UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Quinase p38 alfa como alvo para o planejamento de fármacos em
Mal de Alzheimer**

Flávio Roberto Pinsetta

Ribeirão Preto
2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Quinase p38 alfa como alvo para o planejamento de fármacos em
Mal de Alzheimer**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Química e Física
Biológica

Orientado: Flávio Roberto Pinsetta

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

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 26/02/2013. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2013

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.

Pinsetta, Flávio Roberto

Quinase p38 alfa como alvo para o planejamento de fármacos em Mal de Alzheimer. Ribeirão Preto, 2013.

74 p.; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química e Física Biológica.

Orientador: da Silva, Carlos Henrique Tomich de Paula.

1. Mal de Alzheimer. 2. Quinase p38 α . 3. Modelagem molecular.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávio Roberto Pinsetta

Quinase p38 alfa como alvo para o planejamento de fármacos em Mal de Alzheimer.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Química e Física
Biológica.

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Nelson Roberto Pinsetta, Claudete
Maria Scardovelli Pinsetta, Walter Domingos
Pinsetta, Sublime Bombarda Pinsetta, Rosa
Cecília Scardovelli e Yara Gurgel Dall’Acqua,
com todo o meu amor e admiração.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, por me guiar e me orientar em meus momentos mais difíceis, me abençoando sempre com muita saúde e discernimento.

Ao professor Carlos Henrique Tomich de Paula da Silva, pela amizade e orientação dedicada, e pelo exemplo de força, superação, competência, persistência e paciência.

À CAPES, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa concedida.

Aos meus queridos pais, Nelson Roberto Pinsetta e Claudete Maria Scardovelli Pinsetta, que sempre me deram força nos momentos difíceis. Tudo que sou e que conquistei é reflexo da dedicação e do carinho de vocês.

À minha namorada Yara Gurgel Dall'Acqua, por todo o seu amor, dedicação, carinho, estímulo e incentivo.

Ao meu irmão Walter Roberto Pinsetta, pelo incentivo.

Aos amigos, colegas e funcionários do Laboratório de Química Computacional, Jonathan, Ricardo, Evandro, Susi, João, Daniel, Peterson, Pedro, Marcelo, Cláudia, Luís Otávio, Vanessa, Valquíria, Getúlio, Milena, Thalita, Paulo e Galo, por dividirem comigo as alegrias, as conquistas e, também, os momentos de dificuldade.

Às funcionárias da seção de pós-graduação, Rosana, Eleni, Rafael, Rosemary e Henrique, pelos importantes serviços prestados.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências, pela oportunidade e pelo amparo prestado durante minha formação.

**“Não cruze os braços diante de uma
dificuldade, pois o maior homem do mundo
morreu de braços abertos!”**

Bob Marley (1945 a 1981)

RESUMO

PINSETTA, F. R. **Quinase p38 alfa como alvo para o planejamento de fármacos em Mal de Alzheimer.** 2013. 74f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

O Mal de Alzheimer (MA) foi caracterizado pela primeira vez em 1907 pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer, tendo como sintomas clínicos disfunções cognitivas, fisiológicas, comportamentais, perda de memória, e eventualmente incontinência, demência, acamação e morte. É uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central que costuma afetar, principalmente, indivíduos em faixa etária mais avançada. Este mal é caracterizado microscopicamente pela presença de placas amilóides, que são acúmulos da proteína beta-amilóide inter-neurônios, e emaranhados neurofibrilares, formados predominantemente por formas altamente fosforiladas de uma proteína associada aos microtúbulos, Tau, as quais formam massas emaranhadas que consomem o corpo celular neuronal, possivelmente levando à disfunção neuronal e finalmente à morte. MAPK p38 α tem sido implicada em dois eventos associados ao MA, fosforilação da Tau e inflamação. MAPK p38 α é ativada por uma via de fosforilação dupla em Thr180 e Tyr182. O planejamento de fármacos inibidores de p38 α é principalmente focado em pequenas moléculas que competem pelo sítio catalítico do ATP. Aqui, nós utilizamos diferentes técnicas de modelagem molecular e planejamento racional baseado em estrutura e ligantes, tendo como base os inibidores da MAPK p38 α descritos na literatura, além das estruturas depositadas no PDB. Como resultado das diferentes abordagens de triagens virtuais utilizadas neste trabalho, tais como “docking”, farmacóforo, dinâmica molecular, campos de interação molecular, predição de atividade e toxicidade, cálculo de propriedades farmacocinéticas e físico-químicas, foi selecionado um total de 14 compostos que atendem aos critérios adotados de baixa ou nenhuma toxicidade potencial, bom perfil farmacoterapêutico predito, atividades calculadas em valores comparáveis aos obtidos para os compostos de referência, além da manutenção das principais interações observadas para os inibidores mais potentes. Estes compostos podem ser adquiridos para estudos de inibição *in vitro* frente à enzima MAPK p38 α , contribuindo assim na busca de um potencial candidato à fármaco no tratamento do Mal de Alzheimer.

Palavras chave: Mal de Alzheimer, Quinase p38 alfa e Modelagem molecular.

ABSTRACT

FLÁVIO, F. R. **p38 alpha MAPK as target for drug design in Alzheimer's disease.** 74f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Alzheimer's disease (AD) was first characterized in 1907 by the German neuropathologist Alois Alzheimer, whose clinical symptoms includes cognitive, physiological and behavioral dysfunctions, memory loss, eventually incontinence, dementia, and death. It is a neurodegenerative disease of the central nervous system that usually affects individuals group in older age. This is characterized microscopically by the presence of amyloid plaques, which are accumulations of beta-amyloid protein inter-neurons, and neurofibrillary tangles formed predominantly by highly phosphorylated forms of the microtubule-associated protein, tau, which form tangled masses that consume neuronal cell body, possibly leading to neuronal dysfunction and ultimately death. p38 α MAPK has been implicated in both events associated with AD, tau phosphorylation and inflammation. p38 α MAPK pathway is activated by a dual phosphorylation at Thr180 and Tyr182 residues. The drug design of p38 α MAPK inhibitors is mainly focused on small molecules that compete for ATP in the catalytic site. Here, we used different techniques of molecular modeling based on p38 α MAPK structure deposited in the PDB and its inhibitors described in the literature. As a result of different virtual screening approaches used in this work, such as "docking", pharmacophore, molecular dynamics, molecular interaction fields, activity and toxicity predictions assays, pharmacokinetic properties and physicochemical, was selected a total of 14 compounds that meet these criteria of low or no toxicity potential, good pharmacotherapeutic profile, predicted activities calculated values comparable to those obtained for the reference compounds, while maintaining the main interactions observed for the most potent inhibitors. These compounds should be acquired for *in vitro* inhibition studies against the enzyme p38 α MAPK, thereby helping in the search of a potential drug candidate for the treatment of Alzheimer's disease.

Key words: Alzheimer's Disease, p38 alpha MAPK and drug design.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Patogênese do Mal de Alzheimer. Esquema demonstrando o acúmulo de β -amiloide, levando à formação das placas amiloides e a formação dos emaranhados neurofibrilares, decorrentes da hiperfosforilação da proteína Tau 2
- Figura 2.** PDB ID: 3GC7. Domínio amino-terminal mostrado em cinza à direita, enquanto o domínio carboxi-terminal é mostrado em ciano, à esquerda na figura, em representações de superfície e *ribbons*. O inibidor está em destaque com carbonos em cor salmão, enquanto os resíduos pertencentes ao motivo de ativação por dupla fosforilação, Thr180 e Tyr182, estão em destaque em amarelo. Com relação à estrutura secundária, MAPK p38 α é composta por 41,26% de hélices, 16,33% de folhas-beta e 42,41% de “coils”, de acordo com o calculado pelo algoritmo STRIDE. Figura desenvolvida com o programa PyMOL..... 6
- Figura 3.** Inibidores da p38 α com menor IC₅₀. 1OUK representa o código PDB do complexo original do inibidor 15
- Figura 4.** Grupo/série I de inibidores da MAPK p38 α , com anéis bicíclicos 6:6. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica 18
- Figura 5.** Grupo/série II de inibidores da MAPK p38 α , com anel central de cinco átomos. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica..... 19
- Figura 6.** Grupo/série III de inibidores da MAPK p38 α , com anéis bicíclicos 6:5. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica..... 20
- Figura 7.** Grupo/série IV de inibidores da MAPK p38 α , com grupamento ureia. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica..... 20
- Figura 8:** Grupo/série V de inibidores da MAPK p38 α , com apenas o grupo benzeno em comum. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica..... 21
- Figura 9:** Grupo/série I + IV de inibidores da MAPK p38 α , com anéis bicíclicos 6:6 e grupamento ureia. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica..... 21
- Figura 10:** Tipos de interação dos inibidores da MAPK p38 α : a) modo de ligação “teardrop” (Inibidor do Tipo I, ATP-competitivo); b) modo de ligação linear (Inibidor do Tipo I, ATP-competitivo); c) modo de ligação estendido (Inibidor do Tipo II, ATP-competitivo e alostérico); d) inibidor alostérico (inibidor do Tipo III); 1) região de ligação à adenina do ATP (sítio-ativo); 2) bolsão hidrofóbico (sítio-

ativo); 3) sítio alostérico. Foram utilizados como exemplos os inibidores dos complexos 3GC7, 2RG6, 3GCS e 3HV7 em relação aos quadros a, b, c e d respectivamente, usando o programa **PyMol** 25

Figura 11: Representação em “ribbons” do complexo da MAPK p38 α com o respectivo inibidor (código PDB 3GC7). Em representação em “stick” são visualizados o inibidor (carbono em cor amarelo) e resíduos selecionados no sítio ativo da enzima (carbono em cor cinza). A malha verde, em fase com a estrutura do complexo, é o resultado obtido com o programa **Q-Site Finder** e representa um potencial sítio ligante para essa região ativa da enzima. Tal cavidade poderia ser explorada na otimização deste e de outros inibidores..... 27

Figura 12: Inibidores do Tipo I (modo de ligação “teardrop”): compostos geralmente formados por anel heterocíclico central de cinco membros (códigos PDB 2EWA, 1BMK, 1BL6, 1BL7, 3C5U, 3HVC, 2GFS, 1OUK, e 1ZZL) ou seis membros (códigos PDB 3HUB e 3HRB) ou um anel bicíclico central, também heterocíclico (códigos PDB 3GC7, 1M7Q e 3HP5). A estes anéis centrais estão ligados dois ou três grupos separados pelo intervalo de uma ou duas ligações, geralmente constituída de anel benzeno substituído. O anel bicíclico central permite um maior espaçamento entre os substituintes..... 28

Figura 13: Inibidores do Tipo II (modo de ligação linear): apresentam anel bicíclico central (códigos PDB 3DT1, 2RG5, 2RG6 e 3GFE) ou dois anéis centrais espaçados por uma ligação (códigos PDB 3D7Z e 3DS6) ou por um grupo amida (código PDB 3BX5) 29

Figura 14: Inibidores do Tipo II (modo de ligação estendido): compostos caracterizados por apresentar grupos amida ou uréia entre dois grupamentos volumosos, sendo que o grupo volumoso à direita do grupo uréia ou amida, aqui mostrado, representa a porção da molécula que ocupa o sítio alostérico e induz à conformação inativa (DFG-out) da enzima MAPK p38 α 30

Figura 15: a) modo de ligação linear (código PDB 2RG6). Observa-se que em presença do inibidores do Tipo I, com modo de ligação linear, a MAPK p38 α mantém sua conformação ativa (DFG-in), com os resíduos F169 e G170 voltados à direita do resíduo D168, na região do sítio alostérico; b) modo de ligação estendido (código PDB 3GCS). Observa-se que os inibidores do Tipo II, com modo de ligação estendido, induzem à conformação inativa (DFG-out) da MAPK p38 α , com os resíduos F169 e G170 voltados à esquerda do resíduo D168, bloqueando a entrada do sítio ativo 30

Figura 16: Inibidor do Tipo III (modo de ligação alostérico)..... 31

Figura 17: Inibidores usados para a percepção do farmacóforo. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica..... 33

Figura 18: Farmacóforos derivados pelo programa **PharmaGist**, tendo como pivô o inibidor oriundo do complexo de código PDB 3DS6. A – Alinhamento de seis inibidores. B – Alinhamento de cinco inibidores. C – Alinhamento de quatro inibidores 34

Figura 19: Farmacóforos derivados pelo programa **PharmaGist**, tendo como pivô o inibidor oriundo do complexo de código PDB 2RG6. A – Alinhamento de seis inibidores. B – Alinhamento de cinco inibidores. C – Alinhamento de quatro inibidores 35

Figura 20: Farmacóforo derivado pelo programa **Discovery Studio 3.5**, usado em triagens de inibidores da MAPK p38 α , em base de dados de compostos comerciais. O farmacóforo derivado possui dois grupos aceptores de ligação hidrogênio (em verde), um grupo aromático (em laranja) e um grupo hidrofóbico (em ciano) 37

Figura 21: Distribuição dos valores de escore normalizado para os inibidores de referência 42

Figura 22: Moléculas selecionadas por triagem virtual baseada em farmacóforo (compostos 1 a 23) e por triagem virtual baseada em similaridade (compostos 24 a 33) com “Normalized Fit Score” maior ou igual a sete ($NE \geq 0,70$) usando o programa **PharmMapper**. Estão destacados na legenda dos compostos a base de origem das moléculas selecionadas, o NE calculado pelo **PharmMapper**, e para os compostos obtidos por similaridade estão representados também o código PDB do complexo cujo inibidor adveio e que foi usado como referência 43

Figura 23: Campos de interação molecular calculados para a enzima do complexo de código PDB 2RG5, em fase com o composto 1, selecionado por triagem virtual baseada em farmacóforo. A) Grupo de prova hidrofóbico (“Dry”), com contorno de energia a -1,2 Kcal/mol; B) Grupo de prova de amida (N1), com contorno de energia a -8,0 Kcal/mol; C) Grupo de prova carbonila (O), com contorno de energia a -5,5 Kcal/mol. Os contornos pontilhados, destacados na figura, representam as potenciais regiões de interação com o composto 1. Figura realizada no programa **Insight II**. 47

Figura 24: Simulações de Dinâmica Molecular dos compostos selecionados por triagem virtual baseada em farmacóforo. A) Variação do RMSD (em angstroms) do composto no sítio ativo em função do tempo de simulação (em picossegundos). B) Variação da energia total do complexo em função do tempo de simulação. C) Variação do RMSD da distância de ligação do resíduo Met109 em função do tempo de simulação. 51

Figura 25: Validação dos programas de “docking” utilizados (**GOLD 4.1.2** e **GLIDE 5.5**), através da reprodução do modo de ligação. As figuras A e B representam, respectivamente, a sobreposição do inibidor do complexo de código PDB 3GC7 em sua conformação bioativa (moléculas com carbono em amarelo) com as conformações geradas pelos programas **GOLD 4.1.2** e **GLIDE 5.5** (moléculas

com carbono em cinza). A) RMSD = 0,69 Å; B) RMSD = 0,53 Å..... 53

Figura 26: Campos de interação molecular calculados para a enzima do complexo de código PDB 3GC7, em fase com o inibidor do complexo de código PDB 1M7Q. Grupo de prova hidrofóbico (“Dry”), com contorno de energia a -1.5 Kcal/mol, em cor de laranja; Grupo de prova de carbonila (O), com contorno de energia a -6.0 Kcal/mol, em cor de vermelho. A) Os MIFs destacados pelos contornos pontilhados destacam as regiões exploradas por todos os inibidores de referência selecionados. B) Os campos de força destacados pelos contornos pontilhados destacam outras regiões hidrofóbicas exploradas por alguns inibidores, porém não usadas como crivo entre os compostos obtidos. Figura realizada no programa **Insight II**..... 56

Figura 27: Campos de interação molecular calculados para a enzima do complexo de código PDB 3GC7, em fase com dois compostos selecionados: em A) 22_kinacore; em B), 4_kinaset. Grupo de prova hidrofóbico (“Dry”), com contorno de energia a -1.5 Kcal/mol, em cor de laranja; Grupo de prova de carbonila (O), com contorno de energia a -6.0 Kcal/mol, em cor de vermelho. Figura realizada no programa **Insight II**. 57

Figura 28: Compostos selecionados por triagem virtual baseada em estrutura 59

Figura 29: A) Variação do RMSD (em angstroms) em função do tempo de simulação (em picossegundos). B) Variação da energia total do complexo em função do tempo de simulação. C) Variação do RMSD da distância de ligação do resíduo Met109 em função do tempo de simulação. 62

Figura 30: Compostos selecionados a partir de triagens baseadas em estrutura e ligante 66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: 35 complexos cristalográficos de MAPK p38 α de <i>Homo sapiens</i> com diferentes inibidores	16
Tabela 2: Percentual de identidade entre as sequências primárias das isoformas de MAPK p38	27
Tabela 3: Resultados obtidos por triagem virtual baseada no farmacóforo	38
Tabela 4: Candidatos a Inibidores de MAPK p38 α , com maior similaridade em relação aos inibidores de referência selecionados	41
Tabela 5: Resultado de PharmMapper para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligantes	44
Tabela 6: Quantidade de compostos selecionados após análise visual no sítio ativo da MAPK p38 α	55
Tabela 7: Resultado PharmMapper para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em estrutura	58
Tabela 8: Resultado PharmMapper para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante e estrutura	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AChE	Acetylcholinesterase
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
Ala ou A	Alanina
APP	Amyloid Precursor Protein
Arg ou R	Arginina
Asn ou N	Asparagina
Asp ou D	Aspartato
ATP	Adenosine Triphosphate
A β	Amilóide beta
BChE	Butyrylcholinesterase
CDK	Cyclin-Dependent Kinases
CK1	Casein Kinase 1
CNS	Central Nervous System
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CVFF	Consistent-Valence Force Field
Cys ou C	Cisteína
fs	Femtosegundo
Gln ou Q	Glutamina
Glu ou E	Glutamato
Gly ou G	Glicina
GPUs	Graphics Processing Unit
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
His ou H	Histidina
HTVS	High-Throughput Virtual Screening
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IL-1	Interleucina-1
Ile ou L	Isoleucina
Leu ou L	Leucina
Lys ou K	Lisina
MA	Mal de Alzheimer
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases

MD	Molecular Dynamic
Met ou M	Metionina
MIF	Molecular Interaction Field
NE	Escore normalizado (PharmMapper)
NFTs	Neurofibrillary Tangles
nM	Nanomolar
PDB	Protein Data Bank
Phe ou F	Fenilalanina
Pro ou P	Prolina
QP log K	Coeficiente de Partição do logaritmo da ligação às proteínas séricas
QP log P	Coeficiente de Partição do logaritmo de (octanol/água)
QP log S	Coeficiente de Partição do logaritmo da solubilidade em água
QSAR	Quantitative Structure–Activity Relationship
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	Root-Mean-Square Deviation
SASA	solvent accessible surface area
Ser ou S	Serina
SP	Standard-Precision
Thr ou T	Treonina
TNF	Tumor necrosis factor
Trp ou W	Triptofano
Tyr ou Y	Tirosina
Val ou V	Valina
XP	extra-precision

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	vii
Lista de abreviaturas e símbolos	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mal de Alzheimer	1
1.2. Quinase p38 α	4
2. OBJETIVOS	9
3. METODOLOGIA	10
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
4.1. Caracterização química e relação estrutura/atividade dos inibidores da MAPK p38 α	17
4.2. Caracterização dos modo de ligação dos inibidores da MAPK p38 α selecionados e relação modo de ligação/atividade	25
4.3. Triagem virtual baseada em ligantes	32
4.3.1. Planejamento do farmacóforo e triagem virtual baseada em farmacóforo	32
4.3.2. Triagem virtual baseada em similaridade (Índice de Tanimoto)	40
4.3.3. Predição de atividade (PharmMapper)	41
4.3.4. Predição de propriedades físico-químicas e toxicidade	45
4.3.5. Campos de Interação Molecular (MIF)	46
4.3.6. Simulações de Dinâmica Molecular	48
4.4. Triagem virtual baseada em estrutura	52
4.4.1. “Docking” molecular	52
4.4.2. Campos de Interação Molecular (MIF)	55
4.4.3. Predição de atividade (PharmMapper)	57
4.4.4. Predição de propriedades físico-químicas e toxicidade	58
4.4.5. Simulações de Dinâmica Molecular	60
4.5. Triagem virtual baseada em estrutura (GLIDE) e ligantes (por similaridades eletrostática e de forma - EON e ROCS)	63
5. CONCLUSÕES	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Mal de Alzheimer

O Mal de Alzheimer (MA) é uma doença que foi caracterizada pela primeira vez em 1907 pelo neuropatologista alemão Alois Alzheimer [1-2], tendo como sintomas clínicos disfunções cognitivas, fisiológicas, comportamentais, perda de memória [3], e eventualmente incontinência, demência, acamação e morte [4-6]. É uma doença neurodegenerativa do sistema nervoso central que costuma afetar, principalmente, indivíduos em faixa etária mais avançada. A doença é um grande motivo de preocupação em saúde pública, haja vista que o número de casos vem crescendo nos últimos anos e tende a crescer mais com o aumento da expectativa de vida das pessoas.

O acometimento do MA apresenta grande disparidade, variando de 3,2 por 1.000 pessoas/ano na Índia a 25,2 em Indianópolis, nos EUA. No Brasil, três estudos investigaram a prevalência e incidência desta doença, utilizando amostras de idosos de base comunitária e critérios de diagnósticos atuais. A prevalência de demência na população com mais dos 65 anos foi de 7,1%, sendo que o MA foi responsável por 55% dos casos. A taxa de incidência foi 7,7 por 1.000 pessoas/ano no estudo de São Paulo e 14,8 por 1.000 pessoas/ano no estudo feito no Rio Grande do Sul. Considerando a prevalência de demência no Brasil e a população de idosos de aproximadamente 15 milhões de pessoas, a estimativa para demência é de 1,1 milhão. A porcentagem de indivíduos com o MA duplica aproximadamente a cada 5 anos de idade a partir dos 60 anos, representando 1% aos 60 anos e em torno de 30% aos 85 anos [7].

A idade e o histórico familiar da doença são fatores de risco bem estabelecidos, sendo que o risco aumenta com o número crescente de familiares de primeiro grau afetados. A etiologia do MA permanece indefinida, embora grande parte dos seus mecanismos bioquímicos e genéticos tenha sido elucidada. É sabido que o fragmento de 42 aminoácidos da proteína precursora B-amiloide tem alta relevância na patogênese das placas senis. Algumas proteínas que compõem os emaranhados neurofibrilares, mais especialmente a proteína tau hiperfosforilada e a ubiquitina, foram identificadas. Sabe-se que o alelo e do gene da apolipoproteína E (ApoE) é cerca de 3 vezes mais frequente nas pessoas com DA do que nos sujeitos-controle pareados por idade e que pessoas homozigotas para o gene apresentam maior risco para a doença do que as não homozigotas. Entretanto, a especificidade e a sensibilidade do teste da ApoE são muito baixas para permitir seu uso como teste de rastreamento na

população geral, inexistindo ainda um exame laboratorial que permita confirmar a presença da doença em vida, sendo que o diagnóstico definitivo do MA só pode ser obtido por necropsia, quando se analisa a quantidade de emaranhados neurofibrilares e de placas amiloides presentes no indivíduo [7].

O Mal de Alzheimer é caracterizado, microscopicamente, pela presença de placas amiloides e emaranhados neurofibrilares (**Figura 1**), associados à perda gradual da capacidade cognitiva e deterioração progressiva da memória e do aprendizado, resultantes de um déficit colinérgico [8].

Figura 1: Patogênese do Mal de Alzheimer. Esquema demonstrando o acúmulo de β -amiloide, levando à formação das placas amiloides e a formação dos emaranhados neurofibrilares, decorrentes da hiperfosforilação da proteína Tau [9].

Placas neuríticas, também conhecidas como placas senis ou placas amiloide, são depósitos extracelulares formados por peptídeo β -amiloide (peptídeos agregados). Intervir com a geração e agregação do peptídeo A β ou eliminar placas já formadas constituem uma vertente na pesquisa farmacêutica ao combate à progressão da doença de Alzheimer, através de anticorpos anti-peptídeo A β , vacinas, ou inibidores de secretases, como a β - e γ -secretase, que geram o peptídeo A β através da clivagem da proteína precursora amiloide (APP). Portanto, mutações em qualquer proteína precursora amiloide (APP) ou presenilinas, proteínas que são necessárias para a atividade da γ -secretase, que gera o peptídeo amiloide da

APP, estão fortemente associadas com o MA, e continuam a apoiar estas estratégias terapêuticas [10].

A fosforilação de proteínas em resíduos de serina, treonina e tirosina pelas quase 520 quinases do genoma humano, constituem um dos principais mecanismos pelos quais as células se utilizam para regular seu metabolismo e demais funções [11]. Devido ao grande número de filamentos hiperfosforilados da proteína Tau encontrados em cérebros de pacientes com Alzheimer e sua ocorrência em outras doenças degenerativas, foi sugerido que anormalidades nestas proteínas são fatores importantes na progressão da doença de Alzheimer [12]. Assim, vários esforços foram direcionados para a identificação de quinases e fosfatases que reajam com a Tau. Uma das abordagens consistiu na identificação de enzimas que modificam a Tau *in vitro*, correlacionando diversas famílias de proteínas (GSK3, CDK, CK1 e MAPK) à progressão do MA [12-15].

O aumento da capacidade de neurotransmissão colinérgica constitui o mecanismo dos fármacos utilizados para o tratamento do Mal de Alzheimer. A inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE), a qual atua nas sinapses colinérgicas do sistema nervoso central e periférico, sendo responsável pela interrupção da transmissão do impulso nervoso colinérgico através da hidrólise da acetilcolina [16], representa, atualmente, um dos poucos métodos de escolha para o tratamento do Mal de Alzheimer [17]. Esta forma de terapia, entretanto, é paliativa e apenas aliviam os sintomas da doença quando o quadro esta em sua fase inicial, não impedindo a morte dos neurônios colinérgicos e a progressão da doença.

Dentre os agentes anticolinesterásicos utilizados atualmente para o tratamento do Mal de Alzheimer estão Tacrina (Cognex®) e Donepezil (Aricept®). Tacrina foi o primeiro inibidor de AChE licenciado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) para o tratamento do mal de Alzheimer. Trata-se de um inibidor reversível, não competitivo e não seletivo para AChE, possuindo graus de inibição semelhantes para as enzimas AChE e butirilcolinesterase (BChE). O seu uso desencadeia efeitos colaterais hepatotóxicos e, dada sua baixa meia-vida plasmática (3-5 h), há a necessidade do uso de quatro doses diárias (120-160 mg/dia) de Tacrina [18].

Donepezil é o fármaco mais utilizado para o Mal de Alzheimer, representando aproximadamente 38% das prescrições. É um inibidor reversível, não competitivo e, ao contrário da Tacrina, seletivo para AChE. Os efeitos colaterais proporcionados pelo seu uso são de natureza gastrointestinal, estando diretamente relacionados à dosagem administrada.

Considerando-se a alta meia-vida plasmática do Donepezil (70 h), uma dose diária deste fármaco (5-10 mg/dia) é suficiente para o tratamento [18].

1.2. Quinase p38 α

A família das Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) está associada a numerosos eventos celulares, incluindo diferenciação, mitogênese, oncogênese e apoptose [19]. MAPK p38 α foi originalmente descoberta como alvo molecular para a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e IL-1. Desde então, os inibidores seletivos de MAPK p38 α têm sido utilizados para demonstrar a importância da atividade da MAPK p38 α na geração de outras proteínas pró-inflamatórias, incluindo IL-6 e COX-2 [10]. Além de estar associadas a doenças inflamatórias, desordens na atividade da MAPK p38 α vêm sendo associada a uma série de doenças, desde doenças vasculares e câncer, até doenças neuronais, como o Mal de Alzheimer [20]. Novos inibidores de MAPK p38 α estão em fase II nos ensaios clínicos para dores neuropáticas e depressão [21].

A MAPK p38 tem sido implicada em dois eventos associados ao Mal de Alzheimer: fosforilação da proteína Tau, que leva à formação de Emaranhados Neurofibrilares Intracelulares, e inflamação. Devido ao grande número de filamentos da proteína Tau encontrados em cérebros de pacientes com Alzheimer, foi sugerido que anormalidades nesta proteína são fatores importantes na progressão do Mal de Alzheimer [12].

A Tau é uma proteína associada aos microtúbulos, encontrada dentro dos neurônios, normalmente restrita aos axônios, onde é responsável por sua sustentação, enquanto proteínas Tau anormalmente fosforiladas ou hiperfosforiladas formam massas emaranhadas ("Neurofibrillary Tangles", NFTs) que consomem o corpo celular neuronal, levando à disfunção e morte neuronal. Um número maior de NFTs mostrou estar correlacionado à diminuição da função cognitiva no Mal de Alzheimer, sugerindo que a prevenção da fosforilação da Tau pela inibição da MAPK p38 α possa ser uma importante estratégia terapêutica [10].

A família da MAPK p38 é composta por 4 isoformas: p38 α (Mitogen-activated protein kinase 14), p38 β (Mitogen-activated protein kinase 11), p38 γ (Mitogen-activated protein kinase 12) e p38 δ (Mitogen-activated protein kinase 13). As isoformas α e β são

principalmente expressas no coração e no cérebro, enquanto a p38 γ é encontrada no músculo esquelético e a p38 δ está predominantemente localizada nos testículos, pâncreas, rins e intestino delgado [21-22].

O planejamento de fármacos inibidores da MAPK p38 α está focado principalmente em pequenas moléculas que competem pelo sítio catalítico do ATP [23]. Esse sítio possui cinco regiões bem caracterizadas: o resíduo “linker” (Met109), o resíduo do bolsão “gatekeeper” (Thr106), o próprio bolsão (Ala51 e Val52), uma região hidrofóbica (Ala157 e Leu167) e outra polar, mais acessível ao solvente (Asp112, Ser 154 e Asp168). Existem também os inibidores alostéricos, que preenchem uma pequena porção do bolso de adenosina, mas ainda assim são competitivos pois sua ligação induz a uma mudança conformacional da enzima MAPK p38 α , impedindo sua ligação com o ATP [24]. Esta região de ativação é conhecida por um motivo-DFG (Asp168, Phe169 e Gly170) [24], conservada entre as quinases e caracterizada por alternar entre a conformação inativa (DFG-out) e sua conformação ativa (DFG-in), sendo ativada por dupla fosforilação dos resíduos Thr180 e Tyr182. Esta dupla fosforilação leva também à abertura do *loop* de ativação (resíduos 177-189), facilitando o acesso do ATP ao sítio ativo [21, 25].

Há três tipos de inibidores da MAPK p38 α : Inibidores tipo I, que ocupam a mesma região de ligação do ATP, ou seja, são inibidores competitivos; inibidores tipo II, que além de ocupar a região de ligação do ATP, se estendem até um sítio alostérico contíguo, sendo capaz de induzir a conformação inativa do motivo DFG (DFG-out); e inibidores tipo III, que ocupam principalmente o sítio alostérico contíguo, mas que também podem ocupar uma porção do bolsão hidrofóbico, pertencente ao sítio ativo. Os inibidores tipo III são efetivos apenas quando o motivo DFG está em sua conformação inativa (DFG-out), a qual torna o sítio alostérico acessível. Os inibidores do tipo III estabilizam a conformação inativa da MAPK p38 α , impedindo a ligação do ATP ao sítio ativo. A maioria dos inibidores da MAPK p38 α são ATP-competitivos e podem assumir diferentes conformações bioativas ou modos de ligação no interior do sítio ativo [24-25].

Existe atualmente uma série de complexos da MAPK p38 α com inibidores disponíveis no Banco de Dados de Proteínas (PDB) [26]. Um exemplo pode ser visto na figura abaixo, complexo de código PDB 3GC7, o qual foi selecionado por apresentar uma boa resolução cristalográfica (1,8 Å), e o inibidor apresentar alta atividade com respeito à MAPK p38 α (IC₅₀ = 0,6 nM). O modo de ligação desse inibidor pode ser visualizado na Figura 2. Embora

existam muitos inibidores da MAPK p38 α , poucos alcançam os ensaios clínicos de fase III devido aos sérios efeitos colaterais e também a problemas em relação às suas propriedades farmacocinéticas [27].

Figura 2: PDB ID: 3GC7. Domínio amino-terminal mostrado em cinza à direita, enquanto o domínio carboxi-terminal é mostrado em ciano, à esquerda na figura, em representações de superfície e *ribbons*. O inibidor está em destaque com carbonos em cor salmão, enquanto os resíduos pertencentes ao motivo de ativação por dupla fosforilação, Thr180 e Tyr182, estão em destaque em amarelo. Com relação à estrutura secundária, MAPK p38 α é composta por 41,26% de hélices, 16,33% de folhas-beta e 42,41% de “coils”, de acordo com o calculado pelo algoritmo **STRIDE** [28]. Figura desenvolvida com o programa **PyMOL** [29].

A análise destes complexos nos permite obter um conhecimento mais detalhado a respeito do sítio ativo da enzima, bem como das principais interações realizadas com os inibidores, permitindo o planejamento de novos inibidores mais seletivos. Além disso, através do estudo da estrutura química dos inibidores conhecidos, um padrão farmacofórico pode ser derivado e aplicado na busca de potenciais inibidores que mantenham características farmacofóricas semelhantes [30].

A abordagem computacional tem sido cada vez mais aplicada na busca por novas moléculas bioativas, onde a utilização iterativa de diferentes ferramentas computacionais, através de uma varredura em bancos de dados de grande diversidade química e que contêm uma imensa variedade de compostos naturais, sintéticos e até mesmo hipotéticos, permite a

identificação de compostos protótipos, posteriormente testados em bioensaios. O objetivo é maximizar as chances e reduzir o custo e as etapas de busca de compostos ativos que possam apresentar bom nível de afinidade receptor-ligante [27].

Nessa estratégia, a utilização iterativa de ferramentas computacionais, na seleção e aprimoramento de moléculas, e de ferramentas experimentais, na obtenção de detalhes moleculares a respeito do alvo e da interação deste com novos ligantes podem orientar e tornar mais ágil e eficiente a busca e a otimização de novas moléculas bioativas a partir de coleções de compostos reais ou virtuais. Candidatos a ligantes que advêm destas buscas podem ser avaliados em estudos *in vitro* quanto ao seu caráter inibitório, possibilitando estudos quantitativos de relação estrutura-atividade (QSAR), bem como predição de suas propriedades farmacocinéticas e de toxicidade [31].

Uma dessas ferramentas computacionais é o “Docking” molecular, que permite explorar o vasto espaço conformacional de ligantes, assumido no interior do sítio ativo de um alvo específico, em um curto espaço de tempo, e permitindo a análise de bibliotecas de compostos a um custo computacional razoável [32]. “Docking” molecular é o termo usado para descrever as interações entre o ligante e o receptor através de uma abordagem computacional [33]. Há três aplicações para os programas de “docking”: predição do modo de ligação, otimização de compostos e triagem de bases de dados de compostos. O primeiro modelo de reconhecimento molecular foi o da “chave e fechadura”, proposto por Emil Fischer em 1894, onde a forma do sítio ativo do receptor é exatamente complementar à forma do ligante [34]. Posteriormente, Koshland propôs o modelo do ajuste induzido, no qual ambos, receptor e ligante, adaptam sua estrutura para ligarem-se um ao outro. Esta abordagem possibilitou a implementação de algoritmos de “docking” que permitem a flexibilidade dos ligantes e de alguns resíduos de aminoácido na região do sítio ativo do receptor, nos programas mais recentes de “docking”, como o **GLIDE 5.5** [34].

O cálculo de “docking”, em qualquer programa, é basicamente dividido em duas etapas, o algoritmo de busca e a função de escore. O algoritmo de busca explora as diferentes poses possíveis do ligante no sítio ativo do receptor, ou seja, gera um repertório de orientações e conformações (poses) do ligante dentro do sítio ativo. Já a função de escore é responsável por analisar a interação de cada uma destas poses geradas frente ao sítio ativo, através de análises de complementaridades estérica e química, e ranqueá-las de acordo com a sua afinidade [34].

Os algoritmos de busca podem ser divididos em três tipos: sistemáticos, estocásticos e determinísticos. Os algoritmos de busca sistemáticos são baseados em uma grade de valores para cada grau de liberdade do ligante, ou seja, quanto mais ligações rotacionáveis o inibidor possuir, mais demorado será o cálculo. Como exemplo de algoritmo sistemático tem-se o algoritmo incremental. Os algoritmos de busca estocásticos fazem mudanças na conformação do ligante de forma randômica, geralmente mudando um grau de liberdade de cada vez. O algoritmo genético é um exemplo de algoritmo estocástico. Os algoritmos determinísticos calculam a energia do estado inicial do ligante e permitem apenas mudanças conformacionais em que o estado final possui energia menor ou igual a do estado inicial. Um exemplo de algoritmo determinístico é a simulação de Dinâmica Molecular [34].

As funções de escore podem ser classificadas, basicamente, em: empíricas, baseadas em campos de força ou “knowledge-based”. As funções empíricas são baseadas em um conjunto de dados de afinidade obtidos de complexos ligante-receptor. Nas funções baseadas em mecânica molecular (campos de força), a afinidade de ligação é estimada de acordo com o somatório das energias de interações de van der Waals, eletrostática e de ligação de hidrogênio entre os átomos do ligante e do sítio receptor. As funções de escore do tipo “knowledge-based” são derivadas de análises de preferências estatísticas das distâncias de interação entre os diferentes átomos, baseadas no conhecimento de complexos ligante-proteína com estrutura resolvida [35].

Outra metodologia, baseada na similaridade entre os ligantes, é aquela que explora o conceito de similaridade aos grupos da molécula essenciais à atividade (farmacóforo). É o método mais amplamente empregado exigindo representações 3D. O conceito de farmacóforo foi primeiramente introduzido por Paul Ehrlich, em 1909, como "uma estrutura molecular (phóros) que carrega as características essenciais, responsáveis pela ação biológica de um fármaco (pharmacon's)". O farmacóforo inclui todas as principais características envolvidas na interação do ligante com o sítio receptor. Através desse conhecimento alguns grupos químicos podem ser incorporados a determinados ligantes a fim de elevar a especificidade, visando otimizar sua atividade biológica. Na prática, o farmacóforo engloba características químicas específicas, tais como potencialidade para realização de ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas e hidrofóbicas, entre outras. Dessa forma, um modelo farmacofórico sugerido para uma classe de ligantes pode ser utilizado como molde na busca e seleção de novos protótipos que satisfaçam os principais requisitos moleculares responsáveis pela atividade biológica em determinado alvo molecular [36].

Objetivos

2. OBJETIVOS

Planejamento de inibidores da MAPK p38 α com o uso de diferentes técnicas de modelagem molecular, baseadas em ligantes e em estrutura, com vistas à realização de ensaios de atividade biológica.

Metodologia

3. METODOLOGIA

Fluxograma 1: Resumo das metodologias realizadas no presente trabalho.

Os programas **Swiss-PdbViewer** (**spdbv**) [37], **Q-SiteFinder** [38] e **PyMol** [29] foram utilizados com vistas à identificação dos modos de ligações e dos principais resíduos de aminoácidos explorados pelos inibidores da MAPK p38 α selecionados. O **spdbv** é um programa gratuito que fornece, entre outros recursos, uma interface que permite analisar várias proteínas ao mesmo tempo, através de sobreposições dos complexos cristalográficos [37]. O programa **Q-SiteFinder** através de interações de van der Waals entre um grupo de prova metila e a enzima também é capaz de identificar fissuras que podem ser exploradas por um candidato a inibidor [37]. O programa **PyMol** também possui vários recursos, possibilitando a sobreposição dos complexos e a geração de figuras [29].

O programa **Discovery Studio 3.5** [39] foi usado para gerar um padrão farmacofórico baseado em inibidores da MAPK p38 α do tipo I e II, com conformação estendida. Foram, então, realizadas triagens virtuais com mais de 500.000 moléculas das bases **ChemBridge** (subcoleções Diverset, CNS, Kinacore e KINASet) [40] e **ZINC** (subcoleção CNS) [41-42], utilizando-se o algoritmo de busca “best” para geração dos confôrmeros. O resultado foi

ordenado por ordem decrescente de escore (“Fit Value”), considerando apenas os compostos que se ajustaram aos quatro grupos farmacofóricos do modelo gerado (“PharmType” = 4). Foram analisadas, no sítio ativo da enzima MAPK p38 α , para cada base de dados, as 100 moléculas com os maiores “Fit Values”, excluindo-se as que apresentavam choque com a estrutura da proteína. A necessidade de interações com os resíduos Glu71, Asp168 e Met109, característica dos inibidores tipos I com modo de ligação linear e do tipo II com modo de ligação estendido, foi utilizada como crivo.

O programa **Omega 2.0** [43] da OpenEye Scientific Software (<http://eyesopen.com>), com os parâmetros otimizados [44] com vistas à reprodução de conformações bioativas, foi utilizado para gerar uma biblioteca contendo até 100 confôrmeros por molécula, a partir dos melhores resultados da triagem virtual baseada em farmacóforo. Estes confôrmeros gerados foram novamente submetidos, como uma nova base de dados de moléculas, à triagem virtual por farmacóforo, mantendo-se as moléculas em suas conformações rígidas.

Foi também realizada triagem virtual baseada em farmacóforo através do servidor **ZINCPharmer** [45], que possui um banco contendo 176 milhões de conformêros respectivos a 18,3 milhões de compostos. Para isso, um padrão farmacofórico foi previamente derivado no servidor **PharmaGist** [46], tendo como arquivo de entrada os inibidores dos complexos 2RG5, 2RG6, 3DS6 e 3DT1, mantendo o inibidor do complexo 3DS6 como pivô, por possuir a estrutura mais rígida, além de ser o composto mais ativo, dentre os selecionados. O modelo farmacofórico de maior escore apresentou um padrão similar ao modelo gerado no **Discovery Studio 3.5**, porém com três grupos hidrofóbicos e um doador de hidrogênio a mais. Os três grupos hidrofóbicos excedentes em relação ao modelo anterior foram desconsiderados quando da atribuição das coordenadas xyz no servidor **ZINCPharmer**. O programa **ZINCPharmer** já se utiliza do programa **Omega 2.0** da OpenEye Scientific Software (<http://eyesopen.com>) [47] para gerar os confôrmeros 3D dos compostos sob análise.

A triagem virtual baseada em similaridade aos ligantes de referência foi realizada no **BindingDB**, um servidor “online” gratuito (<http://www.bindingdb.org>). Foi baseada em “impressões digitais” químicas, através do índice de similaridade de Tanimoto, buscando a similaridade máxima 2D entre as moléculas usadas como referência e as moléculas das bases utilizadas [48].

A triagem virtual baseada em estrutura foi realizada através de cálculos de “docking” com compostos das bases **ChemBridge** (subcoleções Diverset, CNS, Kinacore e KINASet)

[40] e **ZINC** (subcoleção CNS) [41-42], com mais de 500.000 compostos, no interior do sítio ativo da MAPK p38 α , de código PDB 3GC7. Foram utilizados dois programas de “docking”: **GOLD 4.1.2** [49] e **GLIDE 5.5** [50]. Os compostos obtidos por ambos os programas foram analisados no interior do sítio ativo da enzima MAPK p38 α , selecionado-se apenas os compostos da classe dos inibidores do tipo I, que apresentavam modo de ligação “teardrop”.

O método mais popular usado para mapear as potenciais regiões de interação de um ligante em um sítio ativo é baseado nos campos de interação molecular, do inglês “molecular interaction fields” (MIF). O programa mais amplamente utilizado para se calcular os MIFs é o **GRID**. Este programa, através de grupos de provas químicas, como grupos hidrofóbicos, por exemplo, constrói um mapa contendo as regiões mais favoráveis para ocorrer este tipo de ligação com determinado composto em análise. Primeiramente, deve-se configurar uma caixa ortogonal, com coordenadas x, y e z, contendo a região do sítio ativo, onde os cálculos serão realizados. Esta caixa é subdividida em pequenos cubos imaginários, onde cada vértice contém a energia resultante da somatória das forças de atração e repulsão ao seu redor. Valores negativos de energia representam interações favoráveis entre o composto e o alvo molecular, desde que o composto em análise apresente a mesma característica do grupo de prova química calculado, no entorno daquela mesma região do campo de força gerado pelo grupo de prova em questão [51-52].

Os campos de interação molecular (MIFs) na região do sítio ativo da MAPK p38 α foram calculados para os complexos de códigos PDB 2RG6 e 3GC7, ou seja, para os resultados obtidos das triagens virtuais baseadas em farmacóforo e “docking”, respectivamente, utilizando-se o programa **GRID 22c** [53]. Os campos de interação molecular foram calculados para fins de mapeamento estéreo-eletrônico da região do sítio ativo da MAPK p38 α com potencial de ligação a determinados grupos moleculares dos compostos selecionados. Assim, foram usados diferentes grupos de provas, os quais se referem aos principais grupamentos químicos encontrados nos inibidores da MAPK p38 α : hidrofóbico (Dry), carbonila (O), carboxila (O::), amida (N1), nitrogênio sp³ (N:), flúor orgânico (F), cloro orgânico (Cl), éter (OC2), oxigênio de éter aromático (OC=), oxigênio de sulfona (O=S), tioéter (STH) e hidroxila (OH).

Foram também realizadas simulações de dinâmica molecular, utilizando-se o módulo **Discover_3** do programa **Insight II** [54], para os compostos selecionados após análise dos MIFs. As simulações foram iniciadas com os compostos em suas poses finais obtidas como

resultado da triagem por farmacóforo ou dos cálculos de “docking” com a enzima MAPK p38 α (de códigos PDB 2RG6 e 3GC7, respectivamente). Foi gerada uma camada de solvatação, com raio de 7 Å em relação ao composto sob análise. A constante dielétrica utilizada para os átomos não ligados, no interior da enzima, foi de 4 ϵ . A minimização do sistema foi realizada usando até 1000 passos de um protocolo combinado de algoritmos (Steepest_D, Conjugate_G e Newton). A simulação de dinâmica molecular foi realizada à temperatura de 298 K, por um tempo de 5×10^6 femtossegundos (ou 5000 picossegundos). As coordenadas foram salvas a cada 5000 fs. O campo de força utilizado foi o CVFF. Para cada trajetória foram analisados o RMSD das poses dos ligantes em função do tempo de simulação, a energia total do sistema em função do tempo de simulação, e o RMSD da potencial interação por ligação de hidrogênio entre o resíduo Met109 (resíduo “linker”) e o ligante, em função do tempo de simulação. Cada gráfico resultante é constituído por um total de 1000 imagens. A velocidade de processamento foi de 14fs/s.

Foram também realizadas triagens virtuais baseada em similaridade de forma, utilizando o programa **ROCS** [55], além de triagem virtual baseada em similaridade eletrostática, utilizando-se o programa **EON** [56], ambos os pacotes da OpenEye Scientific Software (<http://eyesopen.com>).

Os compostos obtidos pelos métodos de triagem virtual baseada em ligantes (farmacóforo e similaridade), assim como os compostos obtidos por triagem virtual baseada em estrutura (“docking”) foram analisados em programas de predições de atividade, toxicidade e de propriedades farmacocinéticas e físico-químicas, utilizando-se os programas **PharmMapper** [57], **DEREK 10.0** [58] e **QikProp** [59], respectivamente.

PharmMapper [57] é um programa gratuito, disponível no servidor “online” (<http://59.78.96.61/pharmmapper>), e trata-se de um método *in silico* de predição de atividade para pequenas moléculas, baseando-se em um modelo de complementaridade estrutural 3D (conceito farmacofórico) a uma base de farmacóforos (**PharmTargetDB**). **PharmMapper** pode ser usado também para predição de potenciais efeitos colaterais.

O programa **Derek 10.0** (“**Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge**”), baseia-se na busca por similaridade 2D da molécula em questão ou seus fragmentos com fragmentos de um banco de dados com toxicidade já reconhecida (toxicóforo), e correlaciona as estruturas com várias características toxicológicas, tais como

mutagenicidade, carcinogenicidade, sensibilização da pele, irritação, efeitos reprodutivos, neurotoxicidade, entre outras [60-62].

QikProp é um programa de predição de propriedades físico-químicas como absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). **QikProp** fornece os resultados das moléculas analisadas, comparando-os com a média dos valores obtidos para 95% dos fármacos conhecidos, os quais são utilizados como referência [59].

Resultados e Discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das buscas realizadas no banco de dados do **BindingDB** (<http://www.bindingdb.org>), foram encontrados 3227 inibidores da MAPK p38 α . Esses inibidores foram ordenados pelos valores de IC₅₀ (em nM), o qual representa a concentração do composto necessária para 50% de inibição da enzima. A seguir, os inibidores mais potentes foram então selecionados. Desse total, 90 possuíam complexos depositados no banco de dados do PDB (<http://www.pdb.org>), e dentre estes, 56 eram de *Homo sapiens*. O inibidor que possui maior atividade biológica (IC₅₀ = 0,078 nM) não possui estrutura cristalográfica em complexo com a MAPK p38 α depositada no PDB. Já o mais potente que possui estrutura cristalográfica depositada no PDB em complexo com a MAPK p38 α (código PDB 1OUK) possui IC₅₀ de 0,1 nM, ligeiramente superior ao composto mais ativo (**Figura 3**).

Figura 3: Inibidores da p38 α com menor IC₅₀. 1OUK representa o código PDB do complexo original do inibidor.

Há no PDB, para a MAPK p38 α , mais de uma estrutura cristalográfica para o mesmo complexo enzima-inibidor, uma vez feita a sobreposição dos dois complexos e constatada a similaridade estrutural entre ele, selecionou-se o complexo com melhor resolução cristalográfica, com o ligante de menor fator de temperatura. Foram também selecionados apenas os complexos de MAPK p38 α oriundos de *Homo sapiens* com IC₅₀ menor que 1 μ M (1000 nM), ou seja, compostos de média a alta atividade, assim considerados. Atendendo a todos estes critérios, obteve-se 35 complexos dos 90 disponíveis, com os quais foi construída uma tabela contendo os códigos de entrada no PDB para os 35 complexos cristalográficos selecionados, valores de IC₅₀, resolução cristalográfica e a raiz do desvio médio quadrático (RMSD) por traço de carbono alfa, das sobreposições realizadas em relação ao complexo 3GC7 (**Tabela 1**).

A sobreposição dos complexos selecionados, listados na **Tabela 1**, foi realizada utilizando-se o aplicativo **Swiss-PdbViewer (spdbv)**. O spdbv é um aplicativo gratuito que fornece, entre outros recursos, uma interface que permite analisar várias proteínas ao mesmo tempo. As proteínas podem ser sobrepostas para deduzir alinhamentos estruturais e comparar os seus sítios ativos ou várias outras características importantes, como mutações de aminoácidos, ligações de hidrogênio, ângulos e distâncias interatômicas. Além disso, várias ferramentas/menus de modelagem e arquivos de comando são integrados a este programa que foi desenvolvido, principalmente, para modelagem de proteínas por homologia estrutural [37].

Tabela 1: 35 complexos cristalográficos de MAPK p38 α de *Homo sapiens* com diferentes inibidores.

Código PDB do inibidor	IC₅₀ (nM)	Resolução cristalográfica	RMSD*
1OUK	0,1	2,5	0,90
3GC7	0,6	1,8	-
3DS6	0,8	2,9	0,85
2RG6	2,2	1,72	1,28
3DT1	2,4	2,8	0,84
1M7Q	2,6	2,4	0,75
2RG5	3,1	2,4	1,26
3GFE	3,2	2,1	0,58
3BX5	3,5	2,4	1,08
1ZZL	5,0	2,0	0,59
3D83	6,0	1,9	1,06
3C5U	6,4	2,8	1,12
3HUB	9,0	2,25	0,97
1BL7	19,0	2,5	0,87
3HRB	21,0	2,2	0,46
1BMK	25,0	2,4	0,86
3HP5	29,0	2,3	1,05
2BAK	30,0	2,2	1,01
1W83	65,0	2,5	1,02
3D7Z	75,0	2,1	0,92
3GCS	84,2	2,1	1,04
3HV7	90,0	2,4	1,05
3HV5	95,0	2,25	1,16
1BL6	160,0	2,5	0,85
1KV2	220,0	2,8	1,10
2GFS	250,0	1,75	0,60
3HV4	310,0	2,6	1,12
3GCV	320,0	2,3	1,33
1WBN	350,0	2,4	1,11
2EWA	360,0	2,1	0,89
3GCU	370,0	2,1	1,18
3HVC	600,0	2,1	1,07
1WBS	630,0	1,8	1,06
3GCQ	800,0	2,0	0,95
3HV3	900,0	2,0	0,93

* desvio médio quadrático (RMSD) relativo à sobreposição dos complexos com o complexo 3GC7.

O complexo do PDB de código 3GC7 foi selecionado para a sobreposição com os demais complexos por apresentar boa resolução e, simultaneamente, baixo valor de IC_{50} . Estas sobreposições são importantes também para analisar as mudanças conformacionais induzidas pelo ligante ao interagir com o sítio ativo da enzima, uma importante consideração quando se pretende planejar ligantes baseados em estrutura, com “docking”, por exemplo.

4.1. Caracterização química e relação estrutura/atividade dos inibidores da MAPK p38 α

Analisando-se os 35 inibidores selecionados na **Tabela 1**, foi possível agrupá-los de acordo com as semelhanças de suas estruturas 2D. O inibidor do complexo de código PDB 3GC7, representado na **Figura 4**, possui um grupo isopropil piperidina (anel de seis membros contendo como heteroátomo o nitrogênio, ao qual se liga um grupo isopropil), ligado a quinazolinona (benzeno fundido com um anel de seis membros, o qual possui nitrogênio nas posições 1 e 3 e uma carbonila na posição 2). Este composto apresenta um baixo valor de IC_{50} (**Tabela 1**), e segundo a literatura, possui baixa biodisponibilidade oral e elevada depuração, devido ao carbono sp^3 vizinho ao grupo ureia, pelo qual ocorre a metabolização deste composto, envolvendo reação de oxidação. Devido a este problema farmacocinético, os autores propuseram sínteses de análogos, com modificações neste grupo, substituindo-o por uma amida ou adicionando uma dupla ligação a este carbono sp^3 , porém nenhuma proposta apresentou atividade equivalente ou melhorada [63].

Além do anel quinazolinona (complexos de códigos PDB 3GC7, 1M7Q), podemos observar também, na **Figura 4**, a presença dos anéis de quinazolina e pirido-pirimidinona, todos biciclos 6:6, que por esta razão foram agrupados em um mesmo grupo/série, dentre os 35 inibidores considerados. A estrutura da quinazolina é formada por uma pirimidina – semelhante ao benzeno, mas com dois heteroátomos de nitrogênio substituindo os carbonos nas posições 1 e 3, com um anel benzeno fundido (complexos de códigos PDB 3DT1, 2BAK), e uma pirido-pirimidinona – semelhante ao naftaleno, mas com anéis heterocíclico, no qual três átomos de nitrogênio substituem o carbono nas posições 1, 7 e 9, além de uma carbonila na posição 6 (complexo de código PDB 3HP5).

Figura 4: Grupo/série I de inibidores da MAPK p38 α , com anéis bicíclicos 6:6. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica.

Outra característica bastante comum entre os inibidores de MAPK p38 α é um anel aromático de cinco átomos, localizado no centro da molécula, sendo mais comum dentre estes o imidazol (complexos de códigos PDB 1BL6, 1BL7, 1BMK, 1OUK e 2EWA), podendo também ser um pirazol (complexos de códigos PDB 2GFS e 3HVC), ou um oxazol (complexos de códigos PDB 1ZZL e 3C5U), de acordo com a **Figura 5**.

Figura 5: Grupo/série II de inibidores da MAPK p38 α , com anel central de cinco átomos. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica.

Outros bicíclicos também estão presentes em alguns destes inibidores da MAPK p38 α , como o pirrolo triazina, o indol, e o pirazolo piridina, todos bicíclicos 6:5. O bicíclico pirrolo triazina é formado por um anel pirrol fundido a um anel de triazina (complexos de códigos PDB 2RG5, 2RG6). O indol é um bicíclico com um pirrol fundido a um benzeno (complexos de códigos PDB 1WBS, 3HUB), e o bicíclico pirazolo piridina possui um anel pirazol fundido a um anel de piridina (complexo de código PDB 3GFE), tal como observado nos compostos da **Figura 6**.

Figura 6: Grupo/série III de inibidores da MAPK p38 α , com anéis biciclos 6:5. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica.

Podemos também destacar a presença marcante do grupamento ureia, grupo carbonila ligado a dois grupamentos amino (3GCS, 3HV7, 1WBN e 1KV2), conforme ilustrado na **Figura 7**.

Figura 7: Grupo/série IV de inibidores da MAPK p38 α , com grupamento ureia. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica.

Os compostos ilustrados na **Figura 8** são os inibidores da **Tabela 1** que não apresentam as características mencionadas anteriormente, não sendo incluídos em nenhum dos grupos/séries de compostos ora discriminados, porém ainda mantêm uma certa semelhança estrutural com os demais, tal como a presença marcante do grupo benzeno, além da função amida, com exceção do composto 3HRB, que não possui a função amida.

Figura 8: Grupo/série V de inibidores da MAPK p38 α , com apenas o grupo benzeno em comum. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica.

Na **Figura 9** estão representados os compostos que apresentam tanto as características destacadas na **Figura 4** (biciclos 6:6), quanto as dos compostos representados pela **Figura 7** (grupamento ureia). Os compostos oriundos dos complexos de códigos PDB 3HV3, 3HV4, 3HV5 apresentam o grupo quinolina, que é um biciclo formado por uma piridina fundida a um benzeno. Os compostos 3GCQ, 3GCU e 3GCV apresentam o grupo quinazolina, uma pirimidina fundida a um benzeno.

Figura 9: Grupo/série I + IV de inibidores da MAPK p38 α , com anéis biciclos 6:6 e grupamento ureia. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica.

Essa discriminação dos compostos em grupos/séries com relação às características químicas 2D em comum é de grande interesse e importância para a realização de cálculos de percepção/derivação de modelos farmacofóricos para fins de triagem virtual baseado em ligantes, além de ser de suma importância na fase de otimização dos protótipos, uma vez que podem ser sugeridas mudanças baseadas em um esqueleto ativo comum às séries analisadas nesta etapa inicial.

Dentre os 35 complexos selecionados para o trabalho, foi feita uma discriminação em diferentes faixas de potência, de acordo com seus valores de IC_{50} , como representados no **Histograma 1** abaixo. Observa-se que a maioria deles (13 compostos) apresentam maior potência, com IC_{50} na faixa de 0,1 a 10 nanomolar (nM), 10 compostos apresentam uma potência intermediária, na faixa de 10 a 100 nanomolar (nM), 8 compostos uma potência na faixa de 100 a 500 nanomolar (nM), e apenas 4 compostos apresentam uma baixa potência, com IC_{50} na faixa de 500 a 900 nanomolar.

Histograma 1: Distribuição dos compostos em determinadas faixas de IC_{50} .

Estudando essas 35 moléculas, relativas aos inibidores da **Tabela 1**, foi feita uma associação das estruturas 2D dos compostos, já mostradas anteriormente, com os respectivos valores de atividade (IC_{50}), tal como pode ser observado no **Histograma 2**.

Histograma 2: Relação mostrando a distribuição das faixas de IC_{50} para cada grupo/série de compostos analisados.

No **Histograma 2**, observa-se que os compostos da série III, que possuem como característica anéis bicíclicos 6:5, são os que apresentam maior atividade, tendo 80% dos compostos desta série atividade (IC_{50}) na faixa entre 0,1 a 10 nanomolar (nM), com exceção do inibidor do complexo 1WBS, que apresentou IC_{50} de 630 nanomolar (nM). Os compostos das séries I e V também apresentaram um padrão de atividade interessante, com valores de IC_{50} menores que 100nM. Os compostos da série (I + IV), ou seja, que apresentam tanto as características da série I como as características da série IV, são os que apresentam os piores valores de IC_{50} .

Analisando as interações de alguns inibidores com diferentes faixas de atividade no sítio ativo, podem ser sugeridas algumas interações importantes para o aumento de sua potência. Para isso foram estudados diversos complexos da MAPK p38 α , e são destacados aqui as interações dos dois inibidores mais ativos, pertencentes a cada intervalo de IC_{50} , representadas no **Histograma 1**, totalizando 8 complexos. Assim, os complexos de códigos PDB 1OUK e 3GC7 foram considerados para o intervalo de IC_{50} na faixa de 0,1 a 10 nM, 1BL7 e 3HRB (IC_{50} de 10 a 100 nM), 1BL6 e 1KV2 (IC_{50} de 100 a 500 nM), e os complexos 3HVC e 1WBS (IC_{50} de 500 a 900 nM).

A análise das interações destes inibidores no sítio ativo da enzima MAPK p38 α , nas diferentes faixas de atividades, é importante para propor alguns dos principais resíduos relacionados à atividade inibitória desta enzima. Nos 8 complexos selecionados, um resíduo de metionina (Met109) está participando da interação com o respectivo inibidor em todos os

complexos, demonstrando a importância desta interação. Este resíduo realiza interação por ligação de hidrogênio, na qual o hidrogênio do grupo amida é disponibilizado para a interação, sendo, portanto, um doador de ligação de hidrogênio.

O resíduo de Met109 é conhecido também como o resíduo “linker”, e faz parte de uma conhecida região do sítio ativo cuja interação é de suma importância para a potência do inibidor [24]. A grande maioria dos inibidores de quinase possui uma ligação de hidrogênio com um NH situado no centro da região de ‘dobradiça’. As ligações de hidrogênio são importantes para a especificidade de um processo de reconhecimento e pode variar significativamente. É formada entre um heteroátomo rico em elétrons (geralmente nitrogênio e oxigênio) e um hidrogênio elétron deficiente, que também está ligado a um átomo eletronegativo (geralmente nitrogênio ou oxigênio). Anéis aromáticos com substituintes doadores de elétrons aumentam a força do acceptor de prótons na ligação de hidrogênio, enquanto os retirantes de elétrons aumentam a força dos doadores de hidrogênio [64-65].

Podemos observar que, para os compostos pertencentes às faixas de atividade com menor IC_{50} – até 100 nanomolar (nM), há mais do que uma ligação de hidrogênio, sendo frequente a interação com o resíduo de aspartato (Asp168), cuja carboxila com residual de carga negativa potencializa seu caráter acceptor de ligação de hidrogênio, conforme observado nos complexos de códigos PDB 1OUK, 3GC7 e 1BL7. No caso específico do complexo de código 3HBR, embora possua apenas uma ligação de hidrogênio com o resíduo de metionina (Met109), esta interação é de grande importância para a atividade, como já foi mencionado anteriormente, e pode ser considerada como umas das mais fortes em relação aos outros 7 inibidores selecionados, pois além de apresentar uma menor distância (e, portanto, maior força) de interação (2,6 Å), trata-se de uma ligação de hidrogênio reforçada, havendo uma carga formal negativa no oxigênio no grupo acceptor de ligação de hidrogênio do inibidor.

Quando analisamos os compostos nas faixas de IC_{50} acima de 100 nanomolar, a somatória das interações de van der Waals passa a ter uma maior relevância, devido ao menor número de ligações de hidrogênio. Observa-se também que as ligações de hidrogênio com a Met109 são consideravelmente mais fracas, pois os inibidores possuem grupos aceptores de ligação de hidrogênio mais fracos em relação aos demais, como o nitrogênio da piridina (complexos de códigos PDB 1BL6, 3HVC e 1WBS) ou o oxigênio do éter (complexo de código PDB 1KV2), ambas as bases mais fracas em relação aos aceptores presentes nos outros complexos de IC_{50} menor, como o nitrogênio do anel 2-amino-pirimidina (complexo

de código PDB 1OUK), e o oxigênio da 3,4-diidro-2-pirimidinona (complexo de código PDB 3GC7). Os inibidores dos complexos de códigos PDB 1KV2 e 1WBS, embora apresentem mais do que uma ligação de hidrogênio além das interações de van der Waals, não possuem uma alta afinidade pelo sítio ativo da enzima.

4.2. Caracterização dos modo de ligação dos inibidores da MAPK p38 α selecionados e relação modo de ligação/atividade

Os inibidores dos 35 complexos selecionados foram classificados em quatro modos de ligação aos sítios ativo e alostérico da enzima MAPK p38 α : dois pertencentes aos inibidores do Tipo I (modo de ligação “teardrop” e modo de ligação linear), um pertencente aos inibidores do Tipo II (modo de ligação estendido), e outro pertencente aos inibidores do Tipo III (modo de ligação alostérico), conforme representado na **Figura 10**.

Figura 10: Tipos de interação dos inibidores da MAPK p38 α : a) modo de ligação “teardrop” (Inibidor do Tipo I, ATP-competitivo); b) modo de ligação linear (Inibidor do Tipo I, ATP-competitivo); c) modo de ligação estendido (Inibidor do Tipo II, ATP-competitivo e alostérico); d) inibidor alostérico (inibidor do Tipo III); 1) região de ligação à adenina do ATP (sítio-ativo); 2) bolsão hidrofóbico (sítio-ativo); 3) sítio alostérico. Foram utilizados como exemplos os inibidores dos complexos 3GC7, 2RG6, 3GCS e 3HV7 em relação aos quadros a, b, c e d respectivamente, usando o programa **PyMol** [29].

A análise das interações destes inibidores no sítio ativo da enzima é importante na investigação de quais resíduos de aminoácidos são explorados pelos inibidores e propor

correlações em relação à sua atividade. Dentre todos os complexos selecionados, apenas o inibidor do complexo de código PDB 3HV7 não realiza interação com o resíduo de metionina (Met109), pois trata-se de um inibidor alostérico do Tipo III, o qual não explora a região de ligação da adenina. O resíduo de Met109 é conhecido também como resíduo “linker” e faz parte de uma conhecida região do sítio ativo, cuja interação é de suma importância para a potência dos inibidores dos Tipos I e II [24].

Os resíduos de Asp168 e Glu71 interagem com os inibidores do Tipo I com modo de ligação linear que compreendem os inibidores dos complexos de códigos PDB 3DT1, 2RG5, 2RG6, 3GFE, 3DS6, 3D7Z e 3BX5, além dos inibidores do Tipo II com modo de ligação estendido, complexos de códigos PDB 3D83, 2BAK, 3GCS, 1WBN, 1WBS, 1KV2, 3HV3, 3HV4, 3HV5, 3GCQ, 3GCU, 3GCV e 1W83. Os resíduos Asp168 e Glu71 delimitam os sítios ativo e alostérico. Os demais inibidores, referentes aos complexos de códigos PDB 3GC7, 1M7Q, 3HP5, 1BL6, 1BL7, 1BMK, 1OUK, 2EWA, 2GFS, 3HVC, 3C5U, 1ZZL, 3HRB e 3HUB são inibidores do Tipo I com modo de ligação “teardrop”, os quais exploram basicamente duas regiões do sítio ativo, a região de ligação da adenina e o bolsão hidrofóbico, neste último destaca-se o resíduo Thr106, conhecido como resíduo “GateKeeper”, por resguardar a entrada do bolsão hidrofóbico.

Utilizando o programa **Q-Site Finder** [38], podemos observar que os inibidores do Tipo I com modo de ligação “teardrop” exploram apenas parte do sítio ativo, não realizando interações polares com os resíduos Glu71 e Asp168, nem interações hidrofóbicas, sobretudo com Leu75, pertencente ao sítio alostérico, conforme representado na **Figura 11**.

Figura 11: Representação em “ribbons” do complexo da MAPK p38 α com o respectivo inibidor (código PDB 3GC7). Em representação em “stick” são visualizados o inibidor (carbono em cor amarelo) e resíduos selecionados no sítio ativo da enzima (carbono em cor cinza). A malha verde, em fase com a estrutura do complexo, é o resultado obtido com o programa **Q-Site Finder** [38], e representa um potencial sítio ligante para essa região ativa da enzima. Tal cavidade poderia ser explorada na otimização deste e de outros inibidores.

A mutação de um único resíduo de aminoácido entre as diferentes isoformas da MAPK p38 é suficiente para conferir seletividade em relação aos seus potenciais inibidores [66]. As quatro isoformas da MAPK p38 (alfa, beta, gama e delta) foram alinhadas, duas a duas (modo “pairwise”), usando o programa **ClustalW** [67]. Os complexos cristalográficos (em códigos PDB) utilizados foram: 3GCP (p38 alfa), 3GP0 (p38 beta), 1CM8 (p38 gama) e 3COI (p38 delta), conforme **Tabela 2**, onde percebemos que a isoforma alfa compartilha uma maior identidade sequencial com a isoforma beta.

Tabela 2: Identidade entre as sequências primárias das isoformas de MAPK p38.

Sequências	Alfa (α) Beta (β)	Alfa (α) Gama (γ)	Alfa (α) Delta (δ)	Beta (β) Gama (γ)	Beta (β) Delta (δ)	Gama (γ) Delta (δ)
Id. Seq.	74	60	60	63	60	66

Uma característica importante em relação ao resíduo “linker” (Met 109) é que o hidrogênio do grupo amida da isoforma α está mais acessível ao sítio ativo, comparado às outras isoformas [24]. Analisando a região do sítio ativo das diferentes isoformas da MAPK p38, foi destacada a mutação no resíduo 106, localizada no bolsão hidrofóbico, onde as isoformas α e β apresentam o aminoácido Thr106; já as isoformas γ e δ , possuem os aminoácidos Tyr106 e Val106, respectivamente. Outra mutação importante ocorre no resíduo

107, onde a isoforma α contém uma histidina (His107), a isoforma β uma treonina (Thr107), a isoforma gama uma leucina (Leu107) e a isoforma delta uma metionina (Met 107). Portanto, é possível obter inibidores mais seletivos à isoforma α da MAPK p38, simplesmente explorando as interações com o resíduo “linker” e com os resíduos mutados.

Observa-se, pelas estruturas relativas a cada modo de ligação, que os inibidores com o modo de ligação “teardrop” apresentam uma estrutura mais compacta, geralmente formada por um anel heterocíclico central de cinco membros, como o imidazol, pirazol e oxazol, ou anel bicíclico central, como quinazolinona e piridino-pirimidinona, aos quais estão ligados dois ou três substituintes cíclicos espaçados por uma ou duas ligações, conforme representado na **Figura 12**.

Figura 12. Inibidores do Tipo I (modo de ligação “teardrop”): compostos geralmente formados por anel heterocíclico central de cinco membros (códigos PDB 2EWA, 1BMK, 1BL6, 1BL7, 3C5U, 3HVC, 2GFS, 1OUK, e 1ZZL) ou seis membros (códigos PDB 3HUB e 3HRB) ou um anel bicíclico central, também heterocíclico (códigos PDB 3GC7, 1M7Q e 3HP5). A estes anéis centrais estão ligados dois ou três grupos separados pelo intervalo de uma ou duas ligações, geralmente constituída de anel benzeno substituído. O anel bicíclico central permite um maior espaçamento entre os substituintes.

Os inibidores com modos de ligação linear ou estendido possuem um grupo amida ou ureia em comum, responsável pela interação com os resíduos Glu71 e Asp168. Basicamente, o que os diferenciam é que os inibidores com modo de ligação estendido possuem um grupo mais volumoso ligado a estes grupos amida ou ureia, capaz de adentrar ao sítio alostérico e induzir um giro de 180° nos resíduos Asp168, Phe169 e Gly170, motivo-DFG, estabilizando a enzima em sua conformação inativa (DFG-out), conforme representado nas **Figuras 13, 14 e 15**.

Figura 13. Inibidores do Tipo II (modo de ligação linear): apresentam anel bicíclico central (códigos PDB 3DT1, 2RG5, 2RG6 e 3GFE) ou dois anéis centrais espaçados por uma ligação (códigos PDB 3D7Z e 3DS6) ou por um grupo amida (código PDB 3BX5).

Figura 14. Inibidores do Tipo II (modo de ligação estendido): compostos caracterizados por apresentar grupos amida ou ureia entre dois grupamentos volumosos, sendo que o grupo volumoso à direita do grupo ureia ou amida, aqui mostrado, representa a porção da molécula que ocupa o sítio alostérico e induz à conformação inativa (DFG-out) da enzima MAPK p38 α .

Figura 15. a) modo de ligação linear (código PDB 2RG6). Observa-se que em presença do inibidores do Tipo I, com modo de ligação linear, a MAPK p38 α mantém sua conformação ativa (DFG-in), com os resíduos F169 e G170 voltados à direita do resíduo D168, na região do sítio alostérico; b) modo de ligação estendido (código PDB 3GCS). Observa-se que os inibidores do Tipo II, com modo de ligação estendido, induzem à conformação inativa (DFG-out) da MAPK p38 α , com os resíduos F169 e G170 voltados à esquerda do resíduo D168, bloqueando a entrada do sítio ativo.

O inibidor do Tipo III, mostrado na **Figura 16**, apresenta certa similaridade com os inibidores que possuem modo de ligação linear ou estendido pois apresenta interações com os resíduos Glu71 e Asp168, por meio do grupamento ureia, além de interagir com o bolsão hidrofóbico através do anel de naftaleno, sendo que o restante da molécula situa-se no sítio alostérico contíguo.

Figura 16. Inibidor do Tipo III (modo de ligação alostérico).

Foi feita, então, uma correlação entre as faixas de IC₅₀, representadas pelo **Histograma 1**, com os modos de ligação ao sítio ativo (modos de ligações “teardrop”, linear e estendido), desconsiderando o inibidor alostérico do Tipo III, por apresentar uma única molécula dentre os complexos selecionados no presente estudo, conforme representado no **Histograma 3**.

Histograma 3: Distribuição das faixas de IC₅₀ para os diferentes modos de ligação dos compostos.

Observa-se, pelo **Histograma 3**, que os inibidores com modo de ligação linear apresentam uma melhor correlação IC_{50} /modo de ligação, possuindo 6 compostos com IC_{50} na faixa de 01 a 10 nM e apenas um composto do grupo com IC_{50} na faixa entre 10 a 100 nM. Os demais inibidores, com modos de ligações “teardrop” e estendido, apresentaram atividade distribuída em todas as faixas de IC_{50} .

4.3. Triagem virtual baseada em ligantes

4.3.1. Planejamento do farmacóforo e triagem virtual baseada em farmacóforo

O conceito de farmacóforo foi primeiramente introduzido por Paul Ehrlich, em 1909, como "uma estrutura molecular (phóros) que carrega as características essenciais, responsáveis pela ação biológica de um fármaco (pharmakon's)" [68]. Farmacóforo é o arranjo espacial das características que permite as moléculas interagirem com o receptor num modo de ligação específico. Há diferentes métodos de construção de um farmacóforo, o método direto utiliza informações tanto da estrutura do sítio ativo como também dos inibidores, porém, em muitos casos, não se tem a estrutura do receptor e, assim, modela-se o farmacóforo pelo método indireto, no qual é utilizado um conjunto de inibidores conhecidos por interagir em um determinado receptor. O objetivo do método indireto é encontrar a maior quantidade de característica da estrutura 3D em comum entre os inibidores [46].

A principal diferença entre os variados programas de derivação de farmacóforo está no algoritmo usado para o alinhamento das moléculas e na metodologia usada para o tratamento da flexibilidade conformacional [69]. Os grupos farmacofóricos são generalizações das diferentes maneiras com as quais os ligantes podem interagir em seu sítio ativo. As buscas baseadas no farmacóforo selecionam os compostos que se ligam aos receptores da mesma forma que os inibidores conhecidos, mas pode não haver exatamente uma similaridade estrutural significativa entre eles [70].

Baseado nos **Histogramas 2 e 3**, foi proposta a derivação de um farmacóforo usando inibidores do Tipo I com modo de ligação linear e inibidores do Tipo II com modo de ligação estendido (**Histograma 3**), os quais apresentam certa similaridade, pertencentes aos grupos/séries de compostos I, III e V (**Histograma 2**), (códigos PDB 2RG5, 2RG6, 3DS6, 3DT1, 3GFE e 3D83), com valores de IC_{50} de até 10 nM, capazes de realizarem ligação de

hidrogênio com os resíduos Met109, Glu71 e Asp168, permitindo a seleção de inibidores com os modos de ligações linear ou estendido, ou seja, os mesmos modos de ligações dos inibidores selecionados para derivação do farmacóforo, conforme a **Figura 17**.

Figura 17: Inibidores usados para a percepção do farmacóforo. Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores, bem como seus valores de atividade biológica.

O farmacóforo foi derivado utilizando-se inicialmente o programa **PharmaGist**. Quanto mais moléculas o programa consegue alinhar com alta sobreposição, gerando um maior número de grupos farmacofóricos comuns a todos, mais alto e significativo é o escore obtido. Geralmente, o algoritmo sugere resolver a tarefa pelo alinhamento flexível múltiplo entre todas as moléculas. No entanto, devido à dificuldade desta tarefa, pode-se assumir manter a conformação rígida de um dos ligantes do arquivo de entrada. Este ligante serve como um pivô, ao qual os outros ligantes serão alinhados. O pivô pode ser definido pelo usuário como o ligante com maior afinidade com o receptor, ou aquela com o menor número de ligações rotacionáveis. Além disso, no caso de um pivô altamente flexível, é possível usar um conjunto pré-computado de conformações [46]. Quando há, entre os inibidores selecionados, apenas um que possui estrutura cristalográfica, ou seja, apresenta-se em sua provável conformação bioativa, este geralmente é escolhido como pivô.

Neste projeto, todos os inibidores selecionados para a construção do farmacóforo possuem estrutura cristalográfica, e portanto, estão todos em suas conformações bioativas. Assim, os seis inibidores dos complexos de códigos PDB 3DT1, 2RG5, 2RG6, 3GFE, 3DS6 e 3D83 foram usados como arquivo de entrada no programa **PharmaGist** e o cálculo foi

realizado de duas maneiras, utilizando-se diferentes pivôs. Um alinhamento foi realizado usando o inibidor do complexo 3DS6 como pivô, que possui a estrutura mais rígida, além de ser o composto mais ativo dentre os selecionados. Outro cálculo de derivação do farmacóforo foi realizado utilizando-se o inibidor oriundo do complexo de código PDB 2RG6 como pivô, por se tratar do ligante mais flexível e o segundo inibidor mais ativo dentre o conjunto de moléculas selecionadas, conforme a **Tabela 1**.

No programa **PharmaGist**, cada grupo farmacofórico é visualizado em cor referente à sua característica físico-química (ciano para aromático, cinza para hidrofóbico, amarelo para grupos doadores de ligação de hidrogênio, verde para grupos aceptores de ligação de hidrogênio, vermelho para grupos com carga negativa e azul para grupos com carga positiva).

O resultado para o alinhamento dos inibidores oriundos dos complexos de códigos PDB 3DT1, 2RG5, 2RG6, 3GFE, 3DS6 e 3D83, mantendo o inibidor do complexo de código PDB 3DS6 como pivô, **Figura 18**, resultou em um escore de 28,8 e apresentou seis grupos farmacofóricos, dois aromáticos, dois hidrofóbicos, um doador de hidrogênio e um aceptor de hidrogênio **Figura 18 – A**. Excluindo-se o inibidor oriundo do complexo de código PDB 3D83, o escore aumentou consideravelmente para 36,487, apresentando oito grupos farmacofóricos: três aromáticos, três hidrofóbicos, um doador e um aceptor de de ligação de hidrogênio, conforme representado na **Figura 18 – B**. Excluindo-se os inibidores oriundos dos complexos de códigos PDB 3D83 e 2GFE, o escore para o alinhamento dos quatro inibidores restantes aumentou para 38,099 e o modelo apresentou nove grupos farmacofóricos, sendo três aromáticos, três hidrofóbicos, um doador e dois aceptores de ligação de hidrogênio, conforme representado na **Figura 18 – C**.

Figura 18: Farmacóforos derivados pelo programa **PharmaGist**, tendo como pivô o inibidor oriundo do complexo de código PDB 3DS6. A – Alinhamento de seis inibidores. B – Alinhamento de cinco inibidores. C – Alinhamento de quatro inibidores.

Analizando os três alinhamentos, o alinhamento B foi o melhor, conforme indicado na **Figura 18 – B**, pois o inibidor excluído do alinhamento A (código PDB 3D83, cor ciano, **Figura 18 – A**), foi o que ficou mais fora do eixo. A variação do número de grupos farmacofóricos de seis para oito, do modelo A para o B, além de uma grande diferença de escore, de 28,8 para 36,487, sugere que o inibidor do complexo de código PDB 3D83 não é interessante para a derivação do modelo farmacofórico. Comparando-se a **Figura 18 – B** com a **Figura 18 – C**, na qual foram excluídos os inibidores dos complexos de códigos PDB 3D83 e 2RG6, não se percebe grande melhoria no alinhamento, com um ligeiro aumento de escore, de 36,487 para 38,099.

Em outro modelo de farmacóforo, com os mesmos inibidores (oriundos dos complexos de código PDB 3DT1, 2RG5, 2RG6, 3GFE, 3DS6 e 3D83), utilizou-se o inibidor mais flexível (oriundo do complexo de código PDB 2RG6) como pivô. Foi analisado o resultado do programa **PharmaGist** para o alinhamento com até 4 inibidores, conforme indicado na **Figura 19**, assim como o modelo anterior.

Neste caso, foi observado que o alinhamento com cinco moléculas foi o melhor resultado, quando excluído apenas o inibidor oriundo do complexo de código PDB 3D83, reforçando que esse inibidor pode ser excluído das futuras derivações do farmacóforo, utilizando o programa **Discovery Studio 3.5**, cujo consenso será utilizado para a triagem em banco de compostos comerciais. Esse inibidor em questão está representado na cor vermelha na **Figura 19 – A**.

Figura 19: Farmacóforos derivados pelo programa **PharmaGist**, tendo como pivô o inibidor oriundo do complexo de código PDB 2RG6. A – Alinhamento de seis inibidores. B – Alinhamento de cinco inibidores. C – Alinhamento de quatro inibidores.

Quando esse mesmo inibidor (**Figura 19 – A**, cor vermelha) é excluído, o escore aumenta de 24,4 para 36,487 (**Figura 19 – B**), além de aumentar o número de grupos

farmacofóricos de cinco para oito. Já na **Figura 19 – C**, observa-se que o escore diminui de 36,487 para 30,162 quando é excluído o inibidor oriundo do complexo de código PDB 3GFE (**Figura 19 – B**, cor amarela). O número de grupos farmacofóricos se mantém o mesmo, apenas substituindo um grupo aceptor de ligação de hidrogênio por um grupo aromático.

Visto que o inibidor oriundo do complexo de código PDB 3D83 prejudicou os resultados de escore do farmacóforo, novas propostas para o modelo farmacofórico foram efetuadas, utilizando-se o programa **Discovery Studio 3.5**, tendo como arquivos de entrada os mesmos inibidores usados com o programa **PharmaGist**: (oriundos dos complexos de códigos PDB 3DT1, 2RG5, 2RG6, 3GFE e 3DS6, com exceção daquele do complexo 3D83).

Vinte hipóteses de farmacóforo foram geradas pelo programa **Discovery Studio 3.5**, mantendo-se rígidas as conformações cristalográficas dos inibidores dos complexos 2RG5, 2RG6, 3DS6, 3DT1 e 3GFE. O modelo selecionado (**Figura 20**) apresentou quatro grupos farmacofóricos: dois aceptores de ligação de hidrogênio (esfera em cor de verde), sendo um próximo ao resíduo Met109 e outro próximo ao Asp168, um grupo aromático (esfera em cor de laranja), direcionado para resíduos apolares como Ile84 e Leu75 e, por fim, um grupo hidrofóbico (esfera em cor de ciano), direcionado para o resíduo apolar Leu171. Este grupo hidrofóbico está mais enterrado no interior do sítio e, portanto, mais confiável do que nos outros modelos gerados, onde estava mais no exterior, acessível à água. O modelo selecionado foi analisado, e um pequeno ajuste foi feito para os grupos aceptores de ligação de hidrogênio, deixando os átomos dos resíduos Met109 e Asp168, responsáveis pela interações por ligação de hidrogênio, melhor arrançados no sítio ativo.

Figura 20: Farmacóforo derivado pelo programa **Discovery Studio 3.5**, usado em triagens de inibidores da MAPK p38 α , em base de dados de compostos comerciais. O farmacóforo derivado possui dois grupos aceptores de ligação hidrogênio (em verde), um grupo aromático (em laranja) e um grupo hidrofóbico (em ciano).

A validação do farmacóforo foi realizada através da contaminação da subcoleção Kinacore, da base de dados **ChemBridge**, com 10 inibidores de referência: os 10 mais ativos da **Tabela 1**, representantes dos inibidores dos Tipos I com modos de ligação “teardrop” ou linear e inibidores do Tipo II com modo de ligação estendido. Como o farmacóforo se propõe a selecionar inibidores do Tipo I com modo de ligação linear ou inibidores do Tipo II com modo de ligação estendido, os inibidores do Tipo I com modo de ligação “teardrop” devem ser excluídos. Os resultados da triagem para validação do farmacóforo foram efetivos de acordo com o almejado, pois dentre os 8219 compostos analisados, incluindo os 10 inibidores de referência incorporados à base, nenhum inibidor do Tipo I com modo de ligação “teardrop” foi selecionado, sendo selecionados apenas os inibidores do Tipo I com modo de ligação linear e os inibidores do Tipo II com modo de ligação estendido. Além disso, a posição destes inibidores selecionados, de acordo com a ordem decrescente de “Fit Value”, foi 2RG6 > 3DT1 > 3BX5 > 3DS6 > 3D83. Com exceção do composto 3DS6, que possui o menor IC₅₀ e, portanto, desejar-se-ia que estivesse em primeiro no ranque decrescente de “Fit Value”, os demais inibidores de referência apresentaram a mesma ordem de “Fit Value” em relação aos seus reais valores de IC₅₀, sendo que os inibidores de referência selecionados ficaram situados entre as posições 34 e 389, dentre os 1034 compostos selecionados.

O farmacóforo final foi, então, utilizado em triagens em diferentes bases de dados de compostos - **ChemBridge** (subcoleções Diverset, CNS, Kinacore e KINASet), **ZINC** (subcoleção CNS) e **Maybridge** (subcoleção MiniMaybridge) - utilizando-se o algoritmo que gera um maior número de conformeros (“best”). O resultado foi filtrado, sendo considerada apenas uma conformação para cada molécula (“MapNumber” igual a 1), ou seja, a de maior escore (“Fit Value”). Foram também consideradas apenas as moléculas que se ajustaram aos quatro grupos farmacóforicos do modelo (“Pharmtype” igual a 4), de uma só vez. A inclusão de duas bases de dados de compostos inibidores de quinases (Kinaset e Kinacore) foi uma estratégia adotada com vistas a aumentar a probabilidade de se obter um primeiro protótipo. A seletividade deste protótipo em relação à MAPK p38 α , bem como a sua otimização, fazem parte das perspectivas seguintes a este trabalho.

O “Fit Value”, valor atribuído de acordo com o ajuste do inibidor ao farmacóforo, foi organizado em ordem decrescente. Para cada base de compostos utilizada, foram consideradas as 150 moléculas contendo os maiores valores de “Fit Value”. Cada grupo contendo 150 moléculas foi analisado dentro do sítio ativo da enzima MAPK p38 α , excluindo-se as moléculas que apresentavam impedimentos estéricos com a estrutura da proteína. Além disso, foram selecionadas somente as moléculas que apresentavam interações com os resíduos Glu71, Asp168 e Met109, característica consensual entre os inibidores mais potentes.

Das 504.705 moléculas analisadas pelo programa **Discovery Studio 3.5**, um total de 131.333 atenderam ao modelo do farmacóforo final, com o qual, após filtragem utilizando-se os critérios anteriormente mencionados, foi obtido um total de 149 moléculas (**Tabela 3**).

Tabela 3: Resultados obtidos por triagem virtual baseada no farmacóforo.

Base de Moléculas (e subcoleções)	Número de Moléculas	Moléculas resultantes da Triagem	Moléculas após análise no sítio ativo
CNS (ZINC)	377.655	94.393	100
CNS (ChemBridge)	55.188	20.900	35
Diverset (ChemBridge)	50.000	1.998	6
KINASet (ChemBridge)	11.653	8.321	1
Kinacore (ChemBridge)	8.209	5.498	7
MiniMaybridge (MayBridge)	2.000	223	0
TOTAL	504.705	131.333	149

Para cada uma das 149 moléculas resultantes, foram gerados até 100 confôrmeros, utilizando o programa **OMEGA 2.0**, obtendo-se um total de 12.176 confôrmeros distribuídos entre as 149 moléculas. Estes 12.176 confôrmeros foram então agrupados como uma nova e pequena base de dados, com a qual um novo experimento de triagem virtual com “constraint” farmacofórica foi realizado. Para tanto, utilizou-se o programa **Discovery Studio 3.5**, com o mesmo modelo farmacofórico inicial, mantendo-se rígidas as conformações previamente obtidas com **OMEGA 2.0**, durante todo o cálculo. Como resultado, dos 12.176 confôrmeros originais, apenas 740 atenderam aos requisitos do modelo farmacofórico utilizado. Foi realizada, a seguir, uma filtragem desses 740 confôrmeros, na qual se considerou apenas um confôrmero (o de melhor “Fit Value”) para cada molécula, o que resultou em 114 moléculas (das 149 anteriores), as quais foram então inspecionadas visualmente no sítio ativo da MAPK p38 α para eliminar possíveis moléculas que apresentavam impedimentos estéricos com os resíduos do sítio ativo. Desta análise resultaram 108 moléculas que apresentavam um bom encaixe no sítio ativo da enzima. Estes compostos foram então analisados com o servidor **PharmMapper**, para a predição de atividade desses compostos.

Outro padrão farmacofórico, gerado no **PharmaGist** [46], apresentou os mesmos grupos do modelo anterior, gerado no **Discovery Studio 3.5** (**Figura 20**), exceto pela adição de um grupo doador de ligação de hidrogênio. O farmacóforo contendo este grupo adicional seleciona compostos capazes de realizar interação com o resíduo Glu71, sendo, portanto, mais restritivo à seleção dos inibidores lineares e estendidos. Com este farmacóforo foi ainda realizada uma nova triagem virtual em base de dados de compostos da **ZINC**, utilizando o servidor **ZINCPharmer** [45]. Dos 18.3 milhões de compostos disponíveis nesta base, obteve-se como resultado 3094 que atenderam ao padrão farmacofórico.

Essas moléculas foram então agrupadas como uma nova e pequena base de dados, com a qual um novo experimento de triagem virtual com “constraint” farmacofórica foi realizado. Utilizando-se o programa **Discovery Studio 3.5**, e mantendo-se as conformações rígidas dos 3094 compostos, obteve-se 972 moléculas que atenderam ao farmacóforo. Os 100 mais bem ranqueados, dentre os 972 compostos, foram então investigados no sítio ativo, seguindo o mesmo padrão anterior de análise. 22 compostos foram então selecionados e, a seguir, analisados com o servidor **PharmMapper**.

4.3.2. Triagem virtual baseada em similaridade (Índice de Tanimoto)

O Índice de Tanimoto é calculado através da avaliação da presença ou ausência de determinadas sub-estruturas nas moléculas. Estas sub-estruturas são conhecidas como “bitstrings” e os valores atribuídos para a ausência ou presença dessas sub-estruturas nas moléculas é 0 ou 1, respectivamente. O Índice de Tanimoto correlaciona, então, o número de “bitstrings” presentes em cada uma das moléculas (**a** ou **b**) e também o número de intersecções da presença desta sub-estrutura, ou seja, o número de “bitstrings” que esta presente em ambas as moléculas (**c**), **Figura 16**.

$$T(a,b) = \frac{c}{a + b - c}$$

Equação 1: Índice de Tanimoto

Para triagem virtual baseada em similaridade, foram utilizados como referência 7 inibidores representantes dos 6 grupos químicos (grupos I, II, III, IV, V e VI, **Histograma 2**) bem como dos 4 possíveis modos de ligação, os inibidores oriundos dos complexos de códigos PDB 1OUK e 3GC7 (modo de ligação “teardrop”, inibidores do Tipo I), os inibidores dos complexos 2RG5 e 3DS6 (modo de ligação linear, inibidores do Tipo I), os inibidores oriundos dos complexos de códigos PDB 3GCS e 3HV5 (modo de ligação estendido, inibidores do Tipo II), além do inibidor oriundo do complexo de código PDB 3HV7 (modo de ligação alostérico, inibidores do Tipo III). Foram analisadas as mesmas bases de dados usadas na triagem virtual baseada em farmacóforo, ou seja, as bases da **ChemBridge** (subcoleções Diverset, CNS, Kinacore e KINASet) e da **ZINC** (subcoleção CNS).

A **Tabela 4** apresenta os resultados das moléculas que obtiveram os maiores valores de Índice de Tanimoto para cada base de dados analisada, em relação a cada um dos inibidores utilizados como referência, totalizando 35 moléculas.

Tabela 4: Candidatos a inibidores de MAPK p38 α , com maior similaridade em relação aos inibidores de referência selecionados.

Índice de Tanimoto – BindingDB (www.bindingdb.org)							
Inibidores de referência	Inibidor “teardrop” Tipo I		Inibidor linear Tipo I		Inibidor estendido Tipo II		Inibidor alostérico Tipo III
Bases	3GC7*	1OUK*	2RG6*	3DS6*	3GCS*	3HV5*	3HV7
CNS (ZINC)	0,55	0,57	0,60	0,62	0,62	0,62	0,65
CNS (ChemBridge)	0,53	0,57	0,60	0,54	0,57	0,55	0,59
Diverset (ChemBridge)	0,51	0,56	0,58	0,53	0,61	0,56	0,58
KINASet (ChemBridge)	0,55	0,58	0,62	0,58	0,53	0,61	0,57
Kinacore (ChemBridge)	0,52	0,60	0,58	0,56	0,54	0,63	0,64

* Estão legendados os códigos PDB dos complexos originais dos inibidores utilizados como referência. Os inibidores oriundos dos complexos de códigos PDB 3GC7 e 1OUK representam o modo de ligação “teardrop”, os inibidores oriundos dos complexos de códigos PDB 2RG6 e 3DS6 possuem o modo de ligação linear, os inibidores oriundos dos complexos de códigos PDB 3GCS e 3HV5 são representantes do modo de ligação estendido, e o inibidor oriundo do complexo de código PDB 3HV7 representa um composto com modo de ligação alostérico. As buscas foram realizadas em 5 bases diferentes. Estão expressos os resultados do Índice de similaridade de Tanimoto, para um total de 35 compostos.

Os 35 compostos, cujos valores de Índice de similaridade de Tanimoto estão mostrados na **Tabela 4**, foram também analisados no servidor **PharmMapper**.

4.3.3. Predição de atividade (PharmMapper)

PharmMapper, um programa gratuito e disponível no servidor “online”, foi utilizado para predição de atividade dos compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligantes. Para isso, foi calculado o escore normalizado (“Normalized Fit Score”) dos 35 inibidores dos complexos cristalográficos selecionados como referência (**Tabela 1**), permitindo a geração de até 300 conformeros nos arquivos de entrada. A média dos escores normalizados foi de 0,80 e os valores máximo e mínimo foram de 0,97 e 0,47, **Figura 21**.

Figura 21: Distribuição dos valores de escore normalizado para os inibidores de referência.

Quando se utilizou apenas os inibidores do Tipo I com modo de ligação linear como arquivo de entrada no servidor **PharmMapper**, mantendo rígidas suas conformações cristalográficas, obteve-se os valores de escore normalizado variando entre 0,56 a 0,73, com uma média de 0,70. Os modelos gerados apresentaram em média 4 resultados para MAPK p38 α entre os 50 primeiros resultados do ranque, tendo o alvo MAPK p38 α na décima segunda posição do ranque, como média.

Dentre todas as moléculas selecionadas tanto por triagem virtual baseada em similaridade (35 compostos) quanto por triagem virtual baseada em farmacóforo (130 compostos), foram selecionados os compostos que apresentaram escore normalizado (“Normalizef Fit Score” - NE) maior ou igual a 0,70, obtendo-se então um total de 33 moléculas (**Figura 22**), cujos resultados estão representados na **Tabela 5**.

Figura 22: Moléculas selecionadas por triagem virtual baseada em farmacóforo (compostos 1 a 23) e por triagem virtual baseada em similaridade (compostos 24 a 33) com “Normalized Fit Score” maior ou igual a sete ($NE \geq 0,70$) usando o programa **PharmMapper**. Estão destacados na legenda dos compostos a base de origem das moléculas selecionadas, o NE calculado pelo **PharmMapper**, e para os compostos obtidos por similaridade estão representados também o código PDB do complexo cujo inibidor adveio e que foi usado como referência.

Tabela 5: Resultado de **PharmMapper** para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligantes.

Ligante	“Job ID”	Escore Normalizado	Ranque	PDB ID
1 - Compound10279	111017221712	0,80	3	1DI9
2 - Compound7568	111017215640	0,78	2	1BL7
3 - ZINC13996279	111010003613	0,77	4	1BMK
4 - ZINC28271301	111010003833	0,74	11	2ZAZ
5 - ZINC28261850	111011001209	0,73	10	2ZAZ
6 - ZINC22006038	111011002340	0,73	15	2ZAZ
7 - ZINC28273017	111011002438	0,73	10	2ZAZ
8 - Compound43515	111017221251	0,72	29	2RG5
9 - Compound739	111017215716	0,72	17	3HRB
10 - ZINC16012259	111011001932	0,72	11	2RG5
11 - Compound28276	111017221230	0,71	28	2RG5
12 - ZINC16285972	111010010859	0,71	15	1DI9
13 - Compound24066	111017221443	0,70	12	2RG5
14 - ZINC21711209	111011001715	0,70	16	1DI9
15 - ZINC05005929	111011001909	0,70	7	1DI9
16_ZINCPharmer ZINC14883705	120711095612	0,89	4	1W84
17_ZINCPharmer ZINC33138301	120711101526	0,79	5	1BL7
18_ZINCPharmer ZINC12030732	1420711101607	0,91	4	1W84
19_ZINCPharmer ZINC44736020	120711101701	0,70	12	1ZYJ
20_ZINCPharmer ZINC33264578	120711101750	0,71	6	1BL6
21_ZINCPharmer ZINC33264374	120711102008	0,71	11	1BL6
22_ZINCPharmer ZINC14988715	120711102145	0,91	5	1W84
23_ZINCPharmer ZINC14996091	120711102458	0,91	3	1W84
24_KINASet_2RG6	120611221536	0,97	1	1BL6

25_KINASet_3GC7	120611222012	0,87	3	1BMK
26_CNS_ZINC_3HV5	120612014836	0,82	6	1BMK
27_kinacore_3GC7	120612001648	0,76	5	2ZAZ
28_KINASet_1OUK	120611221301	0,74	4	1BMK
29_Kinacore_3HV7	12075013134	0,74	8	1BL7
30_CNS_ZINC_3HV7	12077025401	0,73	13	1BMK
31_kinacore_3HV5	120612001959	0,70	8	1BMK
32_CNS_ZINC_3GC7	120612015652	0,70	14	1DI9
33_kinacore_2RG6	120611215538	0,70	46	2GTN

Dentre os 33 compostos selecionados, 19 compostos apresentavam como potencial alvo a MAPK p38 α entre as 10 primeiras posições do ranque. Desses 19 compostos, 12 apresentavam-se entre os 5 primeiros do ranque em relação ao escore normalizado do **PharmMapper** (Tabela 5). Quanto mais no topo do ranque esta o alvo desejado (MAPK p38 α), maior é a seletividade do composto e, assim, menor probabilidade de efeitos colaterais.

4.3.4. Predição de propriedades físico-químicas e toxicidade

Para a avaliação das propriedades farmacocinéticas dos inibidores de referência, bem como dos compostos selecionados, foi utilizado o programa **QikProp**, o qual calcula parâmetros importantes para predição de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME), como QP log S, QP log P, QP log K, Elétron Afinidade, Globularidade, Polaridade, Momento de Dipolo, Potencial de Ionização e Carbono Pi. O programa possui como referência aproximadamente 95% dos fármacos utilizados na terapêutica. Assim, os desvios dos compostos analisados, em relação a cada propriedade físico-química, são dados em relação a estes compostos já em uso na terapêutica.

Das análises realizadas com os 35 inibidores de referência utilizados neste trabalho (Tabela 1), 18 inibidores apresentaram desvio de pelo menos uma das propriedades calculadas, em relação aos 95% dos fármacos conhecidos. Dentre estes, 11 inibidores pertencem à classe dos inibidores do Tipo II. Esta alta taxa de inibidores do Tipo II com desvio em relação às propriedades físico-químicas em relação aos 95% dos fármacos

conhecidos pode-se justificar devido a estes compostos, com estrutura estendida, possuírem uma alta massa molecular, além de possuírem vários grupos polares, o que pode prejudicar sua biodisponibilidade.

Pela análise dos parâmetros farmacocinéticos dos 33 compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante (farmacóforo e similaridade), 7 compostos apresentaram pelo menos uma propriedade físico-química fora da faixa dos fármacos conhecidos, compostos 8, 10, 13, 20, 23, 26 e 33.

Para analisar a toxicidade das moléculas selecionadas por triagem virtual baseada em farmacóforo e similaridade, foi utilizado o programa **DEREK 10.0** (“Deductive Estimation of Risk from Existing Knowledge”), o qual baseia-se na busca por similaridade da molécula em questão ou seus fragmentos com fragmentos de um banco de dados com toxicidade já reconhecida (toxicóforo). Nenhuma toxicidade foi relatada em relação às moléculas como um todo, apenas algumas moléculas apresentavam porções que o programa indicou ser plausível certa atividade tóxica, como carcinogenicidade relacionada com amida aromática, sensibilização da pele relacionada com o grupo fenol e fotossensibilidade relacionada com o grupamento aril sulfonamida, o que não descarta estas moléculas, visto que existem compostos utilizados na clínica que possuem em sua estrutura pelo menos uma destas características, como o ácido acetilsalicílico, amplamente utilizado na terapia como anti-inflamatório e que também possui uma amida aromática como parte de sua estrutura.

Portanto, dentre os 33 compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante, apenas 11 compostos apresentaram propriedades “drug-like”, ou seja, um bom perfil teórico de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade, e também um bom resultado em relação à predição de atividade realizada pelo programa **PharmMapper**, isto é, possuem a MAPK p38 α entre os 5 primeiros alvos do raque, além de um escore maior que 7. Dentre estes compostos, 7 foram obtidos através da triagem virtual baseada em farmacóforo (compostos 1, 2, 3, 16, 17, 18 e 22) e 4 por triagem virtual baseada em similaridade (compostos 24, 25, 27 e 28).

4.3.5. Campos de Interação Molecular (MIF)

Além das análises de interação molecular, os campos de força molecular são úteis em otimizações das propriedades ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Os

campos de força do **GRID** foram pela primeira vez aplicados em predições de propriedades moleculares que influenciam no transporte passivo através de diferentes membranas (**Volsurf**), depois foi utilizado também para predizer o sítio de metabolismo (**MetaSite**), e mais tarde para gerar impressões digitais de ligantes e proteínas (**FLAP**)[71].

Neste trabalho, os campos de interação molecular (MIFs) na região do sítio ativo da MAPK p38 α foram calculados para o complexo de código PDB 2RG5, utilizando o programa **GRID 22c**. Os campos de interação molecular (MIFs) foram usados para explorar as regiões do sítio ativo da MAPK p38 α com o intuito de mapear as regiões com potencial de ligação a determinados grupos moleculares dos compostos selecionados, conforme descrito na seção Metodologia. Assim, os sete compostos selecionados por triagem virtual baseada em farmacóforo foram analisados em relação aos MIFs calculados. A **Figura 23** exemplifica a análise realizada para o composto 1, selecionado.

Figura 23: Campos de interação molecular calculados para a enzima do complexo de código PDB 2RG5, em fase com o composto 1, selecionado por triagem virtual baseada em farmacóforo. A) Grupo de prova hidrofóbico (“Dry”), com contorno de energia a -1,2 Kcal/mol; B) Grupo de prova de amida (N1), com contorno de energia a -8,0 Kcal/mol; C) Grupo de prova carbonila (O), com contorno de energia a -5,5 Kcal/mol. Os contornos pontilhados, destacados na figura, representam as potenciais regiões de interação com o composto 1. Figura realizada no programa **Insight II**.

Pela análise da **Figura 23**, podemos observar que as regiões marcadas com círculo pontilhado em cor preta representam os locais com maior potencial de interação, de acordo com as predições realizadas através dos cálculos de MIFs. A **Figura 23 - A** representa uma região com potencial de interação hidrofóbica, próxima aos resíduos de Val30, Ala40 e Leu108, passível de interação com o anel aromático do composto 1. A **Figura 23 - B** representa os potenciais campos de interação gerados com os grupos de prova amida (N1). Neste caso, o

nitrogênio da amida do composto 1, em destaque pelo círculo pontilhado, atua como doador de hidrogênio na ligação de hidrogênio realizada com o grupo carbonila do resíduo de Glu71. A **Figura 23 - C** mostra, em destaque, o campo de força gerado pelo grupo de prova de carbonila (O), reforçando a interação por ligação de hidrogênio realizada entre a carbonila do composto 1 e o NH da Met109 (resíduo “linker”). Os demais compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligantes (6 compostos) também foram analisados do mesmo modo que o composto 1 e todos mostraram pelo menos três grupos com disposições pertinentes em relação aos MIFs calculados. Além disso, todos apresentaram disposição de grupos passíveis de interação com o resíduo Met109, de fundamental importância para a atividade inibitória e, portanto, nenhuma molécula foi excluída da próxima etapa (simulações de Dinâmica Molecular).

4.3.6. Simulações de Dinâmica Molecular

A simulação de Dinâmica Molecular (MD) é uma técnica computacional que foi introduzida no final da década de 1970. Pode ser utilizada para analisar a estabilidade das poses dos inibidores no interior do sítio ativo da enzima, e também serve para identificar possíveis sítios ativos e alostéricos não identificados por análises de cristalografia ou de RMN, já que estas técnicas representam apenas uma foto de uma determinada conformação do composto, não considerando possíveis movimentos conformacionais. As simulações de Dinâmica Molecular se utilizam dos princípios da física Newtoniana para simular os movimentos atômicos. Inicialmente, é preparado um sistema molecular, como um complexo proteína-ligante, obtido por cristalografia, ressonância magnética nuclear (RMN), ou por modelagem por homologia. As forças atuando neste sistema de átomos são basicamente divididas entre aquelas representativas dos átomos que estão ligados, por meio de molas virtuais e dos ângulos diedros entre estes átomos; e entre os átomos que não estão ligados, por meio de interações de van der Waals e eletrostáticas. Coletivamente, estes parâmetros compõem o campo de força, porque eles descrevem a contribuição de várias forças atômicas que governam a Dinâmica Molecular [72].

Uma vez que as forças que atuam sobre cada um dos átomos do sistema tenham sido atribuídas, as posições destes átomos são guiadas de acordo com as leis de Newton. O tempo de simulação avança, geralmente, por um ou dois femtosegundos ($1\text{fs} = 10^{-15}\text{s}$), e o processo é repetido por milhões de vezes. Como as simulações de Dinâmica Molecular requerem muitos

cálculos, geralmente são executadas em supercomputadores, os quais possuem uma série de processadores em paralelo. Novos “hardwares” tem sido aplicados em simulações de Dinâmica Molecular, como as unidades de processamentos de gráficos (GPUs), as mesmas utilizadas por vídeo-games, no intuito de aumentar a velocidade das simulações convencionais de Dinâmica Molecular [72].

Os mesmo compostos analisados em relação aos MIFs, ou seja, aqueles obtidos por triagem virtual baseada em farmacóforo, foram submetidos às simulações de Dinâmica Molecular, no interior do sítio ativo da enzima MAPK p38 α . Para isso, considerou-se a enzima do complexo de código PDB 2RG5 e utilizou-se o módulo **Discover_3** do programa **Insight II**. Os compostos partiram de suas poses obtidas na triagem virtual baseada em farmacóforo. Para cada trajetória, foi analisado o desvio médio quadrático (RMSD) da conformação dos ligantes, a energia total do sistema, e o RMSD da potencial interação por ligação de hidrogênio entre o resíduo Met109 e o ligante, todos em relação ao tempo de simulação, conforme representado e descrito na **Figura 24**.

Figura 24: Simulações de Dinâmica Molecular dos compostos selecionados por triagem virtual baseada em farmacóforo. A) Variação do RMSD (em angstroms) do composto no sítio ativo em função do tempo de simulação (em picossegundos). B) Variação da energia total do complexo em função do tempo de simulação. C) Variação do RMSD da distância de ligação do resíduo Met109 em função do tempo de simulação.

Podemos observar, pelos gráficos da **Figura 24**, que uma grande variação no RMSD do composto significa que a conformação obtida pelo cálculo de “docking” é significativamente diferente da preferencial, ou seja, que a conformação proposta tem uma menor probabilidade de ser a conformação ativa. O gráfico da variação do RMSD da interação do inibidor com o resíduo Met109 (também conhecido como resíduo “linker”), conforme mostrado na **Figura 24 – C**, é de extrema importância, visto que todos os inibidores competitivos realizam este tipo de interação. Para que as conformações dos compostos obtidos pelo crivo do fármacóforo sejam consideradas estáveis em relação às simulações de dinâmica molecular, a variação de RMSD não pode ser muito grande, sendo desejável que o RMSD se mantenha constante durante o final da simulação, principalmente após decorridos os primeiros 2000 picossegundos, que é quando se observa a estabilização da energia do sistema, **Figura 24 – B**.

Dentre os 7 compostos obtidos por triagem virtual baseada em farmacóforo, os compostos 1, 2, 3 e 22 apresentaram um melhor perfil de estabilidade. Isso pode ser verificado pela tendência horizontal das respectivas trajetórias (**Figura 24 – A**), já a partir de cerca de 2000 ps. A mesma estabilidade foi verificada para estes compostos com respeito à interação com o resíduo “linker” (**Figura 24 – C**). Em complemento, também se observou, para a maioria destes compostos, uma baixa vibração (ou perturbação) da molécula no interior do sítio ativo, assim indicado pela pequena flutuação nos valores de RMSD, no final da trajetória.

Os demais compostos (16,17 e 18), além de apresentarem oscilações em relação à variação de RMSD, ao longo de toda a trajetória, também apresentaram uma variação final mais significativa, numa faixa próxima a 0,5 Å.

4.4. Triagem virtual baseada em estrutura

4.4.1. “Docking” molecular

Neste trabalho, foram realizados cálculos de “docking”, utilizando dois programas (**GOLD 4.1.2** e **GLIDE 5.5**), frente a cinco bases de dados de compostos comerciais, sendo quatro delas provenientes da **ChemBridge** (subcoleções Diverset, CNS, Kinacore e KINASet) [40] e uma da **ZINC** (subcoleção CNS) [41-42], totalizando mais de 1 milhão de moléculas. O programa **GOLD 4.1.2** (“Genetic Optmization for Ligand Docking”) possui um Algoritmo Genético, responsável pela geração da biblioteca de confôrmeros dos ligantes, e uma função de escore baseada em campo de força, a qual leva em conta a energia de interação receptor-ligante e a energia interna do ligante [33-34]. O programa **GLIDE 5.5** (“Grid-based Ligand Docking with Energetics”) possui algoritmo de busca incremental e função de escore empírica [73]. Assim, como os dois programas utilizados possuem diferentes algoritmos de busca e funções de escore, isto diminui a porcentagem de falsos negativos nos resultados de triagem, possibilitando uma melhor varredura das bases de compostos usados nas triagens.

A validação do cálculo de “docking” foi realizada através da capacidade dos programas utilizados (**GOLD 4.1.2** e **GLIDE 5.5**) em reproduzir a conformação bioativa do inibidor do complexo utilizado (“redocking”). A reprodução do modo de ligação experimental é considerada satisfatória quando o RMSD (“Root Mean Square Deviation”), entre o inibidor em sua conformação cristalográfica e sua conformação obtida após o cálculo de “docking”, situa-se abaixo de 2.0 Å [34]. O RMSD calculado para o inibidor do complexo cristalográfico de código PDB 3GC7, entre sua conformação cristalográfica e a conformação gerada pelos programas utilizados, foi de 0,69 Å em relação à conformação gerada pelo programa **GOLD 4.1.2**, e de 0,53 Å, em relação à conformação gerada pelo programa **GLIDE 5.5**, **Figura 25**.

Figura 25: Validação dos programas de “docking” utilizados (**GOLD 4.1.2** e **GLIDE 5.5**), através da reprodução do modo de ligação. As figuras A e B representam, respectivamente, a sobreposição do inibidor do complexo de código PDB 3GC7 em sua conformação bioativa (moléculas com carbono em amarelo) com as conformações geradas pelos programas **GOLD 4.1.2** e **GLIDE 5.5** (moléculas com carbono em cinza). A) RMSD = 0,69 Å; B) RMSD = 0,53 Å.

Nas triagens virtuais realizadas utilizando o programa **GOLD 4.1.2**, foram selecionados 2000 compostos para cada base de compostos, sendo consideradas somente as poses de maior escore de “docking” para cada composto, utilizando 30% de eficiência do algoritmo GoldScore (modo “virtual screening”). Estes 2000 compostos foram novamente submetidos ao cálculo de “docking”, porém, agora utilizando 100% de eficiência do algoritmo GoldScore, sendo selecionados os 50 compostos melhor ranqueados. Estes 50 compostos selecionados foram novamente submetidos ao cálculo de “docking”, utilizando agora 100% de eficiência do algoritmo GoldScore, porém permitindo a geração de 10 poses por molécula, gerando um total de 500 confôrmeros. Foram selecionados, então, dentre estes 500 confôrmeros, os 50 compostos com maior escore, dentre os que apresentavam consenso em relação ao modo de ligação, ou seja, foi selecionada uma pose dentre as dez geradas para cada molécula, através de análise visual dos confôrmeros usando o programa **Discovery Studio**. Para o programa **GLIDE 5.5**, foram realizados os mesmos procedimentos, porém, para seleção inicial dos 2000 compostos, foi utilizado o modo HTVS (“High-Throughput Virtual Screening”). Para posterior seleção dos 50 compostos foi utilizado o modo SP (“Standard-Precision”) e, finalmente, para a geração das poses, foi utilizado o modo XP (“extra-precision”), conforme representado na **Fluxograma 2**.

Fluxograma 2: Triagem virtual baseada em estrutura (“docking”).

Assim, foi obtido um total de 500 compostos, 50 para cada uma das cinco bases de dados, ou seja, 250 compostos advindos das triagens virtuais usando o programa **GOLD 4.1.2** e 250 oriundos das triagens virtuais utilizando o programa **GLIDE 5.5**. Estes 500 compostos foram analisados no interior do sítio ativo da enzima MAPK p38 α com o propósito de selecionar apenas os inibidores do Tipo I (competitivo), com modo de ligação “teardrop” (**Figura 10 - a**), o qual ocupa basicamente a região de ligação da adenina do ATP e o bolsão hidrofóbico, com a necessidade de interação com o resíduo de aminoácido Met109 (resíduo “linker”), essencial para a atividade inibitória desta enzima. Dentre os compostos redundantes, ou seja, compostos muito similares, contendo apenas uma pequena mudança estrutural, foi selecionado apenas o de maior escore, visto que a seleção de compostos muito parecidos não enriquece significativamente a busca por um candidato com potencial atividade inibitoria, bastando apenas um representante da classe [74]. Deste modo, foi selecionado um

total de 117 compostos (**Tabela 6**), os quais foram submetidos a estudos de campo de interação molecular (MIF) no interior do sítio ativo, utilizando o programa **GRID 22c**.

Tabela 6: Quantidade de compostos selecionados após análise visual no sítio ativo da MAPK p38 α .

	GOLD 4.1.2	GLIDE 5.5
CNS_Chembridge	8	9
Diverset_Chembridge	11	13
Kinacore_Chembridge	12	11
KinaSet_Chembridge	13	19
CNS_ZINC	8	13
Total	52	65

4.4.2. Campos de Interação Molecular (MIF)

Diferentemente da triagem virtual baseada em farmacóforo, onde os campos de interação molecular (MIFs) foram usados para analisar os compostos selecionados após ensaios de predições de atividade (**PharmMapper**), toxicidade (**Derek**) e de propriedades físico-químicas (**QikProp**), na triagem virtual baseada em estrutura os MIFs foram usados para analisar os compostos obtidos logo após os cálculos de “docking” e análise dos compostos no sítio ativo, segundo critérios já mencionados anteriormente em “Docking” molecular. Além disso, o mapeamento dos MIFs na região do sítio ativo da MAPK p38 α foi realizado para o complexo de código PDB 3GC7, o mesmo que foi utilizado nos procedimentos de “docking”.

Através da análise dos MIFs dos inibidores de referência do Tipo I, com modo de ligação “teardrop”, foram propostos alguns requisitos mínimos necessários para um composto exercer atividade inibitória. Este padrão apresentou consenso entre os inibidores usados como referência, na região do resíduo “linker” (Met109), através de grupos passíveis de atuar como aceptores de ligação de hidrogênio, como os grupos carbonila, éter, nitrogênio sp³ com um par de elétrons livres, e grupo sulfona; e na região do bolsão hidrofóbico, próximo aos resíduos Val30 e Val38, pela presença de grupos hidrofóbicos. Outras regiões, com MIFs hidrofóbicos, explorados por alguns inibidores de referência e compostos selecionados, também foram destacadas, porém não foram utilizados como crivo (**Figura 26**).

Figura 26: Campos de interação molecular calculados para a enzima do complexo de código PDB 3GC7, em fase com o inibidor do complexo de código PDB 1M7Q. Grupo de prova hidrofóbico (“Dry”), com contorno de energia a -1.5 Kcal/mol, em cor de laranja; Grupo de prova de carbonila (O), com contorno de energia a -6.0 Kcal/mol, em cor de vermelho. A) Os MIFs destacados pelos contornos pontilhados destacam as regiões exploradas por todos os inibidores de referência selecionados. B) Os campos de força destacados pelos contornos pontilhados destacam outras regiões hidrofóbicas exploradas por alguns inibidores, porém não usadas como crivo entre os compostos obtidos. Figura realizada no programa **Insight II**.

Como o complexo PDB de código 3GC7 possui um inibidor do Tipo I, com modo de ligação “teardrop”, ou seja, que ocupa basicamente a região de ligação da adenina do ATP e a região do bolsão hidrofóbico, a grande maioria das moléculas obtidas por “docking” (utilizando a enzima deste complexo) apresentou este mesmo modo de ligação, e isto é devido ao ajuste conformacional da enzima, induzido pelo inibidor. O uso deste complexo é interessante, pois permite a seleção de inibidores de uma classe não explorada na triagem virtual baseada em ligantes. Também, quanto maior a diversidade dos compostos selecionados, maiores as chances de se obter um composto com atividade *in vitro* [74], visto que os compostos obtidos por triagem virtual baseada em ligante eram formados principalmente por inibidores do Tipo I, com modo de ligação linear, e também por alguns inibidores do Tipo II, com modo de ligação estendido.

Assim, os 117 compostos selecionados foram, então, analisados com o programa **Insight II**, dispondo-se dos grupos de prova hidrofóbico (Dry), carbonila (O), carboxila (O::), amida (N1), nitrogênio sp3 (N:), flúor orgânico (F), cloro orgânico (Cl), éter (OC2), oxigênio de éter aromático (OC=), oxigênio de sulfona (O=S), tioéter (STH) e hidroxila (OH), cujos MIFs foram então calculados no programa **GRID 22c**, sendo utilizado os grupos de prova

condizentes com as características estruturais dos compostos sob análise. Dentre os 117 compostos analisados, 77 compostos exploraram as mesmas regiões dos grupos de prova utilizados como referência, podendo apresentar interações adicionais (**Figura 27**). Estes compostos foram posteriormente submetidos à análise de predição de atividade, utilizando-se o programa **PharmMapper**.

Figura 27: Campos de interação molecular calculados para a enzima do complexo de código PDB 3GC7, em fase com dois compostos selecionados: em A) 22_kinacore; em B), 4_kinaset. Grupo de prova hidrofóbico (“Dry”), com contorno de energia a -1.5 Kcal/mol, em cor de laranja; Grupo de prova de carbonila (O), com contorno de energia a -6.0 Kcal/mol, em cor de vermelho. Figura realizada no programa **Insight II**.

4.4.3. Predição de atividade (PharmMapper)

Os inibidores cristalográficos do Tipo I com modo de ligação “teardrop”, usados como referência, foram submetidos ao **PharmMapper** da mesma forma que os inibidores do Tipo I com modo de ligação linear, ou seja, mantendo sua conformação cristalográfica rígida. Os valores de “Normalized Fit Score” obtidos variaram de 0,99 a 0,62, com uma média de 0,81. A posição da MAPK p38 α no ranque variou entre a primeira posição e a trigésima quarta posição, com a média situando-se entre a sexta e a sétima posição.

Assim, dentre os 77 compostos selecionados anteriormente, pelo crivo dos MIFs, foram submetidos ao programa **PharmMapper**. Foram selecionados os compostos apresentando escore normalizado acima de 0,70, com a MAPK p38 α situando-se até a quinta posição no ranque. Com estes critérios, foi selecionado um total de 22 compostos, **Tabela 7**.

Tabela 7: Resultado **PharmMapper** para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em estrutura.

Ligante	“Job ID”	Escore Normalizado	Ranque	PDB ID
8_chembridge	121019210101	0,73	4	2GFS
14_cns_zinc	121019212154	0,77	4	1WBV
2_diverset	121019224607	0,75	3	1WBV
4_diverset	121019224817	0,88	4	2DQ9
10_diverset	121019225118	0,79	3	1BMK
11_diverset	121019225220	0,81	4	1DI9
4_kinacore	121019231328	0,78	3	1KV1
7_kinacore	121019231447	0,72	4	1YQJ
8_kinacore	121019231616	0,90	1	1ZYJ
10_kinacore	121019231643	0,80	5	1ZYJ
11_kinacore	121019231710	0,90	1	1ZYJ
12_kinacore	121019231732	0,78	5	1ZYJ
16_kinacore	121019231757	0,87	3	1ZYJ
22_kinacore	121019232017	0,91	2	1ZYJ
1_kinaset	121019233054	0,90	1	1ZYJ
3_kinaset	121019233151	0,76	5	2BAQ
4_kinaset	121019233224	0,92	1	1ZYJ
9_kinaset	121019233422	0,74	2	1BMK
11_kinaset	121019233453	0,80	4	2ZAZ
19_kinaset	121019234622	0,91	1	1BL6
27_kinaset	121020003130	0,77	3	1WBV
32_kinaset	121020003614	0,96	1	2QD9

Estes compostos foram posteriormente avaliados pelo programa de predição de propriedades físico-químicas (**QikProp**) e de predição de toxicidade (**DEREK 10.0**), da mesma forma que os compostos obtidos por triagem virtual baseada em ligantes foram avaliados.

4.4.4. Predição de propriedades físico-químicas e toxicidade

Os 22 compostos com os melhores resultados obtidos pelo programa **PharmMapper** foram analisados nos programas **DEREK 10.0** e **QikProp**. Nenhuma toxicidade foi relatada em relação às moléculas como um todo (“custom predictions”), e apenas algumas moléculas apresentaram subestruturas que o programa indicou ser plausível com certa atividade tóxica (“Lhasa predictions”), tais como carcinogenicidade, relacionada com amida aromática; sensibilização da pele, relacionada com o grupo fenol; fotossensibilização, relacionada com o

grupamento aril sulfonamida; e irritação do trato respiratório, relacionada com o grupo diamina.

Quanto às predições de propriedades físico-químicas, utilizando o programa **QikProp**, metade dos compostos selecionados (11) apresentou algum desvio em relação aos 95% dos fármacos conhecidos, como Q.P. log S (Coeficiente de Partição do logaritmo da solubilidade em água), momento de dipolo, afinidade eletrônica do soluto, área de superfície acessível ao solvente (SASA) fracamente polar, número de metabólitos primários e carbono Pi SASA (números de carbonos contendo dupla ligação).

Deste modo, 11 compostos, os que não apresentaram problemas farmacocinéticos, foram selecionados para realização de simulação de Dinâmica Molecular. Dentre estes 11 compostos, 4 compostos são oriundos dos cálculos de “docking” usando o programa **GOLD** (4_kinaset, 3_kinaset, 14_cns_zinc e 22_kinacore) e 7 compostos derivados dos cálculos de “docking” usando o programa **GLIDE** (4_kinacore, 7_kinacore, 8_chembridge, 10_kinacore, 11_kinacore, 27_kinaset e 32_kinaset), conforme descrito na **Figura 28**.

Figura 28: Compostos selecionados por triagem virtual baseada em estrutura.

4.4.5. Simulações de Dinâmica Molecular

Os 11 compostos selecionados anteriormente com o uso de diversas ferramentas utilizadas foram analisados frente às simulações de Dinâmica Molecular, utilizando-se o módulo **Discover_3** do programa **Insight II**. Os compostos partiram de sua pose obtida através dos cálculos de “docking” com o complexo cristalográfico da enzima MAPK p38 α , de código PDB 3GC7. Para cada trajetória, foi analisado o RMSD da conformação dos ligantes, a energia total do sistema, e o RMSD (desvio médio quadrático) da potencial interação por ligação de hidrogênio entre o resíduo Met109 e o ligante, todos em função do tempo de simulação (**Figura 29**).

Figura 29: A) Variação do RMSD (em angstroms) em função do tempo de simulação (em picossegundos). B) Variação da energia total do complexo em função do tempo de simulação. C) Variação do RMSD da distância de ligação do resíduo Met109 em função do tempo de simulação.

Em relação às simulações de dinâmica molecular realizadas para as conformações dos compostos provenientes dos cálculos de “docking”, podemos observar pelos gráficos de variação do RMSD, **Figura 29**, colunas **A** e **C**, que os compostos que obtiveram um melhor resultado foram os compostos 10_kinacore, 4_kinacore e 3_kinaset. Os compostos 14_CNS_ZINC, 32_Kinaset e 4_Kinaset, apesar de não apresentarem oscilações nem variações significativas de RMSD da interação do inibidor com o resíduo Met109, **Figura 29 – C**, apresentaram, no final da trajetória, uma elevação da inclinação da curva de RMSD, em função do tempo de simulação, um perfil de instabilidade (**Figura 29 – A**).

Os demais compostos, 11_kinacore, 8_chembridge, 27_Kinaset, 22_Kinacore e 7_Kinacore, apresentaram os piores resultados, pois além de oscilações significativas no RMSD da interação do inibidor com o resíduo Met109, **Figura 29 – C**, todos apresentaram, no final da trajetória, uma elevação da inclinação da curva de RMSD, em função do tempo de simulação, um perfil de instabilidade (**Figura 29 – A**).

4.5. Triagem virtual baseada em estrutura (GLIDE) e ligantes (por similaridades eletrostática e de forma - EON e ROCS)

Utilizando o programa **GLIDE**, que foi mais bem validado em relação ao programa **GOLD** (RMSD de 0,53 para o programa **GLIDE** e RMSD de 0,69 para o programa **GOLD**), foram realizados cálculos de “docking” (modo HTVS) com as bases **ChemBridge** (subcoleções Diverset, CNS, Kinacore e KINASet) e **ZINC** (subcoleção CNS) para gerar cinco pequenas bases de compostos contendo 1000 moléculas cada, as de maior escore. Para cada base gerada, foi utilizado o programa **OMEGA 2.0** para produzir até 100 confôrmeros para cada molécula, dando origem a cinco bibliotecas de compostos com até 100.000 confôrmeros cada.

Para cada uma dessas bibliotecas foram realizadas triagens virtuais baseada em similaridade de forma [55, 75-76], usando o programa **ROCS** (Rapid Overlay of Chemical Structures), da OpenEye, e tendo como referência cinco inibidores cristalográficos (oriundos dos complexos de códigos PDB 1OUK, 3GC7, 3DS6, 2RG6 e 3DT1), sendo eles os de maior IC₅₀ da **Tabela 1**), representantes das classes dos inibidores dos Tipos I e II. Desta triagem foram selecionados os 500 compostos, os que possuíam maior ComboScore (sobreposição de forma + sobreposição baseada em átomo).

Assim, foram geradas 25 bibliotecas contendo 500 compostos cada (5 bases iniciais x 5 inibidores de referência). Com estas bibliotecas foram realizadas triagens virtuais baseadas em similaridade eletrostática [56], usando o programa **EON**, também da OpenEye, sendo selecionados os 25 compostos que apresentaram a maior similaridade eletrostática em relação aos inibidores utilizados como referência, conforme descrito no **Fluxograma 3**.

Fluxograma 3: Esquema de seleção de compostos utilizando métodos de triagem virtual baseado em estrutura (**GLIDE**) e métodos de triagem virtual baseado em similaridade de forma (**ROCS**) e similaridade eletrostática (**EON**). Os 5 compostos finais obtidos, mostrados nesta figura, são derivados da base de composto inicial CNS (**ChemBridge**), portanto foram obtidos um total de 25 compostos, 5 para cada base de dados, **ChemBridge** (Diverset, CNS, Kinacore e KINASet) e **ZINC** (CNS).

A combinação dos métodos de triagens virtuais baseadas em forma e em similaridade já foi demonstrada ser eficiente na busca de novos candidatos a fármacos [77]. Os compostos provenientes das bibliotecas analisadas são pré-alinhados aos inibidores de referência e depois ranqueados de acordo com sua similaridade de forma e eletrostática, utilizando diferentes programas, **ROCS** e **EON**, respectiva e sucessivamente. Esta metodologia demanda menor tempo de processamento que a triagem baseada em farmacóforo.

ROCS é um programa baseado na idéia de que compostos que podem sobrepor seus volumes possuem conformações semelhantes. Ele se utiliza de uma função Gaussiana para representar o volume dos compostos analisados [55]. Ele é utilizado em análises de QSAR e também para predição do modo de ligação (pose) dos ligantes, na ausência da estrutura da proteína [78-79]. **EON** compara os potenciais mapas eletrostáticos superficiais entre as

moléculas pré-alinhadas e determina as medidas de Tanimoto para sua comparação, não dependendo dos gráficos moleculares para isso [80]. Como o programa **EON** necessita de que as moléculas de entrada estejam previamente alinhadas, é interessante utilizar como arquivo de entrada o resultado obtido do programa **ROCS**, assim, os compostos selecionados apresentarão similaridade de forma e eletrostática. Os 25 compostos selecionados de acordo com esta metodologia (**Fluxograma 3**) foram analisados quanto à predição de atividade, utilizando-se o programa **PharmMapper**, conforme apresentado na **Tabela 8**.

Tabela 8: Resultado **PharmMapper** para os compostos selecionados por triagem virtual baseada em ligante e estrutura.

Ligante	“Job ID”	Escore Normalizado	Ranque	PDB ID
1OUK_cnszinc	121228194706	0,92	2	1ZYJ
3GC7_cnszinc	121228194900	0,60	11	1BL7
3DS6_cnszinc	121228204538	0,67	18	2BAK
2RG6_cnszinc	121228194734	0,60	13	2ZAZ
3DT1_cnszinc	121228204607	0,74	4	1ZYJ
1OUK_cnschembridge	121228192455	0,69	12	1A9U
3GC7_cnschembridge	121228194632	0,74	10	2QD9
3DS6_cnschembridge	121228201029	0,49	88	1M7Q
2RG6_cnschembridge	121228194512	0,86	9	1BL6
3DT1_cnschembridge	121228194605	0,60	15	2ZAZ
1OUK_diversset	121228194935	0,75	3	2BAK
3GC7_diversset	121228194955	0,44	118	1OUY
3DS6_diversset	121228211441	0,60	11	2GFS
2RG6_diversset	121228195041	0,49	56	1KV1
3DT1_diversset	121228195104	0,74	2	1ZYJ
1OUK_KINASet	121228195127	0,57	37	1DI9
3GC7_KINASet	121228195209	0,93	2	2QD9
3DS6_KINASet	121228195233	0,75	10	1BMK
2RG6_KINASet	121228212401	0,64	11	1KV1
3DT1_KINASet	121228195317	0,75	17	1BMK
1OUK_Kinacore	121228195340	0,55	43	1DI9
3GC7_Kinacore	121228195403	0,54	71	1ZZL
3DS6_Kinacore	121228195427	0,65	17	2ZAZ
2RG6_Kinacore	121228213149	0,74	10	1ZYJ
3DT1_Kinacore	121228195523	0,76	3	2BAL

Dentre os 25 compostos analisados pelo programa **PharmMapper**, 11 compostos apresentaram escore normalizado maior que 0,7 em relação à MAPK p38 α . Destes, 6 compostos tiveram o alvo desejado, MAPK p38 α , entre as primeiras cinco posições do ranque.

Os seis compostos selecionados, **Figura 30**, foram analisados quanto as predições de toxicidade e em relação as suas propriedades farmacocinéticas, através dos programas **DEREK** e **QikProp**, respectivamente. Em relação às predições de toxicidade, nenhum composto apresentou toxicidade em relação às predições personalizadas, a qual leva em conta a estrutura da molécula analisada como um todo. Quanto às predições Lhasa, que analisa fragmentos do composto em questão, foi relatado ser plausível carcinogenicidade, devido à presença de grupos amina ou amida aromática; mutagenicidade, quando da presença do grupo quinolina; fototoxicidade ou fotoalergenicidade, quando possui o grupo diarilcetona; metahemoglobinemia, devido à presença do grupo anilina; e sensibilização da pele, quando apresenta o grupo fenol. Os compostos 3dt1_diverset e 3gc7_kinaset (**Figura 30**) relataram um maior número de toxicidade (predições Lhasa), com 3 e 4 efeitos tóxicos plausíveis, respectivamente. Os demais compostos apresentaram apenas um efeito tóxico plausível.

Em relação às propriedades farmacocinéticas, com exceção do composto 3dt1_diverset, que não apresentou nenhum metabólito primário, sendo que a faixa de metabólitos primário para os fármacos de referência varia entre 1 e 8, nenhum outro composto apresentou propriedades farmacocinéticas fora da média dos fármacos usados como referência. Estes cinco compostos, que não apresentaram problemas farmacocinéticos nem toxicidade previstos, podem ser comprados das bases de compostos comerciais aqui utilizadas para que ensaios de inibição *in vitro* da enzima MAPK p38 α possam ser realizados.

Figura 30: Compostos selecionados a partir de triagens baseadas em estrutura e ligante.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Com o aumento da expectativa de vida das pessoas e sabendo que a prevalência do Mal de Alzheimer aumenta em populações idosas, o número de casos vem crescendo nos últimos anos e tende a crescer cada vez mais. Além disto, os tratamentos medicamentosos hoje existentes, baseados principalmente em fármacos inibidores da acetilcolinesterase, são apenas paliativos e não impedem o avanço da doença, ou seja, a morte dos neurônios colinérgicos. Portanto, é de extrema importância o contínuo investimento em pesquisas que visem diferentes estratégias de reversão ou interrupção dos dois principais quadros fisiopatológicos conhecidos, como a formação dos aglomerados neurofibrilares e das placas senis.

Um total de 14 compostos foram selecionados, através de diferentes metodologias de triagem, 3 compostos obtidos por triagens virtuais baseadas em farmacóforo, 4 compostos obtidos por triagens virtuais baseadas em similaridade de Tanimoto, 4 compostos obtidos por triagens virtuais baseadas em estrutura (“docking”) e 3 compostos obtidos das triagens virtuais mista, baseada tanto na estrutura (docking) como também no ligante (similaridade de forma e eletrostática). Estes potenciais inibidores da enzima MAPK p38 α , responsável pela hiperfosforilação da proteína tau e consequente formação dos emaranhados neurofibrilares, podem corroborar na busca de um potencial fármaco para o tratamento do Mal de Alzheimer, visto que poucos inibidores da MAPK p38 α atingiram ensaios clínicos de fase III, apesar da grande quantidade de estudos realizados neste sentido.

Em relação aos resultados obtidos, concluiu-se que:

- Os 14 compostos selecionados atendem aos critérios adotados de baixa ou nenhuma toxicidade potencial, bom perfil farmacoterapêutico predito, atividades calculadas em valores comparáveis aos obtidos para os compostos de referência, além da manutenção das principais interações observadas para os inibidores mais potentes.
- A variedade dos métodos de triagem utilizada, sobretudo a abordagem mista, serviu para a autovalidação dos resultados, bem como para explorar, mais eficientemente, a diversidade química estrutural dos compostos, na busca de um primeiro protótipo.

As perspectivas imediatas são a compra desses compostos e a realização de amplos ensaios de atividade (e seletividade) com a MAPK p38 alfa, cujos resultados guiarão a otimização de algum protótipo obtido, bem como análise mais detalhada dos resultados, validados ou não.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Smith, M.d.A.C., *Doença de Alzheimer*. Revista Brasileira de Psiquiatria, 1999. **21**(2): p. 5.
2. Berchtold, N.C. and C.W. Cotman, *Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease: Evolution in the Conceptualization of Dementia and Alzheimer's Disease*. Neurobiology of Aging, 1998. **19**(3): p. 17.
3. Fagihi, M.A., et al., Nature Medicine, 2008. **14**(4).
4. Kuglstatter, A., et al., *Tyramine fragment binding to BACE-1*. Bioorg Med Chem Lett, 2008. **18**(4): p. 1304-7.
5. Citron, M., *[beta]-Secretase inhibition for the treatment of Alzheimer's disease - promise and challenge*. Trends in Pharmacological Sciences, 2004. **25**(2): p. 92-97.
6. Cole, S.L. and R. Vassar, *The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1*. Mol Neurodegener, 2007. **2**: p. 22.
7. *PORTARIA Nº 491, DE 23 DE SETEMBRO DE 2010*.
8. Shintani, E.Y. and K.M. Uchida, *Donepezil: an anticholinesterase inhibitor for Alzheimer's disease*. Am J Health Syst Pharm, 1997. **54**(24): p. 2805-10.
9. Mucke, L., *Neuroscience: Alzheimer's disease*. Nature, 2009. **461**(7266): p. 895-7.
10. Dalrymple, S.A., *p38 mitogen activated protein kinase as a therapeutic target for Alzheimer's disease*. J Mol Neurosci, 2002. **19**(3): p. 295-9.
11. Gompel, M., et al., *Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the ascidian Aplidium meridianum*. Bioorg Med Chem Lett, 2004. **14**(7): p. 1703-7.
12. Kuret, J., et al., *Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain*. J Neurochem, 1997. **69**(6): p. 2506-15.
13. Singh, T.J., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state*. J Neurochem, 1995. **64**(3): p. 1420-3.
14. Kuret, J., et al., *Casein kinase 1 is tightly associated with paired-helical filaments isolated from Alzheimer's disease brain*. Journal of Neurochemistry, 1997. **69**(6): p. 2506-15.

15. Singh, T.J., I. Grundke-Iqbal, and K. Iqbal, *Phosphorylation of tau protein by casein kinase-1 converts it to an abnormal Alzheimer-like state*. Journal of Neurochemistry, 1995. **64**(3): p. 1420-3.
16. Dvir, H., et al., *X-ray structures of Torpedo californica acetylcholinesterase complexed with (+)-huperzine A and (-)-huperzine B: structural evidence for an active site rearrangement*. Biochemistry, 2002. **41**(35): p. 10810-8.
17. Giacobini, E., *Cholinergic foundations of Alzheimer's disease therapy*. J Physiol Paris, 1998. **92**(3-4): p. 283-7.
18. Reichman, W.E., *Current pharmacologic options for patients with Alzheimer's disease*. Ann Gen Hosp Psychiatry, 2003. **2**(1): p. 1.
19. Zhang, Y.Y., et al., *Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states*. J Biol Chem, 2008. **283**(39): p. 26591-601.
20. Chico, L.K., L.J. Van Eldik, and D.M. Watterson, *Targeting protein kinases in central nervous system disorders*. Nat Rev Drug Discov, 2009. **8**(11): p. 892-909.
21. Yasuda, S., et al., *p38 MAP kinase inhibitors as potential therapeutic drugs for neural diseases*. Cent Nerv Syst Agents Med Chem, 2011. **11**(1): p. 45-59.
22. Johnson, G.V. and C.D. Bailey, *The p38 MAP kinase signaling pathway in Alzheimer's disease*. Exp Neurol, 2003. **183**(2): p. 263-8.
23. Perry, J.J., et al., *p38alpha MAP kinase C-terminal domain binding pocket characterized by crystallographic and computational analyses*. J Mol Biol, 2009. **391**(1): p. 1-11.
24. Lee, M.R. and C. Dominguez, *MAP Kinase p38Inhibitors: Clinical Results and an Intimate Look at Their Interactions with p38α Protein*. Current Medicinal Chemistry, 2005. **12**(25): p. 2979-2994.
25. Simard, J.R., et al., *High-throughput screening to identify inhibitors which stabilize inactive kinase conformations in p38alpha*. J Am Chem Soc, 2009. **131**(51): p. 18478-88.
26. Berman, H.M., et al., *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Research, 2000. **28**: p. 235-242.
27. Lengauer, T., *Bioinformatics: from genomes to drugs. Methods and principles in medicinal chemistry*. Weinheim: Wiley-VHC Verlag, 2002. **1**.
28. Heinig, M. and D. Frishman, *STRIDE: a web server for secondary structure assignment from known atomic coordinates of proteins*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W500-2.

29. Loper, J.E., D.Y. Kobayashi, and I.T. Paulsen, *The Genomic Sequence of Pseudomonas fluorescens Pf-5: Insights Into Biological Control*. Phytopathology, 2007. **97**(2): p. 233-8.
30. Polgar, T. and G.M. Keseru, *Virtual screening for beta-secretase (BACE1) inhibitors reveals the importance of protonation states at Asp32 and Asp228*. J Med Chem, 2005. **48**(11): p. 3749-55.
31. Nwaka, S. and A. Hudson, *Innovative lead discovery strategies for tropical diseases*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(11): p. 941-55.
32. Alonso, H., A.A. Bliznyuk, and J.E. Gready, *Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design*. Med Res Rev, 2006. **26**(5): p. 531-68.
33. Halperin, I., et al., *Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions*. Proteins, 2002. **47**(4): p. 409-43.
34. Brooijmans, N. and I.D. Kuntz, *Molecular recognition and docking algorithms*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2003. **32**: p. 335-73.
35. Mohan, V., et al., *Docking: successes and challenges*. Curr Pharm Des, 2005. **11**(3): p. 323-33.
36. Rodrigues, R.P., et al., *Estratégias de Triagem Virtual no Planejamento de Fármacos*. Revista Virtual de Química, 2012. **4**: p. 38.
37. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling*. Electrophoresis, 1997. **18**(15): p. 2714-2723.
38. Laurie, A.T. and R.M. Jackson, *Q-SiteFinder: an energy-based method for the prediction of protein-ligand binding sites*. Bioinformatics (Oxford, England), 2005. **21**(9): p. 1908-16.
39. *Discovery Studio, Versão 3.5, Accelrys Inc.: San Diego, USA, 2012.*
40. Allen, F.H., *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*. Acta Crystallogr B, 2002. **58**(Pt 3 Pt 1): p. 380-8.
41. Irwin, J.J. and B.K. Shoichet, *ZINC--a free database of commercially available compounds for virtual screening*. J Chem Inf Model, 2005. **45**(1): p. 177-82.
42. Irwin, J.J., et al., *ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012.
43. Omega, *Versão 2.0*, Openeyes Scientific Software: Santa Fe, NM, 2006.
44. Silva, C.H.T.P. and M. Pastor, *Resultados não publicados*.

45. Koes, D.R. and C.J. Camacho, *ZINCPharmer: pharmacophore search of the ZINC database*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Web Server issue): p. W409-14.
46. Schneidman-Duhovny, D., et al., *PharmaGist: a webserver for ligand-based pharmacophore detection*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(Web Server issue): p. W223-8.
47. Kirchmair, J., et al., *Comparative Performance Assessment of the Conformational Model Generators Omega and Catalyst: A Large-Scale Survey on the Retrieval of Protein-Bound Ligand Conformations*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2006. **46**(4): p. 1848-1861.
48. Hert, J., et al., *Comparison of Fingerprint-Based Methods for Virtual Screening Using Multiple Bioactive Reference Structures*. Journal of Chemical Information and Computer Sciences, 2004. **44**(3): p. 1177-1185.
49. GOLD, Versão 4.1.2, Cambridge Crystallographic Datacenter, Cambridge, UK, 2009.
50. GLIDE, Versão 5.5, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2009.
51. Goodford, P.J., *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules*. J Med Chem, 1985. **28**(7): p. 849-57.
52. Kumar, A. and I. Ghosh, *Mapping selectivity and specificity of active site of plasmepsins from Plasmodium falciparum using molecular interaction field approach*. Protein Pept Lett, 2007. **14**(6): p. 569-74.
53. GRID, Versão 22, Molecular Discovery Ltd, London, UK, 2006.
54. Insight II, Molecular Simulations, San Diego, CA, 2000.
55. Grant, J.A., M.A. Gallardo, and B.T. Pickup, *A fast method of molecular shape comparison: A simple application of a Gaussian description of molecular shape*. Journal of Computational Chemistry, 1996. **17**(14): p. 1653-1666.
56. Grant, J.A., et al., *A simple formula for dielectric polarisation energies: The Sheffield Solvation Model*. Chemical Physics Letters, 2007. **441**(1-3): p. 163-166.
57. Liu, X., et al., *PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach*. Nucleic Acids Res, 2010. **38**(Web Server issue): p. W609-14.
58. DEREK10.0., LHASA Limited: Leeds, UK (2004).
59. QikProp, version 3.4, Schrödinger, LLC, Schrödinger: New York, NY, 2011.
60. Benfenati, E. and G. Gini, *Computational predictive programs (expert systems) in toxicology*. Toxicology, 1997. **119**(3): p. 213-225.

61. Gopi Mohan, C., et al., *Computer-Assisted Methods in Chemical Toxicity Prediction*. Mini Reviews in Medicinal Chemistry, 2007. **7**(5): p. 499-507.
62. Muster, W., et al., *Computational toxicology in drug development*. Drug Discov Today, 2008. **13**(7-8): p. 303-10.
63. Hunt, J.A., et al., *p38 Inhibitors: piperidine- and 4-aminopiperidine-substituted naphthyridinones, quinolinones, and dihydroquinazolinones*. Bioorg Med Chem Lett, 2003. **13**(3): p. 467-70.
64. Bissantz, C., B. Kuhn, and M. Stahl, *A medicinal chemist's guide to molecular interactions*. J Med Chem, 2010. **53**(14): p. 5061-84.
65. Patrick, G.L., *An Introduction to Medicinal Chemistry*. 4 ed: Oxford University Press, 2009.
66. Mavel, S., I. Thery, and A. Gueiffier, *Synthesis of imidazo[2,1-a]phthalazines, potential inhibitors of p38 MAP kinase. Prediction of binding affinities of protein ligands*. Arch Pharm (Weinheim), 2002. **335**(1): p. 7-14.
67. Larkin, M.A., et al., *Clustal W and Clustal X version 2.0*. Bioinformatics, 2007. **23**(21): p. 2947-8.
68. Sun, H., *Pharmacophore-based virtual screening*. Curr Med Chem, 2008. **15**(10): p. 1018-24.
69. Zhong, H.B., J. Phillip, *GALAHAD pharmacophore modeling for drug discovery*. Journal of the American Chemical Society, 2007. **129**(17): p. 5780-5780.
70. Shepphird, J.K. and R.D. Clark, *A marriage made in torsional space: using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches*. J Comput Aided Mol Des, 2006. **20**(12): p. 763-71.
71. Milletti, F., et al., *New and original pKa prediction method using grid molecular interaction fields*. J Chem Inf Model, 2007. **47**(6): p. 2172-81.
72. Durrant, J.D. and J.A. McCammon, *Molecular dynamics simulations and drug discovery*. BMC Biol, 2011. **9**: p. 71.
73. Eldridge, M.D., et al., *Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes*. J Comput Aided Mol Des, 1997. **11**(5): p. 425-45.
74. Scior, T., et al., *Recognizing Pitfalls in Virtual Screening: A Critical Review*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012. **52**(4): p. 867-881.
75. Boström, J., J.R. Greenwood, and J. Gottfries, *Assessing the performance of OMEGA with respect to retrieving bioactive conformations*. Journal of Molecular Graphics and Modelling, 2003. **21**(5): p. 449-462.

76. Haigh, J.A., et al., *Small Molecule Shape-Fingerprints*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2005. **45**(3): p. 673-684.
77. Muchmore, S.W., A.J. Souers, and I. Akritopoulou-Zanze, *The Use of Three-Dimensional Shape and Electrostatic Similarity Searching in the Identification of a Melanin-Concentrating Hormone Receptor 1 Antagonist*. Chemical Biology & Drug Design, 2006. **67**(2): p. 174-176.
78. Tuccinardi, T., et al., *Multitemplate Alignment Method for the Development of a Reliable 3D-QSAR Model for the Analysis of MMP3 Inhibitors*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2009. **49**(7): p. 1715-1724.
79. Sutherland, J.J., et al., *Lessons in Molecular Recognition. 2. Assessing and Improving Cross-Docking Accuracy*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2007. **47**(6): p. 2293-2302.
80. EON, *Versão 2.0.1, Openeyes Scientific Software: Santa Fe, NM, 2007*.