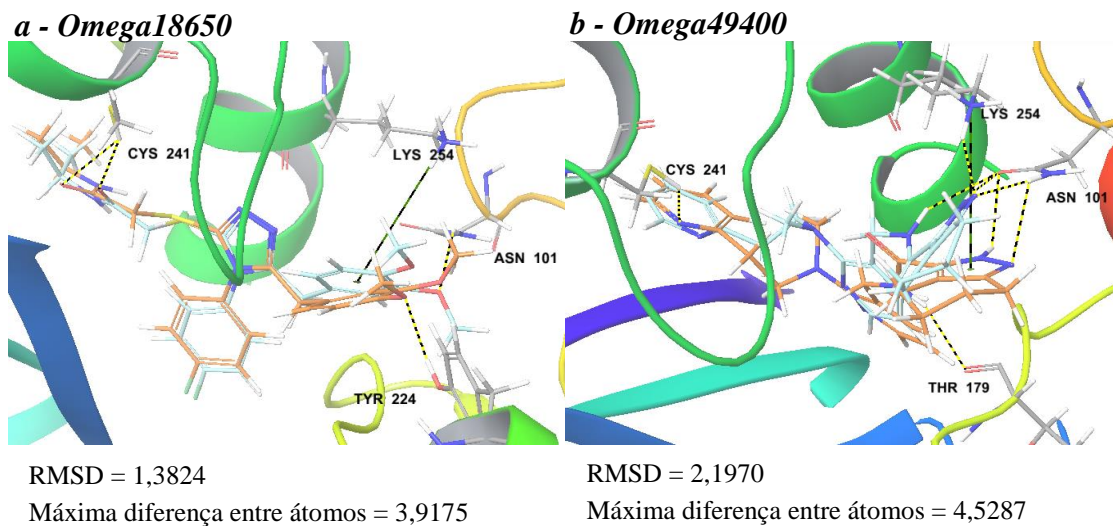
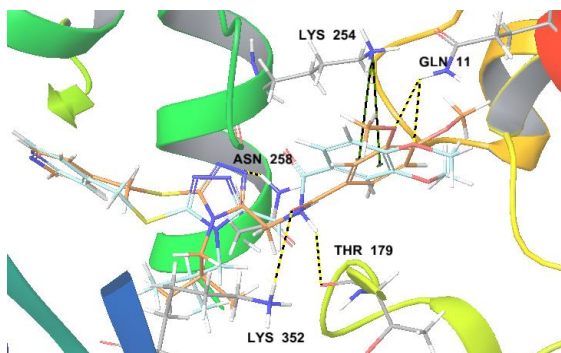


Figura 63. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ26** na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de docking com o **GOLD** e em azul com o **Glide**.



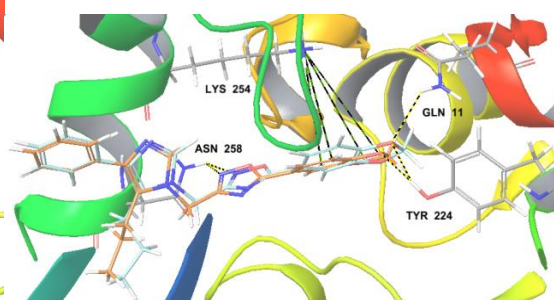
c - Omega43056

d - Omega24781



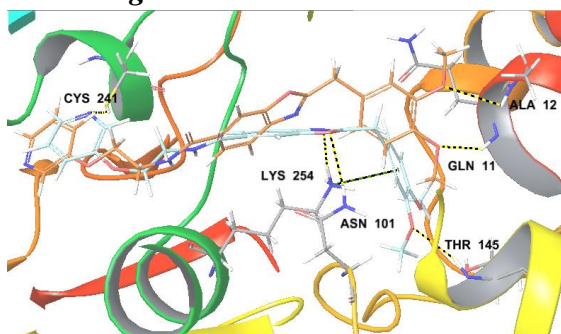
RMSD = 2,7663

Máxima diferença entre átomos = 6,9403

e - Omega22396

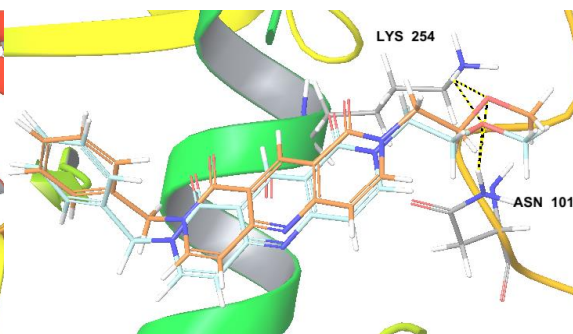
RMSD = 0,8549

Máxima diferença entre átomos = 2,4273

f - Omega49031

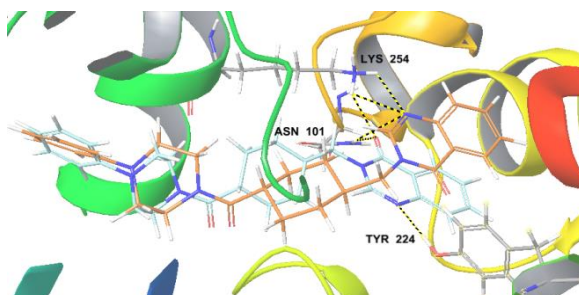
RMSD = 3,9542

Máxima diferença entre átomos = 10,2579

g - Omega44171

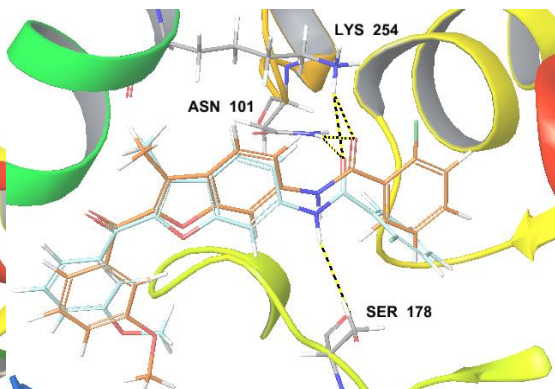
RMSD = 0,7250

Máxima diferença entre átomos = 1,3296

h - ZINC15729363

RMSD = 2,7590

Máxima diferença entre átomos = 7,9565

i - BindingDB50131429

RMSD = 1,6469

Máxima diferença entre átomos = 4,8237

j - BindingDB50331515

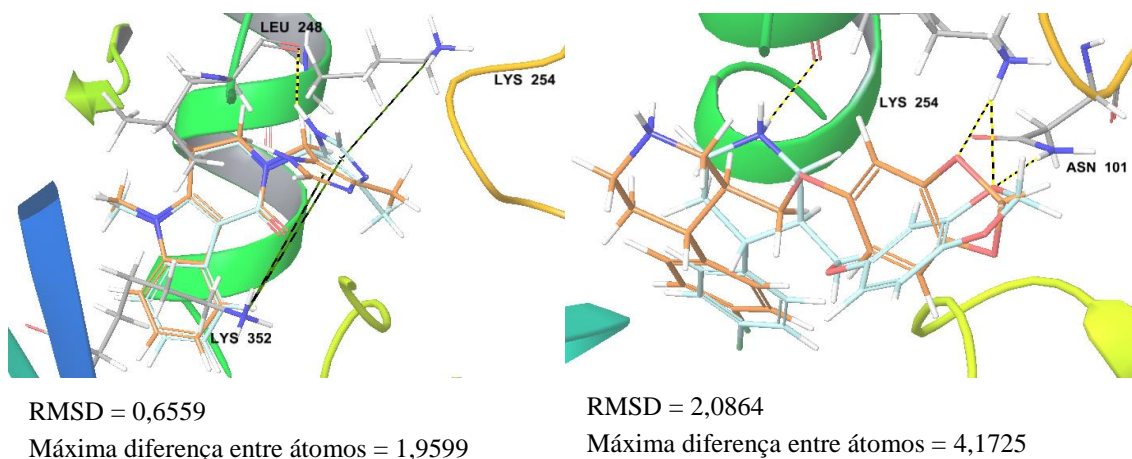
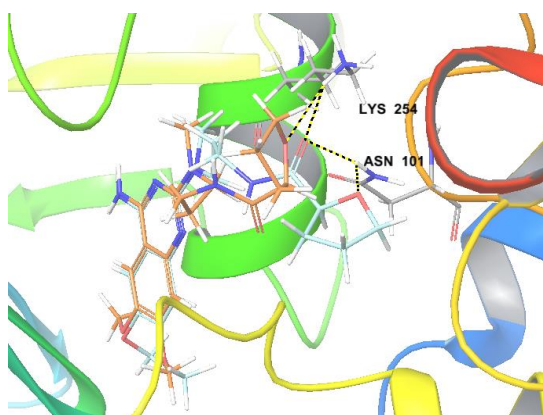


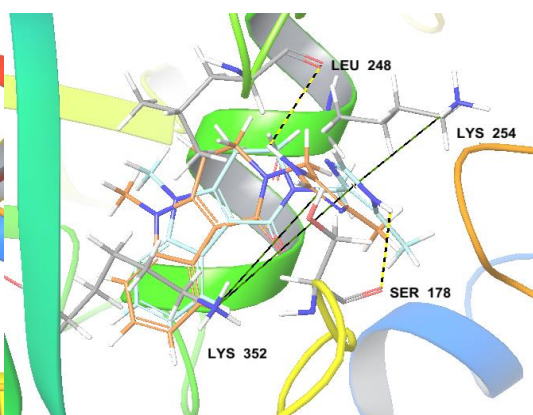
Figura 64. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ27** na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A. Em vermelho os resultados obtidos com as simulações de docking com o **GOLD** e em azul com o **Glide**.

a - ZINC01542392



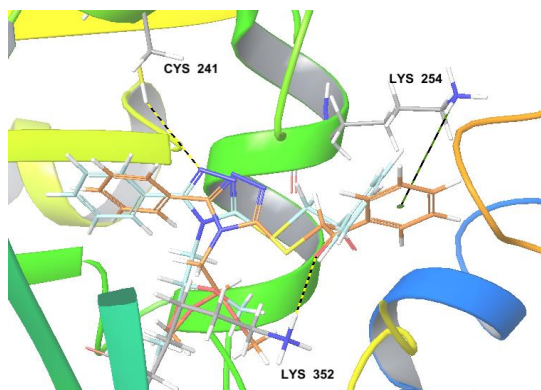
RMSD = 2,3186
Máxima diferença entre átomos = 6,7328

b - ZINC13537284



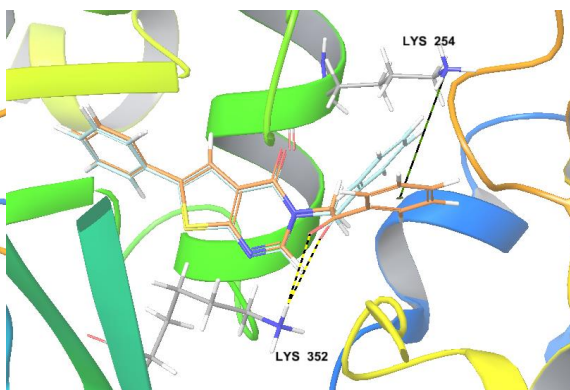
RMSD = 1,4084
Máxima diferença entre átomos = 4,6020

c - Omega52261

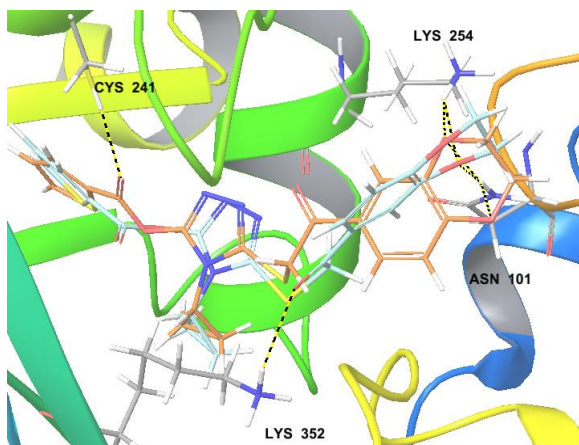


RMSD = 1,7975
Máxima diferença entre átomos = 3,5296

d - Omega22934

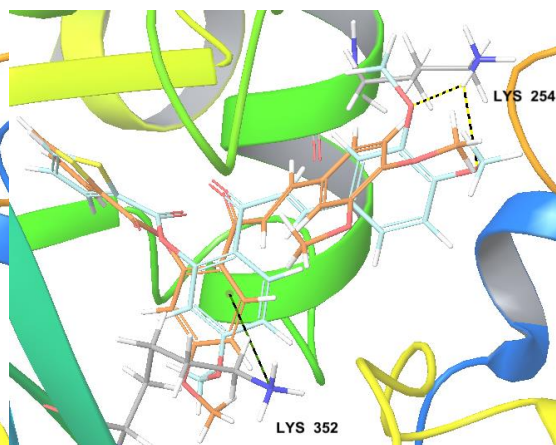


RMSD = 0,9637
Máxima diferença entre átomos = 2,9206

e - Omega20058

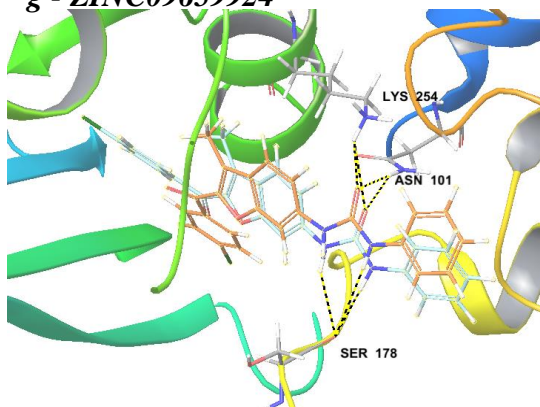
RMSD = 1,7594

Máxima diferença entre átomos = 4,7218

f - ZINC11867672

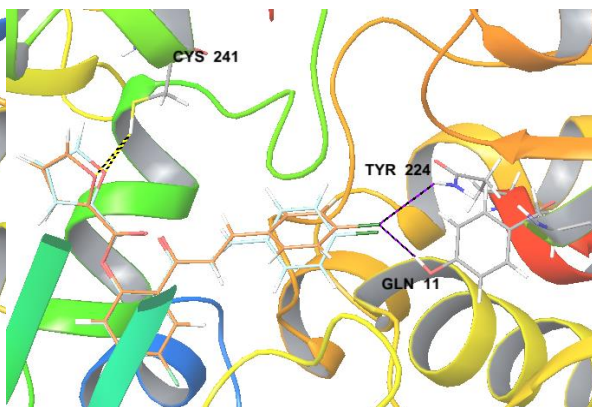
RMSD = 2,5092

Máxima diferença entre átomos = 6,8135

g - ZINC09659924

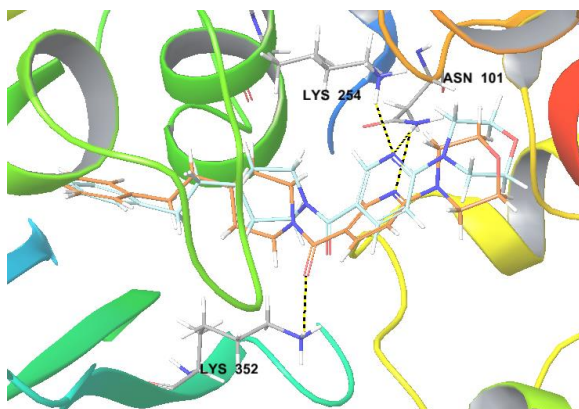
RMSD = 2,9770

Máxima diferença entre átomos = 9,7349

h - ZINC04184804

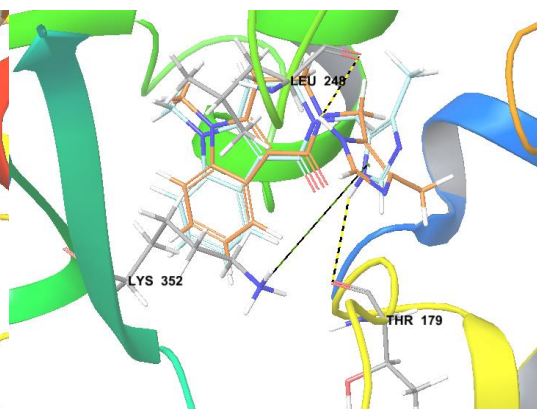
RMSD = 0,8430

Máxima diferença entre átomos = 2,3422

i - Omega38682

RMSD = 1,1056

Máxima diferença entre átomos = 2,2680

j - BindingDB50131429

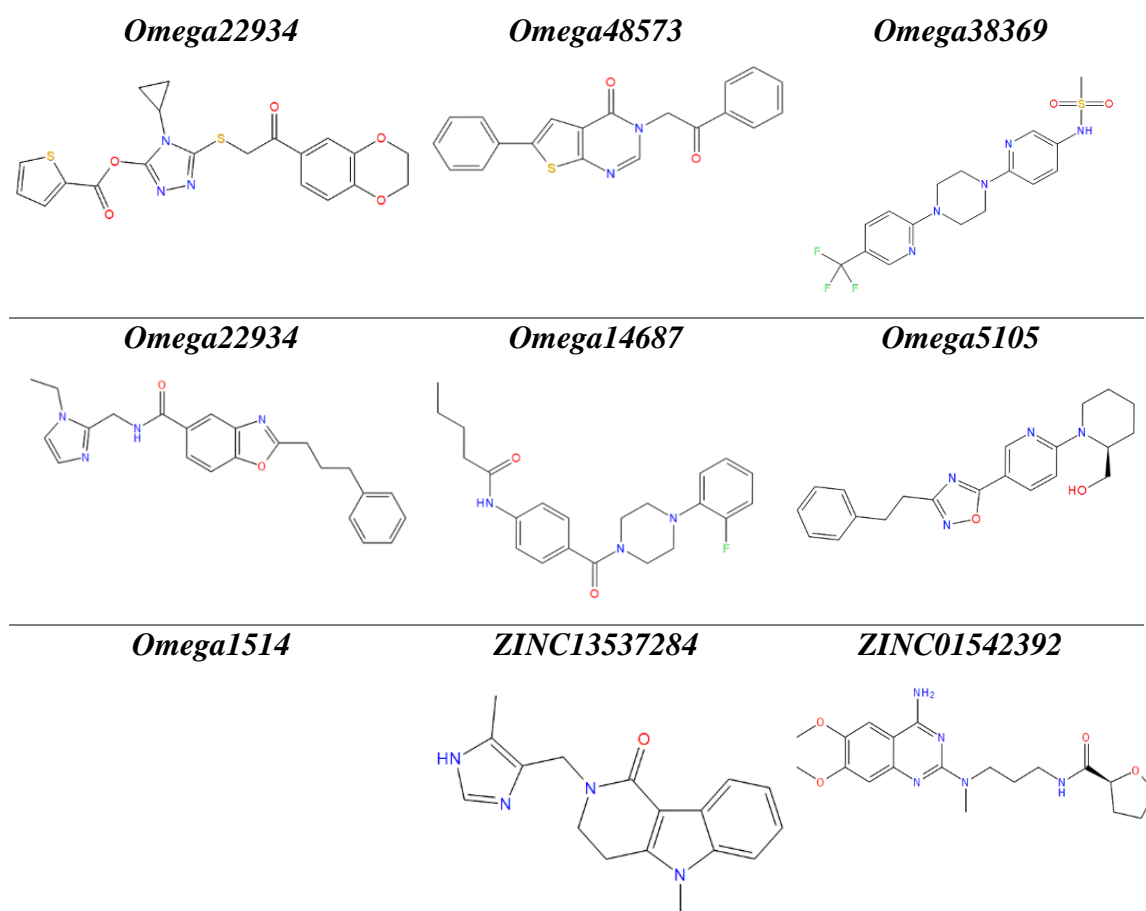
RMSD = 1,7445

Máxima diferença entre átomos = 5,5276

Figura 65. Representação dos modos de interação dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ29** na interface $\alpha\beta$ -tubulina com a estrutura PDB ID:4O2A. Em vermelho os resultados obtidos com simulações de docking com o **GOLD** e em azul com o **Glide**.

A análise da sobreposição dos resultados obtidos na **Estratégia4** nos permite visualizar que os dois programas coincidiram na maioria dos casos o posicionamento dos ligantes. Em alguns casos podemos observar um RMSD abaixo de 1 na sobreposição dos compostos, o que significa que simulações com distintos programas geraram praticamente o mesmo resultado.

Em outros casos, por se tratar de ligantes mais extensos e com maior liberdade conformacional os dois programas variaram em seus resultados. Observamos nestes resultados um RMSD mais elevado, porém os ligantes foram docados na mesma região, e os grupos funcionais, responsáveis pelas interações, estão na maioria das vezes muito próximos. Estes dados serão de grande utilidade após os ensaios *in vitro* destes compostos, podendo ser utilizados em futuras propostas de otimização.



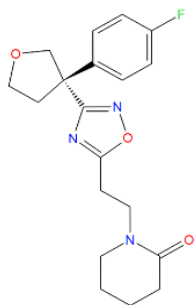
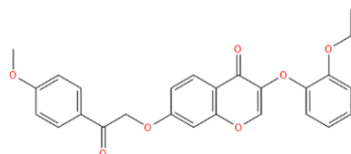
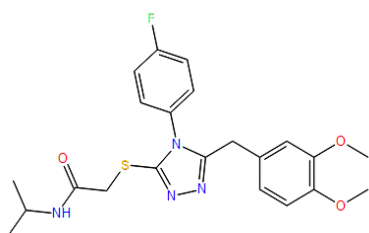
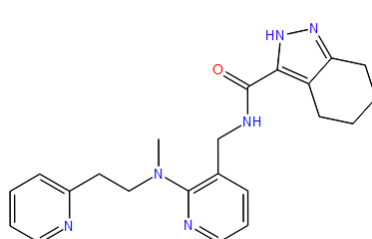
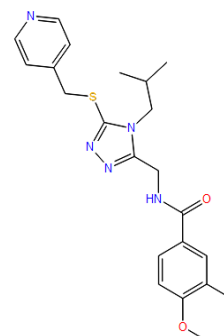
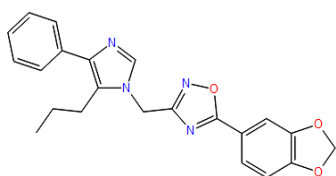
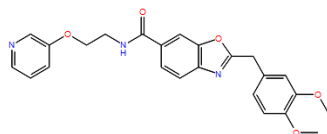
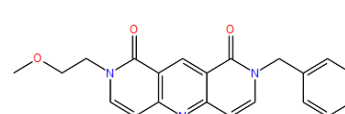
**ZINC01448071**

Figura 66. Representação em 2D dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ26**

Omega18650**Omega49400****Omega43056****Omega24781****Omega22396****Omega49031**

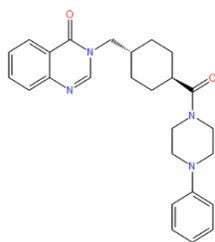
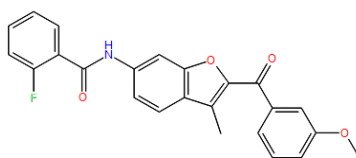
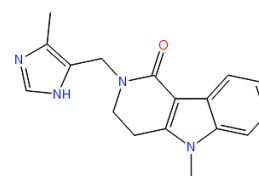
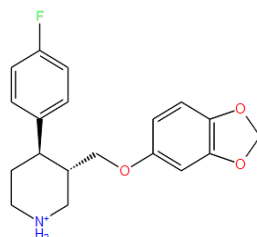
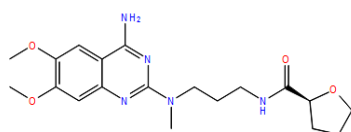
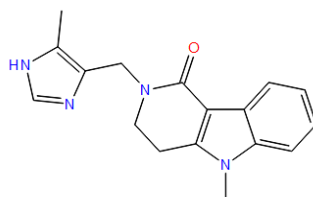
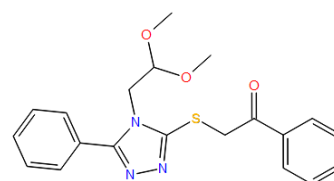
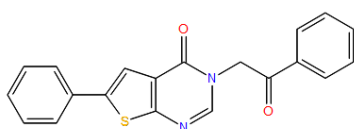
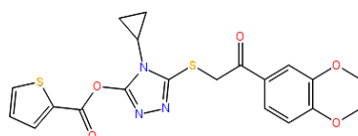
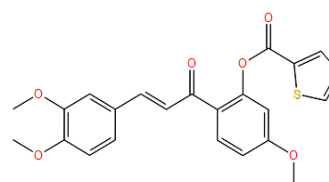
Omega44171**ZINC15729363****BindingDB50131429****BindingDB50331515**

Figura 67. Representação em 2D dos compostos selecionados na **Estratégia4** utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ27**

ZINC01542392**ZINC13537284****Omega52261****Omega22934****Omega20058****ZINC11867672**

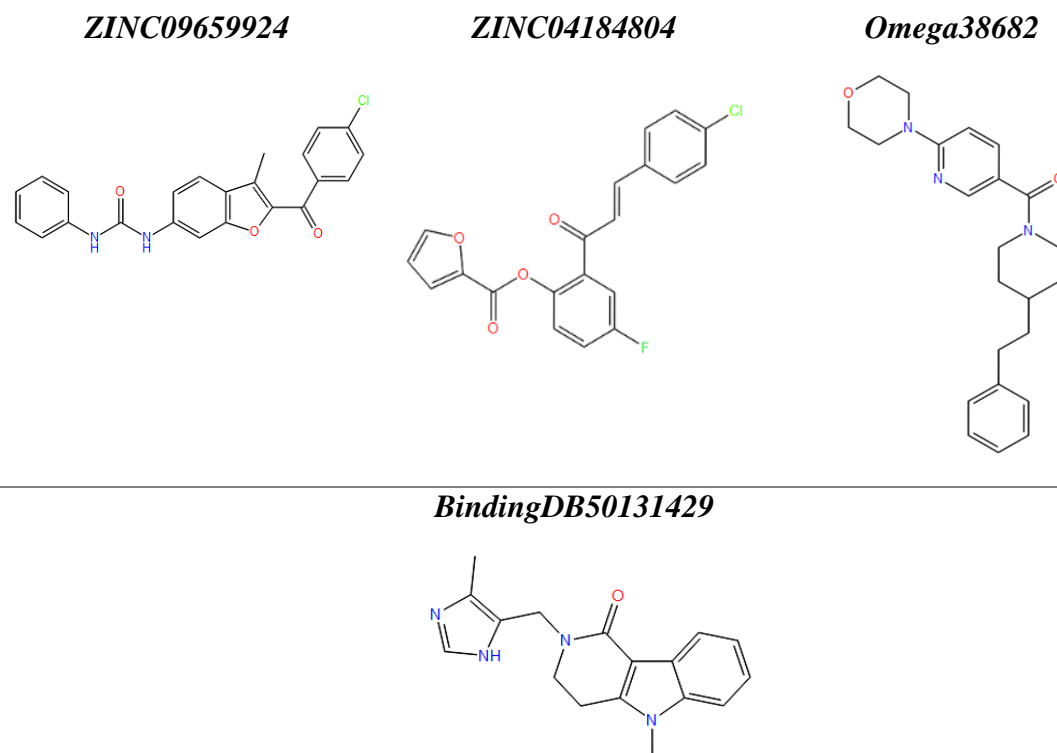


Figura 68. Representação em 2D dos compostos selecionados na Estratégia4 utilizando como referência nos estudos de similaridade o composto **PDJ29**

Por fim, as três estratégias desenvolvidas para triagem de compostos promissores a modulação da tubulina nos possibilitou a seleção de 60 compostos. Ao final, ao analisarmos os compostos em conjunto, observamos que os resultados para compostos **BindingDB 50131429** foram coincidentes com os obtidos a partir da **Estratégia4** para os estudos que utilizamos como referência os compostos **PDJ27** e **PDJ29**. Também foram observados mais três resultados coincidentes entre as simulações ocorridas: do composto **ZINC01542392**, **Omega20058** e **Omega22934** nas triagens executadas com os ligantes **PDJ26** e **PDJ29**, e mais uma, do composto **ZINC13537284** resultado coincidente entre os estudos da **Estratégia3** e **4** utilizando como referência o ligante **BAL27862** e o **PDJ26**.

Sendo assim, os 55 compostos selecionados como resultados mais promissores a candidatos a moduladores da tubulina seguem em processo de compra e posteriormente terão suas atividades comprovadas em ensaios *in vitro*. Os compostos com melhores resultados nos ensaios *in vitro* serão avaliados quanto a possibilidade de síntese junto a lisina acetilada e aos compostos selecionados como candidatos a bloqueadores do canal de cálcio, para assim finalizarmos junto a todos os colaboradores deste projeto a nossa proposta final de pró-fármaco trifuncional.

5. Conclusões e Perspectivas Futuras

5.1. Referentes à Tarefa 1 (Estratégia 1)

Apesar de não existirem estruturas cristalográficas de canal de cálcio do tipo-L em banco de dados de proteínas, um modelo de Cav 1.2 foi construído por modelagem comparativa (ou modelagem por homologia estrutural). A confiabilidade do modelo gerado, bem como a garantia de resultados plausíveis em simulações de *docking*, ficou evidente após o mesmo ser submetido a estudos de avaliação e validação.

Em posse de um modelo de Cav 1.2 e dos resultados dos estudos de triagem virtual utilizando técnicas de LBDD, pudemos simular como os ligantes selecionados se posicionariam e interagiriam frente ao poro central e ao sítio alostérico do canal. A partir dos modos de interações propostos nos estudos de *docking*, selecionamos 9 compostos com potenciais atividades bloqueadoras do canal de cálcio. Estes compostos foram comprados e estão sendo testados *in vitro*, e assim, teremos a comprovação ou não da eficácia dos mesmos.

5.2. Referentes à Tarefa 1 (Estratégias 2 e 3)

As pesquisas nos bancos de dados de proteínas nos revelaram que recentemente, Prota e colaboradores, 2014²⁰⁵ publicaram duas estruturas cristalográficas da tubulina, com a colchicina e o ligante BAL27862 no sítio de interação da colchicina, com as resoluções de 2,3Å e 2,5Å, respectivamente. Sendo assim, foi possível explorar mais as técnicas de SBDD somadas às técnicas de LBDD nos estudos de triagem virtual para compostos com promissoras atividades moduladoras da tubulina.

As estruturas cristalográficas foram validadas e após a comprovação da eficácia das mesmas para a utilização em estudos de *docking* executamos as **Estratégias 2 e 3**. Como resultado da **Estratégia 2** obtivemos 20 compostos com potenciais atividades moduladoras da tubulina e como resultado da **Estratégia 3** obtivemos 10 compostos. Estes compostos também foram comprados e estão sendo testados *in vitro* quanto à propriedade de modular a ação da tubulina.

5.3. Referentes à *Tarefa2 (Estratégia4)*

Após obtidos os resultados dos ensaios de atividade leishmanicida e antineoplásica dos compostos sintetizados por nossa equipe de síntese, buscamos racionalizar estes resultados e buscar o entendimento do sucesso de alguns compostos. Os resultados das simulações de *docking* para estes compostos revelaram coerência quando comparados aos resultados de atividade enzimática, e dessa forma, utilizamos a pose gerada dos três compostos com melhores resultados *in vitro* em estudos de triagem virtual.

Diante da proposta de conformação ativa gerada em simulações de *docking* para os três compostos com melhores valores em ensaios *in vitro*, foram realizados três estudos de triagem virtual. Para cada um dos estudos selecionamos 10 compostos foram comprados e estão sendo testados *in vitro*.

5.4. Considerações finais e perspectivas futuras

Todas as quatro estratégias executadas neste estudo se demonstraram efetivas do ponto de vista teórico. Notamos este fato principalmente com o consenso de alguns resultados obtidos com estudos de *docking*, utilizando independentemente dois programas de escopo e funções de pontuação distintas.

Por este doutoramento fazer parte de um projeto extenso, os estudos dos compostos triados e novas propostas de bibliotecas sugeridas por nossa equipe de síntese seguirão. Tendo em vista o sucesso das etapas iniciais e dos resultados obtidos preliminarmente, ampliamos as fases iniciais do mesmo para, assim, garantirmos um banco de estruturas com um grande número de compostos contendo alta diversidade química estrutural.

Com base nos resultados experimentais dos compostos que estão sendo avaliados, estudos de otimização de compostos líderes e de protótipos por modificações bioisostéricas, QSAR, bem como novas propostas de união dos núcleos através da lisina acetilada, serão realizados em etapas próximas com vistas a desenvolver novos compostos de caráter dual, anticanceroso e leishmanicida.

6. Referencias Bibliográficas

- [1] Abdallah, H. M., Al-Abd, A. M., El-Dine, R. S. & El-Halawany, A. M. P-glycoprotein inhibitors of natural origin as potential tumor chemo-sensitizers: A review. *J. Adv. Res.*, **2015**, 6, 45–62.
- [2] Huber, P. C., Maruiama, C. H. & Almeida, W. P. Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de modularores. *Quim. Nova*, **2010**, 33, 2148–2154.
- [3] Hoffmann, E. K. & Lambert, I. H. Ion channels and transporters in the development of drug resistance in cancer cells. *Philos. Trans. R. Soc. B*, **2014**, 369, 1–9.
- [4] Longley, D. B. & Johnston, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. *J. Pathol.*, **2005**, 205, 275–292.
- [5] Baguley, B. C. Multiple drug resistance mechanisms in cancer. *Mol. Biotechnol.*, **2010**, 46, 308–316.
- [6] WHO Expert Committee on, Of Leishmaniasis Control & 2010 Geneva 22–26 March. *Control of the Leishmaniasis. WHO Technical Report Series* (2010). at <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf>
- [7] American Cancer Society. Cancer facts & figures. **2008**, 2009,
- [8] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva.Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil*. (2014).
- [9] Alvar, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*, **2012**, 7,
- [10] Mahajan, R. c. & Mohan, K. Epidemiology of Visceral Leishmaniasis and Its Control. **2014**, 41–49.
- [11] World Health Organization (WHO) - Leishmaniasis. **2016**, at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>
- [12] Pelissari, D. M., Cechinel, M. P., Sousa-Gomes, M. L. De & Lima Júnior, F. E. F. De. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. *Epidemiol. e Serviços Saúde*, **2011**, 20, 107–110.
- [13] Majumder, H. K. *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*. (Springer New York, 2008). at <<https://books.google.es/books?id=rk9H6xW6Z10C>>
- [14] Ramalho, T. C., Freitas, M. P. & Da Cunha, E. F. F. *Cheminformatics: Directions Toward Combating Neglected Diseases*. (Bentham Science Publishers, 2012). at <<https://books.google.es/books?id=92woc6YbpQAC>>
- [15] Havens, C. G. *et al.* Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, **2000**, 110, 223–236.
- [16] Jordan, M. a. Mechanism of action of antitumor drugs that interact with microtubules and tubulin. *Curr. Med. Chem. Anticancer. Agents*, **2002**, 2, 1–17.
- [17] Pellegrini, F. & Budman, D. R. Review: tubulin function, action of antitubulin

- drugs, and new drug development. *Cancer Invest.*, **2005**, 23, 264–273.
- [18] Leandro-García, L. J. *et al.* Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken)*, **2010**, 67, 214–223.
- [19] Torres, F. & Campos, M. Imidazoles and benzimidazoles as tubulin-modulators for anticancer therapy. 1–47.
- [20] Jordan, A., Hadfield, J. A., Lawrence, N. J. & McGown, A. T. Anticancer Drugs : Agents Which Interact with the Mitotic Spindle. 259–296.
- [21] Aguayo-Ortiz, R. *et al.* Molecular basis for benzimidazole resistance from a novel β -tubulin binding site model. *J. Mol. Graph. Model.*, **2013**, 45, 26–37.
- [22] Cortés-Selva, F. *et al.* Dihydro- β -Agarofuran Sesquiterpenes : A New Class of Reversal Agents of the Multidrug Resistance Phenotype Mediated by P-Glycoprotein in the Protozoan Parasite Leishmania. *Curr. Pharm. Des.*, **2005**, 11, 3125–3139.
- [23] Austrup, J. & Karanis, P. Frequency of MDR1-related p-gp overexpression in Greek Leishmania isolates. *Parasitol. Res.*, **2014**, 113, 1225–1232.
- [24] Moreira, D. S. *et al.* Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World Leishmania spp. susceptible and resistant to antimony. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.*, **2013**, 3, 143–153.
- [25] Little, M. & Luduena, R. F. implications for microtubule assembly and colchicine binding. **1985**, 4, 51–56.
- [26] Shaikat, A. *et al.* Benzimidazole derivatives: synthesis, leishmanicidal effectiveness, and molecular docking studies. *Med. Chem. Res.*, **2012**, 22, 3606–3620.
- [27] Armson, A. *et al.* A comparison of the effects of a benzimidazole and the dinitroanilines against Leishmania infantum. *Acta Trop.*, **1999**, 73, 303–311.
- [28] Lu, Y., Chen, J., Xiao, M., Li, W. & Miller, D. D. An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharm. Res.*, **2012**, 29, 2943–2971.
- [29] Zinzi, L. *et al.* Small and Innovative Molecules as New Strategy to Revert MDR. *Front. Oncol.*, **2014**, 4, 2.
- [30] Ueki, N., Lee, S., Sampson, N. S. & Hayman, M. J. Selective cancer targeting with prodrugs activated by histone deacetylases and a tumour-associated protease. *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 2735.
- [31] Marks, P. a. & Xu, W. S. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J. Cell. Biochem.*, **2009**, 107, 600–608.
- [32] Bolden, J. E., Peart, M. J. & Johnstone, R. W. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **2006**, 5, 769–784.
- [33] Haberland, M., Johnson, A., Mokalled, M. H., Montgomery, R. L. & Olson, E. N. Genetic dissection of histone deacetylase requirement in tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2009**, 106, 7751–7755.
- [34] Collette, J., Ulku, A. S., Der, C. J., Jones, A. & Erickson, A. H. Enhanced cathepsin

- L expression is mediated by different Ras effector pathways in fibroblasts and epithelial cells. *Int. J. Cancer*, **2004**, 112, 190–199.
- [35] Joseph, L. J., Chang, L. C., Stamenkovich, D. & Sukhatme, V. P. Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J. Clin. Invest.*, **1988**, 81, 1621–1629.
- [36] Pedersoli-mantoani, S., Silva, V. B., Taft, C. A. & Silva, C. H. T. P. Pharmacophore-based Drug Design of Novel Potential Tau Ligands for Alzheimer's Disease Treatment. *Curr. Phys. Chem.*, **2014**, 4, 35–44.
- [37] Semighini, E. P., Taft, C. A. & Silva, C. H. T. P. Structure and Ligand Based Rational Drug Design for Bace-1 Inhibitors. *Curr. Bioact. Compd.*, **2013**, 9, 14–20.
- [38] Taft, C. A. & Silva, C. H. T. P. *New developments in Medicinal Chemistry, vol1.* (Bentham Science, 2010).
- [39] Taft, C. A. & Silva, C. H. T. P. *New developments in Medicinal Chemistry, vol2.* (Bentham Science, 2014).
- [40] Juliano, R. L. & Ling, V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1976**, 455, 152–162.
- [41] Hill, B. Drug resistance: an overview of the current state of the art. *Int. J. Oncol.*, **1996**, 9, 197–203.
- [42] Lacombe, S., JA, G. V., J, C. P. & P., L. M. Causes and problems of nonresponse or poor response to drugs. *Drugs*, **1996**, 51, 552–570.
- [43] Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K. & Ricciardelli, C. The Role of ABC Transporters in Ovarian Cancer Progression and Chemoresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, **2015**, 96, 220–256.
- [44] Giacomini, K. M. & Tweedie, D. Membrane transporters in drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, 9, 215–236.
- [45] Shapira, A., Livney, Y. D., Broxterman, H. J. & Assaraf, Y. G. Nanomedicine for targeted cancer therapy: Towards the overcoming of drug resistance. *Drug Resist. Updat.*, **2011**, 14, 150–163.
- [46] Borst, P. & Oude Elferink, R. MAMMALIAN ABC TRANSPORTERS IN HEALTH AND DISEASE. *Annu. Rev. Biochem.*, **2002**, 71, 537 – 592.
- [47] Ambudkar, S. V, Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E. & Gottesman, M. M. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, **2003**, 22, 7468–85.
- [48] Schinkel, A. H. & Jonker, J. W. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: An overview. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, 64, 138–153.
- [49] Amin, M. L. P-glycoprotein inhibition for optimal drug delivery. *Drug Target Insights*, **2013**, 7, 27–34.
- [50] Stavrovskaya, a a. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. *Biochemistry. (Mosc)*, **2000**, 65, 95–106.

- [51] Krishna, R. & Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2000**, 11, 265–283.
- [52] Chen, Z. *et al.* Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family in multidrug resistance: A review of the past decade. *Cancer Lett.*, **2016**, 370, 153–164.
- [53] Zhou, X. F., Yang, X., Wang, Q., Coburn, R. a & Morris, M. E. Effects of dihydropyridines and pyridines on multidrug resistance mediated by breast cancer resistance protein: in vitro and in vivo studies. *Drug Metab Dispos*, **2005**, 33, 1220–1228.
- [54] Tsuruo, T., Lida, H., Tsukagoshi, S. & Sakurai, Y. Overcoming of vincristine resistance in P388 leukemia in vivo and in vitro through enhanced cytotoxicity of vincristine and vinblastine by verapamil. *Cancer Res.*, **1981**, 41, 1967–1972.
- [55] Krishna, R. & Mayer, L. D. Multidrug resistance (MDR) in cancer Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2000**, 11, 265–283.
- [56] Wandel, C. *et al.* P-Glycoprotein and cytochrome P-450 3A inhibition: Dissociation of inhibitory potencies. *Cancer Res.*, **1999**, 59, 3944–3948.
- [57] Zhou, Z. *et al.* Pharmacological Reports L-1416 , a novel MDR reversing agent with possible reduced calcium antagonism. *Pharmacol. Reports*, **2014**, 66, 1140–1147.
- [58] Shekari, F. *et al.* Cytotoxic and multidrug resistance reversal activities of novel 1, 4-dihydropyridines against human cancer cells. *Eur. J. Pharmacol.*, **2015**, 746, 233–244.
- [59] Radadiya, A. *et al.* Synthesis and 3D-QSAR study of 1,4-dihydropyridine derivatives as MDR cancer reverters. *Eur. J. Med. Chem.*, **2014**, 74, 375–387.
- [60] Firuzi, O. *et al.* Reversal of multidrug resistance by novel verapamil analogs in cancer cells. *Arch. Pharm. Res*, **2013**, 36, 1392–1402.
- [61] Organização Pan-Americana de Saúde. at <http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=393:cancer&Itemid=539>
- [62] World Health Organization. **2015**, at <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>
- [63] Instituto Nacional de Câncer - INCA. at <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>
- [64] Cancer Research UK. at <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>>
- [65] Antoni, S., Soerjomataram, I., Møller, B. & Ferlay, J. An assessment of GLOBOCAN methods for deriving national estimates of cancer incidence. **2016**, 174–184.
- [66] Ferlay, J. *et al.* Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base. *GLOBOCAN 2012 v1.0* **2013**, at <<http://globocan.iarc.fr>>

- [67] Bray, F., Ren, J. F., Masuyer, E. & Ferlay, J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, **2013**, 132, 1133–45.
- [68] Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação de Prevenção e Vigilância*. (2014).
- [69] Lasley, I. *21st Century Cancer Treatment*. (Createspace Independent Pub, 2011). at <<https://books.google.com.br/books?id=er614PVQPvKc>>
- [70] DeSantis, C. E. *et al.* Cancer Treatment and Survivorship Statistics , 2014. *CA. Cancer J. Clin.*, **2013**, 64, 252–272.
- [71] American Cancer Society. Treatment Types. **2016**, at <<http://www.cancer.org/treatment/treatmentsandsideeffects/treatmenttypes/index>>
- [72] Bosch, F. & Rosich, L. The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: A tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*, **2008**, 82, 171–179.
- [73] Kaufmann, S. H. E. Paul Ehrlich: founder of chemotherapy. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2008**, 7, 373.
- [74] Chabner, B. A. & Roberts, T. G. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat. Rev. Cancer*, **2005**, 5, 65–72.
- [75] De Almeida, V. L. *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. *Quim. Nova*, **2005**, 28, 118–129.
- [76] Jordan, A., Hadfield, J. A., Lawrence, N. J. & McGown, A. T. Tubulin as a Target for Anticancer Drugs: Agents Which Interact with the Mitotic Spindle. *Med Res Rev.*, **1998**, 18, 259–296.
- [77] Weinberg, R. A. How cancer arises. *Sci. Am.*, **1996**, 275, 62–70.
- [78] Zeibig, E. *Parasitologia Clínica: Uma abordagem clínico-laboratorial*. (Elsevier Health Sciences Brazil, 2014). at <<https://books.google.com.br/books?id=gNt2BgAAQBAJ>>
- [79] David, C. V. & Craft, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol. Ther.*, **2009**, 22, 491–502.
- [80] Vermelho, A. B. *et al.* Leishmaniasis : Possible New Strategies for Treatment. doi:10.5772/57388
- [81] Peacock, C. S. *et al.* Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat Genet.*, **2008**, 39, 839–847.
- [82] MINISTÉRIO DA SAÚDE Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância Epidemiológica. *Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnóstico Clínico e Diferencial*. (Editora MS, 2006). 52,
- [83] Croft, S. L., Sundar, S. & Fairlamb, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. *Society*, **2006**, 19, 111–126.

- [84] Tiuman, T. S., Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D. & Nakamura, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int. J. Infect. Dis.*, **2011**, 15,
- [85] Assis, T. M., Mancini, D. T., Ramalho, T. C. & Cunha, E. F. F. In Silico Study of Leishmania donovani alfa-beta Tubulin and Inhibitors. *J. Chem.*, **2014**, 2014,
- [86] Godinho, J. L. P., Georgikopoulou, K., Calogeropoulou, T., de Souza, W. & Rodrigues, J. C. F. A novel alkyl phosphocholine-dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity in vitro against Leishmania amazonensis. *Exp. Parasitol.*, **2013**, 135, 153–165.
- [87] Howard, J. & Hyman, A. a. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2009**, 10, 569–574.
- [88] Morgan, D. O. *The Cell Cycle: Principles of Control*. (OUP/New Science Press, 2007). at <<https://books.google.com.br/books?id=ScEuiD2V6GoC>>
- [89] Downing, K. H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. **2000**, 89–111.
- [90] Contributors, Mbi. Dynamic instability of microtubules. *In MBInfo Wiki* **2014**, at <<http://www.mechanobio.info/figure/figure/1384243769869.jpg.html>>
- [91] Li, H., DeRosier, D. J., Nicholson, W. V., Nogales, E. & Downing, K. H. Microtubule structure at 8 ?? resolution. *Structure*, **2002**, 10, 1317–1328.
- [92] Gnanambal. K, M. E. & Lakshmipathy, S. V. Dictyoceratidan poisons: Defined mark on microtubule-tubulin dynamics. *Life Sci.*, **2016**, 148, 229–240.
- [93] Wade, R. H. On and around microtubules: An overview. *Mol. Biotechnol.*, **2009**, 43, 177–191.
- [94] Stanton, R. A., Gernert, K. M., Nettles, J. H. & Aneja, R. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. *Med. Res. Rev.*, **2011**, 31, 443–481.
- [95] Chakraborti, S. *et al.* Discrimination of ligands with different flexibilities resulting from the plasticity of the binding site in tubulin. *Biochemistry*, **2012**, 51, 7138–7148.
- [96] Jordan, M. A. & Wilson, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat. Rev. Cancer*, **2004**, 4, 253–265.
- [97] Gigant, B. *et al.* Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, **2005**, 435, 519–522.
- [98] Morris, P. G. & Fournier, M. N. Microtubule active agents: Beyond the taxane frontier. *Clin. Cancer Res.*, **2008**, 14, 7167–7172.
- [99] Turner, R. T., Hong, L., Koelsch, G., Ghosh, A. K. & Tang, J. Structural Locations and Functional Roles of New Subsites S 5 , S 6 , and S 7 in. **2005**, 2, 105–112.
- [100] Risinger, A. L., Giles, F. J. & Mooberry, S. L. Microtubule dynamics as a target in oncology. *Cancer Treat. Rev.*, **2009**, 35, 255–261.
- [101] Skoufias, D. a & Wilson, L. Mechanism of inhibition of microtubule polymerization by colchicine: inhibitory potencies of unliganded colchicine and tubulin-colchicine complexes. *Biochemistry*, **1992**, 31, 738–746.

- [102] Gupta, M. L., Bode, C. J., Georg, G. I. & Himes, R. H. Understanding tubulin-Taxol interactions: mutations that impart Taxol binding to yeast tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2003**, 100, 6394–7.
- [103] Petegem, F. Van & D.L. Minor, J. The structural biology of voltage-gated calcium channel function and regulation. *Biochem. Soc. Trans.*, **2006**, 34, 887–893.
- [104] Hille, B. Ionic channels in excitable membranes current problems and biophysical approaches. *Biophys. J.*, **1978**, 22, 283–294.
- [105] Catterall, W. A. Structure and regulation of voltage-gated calcium channels. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **2000**, 16, 521–555.
- [106] Stotz, S. C., Jarvis, S. E. & Zamponi, G. W. Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J. Physiol.*, **2004**, 554, 263–273.
- [107] Findlay, I. Physiological modulation of inactivation in L-type Ca²⁺ channels: one switch. *J. Physiol.*, **2004**, 554, 275–283.
- [108] Reuter, H. Diversity and function of presynaptic calcium channels in the brain. *Curr. Opin. Neurobiol.*, **1996**, 6, 331–337.
- [109] Yamakage, M. & Namiki, A. Calcium channels-basic aspects of their structure, function and gene encoding; anesthetic action on the channels - a review. *Can. J. Anaesth.*, **2002**, 49, 151–164.
- [110] Bidaud, I., Mezghrani, A., Swayne, L. A., Monteil, A. & Lory, P. Voltage-gated calcium channels in genetic diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **2006**, 1763, 1169–74.
- [111] Birnbaumer, L. *et al.* The naming of voltage-gated calcium channels. *Neuron*, **1994**, 13, 505–506.
- [112] Khosravani, H. & Zamponi, G. Voltage-Gated Calcium Channels and Idiopathic Generalized Epilepsies. *Physiol. Rev.*, **2006**, 86, 941–966.
- [113] Mikaberidze, A. Nomenclature of Voltage-Gated Calcium Channels. *Neuron*, **2000**, 25, 533–535.
- [114] Tanabe, T., Takeshima, H. & Mikami, a. Primary structure of the receptor for calcium channel blockers from skeletal muscle. *Nature*, **1986**, 328, 313–318.
- [115] Cain, S. M. & Snutch, T. P. Voltage-gated calcium channels and disease. *BioFactors*, **2011**, 37, 197–205.
- [116] Mei, L. *et al.* Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2013**, 65, 880–890.
- [117] Cuperus, F. J. C., Claudel, T., Gautherot, J., Halilbasic, E. & Trauner, M. Special Section on Transporters in Toxicity and Disease — Minireview The Role of Canalicular ABC Transporters in Cholestasis. **2014**, 2014, 546–560.
- [118] Patel, N. R., Rathi, A., Mongayt, D. & Torchilin, V. P. Multidrug resistance reversal by co-delivery of tariquidar (XR9576) and paclitaxel using long-circulating liposomes. *Int J Pharm*, **2011**, 416, 269–299.

- [119] Thomas, H. & M.Coley, H. Overcoming multidrug resistance in cancer: An update on research of natural products. *Cancer Control*, **2003**, 10, 159–165.
- [120] Guido, R. V. C. & Andricopulo, A. D. Modelagem Molecular de Fármacos. *Rev. Process. Químicos*, **2008**,
- [121] Guido, R. V. C., Andricopulo, A. D. & Oliva, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. *Estud. Avançados*, **2010**, 24, 81–98.
- [122] Kapetanovic, I. M. Computer aided drug discovery and development: in silico-chemico-biological approach. *Chem. Biol. Interact.*, **2008**, 171, 165–176.
- [123] Sliwoski, G., Kothiwale, S., Meiler, J. & Lowe, E. W. Computational Methods in Drug Discovery. **2014**, 334–395.
- [124] Cobb, K. Dock This : Insilico Drug Design Feeds Drug Development. *Biomed. Comput. Rev.*, **2007**, 20–30.
- [125] Ou-Yang, S.-S. *et al.* Computational drug discovery. *Acta Pharmacol. Sin.*, **2012**, 33, 1131–40.
- [126] Goto, J., Kataoka, R. & Hirayama, N. Ph4Dock : Pharmacophore-Based Protein - Ligand Docking. **2004**, 6804–6811.
- [127] Warren, G. L., Do, T. D., Kelley, B. P., Nicholls, A. & Warren, S. D. Essential considerations for using protein-ligand structures in drug discovery. *Drug Discov. Today*, **2012**, 17, 1270–1281.
- [128] Mech, L. D. A Gray Wolf (*Canis lupus*) Delivers Live Prey to a Pup. *Can. Field-Naturalist*, **2014**, 128, 189–190.
- [129] Liao, C., Sitzmann, M., Pugliese, A. & Nicklaus, M. C. Software and resources for computational medicinal chemistry. *Future Med. Chem.*, **2011**, 3, 1057–1085.
- [130] Tanrikulu, Y., Krüger, B. & Proschak, E. The holistic integration of virtual screening in drug discovery. *Drug Discov. Today*, **2013**, 18, 358–64.
- [131] Maybridge. The Maybridge Screening Collection. *Screening Guide 2004* **2004**, at <<http://www.maybridge.com>>
- [132] Irwin, J. J. & Shoichet, B. K. ZINC – A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening ZINC - A Free Database of Commercially Available Compounds for Virtual Screening. *J. Chem. Inf. Model.*, **2005**, 45, 177–182.
- [133] ChemBridge. The Gold standard in small molecule screening libraries and building blocks. at <www.chembridge.com>
- [134] Liu, T. Q., Lin, Y. M., Wen, X., Jorissen, R. N. & Gilson, M. K. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein- ligand binding affinities. *Nucleic Acids Res.*, **2007**, 35, 198–201.
- [135] Hawkins, P. C. D. & Nicholls, A. Conformer generation with OMEGA: Learning from the data set and the analysis of failures. *J. Chem. Inf. Model.*, **2012**, 52, 2919–2936.

- [136] OpenEye Scientific Software. ROCS 3.2.1.4. at <<http://www.eyesopen.com>>
- [137] OpenEye Scientific Software. EON 2.2.0.5. at <<http://www.eyesopen.com>>
- [138] Schrödinger. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2: QikProp. **2015**,
- [139] Marchant, C. a. Prediction of rodent carcinogenicity using the DEREK system for 30 chemicals currently being tested by the National Toxicology Program. *Environ. Health Perspect.*, **1996**, 104, 1065–1073.
- [140] Schrödinger. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-3: Glide. **2015**,
- [141] Cole, J. C., Nissink, J. W. M. & Taylor, R. in *Virtual Screening in Drug Discovery* (eds. Shoichet, . B. & Alvarez, J.) (Taylor & Francis CRC Press, 2005).
- [142] Johnson, M. *et al.* NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic Acids Res.*, **2008**, 36, 5–9.
- [143] Altschul, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PS I-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res*, **1997**, 25, 3389–3402.
- [144] Sievers, F. *et al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.*, **2011**, 7, 1–6.
- [145] Sali, A. Modeller: Generation and Refinement of Homology-Based Protein Structure Models. *Methods Enzymol.*, **2004**, 374,
- [146] Schrödinger. Schrödinger Release 2015-2: Maestro. **2015**,
- [147] Vriend, G. WHAT IF: A molecular modeling and drug design program. *Molecules*, **1990**, 8, 52–56.
- [148] Vriend, G. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J. Mol. Graph.*, **1990**, 8, 52–6.
- [149] Laskowski, Roman A MacArthur, Malcolm W Smith, D. K. *et al.* Procheck Programs to check the Stereochemical Quality of Protein Structures. **1998**,
- [150] Laplante, S. R. *et al.* Supporting Information Ligand Bioactive Conformation Plays a Critical Role in the Design of Drugs That Target the Hepatitis C Virus NS3 Protease. **2013**, 1–51.
- [151] Bai, F. *et al.* Bioactive conformational generation of small molecules: a comparative analysis between force-field and multiple empirical criteria based methods. *BMC Bioinformatics*, **2010**, 11, 545.
- [152] Hawkins, P. C. D., Skillman, a G., Warren, G. L., Ellingson, B. a & Stahl, M. T. Conformer generation with OMEGA: algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J. Chem. Inf. Model.*, **2010**, 50, 572–84.
- [153] Haigh, J. A., Pickup, B. T., Grant, J. A. & Nicholls, A. Small molecule shape-fingerprints. *J. Chem. Inf. Model.*, **2005**, 45, 673–684.
- [154] Grant, J. a., Gallardo, M. a. & Pickup, B. T. A fast method of molecular shape comparison: A simple application of a Gaussian description of molecular shape. *J. Comput. Chem.*, **1996**, 17, 1653–1666.

- [155] Naylor, E. *et al.* Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *Nat. Chem. Biol.*, **2009**, 5, 220–226.
- [156] Kitchen, D., Decornez, H., Furr, J. & Bajorath, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2004**, 3, 935–949.
- [157] Yuriev, E. & Ramsland, P. a. Latest developments in molecular docking: 2010–2011 in review. *J. Mol. Recognit.*, **2013**, 26, 215–39.
- [158] Jain, A. N. Scoring functions for protein-ligand docking. *Curr. Protein Pept. Sci.*, **2006**, 7, 407–20.
- [159] Yuriev, E., Agostino, M. & Ramsland, P. a. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *J. Mol. Recognit.*, **2011**, 24, 149–164.
- [160] Schrödinger. Small-Molecule Drug Discovery Suite 2015-2: Glide. **2015**,
- [161] Friesner, R. A., Banks, J. L. & Murphy, R. B. Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J. Med. ...*, **2004**, 47, 1739–1749.
- [162] Suite, G. GOLD User Guide A Component of the GOLD Suite. **2015**,
- [163] Eldridge, M. D., Murray, C. W., Auton, T. R., Paolini, G. V & Mee, R. P. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *ournal Comput. Mol. Des.*, **1997**, 11, 425–445.
- [164] Friesner, R. a. *et al.* Extra Precision Glide: Docking and Scoring Incorporating a Model of Hydrophobic Enclosure for Protein-Ligand Complexes. *J. Med. Chem.*, **2006**, 6177–6196.
- [165] Mooij, W. T. M. & Verdonk, M. L. General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **2005**, 61, 272–287.
- [166] Korb, O., St??tzle, T. & Exner, T. E. Empirical scoring functions for advanced Protein-Ligand docking with PLANTS. *J. Chem. Inf. Model.*, **2009**, 49, 84–96.
- [167] Perola, E., Walters, W. P. & Charifson, P. S. A detailed comparison of current docking and scoring methods on systems of pharmaceutical relevance. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **2004**, 56, 235–249.
- [168] Wang, R., Lu, Y. & Wang, S. Comparative evaluation of 11 scoring functions for molecular docking. *J. Med. Chem.*, **2003**, 46, 2287–2303.
- [169] Prentis, R. a, Lis, Y. & Walker, S. R. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964–1985). *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **1988**, 25, 387–396.
- [170] Boobis, A., Gundert-Remy, U., Kremers, P., Macheras, P. & Pelkonen, O. In silico prediction of ADME and pharmacokinetics Report of an expert meeting organized by COST B15. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **2002**, 17, 183–193.
- [171] Venkatesh, S. & Lipper, R. A. Role of the development scientist in compound lead selection and optimization. *J. Pharm. Sci.*, **2000**, 89, 145–154.

- [172] Schrödinger, L. QikProp: Rapid ADME predictions of drug candidates. at <<http://www.schrodinger.com/QikProp/>>
- [173] Kujawski, J. & Popielarska, H. The log P Parameter as a Molecular Descriptor in the Computer-aided Drug Design—an Overview. ... *Methods Sci. ...*, **2012**, 18, 81–88.
- [174] Artursson, P. & Karlsson, J. CORRELATION BETWEEN ORAL DRUG ABSORPTION IN HUMANS AND APPARENT DRUG PERMEABILITY COEFFICIENTS IN HUMAN INTESTINAL EPITHELIAL (CACO-2) CELLS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1991**, 175, 880–885.
- [175] Horster, M. F. & Stopp, M. Transport and metabolic functions in cultured renal tubule cells. *Kidney Int.*, **1986**, 29, 46–53.
- [176] Irvine, J. D. *et al.* MDCK (Madin-Darby canine kidney) cells: A tool for membrane permeability screening. *J. Pharm. Sci.*, **1999**, 88, 28–33.
- [177] Cole, D. C. & Bursavich, M. G. in *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets* (ed. Ghosh, A. K.) (John Wiley & Sons, 2010). 606.
- [178] Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. & Peitsch, M. C. SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.*, **2003**, 31, 3381–3385.
- [179] Fomby, P. & Cherlin, A. J. NIH Public Access. **2011**, 72, 181–204.
- [180] Martí-Renom, M. A., Stuart, A. C., Roberto, S., Melo, F. & Andrej, S. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **2000**, 29, 291–325.
- [181] Sanchez, R. & Sail, A. Advances in comparative protein-structure modelling. 206–214.
- [182] The Statistics of Sequence Similarity Scores. **2006**, 1–13. at <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/tutorial/>>
- [183] Apostolico, A. Sequence Alignment in Molecular Biology. *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 5, 173–196.
- [184] Agostino, M. in *Practical Bioinformatics* (Garland Science - Taylor & Francis Group, 2012). 47–71. at <http://pasa.sourceforge.net/#A_rcdaap>
- [185] Zhorov, B. S., Folkman, E. V & Ananthanarayanan, V. S. Homology model of dihydropyridine receptor: implications for L-type Ca(2+) channel modulation by agonists and antagonists. *Arch. Biochem. Biophys.*, **2001**, 393, 22–41.
- [186] Sievers, F. & Higgins, D. G. in *Multiple Sequence Alignment Methods* (ed. Russell, D. J.) (Humana Press, 2014). 1079, 287.
- [187] Webb, B. & Sali, A. Protein structure modeling with MODELLER. *Protein Struct. Predict.*, **2014**, 1–15.
- [188] Eswar, N. *et al.* *Comparative protein structure modeling using MODELLER. Current protocols in protein science / editorial board, John E. Coligan ... [et al.]* (2007). Chapter 2,
- [189] Blundell, T. L., Sibanda, B. L., Sternberg, M. J. E. & Thornton, J. M. Knowledge-based prediction of protein structures and the design of novel molecules. *Nature*,

- 1987**, 326, 347–352.
- [190] Claessens, M., Van Cutsem, E., Lasters, I. & Wodak, S. Jahresrückblick Biochemie Und Molekularbiologie Modelling The Polypeptide Backbone With ‘spare Parts’ from Known Protein Structures. *Nachr. Chem. Tech. Lab*, **1989**, 37, 162.
- [191] Aszódi, A. & Taylor, W. R. Homology modelling by distance geometry. *Fold. Des.*, **1996**, 1, 325–334.
- [192] Andrade, O., Filho, S. & Alencastro, B. De. Modelagem De Proteínas Por Homologia. *Quim. Nova*, **2003**, 26, 253–259.
- [193] Ramachandran, G. N., Ramakrishnan, C. & Sasisekharan, V. Stereochemistry of polypeptide chain configurations. *J. Mol. Biol.*, **1963**, 7, 95–99.
- [194] Morris, A.-L., MacArthur, M. W., Hutchinson, E. G. & Thornton, J. M. Stereochemical quality of protein structure coordinates. *Proteins Struct. Funct. Genet.*, **1992**, 364, 345–364.
- [195] Shaldam, M. a., Elhamamsy, M. H., Esmat, E. a. & El-Moselhy, T. F. 1,4-Dihydropyridine Calcium Channel Blockers: Homology Modeling of the Receptor and Assessment of Structure Activity Relationship. *ISRN Med. Chem.*, **2014**, 2014, 1–14.
- [196] Doyle, D. a *et al.* The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science*, **1998**, 280, 69–77.
- [197] Yu, L. *et al.* Nuclear Magnetic Resonance Structural Studies of a Potassium channel-charybdotoxin complex. *Biochemistry*, **2005**, 41, 15834–15841.
- [198] UniProt: a hub for protein information. *Nucleic Acids Res.*, **2014**, 43, D204–12.
- [199] Shaya, D. *et al.* Structure of a prokaryotic sodium channel pore reveals essential gating elements and an outer ion binding site common to eukaryotic channels. *J. Mol. Biol.*, **2014**, 426, 467–483.
- [200] Tikhonov, D. B. & Zhorov, B. S. Structural model for dihydropyridine binding to L-type calcium channels. *J. Biol. Chem.*, **2009**, 284, 19006–19017.
- [201] Cosconati, S., Marinelli, L., Lavecchia, A. & Novellino, E. Characterizing the 1 , 4-Dihydropyridines Binding Interactions in the L-Type Calcium Channel : Model Construction and Docking Calculations. *J. Med. Chem.*, **2007**, 50, 1504–1513.
- [202] Locatelli, A. *et al.* Ligand Based Approach to L - Type Calcium Channel by Imidazo[2,1 - b]thiazole-1,4-Dihydropyridines: from Heart Activity to Brain A ffinity. *J. Med. Chem.*, **2013**, 56, 3866–3877.
- [203] Mitterdorfer, J. *et al.* Two amino acid residues in the IIIS5 segment of L-type calcium channels differentially contribute to 1, 4-dihydropyridine sensitivity. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 30330–30335.
- [204] Kelly, T. R. & Kim, M. H. Relative Binding Affinity of Carboxylate and Its Isosteres: Nitro, Phosphate, Phosphonate, Sulfonate, and delta-Lactone. *J. Am. Chem. Soc.*, **1994**, 116, 7072–7080.
- [205] Protá, A. E. *et al.* The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to

- the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. *J. Mol. Biol.*, **2014**, 426, 1848–1860.
- [206] Dorléans, A. *et al.* Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **2009**, 106, 13775–13779.
- [207] Ravelli, R. B. G. *et al.* Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and stathmin-like domain. *Nature*, **2004**, 428, 198–202.
- [208] Siqueira-Neto, J. L. *et al.* An image-based high-content screening assay for compounds targeting intracellular leishmania donovani amastigotes in human macrophages. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, **2012**, 6,
- [209] Mosmann, T. Rapid Colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, **1983**, 65, 55–63.
- [210] Yuriev, E. & Ramsland, P. A. Latest developments in molecular docking: 2010-2011 in review. *J. Mol. Recognit.*, **2013**, 26, 215–239.

7. Anexos

7.1. Dados Suplementares

Anexo 1. Alinhamento entre as seqüências PDB ID:4LTO e QIso20 feitas com o programa **Clustal Omega**

Cadeia I	
4LTO	PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLFAQSFPEW-----FGTLGASMYTLFQVMTLESWSMGIARPVIEAY—PWAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGII/ VPLLHIALLVLFVIIIYAIIGLELFMGKMHKTCYNGITNFDNFAFAMLTVFQCITMEGWT-DVLYWVNDAVGRDWPWIYFVTLIIIGSFVNLNLVGLV/
Iso20	
Cadeia II	
4LTO	PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLFAQSF-----EWFGLGASMYTLFQVMTLESWSM---GIARPVIEAYP-- WAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGIIISMQSAH/ RSIASLLLLLFLFIIIFSLGMLFGGKFNFDQMQRTRSTFDNFPQSLTLVFQILTGEDWNSVMYDGMAYGGPSFPGMLVCIYFIIIFICGNYILLNVFLAIAV DNLADAE/
Iso20	
Cadeia III	
4LTO	PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLF-----AQSFPWFGLGASMYTLFQVMTLESWSMGIAR----- PVIEAYPWAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGIIISMQSAH/ RTIGNIVIVITLLQFMFACIGVQLFKGKLYTCSDSKFDNVLAAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEKGPINRVEISIFIIYIIIIAFFMMNIFVGF VIVTFQEQG/
Iso20	
Cadeia IV	
4LTO	PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLFAQ-----SFPEWFGTLGASMYTLFQVMTLESWS--MGIARPVIEAYP----- WAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGIIIS*
Iso20	QALPYVALLIVMLFFIYAVIGMQVFGKIALNDTTEINRNNNFQTFPQAVLLLFRCATGEAWQDIMLACMPGKKCAPESEPSNSTEGETPCGSSFAVYFISF YMLCAFLIINLFAVIMDN*

Anexo 2 Alinhamento entre as seqüências PDB ID:2A9H PDB ID:4LTO e QIso20 feitas com o programa **Clustal Omega**

Cadeia I	
2A9H	ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAERGAAGAA-----LISYDPALWWSVETATTVGYG-DLYPVT----- LWGRCVAVVVMVAGITSYGLVFAAVATWVFG-REQ/
4LTO	---PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLFAQSFPEW-----FGTLGASMYTLFQVMTLESWSMGIARPVIEAY--PWAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGII-----/
Iso20	IKAMVPLLHIALLVLFVIIIYAIIGLELFMGKMHKTCYNGITNFDNFAFAMLTVFQCITMEGWT- DVLYWVNDAVGRDWPWIYFVTLIIIGSFVNLNLVGLVLSGEFSKERE/
Cadeia II	
2A9H	ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAER-GAPGAA-----LISYDPALWWSVETATTVGYGDLYPVT----- LWGRCVAVVVMVAGITSYGLVFAAVATWVFGREQ/
4LTO	---PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLFAQSF-----EWFGLGASMYTLFQVMTLESWSM---GIARPVIEAYP-- WAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGIIISMQSAH/
Iso20	LNSVRSIASLLLLLFLFIIIFSLGMLFGGKFNFDQMQRTRSTFDNFPQSLTLVFQILTGEDWNSVMYDGMAYGGPSFPGMLVCIYFIIIFICGNYILLNVFL AIAVDNLADAE/
Cadeia III	
2A9H	ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAER-GAPGAA-----LISYDPALWWSVETATTVGYGDLYPVT----- LWGRCVAVVVMVAGITSYGLVFAAVATWVFGREQ/
4LTO	---PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLF-----AQSFPWFGLGASMYTLFQVMTLESWSMGIAR----- PVIEAYPWAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGIIISMQSAH/
Iso20	FVARTIGNIVIVITLLQFMFACIGVQLFKGKLYTCSDSKFDNVLAAAMMALFTVSTFEGWPELLYRSIDSHTEKGPINRVEISIFIIYIIIIAFFMMNI FVGFVIVTFQEQG/
Cadeia IV	
2A9H	ALHWRAAGAATVLLVIVLLAGSYLAVLAER-GAPGAA-----LISYDPALWWSVETATTVGYGDLYPVT----- LWGRCVAVVVMVAGITSYGLVFAAVATWVFGREQ*
4LTO	---PGIAWIALLLLVIYVFAVMGKTLFAQ-----SFPEWFGTLGASMYTLFQVMTLESWS--MGIARPVIEAYP----- WAWIYFVSFILVSSFTVLNLFIGIIIS-----*
Iso20	IKSFQALPYVALLIVMLFFIYAVIGMQVFGKIALNDTTEINRNNNFQTFPQAVLLLFRCATGEAWQDIMLACMPGKKCAPESEPSNSTEGETPCGSSFAVY FISFYMLCAFLIINLFAVIMDNFDYLT*

Anexo 3. Resultados (ainda não publicados) dos ensaios biológicos realizados para a atividade leishmanicida.

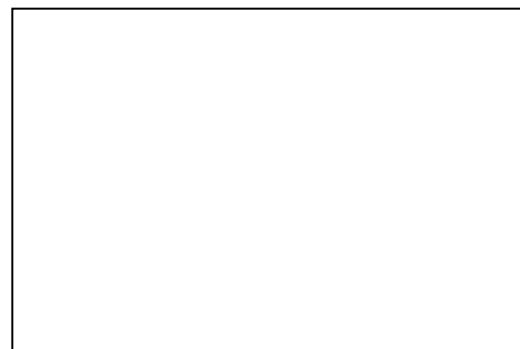
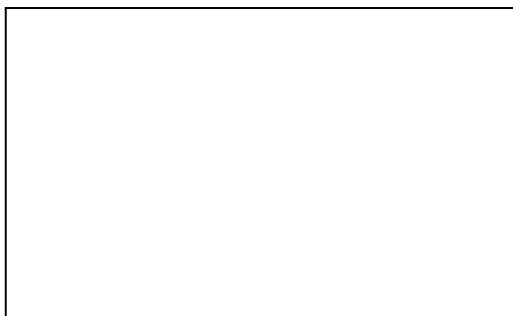
Nome	EC50(uM)	CC50 (uM)	Selective index	Mean Max. Activity_R1 (%)	Mean Max. Activity_R2 (%)	Mean (R1 and R2)
Amphoterin B	1.06 ± 0.04	ND	> 9.43	85,28	98	91,64
PDJ15	ND	ND	-	23,02	14,72	18,87
PDJ16	ND	ND	-	31,64	39,92	35,78
PDJ17	ND	ND	-	23,47	7,84	15,66
PDJ26	ND	ND	-	55,19	26,44	40,82
PDJ27	ND	ND	-	21,05	10,68	15,87
PDJ28	ND	ND	-	37,33	37,85	37,59
PDJ29	ND	ND	-	27,72	15,86	21,79
FCT01	ND	47.41 ± 10.01	-	27,72	20,44	24,08

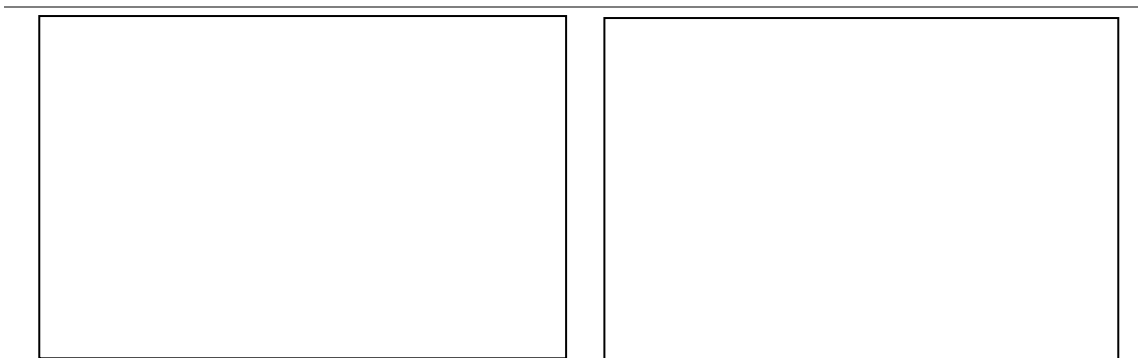
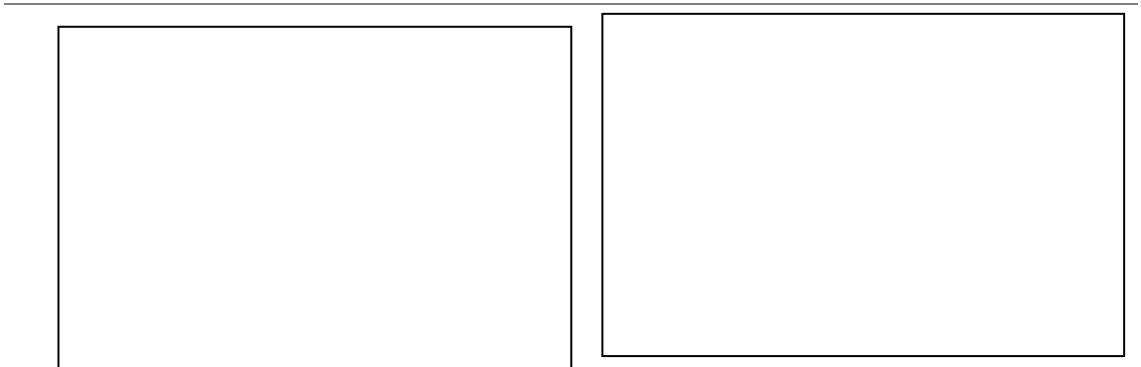
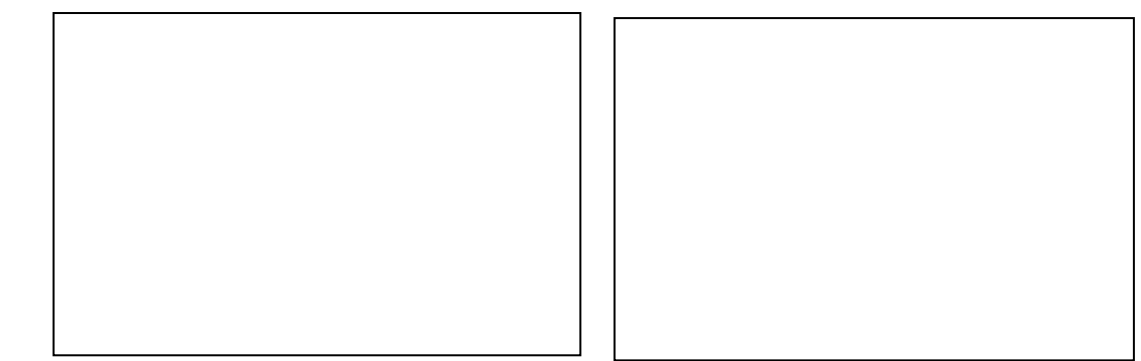
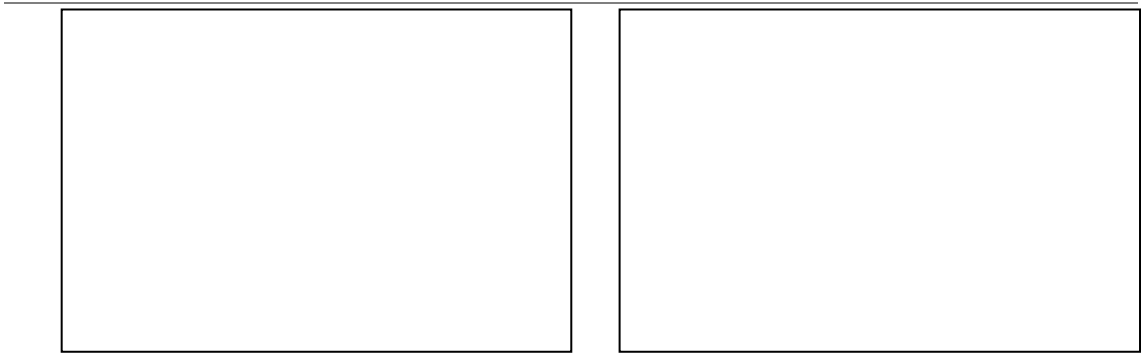
Legenda: Os valores de: EC50 indicam a concentração do composto que reduz a relação de infecção normalizada a 50%, CC50 indicam os valores da concentração do composto no qual a proporção de células normalizado é reduzida para 50%, S.I. (índice de seletividade) é a razão entre o valor de CC50 e EC50 e os valores em duplicata da média máxima de atividade (Mean Max. Activity) em porcentagem.

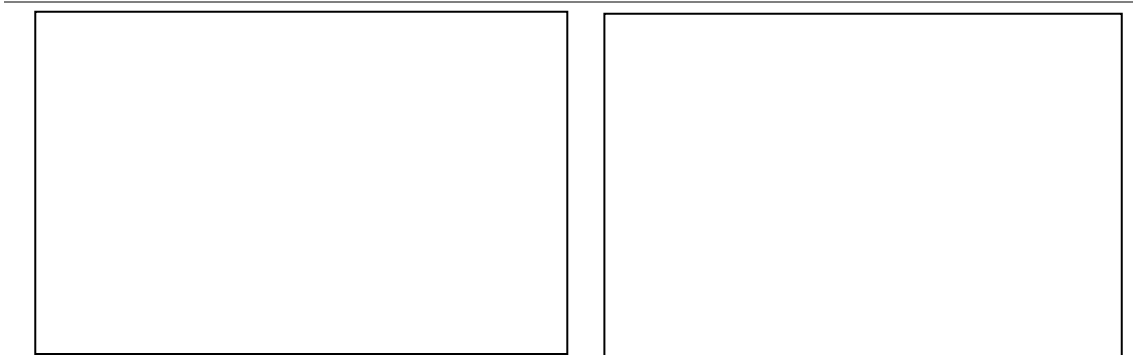
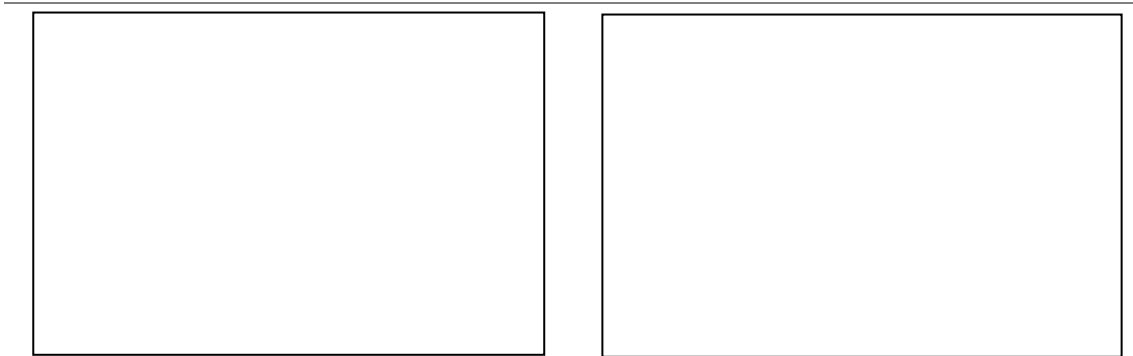
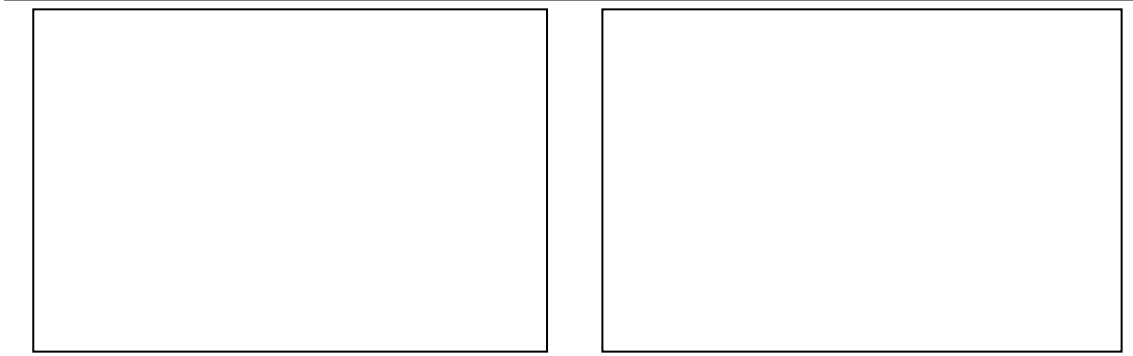
Anexo 4. Gráficos relativos a Curva Dose Resposta relativos as atividades leishmanicidas dos compostos sintetizados por nosso grupo de síntese e o controle Anfotericina B.

Dose Response Curve - R1

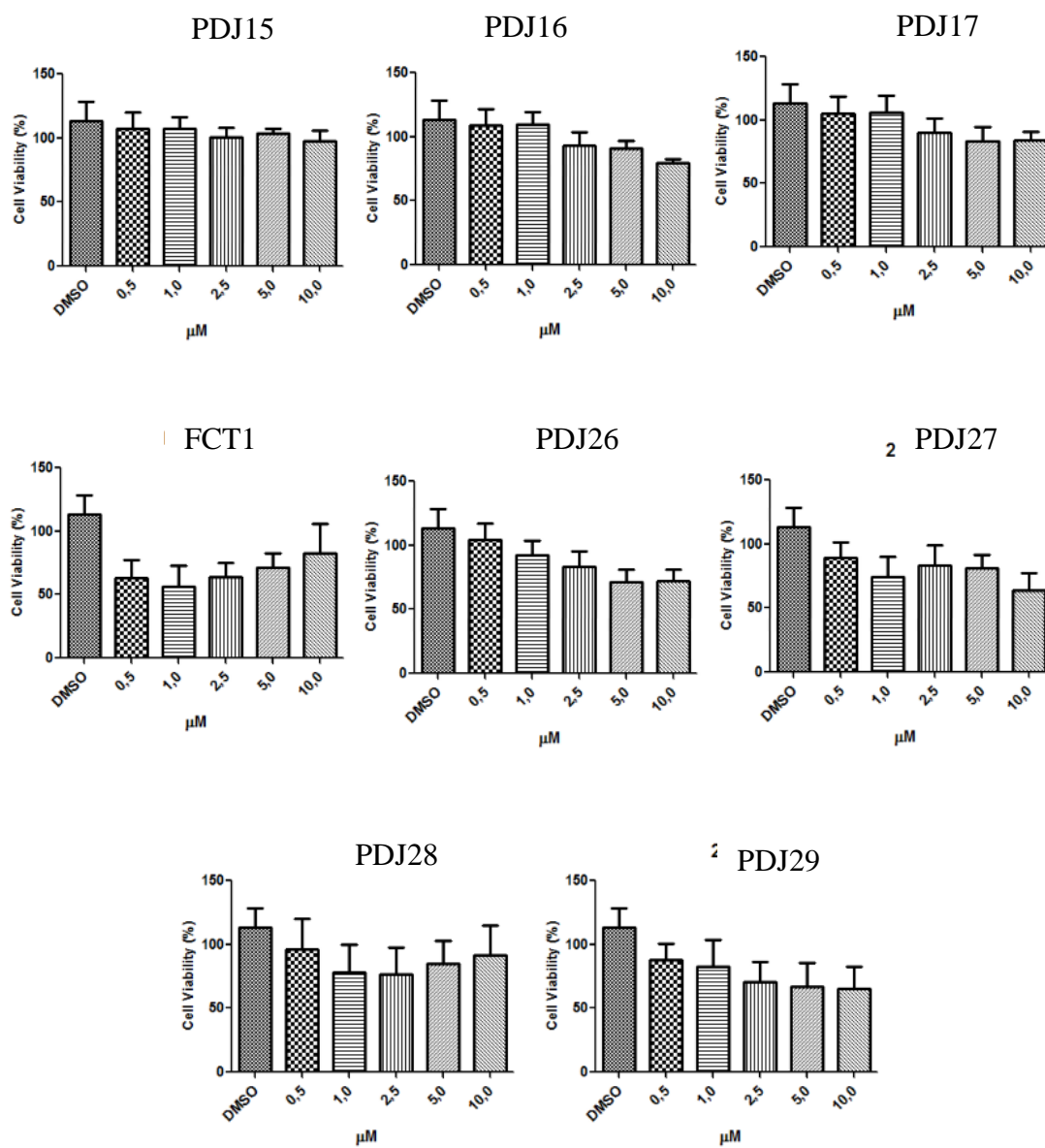
Dose Response Curve - R2







Anexo 5. Esquemas gráficos dos resultados (ainda não publicados) obtidos em ensaios biológicos para a atividade antineoplásica dos compostos PDJ15, PDJ16, PDJ17, FCT1, PDJ26, PDJ27, PDJ28 e PDJ29.



7.2. Produção Científica

Durante o período de doutoramento submetemos, a revistas especializadas, artigos relacionados ao nosso projeto, em projetos paralelos e em colaboração. Os mesmos estão listados abaixo, bem como, encontra-se descrito o estágio de aprovação em que os mesmos se encontram.

1. Federico, L.B.; dos Santos, C.B.R.; Lobato C.C.; Gomes J.S., Campos, J.M.; da Silva C.H.T.P. Ligand- and structural based drug discovery for calcium channel blockers, *Journal of Computational and Theoretical Nanoscience*. (aprovado)
2. Federico, L.B.; de Almeida, J.R.; Taft C.A.; da Silva C.H.T.P. Ligand and Structure-Based Drug Design as Strategies for the Screening of New BACE1 Inhibitor Candidates, *Current Physical Chemistry*, 5(3): 253-262, 2016.
3. Diniz, E.M.L.P.; da Silva, C.H.T.P.; Perez, V. G.; Federico, L.B.; Campos, J.M. GRIND2-based 3D-QSAR and Prediction of Activity Spectra for Symmetrical Bis-Pyridinium Salts with Promastigote Antileishmanial Activity, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* (aprovado)
4. de Araujo Volpini, J.G.; Rodrigues, R.P.; Federico, L.B.; da Silva, C.H.T.P. Structure-Based Drug Design of Novel MARK-3 Inhibitors in Cancer, *Current Bioactive Compounds*, 10(2):131,138, 2014.
5. Pereira, A.L.; dos Santos, G.B.; Franco, M.S.F.; Hage-Melim, L.I.S. , Federico, L.B.; da Silva, C.H.T.P; Santos, C.B.R. Molecular Modeling and Statistical Analysis in the Design of Derivatives of Human Dipeptidyl Peptidase IV, *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. (Submetido)
6. Macêdo, W.J.C.; Costa, J.S.; Federico, L.B.; Cruz, J.V.; Souza, D.S.; Carvalho, J.C.T. Silva, C.H.T.P.; Hage-Melim, L.I.S.; Santos C.B.R. A MLR, ADME/Tox and Synthetic Viability Study of New Dihydroartemisinin Compounds with Antimalarial Activity, *Medicinal Chemistry*. (Submetido)