UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Planejamento e relação estrutura-atividade de inibidores da MARK3
em câncer de cabeça e pescoço.**

Josiana Garcia de Araujo Volpini

Ribeirão Preto
2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Planejamento e relação estrutura-atividade de inibidores da MARK3
em câncer de cabeça e pescoço.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Física Biológica

Orientada: Josiana Garcia de Araujo
Volpini

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique
Tomich de Paula Silva

Ribeirão Preto
2010

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Volpini, Josiana Garcia de Araujo
Planejamento e relação estrutura-atividade de inibidores da
MARK3 em câncer de cabeça e pescoço. Ribeirão Preto,
2010
131 p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Física Biológica.

Orientador: Silva, Carlos Henrique Tomich de Paula.

1. MARK3. 2. Câncer de Cabeça e Pescoço. 3. Drug Design.
4. Modelagem molecular. 5. Química Medicinal

FOLHA DE APROVAÇÃO

Josiana Garcia de Araujo Volpini

Planejamento e relação estrutura-atividade de inibidores da MARK3 em câncer de cabeça e pescoço.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Física Biológica

Orientador: Prof. Dr. Carlos Henrique
Tomich de Paula Silva

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho ao meu
esposo Adriano, por todo amor
sempre doado.
Sem você este trabalho não
existiria. Você é um presente de
Deus!

Aos meus pais, Josafá e Ana Maria,
Exemplos e amparo da minha vida.

E a todas as pessoas que enfrentam
ou enfrentaram um câncer.
Lutem, não desanimem!

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Deus do impossível, pelo dom da vida. Por me dar forças para superar todos os obstáculos que a vida impõe. Pelo seu amor incondicional. Obrigada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Carlos Tomich, a quem agradeço imensamente pelo suporte, orientação, incentivo... enfim pela amizade. Você é um grande exemplo de dedicação e compromisso!

Ao meu amado esposo Adriano Volpini, pelo companheirismo, compreensão, carinho e amor demonstrado em todas as horas (tem muito esforço seu nesta “nossa” dissertação!). Te amo muito e sempre!

À minha querida família, por sempre me apoiar e me impulsionar nos estudos. Por todo esforço do meu pai e pelas promessas feitas pela minha mãe, para que, desta vez, eu concluísse meu mestrado. Aos meus irmãos, Junior e Josué, e suas respectivas companheiras Milena e Dila, que sempre me incentivaram a nunca desistir. Amo vocês!

Aos amigos de laboratório: Vinícius (Vini), Xita, Jonathan e Adriana, pelos anos que passamos juntos e por toda colaboração que este convívio trouxe, não somente ao meu trabalho, mas à minha vida.

Aos colegas da FCFRP, em especial aos colegas do grupo de pesquisa Química Medicinal de Produtos Sintéticos e Naturais.

À Profa. Dra. Ivone Carvalho pelo apoio, principalmente nesta reta final.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino pela colaboração.

À Claudia e Luis Otávio, técnicos dos laboratórios de Química Farmacêutica, pela amizade e apoio em todos os momentos.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Bernardes, médico que me acompanhou durante o tratamento quimioterápico, a enfermeira Valéria e toda equipe da oncologia do Hospital Ribeirânia. A todos minha profunda gratidão.

À todos meus muitos amigos e familiares... Sem vocês esta caminhada seria muito, mas muito difícil ou até impossível. Podem contar comigo sempre!

À toda equipe da secretaria de Pós-graduação da FCFRP, pela gentileza que sempre me trataram.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela infra-estrutura oferecida, e à todos os seus docentes e funcionários.

Muito obrigada!

“Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer
E mesmo quando a visão se turva e o coração só chora
Mas na alma, há certeza da vitória
Posso, tudo posso Naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim
Vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor
Do que ficou, vou me lembrar
E realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou
Em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar
Vou persistir, continuar a esperar e crer ...
Eu vou sofrendo, mas seguindo enquanto tantos não entendem
Vou cantando minha história, profetizando
Que eu posso, tudo posso... em Jesus!”

(Música: Tudo posso – Celina Borges)

“Tudo posso Naquele que me fortalece.”
(Fil 4,13)

RESUMO

VOLPINI, J. G. A. **Planejamento e relação estrutura-atividade de inibidores da MARK3 em câncer de cabeça e pescoço**. 2010. 131f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

O Projeto Genoma Humano do Câncer (PGHC), financiado pela FAPESP e pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer, buscou identificar os genes expressos nos tipos mais comuns de câncer no Brasil. Tal projeto conseguiu identificar aproximadamente um milhão de sequências de genes de tumores frequentes no Brasil. A contribuição brasileira foi maior para tumores de cabeça e pescoço, mama e cólon. Uma das iniciativas mais recentes e estimuladas pelo PGHC é o projeto Genoma Clínico, o qual visa desenvolver novas formas de diagnóstico e tratamento do câncer através do estudo de genes expressos. A partir da análise molecular de tecidos saudáveis e neoplásicos em diferentes estágios, é possível identificar marcadores de prognóstico, permitindo escolhas de terapias mais adequadas e eficientes. A proteína MARK3 foi identificada como um desses marcadores, em neoplasias de tecidos de cabeça e pescoço, sendo o objetivo deste estudo a aplicação de técnicas de bioinformática e modelagem molecular no planejamento baseado em estrutura de candidatos a fármacos antineoplásicos que bloqueiem a atividade da proteína MARK3. Após “screening” virtual em bases de dados de compostos (1.000.000 aproximadamente) com propriedades “drug-like”, 20 compostos com potencial de inibidor da MARK3 foram selecionados. Os modos de ligação para cada um dos mesmos no sítio ligante da proteína MARK3 foram sugeridos por simulações de “docking” e apresentaram um bom encaixe espacial com os sítios receptores virtuais calculados pelos campos de interação molecular (MIF). Simulações de dinâmica molecular foram realizadas com o intuito de avaliar a estabilidade dos compostos selecionados, que também foram avaliados quanto à presença de grupamentos toxicofóricos em sua estrutura.

Palavras-chave: MARK3. Câncer de Cabeça e Pescoço. Drug Design. Modelagem molecular. Química Medicinal.

ABSTRACT

VOLPINI, J. G. A. **Design and structure-activity relationship of inhibitors of MARK3 in head and neck cancer.** 2010. 131f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The Brazilian Project “Genoma Câncer” (PGHC) supported by FAPESP and the Ludwig Institute for Cancer Research, intended to identify the genes involved in the most common cases of cancer in Brazil. In this project about a million of gene sequences were identified. The major contribution was made in breast, colorectal and head and neck cancers. The results obtained stimulated the creation of another project, called “Genoma Clínico”, which intend to develop new trends in treatments and diagnosis of cancer based on the study of expressed genes. Analyzing healthy and neoplastic tissues in different stages, it is possible to identify molecular markers related to the prognosis of cancer, allowing the use of more efficient therapies. The MARK3 protein was identified as a molecular marker in head and neck cancer, where the objective of this work lies in the application of bioinformatics and molecular modeling strategies by structure-based drug design to identify potential antineoplastic drug candidates that could act against MARK3 protein. After the virtual screening simulations performed with drug-like compound databases, containing approximately 1.000.000 compounds, 20 were selected as potential ligands of MARK3 protein. The binding modes suggested for these compounds, by docking simulations, presented a good spatial fit when compared with the virtual receptor sites calculated by molecular interaction fields (MIF). Molecular dynamics simulations were performed in order to evaluate de stability of the binding modes suggested. The potential ligands were also evaluated to identify toxicophoric features in its chemical structures.

Keywords: MARK3. Head and neck cancer. Drug Design. Molecular modeling. Medicinal Chemistry.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Genoma Câncer

O estudo dos genomas está ampliando os horizontes das áreas médicas, oferecendo uma nova dimensão para os estudos epidemiológicos clássicos e inspirando o desenvolvimento de estudos que colaboram com o prognóstico de diversas doenças, inclusive o câncer (WUNSCH-FILHO et al., 2006).

O avanço alcançado na área de genomas encontra-se em um ritmo frenético. O Brasil foi o primeiro país do mundo a obter a sequência completa de um patógeno de plantas (*Xylella fastidiosa*), conseguiu terminar o sequenciamento da variedade de *Xylella* que infecta as uvas e o genoma de duas espécies de *Xanthomonas*, o país possui também o maior conjunto de dados relativos a genes expressos em um vegetal (Cana-de-açúcar) e o segundo maior conjunto de dados mundiais sobre genes expressos em tumores humanos (DIAS NETO, 2001).

A Fapesp, através da rede ONSA (Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis) tem financiado projetos científicos na área de genoma e com esta finalidade lançou em abril de 1999 o projeto Genoma Câncer Brasileiro (Projeto Genoma Humano do Câncer - PGHC), financiado juntamente com o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer, com o intuito de identificar os genes expressos nos tipos de câncer mais comuns no Brasil. A fase de sequenciamento terminou em 2001 e seu sucesso serviu de estímulo para que outras iniciativas fossem apoiadas, tais como o *Human Transcript Validation Initiative*, e para que a bioinformática recebesse um grande impulso no país. Em menos de um ano, o projeto conseguiu identificar um milhão de seqüências de genes de tumores mais frequentes no Brasil (REVISTA PESQUISA FAPESP, 2000).

O PGHC é um projeto de grande escala - possivelmente o maior desenvolvido no Brasil no campo da oncologia - destinado a investigar os perfis de expressão gênica em células normais e cancerígenas e correlacionando estes perfis com o prognóstico dos tumores sob investigação. Este conhecimento pode ser utilizado no futuro para desenvolver novos métodos de diagnóstico e tratamento do câncer.

Sendo assim, o projeto tem um enfoque principal em tumores de cabeça e pescoço, cólon, mama e estômago. Ao mesmo tempo tem um enfoque secundário em tumores mais raros, onde o potencial de descoberta gênica deve ser maior (DIAS NETO, 2001). Sua meta inclui a análise da expressão gênica em neoplasias humanas e a identificação de diferenças nos perfis de expressão que possam estar relacionadas com parâmetros clínicos e

comportamento biológico do câncer. A partir da análise molecular de tecidos saudáveis e neoplásicos em diferentes estágios, é possível identificar marcadores relacionados com as fases iniciais da transformação maligna e marcadores de prognóstico que aumentam as chances de previsão da evolução do tumor, permitindo escolhas de terapias mais adequadas e eficientes (DUNHAN et al., 1999). A identificação desses marcadores é essencial porque o diagnóstico precoce é extremamente importante para o sucesso do tratamento do câncer e para a escolha de terapias agressivas como, por exemplo, nos casos com perfil molecular específico de tumores com recidiva.

Ao assumir um projeto tão competitivo como o PGHC, e outros programas na área genômica, o Brasil assegurou um potencial inestimável para a ciência brasileira, não somente pelos bancos genômicos e os dados gerados, mas também pela formação de profissionais altamente qualificados. O resultado do investimento desta iniciativa brasileira certamente se traduzirá em importantes contribuições científicas futuras (KIMURA, 2002).

1.2. Câncer

Câncer é um termo genérico para um conjunto de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo e que possui diversas características biológicas como o crescimento descontrolado e a proliferação de células anormais. Se esta proliferação não for controlada, pode resultar em morte. O câncer é causado tanto por fatores externos (tabaco, agentes infecciosos, produtos químicos e radiações) como por fatores internos (mutações genéticas, hormônios, condições imunológicas e mutações que ocorrem a partir do metabolismo). Esses fatores causais podem agir em conjunto ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese. Frequentemente passam-se dez ou mais anos entre a exposição a estes fatores externos e a detecção do câncer. (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2009).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como pele ou mucosas ele é denominado carcinoma. Se começa em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (metástases) (Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA).

O câncer pode ser tratado com cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal, terapia biológica, e a terapia-alvo.

Médicos do Egito antigo (3000 a.C.) registraram doenças que, dadas suas características, provavelmente podiam ser classificadas como câncer. Hipócrates (377 a.C.) também descreveu enfermidades que se assemelhavam aos cânceres de estômago, reto, mama, útero, pele e outros órgãos. Portanto, a presença do câncer na humanidade já é conhecida há milênios. No entanto, registros que designam a causa das mortes como câncer passaram a existir na Europa apenas a partir do século XVIII. Desde então, observou-se o aumento constante nas taxas de mortalidade por câncer, que parecem acentuar-se após o século XIX, com a chegada da industrialização (GARÓFOLO, 2004).

A estimativa é de que até o ano de 2020 a incidência do câncer cresça consideravelmente chegando a 15 milhões de casos novos ao ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

1.2.1. Câncer de cabeça e pescoço

“Câncer de cabeça e pescoço” é um termo anatômico coletivo para descrever tumores malignos localizados acima do trato aerodigestivo. (DROBOSSY, 2005) e é considerado um dos principais tumores no mundo, devido a sua mortalidade, incidência, prevalência e sobrevida (STEWART, 2003).

Essa região anatômica inclui os lábios, a língua, a cavidade oral (que inclui mucosa jugal, palato mole, palato duro, vestibulo, assoalho da boca, gengiva e área retromolar), glândulas salivares, faringe (que inclui nasofaringe, orofaringe e hipofaringe) e laringe. Os tumores cerebrais, tireoideanos e melanomas são classificados separadamente (STEWART, 2003). Na figura 1 temos a representação do trato aerodigestivo, aonde é acometido este tipo de câncer.

Figura 1. Representação do trato aerodigestivo.

Aproximadamente 40% dos cânceres de cabeça e pescoço ocorrem na cavidade oral, 15% na faringe, 25% na laringe e o restante nas demais localidades [DROBOSSY, 2005]. A maior parte dos cânceres de vias aerodigestivas superiores é composta por carcinomas espinocelulares, os quais podem ocorrer com maior frequência no sexo masculino e nas faixas etárias acima de 50 anos de idade, podendo ocorrer no sexo feminino e em qualquer idade (MAZZINI, 2007).

Os pacientes com câncer de cabeça e pescoço têm sua qualidade de vida muito afetada, pois este câncer surge em áreas que são estruturalmente complexas e funcionalmente importantes para atividades críticas, como a fala e a deglutição. Além disso, deformidades na cabeça e no pescoço resultam em perda da integridade facial podendo gerar profundos efeitos emocionais e sociais (MURPHY, B. A., 2007). Assim, a busca por um tratamento eficaz é de grande importância.

O câncer de cabeça e pescoço possui diversos subgrupos de tumores que afetam diferentes funções dependendo da sua localização e tamanho (OLIVEIRA et al., 2005).

O consumo de álcool e tabaco são os dois principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Alguns vírus ou até certas irritações crônicas, também, podem estar envolvidos com o aparecimento deste tipo de câncer, embora não sejam tão evidentes quanto ao consumo de tabaco e álcool (GODENBERG et al., 2004; WHITE et al., 2007).

Uma predisposição genética também pode ser relevante no desenvolvimento deste tipo de câncer. Eles podem estar associados com câncer hereditário conferindo um risco aumentado para o câncer de cabeça e pescoço. Embora este seja um campo relativamente pouco estudado nas carcinogêneses hereditárias (BROCKSTEIN et al., 2003).

A taxa de mortalidade associada ao câncer de cabeça e pescoço é alta (cinco anos de sobrevivência relativa, taxa de 33%–62% de acordo com o local do tumor), porque a doença é frequentemente diagnosticada já em estado avançado, pois no início, este tipo de tumores é totalmente assintomáticos, sendo geralmente detectados com dimensões acima de 2 cm (ALHO et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2005).

Quando detectado precocemente, apresenta uma taxa de 75% de sobrevida em 5 anos, mas a maioria dos pacientes apresentam doença metastática no momento do diagnóstico, o que reduz a taxa de sobrevivência para 35% (CHIN et al., 2005). Esta taxa de sobrevida de 5 anos é uma das mais baixas entre os cânceres agressivos e não tem variado nos últimos anos (GREENLEE et al., 2001; JEMAL et al., 2006).

O uso de informação genômica pode ser muito útil na identificação de genes cuja ativação ou perda de função promove a morte celular por câncer, com estas informações podemos propor novas estratégias terapêuticas no tratamento do câncer (KIM et al., 2007).

Atualmente, existem muito poucos marcadores moleculares que podem ser usados com precisão e confiabilidade como indicadores de câncer de cabeça e pescoço com um potencial de progressão metastática e, portanto, como indicadores de um comportamento tumoral mais agressivo. Um marcador de pré-operatório, por exemplo, pode ajudar significativamente na determinação do tratamento mais adequado para um paciente em particular. Além disso, as mudanças no perfil de expressão gênica decorrentes exclusivamente ou preferencialmente em câncer podem ser utilizadas como marcadores moleculares (SILVEIRA et al., 2008). Na verdade, estes marcadores podem nos fornecer novos meios para a detecção precoce do câncer e de avaliação de risco de câncer, como discutido por Hunter e colaboradores (HUNTER et al., 2005).

Tem crescido consideravelmente a busca por biomarcadores que tenham aplicações clínicas, pois a detecção de alterações moleculares auxilia no prognóstico e tratamento do câncer; assim a identificação de novos marcadores e alvos moleculares para diagnóstico, prevenção e tratamento de câncer de cabeça e pescoço também foi impulsionada (LE e GIACCIA, 2003). Nesse sentido o grupo experimental colaborador, dirigido pela Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, selecionou 3 proteínas: a proteína SET, a proteína hnRNP K e a proteína MARK3, como candidatas a marcadores de prognóstico e também como potenciais alvos terapêuticos em câncer de cabeça e pescoço.

Desta forma observa-se que estudos de planejamento e relação estrutura-atividade de inibidores destes potenciais alvos terapêuticos são muito importantes para a prevenção e tratamento deste tipo de câncer. Neste trabalho abordaremos a proteína MARK3 (MAP/microtubule affinity regulating Kinase 3) que é uma proteína serina/treonina quinase.

1.3. Proteínas Quinases e o desenvolvimento de seus inibidores

Proteínas quinases são enzimas que possuem um papel regulador fundamental na biologia celular (COHEN, 2001). Elas regulam a apoptose, a progressão do ciclo celular, o rearranjo do citoesqueleto, a fase de desenvolvimento, a resposta imune, a função de sistema nervoso, e a transcrição. Desregulação nas proteínas quinases desencadeiam uma variedade de doenças como o câncer, diabetes, problemas cardiovasculares e desordens do sistema nervoso como, por exemplo, o mal de Alzheimer (ROSKOSKI JR, 2004; TASSAN et al., 2004).

Muitas proteínas quinases estão envolvidas nos mecanismos que conduzem a malignidades. Em 1980, Hunter e colaboradores (1980) demonstraram que o produto do oncogene Rous sarcoma vírus (vsrc) é uma proteína tirosina/quinase.

O mecanismo de ação das proteínas quinases consiste na adição de um grupamento fosfato (fosforilação) ao substrato, alterando assim sua conformação estérica. Essa mudança conformacional pode, por exemplo, tornar a proteína propícia a outras reações químicas expondo um sítio catalítico (ativação) como o contrário, escondendo um sítio catalítico e impedindo que uma reação ocorra (inativação). O mau funcionamento de algumas quinases está implícito no desenvolvimento de alguns tumores (KATO et al., 2001; TASSAN et al., 2004).

Baseado na natureza dos grupos –OH (hidroxilas) fosforilados, estas enzimas são classificadas como proteínas quinases de serina/treonina e proteínas quinases de tirosina. Hunter e colaboradores (1980) identificaram 518 proteínas quinases nos genes humanos, isso corresponde a aproximadamente 2% de todos os genes humanos. A família de proteína quinase é a maior família dentre enzimas e a quarta maior família de gene em humanos (ROSKOSKI JR, 2004).

Quinases são reguladores “pivô” das vias de sinalização, controlando processos celulares como metabolismo, transcrição, progressão do ciclo celular, apoptose e diferenciação (KUBINYI e MÜLLER, 2004)

Considerando que existem diversas quinases e que todas usam ATP como agente fosforilante, essa família de enzimas costumava ser especulada como um alvo não muito adequado, quando o objetivo é seletividade. Isso porque a região ligante de ATP poderia ser muito similar nas diferentes proteínas quinase existentes. Por esse ponto de vista, o sítio ligante de substrato parecia ter vantagens óbvias sobre o sítio ligante de ATP, como o alvo para inibir a atividade das quinases. Primeiramente, porque inibidores competitivos de substrato não seriam afetados pela alta concentração de ATP encontrada nas células. Segundo, porque o sítio ligante de uma quinase controlaria a seletividade, enquanto o sítio ligante de ATP poderia ter mais alta conservação ao longo de toda a família de 518 membros.

Inibição competitiva de substrato é uma estratégia bem conhecida direcionada a enzimas tidas como alvos para propósito terapêutico, e o sucesso dessa abordagem tem sido demonstrado em diversas classes de enzimas, como proteases, por exemplo. Entretanto, seu uso para inibição de quinases tem tido muito pouco sucesso. Uma das principais razões é que, nessa família de enzimas, o sítio ligante de substrato é relativamente estendido a sítios

ligantes adicionais, os quais não estão localizados no ambiente imediato do sítio ativo. Faltam, assim, sítios hidrofóbicos específicos em quinases que poderiam atuar como alvos para peptidomiméticos, tal como ocorre com protease ou trombina, por exemplo.

Estruturas cristalográficas de muitas quinases também revelaram, por sua vez, que o ATP se liga de modo não tão complementar/encaixado no sítio ativo da enzima, existindo regiões que permanecem desocupadas nas vizinhanças do agente fosforilante. Foi ainda demonstrado, por análise comparativa, que existem significativas diferenças na distribuição dos resíduos de aminoácidos, de um sítio ativo de um membro da família para outro. De fato, a vasta maioria dos inibidores de proteína quinase de interesse clínico na atualidade têm sido planejados e modelados para competirem pelo ATP por essa região do sítio ativo.

Atualmente são definidos cinco distintos subsítios dentro do sítio ligante de ATP (Figura 2), os quais possuem diferentes ambientes químicos e estruturas primárias nessa região, viabilizando o planejamento de específicos e potentes inibidores de quinases:

- *Região ligante de adenina (ABR)* – todos os inibidores de quinase se ligam nesta região hidrofóbica e interagem com o domínio “dobradiça” via ligações de hidrogênio.
- *Região ligante de ribose (RBR)* – região hidrofílica que tem sido explorada para acomodar grupamentos solubilizantes. Essa região não é altamente conservada e contém resíduos únicos que poderiam ser usados para endereçar seletividade.
- *Região ligante I (BR-I)* – esse bolsão estende-se na direção do N6 de ATP, mas não está envolvido diretamente na ligação desse agente fosforilante. Essa região não é conservada e vem sendo explorada para aumentar afinidade ligante bem como seletividade.
- *Região ligante II (BR-II)* – essa região não é acessível ao ATP e pode ser utilizada para obter afinidade ligante bem como seletividade
- *Região ligante de fosfato (PBR)* – essa região hidrofílica é altamente acessível ao solvente e é pensada não ser importante para afetar a afinidade ligante.

Figura 2. Modelo de ligação do ATP no sítio ativo de quinases, e as cinco regiões (subsítios) ligantes (Figura adaptada de KUBINYI e MÜLLER, 2004, pg. 205).

É bem estabelecido que muitas doenças como câncer, diabetes e artrite reumatóide, são moduladas por quinases. Neste aspecto, não é surpreendente que a inibição seletiva de quinases seja um grande objetivo de indústrias farmacêuticas. Atualmente, estima-se que aproximadamente um terço dos programas de descoberta de drogas tenha como alvo as proteínas quinases (LIAO, 2007).

O desenvolvimento da tecnologia na área da biologia estrutural refletiu em um aumento do conhecimento das estruturas de quinases. As informações estruturais embutidas nestas estruturas forneceram um conhecimento profundo das quinases a nível molecular, facilitando o desenho de inibidores mais potentes e seletivos. A biologia estrutural tem agora um papel cada vez mais proeminente na descoberta de drogas contra o câncer, não só para a compreensão da função e modo de ação de alvos de câncer, mas também por elucidar suas estruturas tridimensionais - com técnicas como cristalografia de raios X do complexo proteína-ligante, espectroscopia de RMN e modelagem molecular fornecendo informações valiosas sobre interações da proteína e também do ligante, acelerando o processo iterativo de desenvolvimento do inibidor (MONTFORT, 2009).

Esses esforços têm resultado na aprovação de novos inibidores de quinase para tratamento quimioterápico de câncer, os principais deles estão aqui apresentados, como o Imatinib (**1**) (ZIMMERMAN et al., 1997; DRUKER et al., 1996), Gefitinib (**2**) (BARKER et al., 2001), Erlotinib (**3**) (MOYER et al., 1997), Sorafenib (**4**) (LOWINGER et al., 2002), Sunitinib (**5**) (SUN et al., 2003), Dasatinib (**6**) (LOMBARDO, et al., 2004), entre outros.

Na tabela 1, estão apresentadas as quinases envolvidas com cada um destes fármacos, a indústria fabricante, a indicação e o mês e ano de aprovação pelo FDA (Food and Drug Administration). É relevante ressaltar que todos estes fármacos têm sido administrados com sucesso. Suas fórmulas estruturais são apresentadas na Figura 3.

Tabela 1. Alguns dos fármacos inibidores de quinase disponíveis no mercado farmacêutico.

Fármaco	Quinase alvo	Indústria	Indicação	Aprovação no FDA
Imatinib	BCR-ABL, PDGFR, KIT	Novartis	LMC ¹ , TEG ²	05/2001
Gefitinib	EGFR	AstraZeneca	NSCLC ³	05/2003
Erlotinib	EGFR	Genentech/OSI	NSCLC ³	11/2004
Sorafenib	VEGFR2, KIT, FLT3, BRAF	Onyx/Bayer	CCR ⁴	12/2005
Sunitinib	VEGFR1-3, PDGFR, KIT, FLT3	Pfizer	TEG ² , CCR ⁴	01/2006
Dasatinib	BCR-ABL, PDGFR, KIT, Scr	Bristol-Myers Squibb	LMC ¹ , LLA ⁵	06/2006

¹. Leucemia Mielóide Crônica (LMC); ². Tumor Estromal Gastrointestinal (TEG); ³. Câncer de pulmão de células não pequenas (NSCLC, do inglês nonsmall cell lung cancer); ⁴. Carcinoma de Células Renais (CCR); ⁵. Linfoma Linfoblástico Agudo (LLA).

Figura 3. Fórmulas estruturais de seis inibidores de quinase para tratamento quimioterápico de câncer.

Além desses, outros inibidores seletivos se encontram em fase clínica de estudos e novas patentes são publicadas anualmente. O sucesso dessas drogas no tratamento de pacientes tem estimulado o investimento no desenvolvimento de novos fármacos.

Apesar das conquistas na descoberta de drogas inibidoras de proteínas quinases, o desenvolvimento de potentes inibidores com alto grau de seletividade continua a ser um

grande desafio. Muitos inibidores de quinases falharam na fase de desenvolvimento pré-clínico ou clínico, devido à falta de seletividade, pela indução de efeitos colaterais intoleráveis, principalmente porque os sítios catalíticos de diferentes quinases possuem uma sequência de aminoácidos altamente conservadas e também a conformação das mesmas. A análise sistemática das estruturas cristalográficas de proteínas quinases pode oferecer uma introspecção na concepção dos inibidores de quinases altamente seletivos para superar esses efeitos (LIAO, 2007).

Montfort (2009) destaca a relevância do uso das técnicas de planejamento de fármacos, pois como em outras áreas terapêuticas a descoberta de novos fármacos, principalmente contra o câncer, envolve ciclos interativos de desenvolvimento e síntese química combinada com a avaliação biológica do sistema, otimizando assim a potência e seletividade ao mesmo tempo, dando a atenção devida às propriedades farmacêuticas e propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção)

1.4. MARK

As MARKs (Microtubule Affinity Regulating Kinase) são quinases reguladoras dos microtúbulos e suas proteínas associadas (MAPs) (TOCHIO et al., 2006), são encontrados análogos das MARKs de mamíferos em fungos, nematóides, sapos e moscas, nestas foram observados papéis de MARKs em caminhos moleculares que envolvem neurodegeneração, câncer a apoptose. Foram originalmente purificadas do cérebro de ratos e caracterizadas como uma proteína serina quinase (JEON et al., 2005) e estão intimamente relacionadas com as proteínas quinases AMP-ativadas (AMPKs) que são sensores da carga da energia que regula os processos fisiológicos ATP-dependentes, consumindo ou regenerando esta carga de ATP na célula (LIZCANO et al., 2004). Em células polarizadas de mamíferos, como células epiteliais, estas quinases têm papel na organização assimétrica das células. Em neurônios as MARKs são necessárias para o crescimento de dendritos e estabelecimento da polaridade do neurônio (JEON et al., 2005).

As MAPs são estruturas celulares dinâmicas responsáveis pela estruturação do citoesqueleto, transporte intracelular, partição cromossômica durante a divisão celular e polarização da célula, como na formação de pseudópodes em macrófagos e na formação de axônios em neurônios (BIERNAT et al., 2002; BRAJENOVIC et al., 2004; DREWES et al., 1997; EBENETH et al., 1999; MATENIA et al., 2005; TRINCZEK et al., 2004).

O comportamento dinâmico deve ser modulado para permitir as mudanças desejadas na morfologia celular, as MAPs modulam essa dinâmica ligando-se aos microtúbulos e estabilizando-os (EBENETH et al., 1999), este poder de ligação está diretamente relacionado com o estado de fosforilação das MAPs.

Em especial, as MARKs fosforilam a proteína tau e outras MAPs no sítio de ligação de tubulina catalisando sua dissociação dos microtúbulos. A superexpressão celular de MARKs causa o rompimento da estrutura microtubular da célula, levando a um supercrescimento inapropriado, causando neoplasmas ou morte celular (DREWES et al., 1997; TRINCZEK et al., 2004). Até o momento não foram identificados fatores de ativação de MARK em cérebros de ratos vivos, exceto o choque eletroconvulsivante, fator neurotrófico cerebral e despolarização induzida por KCl em neurônios. Esses achados sugerem que as MARKs devem estar envolvidas na plasticidade sináptica em neurônios adultos (JEON et al., 2005).

A proteína tau é uma MAP descrita como moduladora da dinâmica microtubular, e a ligação desta e outras MAPs aos microtúbulos é controlada por seu estado de fosforilação, o qual é mediado pelas MARKs (MATENIA et al., 2005; SCOTT et al., 2000), isto foi observado em proteína tau purificada de depósitos de neurofibrilas que perderam a habilidade de ligar-se a microtúbulos, condição que foi revertida após desfosforilação. A superexpressão de MARKs causa o rompimento da rede microtubular celular. A hiperfosforilação de vários sítios, incluindo Ser262 na proteína tau pela MARK foi observada no cérebro de pacientes com o mal de Alzheimer e a superexpressão de MARK1 defeituosas em *Drosophila* resultou em neurodegeneração (CHUN et al, 2000; CHURCHER, 2006; DREWES et al., 1997; JEON et al., 2005; MATENIA et al., 2005; RAMIREZ et al., 1999; SCOTT et al., 2000). Durante a degeneração em mal de Alzheimer, a proteína tau agrega-se em filamentos helicoidais pareados, os principais componentes fibrosos de lesões neurofibrósas. As MARKs fosforilam as proteínas MAPs e tau na sequência de aminoácidos KXGS (BIERNAT et al. 2002). A região de ligação dos microtúbulos à proteína tau contém o resíduo Ser262 na primeira repetição da sequência de aminoácidos KIGS, um dos sítios predominantes de fosforilação em Alzheimer (JEON et al., 2005; BRIGHT et al, 2009).

As MARKs são compostas por 4 genes parálogos, sendo os domínios altamente conservados. Os pesos moleculares calculados para MARK1, 2, 3 e 4 são 88 kDa (793 aminoácidos), 81 kDa (722 aminoácidos), 89 kDa (797 aminoácidos) e 83kDa respectivamente.

Esta família de quinases foi previamente chamada KIN1/PAR-1/MARK. Embora grande, este nome traduz o fato que todos os membros desta família compartilham a mesma organização estrutural primária.

Uma árvore filogenética construída com as seqüências das quinases KIN1/PAR-1/MARK é mostrada na Figura 4. Embora as proteínas KIN1/PAR-1/MARK mostrem similaridade estrutural, funcionalmente ainda não foi encontrada nenhuma similaridade entre elas. Membros dessa família foram estudados em diversos organismos modelo e diversas funções foram identificadas como polaridade celular, estabilidade de microtúbulos, estabilidade protéica, sinalização intracelular e controle do ciclo celular (MANNING et al., 2002).

Figura 4. Árvore filogenética da família KIN1/PAR-1/MARK

A família protéica KIN1/PAR-1/MARK é homóloga à família KIN1/PAR-1/Snfl quinases de CaMK II e é subdividida em três domínios conservados, cabeça N-terminal onde está o domínio catalítico (1), domínio associado à ubiquitina (UBA) (2), e cauda C-terminal, denominado "domínio associado à quinase 1" (KA1) (3).

(1) Domínio N-terminal ou Domínio catalítico

O domínio N-terminal contém um sítio catalítico bem conservado. Os domínios catalíticos no N-terminal de todas as MARKs são altamente homólogos, sugerindo que os sítios de fosforilação devem ser similares (MURPHY, J. M. et al., 2007). Fora deste domínio foi detectado um baixo grau de similaridade.

O domínio catalítico contém dois sítios de fosforilação ativa em MARK1 e MARK2. Estes sítios são análogos a alças regulatórias encontradas em várias famílias de quinases onde uma ou duas fosforilações são essenciais para a atividade enzimática. O resíduo de fosfo-Ser é

parte de um motivo Ser-Pro, e pode ser um alvo para quinases do tipo “*upstream proline-directed*”, onde duas MARKs já foram descritas. A MARK quinase (MARKK), que é altamente homóloga a TAO-1 e pertence à família Ste20 de quinases, foi identificada no cérebro de ratos, ela ativa a MARK2 pela fosforilação desta em um resíduo, T208. LKB1, a outra “*upstream kinase*” identificada, forma um complexo com a MARK e fosforila um resíduo de Thr na alça T de MARK. Curiosamente LKB1 e MARK4 têm seus níveis aumentados nos cérebros isquêmicos de ratos, o que sustenta o possível papel de MARK na toxicidade neuronal (LIZCANO et al., 2004).

(2) Domínio associado à ubiquitina - UBA

O papel do UBA não foi explorado na família KIN1/PAR-1/MARK, mas um estudo de Rad23 no domínio UBA mostrou que ele se liga a cadeias poliubiquitínicas e regulam a proteólise pelo proteossoma. O número de genes que codificam KIN1/PAR-1/MARK varia de 1 (um) em *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) a 5 (cinco) em mamíferos.

Panneerselvam et al (2006) revelou a estrutura cristalina da porção catalítica N-terminal e o domínio UBA de MARK2 humana. Estes resultados mostraram que o domínio UBA liga-se ao domínio quinase e que a região ligante entre estes dois domínios está exposta ao solvente. É nesta região ligante que se encontra o grupamento de resíduos carregados negativamente, que é bem conservado nas proteínas da família MARK/PAR-1. Tochio e colaboradores (2006) sugerem que o domínio KA1 interage com as regiões carregadas negativamente que sucedem o domínio catalítico, com função de regular da atividade quinase das famílias protéicas MARK/PAR-1/kin1/MELK.

A presença de um domínio UBA adjacente ao domínio catalítico sugere potenciais interações com proteínas envolvidas na via ubiquitina proteossomo, reparação de DNA, e sinalização celular (PANNEERSELVEM et al., 2006). Devido a potencial importância da proteína MARK em processos fisiológicos e na patologia humana, sua análise estrutural é relevante para auxiliar na identificação de sítios de interação para possíveis inibidores.

(3) Domínio C-terminal ou Domínio associado a quinase 1 - KA-1

Em todas as quatro MARKs os últimos 40 aminoácidos correspondem ao domínio KA1 (domínio associado a quinase 1). Sua função ainda não foi precisamente identificada, mas como o nome sugere KA1 sempre é encontrado em associação com domínios catalíticos de quinase. Alguns membros da família KIN1/PAR-1/MARK também possuem um domínio UBA (domínio associado de ubiquitina) adjacente ao sítio catalítico. Todos os domínios KA1

foram encontrados na porção C-terminal com a sequência **ELKL** (Glu-Leu-Lys-Leu) altamente conservada.

Este domínio foi encontrado em várias outras quinases como KIN1, pEg3, MELK e SnRK1. Entretanto, a função de KA1 ainda não é conhecida. Alguns estudos sugerem que este domínio está envolvido na localização protéica, por exemplo, quando a porção C-terminal, incluindo o domínio KA1 é removido, a localização sub-celular da proteína humana pEg3 é diferente da localização da mesma sem nenhuma alteração durante a mitose. Por outro lado, em *Saccharomyces cerevisiae* KIN2 ou MELK humana, a região C-terminal age como um domínio auto-inibitório do domínio quinase N-terminal (JEON et al., 2005; TOCHIO et al., 2006).

1.4.1. A MARK3

A MARK3 é uma proteína serina/treonina quinase que é expressa pelo gene MARK3 também conhecido como CTAK1, PAR1A e KP78.

A caracterização da estrutura da porção catalítica N-terminal e do domínio UBA da MARK3 humana foi descrita por Murphy e colaboradores (2007) onde foi demonstrado que o domínio UBA liga-se ao lóbulo N-terminal (N-lóbulo) do domínio quinase através de várias interações hidrofóbicas conservadas. Estas interações são facilitadas por uma topologia não-canônica do domínio UBA onde a alfa-hélice está invertida com relação ao enovelamento do domínio UBA canônico, cujos alinhamentos das seqüências sugerem que sejam provavelmente conservados dentro dos domínios de outros membros da família AMPK/Snfl de quinases. Na figura 5 encontramos a representação em *ribbons* (a) e da estrutura em caráter modular (b) da proteína MARK3 humana. Estrutura esta que está depositado no Protein Data Bank (PDB) com o código: 2QNJ.

(a)

(b)

Figura 5. (a) Representação *ribbons* do domínio quinase e domínio UBA da MARK3 humana (código PDB: 2QNJ). **(b)** Representação da estrutura de caráter modular da MARK3.

São demandados inibidores específicos para as MARKs, pois a inibição de quinases tem se revelado como uma grande promessa no tratamento antineoplásico com vários fármacos em fase pré-clínica apresentando bons resultados e menor citotoxicidade em relação aos quimioterápicos utilizados na terapêutica, lembrando que seu estudo precisa ser minucioso, pois, as quinases estão presentes em diversos processos celulares (DANCEY et al., 2003; FABIAN et al., 2005), aumentando a relevância da busca por seletividade.

1.5. Planejamento racional de fármacos

O processo de desenvolvimento de fármacos tem sido profundamente alterado recentemente pela adoção de métodos computacionais, ajudando na concepção mais rápida de novos fármacos e com custos mais baixos. O planejamento racional de fármacos consiste no uso de uma coleção de ferramentas para ajudar a tomar decisões racionais em diferentes etapas do processo de descoberta do fármaco, tais como a identificação de um alvo biomolecular de interesse terapêutico, a seleção ou o design de novos compostos de partida e sua modificação para obter uma melhor afinidade, bem como no cálculo de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas (ZOETE et al., 2009).

O planejamento racional baseado em estrutura e no mecanismo de ação é a metodologia mais eficiente e menos dispendiosa para o desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos (também conhecidos como “compostos de partida” ou “lead compounds”), sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, eficácia e efeitos colaterais), até a elaboração de compostos candidatos a testes clínicos.

Esta metodologia é baseada na inibição ou estimulação da atividade biológica de macromoléculas, tais como proteínas ou ácidos nucleicos (DNA ou RNA) associados a diferentes doenças. A informação estrutural do bioreceptor (e ligantes) permite a descoberta e o planejamento de síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação, os quais podem vir a se tornar fármacos e serem introduzidos na terapêutica medicamentosa (OPREA, 2005).

Desde a concepção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, um processo que pode levar em média 11 anos ou mais, o uso de ferramentas computacionais (a

bioinformática, juntamente com a química computacional) vem se tornando, a cada dia, indispensável no planejamento racional de novos fármacos, já com inúmeros casos de sucesso envolvendo o emprego dessas metodologias computacionais (OPREA, 2005). Para Manuel Peitsch, da Novartis Institutes for BioMedical Research, o processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos é totalmente dependente das metodologias computacionais envolvidas (PEITSCH, 2004).

A convergência de tecnologias genômicas e o desenvolvimento de fármacos planejados contra alvos moleculares específicos provêm muitas oportunidades para o uso da bioinformática, com a finalidade de se diminuir o “gap” entre conhecimento biológico e terapia clínica. Isso pode ser alcançado, por exemplo, identificando genes que têm propriedades similares a conhecidos alvos, investigando similaridade “pairwise” entre bibliotecas (ou “pool” de bibliotecas) de diferentes origens, tais como as de células normais contra as de células tumorais e, ainda, construindo modelos dos alvos receptores baseados em homologia seqüencial e similaridade estrutural (COHEN et al., 2005; DESANY et al., 2004).

Dentre as ferramentas utilizadas no planejamento racional de fármacos, destaca-se o “docking” molecular como um dos métodos mais empregados. Com essa metodologia, são investigadas as possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um bioreceptor, ou simplesmente entre duas moléculas, tal como é o caso da interação entre proteína-proteína ou proteína-DNA, caracterizando o “docking macromolecular”. Entre os programas mais utilizados para simular interações entre macromoléculas biológicas, destaca-se o **ZDOCKPro** (INSIGHT II USER GUIDE, 2005).

O “docking” molecular proporciona um conhecimento básico das interações que estão ocorrendo entre o ligante e seu receptor, demonstrando uma estimativa de afinidade antes de síntese, bem como para técnicas de otimização do ligante (ZOETE et al., 2009).

Os métodos de “docking”, em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligação de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, os quais geram modelos matemáticos que predizem as melhores orientações do ligante, segundo uma lista de escores de energia. O “Problema do docking” é assim centrado na geração e avaliação (quase sempre por intervenção do usuário) de plausíveis estruturas de complexos intermoleculares (CODDING, 1998). As versões dos programas de maior sucesso em “docking”, **FlexE** (SYBYL USER GUIDE, 2005), **GOLD** (PFEIFFER-MAREK et al., 2003) e **GLIDE** (FRIESNER et al., 2004; HALGREN et al., 2004), consideram a flexibilidade do ligante e também de algumas cadeias laterais do sítio receptor. Os

promissores métodos de “docking” utilizam informação farmacofórica do sítio receptor para guiar as simulações, tais como o **FlexX-Pharm** (SYBYL USER GUIDE, 2005). A partir dessa metodologia é possível selecionar por “screening” virtual compostos de bases de dados contendo tipicamente milhares de estruturas (“docking search”), eliminando compostos não promissores antes que eles sejam sintetizados, em tempo consideravelmente menor do que o usualmente gasto com um “screening” por subestrutura.

O “screening” virtual é utilizado para a seleção de novos protótipos, e a literatura vem reportando, há alguns anos, diversos casos de sucesso com o uso dessa sistemática, tal como a descoberta de isoflavonóides como inibidores não-esteroidais da 5 α -redutase, utilizando “constraint” farmacofórica (BRENK et al., 2003; CHEN et al., 2001). Nessa era pós-genômica, o “screening” virtual complementa os conhecidos métodos experimentais de “screening” em larga escala no processo de descoberta de novos protótipos (KUNTZ, 1992). Porém, o sucesso do “screening” dito *in silico*, e em geral das técnicas de “docking”, depende do conhecimento de detalhes estruturais finos do sítio de reconhecimento (CARLSON et al., 1999).

A metodologia baseada na hipótese do farmacóforo é a do “análogo ativo” (MARSHALL, 2004). O farmacóforo representa o conjunto de domínios funcionais das moléculas ligantes através dos quais se define os tipos de interação que os ligantes em comum fazem com o sítio receptor. A análise, por métodos computacionais, dos possíveis conjuntos de grupos farmacofóricos associados a cada molécula ativa, permite a derivação do padrão farmacofórico comum ao conjunto de análogos ativos em questão. Entre os métodos mais robustos e eficientes que envolvem esse tipo de cálculo, destacam-se **Receptor** e **DiscoTech** (SYBYL USER GUIDE, 2005).

Em uma outra categoria de “docking”, a qual não envolve programas que realizam “screening” virtual, ou mesmo que tentam somente prever a orientação de um ligante no interior de um sítio receptor biológico (“docking single”), encontram-se os métodos conhecidos como “docking build” ou “docking *de novo*”. Entre os programas que empregam tal metodologia, destaca-se o **LUDI-CAP** (INSIGHT II USER GUIDE, 2005).

Inicialmente, o sítio receptor é caracterizado no tocante à sua capacidade de ligar moléculas, utilizando-se para isso grupos funcionais específicos, selecionados pelo programa a partir de sua própria base de dados. Esses grupamentos servem como “sonda” para a busca, nessa mesma base de dados, por fragmentos que possam interagir satisfatoriamente com os aminoácidos do sítio receptor, gerando uma nova molécula ligante. Esse método é

considerado o pioneiro para a otimização *in silico* de protótipos (MARSHALL, 2004). Alguns casos de sucesso envolvendo o uso dessa tecnologia têm sido reportados, tais como o planejamento validado de 10 novos inibidores da Transcriptase Reversa de HIV-1, na faixa micromolar de IC₅₀ (SCHENEIDER et al., 2005).

Uma diferente e robusta metodologia do planejamento racional de fármacos, agora já mais direcionada à otimização *in silico* de protótipos, consiste-se em investigar as condições energéticas entre moléculas as quais se aproximam uma da outra, gerando os campos de interação molecular (Molecular Interaction Field - MIF), assim denominados. Esses campos descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo de prova que se move confinado ao interior de uma “caixa” de energia (um “grid” 3D), o qual é posicionado de modo a mapear a região de interesse do alvo biológico (o sítio receptor).

Pioneiramente baseado no algoritmo de **Delphi** (GILSON et al., 1998) e posteriormente implementado no programa **Insight II** (INSIGHT II USER GUIDE, 2005), o método resolve numericamente a equação de Poisson-Boltzmann gerando um mapa de potencial eletrostático clássico. As diferentes provas que usualmente são testadas refletem as características químicas que deveriam possuir ou o ligante ideal ou fragmentos de sua estrutura. Os campos de interação molecular resultantes do cálculo podem ser visualizados como regiões bem definidas no espaço interior ao “grid”, as quais indicam as posições de mais baixa energia de interação que deveria haver entre o sítio receptor e os grupos de prova testados (ou átomos equivalentes no ligante ideal).

Os programas de uso mais freqüente que empregam metodologia similar são o **GRID** (GOODFORD, 1985) e o **CMIP** (BARRIL et al., 2001; FRADERA et al., 2002), e o **VolSurf** (SYBYL USER GUIDE, 2005) e o **Almond** (SYBYL USER GUIDE, 2005). O programa **VolSurf**, adicionalmente, transforma os campos moleculares de seus grupos de prova em “descriptors” (parâmetros), os quais estão associados com as principais forças de interação entre ligante e receptor, correlacionando-os espacialmente à atividade biológica. **VolSurf** pode calcular MIF tanto para o receptor, sem informação de ligantes, quanto para um conjunto de ligantes, sem informação do receptor.

Sua sistemática é similar àquela empregada em um dos métodos preditivos de maior sucesso em estudos que relacionam estrutura com atividade (QSAR): o **CoMFA** (*Comparative Molecular Field Analysis*), o qual também é utilizado para a otimização de protótipos (SYBYL USER GUIDE, 2005). Casos de sucesso em planejamento racional com

VolSurf, por exemplo, têm sido reportados na literatura, tais como o desenvolvimento de potentes inibidores da metaloprotease MMP-8.

Uma promissora tecnologia de ponta empregada na otimização *in silico* de protótipos é a metodologia **RACHEL** (*Real-time Automated Combinatorial Heuristic Enhancement of Lead compounds*), posteriormente implementada no programa **Sybyl** (SYBYL USER GUIDE, 2005). **RACHEL** foi especificamente projetado para otimizar compostos com baixa afinidade pelo sítio receptor, e assim o faz utilizando uma metodologia combinatorial automatizada. Nesse processo, todos os compostos de uma base de dados são inicialmente separados em grupamentos não-rotacionáveis, os quais eram anteriormente conectados entre si por ligações rotacionáveis. Todos os grupamentos não-rotacionáveis são guardados em um novo banco de dados não-redundante de componentes, assim criado pelo programa.

Essa nova base de dados conterá uma variedade de informação química na forma de parâmetros calculados para cada grupamento (ou componente), tais como volume, conectividade, cargas, entre outros. Esse “índice de propriedades” então gerado servirá como guia para o programa adicionar, excluir ou substituir grupamentos no protótipo, testando diferentes combinações dos grupamentos do banco de dados que aumentem a afinidade dos novos compostos derivados pelo sítio receptor

Para o desenvolvimento de um novo fármaco também já é possível estimar propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, bem como propriedades “drug-like” ou “lead-like” de diferentes compostos, selecionando, durante as diversas etapas da modelagem, somente aqueles com potencial de serem fármacos. Como exemplo, a ‘Regra dos 5’ (RO5), de Lipinski, é uma regra que os fármacos eficazes por via oral, em geral, seguem, a saber: peso molecular menor ou igual a 500, log *P* menor ou igual a 5, número de grupos doadores de ligações de hidrogênio menor ou igual a 5 e número de grupos aceptores de ligações de hidrogênio menor ou igual a 10 (LIPINSKI et al., 1997).

Assim, propriedades tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) podem ser preditas a partir do “screening” em bancos de dados contendo essas informações, as quais são computadas para uma grande variedade de compostos (TESTA et al., 2005). Entre os programas mais utilizados para esses fins, destacam-se o **Meteor** (predições de metabolismo) e **Derek** (predições de toxicidade).

Predizer se um fármaco será atóxico, específico ou, ainda, se não sofrerá algum tipo de biometabolismo até chegar ao seu alvo receptor, contribui para agilizar a descoberta de um novo fármaco, reduzindo etapas desse processo. É de grande importância se preocupar, desde

os estágios iniciais do planejamento de um fármaco, com a baixa toxicidade e alta especificidade deste fármaco proposto.

A figura 6 apresenta um esquema geral do processo de planejamento racional de fármacos. Em vez de problemas isolados, a descoberta da droga incorpora uma série de desafios desde a caracterização de uma doença em um nível molecular até finalmente trazer uma fármaco para o mercado. Este processo tem como fase inicial a seleção de alvos e identificação da estrutura e após aborda problemas como a identificação e otimização de candidatos a fármacos.

Figura 6. Representação do processo do planejamento racional de fármacos, através de um fluxograma, a dinâmica desde a descoberta de um novo alvo até a concepção final de um fármaco.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

As proteínas quinase têm se mostrado relacionadas ao desenvolvimento de diversas doenças, inclusive o câncer; desta forma, os inibidores de proteínas quinase têm surgido como uma grande classe de compostos com fins terapêuticos para o tratamento de câncer. Com o progresso e a rapidez na descoberta de novos alvos moleculares terapêuticos, faz-se de importância primordial a proposição destes novos candidatos a fármacos, sempre visando maior especificidade e eficácia.

A pesquisa de elaboração de um novo fármaco abrange diversas disciplinas unidas por um objetivo comum, ou seja, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Hoje, o emprego da abordagem de planejamento racional de fármacos pode significar a maximização da atividade desejada do fármaco dentro de determinados limites estruturais. Neste contexto, o uso de metodologias computacionais tem se tornado cada vez mais importante e difundido. Algumas dessas metodologias computacionais foram amplamente exploradas neste trabalho, com sucesso.

Recentemente, a proteína MARK3 foi identificada como um marcador para câncer, revelando-se super-expressa em câncer de cabeça e pescoço. Ela apresenta diversas funções, com papel na organização assimétrica das células e no crescimento de dendritos, bem como no estabelecimento da polaridade em neurônios.

Um extenso levantamento bibliográfico foi realizado na primeira fase deste estudo, com o intuito de identificar aspectos estruturais e funcionais relevantes da proteína MARK3 e também de outras proteínas quinase, procurando-se um paralelo que pudesse contribuir para um melhor entendimento dessa proteína e, a partir daí, planejar novos inibidores.

Assim sendo, foi realizada uma busca de proteínas homólogas à proteína de interesse, MARK3, a qual resultou em 29 proteínas que apresentaram sobreposição da cadeia principal com a MARK3, com um desvio médio quadrático entre os átomos de carbono alfa menor do que 2,0 Å, resultando em 89 complexos proteína-ligante. Com estas estruturas, foi possível também avaliar a similaridade sequencial delas com a MARK3, uma vez que proteínas com cerca de apenas 30% de identidade, podem ter excelente sobreposição das cadeias principais, sobretudo na região mais conservada do sítio ativo.

As proteínas identificadas apresentaram, após análise de alinhamento múltiplo, uma variação na identidade sequencial de 37,54 % (Serine/Threonine-Protein Kinase - CHK2) a 10,48% (C-kit protein kinase – Kit). A distribuição destas proteínas na árvore filogenética das

quinases, o quinoma, também foi realizada, onde percebeu-se que as duas primeiras proteínas identificadas como mais similares a MARK3 são da mesma classe (ou família), a CAMK.

Outra abordagem utilizada foi o método PIPSA, que investiga a similaridade eletrostática das proteínas. Com este método notamos que não necessariamente as proteínas que apresentam maior similaridade sequencial apresentam também maior similaridade eletrostática, sugerindo que a presença do inibidor é capaz de alterar o comportamento eletrostático das proteínas comparadas.

A determinação do sítio ligante de uma proteína é relevante quando se realiza “screening” virtual por intermédio de “docking”, com este intuito, como a proteína MARK3 ainda não possui estruturas de complexos elucidadas, fizemos a predição por intermédio de dois métodos (Q-SiteFinder e SiteHound) os quais confirmaram o mesmo sítio.

Uma vez definida a região do sítio ligante da MARK3, a identidade sequencial que diz respeito somente a esta particular região foi avaliada em comparação às 29 proteínas homólogas, revelando não conservar o mesmo padrão de identidade sequencial obtidos para as sequências totais.

Os ligantes das outras quinases, os quais com atividades reportadas, poderiam então ser utilizados para identificar as características funcionais, tais como doadores/aceptores de ligação de hidrogênio, grupos hidrofóbicos, etc. Para tanto, uma busca ainda mais recente na literatura demonstrou a existência de outros 11 inibidores da MARK3, mas que também ainda não apresentam complexos no PDB, embora contenham dados de atividade descritos, sejam IC50 ou Kd. Estas informações auxiliaram na derivação do padrão Farmacofórico.

Para a geração de farmacóforo, utilizou-se a abordagem baseada em ligantes, que envolve a análise de características estruturais dos ligantes conhecidos para a derivação de um padrão farmacóforo comum a uma série de compostos ativos. Esta análise foi realizada por dois métodos, o PharmaGist e o Discovery Studio, e com eles obteve-se resultados consensuais: dois grupos hidrofóbicos aromáticos unidos por um grupo doador de ligação de hidrogênio. Desta forma, a determinação do padrão farmacofórico de inibidores de MARK3 foi avaliada como de sucesso, e os métodos empregados, adequados.

No presente trabalho também foi possível a identificação de possíveis subestruturas ativas, capazes de realizar interações com o sítio ligante da proteína, onde estas subestruturas são conhecidas como “scaffold”. O “scaffold” foi utilizado no processo de “screening” virtual para buscas em bases de dados de compostos contendo propriedades de fármacos. O

“scaffold” gerado contemplou em sua estrutura as mesmas características funcionais propostas pelo padrão farmacofórico.

Os métodos de “docking” e “screening” virtual foram integrados sinergicamente para melhorar o processo de seleção de possíveis inibidores, e resultou em **20 compostos**. As simulações de “screening” virtual foram realizadas com as seguintes bases de dados: Chembridge (SUBCOLEÇÃO KinaSet) e ZINC. Todas essas bases de dados apresentam compostos ativos, fármacos, produtos naturais e moléculas com propriedades “drug-like” validadas *in silico*. O número de compostos presentes nas bases de dados e utilizados nas simulações é de aproximadamente 1 milhão.

Os compostos identificados nas simulações de “screening” virtual passaram por um processo de “rescore”, utilizando a abordagem de “docking” flexível. Dessa forma, vinte compostos foram selecionados e aqui foram apresentados.

Com os resultados dos estudos de “docking” foi realizada uma avaliação dos modos de ligação dos vinte compostos selecionados e obteve-se uma visão mais detalhada para a possível interação fármaco-receptor.

Baseado na Regra dos Cinco (RO5) de Lipinski, foram calculadas as propriedades físico-químicas para os vinte compostos selecionados, sendo que somente dois compostos, o **8** e o **9**, violaram uma regra, apresentando valor de logP acima de 5.

Dos vinte compostos selecionados, todos apresentaram átomos ou grupamentos nas posições sugeridas pelos cálculos dos campos de interação molecular (MIF) em relação à pelo menos dois dos seis grupos químicos de prova analisados. Assim, em relação aos MIF, os compostos apresentados se mostraram com potenciais, do ponto de vista energético, de realizar interações com os resíduos da proteína MARK3.

A análise apresentada em relação à toxicidade, realizada através do programa DEREK, aponta que oito dos compostos apresentaram alertas críticos de toxicidade, incluindo carcinogenicidade, mutagenicidade e dano cromossômico, entretanto, é necessário ressaltar que as predições de toxicidade são apenas alertas, os quais fornecem informações importantes nas etapas iniciais do planejamento de moléculas bioativas, com o intuito de garantir o planejamento de substâncias com menor grau de toxicidade.

Além disso, foi realizada a predição de espectros de atividade biológica para os 20 compostos selecionados através do PASS. Foram avaliadas as atividades de antineoplásico e de inibidor de proteína quinase. Os compostos **1, 7, 9, 10, 11, 12** e **15** apresentaram, segundo este método, as duas atividades, simultaneamente.

Foram realizadas simulações de Dinâmica molecular para cinco dos compostos selecionados. Tais simulações revelaram que as orientações dos compostos **7** e **11** se mostraram estáveis dos pontos de vista conformacional e das interações com a Ala135, constituindo-se em compostos bastante promissores em relação à capacidade de ligação e manutenção de interações com a MARK3.

Esse trabalho constitui-se no primeiro passo na busca de um novo inibidor da proteína MARK3. Os resultados são preliminares, de certa forma, entretanto indicaram 20 compostos com esse potencial de inibidor, além de propriedades de fármacos. A perspectiva imediata é a realização de ensaios biológicos de atividade destes compostos selecionados e futuras otimizações do novo protótipo, com vistas ao planejamento de novos agentes anticancerosos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAGYAN R, TOTROV M, KUZNETSOV D. ICM. A new method for protein modeling and design: applications to docking and structure prediction from the distorted native conformation. **J. Comp. Chem.**, v. 15, p. 488–506, 1994.

ALHO, O. P., TEPPON, H., MÄNTYSELKÄ, P., KANTOLA, S. Head and neck cancer in primary care: presenting symptoms and the effect of delayed diagnosis of cancer cases. **CMAJ**, v. 174, n. 6, p. 779-84, 2006.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A.A.; GREASY, J.E. Combining Docking and Molecular Dynamic Simulations in Drug Design. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 531-568, 2006.

ALTSCHUL, S.F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E.W. AND LIPMAN, D.J. BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL. **J MOL BIOL**, V.215, P. 403-410, 1990.

AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer facts & figures 2009**. Atlanta: American Cancer Society, 2009.

BAKER, N.A.; SEPT, D.; JOSEPH, S.; HOLST, M.J; MCCAMMON, J.A. Electrostatics of nanosystems: application to microtubules and the ribosome. **Natl Acad. Sci. USA**, v. 9, p. 10037–10041, 2001.

BAJORATH, J. Understanding chemoinformatics: a unifying approach. **Drug Discov. Today**, v. 9, n. 1, p. 13-14, 2004.

BARKER, A. J.; GIBSON, K. H.; GRUNDY, W.; GODFREY, A. A.; BARLOW, J. J.; HEALY, M. P.; WOODBUM, J. R.; ASHTON, S. E.; CURRY, B. J.; SCARLETT, L.; HENTHORN, L.; RICHARDS, L. Studies leading to the identification of ZD1839 (Iressa): an orally active, selective epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor targeted to the treatment of cancer. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, p. 1911-1914, 2001.

BARRIL, X., GELPI, J. L., LÓPEZ, J. M., OROZCO, M. How accurate can MD/LR and PB/SA calculations be for predicting relative binding affinities? Acetylcholinesterase huprine inhibitors as a test case. **Theor. Chem. Acc.**, v. 106, p. 2-9, 2001.

BARTON, G.J., STERNBERG, M. J.E. A strategy for the rapid multiple alignment of protein sequences. **J. Mol. Biol.**, v. 198, p. 327-337, 1987.

BARTON, G.J., STERNBERG, M.J.E. Flexible protein sequence patterns - a sensitive method to detect weak structural similarities. **J. Mol. Biol.**, v. 212, p. 389-402, 1990.

BASKETTER D. A.; SCHOLE E. W. Comparison of the local lymph-node assay with the guinea-pig maximization test for the detection of a range of contact allergens. **Food Chem. Toxicol.**, v. 30, p. 65-69, 1992.

BEDELL, J., KORF, I., YANDELL, M., BLAST, 2003. - Disponível em URL: <http://oreilly.com/catalog/blast/chapter/ch04.pdf>.

BENNER, S.A., CANNAROZZI, G., GERLOFF, D., TURCOTTE, M., CHELVANAYAGAM, G., **Chem. Rev.**, v. 97, p. 2725, 1997.

BIERNAT J., WU Y-Z., TIMM T., ZHENG-FISCHHO Q., MANDELKOW E., MEIJER L., MANDELKOW E-M., Protein Kinase MARK/PAR-1 Is Required for Neurite Outgrowth and Establishment of Neuronal Polarity, **Mol. Biol. Cell**, v. 13, p. 4013–4028, 2002.

BLAST - Disponível em URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>

BRAJENOVIC, M.; et al; Comprehensive Proteomic Analysis of Human Par Protein Complexes Reveals an Interconnected Protein Network. **J. Biol. Chem.**, v. 279, n.13, p. 12804–12811, 2004.

BRENK, R., NAERUM, L., GRAEDLER, U., GERBER, H., D., GARCIA, G. A. Virtual screening for submicromolar leads of tRNA-guanine transglycosylase based on a new unexpected binding mode detected by crystal structure analysis. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 1133-1143, 2003.

BRIGHT, N.J.; THORNTON, C.; CARLING, D. The regulation and function of mammalian AMPK-related kinases, **Acta Physiol**, v. 196, p. 15–26, 2009.

BROCKSTEIN, B.; MASTERS, G. **Head and Neck Cancer**. Norwell: Kluwer Academic Publishers, 2003. p. 2.

BURT, C.; RICHARDS, W. G.; HUXLEY, P. The application of molecular similarity calculations. **J Comput Chem**, v. 11, p. 1139–1146, 1990.

BUS, J. S.; POPP, J. A. Perspectives on the mechanism of action of the splenic toxicity of aniline and structurally-related compounds. **Food and Chemical Toxicology**, v. 25, p. 619-626, 1987.

BUSBY, E. C.; LEISTRITZ, D. F.; ABRAHAM, R. T.; KARNITZ, L. M.; SARKARIA, J. N. The Radiosensitizing Agent 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) Inhibits the DNA Damage Checkpoint Kinase hChk1. **Cancer Res.**, 60, 2108–2112, 2000.

BUTINA, D. Unsupervised Data Base Clustering Based on Daylight's Fingerprint and Tanimoto Similarity: A Fast and Automated Way To Cluster Small and Large Data Sets. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 39, p. 747-750, 1999.

CARBO, R.; LEYDA, L.; ARNAU, M. **Int. J. Quantum Chem.**, v. 17, p. 1185–1189, 1980.

CARLSON, H.; MASUKAWA, K. M.; McCAMMON, J. A. Method for including the dynamic fluctuations of a protein in a computer-aided drug design. **J. Phys. Chem. A**, v. 103, p. 10213-10219, 1999.

CAVASOTTO CN, ABAGYAN RA. Protein flexibility in ligand docking and virtual screening to protein kinases. **J. Mol. Biol.**, v. 337: p. 209–25, 2004.

CHEN, G. S., CHANG, C. S., KAN, W. M., CHANG, C. L., WANG, K. C., CHERN, J. W. **J. Med. Chem.**, v. 44, p. 3759-3763, 2001.

CHEN, J.; BROOKS III, C. L.; KHANDOGIN, J. Recent advances in implicit solvent-based methods for biomolecular simulations. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, p. 140–148, 2008.

CHIN, D.; BOYLE, G. M.; WILLIAMS, R. M.; FERGUSON, K.; PANDEYA, N.; PEDLEY, J.; CAMPBELL, C. M.; THEILE, D. R.; PARSONS, P. G.; COMAN, W. B. Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. **International Journal of Cancer**, v.113, p. 789-797, 2005.

CHOTHIA, C., LESK, A.M., **EMBO J.**, v. 5, p. 823, 1986.

CHUN, JAESUN et al; 14-3-3 Protein Mediates Phosphorylation of Microtubule associated Protein Tau by Serum- and Glucocorticoid-induced Protein Kinase 1. **Mol. Cells**, v. 18, n. 3, pp. 360-368, 2004.

CHURCHER, IAN; **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 6, p. 579-595, 2001

CLARK, K.; PLATER, L.; PEGGIE, M.; COHEN, P. Use of the Pharmacological Inhibitor BX795 to Study the Regulation and Physiological Roles of TBK1 and I B Kinase A distinct upstream kinase mediates SER-172 Phosphorylation and activation. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY (JBC)** v. 284, n. 21, p. 14136–14146, 2009.

CLAUSSEN H, BUNING C, RAREY M, LENGAUER T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. **J. Mol Biol.**, v. 308: p. 377–95, 2001.

CODDING, P. W., In Structure-Based Drug Design., Kluwer Publish, Dordrecht, 1998.

COHEN P., The role of protein phosphorylation in human health and disease. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 5001–5010, 2001.

COHEN, M. S.; ZHANG, C.; SHOKAT, K. M.; TAUNTON, J. Structural bioinformatics-based design of selective irreversible kinase inhibitors. **Science**, v. 308, p.1318-1321, 2005.

COSTA, A. M. N.; ARAUJO, J. G.; SILVA, V. B.; TAFT, C. A.; SILVA, C. H. T. P. Molecular dynamics simulations. In: TAFT, C. A.; SILVA, C. H. T. P. (Ed.). **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics – Vol.2**. Kerala: Research Signpost, 2008. cap. 2, 38 p.

DANCEY, J.; SAUSVILLE, E.A.; Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 296-313, 2003.

DAVIS, L.D., Handbook of Genetic Algorithms, Van Nostrand Rheinhold, New York 1991.

DAYHOFF, M.O., SCHWARTZ, R.M., **Nat. Biomed. Res. Found.**, v. 3, p. 353-358, 1978.

DEAN, P. M. Molecular Similarity in Drug Design, Blackie. Academic & Professional, London, 1995.

DESANY, B.; ZHANG, Z. Bioinformatics and cancer target discovery. **Drug Discov. Today**, v. 09, p. 795-802, 2004.

DEREK AND METEOR 8.0. LHASA LIMITED, LEEDS, UK, 2004.

DIAS NETO, E., **Biológico**, São Paulo, v.63, n.1/2, p.33-35, 2001.

DÖBRÖSSY, LAJOS; Epidemiology of head and neck cancer: Magnitude of the problem. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 24, p. 9–17, 2005.

DREWES, G.; EBNETH, A.; PREUSS, U.; et al.; MARK – a novel family of protein kinases that phosphorylate microtubule-associated proteins and trigger microtubule disruption.; **Cell**, v. 89, p. 297–308, 1997.

DROR, O.; SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. Novel Approach for Efficient Pharmacophore-Based Virtual Screening: Method and Applications. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 49, n. 10, p. 2333–2343, 2009.

DRUKER, B. J.; TAMURA, S.; BUCHDUNGER, E.; OHNO, S.; SEGAL, G. M.; FANNING, S.; ZIMMERMANN, J.; LYDON, N. B. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nat. Med.**, v. 2, p. 561-566, 1996.

DUNHAM, I.; SHIMIZU, N.; ROE, B. A.; CHISSOE, S.; HUNT, A. R.; COLLINS, J. E.; BRUSKIEWICH, R.; BEARE, D. M.; CLAMP, M.; SMINK, L. J.; AINSCOUGH, R.; ALMEIDA, J. P.; BABBAGE, A.; BAGGULEY, C.; BAILEY, J.; BARLOW, K.; BATES, K. N.; BEASLEY, O.; BIRD, C. P.; BLAKEY, S.; BRIDGEMAN, A. M.; BUCK, D.; BURGESS, J.; BURRILL, W. D.; O'BRIEN, K. P. The DNA sequence of human chromosome 22. **NATURE**, V.402, P. 489-495, 1999.

EBNETH A., DREWES G., MANDELKOW E.-M., AND MANDELKOW E.; Phosphorylation of MAP2c and MAP4 by MARK Kinases Leads to the Destabilization of Microtubules in Cells. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 44, p. 209–224, 1999.

EDDY, S.R. Where did the BLOSUM62 alignment score matrix come from? **Nat. Biotechnol.**, v. 22, p. 1035-1036, 2004.

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

EWING TJ, MAKINO S, SKILLMAN AG, KUNTZ ID. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **J Comput Aided Mol Des.**, v. 15: p. 411–28, 2001.

FABIAN, M.A.; BIGGS, W.H.; III, TREIBER, D.K.; ATTERIDGE, C.E.; AZIMIOARA, M.D.; BENEDETTI, M.G.; CARTER, T.A.; CICERI, P.; EDEEN, P.T.; FLOYD, M.; FORD, J.M.; GALVIN, M.; GERLACH, J.L.; GROTZFELD, R.M.; HERRGARD, S.; INSKO, D.E.; INSKO, M.A.; LAI, A.G.; LÉLIAS, J.M.; MEHTA, ZDRAVKO V MILANOV, ANNE MARIE VELASCO, LISA M WODICKA, HITESH K PATEL, PATRICK P ZARRINKAR & DAVID J LOCKHART. A small molecule–kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. **Nature Biotechnology**, v. 23, p. 329-336, 2005.

FRADERA, X.; DE LA CRUZ, X.; SILVA, C. H. T. P.; GELPI, J. L.; LUQUE, F. J.; OROZCO, M. Ligand-induced changes in the binding sites of proteins. **Bioinformatics**, v. 18, p. 939-948, 2002.

FRIESNER, R.A.; BANKS, J.L.; MURPHY, R.B.; HALGREN, T.A.; KLICIC, J.J.; MAINZ, D.T.; REPASKY, M.P.; KNOLL, E.H.; SHELLEY, M.; PERRY, J.K.; SHAW, D.E.; FRANCIS, P.; SHENKIN, P.S. Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy. *J. Med. Chem.*, v. 47, n. 7, p. 1739–1749, 2004.

FUKUSHIMA, S.; TANAKA, H.; ASAKAWA, E.; KAGAWA, M.; YAMAMOTO, A.; SHIRAI, T. Carcinogenicity of Uracil, a Nongenotoxic Chemical, in Rats and Mice and Its Rationale. **Cancer Res.**, v. 52, p. 1675-1680, 1992.

GARÓFOLO A., AVESANI C. M., CAMARGO K. G., BARROS M. E., SILVA S. R. J., TADDEI J. A. A. C., SIGULEM D. M. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 4, p. 491-505, 2004

GILSON, M.; SHARP, K.; HONIG, B. J. Calculating the electrostatic potential of molecules in solution: method and error assessment. **J. Comp. Chem.**, v. 09, n. 04, p. 327-335, 1988.

GLEN, R.C.; ADAMS, S.E. Similarity Metrics and Descriptor Spaces - Which Combinations to Choose? **QSAR Comb. Sci.**, v. 25, n. 12, p. 1133-1142, 2006.

GOLDBERG, D.E., Genetic Algorithms in Search Optimization and Machine Learning, Addison-Wesley, Reading, MA, 1989.

GOLDENBERG, D.; LEE, J.; KOCH, W. M.; KIM, M. M.; TRINK, B.; SIDRANSKY, D.; MOON, C. Habitual risk factors for head and neck cancer. **Otolaryngology – Head and Neck surgery**, v. 131, p. 986-993, 2004.

GOOD, A. C. In Molecular Similarity in Drug Design; Dean, P. M., Ed.; Blackie Academic & Professional: London; p. 1–23, 1995.

GOODFORD, P. J. A Computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. **J. Med. Chem.**, v. 28, n. 07, p. 849-857, 1985.

GREENLEE R.T.; HILL-HARMON, M.B.; MURRAY, T.; THUN, M. Cancer statistics, 2001. **Cancer J. Clin.**, v.51, p.15-36, 2001.

HENIKOFF, S., HENIKOFF, J.G., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, v. 89, p. 10915-10919, 1992.

HERNANDEZ, M.; GHERSI, D.; SANCHEZ, R. SITEHOUND-web: a server for ligand binding site identification in protein structures. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, p. 413–416, 2009.

HOLLAND, J.H., *Adaptation in Natural and Artificial Systems*, MIT Press, Cambridge, MA, 1992.

HÖLTJE, H. -D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. Introduction to comparative protein modeling. In: *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003a, p. 87-143.

HÖLTJE, H. -D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. Small molecules. In: *Molecular Modeling: Basic Principles and Applications*. Weinheim: Wiley-VCH, 2003b, p. 9-72.

HUEY, R.; MORRIS, G.M.; OLSON, A.J.; GOODSSELL, D.S. A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. **J Comput Chem.**, v. 28: p. 1145–52, 2007

HUNTER T., SEFTON B.M., Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** , v. 77, p. 1311–1315, 1980.

HUNTER K.D.; PARKINSON, E.K.; HARRISON, P.R. Profiling early head and neck cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 5, p. 127-135, 2005.

INSIGHT II USER GUIDE, version 2005, Accelrys, CA, USA, 2005.

IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening. *J Chem Inf Model*. v. 45, n. 1, p.177-82, 2005.

JEMAL, A.; SIEGEL, R.; WARD, E.; MURRAY, T.; XU, J.; SMIGAL, C.; THUN, M.J. Cancer statistics, 2006. **Cancer J. Clin.**, v. 56, p. 106-130, 2006.

JEON, SONGHEE, YONG-SIK KIM, JOOBAE PARK, CHANG-DAE BAE; Microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) is activated by electroconvulsive shock in the rat hippocampus. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, p. 1608–1618, 2005.

JONES, G., WILLETT, P., GLEN, R.C., **J. Mol. Biol.**, v. 245, n. 1, p. 43-53, 1995.

JONES G, WILLETT P, GLEN RC, LEACH AR, TAYLOR R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J Mol Biol.**, v. 267, p. 727–48, 1997.

KARAMAN, M. W.; HERRGARD, S.; TREIBER, D. K.; PAUL GALLANT¹, COREY E ATTERIDGE, BRIAN T CAMPBELL, KATRINA W CHAN, PIETRO CICERI, MINDY I DAVIS, PHILIP T EDEEN, RAFFAELLA FARAONI, MARK FLOYD, JEREMY P HUNT, DANIEL J LOCKHART, ZDRAVKO V MILANOV, MICHAEL J MORRISON, GABRIEL PALLARES, HITESH K PATEL, STEPHANIE PRITCHARD, LISA M WODICKA¹ & PATRICK P ZARRINKAR. A quantitative analysis of kinase inhibitor selectivity. **NATURE BIOTECHNOLOGY**, v. 26, n. 1, 2008.

KARLIN, S., ALTSCHUL, S. F., **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 87, p. 2264–2268, 1990.

KATO, T.; et al; Isolation of a Novel Human Gene, MARKL1, homologous to MARK3 and its involvement to hepatocellular carcinogenesis; **Neoplasia**, v. 3, n. 1, p. 4 – 9, 2001.

KIM, S. Y., HAHN W. C., Cancer genomics: integrating form and function, **Carcinogenesis**, v.28, n.7, p.1387–1392, 2007.

KIMURA, E. T., BAÍA, G. S., **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 46, n. 4, p. , 2002.

KITCHEN, D.B., DECORNEZ, H., FURR, J.R., BAJORATH, J., **Nat. Rev. Drug Discov.**, v.3, n. 11, p. 935–49, 2004.

KUBINYI, H.; MÜLLER, G. Chemogenomics in drug discovery: a medicinal chemistry perspective. Wiley-VCH, 2004.

KUNTZ, I. D., **Science**, v. 257, p. 1078-1082, 1992.

LEOPOLDINO, A.M.; CANDURI, F.; CABRAL, H.; JUNQUEIRA, M.; de MARQUI, A.B.; APPONI, L.H.; da FONSECA, I.O.; DOMONT, G.B.; SANTOS, D.S.; VALENTINI, S.; BONILLA-RODRIGUEZ, G.O.; FOSSEY, M.A.; de AZEVEDO, W.F.JR; TAJARA, E.H. Expression, purification, and circular dichroism analysis of human CDK9. **Protein Expr Purif.**, v. 42, n. 2, p. 614-620, 2006.

LAURIE, A.T., JACKSON, R.M., **Bioinformatics**, v. 21, p. 1908-191, 2005.

LE, Q.T.; GIACCIA, A.J. Therapeutic exploitation of the physiological and molecular genetic alterations in head neck cancer. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 5004-13, 2007.

LENGAUER, T., RAREY, M., **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 6, n.3, p. 402-6, 1996.

LIAO, J. JL. Molecular Recognition of Protein Kinase Binding Pockets for Design of Potent and Selective Kinase Inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 50, n. 3, p. 409-424, 2007.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 01, p. 337-341, 2004.

LIPINSKI, C. A.; HOPKINS, A. Navigating chemical space for biology and medicine. **Nature**, v. 432, p. 855-861, 2004.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.

LIZCANO, J; et al.; LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1; **The EMBO Journal**, 23, 833-843, 2004.

LIU, T.; LIN, Y.; WEN, X.; JORISSEN, R.N.; GILSON, M.K. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 198-201, 2007.

LOMBARDO, L. J.; LEE, F. Y.; CHEN, P.; NORRIS, D.; BARRISH, J. C.; BEHNIA, K.; CASTANEDA, S.; CORNELIUS, L. A.; DAS, J.; DOWEYKO, A.M.; FAIRCHILD, C.; HUNT, J. T.; INIGO, I.; JOHNSTON, K.; KAMATH, A.; KAN, D.; KLEI, H.; MARATHE, P.; PANG, S.; PETERSON, R.; PITT, S.; SCHIEVEN, G. L.; SCHMIDT, R. J.; TOKARSKI, J.; WEN, M. L.; WITYAK, J.; BORZILLERI, R. M. Discovery of N-(2-chloro-6-methyl-phenyl)-2-(6-(4-(2-hydroxyethyl)-piperazin-1-yl)-2-methylpyrimidin-4-ylamino)thiazole-5-carboxamide (BMS-354825), a dual Src/Abl kinase inhibitor with potent antitumor activity in preclinical assays. **J Med Chem**, v. 47, p. 6658-6661, 2004.

LOWINGER, T. B.; RIEDL, B.; DUMAS, J.; SMITH, R. A. Design and discovery of small molecules targeting Raf-1 kinase. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, p. 2269-2278, 2002.

MADURA, J.D., BRIGGS, J.M., WADE, R.C., DAVIS, M.E., LUTY, B.A., ILIN, A., ANTOSIEWICZ, J., GILSON, M.K., BAGHERI, B., SCOTT, L.R. Electrostatics and diffusion of molecules in solution: Simulations with the University of Houston Brownian dynamics program. **Comput. Phys. Commun.**, p. 57–95, 1995.

MAGGIORA, G.M.; JOHNSON, M.A. Introduction to similarity in chemistry. **Concepts Appl Mol Similarity**, p. 1-13, 1990.

MALDONADO, A. G.; DOUCET, J. P.; PETITJEAN, M., FAN, B. T. **Mol. Divers.**, v. 10, p. 39 – 79, 2006.

MANNING, G., WHYTE, D.B., MARTINEZ, R., HUNTER, T., SUDARSANAM, S.; The protein kinase complement of the human genome. **Science**. v. 298, p. 1912–1934, 2002.

MATENIA, D; et al.; PAK5 Kinase Is an Inhibitor of MARK/Par-1, Which Leads to Stable Microtubules and Dynamic Actin. **Mol. Biol. Cell**; v. 16, p. 4410–4422, 2005.

MAZZINI, C. B.; SCHUSTER, R. C.; MAZZINI, A. R. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n.1, p. 55-61, 2007.

MERLOT, C. Computational toxicology—a tool for early safety evaluation. **Drug Discov. Today**, p. 1-7, 2009.

Ministério da Saúde - Brasil. Instituto Nacional do Câncer – INCA – Disponível em URL: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=322 [2007 ago. 13]

MONTFORT, R.L.M. van; WORKMAN, P. Structure-based design of molecular cancer therapeutics. **Trends in Biotechnology**, v.27, n. 5, p. 315-328, 2009.

MORRIS GM, GOODSSELL DS, HALLIDAY RS, HUEY R, HART WE, BELEW RK, OLSON AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. **J. Comp. Chem.** v.19, p. 1639–62, 1998

MOYER, J. D.; BARBACCI, E. G.; IWATA, K. K.; ARNOLD, L.; BOMAN, B.; CUNNINGHAM, A.; DIORIO, C.; DOTY, J.; MORIN, M. J.; MOYER, M. P.; NEVEU, M.; POLLACK, V. A.; PUSTILNIK, L. R.; REYNOLDS, M. M.; SLOAN, D.; THELEMAN, A.; MILLER, P. Induction of apoptosis and cell cycle arrest by CP-358,774, an inhibitor of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. **Cancer Res.**, v. 57, p. 4838-4848, 1997.

MURPHY, B. A.; RIDNER, S.; WELLS, N.; DIETRICH, M. Quality of life research in head and neck cancer: A review of the current state of the science. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 62, p. 251–267, 2007.

MURPHY, J. M.; KORZHNEV, D. M.; CECCARELLI, D. F.; BRIANT, D.J.; ZARRINE-AFSAR, A.; SICHERI, F.; KAY, L. E.; PAWSON, T. Conformational instability of the MARK3 UBA domain compromises ubiquitin recognition and promotes interaction with the adjacent kinase domain. **PNAS**, v. 104, p. 14336-14341, 2007.

MUSTER, W.; BREIDENBACH, A.; FISCHER, H.; KIRCHNER, S.; MÜLLER, L. e PÄHLER, A. Computational toxicology in drug development. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 7-8, p. 303-310, 2008.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B.; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecl. Quím.**, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

NISSINK, J.W.M., MURRAY, C., HARTSHORN, M., VERDONK, M.L., COLE, J.C., Taylor, R.A, Proteins: Struct., Funct., Genetics, **2002**, 49 (4), 457-471.

OLIVEIRA, I. B. *et al.* Ver. Cien. Méd., Campinas, 14(6):523-528, nov./dez., **2005**.

OPREA, T. I. (ed). In *Chemoinformatics in Drug Discovery*, Wiley-VCH, Weinheim, **2005**.

PANNEERSELVAM, SARAVANAN; MARX, ALEXANDER; MANDELKOW, EVA-MARIA; MANDELKOW, ECKHARD. *Structure* **2006**, 14, 173-183.

PEITSCH, M. C. Manuel Peitsch discusses knowledge management and informatics in drug discovery. **Drug Discovery Today: BIOSILICO**, v. 02, p. 94-96, 2004.

PENDLINGTON, R. U.; BARRATT, M. D. Molecular basis of photocontact allergy. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 12, p. 91-103, 1990.

PFEIFFER-MAREK, S., MATTER, H., ENGLERT, H., GERLACH, U., KNiePS, S., SCHUDOK, M., LEHR, K. H.. In *Designing Drugs and Crop Protectants*, Proceedings of the 14th European Symposium on QSAR, Ford, M., Livingstone, D., Derden, J., van de Waterbeemd, H. (Eds). Blackwell Publishers, Oxford, **2003**, pp.104-105.

RAMÍREZ, G. et al; Brazilian Journal of Medical and Biological Research, Regulatory roles of microtubule associated proteins in neuronal morphogenesis. Involvement of the extracellular matrix (**1999**) 32: 611-618.

RAREY M, KRAMER B, LENGAUER T, KLEBE G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J Mol Biol.* v. 261, p. 470–89, 1996.

REVISTA FAPESP, 56, Agosto/**2000**.

RICHARD, A. M. *J Comput Chem* **1991**, 12, 959–969.

RICHTER, S.; WENZEL, A.; STEIN, M.; GABDOULLINE, R.R; WADE, R.C. WebPIPSA: a web server for the comparison of protein interaction properties. **Nucleic Acids Research**, v. 36, p. 276-280, 2008.

ROSKOSKI JR, R. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and câncer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 319 (**2004**) 1-11.

SANZ, F.; MANAUT, F.; RODRIGUEZ, J.; LOZOYA, E.; LOPEZ-DE-BRINAS, E. *J Comput-AidedMol Design* **1993**, 7, 337–347.

SAPKOTA, G.P.; CUMMINGS, L.; NEWELL, F.S.; ARMSTRONG, C.; BAIN, J.; FRODIN, M.; GRAUERT, M.; HOFFMANN, M.; SCHNAPP, G.; STEEGMAIER, M.; COHEN, P.; ALESSI, D.R. BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. **Biochem J.**, v. 401, n.1, p.29-38, 2007.

SCHNEIDER, G.; BÖHM, H. Virtual screening and fast automated docking methods. **Drug Discovery Today**, v. 07, p. 64-70, 2002.

SCHNEIDER, G.; FECHNER, U. Computer-based *de novo* design of drug-like molecules. **Nature Reviews: Drug Discovery**, v. 04, p. 649-663, 2005.

SCHNEIDMAN-DUHOVNY, D.; DROR, O.; INBAR, Y.; NUSSINOV, R.; WOLFSON, H.J. PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. 223-228, 2008.

SCOTT M. JENKINS AND GAIL V. W. JOHNSON; Microtubule/MAP-Affinity Regulating Kinase (MARK) Is Activated by Phenylarsine Oxide In Situ and Phosphorylates Tau Within Its Microtubule-Binding Domain; *J. Neurochem.*, Vol. 74, No. 4, **2000**.

SILVEIRA, N.J.F.; VARUZZA, L.; MACHADO-LIMA, A.; LAURETTO, M.S.; PINEIRO, D.G.; RODRIGUES, R.V.; SEVERINO, P.; NOBREGA, F.G.; SILVA JR; W.A.; PEREIRA, C.A.B.; TAJARA, E.H. Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. **BMC Medical Genomics**, v. 1:56, 2008.

STEWART, B. W.; KLEIHUES, P. **World Cancer Report**. Lyon: IARC; 2003.

Sybyl User Guide, version 7.1, Tripos Inc., CA, USA, **2005**.

SUN, L.; LIANG, C.; SHIRAZIAN, S.; ZHOU, Y.; MILLER, T.; CUI, J.; FUKUDA, J. Y.; CHU, J. Y.; NEMATALLA, A.; WANG, X.; CHEN, H.; SISTLA, A.; LUU, T. C.; TANG, F.; WEI, J.; TANG, C. Discovery of 5-[5-fluoro-2-oxo-1,2-dihydroindol-(3Z)-ylidenemethyl]-2,4-dimethyl-1H-pyrrole-3-carboxylic acid (2-diethylaminoethyl)amide, a novel tyrosine kinase inhibitor targeting vascular endothelial and platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase. **J Med Chem**, v. 46, p. 1116-1119, 2003.

TASSAN, JEAN-PIERRE, LE GOFF, XAVIER; *An overview of the KIN1/PAR-1/MARK kinase family*; *Biology of the Cell* 96 (**2004**) 193–199.

TOCHIO, N., et al; Solution structure of the kinase-associated domain 1 of mouse microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase 3, *Protein Sci.* **2006** 15: 2534-2543.

TOLCHIN, E., *Genomics & Proteomics*, **2005**, 5, 21-24.

THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J., *Nucleic Acids Res.*, **1994**, 22(22), 4673-80.

TRINCZEK, B.; et al; MARK4 Is a Novel Microtubule-associated Proteins/Microtubule Affinity-regulating Kinase That Binds to the Cellular Microtubule Network and to Centrosomes; *The Journal of Biological Chemistry*, Vol. 279, No. 7, Issue of February 13, pp. 5915–5923, **2004**.

Tsar v.3.3. Reference and User's Guide, Oxford Molecular, Oxford, England, 2000.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 52, p. 609-603, 2003.

WADE, R. C. Calculation and application of molecular interaction fields. In : CRUCIANI, G. **Molecular Interaction Fields**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006, p. 27-42.

WALTERS, W. P., STAHL, M. T., MURCKO, M. A. Virtual screening - an overview. **Drug Discovery Today**, v. 3, n. 4, p. 160-178, 1998.

WHITE J. S., WEISSFELD J. L., RAGIN C. C. R., ROSSIE K. M., MARTIN C. L., SHUSTER M., ISHWAD C. S., LAW J. C., MYERS E. N., JOHNSON J. T., GOLLIN S. M.- *Oral Oncology* (2007) 43, 701– 712.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **National cancer control programmes: policies and managerial guidelines**. Geneva, 2002.

WUNSCH-FILHO, V., ELUF-NETO, J., LOTUFO, P. A., SILVA JUNIOR, W. A., ZAGO, M. A., *Braz J Med Biol Res*, 2006, 39: 545-553.

ZIMMERMANN, J.; BUCHDUNGER, E.; METT, H.; MEYER, T.; LYDON, N.B. Potent and selective inhibitors of the Abl-kinase: Phenylaminopyrimidine (PAP) derivatives. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, v. 7, p. 187-192, 1997.

ZOETE, V.; GROSDIDIER, A.; MICHIELIN, O. Docking, virtual high throughput screening and in silico fragment-based drug design. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**. v.13, n. 2, p. 238-248, 2009.