

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

S211d Sanches, Vitor Hugo
Desenvolvimento de candidatos a fármacos para
tratamento da Leucemia Mielóide Crônica a partir do
Imatinibe / Vitor Hugo Sanches. — 2020.
LI, 51 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Cleydson Breno Santos
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de
Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém,
2020.

1. Imatinibe. I. Título.

CDD 610



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM
MOLECULAR- PPGQMMM

VITOR HUGO DA SILVA SANCHES

DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA TRATAMENTO DE
LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA A PARTIR DO IMATINIBE

BELÉM- PA
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM
MOLECULAR- PPGQMMM

VITOR HUGO DA SILVA SANCHES

DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA TRATAMENTO
DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA A PARTIR DO IMATINIBE

Projeto de dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Universidade Federal do Pará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do diploma de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos.

BELÉM- PA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM
MOLECULAR- PPGQMMM

VITOR HUGO DA SILVA SANCHES

DESENVOLVIMENTO DE CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA TRATAMENTO
DA LEUCEMIA MIELÓIDE CRÔNICA A PARTIR DO IMATINIBE

Banca Examinadora

Prof. Dr. Cleydson Breno Rodrigues dos Santos (Orientador)
(UNIFAP)

Prof. Dr. Rosivaldo dos Santos Borges
(UFPA)

Prof. Dra. Gabriela Bianchi dos Santos
(UFOPA)

Prof. Dra. Mayara Amoras Teles Fujishima (Suplente)
(UNIFAP)

Julgado em: ____ / ____ / ____

Resultado: _____

RESUMO

A Leucemia Mielóide Crônica (LMC) é uma doença mieloproliferativa crônica clonal, caracterizada por leucocitose com desvio à esquerda, esplenomegalia e pela presença do cromossomo *Philadelphia* (Ph), que resulta da translocação recíproca e equilibrada entre os braços longos dos cromossomos 9q34 e 22q11, gerando a proteína híbrida BCR-ABL, com atividade aumentada de tirosina quinase. Assim, realizou-se um estudo de triagem virtual baseado no ligante Imatinibe, com pose cristalográfica definida, depositada sob código PDB ID 1IEP. Foram utilizadas seis bases de dados comerciais para seleção de moléculas, por meio do software ROCS (similaridade por forma) e EON (similaridade eletrostática), seguidas de predição farmacocinéticas e toxicológicas *in silico*, resultando em 9 estruturas com valores satisfatórios, comparados com o Imatinibe, que foram submetidas a estudo de predição de atividade biológica via servidor online *PASS Prediction*, resultando em duas estruturas com valores de Probabilidade de ser “ativo” (Pa) para atividade de inibição a proteína quinase, sendo as moléculas LMQC01 (Pa= 0,457) e LMQC04 (Pa= 0,658), selecionadas para estudo de docking molecular. Utilizou-se a interface gráfica *Pyrx 0.8*, para avaliar as prováveis interações com os resíduos de aminoácidos e a afinidade de ligação as estruturas com o sítio ativo BCR-ABL, resultando em -8.6Kcal/mol^{-1} para a estrutura LMQC01 e $-12.2\text{Kcal/mol}^{-1}$ para LMQC04, sendo que a estrutura LMQC04 alcançou valor superior a afinidade de ligação experimental do imatinibe ($-11.18\text{Kcal/mol}^{-1}$), sendo este selecionado como fármaco promissor para estudos posteriores.

Palavras chave: LMC; Imatinibe; 1IEP; Tirosina quinase; atividade biológica.

ABSTRACT

Chronic Myeloid Leukemia (CML) is a chronic clonal myeloproliferative disease, characterized by leukocytosis with left shift, splenomegaly and the presence of the Philadelphia (Ph) chromosome, which results from the reciprocal and balanced translocation between the advanced states of chromosomes 9q34 and 22q11, generating a hybrid protein BCR-ABL, with increased activity of tyrosine kinase. Thus, it carried out a virtual screening study based on the ligand Imatinib, with a defined crystallographic pose, deposited under the code PDB ID 1IEP. Six databases of merchants were used to select molecules, using the software ROCS (shape similarity) and EON (electrostatic similarity), followed by pharmacokinetic and toxicological predictions in silicon, resulting in 9 methods with satisfactory values, compared with Imatinib, which were submitted to a study of biological activity prediction via PASS Prediction online server, resulting in two structures with Probability of being "active" (Pa) values for protein kinase inhibition activity, such as LMQC01 molecules (Pa = 0.457) and LMQC04 (Pa = 0.658), selected for the study of molecular docking. Use a Pyrx 0.8 graphical interface, to evaluate as likely interactions with amino acid residues and binding affinity as structures with the BCR-ABL active site, resulting in -8.6Kcal / mol-1 for structure LMQC01 and -12.2Kcal / mol -1 for LMQC04, with the LMQC04 structure reaching a value higher than the experimental binding affinity of imatinib (-11.18Kcal / mol-1), being the one selected as a drug promoter for further studies.

Keywords: LMC; Imatinib; 1IEP; Tyrosine kinase; biological activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Partes do cromossomo 9 e 22 se rompem. Formando o gene BCR-ABL. O cromossomo 22 alterado é chamado de Cromossomo Philadelphia.	15
Figura 2 - Estrutura química do imatinibe, inibidor de tirosina quinase de primeira geração.....	17
Figura 3 - Mecanismo de ação do imatinibe, causando inibição do processo de fosforilação e ativação do resíduo tirosina quando o imatinibe se liga no domínio quinase	18
Figura 4 - Fluxograma de atividades metodológicas; Triagem virtual baseada em ligante (similaridade por forma), EON (similaridade eletrostática), previsões Farmacocinéticas e Toxicológicas, predição de atividade biológica e Docagem molecular.....	29
Figura 5- Superposições do ligante com pose cristalográfica (em vermelho) com as poses calculadas (em verde).....	37
Tabela 6- Interações do imatinibe com resíduos de aminoácidos.....	38
Figura 7- Interações preditas entre o sítio ativo da tirosino-quinase BCR-ABL e o composto LMQC01.....	39
Figura 8- Interações preditas entre o sítio ativo da tirosino-quinase BCR-ABL e o composto LMQC04.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mortalidade por Leucemia mielóide, homens e mulheres, Brasil, entre 2010 e 2014.....	13
Tabela 2- Protocolos usados no estudo de docking molecular.....	28
Tabela 3 – Alertas toxicológicos resultantes do software Derek Nexus.....	30
Tabela 4 - Valores farmacocinéticos dos compostos obtidos pela triagem virtual que apresentaram atividade biológica para o objetivo da pesquisa.....	332
Tabela 5- Compostos que apresentaram valores de atividade biológica para atividade de inibição tirosina quinase.....	34
Tabela 6- Valores de afinidade de ligação dos compostos estudados.....	36
Tabela 7 – Interações com resíduos de aminoácidos e respectivas distâncias.....	38

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	OBJETIVOS	11
2.1	OBJETIVO GERAL	11
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3.1	LEUCEMIA.....	12
3.1.1	Leucemia mielóide crônica (LMC)	12
3.1.2	O cromossomo <i>Philadelphia</i>	14
3.1.3	Tirosina-quinase (TQs)	16
3.1.4	Inibidores de tirosina-quinase e o tratamento para LMC	16
3.1.5	A linhagem celular K562.....	19
3.2	USO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA PLANEJAMENTO DE FARMÁCOS.....	19
3.2.1	Planejamento de fármacos usando a modelagem molecular	20
3.2.2	Triagem virtual baseada em ligantes.....	21
3.2.3	Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas	21
3.2.4	Predição de atividade biológica.....	23
3.2.5	Docking Molecular	24
3.3	COMPOSTO ESTUDADO E TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM LIGANTES	25
3.4	PREDIÇÃO PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS	26
3.5	SERVIDOR PASS.....	27
3.6	DOCKING MOLECULAR	27
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	30
4.1	TRIAGEM VIRTUAL.....	30
4.2	PREDIÇÕES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS.....	29
4.3	Predição de atividade biológica.....	34
4.4	Resultado do Estudo de <i>Docking molecular</i>	36

5	CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	43
6	REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

A leucemia é uma neoplasia do tecido hematopoiético originário da medula óssea. De acordo com o grau de maturidade e a linhagem das células afetadas, a leucemia pode ser aguda caracterizando-se pela proliferação de células imaturas (ou blastos) na medula óssea, sangue periférico e outros órgãos. A leucemia crônica caracteriza-se pela proliferação de células aparentemente maduras, na medula, sangue periférico e em vários órgãos. A doença tem curso lento, quando comparado com o curso da leucemia aguda, com um intervalo de 2-6 anos entre o diagnóstico e o surgimento da fase acelerada, dependendo do subtipo de célula proliferativa. As leucemias podem ser classificadas segundo a linhagem celular envolvida em duas categorias: mielóide e linfóide. Assim, temos leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC) (CAÑEDO, 2005).

A linhagem celular K562 foi estabelecida pelo cultivo de células de um paciente com leucemia mielóide crônica, onde cromossomos Philadelphia estavam presentes (LOZZIO, 1975). Esta linhagem possui um considerável grau de plasticidade que permite sua diferenciação, quando submetida a diferentes agentes químicos, em células eritróides, com produção de hemoglobina fetal (HbF). Esta plasticidade faz da linhagem celular K562 um ótimo modelo experimental para trabalhos envolvendo “terapia da diferenciação do câncer”, que é o tratamento de células neoplásicas com agentes indutores de diferenciação celular. Esta linhagem é amplamente utilizada como modelo para estudar drogas com capacidade antiproliferativa que possam ser usadas no tratamento desta doença (TSIFTSOGLU *et al.*, 2003).

O gene híbrido BCR-ABL produz uma proteína quimérica com atividade tirosino quinase elevada que é responsável pela patogênese da LMC. O resultado desta atividade elevada induz a medula óssea a proliferar um clone de células mieloides malignas constantemente, resultando um número excessivo destas células. Por ser uma enzima que participa do metabolismo celular, a tirosino quinase está relacionada a várias patologias. A enzima tirosino quinase Abl confere à célula leucêmica alta resistência à morte celular independentemente do agente indutor deste processo (HAMÚ *et al.*, 2007).

Estudos têm evidenciado o papel essencial do controle da atividade da tirosino quinase Abl para o tratamento da LMC. As novas drogas estão sendo desenvolvidas para que sejam utilizadas em pacientes nos quais o tratamento convencional tenha falhado ou que efeitos adversos intensos tenham sido observados no paciente. A composição destas novas drogas baseia-se na inibição específica da expressão gênica da doença, e tem função de bloquear a atividade quinase da proteína Bcr/Abl levando à remissão da LMC (COWAN-JACOB et al., 2007).

Mais recentemente, foi desenvolvido e comercializado o *4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl]benzamide*, conhecido como imatinibe (STI- 571), um derivado do 2-fenil-aminopirimidina e inibidor seletivo da BCR-ABL tirosino-quinase, que induz remissão hematológica e citogenética na LMC. O Imatinibe é um medicamento anti-LMC de fácil tomada e de baixa incidência de efeitos colaterais graves.

Neste projeto de pesquisa propõe-se realizar estudos de triagem virtual baseado no ligante Imatinibe que tem atividade biológica conhecida para o tratamento da LMC. Será utilizado como composto pivô (*template*) na busca de compostos promissores, por meio da triagem virtual, determinação farmacocinética e toxicológica, na etapa *in silico*, a fim de obter candidatos a novos fármacos com atividade antiproliferativas nas células cancerígenas K562. Finalmente, esses compostos selecionados serão realizados ensaios biológicos a fim de comprovar a atividade antiproliferativa.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver candidatos a fármacos para o tratamento da Leucemia Mielóide Crônica (LMC) a partir do Imatinibe.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar o composto pivô na conformação bioativa com atividade biológica para LMC;
- Realizar triagem virtual baseada em ligantes usando os programas ROCS V2.4.1 (*Rapid Overlay of Chemical Structures* - similaridade por forma) e EON (similaridade eletrostática) em seis bases de dados de compostos comerciais;
- Predizer as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas utilizando *QikProp* e *DEREX NEXUS*, respectivamente;
- Avaliar a predição de atividade biológica *in silico* usando o servidor online PASS para os compostos promissores;
- Realizar estudo de docking molecular usando o software *Pyrx* 0.8 para os compostos mais promissores com a proteína proveniente do PDB 1IEP;

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 LEUCEMIA

A leucemia é uma doença maligna que ocorre nos glóbulos brancos (Leucócitos) e na maioria das vezes de origem desconhecida, essa doença começa na medula óssea, se espalhando mais tarde por outras partes do corpo, a medula óssea é o local de formação das células sanguíneas ocupando a cavidade dos ossos e conhecida popularmente por tutano. Nelas são encontradas as células mães ou precursoras que dá origem aos elementos do sangue: glóbulos brancos, glóbulos vermelhos (hemácias ou eritrócitos) e plaquetas. A leucemia prejudica ou impede a produção dos glóbulos vermelhos, causando anemia, nos glóbulos brancos causando infecções e o das plaquetas causando hemorragia e depois de instalada a doença desenvolve rapidamente pelo corpo (SANTOS, 2014).

A leucemia crônica caracteriza-se pela proliferação de células aparentemente maduras, na medula, sangue periférico e em vários órgãos. A doença tem curso lento, quando comparado com o curso da leucemia aguda, com um intervalo de 2-6 anos entre o diagnóstico e o surgimento da fase acelerada, dependendo do subtipo de célula proliferativa. As leucemias podem ser classificadas segundo a linhagem celular envolvida em duas categorias: mielóide e linfóide. Assim, temos leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia mielóide crônica (LMC), leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia linfóide crônica (LLC) (DELGADO-CAÑEDO, 2005).

3.1.1 Leucemia mielóide crônica (LMC)

A leucemia mielóide crônica (LMC) é uma doença clonal maligna caracterizada por uma excessiva proliferação da linhagem mielóide (Fase Crônica - FC), seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular (Fase Acelerada - FA) e terminando num quadro de leucemia aguda (Fase Blástica - FB). A doença é associada a uma anormalidade citogenética específica, o Cromossoma Philadelphia (Ph), que resulta de uma translocação recíproca entre os braços longos dos cromossomas 9 e 22, isto é, a t(9;22) e leva à formação de um novo gene leucemia-

específico, o BCR-ABL, detectável por polymerase-chain-reaction assay (PCR).¹ Atualmente, a LMC não é uma doença curável com a terapia medicamentosa, sendo o transplante de medula óssea (TMO) alogênico (aparentado ou não aparentado) a única modalidade curativa de tratamento, por induzir remissão molecular com a eliminação dos transcritos BCR-ABL.(DOBBIN; GADELHA, 2002; PEGGS, 2003).

Sob o ponto de vista epidemiológico, a incidência da LMC é de 1 a 2 casos para cada 100.000 habitantes/ano, é uma neoplasia mieloproliferativa que responde por 15 a 20% de todos os casos de leucemia em adultos. A mediana de idade ao diagnóstica é de 55 a 60 anos, com menos de 10% dos casos em pacientes com menos de 20 anos (TEFFERI et al., 2005)

Para o Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou para 2018 e 2019, o diagnóstico de 10.800 novos casos de leucemias (5.940 em homens e 4.860 em mulheres), incluindo adultos e crianças. Esses valores correspondem a um risco estimado de 5,75 casos novos a cada 100 mil homens e 4,59 a cada 100 mil mulheres. Cerca de 10% dos novos casos de leucemia são de leucemia mielóide crônica (INCA, 2018). Na Tabela 1 são mostrados o número de mortes por leucemia mielóide no Brasil entre 2010 e 2014.

Tabela 1 - Mortalidade por Leucemia mielóide, homens e mulheres, Brasil, entre 2010 e 2014.

Ano	Óbito total	Óbitos por Leucemia Mielóide	Percentual
2010	1136947	2736	0,24
2011	1170498	2833	0,24
2012	1181166	2853	0,24
2013	1210474	2966	0,25
2014	1227039	2953	0,24

Fonte: Sistema de Informação sobre Mortalidade – SIM (BRASIL, 2015a)

Para o diagnóstico de leucemia mielóide crônica os exames laboratoriais são hemograma completo, aspiração e biopsia da medula óssea, pesquisa do cromossomo Philadelphia. Para o diagnóstico genético os testes atualmente disponíveis são: citogenética padrão, hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), reação de cadeia de polimerase (PCR) e através de análise por Northern e Southern blot. A análise citogenética padrão é considerada padrão ouro, podendo revelar cromossomo Philadelphia em 90% dos pacientes (Redaelli et al, 2004).

A leucemia mielóide crônica se caracteriza por três fases distintas: fase crônica, fase acelerada, e crise blástica. A fase crônica dura vários anos e é caracterizado por um aumento de precursores mielóides e células maduras na medula óssea, sangue periférico e células extra-medulares. A fase acelerada dura 4 a 6 meses e é caracterizado por agravamento da doença e no aumento das células progenitoras em relação às células diferenciadas. A fase conhecida como crise blástica dura poucos meses e se caracteriza por rápida expansão das células blásticas mielóides ou linfóides-diferenciadas (Calabretta et al, 2004).

A evolução clínica da LMC apresenta três fases: crônica, acelerada e blástica. A fase crônica é caracterizada por hiperplasia e intensa maturação de células mielóides, sendo que alguns pacientes são assintomáticos, enquanto outros apresentam fadiga, astenia, cefaléia, irritabilidade, febre, sudorese noturna e perda de peso. O diagnóstico é realizado pelos achados clínicos, citogenéticos e hematológicos do sangue periférico e medula óssea e suas manifestações são controladas por quimioterapia oral (DULLEY; HAMERSCHLACK, 2004; JAMUR, 2005)

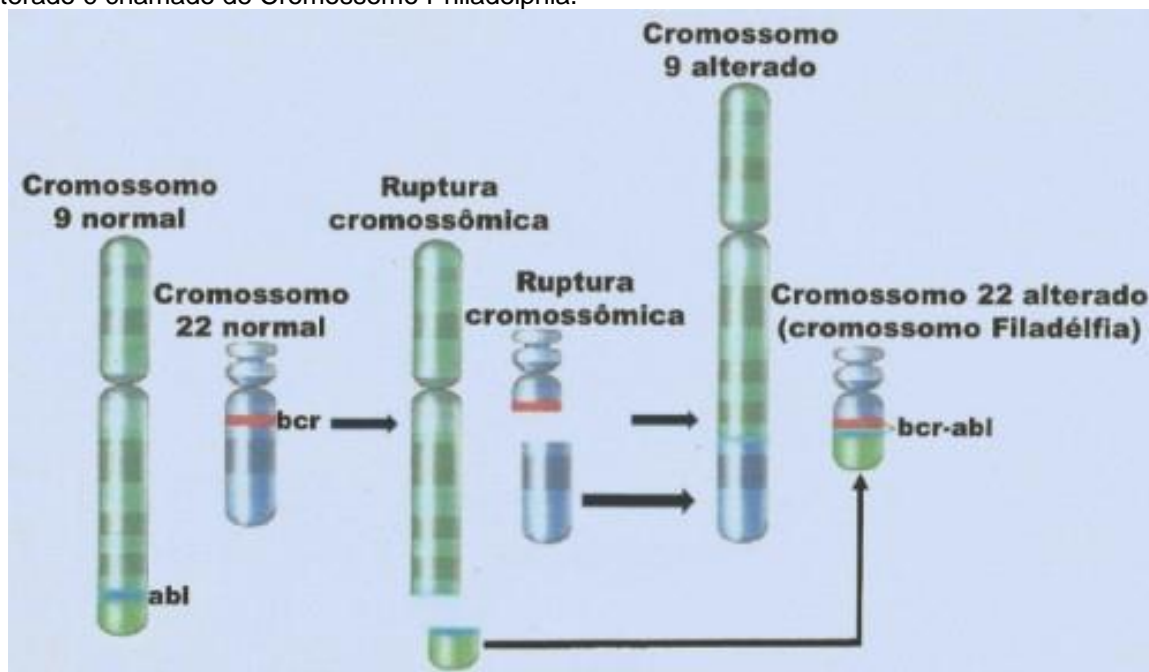
3.1.2 O cromossomo *Philadelphia*

O gene BCR (*Breakpoint Cluster Region*) está mais envolvido na translocação dos cromossomos 9 e 22, possui aproximadamente 100kb de comprimento, sendo dividido em 20 *exons* com 2 sítios de *splicing* e possui 3 regiões de quebra denominadas “Major Breakpoint Cluster Region” (M-BCR), “*Minor Breakpoint Cluster Region*” (m-BCR) e “*Micro Breakpoint Cluster Region*” (μ -BCR) (MARU; WITTE, 1991). Este gene codifica uma proteína de 160KDa que é expressa em vários tipos celulares, sendo mais expressa em células hematopoiéticas e que também está envolvida na transdução de sinais (RANDOLPH, 2005).

O gene ABL (*Abelson Leukemia Virus*) com 230kb de comprimento, sendo dividido em 11 *exons* e 2 sítios de *splicing*, codifica uma proteína p145 que expressa o domínio tirosina-quinase, que tem papel importante no crescimento celular e na indução da apoptose e reparo no DNA, sendo esta proteína participante do processo de transdução de sinais (RANDOLPH, 2005).

Devido a ruptura das partes dos cromossomos 9 e 22, o gene ABL do cromossomo 9 junta-se com o gene BCR do cromossomo 22, formando o gene BCR-ABL. O gene híbrido é chamado de cromossomo *Philadelphia* (Figura 1).

Figura 1 – Partes do cromossomo 9 e 22 se rompem. Formando o gene BCR-ABL. O cromossomo 22 alterado é chamado de Cromossomo Philadelphia.



Fonte: NATIONAL-CANCER-INSTITUTE (2010)

O gene BCR-ABL codifica uma tirosina-quinase que se liga ao ATP e transfere o fosfato do ATP para outras proteínas, e estas proteínas tornam-se responsáveis por toda uma série de etapas, que levam aos defeitos fisiopatológicos da LMC. O resultado desta atividade elevada induz a medula óssea a proliferar um clone de células mieloides malignas constantemente, resultando em um número excessivo destas células. (DRUKER et al., 2006). Este gene também pode bloquear a liberação do citocromo C pela mitocôndria e assim inibir as caspases, inibindo a apoptose das células leucêmicas (DEININGER; GOLDMAN; MELO, 2000).

Por ser uma enzima que participa do metabolismo celular, a tirosino-quinase está relacionada a várias patologias. Estudos têm evidenciado o papel essencial do controle da atividade da tirosino quinase ABL para o tratamento da LMC. As novas drogas estão sendo desenvolvidas para que sejam utilizadas em pacientes nos quais o tratamento convencional tenha falhado ou que efeitos adversos intensos tenham sido observados no paciente. A composição destas novas drogas baseia-se na

inibição específica da expressão gênica da doença, e tem função de bloquear a atividade quinase da proteína BCR-ABL levando à remissão da LMC (COWAN-JACOB et al., 2007)

3.1.3 Tirosina-quinase (TQs)

As TQs são enzimas que após a ligação do ligante (hormônios ou xenobióticos) sofrem uma dimerização e, conseqüentemente, catalisam a fosforilação de proteínas através da transferência de um grupo γ -fosfato do ATP para grupos hidroxila de resíduos de tirosina (Tyr) em substratos protéicos. Esta ação cria sítios de ligação para o recrutamento de proteínas sinalizadoras o que causa estímulos extracelulares e intracelulares que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade de proteínas. Desta forma, funcionam como componentes para as vias de transdução de sinal, estando intimamente relacionadas com diversos processos biológicos, tais como angiogênese, proliferação, sobrevivência, diferenciação, função e quimiotaxia. (VLAHOVIC & CRAWFORD, 2003).

O potencial terapêutico dos inibidores de quinase é enaltecido pelo seu sucesso no tratamento do câncer. No entanto, os inibidores de quinase também estão sendo investigados para o tratamento de outras doenças como a artrite, diabetes, doenças neurológicas e virais (LI & STAFFORD, 2009).

3.1.4 Inibidores de tirosina-quinase e o tratamento para LMC

Na LMC, o gene BCR-ABL é ativado pela fosforilação de proteínas, como a tirosina quinase, quando ligado a um grupo trifosfato de adenosina (ATP). Estas proteínas criam uma cascata de ativação que resultam em um crescimento descontrolado. As novas drogas antineoplásicas ocupam o local de ligação ao ATP fazendo com que este não doe grupo fosfato. Sem a ativação deste grupo não há ativação da cascata de sinalização, o que inibe a divisão celular; portanto, a proteína kinase Bcr-Abl tem um papel fundamental na patogênese da LMC (FAUSEL, 2007).

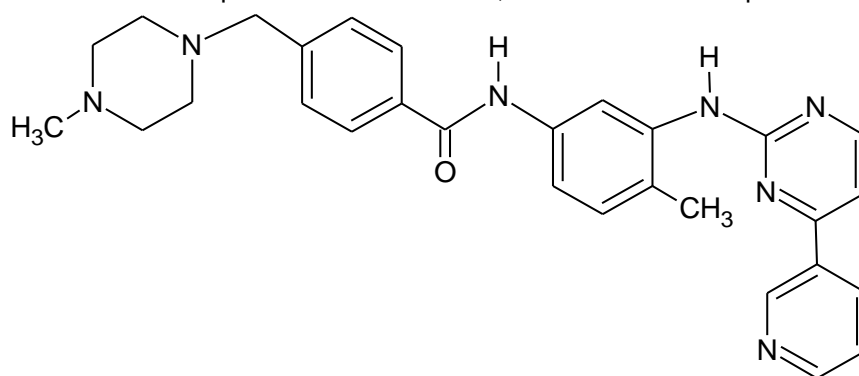
Embora as quinases sejam alvos promissores, o desenvolvimento de inibidores ainda é um grande desafio, uma vez que essas enzimas estão relacionadas com

diversos processos biológicos e sua inibição pode gerar inúmeros efeitos secundários. Apesar de anos de esforço em pesquisa nesta área, foram, relativamente, poucos os inibidores de quinase aprovados pelos órgãos reguladores para o uso em humanos (SAMPAIO, 2011).

A inibição de tirosinas-quinase pode ser alcançada através de compostos que impeçam sua atividade catalítica ou a ativação enzimática (através da inibição do processo de dimerização).

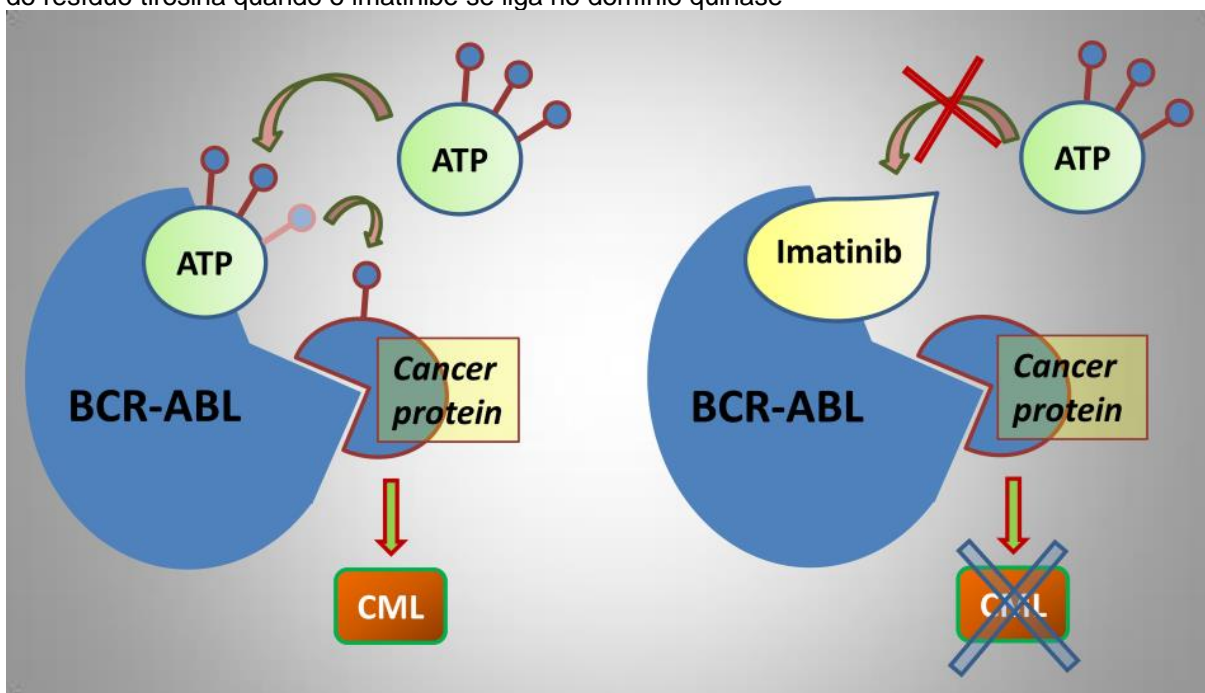
Motivado pelos trabalhos pioneiros coordenados por Weinberg, Barbacid e muitos outros, considerando a insatisfação com a eficácia e tolerabilidade limitada dos antitumorais disponíveis, engajou-se em um programa de descoberta de novos fármacos, objetivando desenvolver, racionalmente, novos tratamentos quimioterápicos contra o câncer. Este programa levou a descoberta e desenvolvimento, pelos laboratórios Novartis, do imatinibe (Figura 3), primeiro inibidor seletivo de tirosina-quinase a ser aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) dos EUA, em 2001, para o tratamento da leucemia mielóide crônica (SAMPAIO, 2011). Essa descoberta comprovou o benefício terapêutico de compostos que atuem através da inibição de tirosina-quinase, validando-as como alvo terapêutico promissor e revolucionou o tratamento desta enfermidade no mundo (CAPDEVILLE et al., 2002).

Figura 2 – Estrutura química 2D do imatinibe, inibidor de tirosina quinase de primeira geração.



O imatinibe tem mecanismo de ação pela inibição da tirosina quinase BCR-ABL através da ligação competitiva no sítio de ligação do ATP, bloqueando as vias de sinalização necessárias para a manutenção da leucemia (Figura 3) (TAMASCAR; RAMANARAYANAN, 2009).

Figura 3 - Mecanismo de ação do imatinibe, causando inibição do processo de fosforilação e ativação do resíduo tirosina quando o imatinibe se liga no domínio quinase



Fonte: Adaptado de Zaharieva et al (2009)

Entretanto, já foram relatados casos de resistência ao imatinibe no tratamento da leucemia mieloide crônica, a qual pode ocorrer por mecanismos diferentes: influxo e efluxo de imatinibe para dentro da célula, ligação do imatinibe as proteínas plasmáticas ou inativação enzimática. Também pode ocorrer perda da inibição da BCR-ABL resultante de mutações na ABL, que podem evitar a ligação correta do imatinibe, o que configura 50 a 90% dos casos resistentes (TAMASCAR; RAMANARAYANAN, 2009).

A resposta hematológica ao Imatinibe da LMC em fase de transformação é de 69% e, na fase blástica, de 52%, porém uma resposta hematológica de curta duração e sem a correspondente resposta citogenética. A remissão da fase aguda da LMC induzida pelo Imatinibe é curta e isto é devido à reativação do BCR-ABL, que caracteriza a resistência ao medicamento (DOBBIN; GADELHA, 2002)

Desta maneira, apesar dos excelentes resultados do tratamento com imatinibe, cerca de 15% dos pacientes apresentarão alguma forma de resistência ao tratamento (TAMASCAR; RAMANARAYANAN, 2009).

O tratamento da LMC pode ser realizado também por meio de transplante de células-tronco hematopoiéticas (TCTH), sendo esta a única modalidade terapêutica

considerada curativa, cujo sucesso depende de múltiplos fatores que incluem a idade, a fase da doença e a histocompatibilidade entre o doador e o receptor (BERGANTINI et al., 2005)

3.1.5 A linhagem celular K562

A linhagem celular K562 foi estabelecida a partir do cultivo de células de um paciente com leucemia mielóide crônica onde o cromossomo Philadelphia estava presente (LOZZIO; LOZZIO, 1975).

Esta linhagem possui um considerável grau de plasticidade que permite sua diferenciação, quando submetida a diferentes agentes químicos, em células eritróides, com produção de hemoglobina fetal (HbF), ou em células megacariocíticas, com aumento de tamanho e ploidia além de marcadores de superfície específicos (TSIFTSOGLOU; PAPPAS; VIZIRIANAKIS, 2003). Esta plasticidade faz da linhagem celular K562 um ótimo modelo experimental para trabalhos envolvendo o que se denomina de “terapia da diferenciação do câncer”, que é o tratamento de células neoplásicas com agentes indutores de diferenciação celular.

Além disso, por ter características eritróides, esta mesma abordagem metodológica sobre esta linhagem permite estudar os caminhos que levam à expressão de hemoglobina, fator de fundamental importância para o tratamento de pacientes com talassemia e anemia falciforme (DELGADO-CAÑEDO, 2005).

3.2 USO DE FERRAMENTAS COMPUTACIONAIS PARA PLANEJAMENTO DE FARMÁCOS

A modelagem molecular é aplicada no planejamento de fármacos, consistindo na geração, manipulação ou representação de estruturas moleculares e cálculo das propriedades físico-químicas associadas. De acordo com a União internacional da Química pura e aplicada (IUPAC), modelagem molecular é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e

técnicas de visualização gráfica, visa fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (WERMUTH, 2011).

A Modelagem Molecular faz uso de diferentes teorias e programas de computador para criar modelos da estrutura molecular e prever suas propriedades (como sua energia, potencial eletrostático, etc). Em Química Medicinal, a modelagem molecular é usada para se fazer o Planejamento de Fármacos Auxiliado por Computadores (CADD, do inglês *Computer Assisted Drug Design*). As estratégias empregadas para o CADD são divididas em dois grandes grupos, o Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura dos Ligantes (LBDD, do inglês *Ligand Based Drug Design*) e o Planejamento de Fármacos Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD, do inglês *Structure Based Drug Design*) (SANT'ANNA, 2014).

O planejamento de novas substâncias tem como principal objetivo a obtenção de compostos que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representarem novas entidades químicas, candidatas a protótipos de fármacos eficazes e seguros (BARREIRO et al., 2002).

A partir do avanço da Biologia Molecular, inúmeros processos biológicos foram identificados, fornecendo novos alvos farmacológicos para o planejamento e desenvolvimento de fármacos (PANCOTE, 2009).

3.2.1 Planejamento de fármacos usando a modelagem molecular

Modelagem molecular é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares usando a química computacional e as técnicas de visualização gráfica visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002).

A modelagem molecular consiste em uma técnica empregada para se estudar as características estruturais e propriedades físico-químicas de uma substância, empregando recursos da química computacional acopladas a interfaces gráficas. Esta, por sua vez, permite a obtenção de modelos tridimensionais (3D) representativos (AMARAL; MONTANARI, 2002; WERMUTH, 2003).

3.2.2 Triagem virtual baseada em ligantes

Inicialmente, a triagem virtual baseada em ligantes foi desenvolvida a partir de descritores 2D ou características moleculares específicas derivadas da estrutura de compostos ativos de referência e comparados com os correspondentes descritores das moléculas das bases de dados, lançando mão de uma medida de similaridade. Este método é, geralmente, muito rápido e fornece como resultado uma lista de compostos classificados de acordo com a sua similaridade ao quimiotipo das moléculas de referência. Posteriormente, buscando aumentar a diversidade estrutural dos protótipos fornecidos foram desenvolvidos diferentes métodos baseados em descritores 3D mais elaborados (GIGANTI et al., 2010).

A estratégia de triagem virtual está associada à busca de ligantes através de métodos computacionais que consideram a estrutura 3D de um alvo terapêutico (SCHNEIDER; BOHM, 2002). A triagem virtual baseada em ligantes é uma estratégia que utiliza compostos com atividade biológica já conhecida como fonte de informação inicial, sem levar em conta a estrutura de um alvo molecular. Esta abordagem visa a identificação de moléculas com certa semelhança estrutural e que possam compartilhar também atividade biológica (GEPPERT; VOGT; BAJORATH, 2010).

O objetivo central é o de prever compostos de uma base de dados capazes de interagir com o sítio ligante do alvo-molecular e ordenar estas moléculas de acordo com a sua afinidade pelo sítio receptor, com o intuito de identificar ligantes promissores com potencial atividade farmacológica (CASAVOTTO, 2007).

3.2.3 Propriedades farmacocinéticas e toxicológicas

A farmacocinética estuda o que o organismo faz com o fármaco, ao passo que a farmacodinâmica descreve o que o fármaco faz no organismo. Quatro propriedades farmacocinéticas determinam o início, a intensidade e a duração da ação do fármaco:

- Absorção: Primeiro, a absorção desde o local de administração permite a entrada do fármaco (direta ou indiretamente) no plasma.

- Distribuição: Segundo, o fármaco pode, então, reversivelmente, sair da circulação sanguínea e distribuir-se nos líquidos intersticial e intracelular.
- Biotransformação: Terceiro, o fármaco pode ser biotransformado no fígado ou em outros tecidos.
- Eliminação: Finalmente, o fármaco e seus metabólitos são eliminados do organismo na urina, na bile ou nas fezes.

A estratégia clássica de varrer milhares de compostos apenas baseado na potência biológica traz problemas para a indústria farmacêutica, visto que muitos compostos atrativos não apresentam propriedades farmacocinéticas requeridas para um fármaco (MODA; MONTANARI; ANDRICOPULO, 2007; MODA et al., 2008). Atualmente, estudos in silico dos parâmetros de absorção, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/Tox) são realizados em etapas preliminares do processo de desenvolvimento de fármacos, a fim de economizar tempo e delinear melhor o estudo de novos compostos (ABREU, 2011).

O programa *QikProp* (Schrödinger, LLC, 2015) realiza a predição de propriedades farmacocinéticas através da utilização de descritores com menor desprendimento computacional. O programa analisa a estrutura química como um todo, não apenas por fragmentos, e baseia as previsões sobre a estrutura em três dimensões. O programa pode prever com boa confiabilidade grande variedade de propriedades. Para cada descritor, além da predição, o programa ainda fornece um intervalo de valores tidos como ótimos. Essa faixa corresponde aos valores que abrangem 95% dos fármacos conhecidos, disponíveis no banco de dados do programa.

A toxicidade de fármacos é um fator de extrema importância, uma vez que um número significativo de fármacos são reprovados em ensaios clínicos devido a esta questão. Prever a mutagenicidade e carcinogenicidade de compostos, ajuda a evitar compostos tóxicos (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

A toxicologia farmacológica enfoca os efeitos prejudiciais de fármacos em animais e no corpo humano. Em praticamente todos os aspectos, os princípios farmacológicos discutidos nos capítulos anteriores aplicam-se ao estudo da toxicidade das substâncias. Por conseguinte, assim como as interações fármaco-receptor são fundamentais para compreender as propriedades benéficas de um fármaco, essas interações também são cruciais na compreensão dos efeitos adversos de um fármaco.

O *DEREK* (*Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge*) é um sistema especialista baseado no conhecimento para a predição qualitativa de toxicidade. O *DEREK* realiza essas predições tendo como base uma série de regras, e cada regra descreve a relação entre uma característica estrutural ou um grupo toxicóforo e sua toxicidade associada. Além de carcinogenicidade, pontos toxicológicos atualmente abrangidos pelo sistema do *DEREK* ainda incluem mutagenicidade, sensibilização da pele, irritação, teratogenicidade e neurotoxicidade (SANDERSON; EARNSHAW, 1991; RINDINGS; BARRATT; CARY, 1996; LHASA LIMITED, 2007; MANTOANI et al, 2014).

O Teste de Ames é um método simples para testar mutagenicidade de um composto, o qual é sugerido por Ames (1972), onde usa várias estirpes da bactéria *Salmonella typhimurium* com mutações nos genes envolvidos na síntese de histidina, a fim de que eles requeiram histidina para o crescimento. A variável a ser testada é a capacidade de o agente mutagênico provocar a reversão ao o crescimento em meio isento de histidina (AMES et al., 1972).

A carcinogenicidade é uma toxicidade que causa câncer no corpo. Geralmente ensaio de carcinogenicidade requer muito tempo (geralmente 2 anos), atualmente são estabelecidas apenas em métodos de ensaio *in vivo*. Normalmente, o teste utiliza camundongos ou ratos, expondo-os a um composto. E a variável a ser observada é a existência do câncer (VAN DE WATERBEEMD; GIFFORD, 2003).

3.2.4 Predição de atividade biológica

PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) (FILIMONOV; POROIKOV, 2008; GERONIKAKI et. al., 2008) é um produto de software concebido como uma ferramenta para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula semelhante a fármaco orgânico, fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividade biológica com base na estrutura de compostos orgânicos. Assim, pode ser usado para estimar os perfis de atividade biológica para moléculas virtuais, antes de sua síntese química e testes biológicos (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>).

3.2.5 Docking Molecular

As técnicas de ancoragem molecular (docking molecular) fornecem estimativas da energia livre de ligação entre a proteína e o ligante, antes mesmo que esses sejam sintetizados. Os custos computacionais com esses estudos são bem menores, se comparados aos gastos laboratoriais despendidos ao sintetizar e testar farmacologicamente várias substâncias. Esta importante ferramenta tem sido usada para filtrar compostos que não servem para serem designados como alvo, e desenhar os possíveis candidatos que apresentariam uma boa interação com o sítio ativo do receptor (RODRIGUES et al., 2012).

A interação do fármaco ao receptor é estereoespecífica, em que o receptor reconhece determinados grupos do ligante, assim como distâncias interatômicas e forma molecular. Este tipo de interação é determinado por meio do ajuste do ligante no sítio do receptor via conformação de menor energia. Geralmente o receptor é mantido rígido enquanto a conformação da molécula é modificada, embora existem métodos de ligantes rígidos com receptores rígidos. Devem-se considerar todos os graus de liberdade da molécula (rotacionais e translacionais). A conformação preferida é então minimizada, entretanto esta conformação pode não corresponder com a conformação bioativa (BURSULAYA et al., 2003; COHEN, C., 1996).

Existem vários tipos de funções para avaliar a energia livre de ligação do receptor-ligante utilizadas pelos pacotes computacionais de ancoragem (RODRIGUES et al., 2012). Para classificá-las, pode-se agrupá-las em três classes principais: primeira, funções baseadas em campos de força, que através de simulações computacionais, o campo de força cria uma representação física do sistema estudado, e suas equações procuram mimetizar o potencial de interação entre os átomos. Segundo, funções empíricas, onde as equações utilizam coeficientes pré-otimizados vindos de dados experimentais de interações proteína-ligante. E por fim, funções baseadas em conhecimento, que utilizam informações vindas de estruturas determinadas experimentalmente, para se basear e criar possíveis geometrias assumidas pelos ligantes no sítio ativo (OLIVEIRA et al., 2006). Além de avaliar quais as funções mais adequadas, o investigador também pode escolher como deve ser montado o experimento. A metodologia de ancoragem molecular permite a

montagem do experimento através de quatro maneiras: ligante rígido e proteína rígida, ligante rígido e proteína flexível, ligante flexível e proteína rígida, e ligante flexível e proteína flexível. Enquanto mais opções de flexibilidade, mais funções ou variáveis são incluídas para os cálculos, mais custoso computacionalmente fica o experimento (LIPKOWITZ et al., 2008).

Os programas utilizados em docking são inúmeros, dentre eles destacam-se Autodock , Dock, FlexX, Gold e PyRx (BISSANTZ et al., 2000). Essa nova realidade de pesquisas e desenvolvimento busca a molécula ideal, que apresente eficácia, especificidade e o mínimo possível de reações não desejáveis, tendo enfoque para doenças com maior incidência e com maior expectativa de retorno. Como por exemplo, as doenças crônicas não transmissíveis, que atingem indivíduos de todos os perfis socioeconômicos (PALMEIRA FILHO et al., 2012).

MATERIAIS E MÉTODOS

3.3 COMPOSTO ESTUDADO E TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM LIGANTES

Neste estudo foi realizado uma triagem virtual baseado em ligante no composto pivô *4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-N-[4-methyl-3-[(4-pyridin-3-yl)pyrimidin-2-yl]amino]phenyl]benzamide*, o imatinibe (STI- 571), devido apresentar cristalografia definida no sitio ativo da enzima tirosino-quinase (PDB ID 1IEP). A triagem virtual foi realizada em seis bases de compostos comerciais (ChemBrigde_DIVERSet, ChemBrigde_DIVERSet_Exp, Zinc_Drug Database, Zinc_Natural_Stock, Zinc_FDA_BindingDB, Maybridge), usando os programas ROCS V2.4.1 (*Rapid Overlay of Chemical Structures* – similaridade por forma) (HAWKINS; SKILLMAN; NICHOLLS, 2007), objetivando pontuar as sobreposições tridimensionais, comparando a conformação e o volume dos compostos das bases de dados com as estruturas de referência (STI- 571) visando obter o “Top2000/base”, totalizando 12000 estruturas.

Uma das características fundamentalmente importante é a forma das estruturas, pois desempenha um papel crucial nas interações moleculares entre os

ligantes e o alvo biológico, sendo a forma do ligante decisiva para o reconhecimento do composto (LOBATO, 2017).

Posteriormente, foi realizada triagem virtual baseado em ligante no software EON (similaridade eletrostática) (OPENEYE SCIENTIFIC SOFTWARE, 2007), objetivando comparar as superfícies eletrostáticas das estruturas selecionados a partir do ROCS, com as estruturas de referência. O programa EON calculou o índice eletrostático de Tanimoto das estruturas das 6 bases de dados e da estrutura do imatinibe (STI-571), além de calcular novas cargas parciais para as estruturas de entrada (LOBATO, 2017), respectivamente, os resultados são agrupados de acordo com o score e classificados com base no “ET_combo” análogo ao “ComboTanimoto” (OPENEYE SCIENTIFIC SOFTWARE, 2007).

A classificação eletrostática baseada na pontuação “ET_combo” varia de 1,0 (idênticas) para valores negativos resultantes da sobreposição de cargas positivas e negativas. para obter o “Top100/base”, totalizando 600 compostos para a realização das predições farmacocinéticas e toxicológicas, que serão realizados com auxílio dos programas QikProp e Derek Nexus (MARCHANT; BRIGGS; LONG, 2008).

3.4 PREDIÇÃO PROPRIEDADES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS

O estudo das propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADME/Tox) para os compostos selecionados pela triagem virtual teve como objetivo excluir do estudo as estruturas com dados farmacocinéticos e toxicológicos insatisfatórios. O programa utilizado nesta etapa foi o QikProp (SCHRÖDINGER_PRESS, 2011), este programa realizou predições das propriedades farmacocinéticas das 600 estruturas resultantes da triagem de similaridade eletrostática, analisando a estrutura química da molécula como um todo e baseia as previsões sobre a estrutura em 3D.

Respectivamente, com o auxílio do software DEREK NEXUS forão realizadas predições de toxicidade analisando as propriedades carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade. O programa leva em consideração dados de estruturas químicas e relatos de toxicidade na literatura para realizar uma comparação com os grupamentos presentes nas moléculas

analisadas (MARCHANT et al., 2008), para cada grupo que tenha algo potencialmente tóxico o programa gera um alerta (provável, plausível, improvável, possível, certo, impossível, duvidoso), ao fim do procedimento é obtido uma análise da estrutura como um todo e a potencial toxicidade da molécula.

Em seguida foram selecionados compostos com melhores propriedades farmacocinéticas e toxicológicas para etapa posterior de predição de atividade biológica.

3.5 SERVIDOR PASS

Após a seleção dos compostos com melhores predições farmacocinéticas e toxicológicas, serão submetidos no servidor online PASS para predição de atividade biológica, sendo após esse *upload* selecionados os compostos que tiveram resultados satisfatórios para atividade antiproliferativa tirosino-quinase e inibição BCR-ABL. Os compostos promissores nesta etapa serão submetidos ao estudo de docking molecular.

3.6 DOCKING MOLECULAR

O estudo de docking molecular foi realizado com o auxílio do programa AutoDock Vina 1.1.2 (TROTT; OLSON, 2010) e a interface gráfica PyRx 0.8 (DALLAKYAN; OLSON, 2015). O docking molecular é um método usado para prever a interação entre uma pequena molécula e uma proteína a nível atômico, o que nos permite caracterizar o comportamento de moléculas pequenas no sítio de ligação de proteínas alvo, bem como elucidar processos bioquímicos fundamentais (MCCONKEY; SOBOLEV; EDELMAN, 2002). O processo de docking envolve duas etapas básicas: a predição da conformação do ligante, bem como sua posição e orientação dentro dos sítios (geralmente referida como pose) e a avaliação da afinidade de ligação (MENG; ZHANG; MEZEI; CUI, 2011).

Uma das características mais valiosas dos métodos de docking é a sua capacidade de reproduzir modos de ligação observados experimentalmente, funcionando até como uma forma de validação dos mesmos. Para realizar um teste desse nível, um ligante é extraído de seu complexo cristalográfico e submetido a

simulações com o sítio ligante da proteína. Dessa forma, os modos de ligação obtidos nas simulações são comparados com os respectivos modos de ligação obtidos experimentalmente (VERDONK et al., 2003).

Neste trabalho, foi feito o re-docking para validação da metodologia. O modelo cristalográfico selecionado no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) foi o Tirosino-quinase (BCR-ABL) complexado com o imatinibe (PDB ID 1IEP), com resolução de 2.1 Å (NAGAR; BORNMANN; PELLICENA; SCHINDLER *et al.*, 2002).

Para identificar as possíveis combinações ligante-macromolécula o algoritmo de busca utilizado foi o Algoritmo Genético Lamarckiano (LGA), que apresenta os melhores resultados na busca do mínimo global (TURNER; TEDESCO; HARRIS; JOHNSTON *et al.*, 2000).

A estrutura cristalográfica obtida no PDB foi editada no programa *Discovery Studio Visualizer* v.17.2 (BIOVIA, 2019) para separar a proteína do ligante e em seguida a estrutura foi submetida ao docking molecular no programa *AutoDock Vina* 1.1.2.

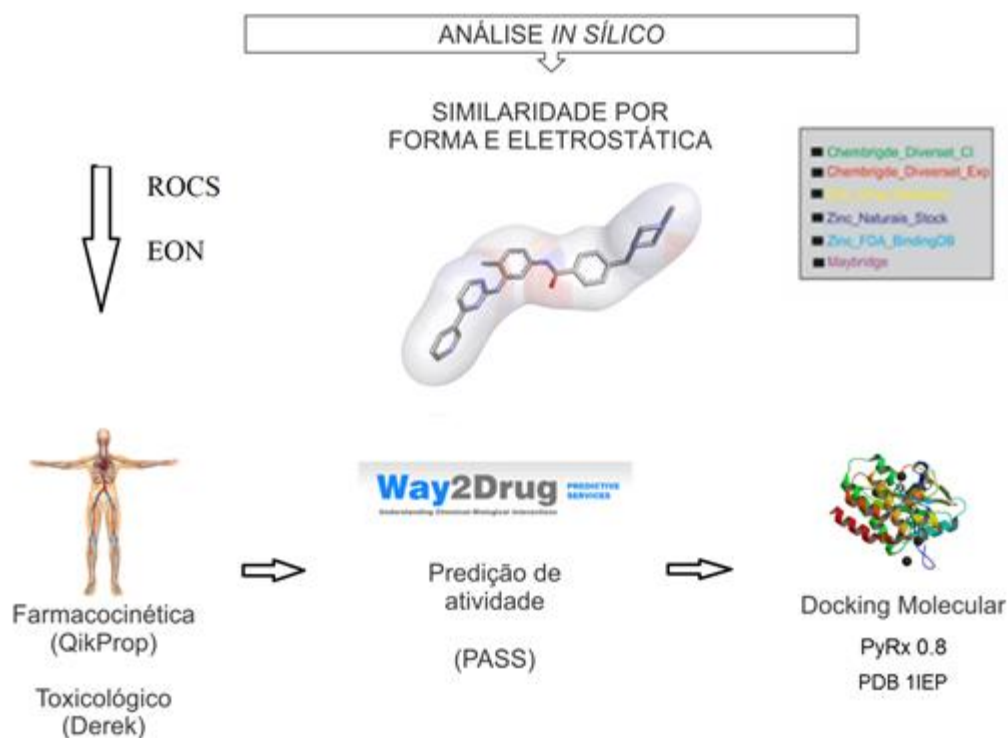
Na seleção da melhor combinação de parâmetros foi considerada a localização da conformação de menor RMSD no cluster mais populoso e de menor afinidade de ligação. Para avaliar visualmente o melhor resultado obtido da validação, foi feita a sobreposição da conformação obtida por difração de raios-X (PDB ID 1IEP) com a conformação de menor RMSD obtida no docking. Após a validação realizou-se o estudo de docking molecular com as estruturas selecionadas na triagem virtual.

As coordenadas espaciais X, Y e Z foram determinadas na região do sítio ativo de acordo com a interação observada entre as enzimas e seus respectivos ligantes originais. As coordenadas usadas para o centro e o tamanho da grade podem ser vistas na Tabela 1. As visualizações, bem como medidas de distância das interações entre os ligantes e enzimas foram realizadas usando o programa *Discovery Studio Visualizer* v17.2.

Tabela 2- Protocolos usados no estudo de docking molecular

Enzyme	Inhibitor*	Coordinates of the Grid Center	Grid dimensions (Angstrom)
Tirosino-Quinase BCR-ABL (PDB ID 1IEP)	Imatinibe	X = 14.79 Y = 52.87 Z = 15.94	X = 16.5 Y = 25.0 Z = 20.47

Figura 4 - Fluxograma de atividades metodológicas; Triagem virtual baseada em ligante (similaridade por forma), EON (similaridade eletrostática), predições Farmacocinéticas e Toxicológicas, predição de atividade biológica e Docking molecular.



4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 TRIAGEM VIRTUAL

A triagem virtual baseado em ligante foi realizado no composto pivô imatinibe, devido possuir sua cristalografia definida para atividade antiproliferativa tirosino-quinase (PDB 1IEP) em seis bases de compostos comerciais (ChemBrigde_DIVERSet, ChemBrigde_DIVERSet_Exp, Zinc_Drug Database, Zinc_Natural_Stock, Zinc_FDA_BindingDB e Maybridge), utilizando o programa ROCS (Rapid Overlay of Chemical Structures), por meio de triagem utilizando a similaridade por forma, essa triagem resultou em um total de 2000 estruturas por base, totalizando 12000 estruturas baseados no composto pivô.

As estruturas obtidas pela triagem do ROCS, foram submetidas por uma nova triagem virtual de similaridade baseada na afinidade eletrostática com a molécula pivô, imatinibe, utilizando o programa EON, obtendo o "Top100" por base, resultando em 600 estruturas que avançaram para as predições farmacocinéticas e toxicológicas.

4.2 PREDIÇÕES FARMACOCINÉTICAS E TOXICOLÓGICAS

Nesta etapa, as 600 estruturas obtidas da triagem virtual baseado em ligante do software EON, foram submetidas a predição de atividade farmacocinética e posteriormente, toxicológica. Nem todas as moléculas terão atividade biológica para a atividade antiproliferativa tirosino-quinase, devido propriedades farmacocinéticas insatisfatórias ou alerta para grupos toxicofóricos, para essa etapa é fundamental uma escolha de filtros eficiente para acessar os melhores resultados farmacocinéticos para desenvolvimento de futuro medicamentos promissores.

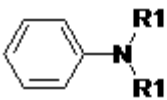
Entre os filtros utilizados para avaliar o perfil farmacocinético estão #stars ou "similar à droga", o peso molecular (PM), Área de Superfície Acessível ao Solvente (ASAS), juntamente com seu componente hidrofóbico (HFOAS) e componente hidrofílico (HFIAS), o volume molecular (VM), o número de aceitadores de ligações de hidrogênio (ALH) e doadores (DLH), o coeficiente de partição n-octanol/água (logP), o parâmetro de solubilidade (logS), a permeabilidade prevista das células Caco-2, o coeficiente de partição barreira hematoencefálica (logCS), a permeabilidade da pele (logKp), o número de metabólitos primários previstos (#metab), a percentagem de

absorção oral humana (%AOH) e a área de superfície polar (ASP) (MALOLO et al., 2015).

Com os parâmetros estipulados por MALOLO et. al. (2015), foram selecionadas um total de 178 estruturas após análise farmacocinética resultantes das seis bases comerciais de compostos (ChemBrigde_DIVERSet, ChemBrigde_DIVERSet_Exp, Zinc_Drug Database, Zinc_Natural_Stock, Zinc_FDA_BindingDB e Maybridge), sempre comparando com os valores obtidos para o imatinibe, o composto pivô, afim de obter as moléculas com os melhores perfis farmacocinéticos que passaram para etapa de predições toxicológicas via *software Derek Nexus*.

O auxílio do software teve como objetivo encontrar alertas plausíveis, prováveis ou certos para carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade. Os resultados dessa predição, que pode ser visualizado na **tabela 3**, resultou em moléculas que não apresentaram nenhum alerta de toxicidade, sendo selecionadas como fármacos promissores para etapa posterior, de predição de atividade biológica que foi realizado via servidor *Pass Online Prediction* (<http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php>).

Tabela 3 – Alertas toxicológicos resultantes do *software Derek Nexus*

Composto	Alerta de predição toxicidade	Grupo Tóxico	Alerta de toxicidade
		Anilina Simples	
Imatinibe	Methaemoglobinaemia		Plausível
R1 = H, Me or hydrolysable group			

Destaca-se que o composto pivô, imatinibe, apresentou alerta “*plausível*” para *metahemoglobinemia*, por possuir compostos que provavelmente serão metabolizados ou hidrolisados para formar uma anilina simples, sendo ela a causadora dessa atividade em humanos, ratos e camundongos. Fato esse que reforça a escolha das moléculas resultantes da triagem como candidatos as etapas

posteriores (SMITH, 1993). Esse alerta pode ser a causa das reações adversas mais relatadas (>30%) foram edema, náusea, vômitos, cólicas musculares, dor musculoesquelética, diarreia, erupção cutânea, fadiga e dor abdominal (DEININGER;DRUKER, 2003).

As propriedades farmacocinéticas analisadas foram observadas de acordo com a faixa de valores aceitas para fármacos descritas por Malolo et al (2015), como pode ser visualizado na tabela 4, e limites definidos próximo aos indicados pela molécula pivô, o imatinibe.

Tabela 4 - Valores farmacocinéticos dos compostos obtidos pela triagem virtual que apresentaram potencial para avançar para a pesquisa.

		Compostos	#Stars	SNC	%AOH	#Metab	Volume	QPP
Compostos resultantes da triagem virtual baseada no Imatinibe	Pivô	Imatinibe (1IEP)	3	1	91,058	8	493.610	75
	LMQC01	BindingDB1944	0	-2	83.755	4	456.562	188
	LMQC02	Omega39040	0	0	82.665	2	461.451	75
	LMQC03	ZINC29051126	0	0	100.000	3	489.250	125
	LMQC04	Omega9146	0	0	100.000	4	459.909	181
	LMQC05	BindingDB50001859	0	0	87.507	5	385.508	246
	LMQC06	BindingDB31046	0	0	100.000	5	281.357	158
	LMQC07	BindingDB50335522	0	-1	86.157	7	406.536	56
	LMQC08	Omega48308	0	0	82.759	5	372.423	349
	LMQC09	Omega45294	0	0	83.631	2	367.468	201

Estes descritores devem apresentar valores em determinada faixa para verificar seu potencial de desenvolvimento posterior como medicamento. Para a atividade no sistema nervoso central (ativo); O componente hidrofóbico da área de superfície acessível ao solvente (HFOAS) deve permanecer na faixa recomendada de 0,0 a 750.0 Å^2 ; O volume total da molécula deve permanecer em um intervalo de 7.0 a 330.0 Å^3 ; O volume acessível ao solvente (HFAS) apresenta uma faixa recomendada de 7.0 a 330.0 Å^3 ; O número de ligações de hidrogénio aceitas pela molécula deve permanecer no intervalo 2-20; a permeabilidade da membrana deve permanecer no intervalo de <5 baixa,> 500 de alta; O Logaritmo do coeficiente predisposto de partição da barreira hematoencefálica deve permanecer na faixa de -1 a 6; O número de ligações de hidrogénio aceitáveis deve ser no máximo 8 e a percentagem de Absorção oral humana acima de 80% é considerada alta, e valores inferiores a 25% indicam baixa absorção.

Todos os compostos submetidos a predições farmacocinéticas apresentaram $\#star = 0$, o que indica que todos os parâmetros calculados estavam dentro da faixa recomendada para 95% de fármacos conhecidos. O índice de conformidade de ADME geral, parâmetro de semelhança de drogas (indicado por $\#stars$) foi utilizado para avaliar os perfis farmacocinéticos dos compostos isolados. O parâmetro $\#stars$ indica o número de descritores de propriedades calculados pela *QikProp* (SCHRÖDINGER_PRESS, 2011), que se situam fora da gama ótima de valores para 95% de medicamentos conhecidos.

A barreira hematoencefálica é uma estrutura específica que protege, controla e regula a homeostase do sistema nervoso central através da separação entre cérebro e sangue sistêmico. Para um fármaco com atividade biológica no SNC, um alto valor de penetração é necessário. No entanto, neste estudo busca-se estruturas sem atividades no SNC, assim, devem apresentar baixos valores de penetração, minimizados os efeitos colaterais (ROJAS; RITTER; PIZZOL, 2011; WANG; HOU, 2009). De acordo com Ma, Chem e Yang (2005) os valores para as predições do Coeficiente de partição cérebro/sangue (QPlogCS) devem ser menores que 1, para moléculas inativas no CNS. Então, nesta análise selecionou-se as estruturas que apresentaram os menores valores, foram elas as 9 estruturas destacadas na Tabela 4.

Os valores para %OAH estão acima de 85% para todas as estruturas, valores considerados alto, segundo a literatura (MALOLO et al, 2015). E propriedades como HFOAS e HFIAS foram dentro da faixa aceitável para todas as estruturas selecionadas.

Ao comparar os valores obtidos do estudo *in silico* para determinadas propriedades farmacocinéticas para resultados experimentais do imatinibe depositados no site *Drug Bank* (<https://www.drugbank.ca>), podemos analisar que o *software* obteve resultados aproximados para %OAH (98%), CNS (0,7624) e HFIAS (86,28). Esses valores aproximados, garantem credibilidade a metodologia utilizada, reforçando o uso dos filtros escolhidos para seleção dos possíveis fármacos para a etapa posterior.

4.3 Predição de atividade biológica

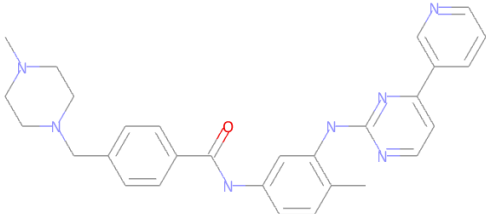
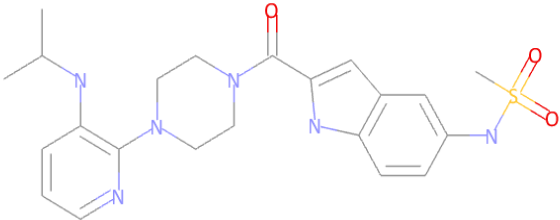
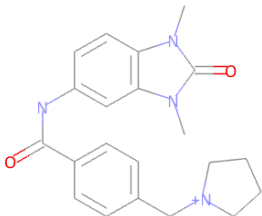
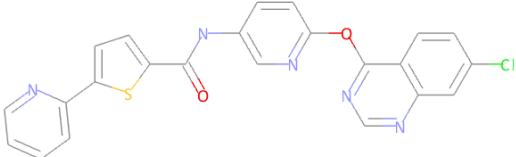
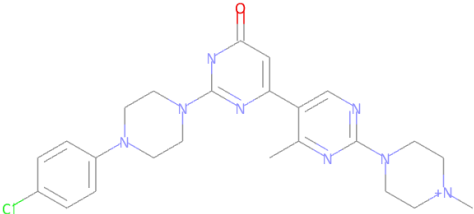
Após a previsão toxicológica, os quatro compostos selecionados (ver Tabela 4) foram submetidos para previsão de potencial atividade biológica utilizando o servidor *Pass Online Prediction* (<http://pharmaexpert.ru/passonline/>).

Software projetado como uma ferramenta para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula orgânica semelhante a drogas. O PASS fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividade biológica com base na estrutura de compostos orgânicos. Assim, o PASS pode ser usado para estimar os perfis de atividade biológica para moléculas virtuais, antes de sua síntese química e testes biológicos. Fornece ao composto estudado um valor de **Pa** (probabilidade de ser ativo") estima a chance de que o composto estudado esteja pertencente à subclasse de compostos ativos (se assemelha às estruturas de moléculas, que são as mais típicas em um subconjunto de "ativos" no conjunto de treinamento PASS) e um valor de **Pi** (probabilidade de ser inativo") estima a chance de que o composto estudado esteja pertencente à subclasse de compostos inativos (se assemelha às estruturas de moléculas, que são as mais típicas em um subconjunto de "inativos" no conjunto de treinamento PASS) (POROIKOV, 2003).

Para um composto ter atividade promissora do câncer, ele deve destruir células cancerígenas sem danificar tecidos normais. Estudos recentes desenvolveram classes de drogas que incluem: antimetastático agentes, que comprometem as propriedades superficiais de células malignas, alterando assim seu potencial metastático; modificadores de resposta biológica, que alteram modificadores metabólicos e imunológicos relacionados; agentes antineoplásticos que destroem células cancerígenas inibindo ou prevenindo o crescimento e proliferação de tumores (DE ALMEIDA; LEITÃO; REINA; MONTANARI; DONNICI; LOPES, 2005).

A previsão de atividade biológica dos quatro compostos obtidos na triagem, apresentaram valores de atividade biológica para inibição da atividade tirosina quinase e BCR-ABL relacionado ao surgimento da atividade proliferativa da LMC, os valores de Pa e Pi podem ser visualizados na Tabela 5, e o composto LMQC04 foi o que teve o resultado mais satisfatório, chegando próximo aos valores do composto pivô, sendo selecionados para estudo de *docking molecular* o composto LMQC01 e LMQC04.

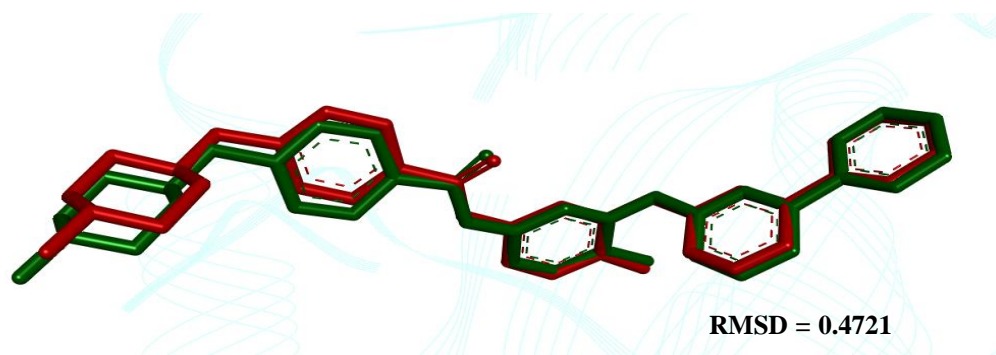
Tabela 5- Compostos que apresentaram valores de atividade biológica para atividade de inibição tirosina quinase.

Composto	Estrutura	Atividade Biológica	Pa	Pi
Imatinibe		Poteín Quinase Inibitor	0,802	0,005
LMQC01		Poteín Quinase Inibitor	0,457	0,049
LMQC02		Poteín Quinase Inibitor	0,137	0,049
LMQC04		Poteín Quinase Inibitor	0,658	0,021
LMQC08		Inibidor Tirosina Quinase	0,222	0,013

4.4 Resultado do Estudo de *Docking molecular*

De acordo com a literatura, a predição do modo de ligação usando o docking, deve apresentar valor de RMSD menor que 2.0 Å na pose cristalográfica do ligante (BURSULAYA; TOTROV; ABAGYAN; BROOKS, 2003; COLE; MURRAY; NISSINK; TAYLOR *et al.*, 2005; HEVENER; ZHAO; BALL; BABAOGLU *et al.*, 2009; KONTOYIANNI; MCCLELLAN; SOKOL, 2004; NISSINK; MURRAY; HARTSHORN; VERDONK *et al.*, 2002). Portanto, estes resultados com a proposta metodológica utilizando esses parâmetros são satisfatórios. Em nosso trabalho anterior, enfatizamos em nosso trabalho anterior o grupo de pesquisa que utiliza ferramentas de acoplamento molecular para procurar novos potenciais leads ou hits (BARCELLOS; SANTOS; FEDERICO; ALMEIDA *et al.*, 2018; BORGES; PALHETA; OTA; MORAIS *et al.*, 2019; COSTA; RAMOS; COSTA; BRASIL *et al.*, 2018; CRUZ; NETO; SILVA; DA S. RAMOS *et al.*, 2018; RAMOS; COSTA; SILVA; DA COSTA *et al.*, 2019)

Figura 5- Superposições do ligante com pose cristalográfica (em vermelho) com as poses calculadas (em verde).



A comparação entre o ligante cristalográfico imatinibe (cor vermelha) e a melhor conformação predita por docking molecular (cor verde), pode ser vista na Figura 5, que mostra a pose com valor de RMSD de 0.4721 Å.

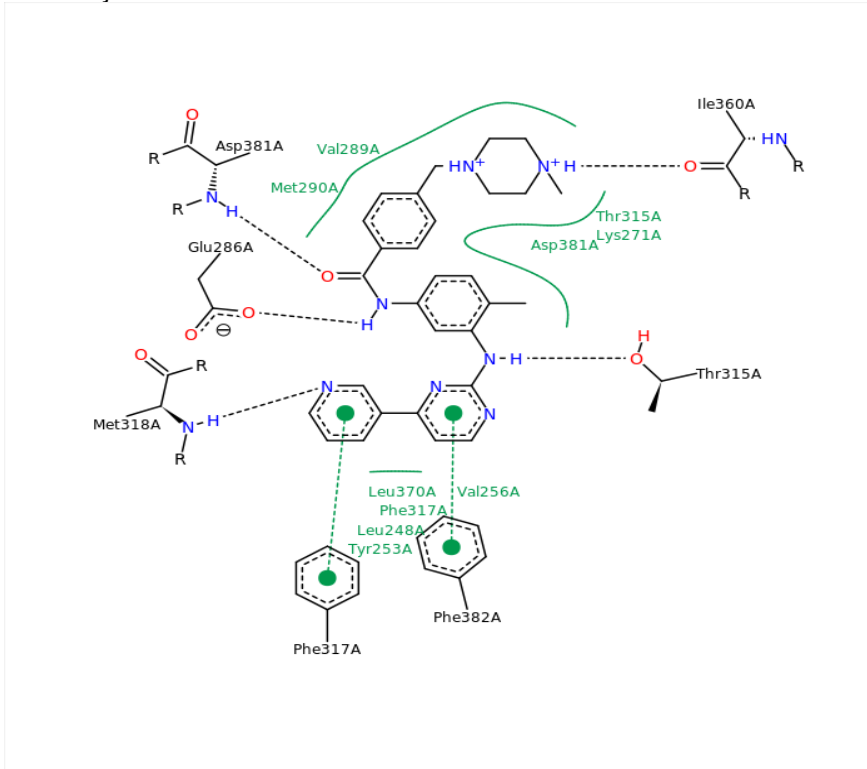
Tabela 6- Valores de afinidade de ligação dos compostos estudados.

Receptor	Ligante	Afinidade de ligação Experimental (Kcal/mol)	Ki (nM)	Afinidade de ligação predita por docking molecular (Kcal/mol)	Resolução (Å)
PDB ID 1IEP	Imatinibe	-11.18[a]	13,0 [b]	-13,3	
	LMQC01	-	-	-8,6	2,1
	LMQC04	-	-	-12,2	

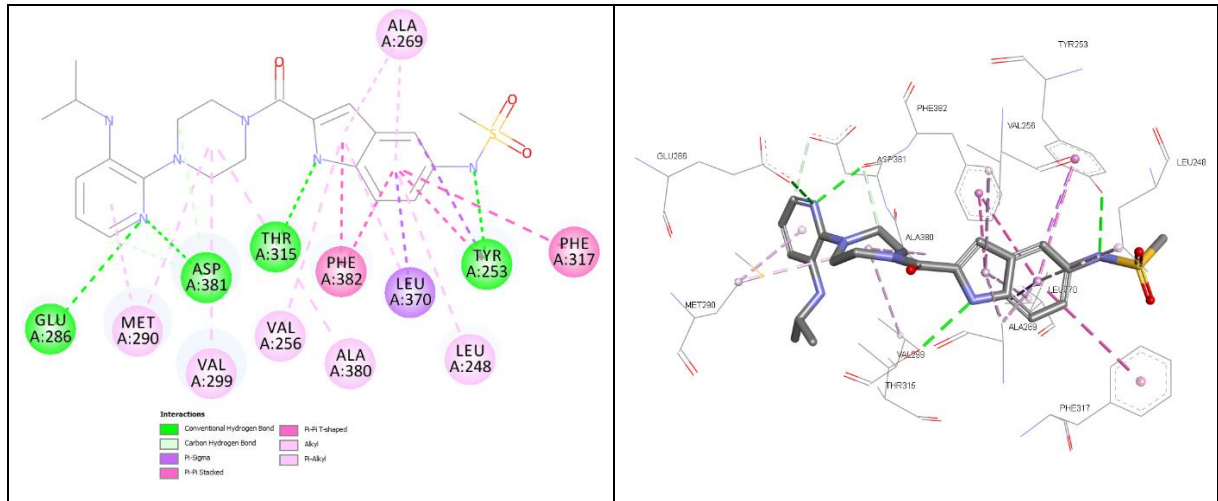
[a] valores calculados a partir de constantes de inibição experimentalmente determinadas (K_i), encontrados nos PDBs, de acordo com equação: $\Delta G = R.T.\ln K_i$ (CERA, 1995)(GOHLKE;KLEBE, 2002), foram R (constante de gás)= $1.987 \cdot 10^{-3}$ kcal/(mol K) e T (temperatura)= 310 K

[b] STIERAND; RAREY, 2010

Figura 6- Interações do imatinibe com resíduos de aminoácidos

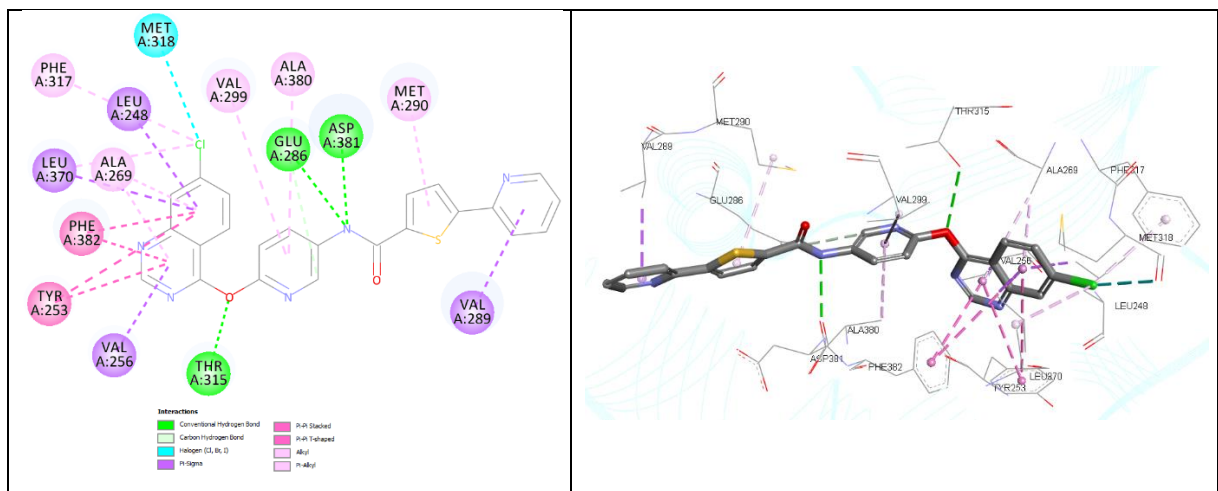


Utilizando a metodologia de docking molecular para o imatinibe (PDB ID 1IEP) os locais de interações observadas foram em torno da alfa hélice localizada entre os resíduos de aminoácidos Leu348 e Glu286-Met290, bem como em torno da beta folha localizada entre os resíduos de aminoácidos Tyr253-Val256, Thr315-Met318, Ile360, Leu370 e Ala380-Phe382. Para o ligante, as ligações de hidrogênio são observadas com resíduos Glu286, Thr315, Met318, Ile360 e Asp381, de acordo com estudos encontrados na literatura (STIERAND; RAREY, 2010)

Figura 7- Interações previstas entre o sítio ativo da tirosino-quinase BCR-ABL e o composto LMQC01

O composto LMQC01 apresentou valor de afinidade de ligação -8.6Kcal/mol , em relação ao composto pivô, o resultado foi abaixo do esperado, no estudo de docking molecular apresentou quatro interações de hidrogênio com Thr253, Thr315, Glu286 e Asp381 sete interações pi-alquila com os aminoácidos Leu248, Val256, Ala269, Ala280, Met290 e Val299, e por fim, duas interações pi-pi emparelhado com Phe382 e Phe317. Totalizando 12 interações.

Para o composto LMQC01 no PDB 1IEP. Foram observadas interações em volta a alfa hélice entre os resíduos de aminoácidos Leu248 e Glu286-Met290. As interações com os resíduos de aminoácidos Thr253, Thr315 e Ala381-Phe382, estão localizadas em torno da beta folha, quando comparadas com a molécula do imatinibe no sítio ativo da proteína.

Figura 8- Interações previstas entre o sítio ativo da tirosino-quinase BCR-ABL e o composto LMQC04

O composto LMQC04 apresentou valor de afinidade de ligação próximo ao imatinibe (-12.2Kcal/mol), em relação aos demais, foi o resultado mais satisfatório, apresentando três interações de hidrogênio com Thr315, Glu286 e Asp380 quatro interações pi-sigma com os aminoácidos Leu248, Leu370, Val256 e Val289, cinco pi-alquil com Phe317, Val299, Ala380 e Met290, e por fim, duas interações pi-pi empilhado com Phe382 e Tyr253. Totalizando 14 interações.

Após realizar o estudo de *docking molecular* e comparar os resultados com o composto *template*, pode-se verificar que a interação em torno a alfa hélice da proteína ocorre com os resíduos Leu248, Glu286-Met290, e na região denominada beta folha, ocorre entre os resíduos Thr253- Val256, Thr315- Met318, Leu370 e Ala380- Phe382. São interações que demonstram que o composto LMQC04 possui as principais interações no sítio ativo da proteína, levando a considerar que ela se torna candidato a fármaco promissor.

Tabela 7 – Interações com resíduos de aminoácidos e respectivas distâncias

Compostos	Aminoácidos	Distância (Å)	Tipo	Energia Livre de Ligação (kcal/mol)
Imatinibe vs 1IEP	Leu248	3,90	Pi-Sigma	-13.3
	Tyr253	5,53	Pi-Pi em forma de T	
	Tyr253	5,00	Pi-Pi em forma de T	
	Val256	4,72	Alquil	
	Val256	4,58	Pi-Alquil	
	Ala269	4,39	Pi-Alquil	
	Ala269	5,12	Pi-Alquil	
	Ala269	4,39	Pi-Alquil	
	Ala269	4,06	Alquil	
	Lys271	4,89	Pi-Alquil	
	Glu286	2,99	Lig. de hidrogênio	
	Val289	5,46	Alquil	
	Met290	5,04	Pi-Alquil	
	Met290	3,30	Ligação de hidrogênio	
	Tyr315	2,88	Lig. de hidrogênio	
	Phe317	4,63	Pi-Pi empilhado	
	Met318	2,90	Lig. de hidrogênio	
	Ile360	2,93	Lig. de hidrogênio	
	Leu370	4,42	Pi-Alquil	
Asp381	3,45	Lig. Hidrogênio		

	Asp381	5,12	Pi-alquil	
	Leu248	5,37	Pi-alquil	
	Tyr253	3,10	Lig. Hidrogênio	
	Tyr253	5,27	Pi-alquil	
	Tyr253	3,80	Pi-sigma	
	Val256	5,41	Pi-alquil	
LMQC01 vs 1IEP	Ala269	4,40	alquil	-8.6
	Ala269	3,64	Pi-alquil	
	Glu286	2,83	Lig. Hidrogênio	
	Met290	5,46	Pi-alquil	
	Met290	4,37	Pi-alquil	
	Val299	4,77	Pi-alquil	
	Thr315	2,91	Lig. Hidrogênio	
	Phe317	5,86	Pi-Pi empilhado	
	Ala380	5,13	alquil	
	Asp381	2,73	Lig. Hidrogênio	
	Asp381	3,12	Lig.H-C	
	Asp381	3,54	Lig.H-C	
	Phe382	5,40	Pi-alquil	
	Phe382	5,07	Pi-alquil	
	Leu248	3,99	Pi-sigma	
	Tyr253	4,84	Pi-Pi empilhado	
	Tyr253	5,60	Pi-Pi empilhado	
	Val256	3,82	Pi-sigma	
	Ala269	4,34	Pi-alquil	-12.2
	Ala269	3,83	Pi-alquil	
LMQC04 vs 1IEP	Glu286	3,22	Lig. Hidrogênio	
	Glu286	3,53	Lig.H-C	
	Val289	3,741	Pi-sigma	
	Met290	4,93	Pi-alquila	
	Val299	4,63	alquil	
	Tyr315	3,10	Lig. Hidrogênio	
	Phe317	4,12	Pi-alquil	
	Met318	3,20	Halogênio	
	Leu370	4.31	Pi-sigma	
	Ala380	4,90	Pi-alquil	
	Asp381	3,11	Lig. Hidrogênio	
	Phe382	4,46	Pi-Pi empilhado	
	Phe382	5,46	Pi-Pi empilhado	

Os dados quantitativos dos tipos de interações e suas respectivas distâncias, e afinidades de ligação entre os ligantes e o receptor Tirosinquinase BCR-ABL são exibidos na Tabela 5. É verificado que, entre as estruturas, o aumento da diversidade de interações com diferentes aminoácidos pode resultar na diminuição dos valores de afinidade de ligação, o que indica maior grau de espontaneidade das interações.

Interações com o aminoácido Thr315 ocorreram em 2 estruturas além do imatinibe, interações com o aminoácido Leu370 ocorreu em 1 estrutura, interações com o aminoácido Ala269 também ocorreram em 2 estruturas, interações com os aminoácidos Val289 ocorreu em 1 estrutura e Tyr253 ocorreram em 2 estruturas e interações com os aminoácidos Glu286 e Met290 ocorreram em 2 estruturas.

Estes resíduos de aminoácidos citados foram os que apresentaram maior número de interações, indicando que podem ter relevância importante para atividade inibitória.

Percebe-se que as estruturas apresentaram de três ou mais interações de ligação de hidrogênio, isso pode ser uma causa da diminuição dos valores de afinidade eletrônica, pois esse tipo de interação entre o receptor e o ligante, indicam a estabilização do complexo, sendo responsáveis pela estabilidade das conformações bioativas.

Quanto aos valores de afinidade de ligação, apresentaram valores abaixo do esperado, com destaque para o composto LMQC04 ($-12,2 \text{ kcal.mol}^{-1}$), este apresentou afinidade de ligação teórica próxima ao imatinibe e o valor maior de afinidade de ligação quando comparado com o experimental, porém, na triagem toxicológica, não existe alerta para grupos toxicofóricos. Sendo este composto selecionado como um potencial promissor para atividade antiproliferativa em células de LMC e possivelmente com menos efeitos adversos.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com a metodologia exposta nesse estudo, apresentou-se moléculas comerciais que indiquem atividade na linhagem celular k562 de leucemia mielóide crônica, com propriedades farmacocinéticas e toxicológicas aceitáveis para um fármaco promissor para inibição do gene BCR-ABL.

Para o composto promissor, pretende-se realizar estudos de formação de metabolitos e suas propriedades ADME/Tox, visando realização de dinâmica molecular e ensaios biológicos, para comprovar essa atividade antiproliferativa e propor essas estruturas como futuros fármacos em caso de resultados satisfatórios.

6 REFERÊNCIAS

ABREU, P. A. **Estudo de alvos terapêuticos e ligantes em doenças neurodegenerativas e neuroinfecções por modelagem molecular**. 2011. 166 f. Tese (Programa de Neurociências), Universidade Federal Fluminense, Niteroi.

DE ALMEIDA, V.L.; LEITÃO, A.; DEL CARMEN Barrett Reina, L.; MONTANARI, C.A.; DONNICI, C.L.; LOPES, M.T.P. Cancer and specific non-specific cyto-cellular and cyclo-cellular antineoplastic agents that interact with DNA: An introduction. *New Chem.* 2005, 28, 118–129.

AMARAL, A. T.; MONTANARI, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. **Química Nova**, v. 25, p. 39-44, 2002.

AMES, B. N. et al. Carcinogens as Frameshift Mutagens: Metabolites and Derivatives of 2-Acetylaminofluorene and Other Aromatic Amine Carcinogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 69, n. 11, p. 3128-3132, 1972.

BARCELLOS, M. P.; SANTOS, C. B. R.; FEDERICO, L. B.; ALMEIDA, P. F. *et al.* Pharmacophore and structure-based drug design, molecular dynamics and admet/tox studies to design novel potential pad4 inhibitors. **J Biomol Struct Dyn**, p. 1-16, 2018.

BIOVIA, D. S. **BIOVIA Discovery Studio**. Versão v.19. San Diego: Dassault Systèmes, 2019.

BISSANTZ, C.; FOLKERS, G.; ROGNAN, D. Protein-Based Virtual Screening of Chemical Databases. 1. Evaluation of Different Docking/Scoring Combinations. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 25, p. 4759-4767, 2000.

BORGES, R. S.; PALHETA, I. C.; OTA, S. S. B.; MORAIS, R. B. *et al.* Toward of Safer Phenylbutazone Derivatives by Exploration of Toxicity Mechanism. **Molecules**, 24, n. 1, p. 143, 2019.

BORTOLHEIRO, T. C. and CHIATTONE, C. S.. **Leucemia Mielóide Crônica: história natural e classificação.** *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* [online]. 2008, vol.30, suppl.1, pp.3-7.

BRASIL. **Banco de dados do Sistema Único de Saúde - DATASUS. Informações de Saúde, Sistema de Informações sobre Mortalidade.**: Ministério da Saúde 2015a.

BURSULAYA, B. D. et al. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. **J Comput Aided Mol Des**, v. 17, n. 11, p. 755-63, Nov 2003.

BURSULAYA, B. D.; TOTROV, M.; ABAGYAN, R.; BROOKS, C. L., 3rd. Comparative study of several algorithms for flexible ligand docking. **J Comput Aided Mol Des**, 17, n. 11, p. 755-763, 2003.

CALABRETTA B., PERROTTI D. **The biology of CML blast crisis.** *Blood*. 2004 Jun 1; 103(11):4010-22.

CAPDEVILLE, R. et al. **Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug.** *Nat Rev Drug Discov*, v. 1, n. 7, p. 493-502, 2002.

CAVASOTTO, C. N.; ORRY, A. J. W.. Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery. **Current topics in medicinal chemistry**. v. 7. Is. 10, 2007.

COHEN, C. **Guidebook on Molecular Modeling in Drug Design.** San Diego: Academic Press, 1996.

COHEN, N. C.; J. M. BLANEY; C. HUMBLET; P. GUND; D. C. BANY.; Molecular Modeling Software and Methods for Medicinal Chemistry, **Journal of Medicinal Chemistry**, v.33, p.883-894, 1990.

COLE, J. C.; MURRAY, C. W.; NISSINK, J. W. M.; TAYLOR, R. D. *et al.* Comparing protein–ligand docking programs is difficult. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 60, n. 3, p. 325-332, 2005.

COSTA, J. d. S.; RAMOS, R. d. S.; COSTA, K. d. S. L.; BRASIL, D. d. S. B. *et al.* An In Silico Study of the Antioxidant Ability for Two Caffeine Analogs Using Molecular Docking and Quantum Chemical Methods. **Molecules**, 23, n. 11, p. 2801, 2018.

COWAN-JACOB, S. W., FENDRICH, G., FLOERSHEIMER, A., FURET, P., LIEBETANZ, J., RUMMEL, G., RHEINBERGER, P., CENTELEGHE, M., FABBRO, D., MANLEY, P. W. Structural biology contributions to the discovery of drugs to treat chronic myelogenous leukaemia. **Acta Cryst.** (2007). D63, 80–93.

CRUZ, J. V.; NETO, M. F. A.; SILVA, L. B.; DA S. RAMOS, R. *et al.* Identification of Novel Protein Kinase Receptor Type 2 Inhibitors Using Pharmacophore and Structure-Based Virtual Screening. **Molecules**, 23, n. 2, p. 453, 2018.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods Mol Biol**, 1263, p. 243-250, 2015.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by docking with PyRx. **Methods Mol Biol**, v. 1263, p. 243-50, 2015.

Deininger MW, Druker BJ: **Specific targeted therapy of chronic myelogenous leukemia with imatinib.** **Pharmacol Rev.** 2003 Sep;55(3):401-23. Epub 2003 Jul 17
DEININGER, M. W. N.; GOLDMAN, J. M.; MELO, J. V. **The molecular biology of chronic myeloid leukemia.** **Blood**, v. 96, n. 10, p. 3343-3356, 2000.

DELGADO-CAÑEDO, A. **Indução de síntese de hemoglobina em células K562 por doxorubicina e aclarrubicina : em busca de um mecanismo comum.** 2005. 123
Doutorado Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular.,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

DEREK, v. 10.0.2, Lhasa Ltd., UK, Leeds, 2007

DOBBIN, J. A.; GADELHA, M. I. P.. Imatinib Mesylate in the Treatment of Chronic Myelogenous Leukemia. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2002, 48(3): 429-438.

DULLEY, F.; HAMERSCHLACK, N. Leucemia mielóide crônica. **Associação Brasileira de Linfoma e Leucemia (Abrale)**, n. 25, p. 2, 2004.

E. D. Cera. Cambridge University Press: Cambridge, 1995.

FAUSEL, C. **Targeted chronic myeloid leukemia therapy: seeking a cure**. J Manag Care Pharm. 2007;13(8 Suppl A):8-12.

FILIMONOV, D.A.; POROIKOV, V.V. **Probabilistic approach in activity prediction**. in: VARNEK, A.; TROPSHA, A. Chemoinformatics Approaches to Virtual Screening. Cambridge (UK): RSC Publishing, 2008, pp. 182 - 216.

GEPPERT, H.; VOGT, M.; BAJORATH, J. Current Trends in Ligand-Based Virtual Screening: Molecular Representations, Data Mining Methods, New Application Areas, and Performance Evaluation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 2, p. 205-216, 2010.

GERONIKAKI, A.; DRUZHILOVSKY, D.; ZAKHAROV, A. ; POROIKOV, V. **Computer-aided predictions for medicinal chemistry via Internet. SAR and QSAR in Environmental Research**, V. 19, pp. 27 – 38, 2008.

H. Gohlke, G. Klebe. Angew. Chem. (International ed. in English) 2002, 41, 2644-2676.
HAWKINS, P. C. D.; SKILLMAN, A. G.; NICHOLLS, A. Comparison of Shape-Matching and Docking as Virtual Screening Tools. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 1, p. 74-82, 2007.

HEVENER, K. E.; ZHAO, W.; BALL, D. M.; BABAOGLU, K. *et al.* Validation of molecular docking programs for virtual screening against dihydropteroate synthase. **Journal of chemical information and modeling**, 49, n. 2, p. 444-460, 2009.

KONTOYIANNI, M.; MCCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of Docking Performance: Comparative Data on Docking Algorithms. **Journal of Medicinal Chemistry**, 47, n. 3, p. 558-565, 2004.

LIPKOWITZ, K. B.; CUNDARI, T. R.; BOY, D. B.; **Reviews in Computational Chemistry**, Nova Jersey: John Wiley & Sons Inc., v. 26, 2008.

LOBATO, C. C. **Planejamento de candidatos a fármacos com atividade antileucêmica (k562) baseado na estrutura do 6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona e 16-(N,N-dietilamino)metileno-6 α -hidroxivouacapan-7 β ,17 β -lactona**. 2017. 106 f. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

MALOLO, F.-A. E. et al. Protease-inhibiting, molecular modeling and antimicrobial activities of extracts and constituents from *Helichrysum foetidum* and *Helichrysum mechowianum* (compositae). **Chemistry Central Journal**, v. 9, p. 32, 2015;

MARCHANT, C. A.; BRIGGS, K. A.; LONG, A. In silico tools for sharing data and knowledge on toxicity and metabolism: derek for windows, meteor, and vitic. **Toxicol Mech Methods**, v. 18, n. 2-3, p. 177-87, 2008.

MCCONKEY, B. J.; SOBOLEV, V.; EDELMAN, M. The performance of current methods in ligand–protein docking. **Current Science**, 83, n. 7, p. 845-856, 2002.

MENG, X. Y.; ZHANG, H. X.; MEZEI, M.; CUI, M. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. **Curr Comput Aided Drug Des**, 7, n. 2, p. 146-157, 2011.

MODA, T. L. et al. PK/DB: database for pharmacokinetic properties and predictive in silico ADME models. **Bioinformatics**, v. 24, n. 19, p. 2270-2271, 2008.

MODA, T. L.; MONTANARI, C. A.; ANDRICOPULO, A. D. Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 24, p. 7738-7745, 12/15/ 2007.

NAGAR, B.; BORNMANN, W. G.; PELLICENA, P.; SCHINDLER, T. et al. Crystal structures of the kinase domain of c-Abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (STI-571). **Cancer Res.**, 62, n. 15, p. 4236-4243, 2002.

NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L. *et al.* A new test set for validating predictions of protein–ligand interaction. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, 49, n. 4, p. 457-471, 2002.

OLIVEIRA, F. G.; SANT'ANNA, C. M. R. CAFFARENA, E. R.; DARDENNE, L. E.; BARREIRO, E. J., Molecular docking study and development of an empirical binding free energy model for phosphodiesterase 4 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 6001-6011, 2006.

OPENEYE_SCIENTIFIC_SOFTWARE. **EON 2.2.0.5**. Santa Fe, NM 2013.

PALMEIRA FILHO, P.; PIMENTEL, V.; GOMES, R.; LANDIM, A.; PIERONI, J., Saúde como desenvolvimento: perspectivas para atuação do BNDS no complexo industrial da saúde, **BNDS Setorial – Complexo Industrial da Saúde**, p. 301-332, 2012.

PEGGS, K.; **Mackinnon S. Imatinib Mesylate: the new gold standard for treatment of chronic myeloid leukemia**. *N Engl J Med* 2003; 348(11)1048-50.

Poroikov, V.V.; Filimonov, D.A.; Ihlenfeldt, W.-D.; Glorizova, T.A.; Lagunin, A.A.; Borodina, Y.V.; Stepanchikova, A.V.; Nicklaus, M.C. PASS Biological Activity Spectrum Predictions in the Enhanced Open NCI Database Browser. *J. Chem. Inform. Comput. Sci.* 2003, 43, 228–236.

RAMOS, R. d. S.; COSTA, J. d. S.; SILVA, R. C.; DA COSTA, G. V. *et al.* Identification of Potential Inhibitors from Pyriproxyfen with Insecticidal Activity by Virtual Screening. **Pharmaceuticals**, 12, n. 1, p. 20, 2019.

REDAELLI, A, Bell C, CASAGRANDE J, STEPHENS J, BOTTEMAN M, LASKIN B, PASHOS C. **Clinical and epidemiologic burden of chronic myelogenous leukemia**. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2004 Feb; 4(1):85-96.

RODRIGUES, R. P.; MANTOANI, S. P.; DE ALMEIDA, J. R.; PINSETTA, F. R.; SEMIGHINI, E. P.; DA SILVA, V. B.;* DA SILVA, C. H. P., Estratégias de Triagem

Virtual no Planejamento de Fármacos, **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p.739-736, dez., 2012.

ROJAS, H.; RITTER, C.; PIZZOL, F. D. Mecanismos de disfunção da barreira hematoencefálica no paciente criticamente enfermo: ênfase no papel das metaloproteinases de matriz. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 23, p. 222-227, 2011.

SAMPAIO, T. S. **Desenho, síntese e avaliação farmacológica de novos possíveis protótipos a inibidores de tirosina quinase**. 2011. 241 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SANDERSON, D.M.; EARNSHAW C.G. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure; the DEREK system. **Human & Experimental Toxicology**, v. 10, p. 261-273, 1991.

SANT'ANNA, C. M. R. **Métodos para o Planejamento Racional de Fármacos**, 2014. PPGQ, PPGMMC – UFRuralRJ LASSBio – UFRJ.

SANTOS, C. do C.; RIBEIRO, J. T.; TEIXIERA, J.; **Leucemia- sociedade em riscos**. Faculdade de São Paulo, 2014.

SCHNEIDER, G.; BOHM, H. J.. Virtual screening and fast automated docking methods. **Drug Discov. Today**, 2002. Jan 1;7 (1): 64-70.

SCHRÖDINGER_PRESS. **QikProp 3.4**. New York: LLC 2011.

SMITH RP. Toxic responses of the blood., *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons, 4th edition, Amdur MO, Doull J and Klaassen CD (editors), McGraw-Hill, New York, , 268-274.*

TAMASCAR, I.; RAMANARAYANAN, J. Targeted treatment of chronic myeloid leukemia: role of imatinib. **OncoTargets and therapy**, v. 2, p. 63-71, 02/18 2009.

TEFFERI, A. et al. **Chronic Myeloid Leukemia: Current Application of Cytogenetics and Molecular Testing for Diagnosis and Treatment**. Mayo Clinic Proceedings, v. 80, n. 3, p. 390-402, 2005.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **J Comput Chem**, 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

TSIFTSOGLU, A. S.; PAPPAS, I. S.; VIZIRIANAKIS, I. S. Mechanisms involved in the induced differentiation of leukemia cells. **Pharmacol Ther** 100:257-290, 2003.

TURNER, G. W.; TEDESCO, E.; HARRIS, K. D. M.; JOHNSTON, R. L. *et al.* Implementation of Lamarckian concepts in a Genetic Algorithm for structure solution from powder diffraction data. **Chemical Physics Letters**, 321, n. 3, p. 183-190, 2000.

VAN DE WATERBEEEMD, H.; GIFFORD, E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 3, p. 192-204, 2003.

WERMUTH, C. G. **The Practice of Medicinal Chemistry**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2003.

WERMUTH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. Academic Press, 2011.