Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Modelagem molecular, síntese e avaliação da atividade
biológica de potenciais antineoplásicos com a proteína
hnRNP K e culturas de células tumorais**

Vinicius Barreto da Silva

Ribeirão Preto
2011

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Modelagem molecular, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais antineoplásicos com a proteína hnRNP K e culturas de células tumorais

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: Vinicius Barreto da Silva

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

Ribeirão Preto

2011

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

da Silva, Vinicius Barreto

Modelagem molecular, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais antineoplásicos com a proteína hnRNP K e culturas de células tumorais. Ribeirão Preto, 2011.

82p.; 30 cm.

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

ERRATA

Folha	Linha	Onde se lê	Leia-se
i	8	nucelotídeos	nucleotídeos
i	10	uma	um
62	11	priorizado	priorizada

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vinicius Barreto da Silva

Modelagem molecular, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais antineoplásicos com a proteína hnRNP K e culturas de células tumorais.

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: _____

RESUMO

SILVA, V. B. **Modelagem molecular, síntese e avaliação da atividade biológica de potenciais antineoplásicos com a proteína hnRNP K e culturas de células tumorais**. 2011. 82f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A proteína hnRNP K é conhecida por seu papel nos múltiplos processos que compõe a expressão gênica, incluindo funções nos estágios de “splicing”, transcrição e tradução, desempenhadas, principalmente, através da ligação de seus domínios KH a nucleotídeos. A ativação inadequada da hnRNP K tem relação direta com a gênese de alguns tipos de câncer, sobretudo de cabeça e pescoço, mama e colo-retal, evidenciando a mesma como uma atrativo alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos. Com o auxílio de técnicas *in silico*, foram identificados dois compostos orgânicos, um derivado de benzimidazol e outro derivado de fenilbenzamida, capazes de impedir a ligação da proteína hnRNP K a oligonucleotídeos *in vitro*. Aliando as técnicas de “docking”, campos de interação e dinâmica molecular foi possível sugerir que tais compostos apresentam características estruturais que permitem a realização de interações na fenda de ligação do domínio KH3, principalmente com os resíduos R40 e R59, os quais são considerados chaves no reconhecimento molecular de nucleotídeos. Os derivados de benzimidazol e fenilbenzamida constituem novos compostos de partida na busca de novos antineoplásicos que tem como alvo a proteína hnRNP K. Do ponto de vista de metabolismo e toxicidade, o derivado de fenilbenzamida parece ser mais promissor quando se investiga uma molécula para aplicação terapêutica, uma vez que gerou poucos alertas críticos de toxicidade, ao contrario do derivado de benzimidazol, que apresenta maior potencial genotóxico. Apesar de se ligarem aos domínios KH da hnRNP K e impedir sua complexação a nucleotídeos, ensaios com culturas de células mostraram apenas tênue atividade antitumoral para tais compostos, com maior redução de viabilidade celular, ao redor de 18% a 8,4 μ M, exibida pelo derivado de fenilbenzamida. Seguindo o princípio do análogo ativo, simulações de triagem virtual na busca de análogos dos ligantes da hnRNP K revelaram 21 novos derivados de benzimidazol ou fenilbenzamida na base de dados EXPRESS-Pick, dos quais 5 foram testados *in vitro* com a proteína e 3 novos ligantes identificados. Com o intuito de otimizar tais derivados, foram sugeridos *in silico* substituintes (potenciais bioisósteros) para os anéis dioxopirrolidínicos dos ligantes já identificados, guiando, assim, a futura síntese de novas substâncias com potencial atividade antitumoral. Além disso, o trabalho foi complementado através da proposição de síntese de novos derivados benzoxazepínicos acoplados a purinas, os quais também tem aplicação como antineoplásicos, entretanto por mecanismos que não envolvem a hnRNP K. A grande limitação desses derivados é a presença de um grupo nitro aromático, o qual é reconhecido por sua toxicidade pronunciada. Com o intuito de otimizar tais derivados, foram sugeridos *in silico* potenciais bioisósteros capazes de substituir o grupo nitro e guiar a síntese e novos derivados com atividade antitumoral e toxicidade reduzida.

Palavras-chave: hnRNP K, modelagem molecular, planejamento de fármacos *in silico*, câncer.

ABSTRACT

SILVA, V. B. **Molecular modeling, synthesis and biological evaluation of potential antineoplasics with hnRNP K and tumoral cell lines.** 2011. 82f Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

hnRNP K protein is known for its role in the multiple processes that compose gene expression, including functions during splicing, transcription and translation, developed, mainly, by the binding of nucleotides to KH domains. Inadequate activation of hnRNP K induces the development of some types of cancer, including head and neck, breast and colorectal. In this way, hnRNP K is an attractive molecular target for antineoplastic drug design. Using *in silico* strategies, we have identified two organic compounds, a benzimidazole and a phenylbenzamide derivatives, able to prevent the natural binding of nucleotides to hnRNP K *in vitro*. Applying docking, molecular interaction fields and molecular dynamics simulations it was possible to propose that such compounds present structural characteristics capable to support intermolecular interactions inside KH3 domain binding cleft, mainly with R40 and R59 residues, which are extremely important during molecular recognition of nucleotides by hnRNP K. The benzimidazole and phenylbenzamide derivatives identified are novel lead compounds that can guide the design of new antineoplastic drugs targeting hnRNP K. Considering metabolic and toxicity predictions, the phenylbenzamide seems to be more promising than the benzimidazole derivative as a drug, once the benzimidazole presents genotoxic potential. Although both derivatives prevent the binding of nucleotides to hnRNP K, biological assays with tongue cancer cell lines revealed only a mild antitumoral activity for such compounds. Higher level of cell viability reduction, 18% at 8.4 μ M, was observed for the phenylbenzamide derivative. Following the similarity principle, virtual screening simulations were made intending to find novel benzimidazole and phenylbenzamide derivatives inside EXPRESS-Pick database. The search revealed 21 compounds, 5 of which were tested *in vitro* with hnRNP K, where 3 of them were active. Intending to optimize benzimidazole and phenylbenzamide derivatives in order to design more potent chemical entities, we have suggested *in silico* substituents as potential bioisosteric groups of the dioxopyrrolidine rings of hnRNP K ligands, guiding the future synthesis of novel compounds with enhanced antitumoral activity. Moreover, complementary work proposition was performed through the synthesis of benzoxazepin-purines, which also present antitumoral activity but not through hnRNP K pathway. The major limitation of such derivatives is the presence of a nitro aromatic group, which can be very toxic. 20 potential bioisosteric groups were proposed as fragment candidates to replace the nitro one in order to design novel antitumoral derivatives with reduced toxic potential.

Keywords: hnRNP K, molecular modeling, *in silico* drug design, cancer.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Configuração básica de um domínio KH, composto por 3 α -hélices, 3 folhas β , um “loop” de comprimento variável e um motivo rico em glicina (GXXG) 3
- Figura 2.** Ilustração da disposição dos domínios presentes na hnRNP K. Além dos domínios KH, que se ligam a ácidos nucleicos, há a presença de domínios responsáveis por interações com outras proteínas, como GRGG “box”, um domínio de ligação a motivos SH3 e um domínio de ligação a proteínas quinases. A isoforma a da proteína apresenta 464 resíduos de aminoácidos enquanto que a isoforma b apresenta 463..... 3
- Figura 3.** Estrutura com código PDB 1J5K. (A) Em destaque os principais resíduos do sítio de ligação do domínio KH3 que interagem com a sequência oligonucleotídica de ssDNA T1-C2-C3-C4-T5. (B) Modo de ligação da sequência oligonucleotídica T1-C2-C3-C4-T5 no domínio KH3 (representação do potencial de superfície eletrostática) da hnRNP K..... 5
- Figura 4.** Estrutura dos compostos da base de dados IResearch Library selecionados por triagem virtual..... 8
- Figura 5.** Estrutura dos compostos da base de dados Ilibdiverse selecionados por triagem virtual..... 8
- Figura 6.** Estrutura dos compostos da base de dados ChemBridge selecionados por triagem virtual..... 8
- Figura 7.** Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e ligantes. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 3- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60 ng); 4- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60 ng) + composto 9 (2 μ l/18,75 mM); 5- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60 ng) + composto 9 (2 μ l/1 mM); 6- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 9 (2 μ l/50 μ M); 7- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M). 22
- Figura 8.** Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e ligantes. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 3- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 4- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 11 (2 μ l/16,78 mM); 5- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60 ng) + composto 11 (2 μ l/50 μ M); 6- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 17 (2 μ l/ 12,88mM); 7- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 17 (2 μ l/50 μ M); 8-hnRNP K(1 μ l/12,25 μ M)..... 23
- Figura 9.** Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos orgânicos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 3- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 4- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60 ng) + composto 10 (2 μ l/14,12 mM); 5- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 10 (2 μ l/500 μ M); 6- hnRNP K

(1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0 µl/60ng) + composto 12 (2 µl/8,56 mM); 7- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 12 (2µl/500 µM); 8- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60 ng) + composto 13 (2 µl/12,13mM); 9- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 13 (2µl/500µM) 10- hnRNP K (1µl/12,25µM)..... 24

Figura 10. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 14 (2µl/11,26 mM); 5- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 14 (2 µl/500µM); 6- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 15 (2µl/13,47 mM); 7- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 15 (2µl/500µM); 8- 1µl da hnRNP K (1µl/12,25µM)... 25

Figura 11. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e ligantes. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular; 2- Só oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 3- hnRNPK (1µl/12,25 µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 4- hnRNPK (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 16 (2 µl/11,26 mM); 5- hnRNPK (1µl/12,25 µM) + CT2-30(2.0µl/60ng) + composto 16 (2µl/500µM); 6- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0 µl/60 ng) + composto 18 (2 µl/12,16 mM); 7- hnRNPK (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 18 (2µl/500µM); 8- hnRNP K (1µl/12,25µM). 25

Figura 12. Grupos de orientações apresentados pelo composto 11 no sítio ligante do domínio KH3 nas simulações de “docking”. 27

Figura 13. (A) Orientação 1 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável da carbonila no espaço. (B) Orientação 1 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático no espaço. (C) Orientação 3 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável da carbonila no espaço. (D) Orientação 3 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático no espaço. (E) Orientação 5 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável da carbonila no espaço. (F) Orientação 5 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático no espaço..... 28

Figura 14. Modo de ligação das orientações 1 (A), 3 (B) e 5 (C) obtidas por “docking” para o composto 11 no sítio ligante do domínio KH3, com destaque para as interações polares realizadas com os resíduos R40 e R59. 29

- Figura 15.** Grupos de orientações apresentados pelo composto 17 no sítio ligante do domínio KH3 nas simulações de “docking”. 30
- Figura 16.** (A) Orientação 1 do composto 17 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,0 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável das carbonilas do composto no espaço. (B) Orientação 1 do composto 17 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático do composto no espaço. 30
- Figura 17.** Modo de ligação do composto 17 com destaque para as interações polares com os resíduos R59 e K22 no sítio ligante do domínio KH3..... 31
- Figura 18.** (A) complexo solvatado da orientação 1 do composto 11 obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia em função do tempo (de simulação) gerada pela trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular..... 32
- Figura 19.** (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) dos átomos da orientação 1 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto 11 em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de confôrmeros do ligante obtidas durante a trajetória. 33
- Figura 20.** (A) Gráfico da distância da ligação de hidrogênio sugerida entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R40 em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 1 do composto 11 com o resíduo R40... 34
- Figura 21.** (A) complexo solvatado da orientação 3 do composto 11 obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia em função do tempo de simulação (dinâmica molecular) do complexo. 35
- Figura 22.** (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) dos átomos da orientação 3 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto 11, em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de confôrmeros do ligante obtidas durante a trajetória. 36
- Figura 23.** (A) Gráfico da distância da ligação de hidrogênio entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R59, durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 3 do composto 11 com o resíduo R59..... 37
- Figura 24.** (A) complexo solvatado da orientação 5 do composto 11 obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia em função do tempo gerada pela trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. 38
- Figura 25.** (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) dos átomos da orientação 5 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto 11 em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de confôrmeros do ligante obtidas durante a trajetória. 39

Figura 26. (A) Gráfico da distância da interação polar entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R59 durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Interação íon-dipolo proposta para a orientação 5 do composto 11 com o resíduo R59. (C) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) da distância da ligação de hidrogênio entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R40 durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (D) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 5 do composto 11 com o resíduo R40..... 40

Figura 27. Orientações 3 e 5 do composto 11 no domínio KH3 em comparação com o modo de ligação experimental do oligonucleotídeo TCCCT. 41

Figura 28. (A) complexo solvatado da orientação 1 do composto 17 obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia em função do tempo gerada pela trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. 42

Figura 29. (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em angstroms) dos átomos da orientação 5 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto 17 em função do tempo durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de conformeros do ligante obtidos durante a trajetória. 43

Figura 30. (A) Gráfico da distância da ligação de hidrogênio entre a carbonila do grupamento amida do ligante e o átomo de nitrogênio do resíduo R59 durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 1 do composto 17 com o resíduo R59. 44

Figura 31. Esquema da relação de formação dos possíveis metabólitos sugeridos a partir da estrutura do composto 11..... 45

Figura 32. Esquema da relação de formação dos possíveis metabólitos sugeridos a partir da estrutura do composto 17..... 48

Figura 33. Valores de absorbância, proporcionais ao nível de viabilidade celular, para cada amostra analisada dos compostos 11 e 17, controle de DMSO e controle de células.. 51

Figura 34. Níveis de redução da viabilidade celular observados para as amostras analisadas. 52

Figura 35. Estruturas dos compostos selecionados na base de dados EXPRESS-Pick com índice de Tanimoto maior que 0,7 em relação à estrutura do composto 11..... 54

Figura 36. Estruturas dos compostos selecionados na base de dados EXPRESS-Pick com índice de Tanimoto maior do que 0,7 em relação à estrutura do composto 17..... 55

Figura 37. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos orgânicos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular; 2- Só oligonucleotídeo CT2-30 (2µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 20 (2µl/500 µM); 5- 1ul da hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60 ng) + composto 20 (2µl/19,43 mM); 6- hnRNP K

(1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 21 (2µl/500 µM); 7- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 21 (2µl/ 12,72 mM); 8- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 28 (2µl/500 µM); 9- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 28 (2µl/25,94 mM) 10- hnRNP K (1µl/12,25µM)..... 57

Figura 38. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos orgânicos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular; 2- Só oligonucleotídeo CT2-30 (2µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2µl/60ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 23 (2µl/500µM); 5- 1ul da hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 23 (2µl/30,79 mM); 6- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2µl/60ng) + composto 27 (2µl/500 µM); 7- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0 ul/60 ng) + composto 27 (2µl/22,04mM); 8- hnRNP K (1µl/12,25µM)..... 58

Figura 39. Fragmentos moleculares dos compostos 11 e 17 submetidos ao procedimento de substituição bioisostérica. 59

Figura 40. Restrições moleculares utilizadas na busca de fragmentos compatíveis aos fragmentos 1-3 para a concepção de derivados dos compostos 11 e 17..... 60

Figura 41. Fragmentos capazes de substituir os fragmentos originais 1-3 na concepção de novos derivados dos compostos 11 e 17. 61

Figura 42. Possíveis modos de ligação de derivados do composto 11 gerados a partir da substituição dos fragmentos 1 ou 2 pelos fragmentos 4 (A), 9 (B) e 17 (C), 29 (D) com destaque para as ligações de hidrogênio ou interações iônicas realizadas pelos novos fragmentos..... 62

Figura 43. Etapas de síntese para produção do núcleo central nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina..... 64

Figura 44. Proposta de compostos a serem sintetizados com potencial atividade antitumoral. 64

Figura 45. Reação de obtenção do composto 40 a partir do álcool 2-aminobenzílico 66

Figura 46. Reação de obtenção do composto 41 a partir do composto 40. 67

Figura 47. Reação de obtenção do composto 42 a partir do composto 41. 67

Figura 48. Reação de obtenção do composto 43 a partir do composto 42. 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura primária das isoformas a e b do domínio KH3 da proteína hnRNP K. Em destaque estão os resíduos diferentes entre as duas isoformas na região C-terminal do domínio.....	4
Tabela 2. Estrutura dos potenciais metabólitos propostos a partir das biotransformações sugeridas partindo do composto 11.....	46
Tabela 3. Estrutura dos potenciais metabólitos propostos a partir de biotransformações sugeridas partindo do composto 11.....	49
Tabela 4. Análise de variância dos dados obtidos para a viabilidade celular dos tratamentos com os compostos 11 e 17 e controle de células e DMSO.	52
Tabela 5. Compostos pertencentes à base de dados EXPRESS-Pick que apresentaram índice de Tanimoto maior que 0,7 quando comparados com a estrutura do composto 11...	54
Tabela 6. Compostos pertencentes à base de dados EXPRESS-Pick que apresentaram índice de Tanimoto maior do que 0,7 quando comparados com a estrutura do composto 17.....	56
Tabela 7. Grupamentos toxicofóricos dos fragmentos sugeridos para a substituição dos fragmentos 1-3 na concepção de derivados dos compostos 11 e 17.....	63
Tabela 8. Dados referentes ao IC ₅₀ (μM) do composto 49 (mistura racêmica) e seus estereômeros isolados frente a linhagens de mama e cólon normais e neoplásicas.....	65
Tabela 9. Fragmentos sugeridos para substituição do grupo nitro dos derivados benzoxazepínicos acoplados a purinas.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADMET	Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”
EGFR	“Epidermal Growth Factor Receptor”
EMSA	“Electrophoretic Mobility Shift Assay”
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
LCQF	Laboratório Computacional de Química Farmacêutica
PDB	“Protein Data Bank”
PGHC	Projeto Genoma Humano do Câncer
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. <i>Genoma Câncer</i>	<i>1</i>
1.2. <i>Proteína hnRNP K.....</i>	<i>2</i>
1.3. <i>Câncer de cabeça e pescoço</i>	<i>6</i>
1.4. <i>Estratégias de planejamento de moléculas bioativas in silico</i>	<i>9</i>
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. <i>Ensaio de ligação com a proteína hnRNP K humana</i>	<i>14</i>
3.1.1. <i>Tampões</i>	<i>14</i>
3.1.1.1. <i>TBE 5X</i>	<i>14</i>
3.1.1.2. <i>TBE 1X</i>	<i>14</i>
3.1.1.3. <i>Tampão de ligação EMSA.....</i>	<i>14</i>
3.1.2. <i>Preparação dos compostos</i>	<i>14</i>
3.1.3. <i>Preparação do gel de acrilamida.....</i>	<i>14</i>
3.1.4. <i>Preparação das amostras</i>	<i>14</i>
3.1.5. <i>Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA).....</i>	<i>15</i>
3.1.6. <i>Revelação do gel.....</i>	<i>15</i>
3.2. <i>Simulações de “Docking”</i>	<i>15</i>
3.3. <i>Campos de Interação Molecular.....</i>	<i>16</i>
3.4. <i>Simulações de dinâmica molecular.....</i>	<i>16</i>
3.5. <i>Predições de metabolismo e toxicidade.....</i>	<i>17</i>
3.6. <i>Ensaio com cultura de células tumorais.....</i>	<i>17</i>
3.6.1. <i>Linhagem celular e condição de cultura</i>	<i>17</i>
3.6.2. <i>Ensaio de proliferação celular por MTT.....</i>	<i>17</i>
3.7. <i>Busca por similaridade.....</i>	<i>18</i>

3.8. Síntese de derivados de nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina acoplados a purinas.....	18
3.8.1. Reação 1: proteção do grupo hidroxila do álcool 2-aminobenzílico.....	18
3.8.2. Reação 2: proteção do grupo amino	19
3.8.3. Reação 3: Reação de Mitsunobu.....	19
3.8.4. Reação 4: desproteção do grupo silano	19
3.9. Substituições bioisostéricas	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
4.1. Ensaios de ligação in vitro com a proteína hnRNP K	21
4.2. Proposição dos modos de ligação para os compostos 11 e 17 por “docking”.....	26
4.3. Simulações de Dinâmica Molecular.....	31
4.4. Predições de metabolismo e toxicidade para os compostos 11 e 17	44
4.4.1. Composto 11	44
4.4.2. Composto 17	47
4.5. Ensaios com culturas de células	50
4.6. Busca por similaridade.....	53
4.7. Ensaios de ligação in vitro com a proteína hnRNP K – 2º etapa.....	56
4.8. Substituições bioisostéricas nos ligantes da hnRNP K	58
4.9. Síntese de derivados nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina acoplados a purinas	63
4.9.1. Reação 1: Proteção do grupamento hidroxila do álcool 2-aminobenzílico.....	66
4.9.2. Reação 2: proteção do grupo amino	67
4.9.3. Reação 3: Reação de Mitsunobu.....	67
4.9.4. Reação 4: desproteção do grupamento silano	68
4.9.5. Substituições bioisostéricas	69
5. CONCLUSÕES.....	72
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74

1. INTRODUÇÃO

1.1. Genoma Câncer

O Projeto Genoma Humano do Câncer (PGHC), financiado pela FAPESP e pelo Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer, buscou identificar os genes expressos nos tipos mais frequentes de câncer no Brasil. A fase de seqüenciamento terminou em 2001 e seu sucesso serviu de estímulo para que outras iniciativas fossem apoiadas e a bioinformática recebesse um grande impulso no país. O PGHC iniciou em abril de 1999 e conseguiu identificar, em menos de um ano, um milhão de seqüências de genes relacionados a neoplasias (REVISTA PESQUISA FAPESP, 2000). A contribuição brasileira foi maior para tumores de cabeça e pescoço, mama e colo-retal, e é qualitativamente importante porque a estratégia utilizada analisou prioritariamente a parte central dos genes, onde está concentrada a informação relevante para a síntese de proteínas (DUNHAN et al., 1999; de SOUZA et al., 2000).

Uma das iniciativas estimuladas pelo PGHC foi o projeto Genoma Clínico, o qual visa desenvolver novas formas de diagnóstico e tratamento do câncer a partir do estudo de genes expressos. Esse projeto envolve oncologistas e cirurgiões paulistas na análise dos genes expressos em quatro tipos de manifestação do câncer: as doenças linfoproliferativas, tumores gastrintestinais, tumores neurológicos e de cabeça e pescoço (REIS et al., 2005). Sua meta inclui a análise da expressão gênica em neoplasias humanas e a identificação de anomalias nos perfis de expressão que possam estar relacionadas a parâmetros clínicos e ao próprio comportamento biológico do câncer. A partir da análise molecular de tecidos saudáveis e neoplásicos em diferentes estágios, é possível identificar marcadores relacionados com as fases iniciais da transformação maligna e marcadores de prognóstico, que aumentam as chances de previsão da evolução do tumor, permitindo a escolha de terapias mais eficazes (DUNHAN et al., 1999). Um dos marcadores e atrativo alvo molecular para o planejamento de fármacos, descoberto recentemente, é a proteína hnRNP K, que está envolvida na gênese do câncer de cabeça e pescoço (LEOPOLDINO et al., 2007).

O conhecimento gerado por pesquisas sobre a função de genes que participam do processo de gênese tumoral tem permitido o desenvolvimento de fármacos e estudos clínicos correspondentes em diferentes neoplasias. Um exemplo é o fármaco erlotinibe (Tarceva®), utilizado no tratamento de câncer de pulmão. Erlotinibe inibe especificamente a enzima tirosina quinase do EGFR (“Epidermal Growth Factor Receptor”), bloqueando a cascata de sinais que é desencadeada pela interação entre receptor e ligante (GRIDELLI et al., 2007).

Na visão de Andrew Simpson – um inglês que reside há mais de uma década no Brasil e que esteve à frente de projetos de peso da ciência nacional, tais como o seqüenciamento do genoma da bactéria *Xylella fastidiosa* e o PGHC – desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, nos anos 50, o tratamento contra o câncer não mudou radicalmente, principalmente no que diz respeito à descoberta de fármacos contra a doença. Na opinião do pesquisador, o Brasil deveria investir em mais projetos que visem o desenvolvimento de medicamentos contra o câncer, ainda que os valores necessários para essa empreitada pareçam elevados. Segundo ele, o país pode e deve ter essa ambição, e acrescenta que não se pode esquecer que a verba investida no desenvolvimento de um fármaco não é gasta de uma só vez, mas ao longo de vários anos de pesquisa (REVISTA PESQUISA FAPESP, 2002).

1.2. Proteína hnRNP K

A especificidade das interações do tipo proteína-RNA se apresenta como o centro de regulação das atividades celulares. As interações do tipo proteína-RNA desempenham um importante papel na expressão gênica. A diversidade de processos dirigidos ao RNA não poderia ter emergido sem a evolução da seletividade desse tipo de interação. Existem poucos motivos de ligação ao RNA bem descritos, incluindo o domínio RNP, RGG “boxes”, “zinc fingers” e o domínio KH (“K homology”), embora o repertório de RNAs seja amplo (PAZIEWSKA et al., 2004).

Originalmente identificado na proteína hnRNP K, o domínio KH contém cerca de 70 resíduos de aminoácidos que se enovelam em um motivo conservado $\beta\alpha\beta\beta\alpha$, incluindo um “loop” invariável GXXG entre a primeira e a segunda α -hélices, e um “loop” de comprimento variável entre a segunda e terceira folhas β (Figura 1) [MUSUNURU; DARNELL, 2004]

Algumas das proteínas que possuem domínios KH mostram a capacidade de interagir com DNA de fita simples (ssDNA). Dentre estas se destacam as proteínas hnRNP K e DDP1. hnRNP K também mostra capacidade de se ligar a DNA de fita dupla (dsDNA). Estas proteínas apresentam vários domínios KH em sua estrutura, entretanto, não está evidente o papel dos vários domínios em uma única proteína (MUSUNURU; DARNELL, 2004; BOMSZTYK; DENISENKO; OSTROWSKI, 2004).

Figura 1. Configuração básica de um domínio KH, composto por 3 α -hélices, 3 folhas β , um “loop” de comprimento variável e um motivo rico em glicina (GXXG).

A proteína hnRNP K apresenta três domínios KH dispostos de maneira assimétrica, em que os domínios KH1 e KH2 estão na região N-terminal e o domínio KH3 na extremidade C-terminal. Outros domínios, relacionados a interações com outros parceiros moleculares (proteínas) e dispostos entre os domínios KH2 e KH3, como GRGG “box”, SH3 e um domínio de ligação a proteínas quinases, também podem ser evidenciados ao longo da estrutura da hnRNP K (Figura 2). Os Domínios KH são bastante conservados e também são encontrados em proteínas que se ligam a RNA em espécies como: *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae*. (PAZIEWSKA et al., 2004; BOMSZTYK et al., 1997).

A proteína hnRNP K é um tipo de proteína que sofre “splicing” alternativo (OSTROWSKI; BOMSZTYK, 2003). Dessa forma, já foram identificadas duas isoformas (a e b), as quais apresentam entre si uma pequena diferença na região C-terminal, ou seja, esta diferença é somente aplicável à região do domínio KH3 (Tabela 1), permanecendo o restante da proteína idêntico em relação a ambas isoformas.

Figura 2. Ilustração da disposição dos domínios presentes na hnRNP K. Além dos domínios KH, que se ligam a ácidos nucleicos, há a presença de domínios responsáveis por interações com outras proteínas, como GRGG “box”, um domínio de ligação a motivos SH3 e um domínio de ligação a proteínas quinases. A isoforma a da proteína apresenta 464 resíduos de aminoácidos enquanto que a isoforma b apresenta 463.

Tabela 1. Estrutura primária das isoformas a e b do domínio KH3 da proteína hnRNP K. Em destaque estão os resíduos diferentes entre as duas isoformas na região C-terminal do domínio.

Domínio KH3		Estrutura primária
Isoforma a		
(82		LGGPIITTQVTIPKDLAGSIIGKGGQRIKQIRHESGASIKIDEPLEGSED
aminoácidos)		RIITITGTQDQIQNAQYLLQNSVKQY ADVEGF
Isoforma b		
(81		LGGPIITTQVTIPKDLAGSIIGKGGQRIKQIRHESGASIKIDEPLEGSED
aminoácidos)		RIITITGTQDQIQNAQYLLQNSVKQY SGKFF

O domínio KH3 é capaz de se ligar a ácidos nucleicos como um domínio isolado, embora com menor afinidade quando comparado com a proteína na sua forma íntegra. Estruturas de complexos entre o domínio KH3 da hnRNP K e *ssDNA* ou RNA, resolvidas por ressonância magnética nuclear e difração de raios-X, encontram-se disponíveis no PDB (“Protein Data Bank”). Nesses complexos, é possível observar que o domínio KH3 forma uma fenda estreita e alongada, localizada na superfície da proteína, responsável pelo reconhecimento específico de oligonucleotídeos ricos em citosina, como por exemplo, 5’d-TATTCCT, 5’d-CTCCCC e 5’d-TTCCCCTCCCCATTT. Os oligonucleotídeos de *ssDNA* se acomodam nessa fenda, que apresenta caráter predominantemente hidrofóbico, justamente entre o motivo invariável GXXG e o “loop” variável. O sítio de reconhecimento molecular dos oligonucleotídeos está localizado na superfície dos domínios KH (Figura 3), e por ser relativamente estreito favorece a ligação de seqüências ricas em bases nitrogenadas pirimídicas (Figura 3B), principalmente citosina, dificultando o acesso de oligonucleotídeos ricos em bases púricas. A fenda é cercada por resíduos de aminoácidos com carga positiva (K31, K37, R40, K48 e R59) e outros resíduos hidrofílicos com grupos hidroxila ou carboxila (S27, S46 e E51). Já a região central, no interior da fenda, é composta por resíduos com características hidrofóbicas (I29, I36, I47, I49) [Figura 3A] {BRADDOCK et al., 2002; BACKE et al., 2005; BABER, et al., 1999}.

Figura 3. Estrutura com código PDB 1J5K. (A) Em destaque os principais resíduos do sítio de ligação do domínio KH3 que interagem com a sequência oligonucleotídica de ssDNA T1-C2-C3-C4-T5. (B) Modo de ligação da sequência oligonucleotídica T1-C2-C3-C4-T5 no domínio KH3 (representação do potencial de superfície eletrostática) da hnRNP K.

Os resíduos R40 e R59 são considerados chaves no reconhecimento das bases nitrogenadas presentes nos oligonucleotídeos (BRADDOCK et al., 2002; BACKE et al., 2005). Estudos prévios de “docking” e campos de interação molecular, realizados no Laboratório Computacional de Química Farmacêutica (LCQF) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) da Universidade de São Paulo (USP), confirmaram a importância destes dois resíduos de arginina não só no processo de reconhecimento de bases nitrogenadas pelo domínio KH3 como na manutenção de interações polares com potenciais ligantes (SILVA, 2008).

A proteína hnRNP K também interage com diversos parceiros moleculares protéicos, sendo encontrada nos diversos compartimentos celulares. A diversidade das interações da hnRNP K supõe que ela esteja envolvida nos múltiplos processos que compõem a expressão gênica, como: remodelagem de cromatina, transcrição, “splicing”, tradução e estabilização do mRNA. O envolvimento da hnRNP K no processo de expressão gênica tem sido demonstrado em diversos experimentos, que também sugerem que a proteína pode ativá-la ou reprimí-la (BOMSZTYK; DENISENKO; OSTROWSKI, 2004).

Interações específicas da hnRNP K com motivos de DNA já foram observadas, como por exemplo com o elemento CT. A proteína hnRNP K reconhece sequências homopirimídicas, especificamente citosina (CCCC), presentes no elemento CT, que se

encontra no promotor *c-Myc* P1. A expressão elevada de hnRNP K aumenta a atividade do promotor do gene *c-Myc*. O que de fato já é comprovado, é que a ativação inadequada do gene *c-Myc* contribui para o desenvolvimento de neoplasias em humanos (WATSON; PON; SHIU, 1991; BOMSZTYK; DENISENKO; OSTROWSKI, 2004). Acredita-se que este mecanismo esteja envolvido não só no desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço, como também na ativação do câncer de mama (OSTROWSKI; BOMSZTYK, 2003). Existem também evidências que sugerem o envolvimento da proteína hnRNP K como biomarcador em câncer colo-retal (CARPENTER et al., 2006).

1.3. Câncer de cabeça e pescoço

Defeitos na base do crânio, indicativos de carcinoma nasofaríngeo, uma das manifestações clínicas de câncer de cabeça e pescoço, foram descritos no Egito há pelos menos 5.000 anos atrás. O câncer de cabeça e pescoço é um termo associado a um grupo de doenças que acometem os tecidos presentes na cabeça e no pescoço, referindo-se, principalmente, aos originários nos lábios, cavidades nasal e oral, faringe, laringe e ouvido médio (McGURK; GOODGER, 2000).

O câncer de cabeça e pescoço era considerado incomum há alguns anos, mas dados recentes sugerem que o número de casos vem crescendo devido ao elevado consumo de álcool e tabaco por parte da humanidade. Estima-se que o Câncer de cabeça e pescoço seja a sexta maior causa de morte por câncer no mundo (RUIZ et al., 2006). Em 1998, 6.863 casos foram relatados na Inglaterra e no País de Gales. Os sítios de desenvolvimento mais comuns destes casos foram a laringe e a cavidade oral (BRADLEY; ZUTSHI; NUTTING, 2005). Segundo dados do INCA (Instituto Nacional do Câncer) [2007], as estimativas para o ano de 2008 para câncer de cavidade oral referiam-se a 14.160 casos novos no Brasil, sendo que destes 4.510 acometeriam habitantes do estado de São Paulo. Assim, o câncer de cabeça e pescoço apresenta impacto representativo na saúde da população brasileira.

O tratamento dos tipos de câncer de cabeça e pescoço varia de acordo com o local acometido e o estágio de desenvolvimento dos mesmos, bem como do estado físico do paciente. A excisão cirúrgica do tumor e a radioterapia são as ferramentas comumente empregadas nos estágios iniciais. Radioterapia e quimio-radioterapia, normalmente, são as ferramentas mais utilizadas em pacientes que sofrem de recorrência e, também, nos casos mais complicados (MARCU; DOORN; OLVER, 2003).

A quimioterapia utilizada como ferramenta isolada de tratamento, normalmente, apresenta resultados pobres, mostrando a necessidade de associação com radioterapia. Os

fármacos mais empregados são: cisplatina, doxorubicina, fluoruracil, vincristina, vimblastina, bleomicina e metotrexato (ALMEIDA et al., 2005; MARCU; DOORN; OLVER, 2003). Estes fármacos são inespecíficos e não conseguem distinguir diferenças bioquímicas significativas entre células neoplásicas de cabeça e pescoço e células saudáveis, apresentando, dessa forma, vários efeitos indesejáveis aos pacientes. Isso também ocorre pelo fato de não atuarem contra um alvo molecular representativo em câncer de cabeça e pescoço, o que contribui para a obtenção de resultados terapêuticos pobres.

A proteína hnRNP K, recentemente identificada como superexpressa em câncer de cabeça e pescoço, especialmente em língua e laringe, representa um novo e atrativo alvo terapêutico para esse tipo de câncer, podendo o planejamento de candidatos a fármacos dirigidos a essa proteína enriquecer o arsenal terapêutico contra a doença, tornando possível o uso de terapias farmacológicas mais eficientes e menos agressivas, não somente em câncer de cabeça e pescoço, mas, possivelmente, em câncer de mama e colo-retal, uma vez que, também, existem evidências do envolvimento da hnRNP K em suas gêneses (OSTROWSKI; BOMSZTYK, 2003; CARPENTER et al., 2006).

A presente proposta pode ser considerada como a continuação da dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas concluída no mês de abril de 2008, por Vinicius Barreto da Silva (doutorando do estudo corrente) na FCFRP/USP, com o seguinte título: Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes. Na dissertação de Mestrado em questão, vários aspectos a respeito da estrutura dos domínios KH e do modo de ligação das seqüências oligonucleotídicas foram levantados. A estratégia de triagem virtual foi utilizada na busca de potenciais ligantes para o domínio KH3 (Figuras 4-6), os quais constituem o ponto de partida para o desenvolvimento do presente trabalho, que se iniciou com a avaliação *in vitro* de algumas destas moléculas.

Figura 4. Estrutura dos compostos da base de dados IResearch Library selecionados por triagem virtual.

Figura 5. Estrutura dos compostos da base de dados Ilibdiverse selecionados por triagem virtual.

Figura 6. Estrutura dos compostos da base de dados ChemBridge selecionados por triagem virtual.

1.4. Estratégias de planejamento de moléculas bioativas in silico

Atualmente, o planejamento de moléculas bioativas baseado em estrutura e no mecanismo de ação é uma das estratégias mais utilizadas no desenvolvimento de novos fármacos, capaz de contribuir em todos os estágios do processo, desde a descoberta de protótipos, sua otimização (com respeito à afinidade, especificidade, seletividade, eficácia e efeitos adversos), até a elaboração de compostos candidatos a testes clínicos. A informação estrutural do bioreceptor e/ou ligantes permite a descoberta, seleção e síntese de compostos com complementaridade estérica, hidrofóbica e eletrostática ao seu sítio de ligação. O que torna ainda mais atrativo tal abordagem, quando utilizada com proteínas, é o fato de que 78% dos fármacos atuais têm como alvo terapêutico esse tipo de biomacromolécula (MARSHALL, 2004).

Desde a concepção do alvo biológico até a descoberta de um novo fármaco, um processo que pode levar em média uma década ou até mais, a bioinformática em conjunto com a química computacional oferecem um excelente direcionamento no planejamento de fármacos, já com inúmeros casos de sucesso onde as simulações computacionais tiveram algum papel durante a concepção de moléculas bioativas (MARSHALL, 2004; PEITSCH, 2004).

Em química computacional, também denominada modelagem molecular, destaca-se o “docking” molecular como um dos métodos mais empregados. As simulações de “docking” investigam as possíveis orientações que determinada molécula assume no interior do sítio ligante de um bioreceptor (KITCHEN et al., 2004). Os métodos de “docking”, em geral, envolvem uma função de energia contendo parâmetros eletrostáticos, de van der Waals, de ligações de hidrogênio e, algumas vezes, hidrofóbicos, os quais geram modelos matemáticos que predizem as orientações e conformações mais estáveis que um ligante adota no seu sítio receptor. As mais recentes versões de alguns dos programas de maior sucesso em “docking”, como FlexE (CLAUSSEN et al., 2001) e GOLD (VERDONK et al., 2003), consideram a flexibilidade do ligante e também de algumas cadeias laterais do sítio receptor. Os mais recentes métodos de “docking” utilizam informação farmacofórica do sítio receptor para guiar as simulações, tais como o FlexX-Pharm (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY et al., 2006) e GLUE (SCIABOLA et al., 2006). Uma das aplicações do “docking” é na triagem virtual, em que uma infinidade de moléculas é avaliada quanto às suas possíveis interações com a estrutura do alvo molecular e as mais promissoras priorizadas para a realização de testes biológicos (GRIFFITH et al., 2005).

A triagem virtual também pode ser realizada sem a utilização da estrutura do receptor, o que caracteriza o planejamento de fármacos baseado em ligantes (GRIFFITH et al., 2005). Dentre as estratégias baseadas em ligantes destaca-se a busca por similaridade, por sua simplicidade e rapidez. Através de um método de busca por similaridade é possível selecionar em bases de dados virtuais de compostos, os mais similares, do ponto de vista estrutural, a um fármaco ou molécula bioativa já conhecida. A triagem por similaridade parte do princípio de que moléculas similares podem apresentar propriedades similares, estendendo este conceito para atividade biológica. Dois componentes principais são utilizados para mensurar uma similaridade estrutural entre duas entidades químicas. O primeiro é a representação estrutural, usada para caracterizar as moléculas, o segundo é o coeficiente de similaridade, o qual quantifica o grau de semelhança entre os pares de moléculas (WILLETT, 2003). O índice de Tanimoto é, atualmente, o coeficiente de similaridade mais empregado em buscas por similaridade (BALDI; NASR, 2010).

Quando compara duas moléculas, o coeficiente de Tanimoto gera valores na faixa de 0, quando não há nenhuma similaridade, a 1, quando a molécula é comparada a ela mesma. O coeficiente de Tanimoto (CT) pode ser calculado (Equação 1) através do número de bits observados para uma molécula A e uma molécula B, além dos bits em comum apresentados por ambas (C). Cada “bit” representa nada mais que um “fingerprint”, ou seja, a presença de uma característica estrutural inerente à constituição da molécula (WILLETT, 2006).

$$CT = \frac{C}{A + B - C} \quad \text{Equação 1}$$

Outra estratégia com diversas aplicações em projetos de desenvolvimentos de moléculas bioativas consiste em investigar as condições energéticas entre moléculas as quais se aproximam uma da outra, gerando os campos de interação molecular (SILVA; ALMEIDA; SILVA, 2011). Os campos de interação molecular descrevem a variação da energia de interação entre uma molécula alvo e um grupo químico de prova que se move confinado no interior de uma grade 3D, a qual é posicionada de modo a mapear a região de interesse do alvo molecular (o sítio receptor). No decorrer do procedimento, o grupo de prova é movido sistematicamente através dos pontos regulares da grade. A cada ponto alcançado a energia de interação entre o grupo de prova e o alvo molecular é calculada. (GOODFORD, 1985). A energia de interação não-covalente E_{xyz} (Equação 2), que envolve o somatório das energias

eletrostática (E_{el}) de ligação de hidrogênio (E_{hb}) e de van der Waals (E_{lj} ; potencial de Lennard-Jones), é calculada a cada coordenada x, y e z. As diferentes provas que usualmente são testadas refletem as características químicas que deveriam possuir o ligante ideal ou fragmentos de sua estrutura. Os programas de uso mais freqüente que empregam tal método são o GRID (GOODFORD, 1985; WADE; GOODFORD, 1993; WADE; CLARK; GOODFORD, 1993; CAROSATI; SCIABOLA; CRUCIANI, 2004), o VolSurf (CRUCIANI; PASTOR; GUBA, 2000) e o Almond (PASTOR et al., 2000).

$$E_{xyz} = \sum E_{lj} + \sum E_{el} + \sum E_{hb} \quad \textbf{Equação 2}$$

Durante o desenvolvimento de moléculas bioativas também já é possível estimar propriedades farmacocinéticas *in silico*, bem como propriedades “drug-like” de diferentes compostos, priorizando, durante as diversas etapas do planejamento, aqueles com maior potencial de se tornarem fármacos. Como exemplo mais simples, a ‘Regra dos 5’ (RO5) de Lipinski, preconiza que os fármacos que apresentam biodisponibilidade por via oral, em geral, apresentam peso molecular menor ou igual a 500, log *P* menor ou igual a 5, número de grupos doadores de ligações de hidrogênio menor ou igual a 5 e número de grupos aceptores de ligações de hidrogênio menor ou igual a 10 (LIPINSKI et al., 1997). Citações no CAS *SciFinder* do artigo original da RO5, de 1997, excederam 1000 somente no ano de 2004 (LIPINSKI, 2004). Além disso, novas regras empíricas vêm sendo descritas, tais como o número de ligações rotacionáveis em fármacos ser menor do que 8 ou, ainda, a área superficial ser menor ou igual a 140 Å² (MARSHALL, 2004).

Propriedades tais como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) podem ser preditas através da utilização de métodos estatísticos, a partir de triagem em bases de dados contendo essas informações, as quais são computadas para uma grande variedade de compostos bioativos de interesse farmacêutico (TESTA et al., 2005). Dentre os programas mais utilizados para tal finalidade, destacam-se o MCASE (SNYDER et al., 2004), METEOR (TESTA et al., 2005) e DEREK (SANDERSON; EARNSHAW, 1991; RIDINGS et al., 1996).

A grande maioria das predições de toxicidade de compostos *in silico* é baseada na avaliação da relação entre estrutura química e atividade biológica e podem identificar riscos potenciais à saúde humana inerentes à constituição química dos compostos avaliados. Os métodos preditivos podem ser divididos em qualitativos e quantitativos. Os sistemas

qualitativos realizam previsões que podem confirmar ou descartar o tipo de risco avaliado. De maneira mais complexa, os métodos quantitativos se utilizam da aplicação de modelos matemáticos e tentam encontrar uma correlação entre estrutura química (gerada por descritores derivados de certas propriedades moleculares) e o nível de efeito tóxico exibido pelas entidades químicas (RIDINGS et al., 1996; SIMON-HETTICH; ROTHFUSS; STEGER-HARTMANN, 2006).

Os métodos de predição de toxicidade *in silico* surgem como uma importante ferramenta alternativa na seleção e priorização de moléculas promissoras que devem ser avaliadas com maior cautela em testes experimentais de toxicidade, reduzindo, sobremaneira, os custos financeiros inerentes ao processo de planejamento de fármacos e, também, o uso indiscriminado de animais em testes pré-clínicos, satisfazendo, assim, as precauções em relação à toxicidade desde as etapas iniciais do desenvolvimento de moléculas com interesse farmacêutico.

2. OBJETIVOS

Os objetivos gerais do trabalho de investigação corrente estão voltados para a seleção e otimização de ligantes da proteína hnRNP K, como processo integrante do planejamento de novos candidatos a fármacos antitumorais. O processo de seleção envolve tanto os aspectos moleculares das interações com o domínio KH3 da proteína, quanto às propriedades ADMET dos ligantes propostos, objetivando o planejamento de protótipos que apresentem além de uma ligação efetiva com o sítio ligante da proteína, um perfil farmacocinético adequado e baixos níveis de toxicidade. Os objetivos específicos do trabalho consistem em:

- Realizar ensaios biológicos com potenciais ligantes, buscando verificar sua capacidade de impedir a ligação natural do DNA aos domínios KH da hnRNP K *in vitro*.
- Verificar se os compostos ativos *in vitro* são eficientes em reduzir a viabilidade de células de carcinoma de língua.
- Busca de potenciais ligantes através da realização de simulações de triagem virtual, utilizando a estratégia de busca por similaridade, usando como molde as estruturas dos ligantes identificados *in vitro*, visando complementar e diversificar o conjunto de ligantes descritos da hnRNP K.
- Propor, através da combinação das estratégias de “docking”, campos de interação molecular e dinâmica molecular, possíveis modos de ligação para as moléculas bioativas no domínio KH3 da hnRNP K.
- Estimar *in silico* a formação de metabólitos e o perfil de toxicidade das moléculas bioativas.
- Explorar a estrutura dos compostos bioativos na proposição de novos derivados otimizados aplicando a estratégia de substituições bioisostéricas.
- Sintetizar potenciais agentes antineoplásicos com o núcleo nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina acoplados a purinas, os quais apresentam um mecanismo distinto do observado para os ligantes da hnRNP K.
- Explorar a estrutura dos derivados nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina acoplados a purinas na proposição de novos derivados com toxicidade reduzida aplicando a estratégia de substituições bioisostéricas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Ensaios de ligação com a proteína hnRNP K humana

3.1.1. Tampões

3.1.1.1. TBE 5X

A solução TBE 5X é composta por 0,445 M de Tris, 0,445 M de ácido bórico e 0,01 M de EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético).

3.1.1.2. TBE 1X

A solução TBE 1X é preparada através da diluição de TBE 5X em água mili-Q em uma proporção 1:5.

3.1.1.3. Tampão de ligação EMSA

O tampão de ligação EMSA é composto por uma mistura de 750 mM de cloreto de potássio, 0,5 mM de EDTA, 50 mM de Tris em pH 7,4 e 0,5 mM de DTT (ditiotretitol) adicionado na hora do uso.

3.1.2. Preparação dos compostos

Os compostos adquiridos comercialmente e testados *in vitro* com a proteína hnRNP K foram solubilizados em DMSO 99,9%.

3.1.3. Preparação do gel de acrilamida

Cada gel de acrilamina para realização do ensaio de mobilidade eletroforética foi preparado adicionando-se 2,6 mL de água destilada, 1,2 mL de acrilamida a 30%, 100 µL de glicerol, 1 mL de tampão TBE 5X, 50 µL de persulfato de amônio a 10% e finalizando com 5 µL de TEMED (tetrametiletilenodiamina). A solução preparada foi misturada e adicionada entre as placas de vidro, previamente montadas em um sistema com espaçadores, e mantida em repouso até a polimerização do gel.

3.1.4. Preparação das amostras

As reações com os compostos foram preparadas com a adição de 3 µL de água mili-Q, 2 µL de tampão de ligação EMSA, 1 µL (630 ng) de hnRNP K purificada, 2 µL de cada

composto em suas respectivas concentrações e, por fim, 2 μ L (60 ng) de oligonucleotídeo CT2-30 (AGCTAACCCCTCCCCAGATCAAGCCTGCGATGATTTATACTCACAGCCCTC CCCATAG) [TOMONAGA; LEVENS, 1995] seguida de homogeneização. O controle de oligonucleotídeo foi montado com apenas a adição de 6 μ L de água mili-Q, 2 μ L de DMSO 99,9% e 2 μ L (60 ng) de oligonucleotídeo CT2-30, seguida de homogeneização. O controle da reação oligonucleotídeo-proteína foi preparado com a adição de 3 μ L de água mili-Q, 2 μ L de DMSO 99,9%, 2 μ L de tampão de ligação EMSA, 1 μ L de hnRNP K purificada (630 ng) e 2 μ L de oligonucleotídeo CT2-30. O controle de proteína foi preparado com a adição 7 μ L de mili-Q, 2 μ L de tampão de ligação EMSA e 1 μ L (630 ng) de hnRNP K purificada. Após a preparação de cada reação e dos respectivos controles já supracitados sucedeu-se incubação por 20 minutos a 0°C.

3.1.5. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA)

Após a polimerização do gel, as placas de vidro foram transferidas para a cuba de eletroforese. Aos produtos das reações com os compostos, controle do oligonucleotídeo, controle da reação proteína-oligonucleotídeo e controle de proteína foram adicionados 2 μ L de tampão EMSA e posteriormente aplicados nas diferentes canaletas do gel, além da adição prévia do peso molecular na primeira canaleta. Após a aplicação das amostras a cuba foi imersa em tampão de corrida (TBE 1X) e submetida a uma voltagem de 120 V por, aproximadamente, 40 minutos.

3.1.6. Revelação do gel

Após a realização do ensaio de mobilidade eletroforética, o gel foi retirado da cuba e imerso em 50 mL de tampão TBE 1X em recipiente plástico, seguido de adição de 5 μ L do corante SYBR[®] Gold (Invitrogen). O gel foi mantido em agitação constante por 20 minutos. A visualização das bandas oligonucleotídicas coradas pelo SYBR[®] Gold foi realizada em luz ultravioleta.

3.2. Simulações de “Docking”

As simulações de “docking” foram realizadas com o “software” GOLD 3.1.1 (VERDONK ET AL., 2003) para o domínio KH3 da proteína hnRNP K, com o intuito de propor um modo de ligação para os compostos ativos nos ensaios *in vitro* com a proteína. A estrutura do domínio KH3 foi obtida através do PDB (código 1J5K).

A base metodológica do “software” GOLD é a execução de simulações de “docking” flexível utilizando um algoritmo genético (VERDONK et al., 2003). Dentre os parâmetros disponíveis no programa, foi utilizada uma população equivalente a 100 confôrmeros, 100.000 operações, 95 mutações e 95 “crossovers”. Os cálculos de “docking” foram realizados dentro de uma esfera de raio de 15 Å, tendo como centro o átomo de carbono delta 1 da cadeia lateral do resíduo de I49. A estrutura com código PDB 1J5K foi resolvida por ressonância magnética nuclear, e as orientações de seus átomos de hidrogênio foram então consideradas para realização das simulações.

As 15 orientações de maior escore para cada composto, em relação ao domínio KH3, foram selecionadas através da função GoldScore. Com base nessa função, são classificadas as orientações das moléculas avaliadas de acordo com um padrão de afinidade (escore), do ponto de vista de estabilidade energética, em relação ao sítio ligante da proteína. As orientações que apresentaram RMSD de superposição menor do que 2.0 Å foram agrupadas e consideradas equivalentes.

3.3. Campos de Interação Molecular

Os campos de interação molecular foram gerados com o “software” GRID 22b (GOODFORD, 1985; WADE; CLARK; GOODFORD, 1993; WADE; GOODFORD, 1993; CAROSATI, SCIABOLA; CRUCIANI, 2004) para a estrutura do domínio KH3 com os grupos de prova: oxigênio de carbonila, carbono aromático, flúor e nitrogênio de amida.

3.4. Simulações de dinâmica molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas com o módulo Discover_3 do pacote computacional Insight II (Accelrys, 2005) para os ligantes da hnRNP K identificados *in vitro*. As geometrias iniciais dos ligantes e do domínio KH3 foram as obtidas nas simulações de “docking”. Os complexos foram solvatados com oito camadas de moléculas de água, totalizando cerca de 400 moléculas. As cargas e potenciais foram atribuídos para os átomos do complexo utilizando o campo de força CVFF – “Consistent Valence Force Field” (DAUBER-OSGUTHORPE, et al., 1988), seguido pelo processo de minimização de energia dos complexos solvatados ligante-KH3. As energias dos complexos foram minimizadas utilizando 1.500 passos de um protocolo combinado de algoritmos steepest descent/gradiente conjugado. Para cada complexo analisado foi gerada uma trajetória, com um tempo simulado de 2 ns a uma temperatura constante de 298 K. As coordenadas do sistema foram salvas a cada 0,001 ns do tempo simulado, gerando, assim, 2.000 “snapshots” para a trajetória de cada

complexo. Para cada trajetória foram analisados os valores de energia total do sistema, o RMSD da conformação dos ligantes e o RMSD da distância entre as ligações de hidrogênio formadas entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos do domínio KH3.

3.5. Predições de metabolismo e toxicidade

O programa Meteor (TESTA et al., 2005; LHASA, 2007) foi usado na proposição de rotas de biotransformação para os compostos que se mostraram ativos nos ensaios de ligação com a proteína hnRNP K. As simulações incluíram reações de biotransformação de fases I e II processadas até a 3^o geração de metabólitos, em que a maioria das moléculas já são suficientemente hidrofílicas para serem excretadas. A base de dados de biotransformações selecionada para análise compreende reações metabólicas de mamíferos. A análise toxicofórica foi realizada com o programa Derek (LHASA, 2007), o qual utiliza modelos baseados nas estruturas químicas dos compostos e as correlaciona a possíveis riscos de toxicidade, incluindo: carcinogenicidade, mutagenicidade, genotoxicidade, sensibilização de pele, teratogenicidade, irritação das vias aéreas, hepatotoxicidade, neurotoxicidade, dano cromossômico, bloqueio de canais hERG e toxicidade ocular. Derek identifica grupos toxicofóricos presentes em substâncias químicas através de um sistema “knowledge-based” que realiza correlação estrutura química-toxicidade, lançando mão de uma base de dados construída com dados da literatura pertinente (SANDERSON; EARNSHAW, 1991; RIDINGS et al., 1996; GREENE et al., 1999).

3.6. Ensaio com cultura de células tumorais

3.6.1. Linhagem celular e condição de cultura

A linhagem celular NIH WSU-HN13 (CARDINALLI et al., 1995) [origem: carcinoma de língua; estadiamento: T2N2M0] foi cultivada em meio DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de penicilina e estreptomicina, e mantidas em incubadora umidificada à 5% de CO₂ a 37 °C.

3.6.2. Ensaio de proliferação celular por MTT

O método é baseado no uso do corante MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol] que indica a atividade mitocondrial, a qual é diretamente proporcional ao número de células vivas e metabolicamente saudáveis (COLLIER; PRITSOS, 2003).

O crescimento das células foi realizado em placas de 96 poços (5000 células em 200 μL de meio) e após 24 horas as células foram incubadas com os compostos por 1 e 24 horas. Após a incubação foram adicionados 20 μL de MTT, seguindo nova incubação por 4 horas na estufa de CO_2 a 37 °C sob proteção de luz. Após incubação com MTT, o meio foi retirado, seguindo adição de 200 μL de DMSO, para dissolver os cristais “purple MTT-formazan”, e 25 μL de tampão glicina 0,2 M (pH 10,6). A leitura em leitor de microplacas foi realizada a 570 nm. Um poço contendo somente reagentes foi utilizado como controle de branco da reação. O controle de células foi estabelecido nas mesmas condições exceto pela adição dos compostos. O controle com DMSO foi estabelecido, também, sem a adição dos compostos, mas com o solvente em concentração final de 0,5 %. Os experimentos foram realizados em quadruplicata e os valores de absorvância obtidos são frutos da média calculada para as quatro repetições.

3.7. Busca por similaridade

O procedimento de busca por similaridade foi realizado com o servidor BindindDB (Liu et al., 2007), usando o índice de Tanimoto para a triagem das sub-coleções de compostos DIVERSet, CNSSet e MWSet da base de dados EXPRESS-Pick, com o intuito de selecionar análogos dos compostos previamente identificados como ligantes da proteína hnRNP K em ensaios *in vitro*. A partir da estrutura química dos compostos ativos, foram filtrados na base de dados os mais bem ranqueados com índice de Tanimoto igual ou superior a 0,7.

3.8. Síntese de derivados de nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina acoplados a purinas

3.8.1. Reação 1: proteção do grupo hidroxila do álcool 2-aminobenzílico

A reação de proteção do grupamento hidroxila do álcool 2-aminobenzílico (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004; COREY; VENKATESWARLU, 1972; XU et al., 2005) se procedeu através da dissolução de 0,1 equivalentes do reagente DMAP e 3 equivalentes de cloreto de *t*-butildimetilsilano em CH_2Cl_2 . Em seguida, 1 equivalente de álcool 2-aminobenzílico foi adicionado à solução, além de um incremento de CH_2Cl_2 para dissolução total. Ao final, aproximadamente 3 equivalentes de TEA foram adicionados ao sistema, que permaneceu em agitação à temperatura ambiente por 6 horas. A mistura final foi diluída em CH_2Cl_2 , lavada três vezes em água destilada, seca com Na_2SO_4 e, posteriormente, filtrada. A mistura obtida foi purificada através de cromatografia por coluna [acetato de etila : hexano (1:12)], fornecendo o composto **40** com um rendimento de 73%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 7,19-7,04 (m, 2H, Ph), 7,04-6,96 (m, 2H, Ph), 4,62 (s, 2H, CH_2), 0,85 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0,01 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$].

3.8.2. Reação 2: proteção do grupo amino

A reação proteção do grupamento amino (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004) se procedeu após dissolução de 0,5 equivalentes de cloreto de 4-nitrobenzenosulfonila em uma solução do composto **40** em CH_2Cl_2 a 3 mL/mmol. A reação permaneceu em agitação a temperatura ambiente durante 5 horas e a mistura final lavada três vezes com água destilada e submetida ao procedimento de secagem com Na_2SO_4 e, posteriormente, filtrada. A mistura obtida foi purificada através de cromatografia por coluna [acetato de etila : hexano (1:50) / acetato de etila : hexano (1:30)], fornecendo o composto **41** com rendimento de 51%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 8,66 (s, 1H, NH), 8,24 (d, $J=7,9$, 2H, SO_2PhNO_2), 7,93 (d, $J=7,9$, 2H, SO_2PhN), 7,53-7,50 (m, 1H, NPhC), 7,30-7,23 (m, 1H, NHPhCH_2), 7,10-6,98 (m, 2H, NArC), 4,33 (s, 2H, CH_2), 0,90 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0,06 (s, 6H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$).

3.8.3. Reação 3: Reação de Mitsunobu

A reação de Mitsunobu (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004; GROCHOWSKI et al., 1982) se procedeu após a dissolução de 1 equivalente do composto **41**, um equivalente de dimetilhidroxiacetaldeído acetal e 1,2 equivalentes de trifenilfosfina em THF (5 mL/mmol do composto **41**), utilizado sob atmosfera de argônio. A esta solução foi posteriormente adicionado 1,1 equivalentes de DIAD, gota a gota a uma temperatura de -20°C , permitindo a elevação da temperatura até 5°C , seguida de aquecimento até 30°C . A solução resultante foi mantida em agitação por 21 horas, seguido de remoção do solvente em vácuo. O resíduo obtido foi purificado através de cromatografia por coluna [acetato de etila : hexano (1:50) : acetato de etila : hexano (1:20)], fornecendo o composto **42** com rendimento de 69%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 8,32 (d, $J=8,8$, 2H, SO_2PhNO_2), 7,83 (d, $J=8,8$, 2H, SO_2PhNO_2), 7,69 (d, $J=7,7$, 1H), 7,38 (t, $J=7,5$, 1H), 7,10 (t, $J=7,4$, 1H), 6,42 (d, $J=7,5$, 1H), 4,99 (d, $J=14,4$, 1H, OCH_2), 4,93 (d, $J=14,4$, 1H, OCH_2), 4,36 (dd, $J=5,5/5,7$, 1H, CH), 3,84 (dd, $J=14,0/5,5$, 1H, NCH_2), 3,41 (dd, $J=5,7$, 1H, NCH_2), 3,32 (s, 3H, OCH_3), 3,15 (s, 3H, OCH_3), 0,96 (s, 9H, $(\text{CH}_3)_3\text{C}$), 0,14 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$), 0,13 (s, 3H, $(\text{CH}_3)_2\text{Si}$).

3.8.4. Reação 4: desproteção do grupo silano

A reação de desproteção do grupo silano (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004; COREY; VENKATESWARLU, 1972) foi realizada através de uma solução do composto **42** em THF (6 mL/mmol) que foi mantida em agitação, à qual foi adicionado 1 equivalente de TBAF monohidratado. A mistura foi mantida em agitação por aproximadamente 1 h. O solvente foi

removido em vácuo e o resíduo resultante dissolvido em CH_2Cl_2 e lavado por 3 vezes com água. Posteriormente, a fração orgânica foi secada em Na_2SO_4 . O resíduo obtido foi purificado através de cromatografia por coluna [acetato de etila : hexano (1:10) : acetato de etila : hexano (1:2)], fornecendo o composto **43** com rendimento de 98%.

^1H RMN (CDCl_3 , 300 MHz): δ (ppm) 8,34 (d, $J=8,9$, 2H, SO_2PhNO_2), 7,81 (d, $J=8,9$, 2H, SO_2PhNO_2), 7,64 (dd, $J=7,7/1,6$, 1H), 7,39 (ddd, $J_1=J_2=7,6$, $J_3=1,1$, 1H), 7,16 (ddd, $J_1=J_2=7,7$, $J_3=1,6$, 1H), 6,36 (dd, $J=8,0/0,9$, 1H), 4,94 (dd, $J=12,4/6,7$, 1H, OCH_2), 4,69 (dd, $J=6,7$, 1H, OCH_2), 4,43 (dd, $J=5,9/5,6$, 1H, CH), 4,01 (dd, $J=14,0/5,9$, 1H, NCH_2), 3,38 (s, 3H, OCH_3), 3,35 (dd, 1H, OH), 3,24 (dd, $J=5,6$, 1H, NCH_2), 3,09 (s, 3H, OCH_3).

3.9. Substituições bioisostéricas

As substituições bioisostéricas *in silico* foram realizadas com o programa BROOD (OpenEye., 2010) a partir dos fragmentos das moléculas-protótipo selecionados, os quais se deseja substituir. A busca por potenciais bioisósteros foi realizada com a bases de dados interna de fragmentos do próprio programa, a qual contém aproximadamente 4 milhões de fragmentos de moléculas “drug-like”. Para as buscas, foram selecionados os parâmetros de similaridade de forma e eletrostática aos fragmentos originais, com o limite mínimo de índice de Tanimoto estabelecido em 0,6.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Ensaios de ligação *in vitro* com a proteína hnRNP K

Considerando os 18 compostos selecionados *in silico* (Figuras 4-6), identificados previamente como potenciais inibidores da atividade da proteína hnRNP K por apresentarem características moleculares que favoreçam a manutenção de interações com o domínio KH3, 10 destes (compostos **9-18**; Figura 6) foram adquiridos comercialmente da base de dados ChemBridge e testados em ensaios de ligação com a proteína hnRNP K purificada, cedida através de colaboração com a Prof. Dra. Andréia Machado Leopoldino, do Laboratório de Bioquímica Clínica da FCFRP/USP.

Os resultados aqui apresentados remetem ao ensaio de mudança de mobilidade eletroforética (EMSA), com o intuito de observar a migração de um oligonucleotídeo específico para a proteína hnRNP K. Nota-se que o método empregado cora as moléculas oligonucleotídicas e quando as mesmas encontram-se em complexo com a proteína hnRNP K, sua migração é retardada pelos poros do gel e as bandas se posicionam na região superior do mesmo. Quando o oligonucleotídeo é deslocado por um inibidor, por exemplo, a sua migração não é retardada, pois o mesmo está livre e pode atravessar os poros de maneira mais rápida. Assim, as bandas se apresentam na região inferior do gel. O objetivo do ensaio de ligação é o de verificar quais moléculas são capazes de impedir a ligação natural da hnRNP K ao DNA.

A Figura 7 indica o gel revelado e obtido para a reação em três concentrações distintas do composto 9 e a proteína hnRNP K com o seu oligonucleotídeo específico. Percebe-se que durante essas três reações (canaletas 4-6) houve a formação de bandas do oligonucleotídeo na região superior do gel, ou seja, o mesmo perfil de mobilidade observado para o controle da reação oligonucleotídeo - proteína (canaleta 3), onde não há presença de ligantes. Assim, observa-se que o composto 9 não foi capaz de impedir a formação do complexo ssDNA-hnRNP K.

Figura 7. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA e ligantes. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60 ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0 µl/60 ng) + composto 9 (2 µl/18,75 mM); 5- hnRNPK (1µl/12,25uM) + CT2-30 (2.0 µl/60 ng) + composto 9 (2 µl/1 mM); 6- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0 µl/60ng) + composto 9 (2µl/50 µM); 7- hnRNP K (1µl/12,25µM).

Na presença dos compostos **11** e **17** (Figura 8), é possível observar uma alteração consistente em relação ao deslocamento e mobilidade do oligonucleotídeo quando os compostos foram adicionados à reação (canaletas 4-7). Percebe-se nessas canaletas um perfil completamente diferente do encontrado na canaleta 3, em que apenas a proteína e oligonucleotídeo estavam presentes no meio. Assim, na canaleta 3, sem interferência de qualquer inibidor, as bandas correspondentes às moléculas oligonucleotídicas se apresentam na região superior do gel, pois as mesmas estão complexadas com a proteína. Com a adição dos compostos nas canaletas 4-7, houve um deslocamento das moléculas oligonucleotídicas para a região inferior do gel, confirmando, assim, que os mesmos impediram a formação do complexo ssDNA-hnRNP K. Dessa forma, os compostos **11** e **17** foram identificados como ligantes da hnRNP K *in vitro*. É importante ressaltar que a atividade desses dois compostos foi identificada em faixa de concentração da ordem de µM, o que estabelece um grau de potência considerável e os torna bons protótipos para investigações posteriores, bem como síntese de derivados.

Figura 8. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de *ssDNA* e ligantes. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 µl/60ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0 µl/60ng) + composto 11 (2 µl/16,78 mM); 5- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0 µl/60 ng) + composto 11 (2 µl/50 µM); 6- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0 µl/60ng) + composto 17 (2 µl/ 12,88mM); 7- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0 µl/60ng) + composto 17 (2 µl/50 µM); 8-hnRNP K (1µl/12,25µM).

O gel obtido para o ensaio de ligação realizado para os compostos **10**, **12** e **13** (Figura 9) revelou que nenhum dos mesmos foi capaz de impedir a ligação do oligonucleotídeo à hnRNP K. No ensaio de mobilidade eletroforética fica evidente que em todas as amostras contendo os compostos, hnRNP K e DNA (canaletas 4-9), as bandas correspondentes ao DNA se encontram na região superior do gel, fato que confirma a sua ligação à proteína, a qual tem dificuldade de transpassar os poros do gel e fica retida em sua porção superior. O controle de ligação *ssDNA*-hnRNP K (canaleta 3) apresenta o mesmo padrão de posicionamento das bandas que correspondem ao DNA. A menor concentração utilizada para cada composto no ensaio foi de 500 µM, correspondendo a uma concentração final de 200 µM no meio. Como nenhum dos compostos foi ativo nesta concentração, concentrações inferiores não foram investigadas.

Figura 9. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos orgânicos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0 µl/60 ng) + composto 10 (2µl/14,12 mM); 5- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 10 (2µl/500 µM); 6- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0 µl/60ng) + composto 12 (2 µl/8,56 mM); 7- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 12 (2µl/500 µM); 8- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60 ng) + composto 13 (2 µl/12,13mM); 9- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 13 (2µl/500µM) 10- hnRNP K (1µl/12,25µM).

Em relação aos compostos **14**, **15**, **16** e **18** (Figuras 10 e 11), o mesmo fenômeno foi observado, ou seja, a formação do complexo hnRNP K – ssDNA nas amostras em que os compostos químicos foram adicionados (canaletas 4-7). O posicionamento das bandas apresentado para as amostras contendo o ligante, na região superior do gel, foi semelhante ao encontrado para o controle de ligação hnRNP K – DNA (canaleta 3). Assim, fica evidente que os compostos investigados não conseguem impedir a formação do complexo entre proteína e DNA. Dessa forma, não foram investigadas concentrações inferiores.

Figura 10. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 3- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 4- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 14 (2 μ l/11,26 mM); 5- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 14 (2 μ l/500 μ M); 6- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 15 (2 μ l/13,47 mM); 7- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 15 (2 μ l/500 μ M); 8- 1 μ l da hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M).

Figura 11. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e ligantes. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- Só oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 3- hnRNPK (1 μ l/12,25 μ M) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0 μ l/60ng); 4- hnRNPK (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 16 (2 μ l/11,26 mM); 5- hnRNPK (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30(2.0 μ l/60ng) + composto 16 (2 μ l/500 μ M); 6- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60 ng) + composto 18 (2 μ l/12,16 mM); 7- hnRNPK (1 μ l/12,25 μ M) + CT2-30 (2.0 μ l/60ng) + composto 18 (2 μ l/500 μ M); 8- hnRNP K (1 μ l/12,25 μ M).

Após a realização dos ensaios de ligação, os esforços da investigação foram concentrados nos compostos **11** e **17**, os quais se mostraram capazes de impedir a formação do complexo ssDNA-hnRNP K. Uma vez que os mesmos foram planejados para o domínio KH3 da hnRNP K, é admissível a possibilidade de que nas reações realizadas alguns dos compostos tenham afinidade apenas para o domínio KH3, embora exista homologia entre os três domínios KH da proteína (PAZIEWSKA et al., 2004). É possível que tal fato não impeça a formação do complexo ssDNA-proteína, pois outros dois domínios KH ainda estariam livres para interagir com o nucleotídeo. De forma especulativa, se tal afirmativa for verdadeira, é possível que os compostos **11** e **17** também se liguem aos domínios KH1 e/ou KH2.

A respeito da importância da proposição de ligantes para domínios KH capazes de impedir a sua ligação natural ao DNA, Huth et al. (2004) relataram a descoberta, auxiliada por triagem virtual, de ligantes benzoantrânicos da proteína FBP (“FUSE Binding Protein”), a qual também liga ao DNA através de domínios KH, e está envolvida na gênese de alguns tipos de câncer por interferir na via *c-Myc*, como também já observado para a hnRNP K. Assim, o planejamento de ligantes voltados para os domínios KH de diferentes marcadores moleculares envolvidos na gênese do câncer pela via *c-Myc*, pode representar uma nova tendência no desenvolvimento de novas classes de fármacos antineoplásicos.

4.2. Proposição dos modos de ligação para os compostos 11 e 17 por “docking”

Uma vez que os compostos submetidos aos ensaios de ligação com proteína hnRNP K se mostraram ativos e foram selecionados e planejados com base na estrutura do domínio KH3 para competir com o oligonucleotídeo de DNA, acredita-se que o mecanismo de ação ocorra nos domínios KH. Com o objetivo de propor um modo de ligação para guiar futuras investigações para novos compostos ativos, foram realizadas simulações de “docking” flexível, aliadas a estudos de campos de interação molecular. Para as simulações de “docking” utilizou-se o programa GOLD (VERDONK ET AL., 2003), e para os estudos de campos de interação molecular, os quais foram computados para a estrutura do domínio KH3 (código PDB 1J5K), utilizou-se o programa GRID (GOODFORD, 1985; WADE; CLARK; GOODFORD, 1993; WADE; GOODFORD, 1993; CAROSATI, SCIABOLA; CRUCIANI, 2004). O fato de existirem duas isoformas não interfere nas análises, uma vez que a região que compreende o sítio ligante dos domínios KH3 é a mesma para ambas (OSTROWSKI; BOMSZTYK, 2003).

As simulações de “docking” realizadas para o composto **11** revelaram seis modos de ligação distintos dentre as quinze orientações de maior escore obtidas (Figura 12). O modo de ligação de maior escore para cada um dos seis grupos de orientações foi selecionado para

análises posteriores com os campos de interação molecular calculados para a estrutura do domínio KH3. A orientação 2 apresentou seis modos de ligação equivalentes dentre as quinze orientações de maior escore. Isso poderia indicar a maior relevância dessa orientação pelo consenso apresentado. Já as orientações 4 e 5 apresentaram três e duas orientações equivalentes, respectivamente. As demais orientações foram únicas dentre as 15 mais bem ranqueadas pela função de escore.

Figura 12. Grupos de orientações apresentados pelo composto 11 no sítio ligante do domínio KH3 nas simulações de “docking”.

Nas simulações de “docking” a orientação 2 parecia ser a mais relevante por apresentar maior número de orientações equivalentes dentre as 15 de maior escore. Entretanto, isso não foi corroborado pela análise dos campos de interação molecular. Os campos de interação molecular computados para a estrutura do domínio KH3 revelaram que as orientações 1, 3 e 5 são as mais favorecidas dentre as seis obtidas nas simulações de “docking”. A Figura 13 mostra a sobreposição de cada uma das orientações com os sítios virtuais de interação computados com o programa GRID (GOODFORD, 1985; WADE; CLARK; GOODFORD, 1993; WADE; GOODFORD, 1993; CAROSATI, SCIABOLA; CRUCIANI, 2004), utilizando os grupos de prova carbono aromático e oxigênio de carbonila. Como as três orientações obtidas são viáveis do ponto de vista teórico, seria possível a ligação do composto **11** com o domínio KH3 por qualquer um dos três modos apresentados. Assim, cálculos de dinâmica molecular para estimar a estabilidade energética, conformacional e das

interações propostas para cada uma das três orientações do composto **11** no sítio ligante do domínio KH3 foram realizados e serão apresentados no tópico posterior.

Figura 13. (A) Orientação 1 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável da carbonila no espaço. (B) Orientação 1 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático no espaço. (C) Orientação 3 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável da carbonila no espaço. (D) Orientação 3 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático no espaço. (E) Orientação 5 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável da carbonila no espaço. (F) Orientação 5 do composto 11 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático no espaço.

A principal interação da orientação 1 ocorre com o resíduo R40 (Figura 14), uma interação íon-dipolo com um dos resíduos de arginina imprescindíveis no reconhecimento de oligonucleotídeos (BRADDOCK et al., 2002; BACKE et al., 2005) por parte do domínio KH3, mediada por uma das carbonilas de um anel pirrolidinodiona. Em relação à orientação 3, uma carbonila do mesmo anel é responsável por mediar uma ligação de hidrogênio com o resíduo R59 (Figura 14). Já em relação à orientação 5, a ligação de hidrogênio sugerida pelo método de “docking” é realizada com o resíduo R40. Para a orientação 5 podemos observar, também, uma possível interação íon-dipolo com o resíduo R59. Assim, a orientação 5 se mostra muito interessante, pois apresenta a capacidade de formar, concomitantemente, duas interações polares com os principais resíduos do sítio ligante do domínio KH3.

Figura 14. Modo de ligação das orientações 1 (A), 3 (B) e 5 (C) obtidas por “docking” para o composto 11 no sítio ligante do domínio KH3, com destaque para as interações polares realizadas com os resíduos R40 e R59.

Em relação ao composto **17**, as simulações de “docking” sugeriram cinco grupos de orientações distintos dentre as 15 de maior escore, embora apenas quatro tenham sido considerados, pois, por inspeção visual, um dos grupos de orientações, composto por três orientações equivalentes, se apresentou em uma região que não compreende o sítio ligante do domínio KH3. Os quatro possíveis modos de ligação encontrados no sítio ligante são mostrados na Figura 15. A orientação 1, que apresentou maior escore de interação dentre as quinze obtidas, foi única considerando-se os modos de ligação obtidos. O mesmo ocorreu para a orientação 4, que também é única. A orientação 2 apresentou oito modos de ligação consensuais e equivalentes no sítio ligante do domínio KH3. Já a orientação 3 apresentou duas orientações equivalentes.

Figura 15. Grupos de orientações apresentados pelo composto 17 no sítio ligante do domínio KH3 nas simulações de “docking”.

De acordo com os cálculos dos campos de interação molecular, a orientação 1 do composto **17** parece ser a mais viável do ponto de vista energético, com o posicionamento de duas carbonilas e seus dois anéis aromáticos nos sítios de interação virtual obtidos (Figura 16). As demais orientações não mostraram concordância com os campos de interação molecular.

Figura 16. (A) Orientação 1 do composto 17 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova oxigênio de carbonila, a -5,0 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável das carbonilas do composto no espaço. (B) Orientação 1 do composto 17 obtida por “docking” em comparação com os sítios virtuais de interação obtidos para o grupo de prova carbono aromático, a -2,50 Kcal/mol, com destaque, em círculo, para o posicionamento favorável do anel aromático do composto no espaço.

O modo de ligação mais favorável e sugerido para o composto **17** apresenta duas ligações de hidrogênio (Figura 17). Uma das ligações de hidrogênio ocorre com o resíduo R59, considerado indispensável no reconhecimento molecular de nucleotídeos (BRADDOCK et al., 2002; BACKE et al., 2005). A segunda ligação de hidrogênio é sugerida com o resíduo K22.

Figura 17. Modo de ligação do composto 17 com destaque para as interações polares com os resíduos R59 e K22 no sítio ligante do domínio KH3.

4.3. Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas com as orientações dos compostos **11** e **17**, propostas por “docking” e complexadas com o domínio KH3. Para o composto **11**, em que foram filtradas três orientações principais (1, 3 e 5), as simulações de dinâmica molecular objetivaram estabelecer qual modo de ligação seria o mais estável e, portanto, o mais próximo da realidade.

A determinação do modo de ligação é um passo importante na derivação de uma relação estrutura-atividade, criando subsídios para etapas posteriores de otimização de novas moléculas no quesito afinidade ao sítio ligante da proteína (ALVAREZ, 2004). Em relação ao composto **17**, para o qual foi proposta apenas uma orientação, o objetivo das simulações está centrado na validação do modo de ligação apresentado bem como avaliação de sua perturbação no sítio ligante da proteína.

Para a nomeada orientação 1 do composto **11**, a trajetória obtida mostra uma queda da energia total do sistema ao longo do tempo, sugerindo que o complexo solvatado busca um estado de estabilidade, com tendência de menor grau de queda após decorridos 0,7 ns do tempo total de simulação (Figura 18).

Figura 18. (A) complexo solvatado da orientação 1 do composto 11 obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia total do sistema em função do tempo (de simulação) gerada pela trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular.

A trajetória analisada evidencia que a orientação 1 não apresenta estabilidade conformacional satisfatória no decorrer do tempo, sugerindo uma labilidade conformacional no interior do sítio ligante do domínio KH3 (Figura 19). Quando sobrepostas amostras de “snapshots” da trajetória da orientação 1, observa-se a instabilidade do anel benzênico, que apesar de estar em uma região que favorece carbonos aromáticos (constatado por campos de interação molecular; Figura 13), não deve estar espacialmente posicionado da maneira mais correta, pois em nenhum momento os confôrmeros gerados se mantiveram estáveis por longos períodos durante os 2 ns de simulação. O grau de variação conformacional sugere que o modo de ligação apresentado não é o mais adequado. Ou seja, a orientação 1 não deve corresponder ao modo de ligação ideal do composto **11**.

Figura 19. (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) dos átomos da orientação 1 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto 11 em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de conformeros do ligante obtidas durante a trajetória.

Sabendo que os resíduos de R40 e R59 possuem papel chave na atividade funcional do domínio KH3 (BRADDOCK et al., 2002; BACKE et al., 2005) e que para a orientação 1 foi descrita uma interação polar com R40, a distância entre a carbonila do anel de dioxopirrolidina com um dos grupos amina de R40 foi monitorada durante a simulação (Figura 20). A trajetória mostra um distanciamento desses átomos logo no início da simulação, com tendência de afastamento da molécula em relação ao sítio receptor, assim observada até o final da simulação e descrita pelos mais altos valores de distância entre os pares de átomos envolvidos. Assim, a orientação 1 não parece ser, de fato, um modo de ligação adequado do composto **11** no sítio ligante do domínio KH3, pois com a tendência de queda de energia ao longo do tempo e busca de estabilidade por parte do sistema, a principal interação da conformação inicial da orientação 1 não foi capaz de se manter.

Figura 20. (A) Gráfico da distância da ligação de hidrogênio sugerida entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R40 em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 1 do composto 11 com o resíduo R40.

A energia total do sistema (proteína, ligante e água) para a orientação 3 do composto **11** mostra uma tendência de queda ao longo da simulação, confirmando que o complexo do composto **11** (nessa orientação) com o domínio KH3 alcança estabilidade energética ao longo da trajetória, obtendo valores mais estáveis de energia, com menor grau de variação, a partir de cerca de 0,6 ns do tempo total de simulação (Figura 21).

Figura 21. (A) complexo solvatado da orientação 3 do composto 11 obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia em função do tempo de simulação (dinâmica molecular) do complexo.

A despeito da leve tendência de crescimento dos valores de RMSD obtidos, a orientação 3 do composto **11** revelou uma trajetória mais estável no sítio de ligação do domínio KH3 (Figura 22) quando comparada com a orientação 1 (Figura 19), indicada pelos baixos valores de desvio. Por outro lado, mesmo com a queda de energia ao longo da simulação, o posicionamento do ligante em relação à proteína apresentou pouca diferença em relação às coordenadas iniciais durante toda a trajetória, não havendo mudanças conformacionais significativas. Observa-se que os ajustes conformacionais se aplicam mais ao posicionamento dos dois anéis dioxipirrolidínicos, permanecendo os anéis centrais, benzeno e benzimidazol, estáveis quanto ao posicionamento no espaço durante a trajetória.

Figura 22. (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) dos átomos da orientação 3 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto 11, em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de conformeros do ligante obtidas durante a trajetória.

A ligação de hidrogênio proposta para a orientação 3 com o resíduo R59, se manteve estável ao longo da simulação (Figura 23). Assim, a baixa variação conformacional do ligante no sítio não comprometeu a ligação de hidrogênio, pois as mudanças de conformação do ligante foram influenciadas por mudanças conformacionais ocorridas na proteína durante a trajetória. Ou seja, as mudanças de RMSD do ligante em um dos anéis dioxopirrolidina, o qual está ligado ao anel benzênico, aconteceu pela aproximação do anel ao resíduo R59 (Figura 22B), fato que ocorreu logo nos momentos iniciais da simulação. O outro anel dioxopirrolidínico apresentou mudanças conformacionais induzidas por moléculas de água do ambiente solvatado, buscando interações de hidrogênio com as mesmas. O baixo grau de variação conformacional observado para a orientação inicial e a manutenção da ligação de hidrogênio com o resíduo de arginina evidencia que a orientação 3 está mais próxima de um modo de ligação adequado para o composto **11**.

Figura 23. (A) Gráfico da distância da ligação de hidrogênio entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R59, durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 3 do composto 11 com o resíduo R59.

Para a orientação 5 do composto **11**, a energia total do sistema também reduziu ao longo do tempo. Assim, o complexo apresentou uma trajetória compatível com estabilidade energética ao final da simulação (Figura 24). Os patamares de energia apresentados para o complexo KH3-orientação 5 (Figura 24) são semelhantes aos observados para KH3-orientação 3 (Figura 21). Em relação ao complexo KH3-orientação 1, os valores de energia durante toda a simulação são mais altos (Figura 18), evidenciando que a orientação 1 é menos estável que as outras duas apresentadas. Assim, as orientações 3 e 5 devem estar mais próximas do modo de ligação ideal para o composto **11**.

Figura 24. (A) complexo solvatado da orientação 5 do composto 11 obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia em função do tempo gerada pela trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular.

O RMSD dos átomos da orientação 5 mostrou pouca variação ao longo da trajetória, com menores valores dentre as três orientações investigadas (Figura 25A). Ao final da simulação houve um aumento da vibração da molécula no sítio, que se relaciona aos menores valores de energia apresentados pelo complexo (Figura 24). Entretanto, esse maior grau de variação não gerou conformeros distintos da orientação inicial (Figura 25B), fato explicado pelos baixos valores de RMSD observados durante a trajetória.

Figura 25. (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) dos átomos da orientação 5 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto **11** em função do tempo (de simulação), durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de conformeros do ligante obtidas durante a trajetória.

A orientação 5 do composto **11** é a única que apresenta interações com R40 e R59 simultaneamente. Desse modo, a distância entre os átomos nessas interações foram monitoradas ao longo da simulação (Figura 26). É possível observar que a interação íon-dipolo proposta com R59 se manteve ao longo da trajetória. Logo no início da simulação houve uma aproximação dos átomos, promovendo ajuste na interação com o resíduo, seguido de um longo período de manutenção nos mesmos patamares de distância que perdurou durante todo o período restante de simulação (Figura 26A). Em relação à ligação de hidrogênio proposta com R40 observa-se que a mesma também foi estável ao longo da simulação, com tendência de aproximação dos pares de átomos no início da trajetória, seguido de tênue afastamento e um longo período de estabilidade (Figura 26C). A interação com R40 foi mantida durante todo o tempo de simulação, sugerindo que a mesma é estável. Assim, as orientações 3 e 5 são, de fato, mais estáveis que a orientação 1 e poderiam representar o modo de ligação do composto **11** no sítio ligante do domínio KH3.

Figura 26. (A) Gráfico da distância da interação polar entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R59 durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Interação íon-dipolo proposta para a orientação 5 do composto 11 com o resíduo R59. (C) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em ângstroms) da distância da ligação de hidrogênio entre a carbonila do anel dioxopirrolidina e o átomo de nitrogênio do resíduo R40 durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (D) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 5 do composto 11 com o resíduo R40.

A vantagem da orientação 5, em detrimento da orientação 3, é que a mesma, além de realizar ligações de hidrogênio com R40 e R59 simultaneamente, ocupa melhor o perímetro da fenda do sítio de ligação, ou seja, há sobreposição com grande parte do espaço preferido pelo nucleotídeo. Já a orientação 3 se acomodaria em um sítio periférico à fenda de ligação do domínio, entretanto com potencial de sobreposição à região catiônica formada por R59, a qual é capaz de interagir com o segundo resíduo do oligonucleotídeo (C2) [Figura 27].

Figura 27. Orientações 3 e 5 do composto 11 no domínio KH3 em comparação com o modo de ligação experimental do oligonucleotídeo TCCCT.

A única orientação analisada por dinâmica molecular (orientação 1) para o composto **17** em complexo com o domínio KH3 também mostrou queda da energia total do sistema ao longo do tempo de simulação, tendendo a uma estabilidade conformacional (Figura 28). Nos momentos finais da simulação a taxa de queda da energia se mostrou em patamar menor, traduzindo o momento em que o sistema alcança um estado esperado de menor energia.

Figura 28. (A) complexo solvatado da orientação 1 do composto **17** obtida por “docking” com o domínio KH3. (B) Gráfico da energia em função do tempo gerada pela trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular.

A orientação 1 do composto **17** se mostrou conformacionalmente estável no sítio ligante do domínio KH3 ao longo da trajetória (Figura 29). No primeiro terço do tempo de simulação observou-se que os conformêreros gerados para o composto **17** são muito próximos da orientação inicial, fato que é distinguível no gráfico do RMSD em função do tempo (Figura 29A). No início dos outros dois terços de simulação observou-se uma tênue mudança conformacional que não se traduziu em variações no modo de ligação com a proteína e muito menos em relação à orientação inicial.

Figura 29. (A) Gráfico do desvio médio quadrático (RMSD, em angstroms) dos átomos da orientação 5 (desconsiderando átomos de hidrogênio) do composto 17 em função do tempo durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Sobreposição de amostras de conformeros do ligante obtidos durante a trajetória.

O comportamento da ligação de hidrogênio entre a orientação 1 do composto **17** e o resíduo R59 revelou que no primeiro terço da simulação a distância entre os átomos se manteve estável (Figura 30A). Ao redor de 0,7 ns do tempo de simulação percebeu-se um início de distanciamento entre os átomos envolvidos na interação. Apesar do afastamento, a ligação de hidrogênio proposta se manteve até o final da trajetória obtida de 2 ns. De acordo com os gráficos anteriores de energia total (Figura 28B) e RMSD dos átomos do ligante (Figura 29A) percebe-se que os conformeros gerados a partir de 0,7 ns são os mais estáveis. Entretanto, a orientação espacial desses conformeros não difere da orientação inicial proposta para o composto **17**. Assim, a orientação 1, obtida por “docking”, mostra-se viável para explicar a capacidade de ligação do composto **17** ao domínio KH3.

Figura 30. (A) Gráfico da distância da ligação de hidrogênio entre a carbonila do grupamento amida do ligante e o átomo de nitrogênio do resíduo R59 durante a trajetória do complexo obtida por dinâmica molecular. (B) Ligação de hidrogênio proposta para a orientação 1 do composto 17 com o resíduo R59.

4.4. Predições de metabolismo e toxicidade para os compostos **11** e **17**

As predições de metabolismo e toxicidade foram realizadas para as estruturas dos compostos **11** e **17**, com o intuito de propor uma rota metabólica, fornecendo dados que ajudem a identificar parâmetros que limitem as suas ações como possíveis agentes terapêuticos. Assim, modificações moleculares que otimizem essas propriedades podem ser realizadas no futuro e guiar o planejamento de novos compostos bioativos. As predições de reações metabólicas foram realizadas com o programa Meteor (TESTA et al., 2005), o qual lança mão de uma base de dados de biotransformações para propor uma rota metabólica para compostos químicos.

4.4.1. Composto **11**

As predições de biotransformações para a estrutura do composto **11** revelaram, até a 3ª geração, 12 possíveis metabólitos, os quais seriam formados através de reações de hidrólise, glucuronidação e oxidação (Figura 31). As biotransformações sugeridas não afetariam o grupo central fenilbenzimidazol do composto **11**, ocasionando a possível formação de metabólitos com diferentes substituintes no sistema central de anéis e um produto de hidrólise (Tabela 2).

Figura 31. Esquema da relação de formação dos possíveis metabólitos sugeridos a partir da estrutura do composto 11.

Os metabólitos de 1ª geração propostos poderiam ser biotransformados a partir da hidrólise dos anéis periféricos de dioxopirrolidina do composto **11**. Todas as biotransformações subsequentes seriam centradas nos grupamentos formados após a hidrólise dos anéis dioxopirrolidina, contribuindo, assim, para a formação dos metabólitos de 2ª e 3ª geração. Os metabólitos de 2ª geração poderiam ser formados após a glucuronidação de funções carboxílicas dos metabólitos de 1ª geração e hidrólise do segundo anel dioxopirrolidínico. Já os metabólitos de 3ª geração seriam formados após glucuronidação e β -oxidação de funções carboxílicas dos metabólitos de 2ª geração, além da hidrólise de grupamentos amida (Figura 31/Tabela2). Todos os metabólitos sugeridos são estruturas passíveis de formação durante o metabolismo do composto **11** em mamíferos. As simulações realizadas são de caráter qualitativo e não há nenhuma relação com quais dos metabólitos seriam formados em maiores ou menores quantidades.

Tabela 2. Estrutura dos potenciais metabólitos propostos a partir das biotransformações sugeridas partindo do composto 11.

Substituinte	R1/R2	Metabólitos
1		A1 (R1 = 1 / R2 = 2)
		A2 (R1 = 2 / R2 = 1)
		A3 (R1 = 3 / R2 = 2)
2		A4 (R1 = 1 / R2 = 1)
		A5 (R1 = 2 / R2 = 3)
		A6 (R1 = 3 / R2 = 1)
3		A7 (R1 = 1 / R2 = 3)
		A8 (R1 = 4 / R2 = 1)
		A9 (R1 = 1 / R2 = 4)
		A10 (R1 = NH ₂ / R2 = 1)
		A11 (R1 = 1 / R2 = NH ₂)
4		Produto de hidrólise
		A12

A estrutura do composto **11** e seus respectivos metabólitos propostos (A1-A12) foram submetidos a uma análise toxicofórica através do software Derek (LHASA, 2007). Apenas dois grupamentos toxicofóricos foram encontrados na estrutura química dos compostos analisados, sendo eles a amina aromática e o benzimidazol. O composto **11** e todos os seus metabólitos propostos, exceto **A12**, apresentam o grupamento benzimidazol, o qual está associado à indução de dano cromossômico. Esse grupamento pode causar mutações através de sua incorporação ao DNA em lugar da guanina e causar o efeito genotóxico (SEILER, 1975; SEILER, 1976).

Esta propriedade tóxica não garante insegurança e falta de eficácia na farmacoterapia, uma vez que fármacos consagrados na prática terapêutica como o redutor de acidez gástrica omeprazol e o anti-helmíntico mebendazol também apresentam o grupamento benzimidazol, e já foram, também, identificados como agentes genotóxicos (BURLINSON et al., 1990; MARTELLI et al., 1998; de la TORRE et al., 1994). Assim, a potencial capacidade indutora de efeito genotóxico sugerida para o composto **11** e seus metabólitos deveria ser investigada experimentalmente em testes biológicos para determinar qual o grau de importância e se o mesmo efeito seria relevante em diferentes espécies, como por exemplo, em camundongos e humanos.

Outro grupamento toxicofórico identificado foi a amina aromática, a qual é compartilhada apenas pelas estruturas dos metabólitos de 3ª geração **A10** e **A11**. Compostos que apresentam aminas aromáticas, em geral, estão associados a múltiplas implicações tóxicas, incluindo indução de mutagenicidade, carcinogenicidade e sensibilização cutânea. As aminas aromáticas podem atuar como agentes genotóxicos, induzindo mutagenicidade e carcinogenicidade a partir de ativação metabólica por reação de *N*-hidroxilação e subsequente *O*-esterificação, culminando com a formação de derivados *O*-acetilados e *O*-sulfatados (ANDERSEN et al., 1964; MILLER, 1970; TURESKY et al., 1991). Tais derivados podem formar íons nitrênio, que são intermediários altamente reativos e podem se ligar diretamente ao DNA através de ataque nucleofílico das bases de purina, ocasionando modificações químicas no material genético (VERNA; WHYSNER; WILLIAMS, 1996; MILLER, 1978). Neste caso, seria de vital importância determinar em ensaios de metabolismo em qual proporção os metabólitos **A10** e **A11** seriam formados para esclarecer se este efeito estaria associado a utilização do composto **11** como agente terapêutico após metabolismo. **A12** foi o único metabólito proposto que não apresentou nenhum grupamento toxicofórico dentre os avaliados e implementados no sistema Derek.

4.4.2. Composto **17**

As simulações metabólicas para a estrutura do composto **17** revelaram, até a 3ª geração, 15 possíveis metabólitos, incluindo reações de oxidação, hidrólise, hidroxilação, glucuronidação e conjugação com glicina (Figura 32). De acordo com os metabólitos sugeridos, o grupo central fenilbenzamida seria afetado por biotransformações apenas no seu grupamento amida, o qual é susceptível à reação de hidrólise, contribuindo para a possível formação dos metabólitos **B2**, **B3**, **B7**, **B8** e **B13**. As outras reações de biotransformação sugeridas afetariam somente substituintes do núcleo fenilbenzamida (Tabela 3).

Figura 32. Esquema da relação de formação dos possíveis metabólitos sugeridos a partir da estrutura do composto 17.

Os metabólitos de 1ª geração poderiam ser formados a partir de diversas reações que podem ocorrer na estrutura do composto **17**, incluindo a oxidação do anel oxopirrolidina, hidrólise do grupo amida e hidroxilação de anel aromático. Glucuronidação poderia ocorrer nos grupos carboxila presentes nos metabólitos de 1ª geração **B2** e **B6**, contribuindo para a formação de **B7** e **B9** (2ª geração). O grupo carboxílico de **B2** também poderia sofrer conjugação com glicina e contribuir para a formação de **B8**. Já o grupo carboxílico de **B6** poderia sofrer β -oxidação e formar **B10**. A hidrólise do grupo amida de **B6** poderia dar origem a outros dois metabólitos de 2ª geração, **B11** e **B12**. A glucuronidação das funções carboxílicas remanescentes dos metabólitos de 2ª geração (**B8** e **B10**) poderiam contribuir na formação de **B13** e **B14**. Finalmente, a hidrólise do grupo amida de **B10** poderia originar **B12** e **B15**.

Tabela 3. Estrutura dos potenciais metabólitos propostos a partir de biotransformações sugeridas partindo do composto 11.

<div><div><div><div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></div><div></</div></div></div></div></div>		
--	--	--

Apenas dois grupamentos toxicofóricos foram identificados na estrutura do composto **17** e seus potenciais metabólitos, a amina aromática e o fenol. O grupamento amina aromática está presente na estrutura dos metabólitos **B3** e **B12**. Como explanado acima, no subtópico 4.1.1, as aminas aromáticas podem atuar como agentes genotóxicos, induzindo mutagenicidade e carcinogenicidade (ANDERSEN et al., 1964; MILLER, 1970; TURESKY et al., 1991). Assim, o alerta gerado para esses possíveis metabólitos é válido e pode ser um fator indutor de toxicidade em um organismo vivo. Entretanto, para conclusões mais precisas seria necessário determinar em que quantidade seriam formados os metabólitos **B3** e **B12** e esclarecer se contribuem representativamente com os efeitos tóxicos clássicos associados às aminas aromáticas, estabelecendo o nível de segurança inerente à administração de tal composto para eventual farmacoterapia.

Os compostos **B4** e **B5** apresentam em sua estrutura química o grupamento fenol, que pode induzir sensibilização cutânea quando presente em moléculas que entram em contato com a pele. O mecanismo que desencadeia sensibilização cutânea pode ser resultado da formação de radicais fenólicos, principalmente nas posições *orto* ao grupamento fenol, os quais apresentam grande potencial de reação com as proteínas da pele (BARRATT; BASKETTER, 1992). Para fármacos, mesmo os administrados por via oral, os quais podem alcançar a pele através da secreção de glândulas após distribuição pela circulação sanguínea, a indução de sensibilização cutânea pode representar um fator limitante ao seu emprego terapêutico, mesmo que não representando um alerta grave de toxicidade. Da mesma forma como exposto acima, seria necessário determinar em que quantidade os metabólitos fenólicos seriam formados e, também, se poderiam ser distribuídos até as glândulas sudoríparas para serem secretados na pele.

4.5. Ensaio com culturas de células

Para verificar a influência dos compostos **11** e **17**, já identificados previamente como ligantes da proteína hnRNP K, no crescimento de células de carcinoma de língua foi utilizado o ensaio MTT, que permite a análise da viabilidade celular após a incubação com os compostos. Assim, quanto menor a viabilidade celular maior é a atividade antitumoral do composto estudado.

Os testes foram realizados através de quadruplicadas para três concentrações diferentes de cada composto (composto **11**: 64,4 µM, 6,4 µM e 0,6 µM; composto **17**: 83,9 µM, 8,4 µM e 0,8 µM) com período total de incubação de 1 hora. Da mesma forma, foram mantidos controles de células (sem adição de qualquer composto) e controle de DMSO, o qual

continha as células em um meio com 0,5% de DMSO. A concentração de 0,5 % de DMSO é justificada porque os compostos **11** e **17** foram solubilizados em DMSO, resultando em uma concentração final de 0,5 % no meio celular para tais amostras.

Durante os ensaios, a amostra com maior concentração do composto **17** (84,4 μ M) precipitou após a sua adição ao meio. Assim, os resultados dessas amostras foram descartados, uma vez que a formação de precipitados pode influenciar no crescimento das células e impede a interpretação dos resultados. As leituras de absorbância mostradas posteriormente representam uma média aritmética das quatro repetições para cada amostra.

Como esperado, o controle apresentou o maior nível de viabilidade celular, traduzido pelo valor mais elevado de absorbância (Figura 33). A viabilidade das amostras em DMSO 0,5 % foi menor que a apresentada pelo controle, justificada pelo efeito nocivo desse solvente às células tumorais. Entretanto, todas as amostras com presença dos compostos **11** e **17** apresentaram níveis de viabilidade celular inferiores aos observados para o controle de DMSO (Figura 33), ou seja, as amostras com os compostos **11** e **17** foram capazes de reduzir a viabilidade das células de carcinoma de língua. A maior redução (cerca de 18%) foi observada pela média das amostras em 8,4 μ M do composto **17** em relação ao controle de células (Figura 34). As amostras em 0,8 μ M do mesmo composto apresentaram uma redução de viabilidade celular de cerca de 10% em relação ao controle (Figura 34). Em relação ao composto **11**, as três concentrações analisadas mostraram um nível similar de redução de viabilidade celular, ao redor de 12-14% (Figura 34). Assim, para os diferentes níveis de concentração do composto **11** foram observadas apenas pequenas variações na viabilidade celular, as quais não foram significativas ao nível de 5% de probabilidade (Tabela 4).

Figura 33. Valores de absorbância, proporcionais ao nível de viabilidade celular, para cada amostra analisada dos compostos 11 e 17, controle de DMSO e controle de células.

Figura 34. Níveis de redução da viabilidade celular observados para as amostras analisadas.

Tabela 4. Análise de variância dos dados obtidos para a viabilidade celular dos tratamentos com os compostos 11 e 17 e controle de células e DMSO.

Causas de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrados Médios	F calculado
Tratamentos	6	0,043	0,007	1,4*
Resíduo	21	0,116	0,005	
Total	27	0,159		

*Não significativo ao nível de 5% de probabilidade

Ainda é necessário esclarecer se a tênue redução nos níveis de viabilidade celular se deu pela baixa afinidade dos compostos ao sítio de ligação do domínio KH3, pela dificuldade de acesso ao alvo molecular limitada por propriedades físico-químicas dos compostos, ou até por falta de especificidade ao alvo-molecular. Assim, o caminho de investigação futuro deve focar na melhora destas propriedades para obtenção de compostos mais promissores em ensaios celulares. Assim, se torna necessário explorar a diversidade química dos compostos **11** e **17** e conceber novos derivados visando a otimização da atividade biológica.

Os compostos **11** e **17** se mostraram interessantes protótipos para o desenvolvimento de fármacos antitumorais que atuem na via da proteína hnRNP K, pois, apesar de reduzir a viabilidade celular em culturas de células tumorais em níveis tênues já foram identificados como ligantes desse alvo. Mesmo que em níveis tênues, a redução nos níveis de viabilidade celular por parte desses compostos representa um ótimo ponto de partida para o planejamento de novas substâncias bioativas. O estudo de modificações moleculares para o desenvolvimento de análogos com atividade otimizada parece ser promissor e representa uma estratégia de vanguarda, já que, ainda, não existem fármacos ou outros agentes antitumorais descritos que atuem na via de expressão da hnRNP K.

4.6. Busca por similaridade

Na busca de compostos por similaridade, foram selecionadas as moléculas com índice de Tanimoto igual ou superior a 0,7 em relação aos compostos **11** e **17** nas sub-coleções de compostos DIVERSet, CNSSet e MWSet da base de dados EXPRESS-Pick. O objetivo inicial era derivar um padrão farmacofórico a partir dos ligantes encontrados na primeira etapa do trabalho. Entretanto, com apenas dois ligantes identificados a derivação de um padrão farmacofórico não é representativa. Assim, lançou-se mão da estratégia da busca por similaridade, a qual permite identificar compostos similares aos ligantes, constituindo na melhor ferramenta a ser utilizada nesta etapa do trabalho. O limite de corte do índice de similaridade foi estabelecido em 0,7 com o intuito de selecionar compostos com alto grau de similaridade, capazes de manter o núcleo central de anéis dos compostos **11** e **17**, obtendo, assim, variações nos substituintes.

O intuito da busca por similaridade é o de selecionar compostos com similaridade do ponto de vista estrutural aos compostos **11** e **17** e investigar se os mesmos também são capazes de impedir a ligação do DNA à proteína hnRNP K *in vitro*. Assim, obtendo êxito nessa empreitada, uma biblioteca de ligantes dos domínios KH da proteína hnRNP K pode ser construída, enriquecendo o número de compostos conhecidos com afinidade para a proteína e criando subsídios para a realização de estudos mais precisos de relação estrutura-atividade para a otimização dos ligantes já existentes e proposição de moléculas com propriedades ótimas de ligação.

Para as três subcoleções de compostos analisadas foram selecionadas ao todo 21 estruturas com índice de Tanimoto maior ou igual a 0,7 para os compostos **11** e **17**. Especificamente, 5 compostos apresentaram índice de similaridade dentro dos limites pré-estabelecidos em relação ao composto **11** (Figura 35; Tabela 5) e 16 compostos em relação ao composto **17** (Figura 36; Tabela 6).

Figura 35. Estruturas dos compostos selecionados na base de dados EXPRESS-Pick com índice de Tanimoto maior que 0,7 em relação à estrutura do composto 11.

Tabela 5. Compostos pertencentes à base de dados EXPRESS-Pick que apresentaram índice de Tanimoto maior que 0,7 quando comparados com a estrutura do composto 11.

Composto	Número CAS	Índice de Tanimoto
19	296242-68-7	0,81
20	206983-41-7	0,76
21	330971-52-3	0,88
22	89427-48-5	0,71
23	342396-08-1	0,74

Figura 36. Estrutura dos compostos selecionados na base de dados EXPRESS-Pick com índice de Tanimoto maior do que 0,7 em relação à estrutura do composto 17.

Tabela 6. Compostos pertencentes à base de dados EXPRESS-Pick que apresentaram índice de Tanimoto maior do que 0,7 quando comparados com a estrutura do composto 17.

Composto	Número CAS	Índice de Tanimoto
24	416890-16-9	0,75
25	369-73-3	0,74
26	416891-11-7	0,73
27	166388-04-1	0,73
28	418775-95-8	0,73
29	1629-12-5	0,71
30	195379-02-3	0,71
31	350500-51-5	0,71
32	401-25-2	0,70
33	198879-91-3	0,77
34	304882-37-9	0,72
35	331270-57-6	0,73
36	351039-24-2	0,70
37	349129-78-8	0,70
38	803-94-1	0,70
39	346719-18-4	0,70

4.7. Ensaios de ligação *in vitro* com a proteína hnRNP K – 2ª etapa

Nesta etapa os ensaios de ligação *in vitro* com a proteína hnRNP K foram realizados com cinco compostos adquiridos da base de dados EXPRESS-Pick através da busca por similaridade, descrita no tópico acima.

O gel obtido para os experimentos realizados com os compostos **20**, **21** e **28** (Figura 37) revelou que os compostos **21** e **28** conseguiram deslocar uma porção do ssDNA que ligaria aos domínios KH. Esse deslocamento ocorreu em grau distinguível apenas na maior concentração utilizada para cada composto (canaleta 7 - 12,72 mM para o composto **21**; canaleta 9 - 25,94 mM para o composto **28**), sendo mais evidente, por apresentar uma banda mais forte, no caso do composto **28**. Assim, para estes compostos, observa-se, a presença das bandas de ssDNA tanto na região superior (ligado à proteína) quanto na região inferior do gel (não ligado à proteína). Quando os compostos foram adicionados na concentração de 50 µM o mesmo padrão não foi observado, pois as bandas referentes ao ssDNA se mostraram quase

que totalmente na região superior do gel, semelhante ao controle de ligação hnRNP K – ssDNA (canaleta 3), fato que indica a sua ligação à proteína. Apenas traços de banda referente ao ssDNA foram observadas na região inferior. Nenhum efeito de deslocamento do oligonucleotídeo foi observado para o composto **20**, sugerindo que o mesmo não é capaz de se ligar à hnRNP K em quantidades expressivas.

Figura 37. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos orgânicos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- Só oligonucleotídeo CT2-30 (2µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2.0µl/60ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 20 (2µl/500 µM); 5- 1ul da hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2.0µl/60 ng) + composto 20 (2µl/19,43 mM); 6- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0µl/60ng) + composto 21 (2µl/500 µM); 7- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 21 (2µl/ 12,72 mM); 8- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 28 (2µl/500 µM); 9- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 28 (2µl/25,94 mM) 10- hnRNP K (1µl/12,25µM).

O ensaio realizado para os compostos **23** e **27** revelou que apenas o composto **27**, na sua maior concentração (canaleta 7 – 22,04 mM), foi capaz de deslocar uma porção do oligonucleotídeo (Figura 38). O padrão de deslocamento foi semelhante ao mostrado para o composto **28** (Figura 37), em que as bandas referentes ao oligonucleotídeo são evidentes tanto na região superior quanto inferior do gel. Isso indica que estes compostos são capazes de se ligar à proteína hnRNP K e impedir em menor grau, quando comparados aos compostos **11** e **17**, a ligação do oligonucleotídeo à proteína.

Figura 38. Ensaio de mudança de mobilidade eletroforética usando a hnRNP K humana recombinante pura, oligonucleotídeos de ssDNA (CT2-30) e compostos orgânicos. Nas canaletas: 1- marcador de peso molecular 100 pb; 2- Só oligonucleotídeo CT2-30 (2µl/60ng); 3- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + oligonucleotídeo CT2-30 (2µl/60ng); 4- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 23 (2µl/500µM); 5- 1ul da hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2µl/60 ng) + composto 23 (2µl/30,79 mM); 6- hnRNP K (1µl/12,25µM) + CT2-30 (2µl/60ng) + composto 27 (2µl/500 µM); 7- hnRNP K (1µl/12,25 µM) + CT2-30 (2.0 ul/60 ng) + composto 27 (2µl/22,04mM); 8- hnRNP K (1µl/12,25µM).

Os compostos ensaiados nesta etapa, não se mostraram tão eficientes em deslocar o ssDNA quanto os moldes (compostos **11** e **17**) utilizados em sua seleção na base de dados. Entretanto, os novos compostos aqui identificados são importantes para criar uma base de dados de novos ligantes, sejam eles com maior ou menor grau de atividade, ajudando a obter uma relação-estrutura atividade capaz de guiar futuras investigações na otimização de substâncias bioativas.

4.8. Substituições bioisostéricas nos ligantes da hnRNP K

Com o intuito de gerar novos derivados virtuais dos compostos **11** e **17** em consonância com o ambiente químico do domínio KH3, substituições bioisostéricas foram realizadas nas estruturas químicas destes compostos, contemplando as regiões moleculares capazes de realizar as principais interações propostas com a proteína, ou seja, as interações polares com R40, R59 e K22. A idéia básica é a de otimizar as principais interações e ao mesmo tempo manter ou, até, melhorar a atividade biológica através da construção de novos derivados. A concepção dos novos derivados foi realizada com o programa BROOD

(OpenEye, 2010), o qual contém uma bases de dados com aproximadamente 4 milhões de fragmentos químicos, dos quais os mais promissores para os substituintes R1-R3 dos compostos **11** e **17** (Figura 39) foram selecionados através da análise das novas interações sugeridas e adaptadas a partir dos modos de ligação previamente propostos para ambos compostos.

Figura 39. Fragmentos moleculares dos compostos **11** e **17** submetidos ao procedimento de substituição bioisotérica.

Para a realização das substituições bioisotéricas, foram estabelecidos dois tipos de restrições para a seleção dos fragmentos para composição dos novos derivados. A primeira, inerente à própria constituição molecular dos fragmentos, ou seja, para os fragmentos **1** e **2**, um anel central contendo dois aceptores de ligação de hidrogênio e para o fragmento **3**, um anel central contendo um aceptor de ligação de hidrogênio (Figura 40A e 40B). Já para a segunda estratégia, as restrições corresponderam às características do ambiente químico do domínio KH3, de acordo com os modos de ligação propostos por “docking” para os compostos **11** e **17**. Assim, como as principais interações propostas ocorreriam com R40 e

R59, as restrições para os fragmentos 1-3 foram estabelecidas em um anel central contendo um grupo aniônico. Dessa forma, os grupos aniônicos dos novos derivados poderiam possibilitar a realização de interação iônica com os resíduos catiônicos R40 e R59 (Figura 40C e 40D).

Figura 40. Restrições moleculares utilizadas na busca de fragmentos compatíveis aos fragmentos 1-3 para a concepção de derivados dos compostos 11 e 17.

Após o procedimento de busca, foram selecionados os fragmentos mais bem pontuados (Figura 41), de acordo com a similaridade aos fragmentos originais e às interações propostas com o domínio KH3, os quais poderiam interagir com R59, R40 ou K22 por meio de interações polares através de seus grupamentos carboxila, carbonila, hidroxila ou sulfonamida.

Figura 41. Fragmentos capazes de substituir os fragmentos originais 1-3 na concepção de novos derivados dos compostos 11 e 17.

A apresentação de tais fragmentos para a concepção de derivados dos compostos **11** e **17** fornece subsídios para guiar a futura síntese de novas entidades químicas capazes, ao menos do ponto de vista teórico, de manter as principais interações com os resíduos da fenda de ligação do domínio KH3. Por exemplo, novos derivados do composto 11, gerados a partir dos fragmentos 4 e 9, poderiam realizar interação iônica através de seus grupos carboxila (Figura 42). Já os compostos formados a partir dos fragmentos 17 e 29, também para a estrutura do composto **11**, poderiam realizar ligação de hidrogênio com R59 (Figura 42). Os

demais fragmentos selecionados, constituindo derivados dos compostos **11** e/ou **17**, apresentariam um posicionamento semelhante aos seus congêneres.

Figura 42. Possíveis modos de ligação de derivados do composto **11** gerados a partir da substituição dos fragmentos 1 ou 2 pelos fragmentos 4 (A), 9 (B) e 17 (C), 29 (D) com destaque para as ligações de hidrogênio ou interações iônicas realizadas pelos novos fragmentos.

Com o intuito de indicar fragmentos com menor potencial de induzir efeitos tóxicos agudos clássicos, uma análise toxicofórica foi realizada com os derivados gerados, com o intuito de direcionar a concepção de novos análogos também otimizados do ponto de vista da toxicidade e, assim, priorizar os fragmentos capazes de conceber derivados relevantes do ponto de vista farmacêutico. Seis grupamentos toxicofóricos (furano, hidrazina, pirimidina substituída, éter enólico, ester α,β -insaturado e alquil carbamato) foram identificados após a concepção dos novos derivados a partir da composição de dez fragmentos distintos (Tabela 7). Assim, a princípio, a concepção de derivados com os fragmentos sem estrutura toxicofórica deveria ser priorizado na futura síntese de análogos dos compostos **11** e **17** com potencial atividade antitumoral, especialmente fragmentos capazes de realizar interações

iônicas com os resíduos de arginina da fenda de ligação do domínio KH3, como por exemplo, os fragmentos 4-11, 14 e 26, os quais apresentam grupos carboxílicos. Nesse caso, como as interações iônicas são mais atrativas que as ligações de hidrogênio (PATRICK., 2009), espera-se que os novos derivados possam exibir níveis mais robustos de atividade biológica frente aos protótipos originais.

Tabela 7. Grupamentos toxicofóricos dos fragmentos sugeridos para a substituição dos fragmentos 1-3 na concepção de derivados dos compostos 11 e 17.

Grupo toxicofórico	Fragmento	Toxicidade
Furano	9,27	Hepatotoxicidade
Hidrazina	10,16,20,21,28	Sensibilização cutânea
Pirimidina substituída	14	Carcinogenicidade
Éter enólico	31	Sensibilização cutânea
Ester α,β -insaturado	31	Sensibilização cutânea
Alquil carbamato	33	Dano cromossômico

4.9. Síntese de derivados nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina acoplados a purinas

O presente tópico refere-se aos resultados obtidos durante o estágio “sandwich”, realizado no período de 01/05/2010 a 31/10/2010 no grupo de Química Orgânica e Farmacêutica da Universidad de Granada, sob supervisão do Prof. Dr. Joaquin Maria Campos Rosa.

A síntese de alguns derivados de compostos nitrobenzenosulfonil-benzoxazepínicos acoplados a purinas já foi realizada no grupo em questão, fornecendo potentes compostos antitumorais capazes de impedir a progressão metastática, os quais têm como alvo genes pró-apoptóticos com atividade de quinase (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2008), ou seja, não mostrando nenhuma relação, até o presente momento, com qualquer mecanismo envolvido na via da proteína hnRNP K. O objetivo desta etapa foi a de complementar a formação do doutorando, buscando subsídios em uma área de formação importante no desenvolvimento de moléculas bioativas, a síntese orgânica, além de sintetizar compostos com potencial atividade antitumoral. A seqüência de reações planejada para síntese dos compostos (Figura 43) apresenta cinco etapas até a síntese do núcleo nitrobenzenosulfonil-benzoxazepina, a partir daí o mesmo seria acoplado a bases nitrogenadas halogenadas gerando as novas entidades químicas com potencial atividade antitumoral (Figura 44).

Figura 43. Etapas de síntese para produção do núcleo central nitrobenzenosulfonyl-benzoxazepina.

Figura 44. Proposta de compostos a serem sintetizados com potencial atividade antitumoral.

A idéia de sintetizar derivados benzoxazepínicos acoplados a bases nitrogenadas surgiu no grupo de Química Orgânica e Farmacêutica da Facultad de Farmacia da Universidad de Granada, onde grande mérito dessa empreitada é creditado ao Prof. Joaquin Maria Campos Rosa, que já trabalha com essa classe de compostos desde o início do século XXI. A motivação na busca de tais compostos, na Universidade de Granada, se baseou na intenção de desenvolver entidades químicas que pudessem ser úteis como fármacos na luta contra o câncer. Grande avanço foi obtido durante o planejamento e descoberta do composto **49** (Tabela 7), o qual já se mostrou capaz de induzir fortemente a morte de células tumorais de linhagens de mama e colo-retal, com valores de IC_{50} na faixa de μM para seus dois estereômeros (CORRALES et al., 2011; LÓPEZ-CARA et al., 2011).

Tabela 8. Dados referentes ao IC_{50} (μM) do composto 49 (mistura racêmica) e seus estereômeros isolados frente a linhagens de mama e cólon normais e neoplásicas.

	Linhagens de mama			Linhagens de Cólon				
	Normal	Neoplásicas		Normal	Neoplásicas			
	MCF-10A	MCF-7	MDA-MB-231	CCD-18Co	Caco-2	T84	HT29	SW-480
Mistura racêmica	1,825 ± 0,503	0,355 ± 0,011	0,166 ± 0,063	2,102 ± 0,012	0,631 ± 0,008	1,019 ± 0,394	1,352 ± 0,281	0,235 ± 0,011
(R)	0,1 ± 0,003	0,19 ± 0,001	0,11 ± 0,001	1,876 ± 0,011	0,623 ± 0,006	1,389 ± 0,533	1,501 ± 0,322	1,370 ± 0,181
(S)	0,1 ± 0,001	0,1 ± 0,001	0,11 ± 0,001	0,968 ± 0,007	0,576 ± 0,005	0,370 ± 0,014	0,311 ± 0,004	0,437 ± 0,023

Atualmente, o estágio da pesquisa está voltado para a elucidação do mecanismo de ação dessa classe de compostos, além de sua otimização e produção de novos derivados. Em relação à elucidação dos possíveis alvos moleculares, já se sabe que o composto 49 é capaz de interferir nas vias de sinalização e transdução de sinais implicadas na proliferação e migração

celular, apoptose e angiogênese. Já foi demonstrado que a substância interfere na atividade da cascata de proteínas quinases ativada após a dimerização dos receptores EGFR e HER-2, os quais se encontram superexpressados em alguns tipos de neoplasias, sobretudo em câncer de mama. Possíveis alvos moleculares seriam: EGFR, HER2, RET, RAS, PKC, PDK-1, AKY-P e VEGF (CORRALES ET al., 2011).

Já em relação à otimização de novos derivados, os principais esforços se alinham à síntese e avaliação biológica dos compostos **45-48**, além de outros análogos, com variações nos substituintes halogenados das bases nitrogenadas e verificação de quais seriam os mais adequados. Nota-se que o termo “mais adequado”, para a busca de substituintes, refere-se tanto à atividade biológica quanto às propriedades farmacocinéticas e à toxicidade. Para tal, se torna necessária a síntese de tais compostos, como aqui propostos (Figuras 43 e 44) e desenrolados nas seções subseqüentes.

4.9.1. Reação 1: Proteção do grupamento hidroxila do álcool 2-aminobenzílico

Figura 45. Reação de obtenção do composto 40 a partir do álcool 2-aminobenzílico.

A primeira etapa na concepção dos compostos **45-48** correspondeu à síntese do composto **40** a partir do álcool 2-aminobenzílico. Nesta reação a hidroxila do álcool foi protegida com o grupo *t*-butildimetilsilano (Figura 45). O composto 40 revelou-se como um líquido viscoso de cor amarela. Assim, foi possível realizar o procedimento com obtenção de 706,8 mg do composto **40** e um conseqüente rendimento de 73%. A proteção do grupamento hidroxila pelo grupo *t*-butildimetilsilano foi confirmada através da comparação do espectro de RMN do produto obtido aos dados descritos na literatura (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004).

4.9.2. Reação 2: proteção do grupo amino

Figura 46. Reação de obtenção do composto 41 a partir do composto 40.

A reação 2 compreendeu a proteção do grupo amino com o grupo 4-nitrobenzenosulfonila (Figura 46), resultando na formação de uma sulfonamida. O composto **41** revelou-se como um sólido de cor branca e ao final do procedimento de purificação foram obtidos 646,5 mg do mesmo, resultado de um rendimento de aproximadamente 51%. A formação do composto **41** foi confirmada pela comparação do espectro de RMN do produto obtido aos dados descritos na literatura (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004).

4.9.3. Reação 3: Reação de Mitsunobu

Figura 47. Reação de obtenção do composto 42 a partir do composto 41.

A reação 3 foi realizada nas condições de Mitsunobu (MITSUNOBU; YAMADA, 1967) para o composto **42** e o hidroxiacetaldeído dimetil acetal (Figura 47). O composto **42** revelou-se como um sólido de cor branca e ao final do procedimento de purificação foram obtidos 537,23 mg do mesmo, resultado de um rendimento de aproximadamente 69%. A formação do composto **42** foi confirmada pela comparação do espectro de RMN do produto obtido aos dados descritos na literatura (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004).

4.9.4. Reação 4: desproteção do grupamento silano

Figura 48. Reação de obtenção do composto 43 a partir do composto 42.

A reação 4 correspondeu à desproteção do grupo silano, o qual foi adicionada na primeira etapa da rota sintética, resultando na síntese do composto **43** (Figura 48). O composto **43** revelou-se como um sólido de cor amarela e ao final do procedimento de purificação foram obtidos 408,35 mg do mesmo, resultado de um rendimento de aproximadamente 98%. A confirmação da reação de desproteção se deu através da comparação do espectro de RMN do produto obtido aos dados descritos na literatura (DÍAZ-GAVILÁN et al., 2004).

A reação 4 foi a última etapa experimental de síntese realizada durante o estágio “sandwich” da rota proposta ao início do trabalho (Figura 50). Assim, a síntese dos derivados benzoxazepínicos acoplados a bases nitrogenadas (compostos **45-48**) não foi finalizada, pois o tempo de seis meses não foi suficiente para tal. Assim, a finalização da síntese dos compostos **45-48** ficou a cargo do grupo de Química Orgânica e Farmacêutica da Universidad de Granada.

4.9.5. Substituições bioisostéricas

Considerando que os compostos **45-49** são entidades químicas valiosas na busca de novos candidatos a fármacos na luta contra o câncer, é necessário apreciar também o potencial de toxicidade inerente às suas estruturas, já que o objetivo do planejamento químico de tais moléculas está voltado para a aplicação terapêutica. Assim, é inevitável preponderar que o grupo nitro aromático pode reduzir drasticamente o potencial de aplicação terapêutica dessa classe de compostos, uma vez que o mesmo já é reconhecido por sua toxicidade através da capacidade de induzir mutagenicidade, carcinogenicidade e hepatotoxicidade, como também mostram as predições realizadas com o programa Derek (LHASA, 2007). O mecanismo de toxicidade do grupo nitro aromático requer a redução desse grupo a hidroxilamina, o que acarreta a subsequente formação de derivados *O*-esterificados. Os produtos esterificados podem acarretar a formação de íons nitrênio, os quais são altamente reativos e capazes de interagir com biomacromoléculas, incluindo o DNA. A redução do grupo nitro em compostos tóxicos pode se iniciar pelas bactérias da microbiota intestinal, proporcionando um das vias implicadas na toxicidade desse grupo. Além disso, reações de redução do grupo nitro também podem ocorrer sistemicamente pelo organismo, a partir do momento em que a substância está biodisponível (OHKUMA; KAWANISHI, 1999; RITTER et al., 2002; HAACK; ERDINGER; BOCHE, 2001; HOLDER, 1999; PUROHIT; BASU, 2000; O'BRIEN et al., 1990).

Uma das maneiras de otimizar os candidatos **45-49**, incluindo seus isômeros (*R*) e (*S*), seria a proposição de substituições bioisostéricas do grupo nitro na concepção de novos derivados, com o intuito de reduzir a toxicidade e elevar o potencial terapêutico dessa classe de compostos. Assim, foram selecionados os 20 fragmentos mais bem ranqueados da base de dados do programa BROOD (OpenEye, 2010) em relação à similaridade de forma e eletrostática ao grupo nitro (Tabela 9).

Tabela 9. Fragmentos sugeridos para substituição do grupo nitro dos derivados benzoxazepínicos acoplados a purinas.

Nº	Fragmento	Grupo toxicofórico	Toxicidade
41	-CN	-	-
42	-COOH	-	-
43	-CF ₂ Cl	-	-
44	-CHFCl	Dihaletto geminal	mutagenicidade
45	-CF(Cl)OH	-	-
46	-CF ₃	-	-
47	-CHF ₂	-	-
48	-NOCH ₃	-	-
49	-CFCl ₂	-	-
50	-SO ₃ H	-	-
51	-SO ₂ CH ₃	-	-
52	-SONH ₂	-	-
53	-SO ₂ NH ₂	Aril sulfonamida	Fototoxicidade Hiperplasia urotelial de bexiga
54	COH(NH ₂)CH ₃	-	-
55	-CF ₂ OH	-	-
56	-OCN	cianato	Sensibilização cutânea
57	-OCH ₂ F	-	-
58	-F	-	-
59	-CH(Cl)OH	Agente alquilante	Carcinogenicidade
60	-CH(F)OH	-	-

Alguns dos fragmentos sugeridos também são conhecidos por induzir efeitos tóxicos, incluindo mutagenicidade, carcinogenicidade, fototoxicidade, hiperplasia urotelial e sensibilização cutânea (Tabela 9). Embora a presença dos grupamentos toxicofóricos não permita a confirmação do efeito tóxico sugerido para os novos derivados, pode ser escolhida como um fator na priorização na seleção dos fragmentos para orientação da futura síntese de análogos, pois, dos 20 fragmentos sugeridos, 16 não apresentam grupamentos toxicofóricos segundo a base de dados do programa Derek (LHASA, 2007). As sugestões aqui apresentadas

para substituição do grupo nitro na concepção de novos derivados benzoxazepínicos acoplados a bases nitrogenadas serão levadas a cabo pelo grupo colaborador de Química Orgânica e Farmacêutica da Universidad de Granada, permitindo a avaliação de novos derivados que, ao menos do ponto de vista teórico, não terão a mesma limitação tóxica inerente aos protótipos que apresentam o grupo nitro aromático em sua composição.

5. CONCLUSÕES

A proteína hnRNP K é um atrativo alvo molecular para o planejamento de fármacos, sobretudo a partir de descobertas recentes sobre o seu envolvimento em alguns tipos de câncer, através de mecanismo de ativação do promotor do gene *c-Myc*. Assim, o planejamento de ligantes tendo como alvo a proteína hnRNP K pode representar um novo paradigma no desenvolvimento de uma nova classe de fármacos antitumorais capazes de controlar a via *c-Myc* através do impedimento da complexação natural dos domínios KH da hnRNP K com nucleotídeos.

A identificação *in vitro* dos compostos **11** e **17** como ligantes da hnRNP K corrobora que os métodos de química computacional podem ser extremamente úteis no processo de planejamento de substâncias bioativas, neste caso evidenciando detalhes da estrutura do alvo molecular e guiando a busca de moléculas com propriedades para ligação ao alvo desejado. A identificação dos dois inibidores da proteína hnRNP K aqui descritos, em ensaios de ligação, constitui-se em um dado pioneiro que pode preencher “gaps” e ajudar a entender melhor como funcionaria do ponto de vista molecular o bloqueio de um domínio KH, com a determinação de padrões estruturais de compostos ativos.

A proposição dos modos de ligação dos compostos **11** e **17** no domínio KH3 foi realizada utilizando estratégias de “docking”, campos de interação molecular e dinâmica molecular. Esta etapa é de suma importância para guiar futuras investigações com o objetivo de buscar novos ligantes e aperfeiçoar os protótipos já identificados, uma vez que o conhecimento das interações mais importantes com o sítio de ligação pode direcionar o desenho de moléculas mais específicas para a hnRNP K. Simulações de dinâmica molecular revelaram que algumas das orientações obtidas por “docking” para ambos compostos são viáveis e podem subsidiar a derivação de uma relação estrutura-atividade capaz de auxiliar na proposição e busca de derivados com propriedades otimizadas de ligação no sítio. De fato, com a ajuda das simulações de “docking”, campos de interação e dinâmica molecular conclui-se que para apresentar atividade os compostos devem conter um núcleo central hidrofóbico, constituído por anéis aromáticos, capazes de interagir com o centro da fenda de ligação do domínio KH que é predominantemente hidrofóbica, e substituintes polares, imprescindíveis para realizar interações polares com os resíduos R40 e/ou R59.

Os compostos **11** e **17** também foram avaliados em ensaios celulares, com o intuito de observar suas capacidades de reduzir a viabilidade de células tumorais, uma vez que, com o bloqueio da atividade da hnRNP K, a via *c-Myc* estaria comprometida. Entretanto, os

resultados mostraram apenas uma tênue redução da viabilidade celular na presença dos ligantes, o que, de fato, já é um início na busca de compostos promissores, principalmente para os primeiros ligantes identificados para os domínios KH da hnRNP K. Assim, o bloqueio da atividade da hnRNP K em meio celular pode ter sido pouco eficiente, fato que poderia ser explicado, em teoria, pela moderada afinidade dos compostos **11** e **17** pelo sítio de ligação ou, até, pela dificuldade de acesso ao alvo em ambiente celular, por falta de especificidade. Para minimizar tal aspecto, foram sugeridos fragmentos que podem compor novos derivados dos compostos **11** e **17** capazes, do ponto de vista teórico, de manter interações iônicas ou ligações de hidrogênio com R40 e/ou R59. Tais fragmentos devem orientar a futura síntese de ligantes otimizados da hnRNP K.

A estratégia de busca por similaridade, por um lado, se mostrou eficiente em ajudar na descoberta de novos compostos capazes de se ligar aos domínios KH, entretanto nenhum dos compostos testados foi mais eficiente que os moldes originalmente ativos (compostos **11** e **17**). Do ponto de vista de enriquecimento de dados a estratégia se mostra promissora, permitindo criar mais subsídios para uma futura derivação de relação estrutura-atividade através da descoberta de novos ligantes, gerando diversidade química. Assim, torna-se mais fácil entender melhor como funciona a ligação aos domínios KH, permitindo intervenções futuras em moléculas conhecidas para planejar compostos otimizados capazes de ajudar, se possível, no tratamento terapêutico do câncer, mas também ajudar a entender como a inibição da proteína hnRNP K pode ajudar no tratamento e no entendimento clínico do processo neoplásico, além das outras proteína envolvidas em vias na qual a hnRNP K desempenha algum papel.

A síntese de derivados benzoxazepínicos acoplados a purinas foi realizada com o intuito de propor novas moléculas com atividade antitumoral, uma vez que esta estratégia já se mostrou eficiente, além de integrar o doutorando na área de síntese orgânica. Embora a síntese não tenha sido finalizada nos seis meses de estágio sandwich a experiência foi bastante positiva, gerando novos conhecimentos que contribuíram até a última etapa antes da síntese no núcleo benzoxazepínico. As próximas etapas devem compreender a síntese de derivados otimizados, com a substituição do grupo nitro aromático, reconhecido por sua toxicidade, por bioisósteros com potencial tóxico reduzido.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L.; LOPES, M. T. P. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, p. 118-129, 2005.

ALONSO, H.; BLIZNYUK, A. A.; GREASY, J. E. Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. **Medical Research Reviews**, v. 26, p. 531-568, 2006.

ALVAREZ, J. C. High-throughput docking as a source of novel drug leads. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, p. 365-370, 2004.

ANDERSEN, R. A.; ENOMOTO, M.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A. Carcinogenesis and inhibition of the Walker 256 tumor in the rat by trans-4-acetylaminostilbene, its N-hydroxy metabolite, and related compounds. **Cancer Research**, v. 24, p. 128-143, 1964.

BABER, J. L.; LIBUTTI, D.; LEVENS, D.; TJANDRA, N. High precision solution structure of the C-terminal KH domain of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K, a *c-myc* transcription factor. **Journal of Molecular Biology**, v. 289, p. 949-962, 1999.

BACKE, P. H.; MESSIAS, A. C.; RAVELLI, R. B. G.; SATTLER, M.; CUSACK, S. X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. **Structure**, v. 13, p. 1055-1067, 2005.

BAHRAMI, K.; KHODAEI, M. M.; SOHEILIZAD, M. Direct conversion of thiols to sulfonyl chlorides and sulfonamides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 74, p. 9287-9291, 2009.

BALDI, P.; NASR, R. When is chemical similarity significant? The statistical distribution of chemical similarity scores and its extreme values. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, p. 1205-1222, 2010.

BARRATT, M. D.; BASKETTER, D. A. Possible origin of the skin sensitisation potential of isoeugenol and related compounds. **Contact Dermatitis**, v. 27, p. 98-104, 1992.

BOMSZTYK, K.; DENISENKO, O.; OSTROWSKI, J. HnRNP K: one protein multiple processes. **Bioessays**, v. 26, p. 629-638, 2004.

BOMSZTYK, K.; SEUNINGEN, I. V.; SUZUKI, H.; DENISENKO, O.; OSTROWSKI, J. Diverse molecular interactions of the hnRNP K protein. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 403, p. 113-115, 1997.

BRADDOCK, D. T.; BABER, J. L.; LEVENS, D.; CLORE, G. M. Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. **The EMBO Journal**, v. 21, p.3476-3485, 2002.

BRADLEY, P. J.; ZUTSHI, B.; NUTTING, C. M. An audit of clinical resources available for the care of head and neck cancer patients in England. **Clinical Oncology**, v. 17, p. 604-609, 2005.

BROOD, version 2.0.0, OpenEye Scientific Software, USA, Sante Fe, 2010.

BURLINSON, B.; MORRISS, S. H.; GATEHOUSE, D. G.; TWEATS, D. J. Genotoxicity studies of gastric acid inhibiting drugs. **Lancet**, v. 335, p. 419-420, 1990.

CARDINALLI, M.; PIETRASZKIEWICZ, H.; ENSLEY, J. F.; ROBBINS, K. C. Tyrosine phosphorylation as a marker for aberrantly regulated growth-promoting pathways in cell lines derived from head and neck malignancies. **International Journal of Cancer**, v. 61, p. 98-103, 1995.

CAROSATI, E.; SCIABOLA, S.; CRUCIANI, G. Hydrogen bonding interactions of covalently bonded fluorine atoms: from crystallographic data to a new angular function in the GRID force Field. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 5114-5125, 2004.

CARPENTER, B.; McKAY, M.; DUNDAS, S. R.; LAWRIE, L. C.; TELFER, C.; MURRAY, G. I. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is over expressed, aberrantly localised and is associated with poor prognosis in colorectal cancer. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. 921-927, 2006.

CLAUSSEN, H.; BUNING, C.; RAREY, M.; LENGAUER, T. FlexE: efficient molecular docking considering protein structure variations. **Journal of Molecular Biology**, v. 308, p. 377-395, 2001.

COLLIER, A. C.; PRITSOS, C. A. The mitochondrial uncoupler dicumarol disrupts the MTT assay. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 281-287, 2003.

CORRALES, J. A. M.; JIMÉNEZ, A. A.; CONEJO-GARCIA, A.; CHAVES, A. G.; CRUZ-LÓPEZ, O.; BOULAIZ, H.; SERRANO, F. R.; QUESADA, M. P.; SANZ, A. I. J.; RUIZ, J. M. G.; LAZARTE, D. C.; CAMPOS, J. M. Enantiómeros de derivados benzoheteroepínicos y su uso como agents anticancerígenos. Espanha. Patente, nº PCT/ES2011/070187. 18-03-2011.

COREY, E. J.; VENKATESWARLU, A. Protection of hydroxyl groups as tert-butyldimethylsilyl derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 94, p. 6190-6191, 1972.

CRUCIANI, G.; PASTOR, M.; GUBA, W. Volsurf: a new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, S. 02, p. S29-S39, 2000.

DAUBER-OSGUTHORPE, P.; ROBERTS, V. A.; OSGUTHORPE, D. J.; WOLFF, J.; GENEST, M.; HAGLER, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *E. coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 4, p. 31-47, 1988.

Derek for Windows, version 10.0.2, Lhasa ltd, UK, Leeds, 2007.

de la TORRE, R. A.; ESPINOSA-AGUIRRE, J. J.; CORTINAS de NAVA, C.; IZQUIERDO, T.; MORON, F. Genotoxic activity of mebendazole in *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**, v. 305, p. 139-144, 1994.

de SOUZA, S. J.; CAMARGO, A. A.; BRIONES, M. R. S.; COSTA, F. F.; NAGAI, M. A.; ALMEIDA, S. V.; ZAGO, M. A.; ANDRADE, L. E. C.; CARRER, H.; EL-DORRY, H. F. A.; ESPREAFICO, E. M.; HABR-GAMA, A.; GIANELLA-NETO, D.; GOLDMAN, G. H.; GRUBER, A.; HACKEL, C.; KIMURA, E. T.; MACIEL, R. M. B.; MARIE, S. K. N.; MARTINS, E. A. L.; NÓBREGA, M. P.; PAÇO-LARSON, M. L.; PARDINI, M. I. M. C.; PEREIRA, G. G.; PESQUERO, J. B.; RODRIGUES, V.; ROGATTO, S. R.; DA SILVA, I. D. C. G.; SOGAYAR, M. C.; SONATI, M. F.; TAJARA, E. H.; VALENTINI, S. R.; ACENCIO, M.; ALBERTO, F. L.; AMARAL, M. E. J.; ANEAS, I.; BENGTSON, M. H.; CARRARO, D. M.; CARVALHO, A. F.; CARVALHO, L. H.; CERUTTI, J. M.; CORRÊA, M. L. C.; COSTA, M. C. R.; CURCIO, C.; GUSHIKEN, T.; HO, P. L.; KIMURA, E.; LEITE, L. C. C.; MAIA, G.; MAJUMDER, P.; MARINS, M.; MATSUKUMA, A.; MELO, A. S. A.; MESTRINER, C. A.; IRACCA, E. C.; MIRANDA, D. C.; NASCIMENTO, A. L. T. O.; NÓBREGA, F. G.; OJOPI, E. P. B.; PANDOLFI, J. R. C.; PESSOA, L. G.; RAHAL, P.; RAINHO, C. A.; RO'S, N.; DE SÁ, R. G.; SALES, M. M.; DA SILVA, M. P.; SILVA, T. C.; JUNIOR, W. S.; SIMÃO, D. F.; SOUSA, J. F.; STECCONI, D.; TSUKUMO, F.; VALENTE, V.; ZALCBERG, H.; BRENTANI, R. R.; REIS, L. F. L.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A. J. G. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, p. 12690-12693, 2000.

DÍAZ-GAVILÁN, M.; GÓMEZ-VIDAL, J. A.; RODRÍGUEZ-SERRANO, F.; MARCHAL, J. A.; CABA, O.; ARÁNEGA, A.; GALLO, M. A.; ESPINOSA, A.; CAMPOS, J. M. Anticancer activity of (1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepine-3-yl)-pyrimidines and -purines against the MCF-7 cell line: Preliminary cDNA microarray studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 1457-1460, 2008.

DÍAZ-GAVILÁN, M.; RODRÍGUEZ-SERRANO, F.; GÓMEZ-VIDAL, J. A.; MARCHAL, J. A.; ARÁNEGA, A.; GALLO, M. A.; ESPINOSA, A.; CAMPOS, J. M. Synthesis of tetrahydrobenzoxazepine acetals with electron-withdrawing groups on the nitrogen atom. Novel scaffolds endowed with anticancer activity against breast cancer cells. **Tetrahedron**, v. 60, p. 11547-11557, 2004.

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

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

GREENE, N.; JUDSON, P. N.; LANGOWSKI, J. J.; MARCHANT, C. A. Knowledge-based expert systems for toxicity and metabolism prediction: DEREK, StAR and METEOR. **SAR and QSAR in Environmental Research**, v. 10, p. 299-314, 1999.

GRIDELLI, C.; BARESCINO, M. A.; SCHETTINO, C.; ROSSI, A.; MAIONE, P.; CIARDIELLO, F. Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development. **The Oncologist**, v. 12, p. 840-849, 2007.

GRIFFITH, R.; LUU, T. T. T.; GARNER, J.; KELLER, P. A. Combining structure-based drug design and pharmacophores. **Journal of Molecular Graphics and modeling**, v. 23, p. 439-446, 2005.

GROCHOWSKI, E.; HILTON, B. D.; KUPPER, R. J.; MICHEJDA, C. J. Mechanism of the triphenylphosphine and diethyl azodicarboxylate induced dehydration reactions (Mitsunobu reaction). The central role of pentavalent phosphorus intermediates. **Journal of the American Chemical Society**, v. 104, p. 6876-6877, 1982.

HAACK, T.; ERDINGER, L.; BOCHE, G. Mutagenicity in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 of nitroso and respective hydroxylamine compounds. **Mutation Research**, v. 491, p. 183-193, 2001.

HOLDER, J. W. Nitrobenzene carcinogenicity in animals and human hazard evaluation. **Toxicology and Industrial Health**, v. 15, p. 445-457, 1999.

HUTH, J. R.; YU, L.; COLLINS, I.; MACK, J.; MENDOZA, R.; ISAAC, B.; BRADDOCK, D. T.; MUCHMORE, S. W.; COMESS, K. M.; FESIK, S. W.; CLORE, G. M.; LEVENS, D.; HAJDUK, P. J. NMR-driven discovery of benzoylanthranilic acid inhibitors of far upstream element binding protein binding to the human oncogene c-myc promoter. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 4851-4857, 2004.

Insight II, version 2005, Accelrys: CA, USA, 2005.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, INCA, 2007.

KITCHEN, D. B.; DECORNEZ, H.; FURR, J. R.; BAJORATH, J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, p. 935-949, 2004.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.; ZITO, S. W. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry**, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 6th edition., 2008.

LEOPOLDINO, A. M.; CARREGARO, F.; SILVA, C. H. T. P.; FEITOSA, O.; MANCINI, U. M.; FREITAS, J. M.; TAJARA, E. H. **Sequence and transcriptional study of hnRNP K pseudogenes, and expression and molecular modeling analysis of hnRNP K isoforms.** *Genome*, v. 50, p. 451-462, 2007.

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

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

LIU, T.; LIN, Y.; WEN, X.; JORISSEN, R. N.; GILSON, M. K. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic Acids Research**, v. 35, Database issue, p. D198-D201, 2007.

LÓPEZ-CARA, L. C.; CONEJO-GARCÍA, A.; MARCHAL, J. A.; MACCHIONE, G.; CRUZ-LÓPEZ, O.; BOULAIZ, H.; GARCÍA, M. A.; RODRÍGUEZ-SERRANO, F.; RAMÍREZ, A.; CATIVIELA, C.; JIMÉNEZ, A. I.; GARCÍA-RUIZ, J. M.; CHOQUESILLO-LAZARTE, D.; ARÁNEGA, A.; CAMPOS, J. M. New (RS)-benzoxazepin-purines with antitumour activity: the chiral switch from (RS)-2,6-dichloro-9-[1-(p-nitrobenzenesulfonyl)-1,2,3,5-tetrahydro-4,1-benzoxazepin-3-yl]-9H-purine. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 249-258, 2011.

MARCU, L.; DOORN, T.; OLVER, I. Cisplatin and radiotherapy in the treatment of locally advanced head and neck cancer: a review of their cooperation. **Acta Oncologica**, v. 42, p. 315-325, 2003.

MARSHALL, G. R. Introduction to chemoinformatics in drug discovery – A personal view. In: OPREA, T. I. **Chemoinformatics in drug discovery**. Weinheim: WILEY-VHC, 2004. p. 1-22.

MARTELLI, A.; MATTIOLI, F.; MERETO, E.; BRAMBILLA, C. G.; SINI, D.; BERGAMASCHI, G.; BRAMBILLA, G. Evaluation of omeprazole genotoxicity in a battery of in vitro and in vivo assays. **Toxicology**, v. 130, p. 29-41, 1998.

MCGURK, M.; GOODGER, N. M. Head and neck cancer and its treatment: historical review. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 38, p. 209-220, 2000.

Meteor, version 10.0.2, Lhasa ltd, UK, Leeds, 2007.

MILLER, E. C. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: presidential address. **Cancer Research**, v. 38, p. 1479-1496, 1978.

MILLER, J. A. Carcinogenesis by chemicals: an overview – G.H.A. Clowes memorial lecture. **Cancer Research**, v. 30, p. 559-576, 1970.

MITSUNOBU, O.; YAMADA, M. Preparation of esters of carboxylic and phosphoric acid via quaternary phosphonium salts. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 40, p. 2380-2382, 1967.

MUSUNURU, K.; DARNELL, R.B. Determination and augmentation of RNA sequence specificity of the Nova K-homology domains. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. 4852-4861, 2004.

O'BRIEN, P. J.; WONG, W. C.; SILVA, J.; KHAN, S. Toxicity of nitrobenzene compounds towards isolated hepatocytes: dependence on reduction potential. **Xenobiotica**, v. 20, p. 945-955, 1990.

OHKUMA, Y.; KAWANISHI, S. Oxidative DNA damage by a metabolite of carcinogenic and reproductive toxic nitrobenzene in the presence of NADH and Cu(II). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 257, p. 555-560, 1999.

OSTROWSKI, J.; BOMSZTYK, K. Nuclear shift of hnRNP K protein in neoplasms and other states of enhanced cell proliferation. **British Journal of Cancer**, v. 89, p. 1493-1501, 2003.

PASTOR, M.; CRUCIANI, G.; McLAY, I.; PICKETT, S.; CLEMENTI, S. GRID-Independent Descriptors (GRIND): a novel class of alignment-independent three-dimensional descriptors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, p. 3233-3243, 2000.

PATRICK, G. L. **An introduction to medicinal chemistry**. Fourth Edition, New York: Oxford University Press, 2009.

PAZIEWSKA, A.; WYRWICS, L.S.; BUJNICKI, J.M.; BOMSZTYK, K.; OSTROWSKI, J. Cooperative binding of the hnRNP K three KH domains to mRNA targets. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v. 577, p. 134-140, 2004.

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

PUROHIT, V.; BASU, A. K. Mutagenicity of nitroaromatic compounds. **Chemical Research in Toxicology**, v. 13, p. 673-692, 2000.

REIS, E. M.; OJOPI, E. P. B.; ALBERTO, F. L.; RAHAL, P.; TSUKUMO, F.; MANCINI, U. M.; GIMARÃES, G. S.; THOMPSON, G. M. A.; CAMACHO, C.; MIRACCA, E.; CARVALHO, A. L.; MACHADO, A. A.; PAQUOLA, A. C. M.; CERUTTI, J. M.; DA SILVA, A. M.; PEREIRA, G. G.; VALENTINI, S. R.; NAGAI, M. A.; KOWALSKI, L. P.; VERJOVSKI-ALMEIDA, P.; TAJARA, E. H.; DIAS-NETO, E. Large-scale transcriptome analyses reveal new genetic marker candidates of head, neck and thyroid cancer. **Cancer Research**, v. 65, p. 1693-1699, 2005.

Revista Pesquisa FAPESP, v. 56, Ago. 2000

Revista Pesquisa FAPESP, Edição Especial FAPESP 40 anos, Jun. 2002.

RIDINGS, J. E.; BARRATT, M. D.; CARY, R.; EARNSHAW, C. G.; EGGINGTON, C. E.; ELLIS, M. K.; JUDSON, P. N.; LANGOWSKI, J. J.; MARCHANT, C. A.; PAYNE, M. P.; WATSON, W. P.; YIH, T. D. Computer prediction of possible toxic action from chemical structure: an update on the DEREK system. **Toxicology**, v. 106, p. 267-279, 1996.

RITTER, C. L.; CULP, S. J.; FREEMAN, J. P.; MARQUES, M. M.; BELAND, F. A.; MALEJKA-GIGANTI, D. **Chemical Research in Toxicology**, v. 15, p. 536-544, 2002.

RUIZ, M. T.; BERTELLI, E. P.; MANIGLIA, J. V.; RUBACK, M. J. C.; BERTOLLO, M. G. Epidemiologia e biomarcadores em câncer de cabeça e pescoço. **Arquivos em Ciências da Saúde**, v. 13, p. 34-38, 2006.

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

SCIABOLA, S.; BARONI, M.; CAROSATI, E.; CRUCIANI, G. Recent improvements in the GRID force field. 1. The docking procedure GLUE. **Proceedings of the 15th European Symposium on Structure-activity Relationships (QSAR) and Molecular Modelling**, p. 47-49, 2006.

SEILER, J. P. The mutagenicity of benzimidazole and benzimidazole derivatives. VI. Cytogenetic effects of benzimidazole and benzimidazole derivatives in the bone marrow of the mouse and the Chinese hamster. **Mutation Research**, v. 40, p. 339-347, 1976.

SEILER, J. P. Toxicology and genetic effects of benzimidazole compounds. **Mutation Research**, v. 32, p. 151-167, 1975.

SILVA, V. B. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNP K e ligantes**. 2008. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

SILVA, V. B.; ALMEIDA, J. R.; SILVA, C. H. T. P. General aspects of molecular interaction fields in drug design. In: TAFT, C. A.; TOMICH, C. H. T. P. **New Developments in Medicinal Chemistry**. Benthan eBooks, 2011, p. 70-78.

SIMON-HETTICH, B.; ROTHFUSS, A.; STEGER-HARTMANN, T. Use of computer-assisted prediction of toxic effects of chemical substances. **Toxicology**, v. 224, p. 156-162, 2006.

SNYDER, R. D.; PEARL, G. S.; MANDAKAS, G.; CHOY, W. N.; GOODSID, F.; ROSENBLUM, I. Y. Assessement of the sensitivity of the computational programs DEREK, TOPAK, and MCASE in the prediction of the genotoxicity of pharmaceutical molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 43, p. 143-158, 2004.

TESTA, B.; BALMAT, A.; LONG, A.; JUDSON, P. Predicting drug metabolism - An evaluation of the expert system METEOR. **Chemistry & Biodiversity**, v. 02, p. 872-885, 2005.

TOMONAGA, T.; LEVENS, D. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a DNA-binding transactivator. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, p. 4875-4881, 1995.

TURESKEY, R. J.; LANG, N. P.; BUTLER, M. A.; TEITEL, C. H.; KADLUBAR, F. F. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. **Carcinogenesis**, v. 12, p. 1839-1845, 1991.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MULRRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins: structure, function and genetics**, v. 52, p. 609-623, 2003.

VERNA, L.; WHYSNER, J.; WILLIAMS, G. M. 2-Acetylaminofluorene mechanistic data and risk assessment: DNA reactivity, enhanced cell proliferation and tumor initiation. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 71, p. 83-105, 1996.

XU, S.; HELD, I.; KEMPF, B.; MAYR, H.; STEGLICH, W.; ZIPSE, H. The DMAP-catalyzed acetylation of alcohols – a mechanistic study (DMAP = 4-(dimethylamino)pyridine). **Chemistry – A European Journal**, v. 11, p. 4751-4757, 2005.

WADE, R. C.; CLARK, K. J.; GOODFORD, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 1. Ligand probe groups with the ability to form two hydrogen bonds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 140-147, 1993.

WADE, R. C.; GOODFORD, P. J. Further development of hydrogen bond functions for use in determining energetically favorable binding sites on molecules of known structure. 2. Ligand probe groups with the ability to form more than two hydrogen bonds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 36, p. 148-156, 1993.

WATSON, P. H.; PON, R. T.; SHIU, R. P. C. Inhibition of c-myc expression by phosphorothioate antisense oligonucleotide identifies a critical role for c-myc in the growth of human breast cancer. **Cancer Research**, v. 51, p. 3996-4000, 1991.

WILLETT, P. Similarity-based approaches to virtual screening. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, p. 603-606, 2003.

WILLETT, P. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. **Drug Discovery Today**, v. 11, p. 1046-1053, 2006.