

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS**

Lívia de Barros Salum

Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais

São Carlos

2011

LIVIA DE BARROS SALUM

Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Adriano Andricopulo

Versão corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos

2011

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Salum, Livia de Barros
Planejamento de ligantes da tubulina com
propriedades antitumorais / Livia de Barros Salum;
orientador Adriano Defini Andricopulo - versão
corrigida -- São Carlos, 2011.
220 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2011.

1. Câncer . 2. Tubulina. 3. Química medicinal. 4.
Ensaio de polimerização. 5. Análises de alto
conteúdo. I. Andricopulo, Adriano Defini, orient.
II. Título.

AGRADECIMENTOS

A Deus, às minhas irmãs Samantha Salum, Lorena Torres e Kamila Nery e ao Napoleão Valadares e ao Vitor Viterbo, pelo amor, força e compreensão. Aos meus pais.

Ao Prof. Dr. Adriano Andricopulo pelas oportunidades.

Ao Dr. Andreas Vogt e ao Prof. Dr. Billy Day, da Universidade de Pittsburgh, pela oportunidade e orientação durante o doutorado sanduíche, na Universidade de Pittsburgh, EUA. Ao Dr. Hikmat Daghestani e à Laura Vollmer pela paciência e colaboração na execução dos experimentos. Ao doutorando Daniel Brody pelas importantes discussões.

Ao Profs. Drs. Eduardo Horjales e Richard Garratt pelo exemplo. Ao Prof. Dr. Igor Polikarpov pelo apoio. Aos Profs. Dr. Carlos Montanari e Dr. Andrei Leitão pelos primeiros incentivos nos estudos em Química Medicinal. Aos professores da Faculdade de Farmácia da UFMG e aos meus primeiros orientadores Jenner Karlisson Pimenta dos Reis, Luís Orlando Ladeira e Edward de Sousa, por suas contribuições à minha formação.

Aos professores Dra. Heloísa Beraldo, Dra. Káthia Honório, Dr. Rafael Guido, Dr. Luiz Carlos Dias, Dra. Tânia Creczynski-Pasa, Dra. Maria Cláudia Santos Silva, Dr. Ricardo Nunes, Dr. Rosendo Yunes, Dra. Vanderlan Bolzani, Dra. Rafaela Ferreira, Dra. Deise Borchhardt, Dra. Tatiane Balliano, Dr. Gustavo Trossini, Dra. Carolina Horta e Dr. Wanius Garcia pelas significativas e produtivas discussões e colaborações.

Aos colegas e amigos de trabalho Dra. Ana Carolina Figueira, Dra. Louise Chiaradia, Dra. Daniela Trivella, Dr. Tiago Moda, Me. Leonardo Lima, Ma. Wanessa Altei, Ma. Fernanda Batista, Ma. Alessandra Mascarello, Ma. Josane Lessa, Me. Rafael Vieira, Ma. Marília Valli, Me. Victor Caldas e aos doutorandos Ricardo Nascimento e Daiana Martil pelas importantes e férteis colaborações e discussões.

Aos demais amigos, Bjorn Ahlsted, dona Áurea e sr. Joaquim, dona Carmem, profa. Sílvia Stafforini, Dr. Alexandre Cassago, Heline Moreira, Mariane Leite e Mariana Laureano.

Ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, aos demais colegas, professores e funcionários pela colaboração e suporte para a realização deste trabalho.

À FAPESP e a CAPES pelo suporte financeiro.

*“Pois nada tem valor para o homem enquanto homem,
se o não puder fazer com paixão.”*
Max Weber (A Ciência como Vocação)

RESUMO

SALUM, L. B. **Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais.** 2011. 220 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

O planejamento de moduladores da dinâmica dos microtúbulos, a partir da ligação à $\alpha\beta$ -tubulina, constitui importante estratégia para a terapia do câncer. Os efeitos de inibição da polimerização da tubulina ou de estabilização dos microtúbulos são promovidos pela interação de compostos em cavidades específicas da proteína alvo. A interferência com a dinâmica dos microtúbulos nas células em rápida multiplicação provoca o bloqueio do ciclo celular, disparando sinais bioquímicos que culminam em apoptose. Os taxanos são os agentes antimitóticos mais importantes dentre os estabilizadores de microtúbulos, ao passo que os alcalóides da vinca e a colchicina são membros representativos dos inibidores da polimerização. Entretanto, o aparecimento de resistência, baixa biodisponibilidade e reações adversas graves são fatores que têm impulsionado a pesquisa por novos agentes anticâncer. Dentre os ligantes identificados recentemente para o sítio do taxol, o discodermolídeo e a dictioestatina, produtos naturais de origem marinha, são potentes estabilizadores de microtúbulos que apresentam maior solubilidade que o taxol e atividade contra células de câncer resistentes aos taxanos. Por essa razão, o modo de ligação desses compostos à cavidade de interação da β -tubulina tem sido objeto de investigação. Modelos preditivos de HQSAR foram desenvolvidos para derivados sintéticos do discodermolídeo e utilizados em conjunto com estudos baseados na estrutura do receptor, em concordância com evidências experimentais, para a proposição de modelos de interação para os análogos na cavidade do taxol. Os modelos de conformação bioativa foram utilizados no alinhamento estrutural do conjunto de dados para estudos de QSAR 3D CoMFA e comparação com o alinhamento baseado nas estruturas minimizadas dos ligantes. A caracterização de padrões de reconhecimento molecular foi útil para a proposição de um modelo farmacofórico baseado nas estruturas dos produtos naturais estabilizadores de microtúbulos. Um modelo farmacofórico simplificado foi integrado ao processo de triagem virtual consistindo na aplicação de filtros hierárquicos sucessivos para a identificação de novos estabilizadores de microtúbulos. Caseobliquinas foram ensaiadas como estabilizadoras de microtúbulos, enquanto que intermediários sintéticos da dictioestatina foram avaliados quanto aos seus efeitos na polimerização da tubulina. Nos últimos anos, tem sido intensificada a busca por

novos ligantes do sítio da colchicina, dentre os quais os indóis estão entre os mais relevantes. Para quatro conjuntos de dados totalizando 170 derivados de indóis, modelos de HQSAR foram desenvolvidos para a avaliação virtual de uma base de dados. Estudos de QSAR 3D CoMFA e CoMSIA baseados nos farmacóforos foram comparados para 3 conjuntos de dados. Os resultados sugerem que o núcleo indólico pode interagir de maneiras diferentes na cavidade de interação da proteína. Chalconas do tipo 1, inspiradas em ligantes clássicos do sítio da colchicina, foram avaliadas em ensaios celulares e de polimerização da tubulina, levando a síntese e avaliação de uma nova série de chalconas com propriedade antiproliferativa significativa. Por outro lado, derivados de *N*-acil-hidrazonas apresentaram atividade antimitótica semelhante à colchicina, enquanto as tiosemicarbazonas citotóxicas não interagiram diretamente com a tubulina.

Palavras-chave: Câncer. Tubulina. Química medicinal. Ensaios de polimerização. Análises de alto conteúdo

ABSTRACT

SALUM, L. B. **Design of tubulin ligands with antitumor properties**. 2011. 220 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

Inhibition of microtubule function is one of the most important approaches to anticancer therapy. Two main effects can be elicited by tubulin/microtubule-interactive agents: inhibition of tubulin assembly or microtubule stabilization. Interference with either the assembly or disassembly of microtubules within the mitotic spindle in rapidly dividing cells disrupts the normal process of cell division and provokes chemical signals that induce apoptosis. On one hand, taxanes are the most prominent among the microtubule-stabilizing antimitotic agents, while on the other hand, colchicine and the vinca alkaloids are representative members of the tubulin polymerization inhibitors. However, due to poor pharmacokinetic properties, high toxicity and resistance, their clinical utility has been limited, generating new opportunities for the development of novel anticancer agents. In recent years, structurally diverse taxoid-site ligands have been identified, including the potent microtubule-stabilizers discodermolide and dictyostatin. These marine sponge-derived natural products have higher water solubility than taxol and exhibit activity against taxane-resistant cell lines. Therefore, the elucidation of their binding modes is important in drug design. Predictive conformation-independent hologram QSAR models were developed for a series of synthetic discodermolide analogs as antiproliferative agents. Receptor-based studies were integrated with molecular recognition patterns, in agreement with experimental evidences, leading to ligand-binding conformations for discodermolide analogs in the taxol-site. The bioactive conformation models were used to the structural alignment of the data set for the development of 3D QSAR CoMFA models, and for comparison with the models constructed with the rigid-body alignment based on minimized structures of the ligands. A set of structural features related to the interaction with the taxol cavity was identified and the molecular recognition patterns were employed to the construction of pharmacophore models based on the microtubule-stabilizing natural products. A final simplified pharmacophore model was integrated in a virtual screening procedure consisting of consecutive hierarchical filters targeting the identification of novel microtubule-stabilizers. Caseobliquins were screened as microtubule-stabilizers, while intermediates for the synthesis of dictyostatin were evaluated by their effects on tubulin assembly. Recently, the search for more simple anti-tubulin agents has renewed the interest in the development of colchicine analogs, often discarded for their high toxicity. Considering

the structurally diverse ligands of the colchicine site, the indole derivatives are among the most important ones. Hologram QSAR models were developed for four data sets consisting of 170 indole derivatives, and used to evaluate a data set of commercially available compounds. Pharmacophore-based 3D QSAR CoMFA and CoMSIA models were constructed and compared to three of the individual data sets. The results indicated that the indole nucleus bind to the protein cavity in different ways. Type 1 chalcones, designed based on classical colchicine site ligands, have been screened for their anti-proliferative activity and tubulin assembly inhibition, leading to the synthesis and assessment of a novel series of chalcone analogs with substantial antiproliferative properties. Some *N*-acylhydrazone derivatives behaved as mitotic arresters in a way similar to that of colchicine, while cytotoxic thiosemicarbazones did not exhibit tubulin-interacting properties.

Keywords: Cancer. Tubulin. Medicinal chemistry. Polymerization assays. High-content analyses

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 -	Principais tipos de câncer na população brasileira, nos gêneros masculino e feminino (números de 2008, excetuando o câncer de pele não melanoma) ...	31
Figura 1.2 -	Etapas do ciclo celular. Na fase G1 (<i>gap1</i>), a célula aumenta de tamanho e se prepara para a replicação do DNA, que ocorre na fase S (síntese). Na fase G2 (<i>gap2</i>) a célula se prepara para a fase M (mitose). As novas células-filhas imediatamente iniciam novo ciclo. Alternativamente, as células podem parar de se dividir temporariamente ou permanentemente. Compostos capazes de regular as fases G ₂ e M impedem com que a multiplicação celular se concretize	32
Figura 1.3 -	Estrutura química dos fármacos antitumorais usados no tratamento do câncer	33
Figura 1.4 -	Estrutura do dímero de $\alpha\beta$ -tubulina (código PDB: 1JFF). Cada monômero consiste dos domínios de ligação a nucleotídeos (rosa), de interação com ligantes (verde), e de ligação a proteínas associadas (amarelo). O taxol, fármaco com potente ação antitumoral, é mostrado na cavidade da alça M no monômero de β -tubulina	34
Figura 1.5 -	Dinâmica de polimerização/despolimerização dos dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, mostrando a perda de dímeros em uma das extremidades e adição de dímeros na outra extremidade. Os microtúbulos são resultantes do empacotamento dos protofilamentos lado a lado. Na presença de GTP, a polimerização é favorecida e na presença de GDP o processo inverso é mais favorável	35
Figura 1.6 -	Produtos naturais estabilizadores de microtúbulos com potente ação antitumoral	36
Figura 1.7 -	Produtos naturais estabilizadores de microtúbulos. A) cicloestrepina, B) sarcodictina A, C) eleuterobina e D) laulimalídeo	37
Figura 1.8 -	Sítios distintos de interação para inibidores da polimerização de microtúbulos. Análogo de colchicina, na interface $\alpha\beta$ (rosa) e vimblastina, na interface entre dois heterodímeros (verde). Código PDB: 1Z2B	39
Figura 1.9 -	Ligantes do sítio da colchicina, que são inibidores da polimerização dos microtúbulos	39
Figura 1.10 -	Compostos contendo o núcleo indol que apresentam atividade inibitória da polimerização da tubulina	40
Figura 1.11 -	Esquema de evolução típica da fase pré-clínica no processo de descoberta de novos fármacos	40
Figura 1.12 -	Etapas características de identificação, seleção e otimização dos compostos durante o processo de planejamento de novos fármacos. Nos estágios iniciais, as pesquisas se concentram na identificação e seleção de alvos moleculares com elevado potencial terapêutico e na pesquisa por moléculas pequenas capazes de modular o alvo validado. As moléculas bioativas podem ser provenientes de fontes diversas, como produtos naturais, síntese química e coleções combinatórias. Também podem ser selecionadas a partir de procedimentos de triagem virtual e devem ter suas propriedades biológicas determinadas experimentalmente. Em geral, apresentam baixa afinidade. Moléculas que apresentem propriedades desejáveis, como	41

potência e seletividade, são selecionadas como compostos-líderes. Coleções dirigidas de compostos podem, então, ser geradas. Na fase seguinte, os compostos selecionados são otimizados em relação às suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas, físico-químicas e de toxicidade. São realizados vários testes *in vitro* e *in vivo* para a avaliação do potencial terapêutico e segurança dos compostos eleitos, para que sejam introduzidos em fases clínicas para testes em humanos. Os compostos que apresentam propriedades múltiplas otimizadas são selecionados como candidatos a fármacos

Figura 3.1 -	Organograma do processo iterativo de SBDD. As características químicas do sítio de ligação do alvo biológico, conhecidas a partir de estruturas de cristalografia de raios-X ou por RMN, devem ser cuidadosamente examinadas. Modelos por homologia também podem ser construídos. A integração dos métodos <i>in silico</i> (triagens virtuais, geração de farmacóforos, docagens, estudos de QSAR 3D) com métodos experimentais (síntese, ensaios biológicos, cristalografia) aumenta as chances de identificação de um candidato a fármaco que possa prosseguir em fases clínicas de desenvolvimento	52
Figura 3.2 -	Esquema ilustrativo do processo de docagem molecular	54
Figura 3.3 -	Etapas de um processo típico de SBVS	56
Figura 3.4 -	Etapas da construção um modelo farmacofórico, mostrando o mapeamento por sondas hidrofóbicas (amarelo) e hidrofílicas (azul) da cavidade de interação do receptor de estrógeno. Regiões importantes de ligação são traduzidas na proposição do modelo farmacofórico final	58
Figura 3.5 -	Representação do processo de otimização de moléculas bioativas até a seleção de um candidato a fármaco, demonstrando a importância dos métodos de SAR e QSAR nesse processo	60
Figura 3.6 -	Esquema ilustrativo do processo de geração dos hologramas moleculares e das etapas envolvidas na geração de um modelo de HQSAR	63
Figura 3.7 -	Integração dos modelos de HQSAR com outras estratégias de química medicinal	65
Figura 3.8 -	Etapas envolvidas na geração de um modelo de CoMFA. Moduladores do receptor de estrógeno são mostrados como exemplo. Os mapas de contorno resultantes da modelagem de QSAR 3D, no interior da cavidade de interação do receptor nuclear, são mostrados como exemplo	67
Figura 3.9 -	Esquema da cavidade de interação do receptor de hormônios tireoidianos e do modelo farmacofórico baseado nas estruturas de um conjunto de moduladores desse receptor, construído utilizando os programas Galahad e UNITY. O modelo contém 2 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (verde), 2 grupos aromáticos (amarelo) e 2 superfícies estéricas (azul)	69
Figura 3.10 -	Ligante do sítio do taxol obtido por simplificação molecular do discodermolídeo	70
Figura 4.1 -	4',6,diamino-2-fenilindol, fluoróforo utilizado nos ensaios de polimerização da tubulina	73
Figura 4.2 -	Ensaio de polimerização da tubulina baseado em fluorescência. O fluoróforo DAPI emite na região do azul quando em solução. O máximo de emissão é em torno de 470 nm. Quando interage com os dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, a intensidade da emissão é aumentada e ligeiramente deslocada para menores valores de comprimento de onda (cerca de 445 nm), ou de maior energia (efeito hipercrômico e hipsocrômico). Para os experimentos, a	74

leitura é feita aproximadamente em 460 nm. Para a absorção/excitação, efeitos semelhantes são observados. Na presença de polímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, a intensidade da emissão (medida em unidades relativas de fluorescência, URF) é máxima. DAPI possui, ainda, maior afinidade pelo polímero do que pelo dímero de $\alpha\beta$ -tubulina. Na presença de estabilizadores de microtúbulos, como o Taxol em altas concentrações, a intensidade de emissão será maior que na ausência de ligantes. Quando inibidores da polimerização, como a colchicina em altas concentrações, são adicionados, não há aumento no sinal de emissão da fluorescência. A reação é acompanhada por um período de 60 min

Figura 4.3 -	Ensaio de polimerização da tubulina baseado em espalhamento de luz. Na presença de GTP, os dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, inicialmente em solução, formam polímeros que turvam a mistura reacional em extensão proporcional à formação dos polímeros. Na presença de estabilizadores de microtúbulos, como o Taxol em altas concentrações, o espalhamento de luz será maior que na ausência de ligantes. Quando inibidores da polimerização, como a colchicina em altas concentrações, são adicionados, não há aumento no sinal de absorvância a 350 nm, pois os heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina são solúveis. A reação é acompanhada por um período de 60 min	77
Figura 4.4 -	Fluxograma esquemático de um experimento de HCS, desde a questão biológica até a geração de conhecimento sobre o funcionamento celular. O ciclo é iterativo: variações de diversos parâmetros como linhagem celular, concentrações dos ligantes, tempos de tratamento, parâmetros a serem considerados e número/frequência de pontos a serem analisados devem ser apreciados. Durante a análise de dados, diferentes tipos de informação celular a partir do mesmo conjunto de imagens podem ser considerados	79
Figura 4.5 -	Esquema das etapas de um experimento de HCS para verificar se os compostos apresentam atividade antimetabólica. Coquetéis de anticorpos são utilizados para possibilitar a visualização das alterações fenotípicas das células estudadas por microscopia de fluorescência	80
Figura 5.1 -	As cavidades de interação do taxol (rosa) e da epotilona (azul) não são bem delimitadas	86
Figura 5.2 -	Taxol (rosa) e epotilona (azul) exploram a mesma cavidade de interação da β -tubulina (cinza) de maneiras diferentes. Resíduos importantes são mostrados em bastão na estrutura 1TVK	86
Figura 5.3 -	Integração de estratégias para o estudo da modulação da polimerização da tubulina por análogos do discodermolídeo: geração de fragmentos moleculares, construção de modelos de HQSAR, identificação de padrões de reconhecimento molecular e estudos de docagem molecular	88
Figura 5.4 -	O conjunto de dados de análogos do discodermolídeo apresenta variações estruturais nas regiões A, B e C	90
Figura 5.5 -	Valores de pIC_{50} estimados (azul) e preditos (rosa) <i>versus</i> valores experimentais correspondentes para os análogos do discodermolídeo	96
Figura 5.6 -	Mapas de contribuição do HQSAR para A) o discodermolídeo (36) e B) o seu análogo mais potente (47)	97
Figura 5.7 -	Fragmentos moleculares com contribuições importantes para a citotoxicidade, preditos pelos modelos de HQSAR	98
Figura 5.8 -	Modelos 3D para o discodermolídeo no interior da cavidade da β -tubulina. Os átomos de hidrogênio foram eliminados para maior clareza	100

Figura 5.9 -	Grupos substituintes com contribuições positivas para citotoxicidade (C ₁₉ - carbamato, C ₁₄ -CH ₃ , (S)-C ₁₁ -OH, (S)-C7-OH e oxigênio da carbonila; rosa) no discodermolídeo (verde). Os átomos de hidrogênio foram eliminados para maior clareza	101
Figura 5.10 -	A) Conformação minimizada do discodermolídeo pelo campo de forças Tripos. B) Os estudos em solução demonstram que, embora tenha 14 ligações rotacionáveis, a conformação preferencial do discodermolídeo é curvada. Essa preferência se deve à existência de duas ligações (Z)- alqueno (C ₈ -C ₉ e C ₁₃ -C ₁₄ , amarelo em A) e à minimização das interações <i>sin</i> -pentano nos carbonos entre as duplas ligações, em C ₁₀ -C ₁₂ (os raios de van der Waals estão mostrados como esferas em A). Na região A do discodermolídeo (Figura 5.4), a minimização das interações <i>sin</i> -pentano representam contribuição adicional para a curvatura da molécula. A conformação em U permite, ainda, a formação de fraca interação polar intramolecular entre o grupo carbamato e o grupo lactona nos dois terminais da molécula	101
Figura 5.11 -	Taxol (rosa), epotilona (azul) e discodermolídeo (modelo em verde) exploram a mesma cavidade da tubulina de maneiras diferentes	102
Figura 5.12 -	Outros modelos de interação para o discodermolídeo na cavidade da β- tubulina recentemente propostos na literatura	103
Figura 5.13 -	A) Alinhamento tridimensional do conjunto de dados para os análogos minimizados do discodermolídeo. O discodermolídeo, molécula utilizada como padrão para o alinhamento; está mostrado com a subestrutura comum a todos os análogos em cinza. B) Alinhamento 3D do conjunto de dados gerado a partir de estudos de docagem molecular na cavidade da β-tubulina	104
Figura 5.14 -	Distribuição dos valores de pIC ₅₀ para os conjuntos teste, treinamento e para o conjunto de dados completo	105
Figura 5.15 -	Valores de pIC ₅₀ preditos <i>versus</i> valores experimentais correspondentes para os compostos dos conjuntos treinamento (azul) e teste (rosa) para os alinhamentos estruturais baseados nas estruturas minimizadas dos análogos do discodermolídeo (A) e na estrutura do receptor (B)	107
Figura 5.16 -	Mapas de contorno eletrostáticos. A) Alinhamento de corpo-rígido dos conformers de baixa energia. B) Alinhamento baseado na estrutura do receptor. Maiores valores de pIC ₅₀ estão associados com maior carga positiva próxima aos campos azuis e maior carga negativa próxima aos campos vermelhos. O composto 46 é mostrado para referência	109
Figura 5.17 -	Mapas de contorno estéricos. A) Alinhamento de corpo-rígido dos conformers de baixa energia. B) Alinhamento baseado na estrutura do receptor. Maiores valores de pIC ₅₀ estão associados com grupos mais volumosos próximos aos campos verdes e menor volume próximo aos campos amarelos. O composto 46 é mostrado para referência	109
Figura 5.18 -	Modelo 3D para o discodermolídeo na cavidade da β-tubulina juntamente com os campos estéricos e eletrostáticos resultantes do modelo de QSAR 3D CoMFA baseado na estrutura do receptor	110
Figura 5.19 -	Campos de interação molecular hidrofóbicos favoráveis (amarelo) e desfavoráveis (cinza) e campos de interação molecular doadores (azul) e aceptores (rosa) de ligação de hidrogênio para A) Taxol; B) Epotilona A e C) Discodermolídeo. O limite de valores das energias de interação hidrofóbicas foi selecionado para a faixa de -38 a -36 kcal/mol, e as hidrofílicas entre -40 e -30 kcal/mol. Para doadores de ligação de hidrogênio, as energias foram selecionadas para o limite de -13 kcal/mol e para aceptores entre -40 e -33	112

	kcal/mol	
Figura 5.20 -	Modelo farmacofórico 3D final proposto. Azul, doador de ligação de hidrogênio; vermelho, aceptor de ligação de hidrogênio; roxo, doador ou aceptor de ligação de hidrogênio; amarelo, região hidrofóbica	115
Figura 5.21 -	Modelo farmacofórico simplificado 3D. Azul, doação de ligação de hidrogênio; vermelho, acepção de ligação de hidrogênio; roxo, doação ou acepção; amarelo, região hidrofóbica	116
Figura 5.22 -	Filtros hierárquicos sucessivos utilizados na estratégia de triagem virtual para a identificação de estabilizadores de microtúbulos	117
Figura 5.23 -	Grupos funcionais negativamente carregados recorrentemente encontrados interagindo com grupos guanidina de resíduos de arginina em complexos ligante-proteína	118
Figura 5.24 -	Posicionamentos de três compostos representativos (verde), selecionados dentre os mais bem pontuados nos procedimentos de docagem molecular. Interações polares são mostradas em linhas tracejadas. Resíduos importantes para interações são mostrados em bastão. Código PDB: 1TVK. Átomos de hidrogênio não são mostrados para maior clareza	119
Figura 5.25 -	A) Comportamento típico da curva de polimerização da tubulina purificada nas condições padrão. B) Efeitos dos padrões de promoção (Taxol, concentração final 4 μ M) e inibição (colchicina, concentração final 5 μ M) da polimerização da tubulina nas curvas padrão	121
Figura 5.26 -	Efeitos provocados por diferentes concentrações de glicerol no comportamento da curva de polimerização da tubulina. A concentração de 15% é a concentração padrão. A) Na ausência de glicerol, a polimerização é mais suave e B) Na presença de glicerol, o processo de polimerização é aumentado	122
Figura 5.27 -	A) Efeitos na polimerização da tubulina causados pela adição de concentrações crescentes de Taxol. B) Determinação da potência do taxol ..	123
Figura 5.28 -	Determinação da potência da colchicina	125
Figura 5.29 -	Efeitos das concentrações DMSO (v/v) nas curvas de polimerização da tubulina. Concentrações tão pequenas quanto 1% v/v do co-solvente provocam alterações na curva padrão de polimerização	124
Figura 5.30 -	A) Concentrações de DMSO tão baixas como 1% (v/v) podem resultar em falso-positivos nas avaliações biológicas se não consideradas no controle negativo, como demonstrado para o fragmento 6. B) Quando DMSO 1% é utilizado como branco, percebe-se que o aumento aparente na polimerização em A foi na realidade provocado pelo co-solvente	124
Figura 5.31 -	Intermediários sintéticos avaliados pelo ensaio de polimerização da tubulina em concentração única de 50 μ M	126
Figura 5.32 -	A) Estrutura geral do esqueleto carbônico dos clerodanos. B) Estrutura química da casearina X	128
Figura 5.33 -	Estruturas das caseobliquinas ensaiadas	128
Figura 5.34 -	Efeito na polimerização da tubulina purificada <i>in vitro</i> provocado pelos clerodanos diterpenos avaliados	128
Figura 6.1 -	Ligantes do sítio da colchicina. A) colchicina, B) combretastatina A-4, C) podofilotoxina e D) colcemida	131

Figura 6.2 -	Representação esquemática dos efeitos provocados pelo taxol (estabilizador de microtúbulos) e colchicina (inibidor da polimerização, que previne a alteração para conformação alinhada dos heterodímeros, adequada para formação do polímero) no sistema tubulina-microtúbulos. Alterações no equilíbrio celular da polimerização-despolimerização desencadeiam mecanismos que culminam em apoptose	132
Figura 6.3 -	Comparação da estrutura do dímero de tubulina A) estabilizado por zinco em complexo com taxol, obtido por cristalografia eletrônica do polímero (código PDB 1JFF) e B) e ligado à colchicina (verde) na interface entre os monômeros α e β , obtido por cristalografia de raio X (código PDB 1SA0). Na presença de colchicina, os dímeros se curvam, dificultando a formação do polímero	132
Figura 6.4 -	A) 2-mercapto-colchicina (amarelo, código PDB: 1SA0) e B) podofilotoxina (verde, código PDB: 1SA1) interagem na mesma região de interface dos heterodímeros de tubulina (α -tubulina em azul e β -tubulina em rosa) e seus grupos trimetoxifenila comuns compartilham o mesmo subsítio de interação. Resíduos importantes, ligantes e GTP estão mostrados em bastão. O íon magnésio, cofator, está mostrado em esfera. Átomos de hidrogênio não foram mostrados	133
Figura 6.5 -	Ligantes diversos do sítio da colchicina para os quais existem complexos cristalográficos com a tubulina (α -tubulina em azul, β -tubulina em rosa). A) ABT751, PDB: 3HKC, B) T138067 (2 por sítio, um deles covalentemente ligado), PDB: 3HKE e C) TN16, PDB: 3HKD. Resíduos importantes para as interações, além do GTP e dos ligantes, estão mostradas em bastão. O íon magnésio está mostrado em esfera	134
Figura 6.6 -	Interações dos ligantes A) colchicina, B) Podofilotoxina, C) ABT751, D) T13067 (duas moléculas por sítio) e E) TN16 no sítio da colchicina. Os diagramas de interação 2D foram gerados com o programa Poseview (http://poseview.zbh.uni-hamburg.de)	135
Figura 6.7 -	Integração das estratégias de modelagem de HQSAR e ensaio virtual para identificação de ligantes do sítio da colchicina	136
Figura 6.8 -	O conjunto indóis utilizado para a modelagem de HQSAR é estruturalmente diverso, apresentando modificações estruturais em X e R ₁ a R ₇	137
Figura 6.9 -	Valores de RBR preditos <i>versus</i> valores experimentais correspondentes para os compostos indólicos utilizados para a modelagem de HQSAR	146
Figura 6.10 -	Filtros hierárquicos sucessivos utilizados na estratégia de triagem virtual para a identificação de inibidores da polimerização de tubulina	147
Figura 6.11 -	Avaliação da capacidade preditiva dos modelos de HQSAR para um conjunto de 170 indóis. A porcentagem de predições corretas decresce com o aumento da porcentagem de tipos de fragmentos extrapolados nos modelos	149
Figura 6.12 -	Comparação da distribuição percentual de características físico-químicas (massa molar e cLogP) apresentadas A) pelos ligantes do conjunto de dados de 170 indóis e derivados e B) pelos indóis e indolinas recuperados da base de dados ZINC e filtrados de acordo com características apresentadas por ligantes conhecidos	150
Figura 6.13 -	Gráfico dos <i>scores</i> de PC1 x PC2 para os descritores moleculares gerados para o modelo 6	152
Figura 6.14 -	Compostos representativos selecionados a partir do procedimento de triagem virtual para identificação de ligantes do sítio da colchicina (cinza).	155

	Interações polares são mostradas em linhas tracejadas. Átomos de hidrogênio não são mostrados para maior clareza	
Figura 6.15 -	Chalconas (B) são análogas aos aroilindóis (A) e foram selecionadas para avaliação experimental como possíveis ligantes do sítio da colchicina	155
Figura 6.16 -	Variações estruturais nos três conjuntos de dados estudados individualmente	156
Figura 6.17 -	Distribuição dos valores de potência para os conjuntos de derivados indólicos utilizados para a modelagem de QSAR 3D. A) conjunto 1, B) conjunto 2 e C) conjunto 3	159
Figura 6.18 -	Modelos farmacofóricos criados para os 3 conjuntos de dados utilizados para a modelagem de QSAR 3D	161
Figura 6.19 -	Alinhamentos tridimensionais para os 3 conjuntos de dados estudados individualmente	162
Figura 6.20 -	Valores de preditos (vermelho) e experimentais (azul) correspondentes para os modelos de QSAR 3D desenvolvidos para os conjuntos individuais de compostos indólicos. A) modelos gerados utilizando o método CoMFA; B) modelos gerados utilizando o método CoMSIA; I) conjunto ; II) conjunto 2; III) conjunto 3	165
Figura 6.21 -	Mapas de contorno A) CoMFA e B) CoMSIA para os melhores modelos construídos para os conjuntos (I) 1, (II) 2 e (III) 3. Os 3 compostos mais potentes em cada conjunto estão representados em bastão para visualização	167
Figura 6.22 -	Posicionamentos propostos para compostos representativos de cada conjunto de dados estudado. A) composto 35 (conjunto 1); B) composto 22 (conjunto 2) e C) composto 38 (conjunto 3). O núcleo indol se repete nesses conjuntos de dados, mas ocupa regiões diferentes nos 3 posicionamentos propostos. Os átomos de hidrogênio não foram mostrados	169
Figura 6.23 -	Chalconas dos tipos 1 (1a , 2a-2c) e 2 (3 e 3a) planejadas	170
Figura 6.24 -	Análises de alto conteúdo para interrupção da mitose e alterações nos microtúbulos para células expostas a agentes antitubulina. As células foram tratadas em placas de 384 poços com diluições de 10 vezes de colchicina ou das chalconas 2c e 3a , e analisadas para A) densidade celular, B) índice mitótico, C) condensação da cromatina e D) densidade de microtúbulos. Todos os compostos provocaram perda celular, aumento do índice mitótico, condensação nuclear e aumento inicial da densidade de microtúbulos que foi revertida em altas concentrações	174
Figura 6.25 -	Imunomarcagem para interrupção na mitose em células HeLa. As células foram tratadas com A) DMSO 0,1%, B) colchicina 62 nM, C) chalcona 2c , mais potente do tipo 1 (940 nM) ou D) chalcona 3a , mais potente do tipo 2 (470 nM), e marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde), anti-fosfo-histona H3 (amarelo-vermelho) e HOECHST 33342 (azul)	175
Figura 6.26 -	Ensaio de cicatrização celular <i>in vitro</i> para avaliação da inibição da migração de células MDA-MB-231 por colchicina e pelas chalconas 2c e 3a em três concentrações diferentes	176
Figura 6.27 -	Configurações e conformações das chalconas	177
Figura 6.28 -	Derivados de 3',4',5'-trimetoxichalconas inibidoras da polimerização dos microtúbulos (2c e 3a) inspiraram a proposição de 24 análogos modificados no esqueleto central, os derivados da <i>N</i> -benzilideno-3,4,5-	178

trimetoxibenzohidrazida (4) que contêm um esqueleto central *N*-acil-hidrazona substituído com um grupo 3,4,5-trimetoxifenil no anel A e um anel aromático em R (anel B)

- Figura 6.29 -** Principais estados conformacionais que podem ser atribuídos à unidade central *N*-acil-hidrazona 179
- Figura 6.30 -** Uma série de tiosemicarbazonas (5) foi investigada. O análogo **5a** e seu complexo de Gálio, $Ga(5a)_2NO_3$, foram avaliados em seus efeitos na polimerização da tubulina e em ensaios celulares de alto conteúdo para a determinação do mecanismo de ação citotóxica desses compostos 180
- Figura 6.31 -** Inibição da polimerização da tubulina purificada *in vitro*. **A)** 5a e **B)** o seu complexo $Ga(5a)_2NO_3$ inibiram parcialmente a polimerização da tubulina de maneira concentração-dependente 181
- Figura 6.32** Imunomarcagem para interrupção da mitose em células HeLa, tratadas com **A)** DMSO 0,1% (controle negativo), **B)** colchicina 62 nM, **C)** 5a 12,5 μ M ou **D)** o complexo de Gálio $Ga(5a)_2NO_3$ 12,5 μ M e marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde), anti-fosfo-histona H3 (amarelo-vermelho) e HOECHST 33342 (azul) 182
- Figura 6.33** Análises de alto conteúdo para perfis de interrupção da mitose e alterações nos microtúbulos para células expostas aos compostos avaliados. As células foram tratadas em placas de 384 poços com diluições de 10 vezes de colchicina ou dos derivados 5a, $Ga(5a)_2NO_3$, ou $Ga(NO_3)_3 \cdot xH_2O$ e analisadas para **A)** densidade celular, **B)** condensação da cromatina, **C)** densidade de microtúbulos e **D)** índice mitótico. Todos os compostos, exceto o sal de gálio, $Ga(NO_3)_3 \cdot xH_2O$, provocaram redução da densidade celular, condensação nuclear e perturbações dos microtúbulos celulares. Colchicina, um agente antimitótico típico, provocou aumento do índice mitótico, o que não foi observado para os outros compostos 183

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -	Parâmetros de distinção dos fragmentos no método HQSAR	63
Tabela 5.1 -	Conjunto de dados de análogos do discodermolídeo (e valores correspondentes de pIC ₅₀) empregado para as análises de QSAR 2D e 3D e para os estudos de docagem molecular	90
Tabela 5.2 -	Resultados das análises de HQSAR para várias distinções dos fragmento nos parâmetros estatísticos, utilizando o tamanho do fragmento padrão (4-7)	94
Tabela 5.3 -	Análises de HQSAR para a influência dos tamanhos dos fragmentos nos parâmetros estatísticos para os melhores modelos	94
Tabela 5.4 -	Valores de pIC ₅₀ experimentais, estimados e preditos para o conjunto de análogos do discodermolídeo utilizado nos estudos de HQSAR	95
Tabela 5.5 -	Resultados dos melhores modelos CoMFA construídos	106
Tabela 5.6 -	Valores de pIC ₅₀ experimentais e preditos pelos melhores modelos CoMFA, com valores residuais, para os compostos do conjunto teste. Alinhamento de corpo-rígido (1) e baseado na estrutura do receptor (2)	107
Tabela 5.7 -	Condições de reação selecionadas para os ensaios de polimerização de tubulina purificada <i>in vitro</i>	121
Tabela 5.8 -	Potências biológicas aparentes dos controles taxol e colchicina em diferentes concentrações de DMSO como co-solvente orgânico	125
Tabela 6.1 -	Conjuntos de dados de derivados indólicos e seus valores correspondentes de RBR, empregados nas análises de HQSAR	140
Tabela 6.2 -	Derivados indólicos utilizados para os estudos de HQSAR	145
Tabela 6.3 -	Melhores modelos de HQSAR construídos	146
Tabela 6.4 -	Filtros físico-químicos utilizados para a filtragem da base de dados inicial	149
Tabela 6.5 -	Compostos selecionados para os estudos baseados na estrutura do sítio da colchicina	151
Tabela 6.6 -	Informação 3D disponível sobre a cavidade de interação da colchicina, obtida por cristalografia de raios-X	153
Tabela 6.7 -	<i>Conjunto 1</i> - 2-fenilindóis-3-substituídos	157
Tabela 6.8 -	<i>Conjunto 2</i> – Aroilindóis	158
Tabela 6.9 -	<i>Conjunto 3</i> – Ariltioindóis	160
Tabela 6.10 -	Melhores modelos de QSAR 3D construídos	164
Tabela 6.11 -	Efeitos de citotoxicidade (células L-1210) e de inibição da polimerização da tubulina para as chalconas avaliadas	169
Tabela 6.12 -	Análises de alto conteúdo para interrupção da mitose em células HeLa tratadas com derivados de chalconas	173

Tabela 6.13	Efeitos das chalconas 2c e 3a na migração das células MDA-MB-231	176
Tabela 6.14	Resultados das análises de alto conteúdo em células HeLa	183

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
A	Átomo
B	Ligação
BMS	<i>Bristol-Myers Squibb</i>
C	Conectividade
CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
Ch	Quiralidade
CDTN	Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
CoMFA	Análise comparativa dos campos moleculares (<i>comparative molecular field analysis</i>)
CoMSIA	Análise comparativa dos índices de similaridade (<i>comparative molecular similarity indices analysis</i>)
CPT	Composto
Cy3	Indocarbocianina (<i>indocarbocyanine with three methine spacer</i>)
DA	Doador e aceptor
DAPI	4',6,diamino-2-fenilindol (<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>)
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EC ₅₀	Concentração efetiva 50%
EGTA	<i>Ethylene glycol-bis[β-aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)
GDP	Guanosina difosfato
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GTP	Guanosina trifosfato
H	Hidrogênio
HBBS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCA	Análise hierárquica de agrupamento (<i>hierarchical cluster analysis</i>)
HCS	Ensaio biológico de alto conteúdo (<i>high content screening</i>)
HL	Comprimento do holograma (<i>hologram length</i>)
HQSAR	Holograma QSAR (<i>hologram QSAR</i>)
HTS	Ensaio automatizados em larga escala (<i>high-throughput screening</i>)
IC ₅₀	Concentração inibitória 50%
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LBDD	Planejamento baseado na estrutura do ligante (<i>ligand-based drug design</i>)

LMO	Método de validação cruzada deixe-muitos-fora (<i>leave-many-out</i>)
LOO	Método de validação cruzada deixe-um-fora (<i>leave-one-out</i>)
MAP	Proteína associada aos microtúbulos (<i>microtubule associated protein</i>)
MDEC	Concentração mínima efetiva detectável (<i>minimum detectable effective concentration</i>)
MIF	Campo de interação molecular (<i>molecular interaction field</i>)
MSG	<i>Monosodium glutamate</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide</i>
NCE	Nova entidade química (<i>new chemical entity</i>)
NCI	Instituto Nacional do Câncer Americano (<i>National Cancer Institute</i>)
NFC	Núcleo fundamental das chalconas
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCA	Análise de componentes principais (<i>principal component analysis</i>)
PDB	Banco de dados de proteínas (<i>Protein Data Bank</i>)
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
pIC ₅₀	Logaritmo da concentração inibitória 50%
PIPES	<i>Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
PH3	Fosfo-histona H3 (<i>phosphohistone H3</i>)
PLS	Regressão multivariada por mínimos quadrados (<i>partial least squares</i>)
q^2	Coeficiente de correlação da validação cruzada
QSAR	Relações quantitativas entre a estrutura e a atividade (<i>quantitative structure-activity relationships</i>)
r^2	Coeficiente de correlação
RBR	Resposta biológica relativa
RMN	Ressonância magnética nuclear
SAR	Relações estrutura-atividade (<i>structure-activity relationship</i>)
SBDD	Planejamento baseado na estrutura do receptor (<i>structure-based drug design</i>)
SBVS	Triagem virtual baseada na estrutura do receptor (<i>structure-based virtual screening</i>)
SEE	Erro padrão da estimativa (<i>standard error of estimate</i>)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPDDI	<i>The University of Pittsburgh Drug Discovery Institute</i>
URF	Unidade relativa de fluorescência
VS	Triagem virtual (<i>virtual screening</i>)

SUMÁRIO

<i>Capítulo 1 – Introdução</i>	29
1.1 CÂNCER	31
1.2 $\alpha\beta$-TUBULINA COMO ALVO MACROMOLECULAR	34
1.2.1 Estabilizadores dos microtúbulos	36
1.2.2 Inibidores da polimerização da tubulina	38
1.3 PLANEJAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS	40
1.3.1 Estratégias para o planejamento de novos compostos com atividade antitumoral	42
1.3.2 Métodos computacionais para o planejamento de compostos bioativos	43
<i>Capítulo 2 – Objetivos</i>	45
2.1 PARA ESTABILIZADORES DA POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS	47
2.2 PARA INIBIDORES DA POLIMERIZAÇÃO DOS MICROTÚBULOS	48
<i>Capítulo 3 – Métodos Computacionais & Estratégias de Planejamento</i>	49
3.1 PLANEJAMENTO BASEADO NA ESTRUTURA DO RECEPTOR (SBDD)	51
3.1.1 Docagem molecular	53
<i>3.1.1.1 Métodos de amostragem conformacional</i>	54
<i>3.1.1.2 Funções de pontuação</i>	55
3.1.2 Triagem virtual baseada na estrutura do receptor	56
3.1.3 Requerimentos farmacofóricos definidos a partir da estrutura do receptor	57
3.2 PLANEJAMENTO BASEADO NA ESTRUTURA DO LIGANTE (LBDD)	59
3.2.1 Estudos das relações quantitativas estrutura-atividade (QSAR)	59
<i>3.2.1.1 Holograma QSAR (HQSAR)</i>	61
<i>3.2.1.1.2 Integração dos modelos de HQSAR com outros métodos</i>	64
<i>3.2.1.3 Análise comparativa dos campos moleculares (CoMFA)</i>	65
<i>3.2.1.4 Análise comparativa dos índices de similaridade (CoMSIA)</i>	67
3.2.2 Identificação de requerimentos farmacofóricos	68
3.2.3 Simplificação molecular	69

3.3 PLANEJAMENTO DE INIBIDORES DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA	71
--	----

Capítulo 4 – Métodos Bioquímicos

71

4.1 ENSAIO DE POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA	73
--	----

4.1.1 O ensaio baseado em fluorescência	73
--	----

<i>4.1.2.1 Curva de polimerização da tubulina na presença de GTP</i>	74
--	----

<i>4.1.2.2 Determinação da potência de promoção da polimerização (EC₅₀) do taxol</i>	75
---	----

<i>4.1.2.3 Determinação da potência de inibição da polimerização (IC₅₀) da colchicina</i>	75
--	----

<i>4.1.2.4 O efeito do solvente na polimerização da tubulina</i>	76
--	----

<i>4.1.2.5 Determinação do efeito de diferentes compostos sobre a polimerização da tubulina</i>	76
---	----

4.1.2 O ensaio clássico baseado em espalhamento de luz	76
---	----

4.2 ENSAIOS CELULARES	77
------------------------------	----

4.2.1 Ensaios celulares de alto conteúdo	77
---	----

<i>4.2.1.1 Análises de alto conteúdo para interrupção da mitose</i>	79
---	----

<i>4.2.1 Efeitos na migração celular</i>	82
--	----

Capítulo 5 – Planejamento de Estabilizadores da Polimerização de Microtúbulos

83

5.1 BASES ESTRUTURAIS PARA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE ANÁLOGOS DO DISCODERMOLÍDEO	86
---	----

5.1.1 Estratégias computacionais	89
---	----

5.1.2 Caracterização do conjunto de dados	89
--	----

5.1.3 Análises de HQSAR	92
--------------------------------	----

5.1.4 Identificação de fragmentos moleculares especializados	96
---	----

5.1.5 Estudos de modelagem molecular baseados na estrutura do receptor	98
---	----

5.1.6 Análises de QSAR 3D	103
----------------------------------	-----

5.2 PROPOSIÇÃO DE UM MODELO FARMACOFÓRICO BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS MODULADORES DA β-TUBULINA COM POTENTE AÇÃO ANTITUMORAL	111
---	-----

5.2.1 Identificação de características estereoelétrônicas comuns	111
---	-----

5.2.2 Identificação de subsítios comuns de interação	113
---	-----

5.2.3 Construção e refinamento dos modelos	114
---	-----

5.2.4 Proposição de um modelo farmacofórico simplificado	115
---	-----

5.3 TRIAGEM VIRTUAL DE PROMOTORES DA POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS	116
5.3.1 Filtragem 2D das bases de dados	117
5.3.2 Aplicação do filtro 3D no processo de triagem virtual	118
5.3.3 Seleção dos compostos para aquisição e avaliação biológica	118
5.4 ENSAIOS DE POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA	120
5.4.1 Estabelecimento das condições padrão de reação	120
5.4.2 Determinação da potência de promoção da polimerização (EC ₅₀) do taxol	122
5.4.3 Determinação da potência de inibição da polimerização (IC ₅₀) da colchicina	123
5.4.4 O efeito aparente do co-solvente orgânico na polimerização da tubulina	124
5.5 SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR	125
5.5.1 Triagem biológica de fragmentos	125
5.5.2 Análogos simplificados do taxol e estabilizadores de microtúbulos	126

Capítulo 6 – Planejamento de Inibidores da Polimerização da Tubulina

	129
6.1 ENSAIO VIRTUAL BASEADO EM FRAGMENTOS MOLECULARES E NA ESTRUTURA DO RECEPTOR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS	135
6.1.1 Estratégias computacionais	136
6.1.2 Caracterização do conjunto de dados	137
6.1.3 Análises de HQSAR	144
6.1.3.1 HQSAR e ensaio virtual	147
6.1.3.2 Avaliação da aplicabilidade dos modelos construídos	147
6.1.4 Bases de compostos para o ensaio virtual	149
6.1.5 Avaliação da base de dados filtrada através dos modelos de HQSAR	150
6.1.6 Estudos de docagem molecular	152
6.2 CONSTRUÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS E ESTUDOS DE QSAR 3D PARA CONJUNTOS DE DERIVADOS INDÓLICOS ESTRUTURALMENTE DIVERSOS	156
6.2.1 Caracterização dos conjuntos de dados	156
6.2.1.1 Conjunto 1 (2-Fenilindóis)	156
6.2.1.2 Conjunto 2 (Aroilindóis)	158
6.2.1.3 Conjunto 3 (Ariltioindóis e derivados)	158
6.2.1.4 Divisão do conjunto de dados	159

6.2.2 Proposição de hipóteses farmacofóricas	161
6.2.3 Análises de QSAR 3D	162
6.2.3.1 Estudos de QSAR 3D CoMFA	162
6.2.3.2 Estudos de QSAR 3D CoMSIA	163
6.2.4 Estudos de docagem molecular	168
6.3 PLANEJAMENTO DE CHALCONAS COM ATIVIDADE ANTIMITÓTICA	169
6.3.1 Planejamento de chalconas do tipo 1	169
6.3.2 Planejamento de chalconas do tipo 2	171
6.3.3 Ensaios celulares de alto conteúdo comparativos	172
6.3.4 Efeitos na migração celular	175
6.3.5 Proposição de análogos restritos	176
6.4 PLANEJAMENTO DE DERIVADOS <i>N</i>-ACIL-HIDRAZÔNICOS COM ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA	177
6.5 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE TIOSEMICARBAZONAS CITOTÓXICAS	180
6.5.1 Efeitos na polimerização da tubulina	180
6.5.2 Análises mutiparamétricas de alto conteúdo	181
<i>Capítulo 7 – Conclusões e Perspectivas</i>	185
7.1 CONCLUSÕES	187
7.2 PERSPECTIVAS	187
<i>Referências</i>	189
<i>Anexo – Produção Científica</i>	215

Capítulo 1

Introdução

“Eu quase que nada não sei. Mas desconfio de muita coisa”

Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)

1.1 CÂNCER

Câncer é a denominação genérica de um grupo de doenças devastadoras caracterizadas pela multiplicação descontrolada de células malignas, capazes de invadir estruturas próximas e se espalharem em diversas regiões do organismo. As células malignas deixam de responder aos mecanismos de controle fisiológicos, duplicando-se desordenadamente para criar tumores, que são massas de células com crescimento anormal. A proliferação celular anômala está associada a defeitos genéticos que resultam em alterações em etapas-chave de regulação do ciclo celular. Na maioria dos tumores, os mecanismos fisiológicos de regulação estão desarranjados de modo que a proliferação das células ocorre de maneira independente do controle do crescimento celular normal. Posteriormente, as células que acumulam outras alterações específicas se desprendem e migram para outros órgãos, onde começam a se multiplicar desordenadamente e a substituir o tecido sadio, em um processo conhecido como metástase¹⁻⁶.

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), aproximadamente 500 mil novos casos de câncer são diagnosticados no Brasil a cada ano, sendo a segunda causa de morte por doença no país, panorama grave que acompanha uma tendência mundial¹⁻³. De fato, o impacto global do câncer mais que dobrou nos últimos trinta anos: mais de 10 milhões de novos casos são estimados por ano no mundo, com mais de 7 milhões de óbitos anuais. Somente para o câncer de mama, o de maior incidência em mulheres, são esperadas aproximadamente 50 mil mortes no Brasil e mais de 500 mil mortes no mundo a cada ano. As estimativas para o ano de 2010 no país estão ilustradas na Figura 1.1¹⁻³. Diante deste cenário, torna-se clara a necessidade de investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o tratamento do câncer, em diferentes níveis de atuação.

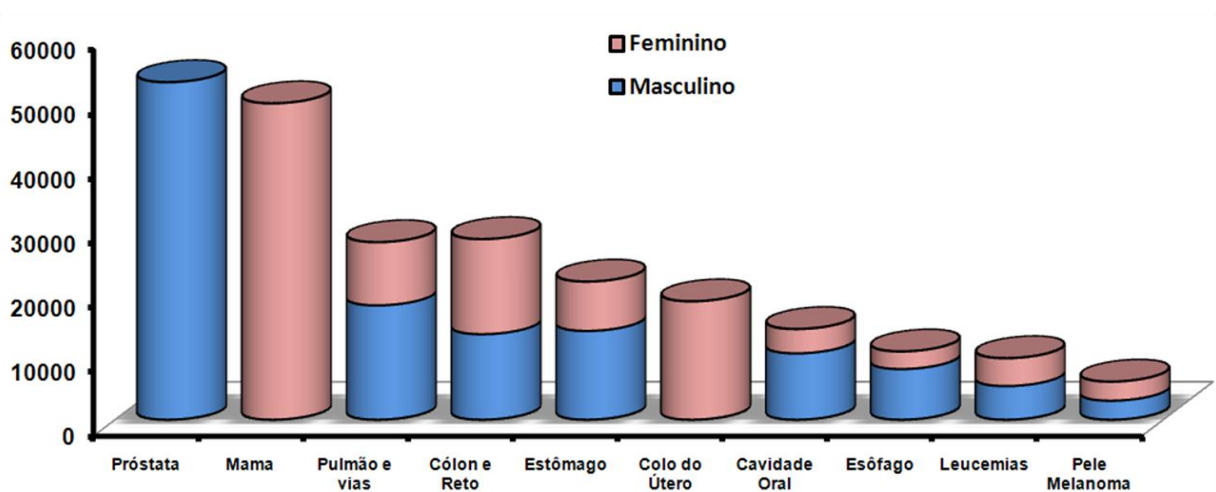


Figura 1.1 - Principais tipos de câncer na população brasileira, nos gêneros masculino e feminino (números de 2008, excetuando o câncer de pele não melanoma)³.

O tratamento dos diversos tipos de câncer pode envolver uma série de esquemas e combinações especiais de métodos dependendo de seu tamanho, estágio e localização primária. Na maior parte dos casos, entretanto, é necessária uma abordagem sistêmica concomitante. Vários fármacos estão disponíveis para a terapia sistêmica do câncer, atuando através de complexos mecanismos moleculares de ação. Entretanto, a grande maioria dos fármacos disponíveis no mercado tem seu uso limitado por fatores diversos – como elevada toxidez, resistência e baixa biodisponibilidade – os quais têm impulsionado a pesquisa por novos candidatos a fármacos com propriedades otimizadas, que possam representar novas alternativas terapêuticas e aumentar o arsenal quimioterápico existente para o tratamento do câncer. Nesse contexto, diversos alvos macromoleculares podem ser modulados pela ação de moléculas pequenas, reduzindo os processos malignos de crescimento e multiplicação desordenada, além da invasão e migração celular^{1, 7-11}.

A alteração frequente no ciclo das células tumorais tem levado à identificação de etapas relacionadas à inibição da multiplicação celular e ao estudo de alvos moleculares para o desenvolvimento de novos candidatos a fármacos para a terapia do câncer. A mitose, processo pelo qual uma cópia completa do genoma duplicado é precisamente segregada pelo fuso mitótico em duas células-filhas, corresponde a uma das fases do ciclo celular, como mostra a Figura 1.2. A fidelidade desse processo é monitorada a partir de sistemas de verificação em todas as fases do ciclo. Esses sistemas são coordenados para garantir a sobrevivência das células e a estabilidade do genoma. Erros nesses mecanismos constituem um importante aspecto na tumorigênese^{5, 6, 9, 12, 13}.

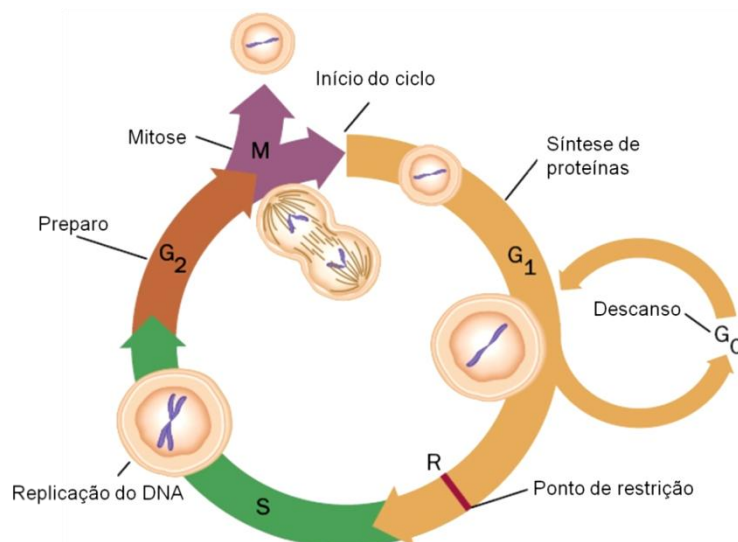


Figura 1.2 - Etapas do ciclo celular⁴. Na fase G₁ (*gap1*), a célula aumenta de tamanho e se prepara para a replicação do DNA, que ocorre na fase S (síntese). Na fase G₂ (*gap2*) a célula se prepara para a fase M (mitose). As novas células-filhas imediatamente iniciam novo ciclo. Alternativamente, as células podem parar de se dividir temporariamente ou permanentemente. Compostos capazes de regular as fases G₂ e M impedem com que a multiplicação celular se concretize.

As células malignas frequentemente perdem a regulação da divisão celular na fase G_1 . Por essa razão, pequenas moléculas capazes de regular a fase G_2 ou de provocar alterações que resultem na interrupção da fase M apresentam particular interesse (Figura 2). Até o momento, entretanto, a maior parte das substâncias identificadas com propriedades antimitóticas interage com os componentes dos microtúbulos, particularmente com a proteína heterodimérica $\alpha\beta$ -tubulina, interferindo na formação do fuso mitótico durante as etapas de divisão celular. De fato, os microtúbulos permanecem como um dos poucos alvos macromoleculares validados para o planejamento de compostos com atividade anticâncer e a tubulina continua a ser a única proteína associada à formação do fuso mitótico que é alvo macromolecular de agentes terapêuticos aprovados para o tratamento de diversos tipos de câncer^a, como o paclitaxel (Taxol[®] e outros)^b, o docetaxel (Taxotere[®]), a vincristina (Oncovin[®]) e a vimblastina (Velbe[®]), apresentados na Figura 1.3²¹⁻²⁴.

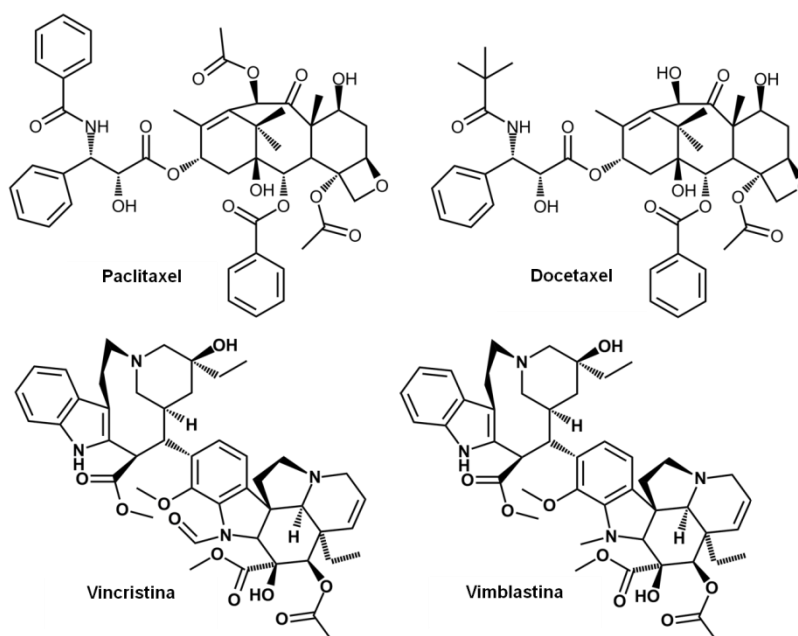


Figura 1.3 - Estrutura química dos fármacos antitumorais usados no tratamento do câncer.

^a Inibidores de quinases em geral impedem a divisão, mas não a progressão do ciclo celular e, portanto, não são agentes antimitóticos^{8, 9}. Inibidores das quinesinas do fuso provocam interrupção do ciclo celular e são, por conseguinte, antimitóticos¹⁴. O ispinesib, inibidor alostérico dessa proteína, encontra-se atualmente em fase II de triagens clínicas para o tratamento de câncer de mama^{8, 15}.

^b O paclitaxel foi isolado do pinheiro de *Taxus brevifolia* e identificado como agente anticâncer em um programa do *National Cancer Institute* (NCI), na década de 60, quando foi nomeado taxol. Quando desenvolvido comercialmente pela empresa farmacêutica *Bristol-Myers Squibb* (BMS), o nome genérico foi alterado para paclitaxel e passou a ser comercializado sob a marca Taxol[®], formulado em cremofor EL e etanol. A síntese parcial do paclitaxel foi estabelecida na década de 80, a partir do isolamento de um intermediário avançado, a 10-acetil-bacatina, disponível em maiores quantidades em árvores relacionadas (*T. baccata*). Atualmente a BMS produz, isola e purifica o paclitaxel diretamente a partir da tecnologia de fermentação de células utilizando linhagens celulares de *Taxus*. O nome inicial (taxol), entretanto, é ainda hoje o mais amplamente utilizado na literatura para nomear o composto, razão pela qual essa designação foi mantida nessa tese¹⁶⁻²⁰. O mesmo ocorre para o taxotere.

1.2 $\alpha\beta$ -TUBULINA COMO ALVO MACROMOLECULAR

Os microtúbulos são polímeros dinâmicos de tubulina, componentes estruturais celulares envolvidos em vários processos vitais como mitose, citocinese e transporte vesicular, além de comunicação intracelular. As unidades estruturais dos microtúbulos são os $\alpha\beta$ -heterodímeros de tubulina. Guanosina trifosfato (GTP) se liga a ambas as subunidades, α e β (Figura 1.4). A subunidade β , que possui atividade GTPásica, também se liga à guanosina difosfato (GDP), quando GTP é hidrolisado e ocorre a adição de mais uma subunidade heterodimérica ao protofilamento em formação. Os protofilamentos se empacotam paralelamente em filamentos cilíndricos ocos para formar os microtúbulos. Em geral, os microtúbulos são formados por 13 protofilamentos de dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina (Figura 1.5)^{25, 26}. Os monômeros de α e β -tubulina compartilham 40% de identidade sequencial e possuem estruturas muito similares, exceto em algumas regiões de alças, e apresentam domínios de ligação a nucleotídeos (N-terminal), de interação com ligantes (intermediário) e de ligação a proteínas associadas (MAPs, do inglês, *microtubule associated proteins*) com o processo de polimerização (C-terminal), como mostrado na Figura 1.4²⁷⁻²⁹.

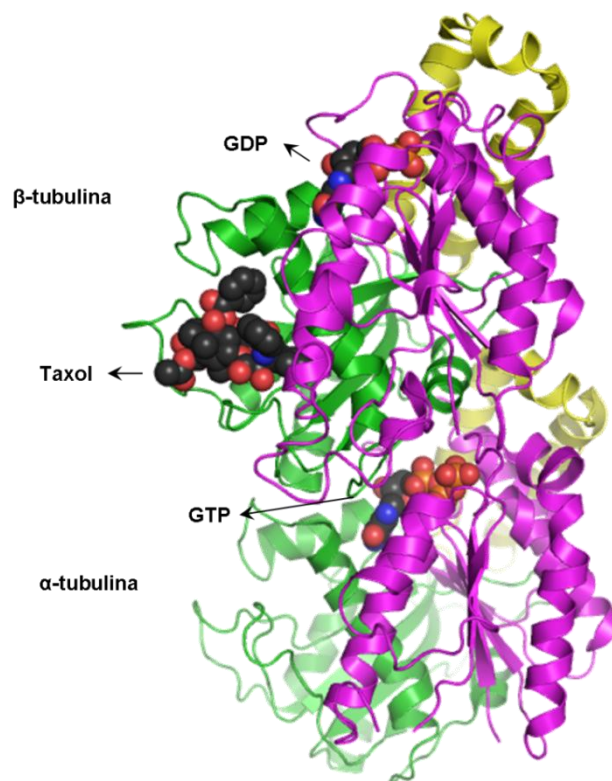


Figura 1.4 - Estrutura do dímero de $\alpha\beta$ -tubulina (código PDB: 1JFF). Cada monômero consiste dos domínios de ligação a nucleotídeos (rosa), de interação com ligantes (verde), e de ligação a proteínas associadas (amarelo). O taxol, fármaco com potente ação antitumoral, é mostrado na cavidade da alça M no monômero de β -tubulina.

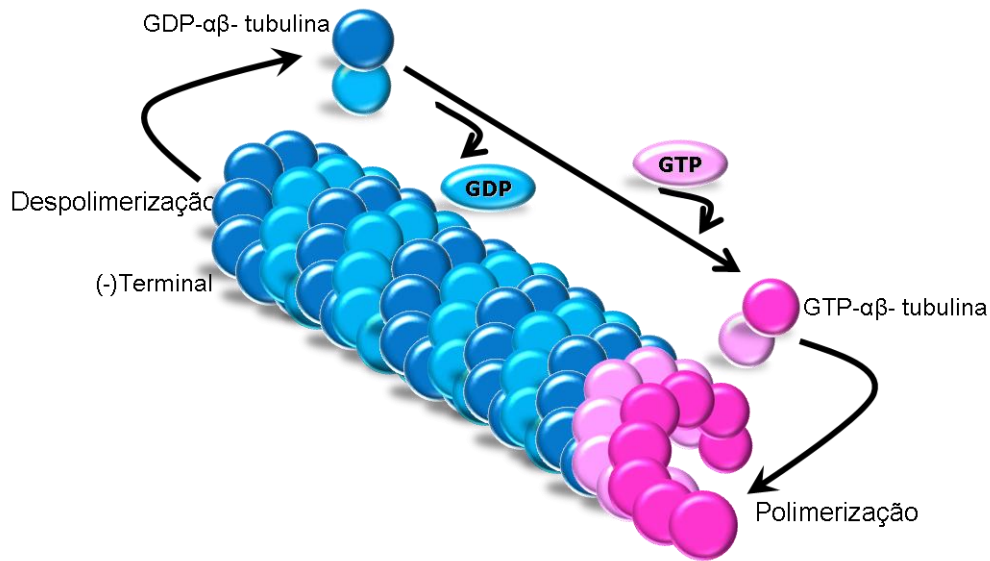


Figura 1.5 - Dinâmica de polimerização/despolimerização dos dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, mostrando a perda de dímeros em uma das extremidades e adição de dímeros na outra extremidade. Os microtúbulos são resultantes do empacotamento dos protofilamentos lado a lado. Na presença de GTP, a polimerização é favorecida e na presença de GDP o processo inverso é mais favorável²⁶.

A dinâmica dos microtúbulos é definida por fases de polimerização e despolimerização, que podem ser reguladas, já que a uma das extremidades dessas estruturas polares, no terminal (+), podem ser adicionadas subunidades diméricas, no monômero de β -tubulina, e na extremidade oposta, no terminal (-), o monômero de α -tubulina, há perda de subunidades quando a estrutura não está estabilizada (Figura 1.5). Enquanto os dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina ligados a GDP são curvados, desfavorecendo a formação do protofilamento, os dímeros ligados a GTP são retos, e favorecem o crescimento do polímero. A supressão da dinâmica dos microtúbulos perturba a formação do eixo mitótico, interrompendo o ciclo celular na transição metáfase-anáfase, desencadeando mecanismos que resultam em apoptose²⁶⁻³⁰. Compostos que interferem com a dinâmica dos microtúbulos estão entre os agentes anticâncer mais importantes na terapêutica. Esses compostos, que interagem diretamente com a tubulina, também denominados agentes antitubulina, são classificados como agentes estabilizadores ou desestabilizadores de microtúbulos^{22, 23, 28}.

1.2.1 Estabilizadores dos microtúbulos

O mecanismo de ação do taxol e de seus análogos (os taxanos^c), além de outros compostos de origem natural, estruturalmente diversos dos taxanos, como as epotilonas, o discodermolídeo e a dictioestatina, mostrados na Figura 1.6, inclui a ligação à subunidade β -tubulina na região da alça M, no sítio de ligação das proteínas Tau, o aumento das interações laterais entre protofilamentos, a estabilização dos microtúbulos contra despolimerização, e a interferência com a função normal da tubulina na formação do fuso mitótico efetivo²⁸⁻³⁷. As proteínas Tau constituem uma família integrante do grupo das MAPs, que são importantes reguladores fisiológicos da polimerização da tubulina. As proteínas Tau favorecem a polimerização da tubulina, e estabilizam os microtúbulos formados através de copolimerização³⁸⁻⁴¹. Portanto, os taxanos, as epotilonas e o discodermolídeo são ligantes de uma cavidade de interação proteína-proteína.

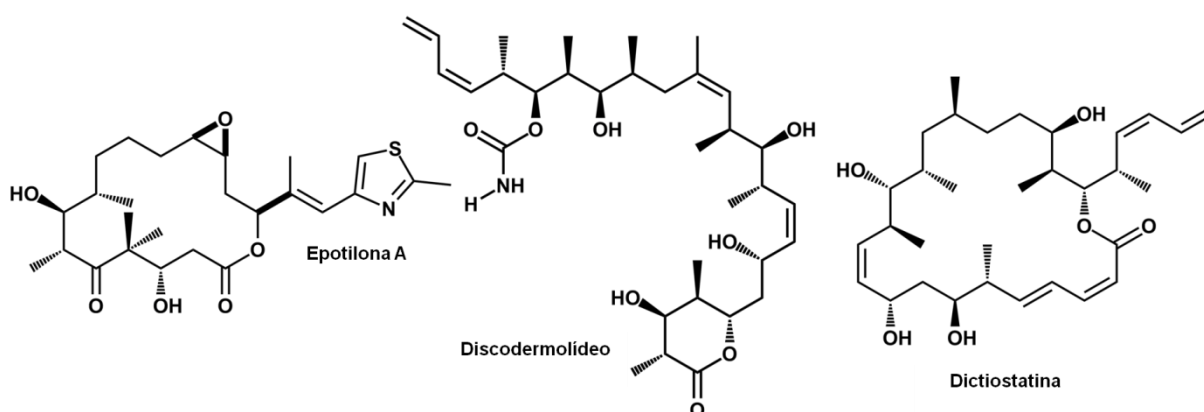


Figura 1.6 - Produtos naturais estabilizadores de microtúbulos com potente ação antitumoral.

O taxol e o taxotere (Figura 1.3) são os compostos mais estudados da classe dos taxanos. Embora estejam entre os agentes quimioterápicos mais eficazes, os taxanos são suscetíveis a vários mecanismos de resistência, incluindo a redução da afinidade por mutações na estrutura da β -tubulina, a expressão aumentada de subtipos dos monômeros de β -tubulina para os quais a afinidade desses compostos é menor e a sua expulsão da célula pela glicoproteína-P^d. Outro aspecto limitante é a baixa solubilidade destes compostos, o que resulta em uma formulação farmacêutica complexa, administrada na

^c A literatura denomina como taxanos os diterpenos extraídos dos pinheiros de *Taxus*, e como taxóides os derivados de taxol³¹. Como taxol e taxotere se encaixam em ambas as denominações, esses termos são com frequência indistintamente utilizados, assim como nessa tese de doutorado.

^d A glicoproteína-P é uma proteína transmembrana envolvida com o transporte ativo de várias toxinas estruturalmente não-relacionadas para o exterior das células, participando, portanto, do processo de detoxificação. A superexpressão dessa proteína tem sido também relacionada à resistência múltipla aos fármacos anticâncer⁴².

forma injetável. Além disso, essas formulações estão associadas a efeitos adversos graves, como neutropenia, neurotoxicidade e cardiopatias. Todos esses fatores têm estimulado as pesquisas por candidatos a novos fármacos que atuem por mecanismos similares, mas com propriedades terapêuticas mais apropriadas, sejam estes análogos dos taxol ou originados a partir de uma nova diversidade química^{22, 29, 32-34, 37, 43-45}.

A dictioestatina e o discodermolídeo (Figura 1.6) são lactonas de origem natural, isoladas em pequenas quantidades (menos de 0,003% em massa) a partir de esponjas marinhas – *Spongia sp* e *Discoderma dissoluta*, respectivamente. Esses produtos naturais são os mais potentes agentes estabilizadores de microtúbulos identificados até o momento e demonstram mecanismo de ação semelhante ao do taxol, efetivamente induzindo o processo de apoptose. Além disso, não apresentam resistência cruzada com linhagens celulares de câncer resistentes ao taxol e apresentam maior solubilidade que os taxanos. Sabe-se, ainda, que são capazes de competir com o taxol pelo sítio de ligação da β -tubulina, interagindo reversivelmente com essa cavidade, sugerindo que se liguem ao mesmo sítio de interação do taxol^{28, 32-34, 46-48}. Devido a essas propriedades biológicas, o padrão de reconhecimento molecular dessas moléculas bioativas é importante para abordagens de planejamento em química medicinal e, por isso, análogos desses compostos foram estudados. O entendimento das interações intermoleculares relacionadas à modulação da tubulina é importante tendo-se em vista que compostos que apresentam variações de entalpias de interação favoráveis no sítio de interação do taxol são os que apresentam maior citotoxicidade^{49, 50}.

Outros importantes estabilizadores dos microtúbulos incluem a cicloestreptina, a eleuterobina, as sarcodictinas e o laulimalídeo⁵¹⁻⁵⁶. As estruturas químicas desses produtos naturais complexos são mostradas na Figura 1.7. Enquanto a eleuterobina, as sarcodictinas e a cicloestreptina representam prováveis ligantes da cavidade de interação do taxol, sendo a cicloestreptina o primeiro ligante covalente descrito para esse sítio, o laulimalídeo não compete com os taxanos pela cavidade da β -tubulina⁵¹⁻⁵⁷.

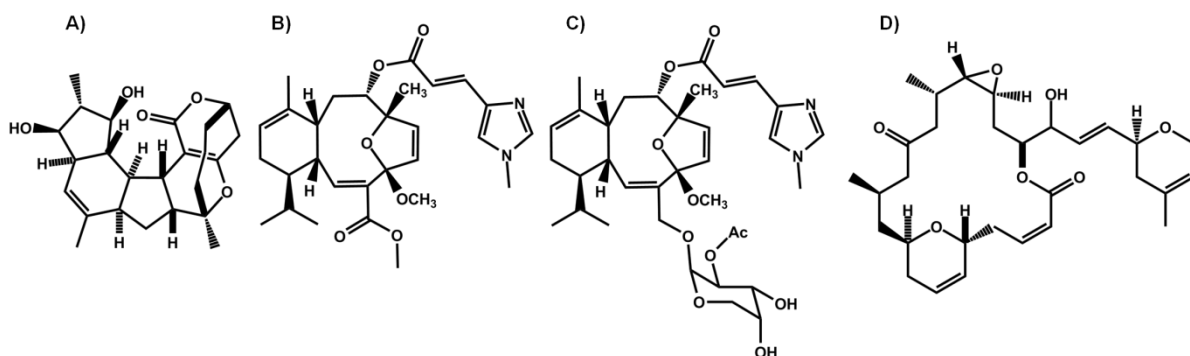


Figura 1.7 - Produtos naturais estabilizadores de microtúbulos. **A)** cicloestreptina, **B)** sarcodictina, **C)** eleuterobina e **D)** laulimalídeo.

1.2.2 Inibidores da polimerização da tubulina

Os alcalóides da vinca, vincristina e vimblastina (Figura 1.3), diferentemente dos taxanos, atuam como inibidores da polimerização da tubulina (ou como desestabilizadores de microtúbulos). Esses produtos naturais também interagem com a β -tubulina, mas em uma cavidade distinta do sítio de interação dos taxanos, localizada na interface entre dois diferentes $\alpha\beta$ -heterodímeros no protofilamento. Na presença desses compostos, o fuso mitótico não se forma e não há divisão celular, desencadeando o processo de morte celular. Os alcalóides da vinca também são sensíveis à ação da glicoproteína-P e possuem baixo índice terapêutico, razão pela qual é importante a pesquisa de novos fármacos na terapia do câncer, capazes de inibir a polimerização dos microtúbulos^{58, 59}.

Além das cavidades de interação dos taxanos e dos alcalóides da vinca, ainda é conhecido o sítio de interação do alcalóide colchicina^e (e da lignana podofilotoxina), localizado na interface entre as duas subunidades da tubulina. Os sítios distintos de interação da colchicina e dos alcalóides da vinca estão mostrados na Figura 1.8^{22, 59, 64}. A colchicina, produto natural com atividade antiproliferativa, foi o primeiro agente desestabilizador de microtúbulos a ser identificado, e desempenhou papel central na elucidação das propriedades físicas e funções do sistema tubulina/microtúbulos. Apesar de sua importância histórica e de apresentar significativa propriedade citostática, a colchicina e a podofilotoxina não estão incluídas entre os fármacos comercialmente disponíveis em razão da sua elevada neurotoxicidade⁶⁵⁻⁶⁸. Até o momento, portanto, apenas os alcalóides da vinca, os taxanos e as epotilonas foram extensivamente utilizados para a quimioterapia do câncer, apesar dos esforços intensivos direcionados à identificação de novos agentes antitubulina.

Nos últimos anos, entretanto, a identificação das combretastatinas^f como ligantes do sítio da colchicina, particularmente da combretastatina A-4 (Figura 1.9), potente agente antimitótico cujo pró-fármaco de fosfato (fosbretabulina) encontra-se atualmente em fase clínica de desenvolvimento para o tratamento do câncer da tireóide, provocou um ampliação do interesse no estudo dos ligantes do sítio da colchicina. A combretastatina A-4, além de potente inibidor da polimerização da tubulina e do crescimento celular, também possui atividade antiangiogênica em baixas concentrações⁶⁹⁻⁷¹. Além disso, ligantes do sítio da

^e A colchicina é um alcalóide originalmente extraído de plantas do gênero *Colchium* e *Gloriosa*. É utilizada para o tratamento de gota, possivelmente em função da inibição da motilidade dos granulócitos^{56, 60-62}. A podofilotoxina é um composto não-alcalóide extraído de plantas do gênero *Podophyllum*. É utilizada como gel tópico para tratamento do condiloma acuminado (verrugas genitais)^{56, 63}.

^f As combretastatinas são compostos fenólicos, contendo um núcleo (*Z*)-estilbeno, presentes em nas cascas de *Combretum cafrum*. A combretastatina A-4 é o mais potente dos derivados naturais⁶⁹.

colchicina, como as combretastatinas, são, em geral, estruturalmente bem mais simples que os taxanos, as epotilonas e os alcalóides da vinca, e podem, ainda, não estar associados ao mecanismo de resistência por efluxo provocado pela glicoproteína-P, frequentemente envolvida na resistência das células de câncer aos agentes antitubulina^{66, 67, 70, 72-74}. Devido a essas propriedades químicas e biológicas, o estudo de ligantes do sítio da colchicina tem sido muito incentivado nos últimos anos, e um grande número de moléculas pequenas sintéticas ligantes desse sítio tem sido identificado. Dentre eles, o núcleo indol foi descrito em vários estudos como esqueleto central de um grande número de inibidores da polimerização da tubulina estruturalmente diversos, alguns deles potentes inibidores da proliferação de tumores resistentes ao taxol (Figura 1.10)^{75, 76}. O planejamento baseado na informação estrutural desses ligantes é uma estratégia interessante e será abordada nessa tese.

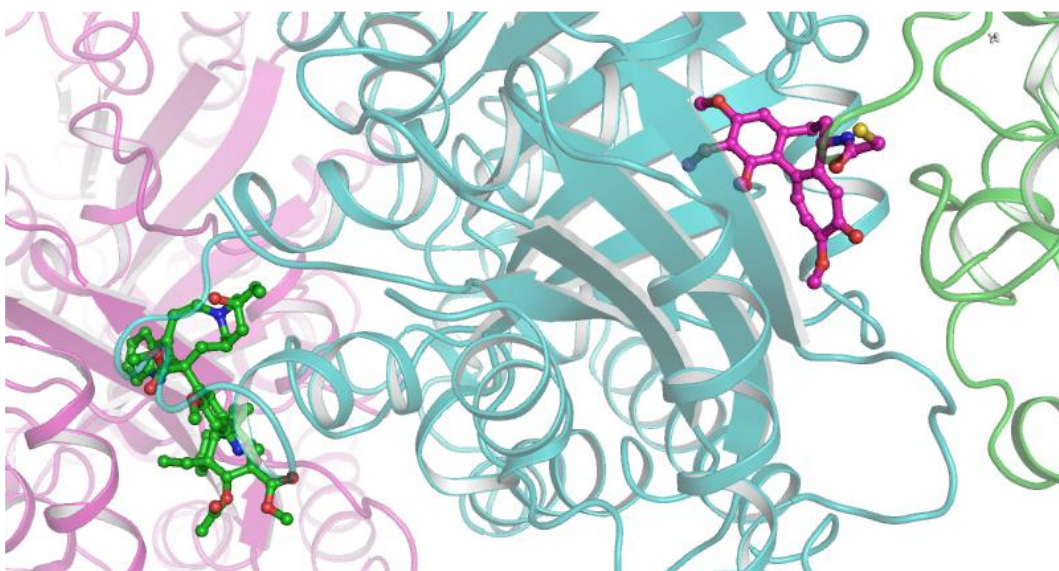


Figura 1.8 - Sítios distintos de interação para inibidores da polimerização de microtúbulos. Análogo de colchicina, na interface $\alpha\beta$ (rosa) e vimblastina, na interface entre dois heterodímeros (verde). Código PDB: 1Z2B⁵⁹.

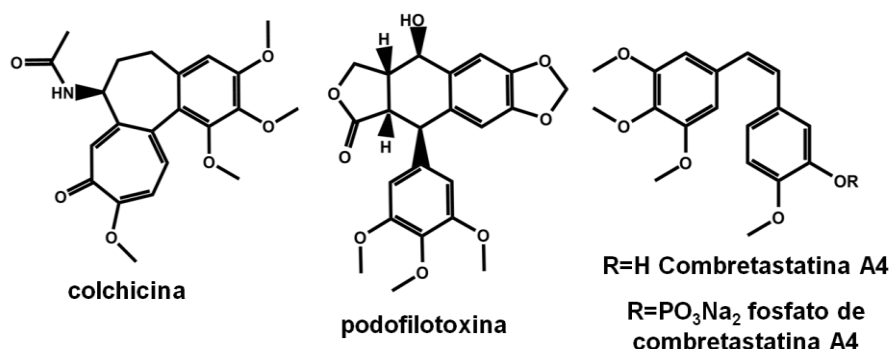


Figura 1.9 - Ligantes do sítio da colchicina, que são inibidores da polimerização dos microtúbulos.

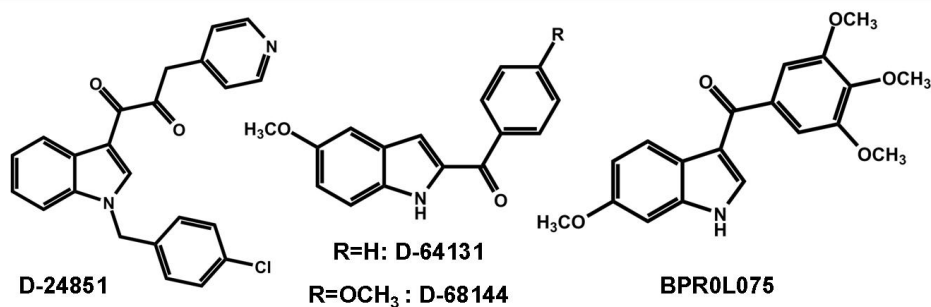


Figura 1.10 - Compostos contendo o núcleo indol que apresentam atividade inibitória da polimerização da tubulina.

1.3 PLANEJAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A identificação de moléculas bioativas, que possam ser estruturalmente modificadas para a adequação de suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas, físico-químicas e de toxicidade, às características necessárias para que tenham elevado potencial terapêutico, é um dos maiores desafios nos projetos de planejamento de novos candidatos a fármacos. Embora “tentativa e erro” sejam inerentes a esse processo, os métodos de planejamento racional têm sido cada vez mais utilizados para a identificação de moléculas bioativas e sua posterior otimização^{77, 78}.

As estratégias modernas de planejamento de novos compostos bioativos estão fundamentadas no conhecimento prévio dos mecanismos bioquímicos envolvidos no processo fisiológico ou patológico que deve ser alterado, para o tratamento de alguma doença ou disfunção humana, e na definição do adequado mecanismo de intervenção terapêutica, ou eleição do alvo terapêutico, para que essa modificação possa ser processada. A definição do alvo para intervenção terapêutica é uma etapa-chave no processo de planejamento de novos compostos bioativos⁷⁹. Um esquema típico da evolução desse processo de planejamento está mostrado na Figura 1.11.

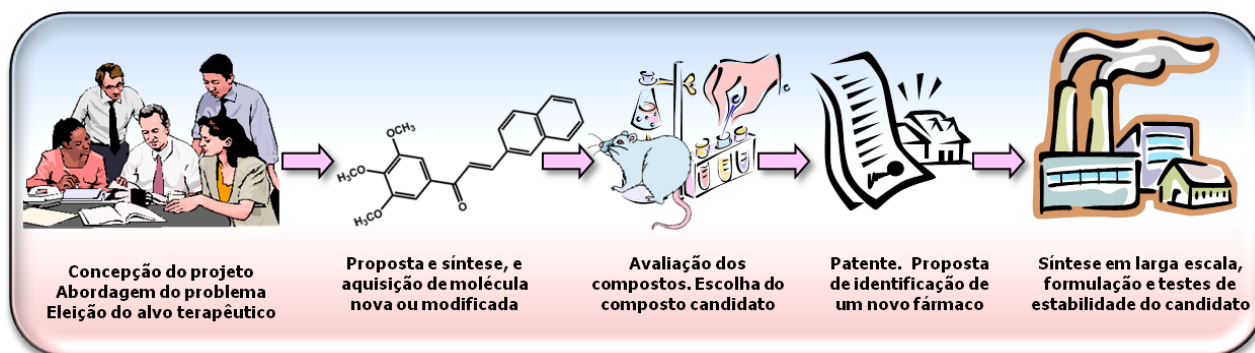


Figura 1.11 - Esquema de evolução típica da fase pré-clínica no processo de descoberta de novos fármacos^{80,81}.

A química medicinal, com sua característica multidisciplinar, que abrange várias especialidades em caráter complementar, desempenha função central nesse processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. Conforme a definição da União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, do inglês, *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a química medicinal está relacionada com a identificação, o planejamento e a preparação de compostos biologicamente ativos, a interpretação do seu modo de interação em nível molecular e a construção das relações entre a estrutura e a atividade, além do estudo do metabolismo^{79, 82}.

A partir da seleção do alvo de intervenção terapêutica, as estratégias mais adequadas para o planejamento de compostos capazes de reconhecer esse alvo poderão ser definidas. Além disso, essas e outras estratégias poderão também ser utilizadas em etapas posteriores para a otimização das propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas físico-químicas e de toxicidade, como mostrado na Figura 1.12. Em qualquer caso, a seleção das estratégias de planejamento a serem adotadas depende do gerenciamento do conhecimento disponível sobre a estrutura do alvo terapêutico selecionado, sobre os moduladores conhecidos e sobre os mecanismos bioquímicos envolvidos na atividade do alvo⁷⁷. Algumas dessas estratégias serão discutidas nessa tese de doutorado.

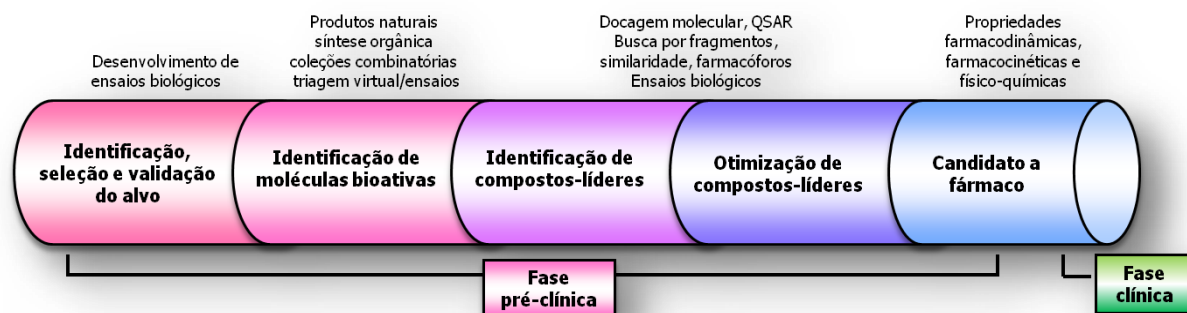


Figura 1.12 - Etapas características de identificação, seleção e otimização dos compostos durante o processo de planejamento de candidatas a novos fármacos. Nos estágios iniciais, as pesquisas se concentram na identificação e seleção de alvos moleculares com elevado potencial terapêutico e na pesquisa por moléculas pequenas capazes de modular o alvo validado. As moléculas bioativas podem ser provenientes de fontes diversas, como produtos naturais, síntese química e coleções combinatórias. Também podem ser selecionadas a partir de procedimentos de triagem virtual e devem ter suas propriedades biológicas determinadas experimentalmente. Em geral, apresentam baixa afinidade. Moléculas que apresentem propriedades desejáveis, como potência e seletividade, são selecionadas como compostos-líderes. Coleções dirigidas de compostos podem, então, ser geradas. Na fase seguinte, os compostos selecionados são otimizados em relação às suas propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas, físico-químicas e de toxicidade. São realizados vários testes *in vitro* e *in vivo* para a avaliação do potencial terapêutico e segurança dos compostos eleitos, para que sejam introduzidos em fases clínicas para testes em humanos. Os compostos que apresentam propriedades múltiplas otimizadas são selecionados como candidatos a fármacos⁸³.

Os métodos de quimio- e bioinformática podem ser integrados ao planejamento de novos candidatos a fármacos, e encontram aplicação em vários estágios desse processo, incluindo desde a identificação, a seleção e a otimização de moléculas bioativas, até proposição de novas entidades químicas (NCE, do inglês, *new chemical entities*), com elevado potencial terapêutico (Figuras 1.11 e 1.12)^{81,83-88}. Os métodos computacionais de química medicinal auxiliam a exploração do imenso espaço químico de compostos de forma a correlacionar o espaço biológico em estudo com a apropriada diversidade química.

1.3.1 Estratégias para o planejamento de novos compostos com atividade anticâncer

O funcionamento dos processos bioquímicos e dos mecanismos relacionados à proliferação celular é dependente de complexas interações intermoleculares não-covalentes entre diferentes proteínas e entre proteínas e micromoléculas reguladoras. O entendimento das propriedades estruturais que determinam a modulação de alvos moleculares, como os microtúbulos, envolvidos em etapas bioquímicas relevantes, como as que determinam a formação do fuso mitótico, permite o planejamento de compostos capazes de alterar a proliferação celular. Os efeitos antiproliferativos provocados por estabilizadores ou inibidores dos microtúbulos são, em regra, resultantes das múltiplas interações desses compostos com as diferentes cavidades de ligação nos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. Compostos apresentando atividade anticâncer, capazes de modular o sistema tubulina-microtúbulos, podem ser planejados a partir do gerenciamento da informação sobre as interações ligante-receptor determinantes para o processo de reconhecimento molecular, e do conhecimento do mecanismo bioquímico de promoção e inibição da polimerização^{22, 89-91}.

No planejamento de compostos com atividade anticâncer é possível explorar a informação estrutural das diversas cavidades de interação da tubulina, através do planejamento baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês, *structure-based drug design*), destacando-se os métodos de triagem virtual (VS, do inglês, *virtual screening*), docagem molecular e construção de modelos farmacofóricos utilizando a estrutura do receptor. A diversidade química de esqueletos estruturais bioativos capazes de interagir nas diferentes cavidades, e as suas características multifuncionais, também podem ser exploradas através do planejamento baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês, *ligand-based drug design*), com ênfase para os métodos baseados em subfragmentos estruturais, similaridade química, simplificação molecular, bioisosterismo e proposição de requerimentos farmacofóricos baseados na estrutura dos ligantes. Os estudos das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR, do inglês, *quantitative structure-activity relationships*) também podem ser utilizados para dirigir a síntese de novas moléculas

durante o processo cíclico de modificação molecular dos compostos com diversidade química selecionada. Nesse campo de desenvolvimento, são várias as oportunidades de sinergias entre essas ferramentas de planejamento^{83-86, 92, 93}. Algumas dessas estratégias serão exploradas nessa tese de doutorado.

A integração desses métodos ao trabalho químico e biológico experimental é um requerimento essencial para a identificação e otimização de novas moléculas bioativas. Por essa razão, alguns métodos bioquímicos para a avaliação de compostos com atividade antimitótica também serão descritos nessa tese.

1.3.2 Métodos computacionais para o planejamento de compostos bioativos

Se a estrutura tridimensional do receptor-alvo é conhecida, a modelagem molecular encontra vasta aplicação. Os programas de docagem/triagem virtual são úteis na proposição de interações intermoleculares importantes para o processo de reconhecimento molecular. Existem diversos programas de docagem molecular que empregam algoritmos diferentes, com capacidade de processamento variável^{77, 94-97}. A identificação dos requerimentos farmacofóricos é parte de outra estratégia útil na busca por novos ligantes bioativos^{77, 97}. Os requerimentos farmacofóricos tipicamente incluem características moleculares definidas, como por exemplo, grupos aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, regiões hidrofóbicas, cátions e ânions, que podem ser identificadas através do estudo de uma série de ligantes bioativos e da complementaridade multifuncional destes ligantes com o alvo molecular. A pesquisa virtual por moléculas comercialmente disponíveis, apresentando os requerimentos farmacofóricos identificados, é uma estratégia que tem sido utilizada em conjunto com os programas de triagem virtual, e tem demonstrado um impacto positivo nos resultados dos processos de docagem, levando a um aumento da porcentagem de substâncias bioativas encontradas em grandes bases de dados^{98, 99}.

Por outro lado, os métodos de QSAR buscam identificar e quantificar as relações predominantes no campo da modelagem, representadas pelas propriedades da estrutura química e atividade biológica correspondente. Os modelos de QSAR podem ser utilizados para orientar a síntese de novas moléculas e para a proposição de modificações moleculares visando a obtenção de moléculas com maior afinidade, ou mais potentes e seletivas. Métodos de QSAR bi- e tridimensionais (2D e 3D) têm sido utilizados para esses propósitos^{77, 78, 100}. A capacidade de criar modelos de QSAR robustos é importante para a análise das relações quantitativas entre a estrutura e atividade. Além disso, podem-se identificar sinergias entre as técnicas de QSAR e outras tecnologias empregadas no planejamento molecular (e.g., triagem virtual, planejamento baseado em estruturas)^{77, 95, 100}.

Esses métodos serão discutidos com maior profundidade no capítulo 3 dessa tese de doutorado.

Capítulo 2

Objetivos

"Mas quem é que sabe como? Viver... o senhor já sabe: viver é etcétera..."

Guimarães Rosa (Grande Sertão : Veredas)

Os objetivos fundamentais desta tese de doutorado são:

- A partir da integração das estratégias de planejamento baseadas na estrutura do receptor e do ligante, identificar padrões de reconhecimento molecular em agentes antitubulina, gerando informação para o planejamento de compostos com atividade anticâncer.
- Identificar e propor interações intermoleculares importantes para o processo de reconhecimento molecular dos compostos selecionados pelo alvo biológico.
- Avaliar bioquimicamente os compostos selecionados.

Os objetivos específicos incluem:

2.1 PARA ESTABILIZADORES DA POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS

- 2.1.1 Desenvolver modelos preditivos de QSAR 2D, empregando o método holograma QSAR, para um conjunto padrão de derivados sintéticos do discodermolídeo com atividade antiproliferativa.
- 2.1.2 Propor modelos de interação para o discodermolídeo e seus análogos com a cavidade de ligação do taxol utilizando o modelo gerado baseado em fragmentos.
- 2.1.3 Desenvolver modelos de QSAR 3D, empregando o método CoMFA, utilizando duas estratégias distintas para o alinhamento estrutural do conjunto padrão de dados de análogos sintéticos do discodermolídeo.
- 2.1.4 Identificar padrões de reconhecimento molecular a partir das conformações de ligação e de modelos de conformação bioativa para os ligantes da cavidade de interação do taxol.
- 2.1.5 Propor modelos de requerimentos farmacofóricos utilizando a informação dos ligantes e a cavidade de interação do taxol na estrutura da β -tubulina.
- 2.1.6 Refinar os modelos farmacofóricos propostos para sua utilização como um filtro molecular em um procedimento de triagem virtual para a identificação de estabilizadores de microtúbulos.
- 2.1.7 Utilizar os modelos de QSAR construídos e de requerimentos farmacofóricos propostos para selecionar intermediários simplificados da síntese da dictioestatina.
- 2.1.8 Avaliar experimentalmente os intermediários sintéticos selecionados.
- 2.1.9 Avaliar experimentalmente um conjunto de diterpenos clerodanos como análogos simplificados do taxol.

2.2 PARA INIBIDORES DA POLIMERIZAÇÃO DOS MICROTÚBULOS

2.2.1 Organizar conjuntos padrão de dados de inibidores diversos da polimerização da tubulina com atividade antiproliferativa.

2.2.2 Construir modelos robustos de QSAR 2D, empregando o método HQSAR, para um conjunto de derivados indólicos citotóxicos estruturalmente diversos.

2.2.3 Estudar os domínios de predição dos modelos de HQSAR construídos para sua aplicação em procedimentos de triagem virtual baseados em fragmentos moleculares.

2.2.4 Integrar os estudos baseados na estrutura dos ligantes com estudos baseados na estrutura do sítio de interação da colchicina para a seleção de compostos derivados de indóis e indolinas.

2.2.5 Selecionar esqueletos químicos sinteticamente viáveis para a proposição de inibidores da polimerização da tubulina com atividade antiproliferativa.

2.2.6 Construir modelos preditivos de QSAR 3D, utilizando os métodos CoMFA e CoMSIA, para cada os conjuntos de dados individuais de compostos indólicos estruturalmente distintos.

2.2.7 Avaliar experimentalmente os compostos selecionados e planejados.

2.2.8 Propor modificações moleculares para a otimização dos compostos ensaiados.

2.2.9 Avaliar experimentalmente os análogos propostos.

Capítulo 3

Métodos Computacionais & Estratégias de Planejamento

*"Viver é negócio muito perigoso."
Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)*

Nas últimas décadas, a integração de áreas estratégicas, como a química e a biologia, e o notável avanço de tecnologias modernas, como a química combinatória, a genômica e os ensaios biológicos automatizados em larga escala (HTS, do inglês, *high-throughput screening*), contribuíram para uma transformação significativa no complexo processo de pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. Nesse novo paradigma, moléculas são planejadas para modulação específica de alvos biológicos relacionados a doenças humanas. Para tal, são investigados os determinantes estruturais do processo de reconhecimento molecular (ligante-receptor), e as propriedades biológicas resultantes: afinidade, potência e seletividade. Nesse contexto, os métodos de cristalografia de raios-X e de ressonância magnética nuclear (RMN), aliados às estratégias de planejamento SBDD e LBDD são importantes para o estabelecimento das bases racionais do planejamento de moléculas bioativas^{77, 78, 100}.

Recentemente, os progressos tecnológicos nas áreas da computação, juntamente com os avanços dos métodos científicos já citados, têm permitido a rápida integração de componentes fundamentais para pesquisa e desenvolvimento de novas substâncias bioativas. Os métodos computacionais são, atualmente, ferramentas amplamente utilizadas nos projetos de descoberta e desenvolvimento de novos candidatos a fármacos, podendo ser empregados nas etapas de identificação e de modificação estrutural de moléculas com atividade biológica (Figuras 1.10 e 1.11)^{77, 78, 88, 100,101}. Dentre as diversas ferramentas da química medicinal, aquelas abordadas nessa tese de doutorado estão abaixo descritas.

3.1 PLANEJAMENTO BASEADO NA ESTRUTURA DO RECEPTOR

A utilização da informação 3D sobre as estruturas das proteínas (ou alvos macromoleculares de outras classes, como o DNA e o RNA) no planejamento de moléculas bioativas constitui uma estratégia bem estabelecida e bastante utilizada denominada SBDD. Essa informação geralmente é obtida a partir da análise de estruturas obtidas por cristalografia de raios-X (ou eletrônica), RMN ou até mesmo através de modelagem por homologia, que são depositadas em bases de dados públicas, onde podem ser acessadas livremente, dentre as quais a principal é o PDB (do inglês, *Protein Data Bank*)^{77, 94-97, 102-105}. Uma vez que a topologia e a natureza química da cavidade de interação de uma proteína-alvo específica sejam conhecidas, e as possíveis interações intermoleculares entre ligantes e essa cavidade sejam identificadas, esse conjunto de informações pode ser empregado para a identificação de novos ligantes dessa interface de interação e para a otimização de esqueletos estruturais previamente identificados, reduzindo, portanto, o número de compostos que necessitam ser avaliados experimentalmente. Para isso, as estratégias de

SBDD requerem um substancial entendimento dos aspectos espaciais e energéticos que afetam as afinidades dos complexos proteína-ligante^{77, 106, 107}. Um esquema de integração de métodos experimentais e computacionais no SBDD está mostrado na Figura 3.1.

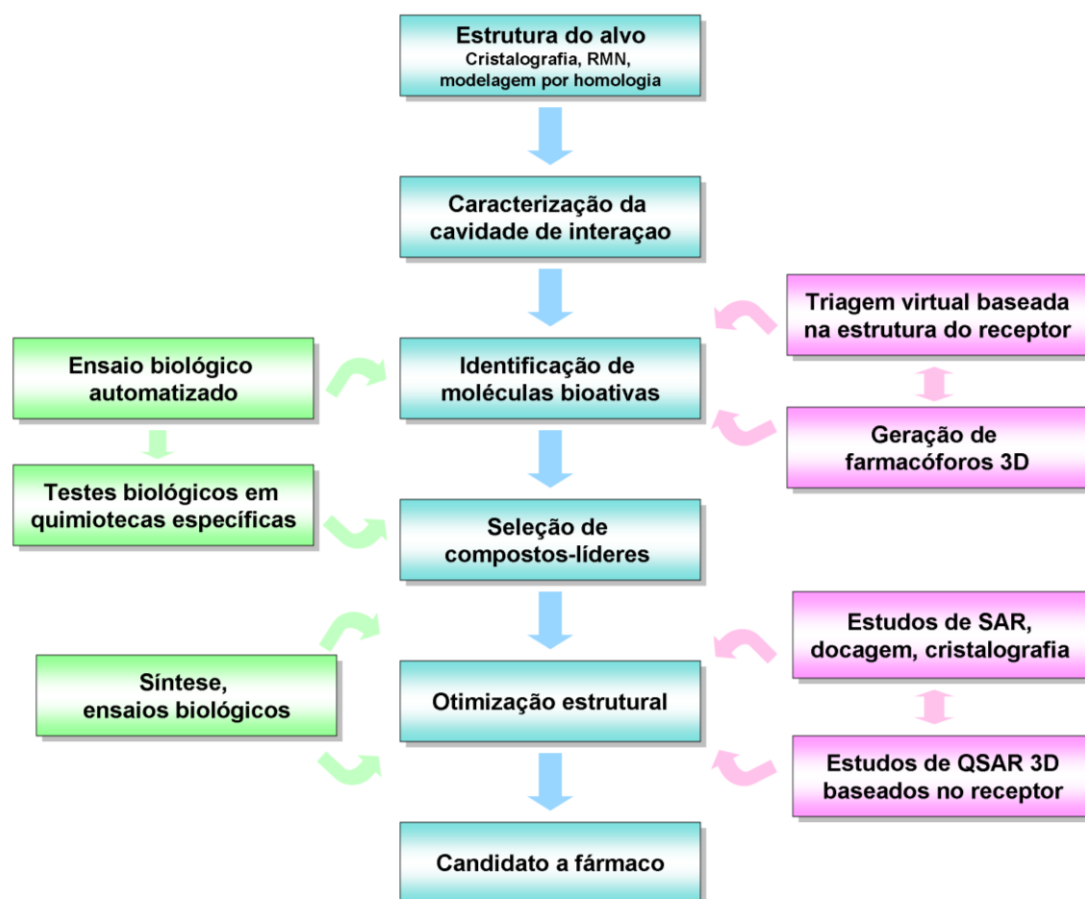


Figura 3.1 - Organograma do processo iterativo de SBDD. As características químicas do sítio de ligação do alvo biológico, conhecidas a partir de estruturas de cristalografia de raios-X ou por RMN, devem ser cuidadosamente examinadas. Modelos por homologia também podem ser construídos. A integração dos métodos *in silico* (triagens virtuais, geração de farmacóforos, docagens, estudos de QSAR 3D) com métodos experimentais (síntese, ensaios biológicos, cristalografia) aumenta as chances de identificação de um candidato a fármaco que possa prosseguir em fases clínicas de desenvolvimento⁷⁷.

As moléculas bioativas podem ser identificadas a partir de estudos de docagem molecular/triagem virtual nas cavidades de interação estudadas ou através do uso de modelos farmacofóricos construídos a partir da estrutura do receptor. Grandes quimiotecas ou coleções dirigidas de compostos podem ser virtualmente avaliadas utilizando esses métodos. Além disso, os compostos podem ter sua estrutura molecular planejada nessas cavidades utilizando a informação a respeito das interações intermoleculares complementares com os resíduos da proteína^{77, 95, 97, 102, 106, 108, 109}. Como evidenciado nas Figuras 1.11 e 3.1, a integração dos métodos computacionais com os métodos experimentais é um requisito para o processo iterativo de SBDD.

Os compostos bioativos identificados precisam ser otimizados em relação às suas propriedades. Variações estruturais dentro da diversidade química selecionada são utilizadas para adequar o perfil das moléculas às características necessárias à sua aplicação terapêutica. Nesse contexto, coleções dirigidas de compostos podem ser planejadas. Os estudos de docagem molecular e de QSAR 3D baseados na estrutura do receptor podem ser utilizados durante essa etapa, para guiar a seleção e síntese de moléculas com propriedades adequadas^{77, 78, 95}.

3.1.1 Docagem molecular

Calcular interações intermoleculares entre uma macromolécula e seus ligantes é uma tarefa complexa. O método de docagem molecular consiste na predição do posicionamento (conformação e orientação) de uma molécula pequena na cavidade de interação de uma macromolécula, que é seguida de uma avaliação (ou pontuação) do modo de ligação proposto, como ilustrado na Figura 3.2. Esse processo pode ser dividido em duas fases: (i) a proposição de modelos de ligação para conformações da molécula analisada (ou predição de conformações e orientações bioativas) e (ii) a predição da afinidade de dada conformação da micromolécula pela cavidade de interação a partir da avaliação das suas interações intermoleculares (ou complementaridade eletrostática e estérica) com o receptor-alvo. Enquanto vários algoritmos de docagem disponíveis são razoavelmente robustos para prever o modo de ligação de uma molécula biologicamente ativa, com vários exemplos de sucesso reportados na identificação de compostos bioativos a partir de grandes bases de dados⁹, as funções de avaliação ainda são um fator limitante. A predição dos valores de afinidade para diferentes moléculas é complicada pelos cálculos dos valores de energia de solvatação e dos muitos graus de liberdade das moléculas envolvidas na interação. Além disso, as diferenças entre os valores de energia de ligação para compostos com valores de afinidade na ordem do baixo nanomolar e do alto micromolar são menores que 5 kcal/mol^{77, 94-97, 103, 115}.

Selecionar, dentre os mais de 30 programas disponíveis – que representam diferentes combinações de métodos para a amostragem de conformações dos ligantes, algoritmos de docagem, funções de pontuação e capacidade de processamento – o mais

⁹ Não há necessariamente uma correlação entre o sucesso de um procedimento de triagem virtual e a capacidade do programa utilizado em acertar o correto posicionamento do ligante. A docagem molecular, entretanto pode ajudar a distinguir entre possíveis ligantes e candidatos que provavelmente não são ligantes, resultando num efetivo aumento da porcentagem de compostos com afinidade que são mais bem pontuados que os não-ligantes. Esse enriquecimento em relação aos testes feitos aleatoriamente tem sido verificado em vários estudos na literatura^{88, 94, 96, 110-114}.

apropriado para obtenção de resultados confiáveis para um dado alvo e um conjunto de ligantes com características específicas não é uma tarefa simples. Vale lembrar que um número limitado desses programas é, na realidade, amplamente utilizado^{77, 108, 116-118}.

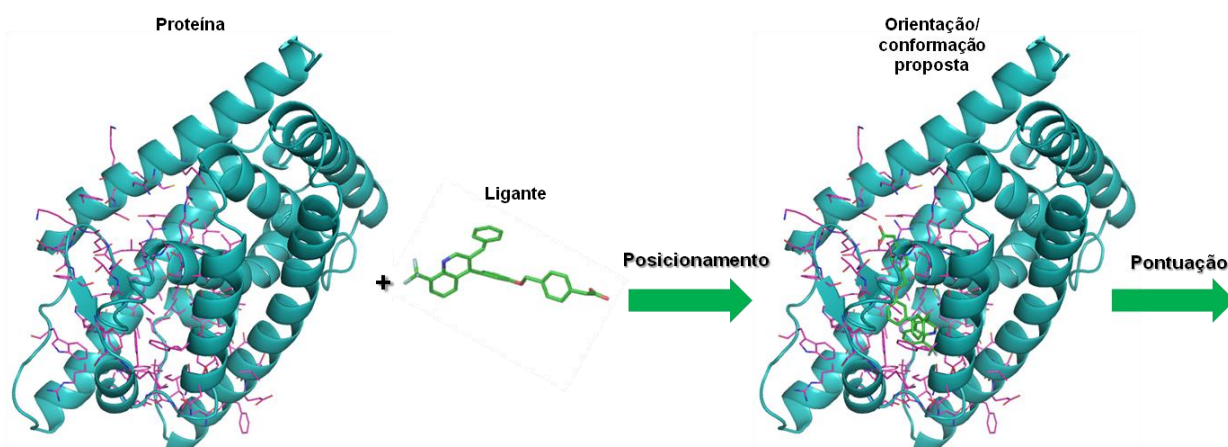


Figura 3.2 - Esquema ilustrativo do processo de docagem molecular.

3.1.1.1 Métodos de amostragem conformacional

O tratamento da flexibilidade dos ligantes pode ser dividido em 3 categorias básicas de métodos: (i) sistemáticos (de construção incremental, busca conformacional e de bases de dados), (ii) aleatórios ou estocásticos (Monte Carlo, algoritmos genéticos e busca tabu) e (iii) de simulação (dinâmica molecular ou minimização de energia).

Programas que utilizam a construção incremental dividem o ligante em um conjunto de fragmentos, que são posicionados na cavidade, sendo o restante da estrutura molecular do ligante construído, com minimizações de energia após cada adição. O programa FlexX utiliza esse método¹¹⁸. Bibliotecas de conformações geradas previamente também podem ser utilizadas, resultando num processo de docagem de corpo rígido de conformações pré-geradas. O programa DOCK utiliza um algoritmo similar ao descrito^{96, 108}.

Os métodos estocásticos de amostragem conformacional exploram o espaço conformacional do ligante por inteiro. Os algoritmos genéticos, que compreendem abordagens inspiradas em biologia evolutiva, como hereditariedade, mutação, seleção e recombinação, são bastante utilizados. As poses dos ligantes são representadas como cromossomos contendo informações (genes) como ângulos torsionais, rotação e translação do ligante no espaço. Essas poses evoluem por transmissão de sua informação alterada por operadores como mutação e recombinação. Conformações de baixa energia são então

selecionadas para compor a próxima geração. O programa GOLD e algumas versões do programa DOCK utilizam esse método¹¹⁷.

O tratamento da flexibilidade da proteína é mais complicado, embora alguns métodos para considerar flexibilidade de resíduos específicos já tenham sido desenvolvidos, incluindo os métodos de dinâmica molecular e o uso das bibliotecas de rotâmeros, presente no programa GOLD^{77, 94, 96, 116}.

3.1.1.2 Funções de pontuação

As funções de pontuação são predições da energia livre de ligação dos compostos ao alvo molecular ou simples avaliações da qualidade do ajuste. Uma vez que as técnicas de simulação da energia livre são bastante demoradas para a análise frequentemente necessária de um grande número de complexos proteína-ligantes, as funções de pontuação assumem várias simplificações para a avaliação dos modos de ligação. Três tipos de funções de pontuação são frequentemente aplicados: (i) baseados em campos de força, (ii) métodos empíricos e (iii) métodos baseados no conhecimento.

A maioria dos métodos de pontuação baseados em campos de força, que utilizam mecânica molecular, quantifica a soma das energias de interação receptor-ligante e da energia interna do ligante, considera uma conformação única da proteína e não inclui termos de solvatação. As interações entre ligantes e proteínas são descritas por termos eletrostáticos, de acordo com a formulação de Coulomb, e de van der Waals, dado pelo potencial de Lennard-Jones. A forma funcional da energia interna do ligante considera contribuições semelhantes. Algumas funções incluem termos para ligações de hidrogênio. A função GoldScore, do programa GOLD, é uma delas. O programa DOCK também utiliza uma função de pontuação baseada em mecânica molecular^{94, 96, 108, 117}.

As funções de pontuação empíricas são ajustadas para reproduzir dados experimentais, incluindo energias de ligação e conformações derivadas de cristalografia de raios-X, a partir de uma soma de várias funções parametrizadas individuais não-correlacionadas, obtidas por regressão dos dados disponíveis. Como essas funções são mais simples, embora possam incluir termos da mecânica molecular, as contribuições não-entálpicas, como as penalidades por perda de entropia rotacional do ligante, também podem ser adicionadas. A função ChemScore do programa Gold, é uma delas. Os programas FlexX e Surflex também utilizam funções de pontuação empíricas^{94, 96, 117-119}.

3.1.2 Triagem virtual baseada na estrutura do receptor

A docagem molecular pode ser aplicada para diferentes propósitos no processo de desenvolvimento de novos compostos bioativos. Uma estratégia bastante difundida que emprega os métodos de docagem molecular como uma de suas etapas determinantes é a triagem virtual baseada na estrutura do receptor (SBVS, do inglês *structure-based virtual screening*), esquematizada na Figura 3.3. Nessa aplicação, as pontuações para milhares ou milhões de compostos pertencentes a extensas bases de dados de moléculas, obtidas das avaliações de seus posicionamentos na cavidade de interação de um alvo específico, são utilizadas para classificar esses compostos, orientando, portanto, a seleção de moléculas a serem adquiridas comercialmente ou sintetizadas e avaliadas experimentalmente^{77, 88, 94, 95, 97, 101, 103, 106, 107, 116, 120-124}.



Figura 3.3 - Etapas de um processo típico de SBVS^{77, 106}.

A triagem virtual se desenvolve tipicamente em múltiplas etapas computacionais, incluindo o preparo da estrutura do alvo, a seleção da base de dados de compostos químicos, a docagem, a pontuação, as análises pós-docagem, a classificação, a inspeção visual e a seleção de compostos para testes biológicos (Figura 3.3). O processo de seleção

e preparação da estrutura do receptor envolve a identificação das estruturas 3D disponíveis em mais alta resolução, a atribuição das cargas parciais, a adição dos átomos de hidrogênio (quando pertinente), a verificação dos estados de protonação e tautoméricos e a avaliação da flexibilidade. Independentemente da origem da base de dados de moléculas pequenas utilizada, filtros moleculares podem ser utilizados para reduzir o número de compostos a serem virtualmente ensaiados. Variações da regra de Lipinski^h ou de propriedades moleculares orientadas por grupos de ligantes conhecidos podem ser utilizadas para planejar bases de dados mais apropriadas para a triagem virtual. Os métodos de docagem molecular e as funções de pontuação são então utilizados para avaliar a complementaridade dos modelos de ligação entre as micromoléculas e a cavidade de interação do receptor selecionado, classificando os compostos em uma lista de prioridades. As análises pós-docagem são importantes para reduzir o número de compostos falso-positivos que serão experimentalmente avaliados. O emprego da estratégia de pontuação por consenso, que utiliza uma combinação de várias funções de pontuação, ou de métodos que incluem parâmetros mais complexos como flexibilidade e moléculas de água, por exemplo, estão dentre as estratégias pós-docagem mais utilizadas. A inspeção visual dos posicionamentos bem classificados, incluindo a análise da complementaridade dos compostos com a cavidade de interação, e a verificação do estabelecimento de interações intermoleculares conhecidamente essenciais, são úteis para balancear as deficiências associadas com os métodos de docagem e as funções de pontuação^{77, 88, 94-97, 101-103, 106-109, 116, 120-124, 126}.

3.1.3 Requerimentos farmacofóricos definidos a partir da estrutura do receptor

Os requerimentos farmacofóricos podem ser definidos como o conjunto de características essenciais para o processo de reconhecimento molecular de ligantes por um alvo biológico específico e consequente atividade biológica. Tipicamente, incluem representações das principais forças intermoleculares de interação não-covalentes, como por exemplo, ligações de hidrogênio, eletrostáticas e de van der Waals, além de características como regiões hidrofóbicas, volumes de exclusão e grupos substituintes particulares. Os requerimentos farmacofóricos podem ser identificados através do estudo das características comuns presentes em uma série de ligantes bioativos (e ausentes em compostos que não apresentam atividade), portanto, uma estratégia de LBDD, ou da complementaridade multifuncional destes ligantes com o alvo macromolecular^{77, 95, 99, 127, 128}.

^h De acordo com a regra dos 5, formulada por Lipinski e colaboradores, baixa absorção ou permeação é mais provável quando compostos administrados por via oral possuem mais do que 5 doadores de ligações de hidrogênio, 10 aceptores de ligações de hidrogênio, peso molecular maior que 500 e logaritmo do coeficiente de partição água-etanol calculado maior que 5¹²⁵.

A identificação de requerimentos farmacofóricos representa uma estratégia útil no entendimento das interações intermoleculares essenciais para a ligação de pequenas moléculas ao seu receptor e, portanto, para a identificação e otimização de novos ligantes bioativos. Uma vantagem importante dessa estratégia está na capacidade de distinguir esqueletos estruturais diversos que apresentam funções químicas comuns, ou grupos capazes de estabelecer interações intermoleculares similares⁷⁷. Os modelos farmacofóricos são ferramentas bastante versáteis, podendo ser utilizados como filtros molecularesⁱ, para avaliar posições de docagem nos procedimentos de triagem virtual, para guiar a síntese de compostos com potência e afinidade otimizadas e também para o alinhamento estrutural de moléculas para estudos de QSAR 3D^{111, 113, 120, 128-132}.

O ambiente químico da cavidade de interação de um alvo molecular pode ser utilizado para definir regiões importantes para o estabelecimento de interações com ligantes, e para gerar, dessa maneira, modelos farmacofóricos baseados na cavidade de interação. Essas regiões podem ser identificadas através da análise visual das características estruturais da cavidade, ou com o auxílio de programas como Flex-Pharm, um módulo do programa de docagem molecular FlexX, ou mesmo através do mapeamento do sítio por sondas químicas, como no programa GRID, para a identificação de regiões preferenciais de ligação (do inglês, *hot spots*)^{133, 134}. Um exemplo de geração de um modelo farmacofórico por mapeamento da cavidade de interação está ilustrado na Figura 3.4.

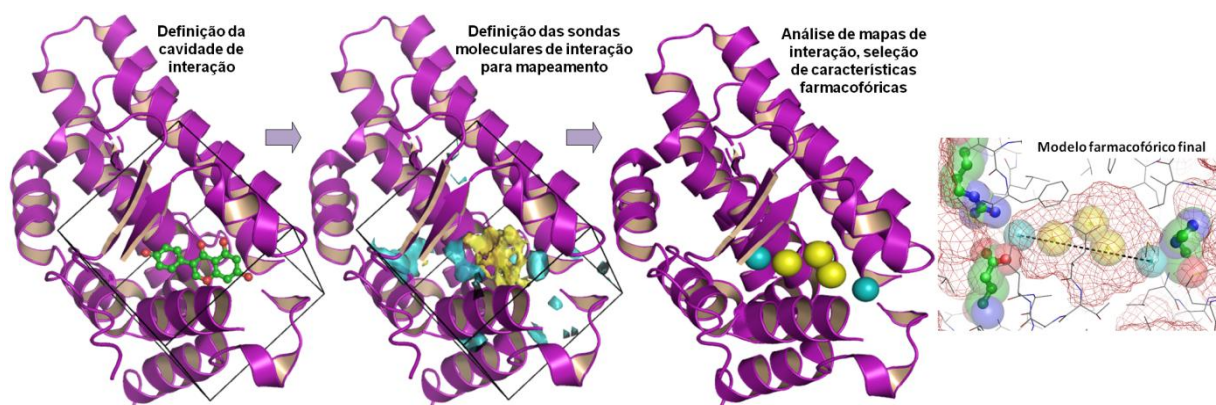


Figura 3.4 - Etapas da construção um modelo farmacofórico, mostrando o mapeamento por sondas hidrofóbicas (amarelo) e hidrofílicas (azul) da cavidade de interação do receptor de estrógeno. Regiões importantes de ligação são traduzidas na proposição do modelo farmacofórico final^{77, 135}.

ⁱ A aplicação de restrições, construídas a partir da estrutura do receptor, às estratégias de triagem virtual tem demonstrado vantagens significativas para a identificação de compostos bioativos^{77, 97, 111, 128}.

3.2 PLANEJAMENTO BASEADO NA ESTRUTURA DO LIGANTE

Graças à evolução dos métodos em biologia estrutural, incluindo a cristalografia de raios-X, cristalografia eletrônica e RMN, um número cada vez maior de alvos moleculares tem suas estruturas 3D disponíveis em bancos de dados como o PDB^{104, 105, 136}. A estrutura do alvo molecular pode, entretanto, não ser conhecida. Nesse caso, o planejamento de novos compostos bioativos pode ser conduzido a partir das características multifuncionais dos ligantes conhecidos ou da micromolécula endógena, substrato ou agonista, envolvida no processo bioquímico estudado, estratégia conhecida como LBDD⁷⁹. Os métodos de LBDD se baseiam na análise comparativa de moléculas que possuem diferentes perfis de afinidade pelo alvo molecular. O LBDD também assume notável importância quando a diversidade química de compostos que interage com uma cavidade de interação muito flexível ou não delimitada (como as cavidades de interação proteína-proteína) é explorada^{77, 78, 100}. A identificação de um grande número de moléculas bioativas foi possível devido aos métodos de LBDD, que não exigem informação sobre a topologia do alvo molecular^{127, 137-139}. Em muitos casos, o uso combinado dos métodos de LBDD e SBDD pode ser útil no processo de planejamento, gerando conhecimentos novos a partir de sinergias entre as estratégias complementares^{77, 78, 100, 131, 135, 136, 140}.

3.2.1 Estudos das relações quantitativas entre a estrutura e a atividade

A identificação de compostos apresentando potencial para posterior modificação estrutural é uma etapa importante no processo de desenvolvimento de novos compostos-líderes. Além de afinidade e potência, simplicidade estrutural, capacidade de modificação estrutural por síntese química e potencial favorável para proteção intelectual devem ser consideradas¹⁴¹. Independentemente da estratégia adotada para a identificação inicial das moléculas bioativas, em geral, estas apresentam baixa afinidade e potência. Por essa razão, esses parâmetros devem ser aprimorados através de ciclos iterativos de modificação estrutural. Além disso, seletividade, estabilidade e propriedades farmacocinéticas devem ser ajustadas para que candidatos a fármacos sejam obtidos. Nesse contexto, o entendimento das relações estrutura-atividade é fundamental para o progresso do processo de modificação molecular com a finalidade de obter compostos com propriedades mais apropriadas^{77-79, 100}.

Quando as relações entre as estruturas químicas de compostos e suas correspondentes atividades biológicas são quantitativamente medidas, avaliadas e comparadas, tem-se o QSAR. Na construção de modelos de QSAR, são aplicadas análises

estatísticas das relações entre descritores da estrutura molecular e a atividade dos compostos em uma maneira orientada para identificar descritores quantitativamente relacionados à propriedade estudada. O processo cíclico de formulação de QSAR, predição das propriedades-alvo, síntese e ensaios biológicos prossegue até que moléculas qualificadas sejam obtidas (Figura 3.5). Quando os descritores são bidimensionais, têm-se os métodos de QSAR 2D. Como exemplos, têm-se os métodos baseados em descritores físico-químicos ou em impressões digitais moleculares, como os hologramas. Quando os descritores são tridimensionais, dependentes da conformação dos ligantes, tem-se o QSAR 3D^{78, 86, 100, 142-145}. Os métodos de QSAR 2D e 3D podem ser utilizados em conjunto, ou mesmo associados a estudos baseados na estrutura do receptor. A integração de métodos pode resultar em oportunidades úteis de incorporação de informações no desenvolvimento de compostos-líderes^{77, 78, 95, 100, 131, 135, 140}.

Para que os estudos de QSAR possam ser realizados, os compostos estudados devem ser estruturalmente relacionados e precisam exercer os seus efeitos através de um mesmo receptor biológico, na mesma cavidade de interação. A propriedade biológica estudada, geralmente afinidade, potência ou seletividade, deve ter sido medida de maneira padronizada e validada para ser útil no desenvolvimento de modelos quantitativos de comparação¹⁴²⁻¹⁴⁴. Três métodos de QSAR recebem atenção particular nessa tese de doutorado.

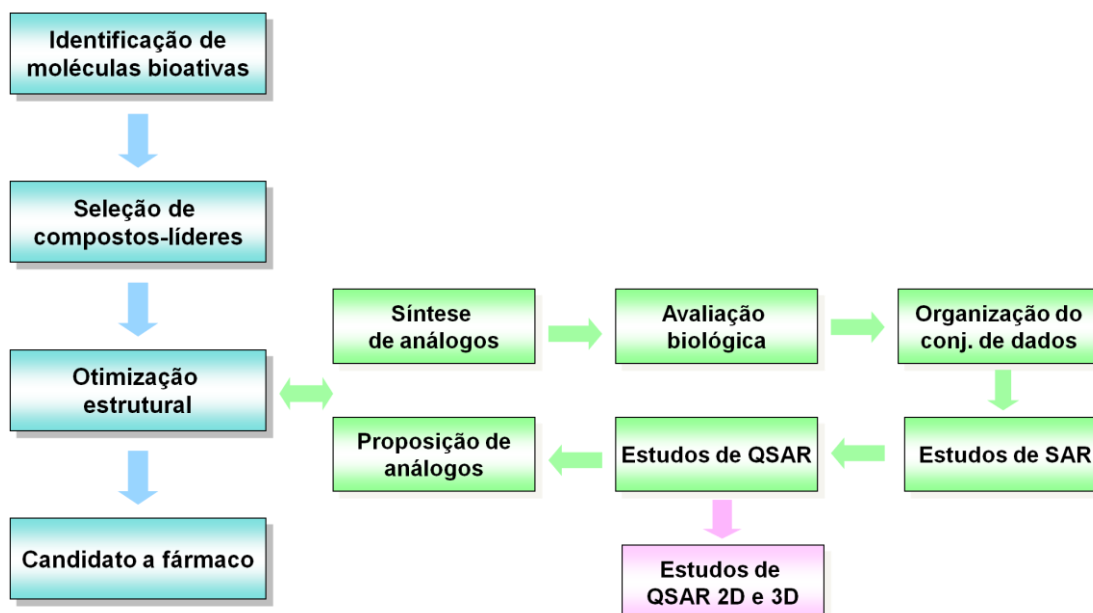


Figura 3.5 - Representação do processo de otimização de moléculas bioativas até a seleção de um candidato a fármaco, demonstrando a importância dos métodos de SAR e QSAR nesse processo⁷⁷.

3.2.1.1 Holograma QSAR

O holograma QSAR (HQSAR, do inglês, *hologram QSAR*) é um método de QSAR bidimensional, baseado em fragmentos moleculares especializados, em que as moléculas dos conjuntos de dados são convertidas em sequências numéricas que codificam sua estrutura 2D. Baseando-se no conceito central do QSAR, de que a atividade biológica é função da estrutura molecular, é possível estabelecer relações quantitativas entre a atividade de uma série de moléculas a partir das informações codificadas nos descritores bidimensionais^{78, 100, 146}.

Como ilustrado na Figura 3.6, no HQSAR, cada molécula do conjunto de dados é estruturalmente fragmentada e os fragmentos resultantes são distribuídos de maneira a formar os hologramas moleculares, impressões digitais moleculares estendidas que codificam todos os tipos possíveis de fragmentos (lineares, ramificados, cíclicos e sobrepostos). Os hologramas moleculares também mantêm uma contagem da frequência com que cada tipo de fragmento aparece na molécula, de maneira que fragmentos considerados iguais são alocados na mesma posição do hologramaⁱ (Figura 3.6). Informações tridimensionais, como hibridação e quiralidade, são também codificadas nos hologramas moleculares^{78, 100, 146, 148}.

Com a representação da estrutura química das moléculas em seus hologramas moleculares correspondentes, o HQSAR não requer o cálculo e a seleção de parâmetros físico-químicos utilizados comumente como descritores em modelos de QSAR 2D, e nem exige informação 3D explícita (como conformações de ligação) para essas moléculas. Os únicos requerimentos são as estruturas 2D das moléculas do conjunto de dados e as correspondentes propriedades. Desta forma, os hologramas definem a dimensionalidade do espaço ocupado pelos descritores e os modelos de QSAR são, então, desenvolvidos empregando-se o método de regressões multivariadas pelos mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês, *partial least squares*) e técnicas de validação cruzada (Figura 3.6)^{77, 78, 100, 135, 140, 149-151}.

Durante o processo de modelagem de HQSAR, vários parâmetros relevantes para a obtenção dos hologramas, e, portanto, que afetam a qualidade dos modelos, podem ser definidos. Esses parâmetros são: i. comprimento do holograma; ii. tamanho dos fragmentos; e, iii. distinção dos fragmentos. O comprimento do holograma define o número de posições no holograma disponíveis para que diferentes fragmentos sejam incorporados. O tamanho

ⁱ Alguns estudos comparativos que utilizam descritores baseados em fragmentos para descrever a estrutura molecular demonstram que descritores que utilizam frequências de fragmentos são capazes de explicar melhor os sistemas moleculares que os descritores tradicionais que não utilizam pesos^{100, 147}.

dos fragmentos é definido pelo número máximo (N) e mínimo (M) de átomos que é imposto aos fragmentos a serem gerados e os parâmetros de distinção dos fragmentos definem as características moleculares que distinguem um fragmento do outro. Como, em geral, o comprimento do holograma é menor que o número total de fragmentos diferentes gerados, fragmentos distintos são usualmente alocados numa mesma posição do holograma. A maneira como os fragmentos são distribuídos nas posições do holograma influencia diretamente a qualidade dos modelos. Várias combinações de distribuição de fragmentos nas posições do holograma molecular são testadas para impedir que haja a colisão de fragmentos, ou seja, que fragmentos distintos e importantes sejam agrupados numa mesma posição. Os parâmetros utilizados para distinguir os fragmentos são ajustáveis, e de fundamental importância, pois definem o tipo de informação 2D que será incluída na criação dos descritores. Na Tabela 3.1 estão apresentados os diferentes parâmetros de distinção dos fragmentos considerados no método HQSAR. Combinações desses parâmetros são utilizadas para escolha daquela que produz o resultado estatístico mais significativo^{78, 100, 140, 148, 152}.

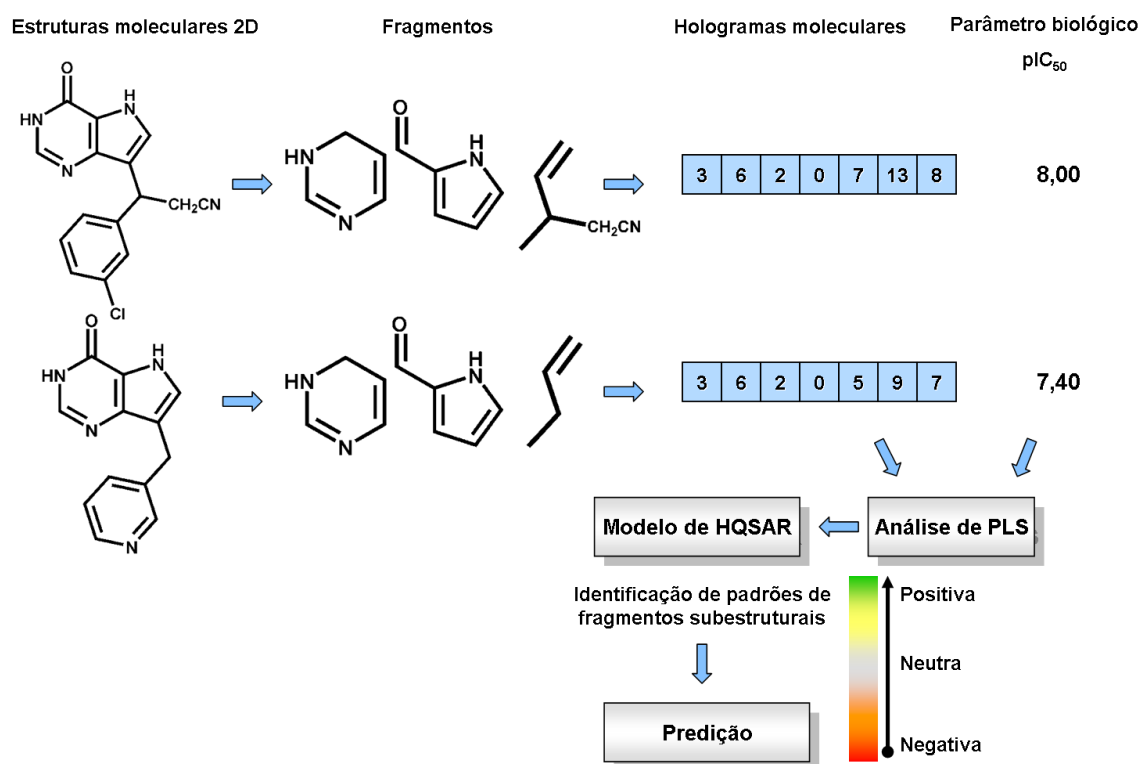


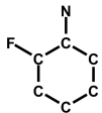
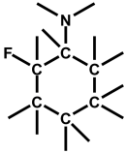
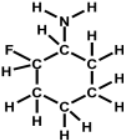
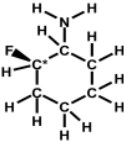
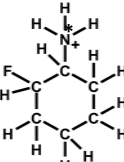
Figura 3.6 - Esquema ilustrativo do processo de geração dos hologramas moleculares e das etapas envolvidas na geração de um modelo de HQSAR^{78, 100}.

Os hologramas gerados a partir da estrutura das moléculas do conjunto de dados são os descritores relacionados com a propriedade-alvo através de PLS, para o desenvolvimento do modelo estatístico de QSAR (Figura 3.6). Utilizando esse método,

padrões de fragmentos subestruturais relevantes para a propriedade alvo são identificados. Um composto estruturalmente relacionado ainda não testado, e, portanto, não incluído no conjunto de dados utilizado para a modelagem, pode, então, ter a sua propriedade biológica predita quando avaliado pelo modelo construído^{78, 100, 140, 149-154}.

Além de prever a propriedade-alvo de moléculas ainda não testadas, um modelo preditivo de HQSAR pode fornecer importantes indicações sobre quais fragmentos moleculares são importantes para a propriedade estudada. Estas informações podem orientar a síntese de novas moléculas com propriedades otimizadas. No método HQSAR, esse objetivo é atingido pela geração de mapas de contribuição individuais 2D, que utilizam um código de cores para indicar a magnitude da contribuição de diferentes fragmentos moleculares para a propriedade em estudo (Figura 3.6)^{78, 100, 140, 149-152}. Esse método é capaz de gerar modelos com capacidade de interpolação e extrapolação em diversos conjuntos de dados.

Tabela 3.1 - Parâmetros de distinção dos fragmentos no método HQSAR.

Distinção dos Fragmentos	Definição	Representação
Átomo (A)	Fragmentos são diferenciados com base nos tipos de átomos	CCCCCFN
Ligação (B)	Fragmentos são distinguidos com base nos tipos de ligação: simples, dupla, tripla e aromática	
Conectividade (C)	Fragmentos são diferenciados de acordo com a hibridação dos átomos contidos no fragmento	
Hidrogênio (H)	Fragmentos são diferenciados com base na presença e número de átomos de hidrogênio	
Quiralidade (Ch)	Fragmentos são distinguidos de acordo com a presença de centros estereogênicos	
Doador e acceptor	Fragmentos são diferenciados com base na presença de átomos aceptores ou doadores de ligações hidrogênio	

3.2.1.2 Integração dos modelos de HQSAR com outros métodos

A regulação dos processos bioquímicos é dependente de múltiplas interações intermoleculares não-covalentes entre os resíduos das proteínas e os grupos funcionais que compõem os moduladores^{100, 136}. As estruturas químicas dos compostos bioativos podem ser imaginadas como composições de fragmentos especificamente organizadas para estabelecer interações 3D com as cavidades dos receptores. Dessa forma, a codificação das estruturas moleculares em fragmentos subestruturais pode ser uma maneira simples e adequada para compreender as propriedades farmacodinâmicas dos ligantes bioativos^{100, 136}. Embora as técnicas de QSAR sejam tradicionalmente utilizadas para o desenvolvimento de modelos robustos capazes de prever a atividade de compostos relacionados estruturalmente, os mesmos princípios também têm sido utilizados para a avaliação de quimiotecas de compostos estruturalmente diversos (Figura 3.7). Ainda que a caracterização dos limites do domínio de predição dos modelos de QSAR não seja uma tarefa simples, a capacidade de utilizar modelos validados para a identificação de moléculas bioativas em grandes bases de dados apresenta certa flexibilidade. Uma vez que os fragmentos estruturais mais importantes para a atividade biológica das moléculas do conjunto de dados sejam identificados a partir dos modelos de HQSAR, com diferentes pesos para os diferentes fragmentos, essas características podem ser procuradas em bases de dados contendo moléculas diversas, como uma pesquisa por fragmentos especializados^{78, 100, 146, 155, 156}.

A afinidade de um ligante pelo receptor-alvo, e sua consequente atividade biológica, são o resultado de uma variedade de fatores, incluindo as interações intermoleculares estabelecidas entre a micro- e a macromolécula em questão. Uma vez que os fragmentos moleculares mais importantes para a atividade biológica, como identificados pelos modelos de HQSAR, carregam uma coleção de características estruturais 2D que podem ser quantitativamente transformadas em interações proteína-ligante de caráter 3D^k, mesmo na ausência de informações estruturais sobre esses complexos, os resultados dos modelos de HQSAR também podem ser utilizados para entender os determinantes químicos para a modulação do alvo biológico. Além disso, quando a informação estrutural sobre a cavidade do receptor-alvo é conhecida, os fragmentos selecionados podem servir como blocos de construção para o SBDD. As características estruturais identificadas a partir dos modelos de HQSAR podem ser entendidas como farmacóforos 2D. Fragmentos ou grupos funcionais

^k Rigorosamente, essa afirmativa só é válida quando a propriedade biológica utilizada é a afinidade. Entretanto, outras propriedades biológicas podem ser, em termos gerais, aproximadas como o resultado das interações ligante-receptor, desde que as limitações dessa pressuposição sejam levadas em consideração.

que se comportam de maneira semelhante em relação à propriedade-alvo podem ser selecionados como “bioisósteros”. As moléculas selecionadas a partir de qualquer dessas estratégias podem ter suas propriedades previstas pelos modelos de QSAR construídos^{78, 100} (Figura 3.7).

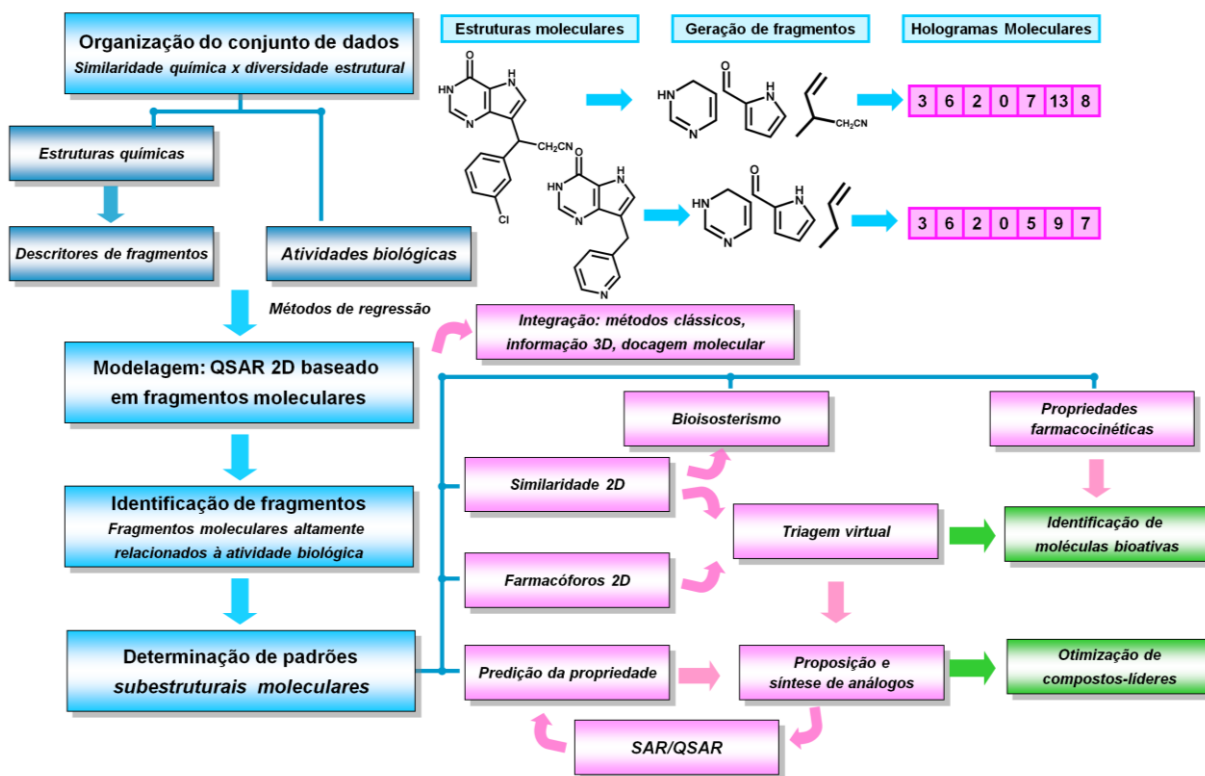


Figura 3.7 – Integração dos modelos de QSAR com outras estratégias de química medicinal¹⁰⁰.

3.2.1.3 Análise comparativa dos campos moleculares

A análise comparativa dos campos moleculares (CoMFA, do inglês, *comparative molecular field analysis*) é um método de QSAR 3D bastante utilizado no processo de otimização estrutural de compostos-líderes. A técnica baseia-se na premissa de que a atividade biológica está diretamente relacionada com as interações ligante-receptor, ou seja, as moléculas bioativas geralmente produzem seus efeitos através de interações não-covalentes estéricas e eletrostáticas com o alvo macromolecular. Como essas interações apresentam caráter 3D, este método considera as moléculas em três dimensões, utilizando os campos moleculares de interação (MIFs, do inglês, *molecular interaction fields*) como descritores^{77, 131, 132, 135, 136, 157, 158}. Os campos moleculares são obtidos pelo cálculo das energias de interação entre as moléculas e sondas virtuais, que consistem de um determinado átomo apresentando uma carga de prova. As diferenças na propriedade alvo

(variável dependente) são desta forma, descritas em função das diferenças nestes campos moleculares de interação^{157, 158}.

Diferentemente do método de HQSAR, as conformações e as cargas parciais atômicas das moléculas em estudo alteram de forma significativa o cálculo dos descritores 3D, que são os campos moleculares estéricos e eletrostáticos. Dessa forma, é necessário que sejam geradas conformações de baixa energia e que as cargas atômicas parciais sejam apropriadamente calculadas para as moléculas utilizadas na modelagem. Além disso, o método requer que as conformações do conjunto de dados apresentem a mesma orientação no espaço cartesiano e, por isso, que sejam submetidas a um processo de alinhamento estrutural 3D^{77, 157, 158}. Essa superposição pode ser obtida a partir do alinhamento de corpo rígido de uma estrutura comum presente nas conformações de baixa energia das moléculas de conjunto de dados, utilizando os métodos de docagem (constituindo, portanto, em uma estratégia de SBDD) ou ainda pode ser baseada nos requerimentos farmacofóricos previamente identificados^{77, 131, 132, 135, 136, 150}. Uma grade tridimensional reticulada suficientemente ampla é, então, posicionada ao redor das moléculas adequadamente superpostas e uma distância de intersecção entre os retículos da grade é definida. Em cada um desses pontos de intersecção são calculadas as energias de interação estéricas e eletrostáticas entre a sonda virtual e os átomos suficientemente próximos desse ponto. A sonda virtual pode ser definida, por exemplo, como um átomo de carbono com hibridação sp^3 (interações estéricas) positivamente carregado (interações eletrostáticas). Esse processo é realizado até que todos os pontos de intersecção sejam percorridos e mapeados pela sonda. As energias de interação calculadas em cada ponto correspondem a uma tabela contendo centenas de colunas de descritores (variáveis independentes), que podem ser correlacionados com o valor da propriedade alvo (variável dependente) utilizando métodos de regressão multivariada. O método de regressão PLS é apropriado para esse propósito. Técnicas de validação cruzada são utilizadas para investigar a robustez interna do modelo obtido. O modelo estatístico gerado, dessa forma, correlaciona a propriedade alvo com os descritores e permite que novas moléculas ainda não testadas possam ter o valor da propriedade em estudo predito (Figura 3.8)^{157, 158}.

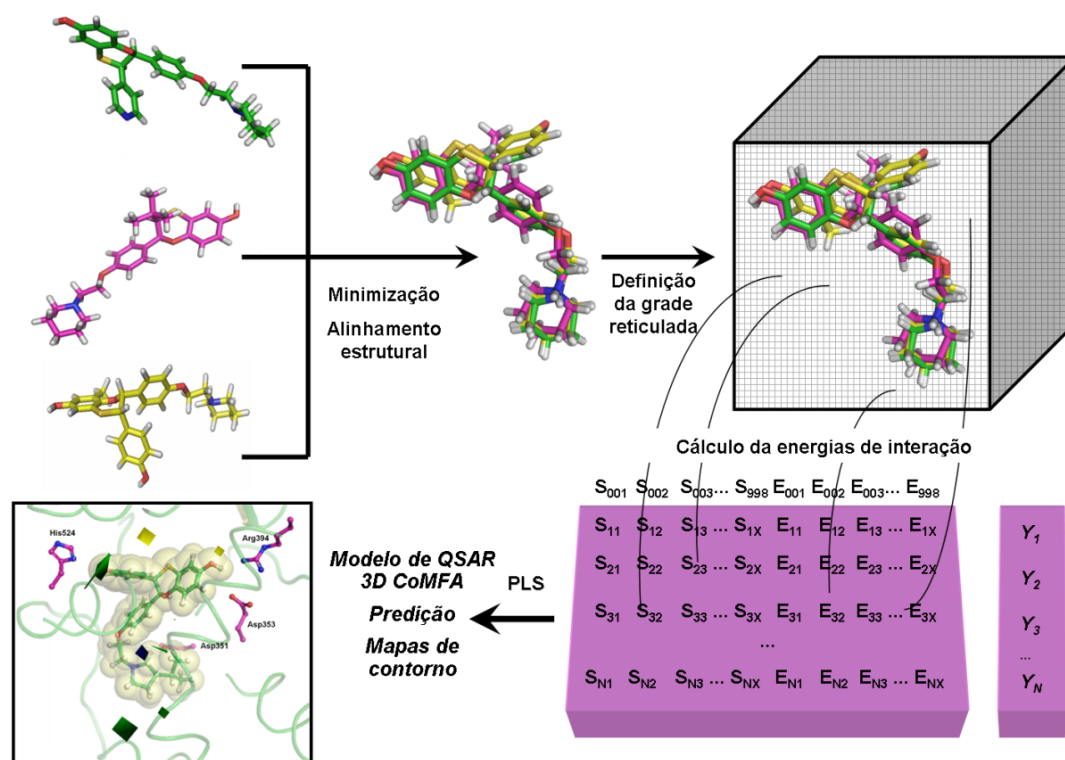


Figura 3.8 - Etapas envolvidas na geração de um modelo de CoMFA¹⁵⁷. Moduladores do receptor de estrógeno são mostrados como exemplo¹³⁵. Os mapas de contorno resultantes da modelagem de QSAR 3D, no interior da cavidade de interação do receptor nuclear, são mostrados como exemplo.

Assim como no método HQSAR, o método CoMFA permite a avaliação visual das modificações estruturais relacionadas às variações do valor da propriedade biológica em estudo. No método CoMFA, visualizam-se poliedros especiais denominados mapas de contorno. Esses poliedros evidenciam regiões estéricas e eletrostáticas, ao redor das moléculas, que são posições de substituição com contribuições favoráveis ou desfavoráveis para a propriedade biológica em questão (Figura 3.8)^{77, 95, 131, 132, 135, 136, 150, 151, 157, 158}. Os estudos de QSAR 3D CoMFA também podem ser integrados a estudos envolvendo a cavidade de interação do receptor-alvo, como ilustrado na Figura 3.8.

3.2.1.4 Análise comparativa dos índices de similaridade

No método CoMFA pressupõe-se que as diferenças na afinidade das moléculas são explicadas pelas suas diferentes habilidades em estabelecer interações intermoleculares, estéricas e eletrostáticas, com o receptor-alvo^{77, 157}. Mudanças graduais nas propriedades de interações são mapeadas através da avaliação dos potenciais de energia nas imediações dos vértices de intersecção da grade reticulada, nas moléculas mutuamente alinhadas¹⁵⁷. Esses potenciais avaliam essencialmente o componente entálpico das afinidades de ligação,

já que as contribuições entrópicas, relacionadas à dessolvatação das moléculas em estudo, ou à sua flexibilidade, não são facilmente descritas. De maneira a incluir contribuições entrópicas, o método CoMSIA (do inglês, *comparative molecular similarity indices analysis*) foi desenvolvido, com a implementação dos campos hidrofóbicos¹⁵⁹. Além disso, por causa da importância das ligações de hidrogênio para o processo de reconhecimento molecular e afinidade de uma molécula pelo seu receptor-alvo, campos moleculares que avaliam esse componente também foram desenvolvidos e implementados no método CoMSIA¹⁶⁰.

Os campos moleculares calculados no método CoMFA são altamente dependentes do alinhamento estrutural do conjunto de dados, uma vez que os valores de energia de interação estérica e eletrostática apresentam uma considerável variação em regiões próximas à superfície de van der Waals. Como consequência, pequenas variações nas conformações e no alinhamento molecular dos ligantes, avaliadas como visualmente insignificantes, podem resultar em grandes variações nos descritores, implicando na atribuição de maior importância para os campos moleculares nessa região e na obtenção de mapas de contorno mais fragmentados e dificilmente interpretáveis. No método CoMSIA, uma função do tipo gaussiana dependente da distância, mais suave que o potencial de Lennard-Jones ou Coulomb, é utilizada para avaliar os componentes estéricos, eletrostáticos, hidrofóbicos e de ligação de hidrogênio^{159, 160}. Uma vez que não é necessária a utilização de valores arbitrários para limites de energia de interação em regiões muito próximas aos ligantes alinhados, e nem o escalonamento dos diferentes campos estudados simultaneamente, o método CoMSIA pode ser entendido como uma avaliação indireta da similaridade de duas moléculas, a partir de suas interações como uma sonda comum. Os modelos de QSAR 3D CoMSIA para inibidores da polimerização da tubulina, apresentados nessa tese de doutorado, foram desenvolvidos pelo Prof. Dr. Rafael Guido. A partir dessa colaboração, mapas de contorno 3D de QSAR CoMFA e CoMSIA foram comparados.

3.2.2 Identificação de requerimentos farmacofóricos

Uma hipótese farmacofórica 3D baseada na estrutura dos ligantes deve incorporar as características essenciais comuns a uma série de moléculas de conhecida afinidade pelo receptor, juntamente com a distribuição 3D dessas características nas respectivas conformações de ligação. O modelo resultante pode ser utilizado para a identificação de compostos que apresentem esses requerimentos ou para entender as relações entre a estrutura e a atividade dentro de uma série congênica de moléculas bioativas^{77, 99, 161}. O programa GALAHAD pode ser utilizado para a construção de hipóteses farmacofóricas, através da identificação do número máximo de possíveis grupos farmacofóricos comuns

para conformações de baixa energia dos moduladores em análise^{127, 131, 132, 161, 162}. Alternativamente, o programa UNITY pode ser utilizado para selecionar as características de interesse, refinar os modelos e integrar informações baseadas na estrutura do receptor, como mostrado na Figura 3.9. O programa UNITY pode também ser utilizado também para a pesquisa por ligantes virtuais contendo as características farmacofóricas selecionadas. Um número mínimo de características, dentre as selecionadas, pode ser utilizado para diminuir as restrições, de acordo com o modelo estudado. Além disso, os modelos farmacofóricos construídos utilizando o programa UNITY podem ser utilizados para o alinhamento estrutural de conjuntos de moduladores para os estudos de CoMFA^{131, 132, 163}.

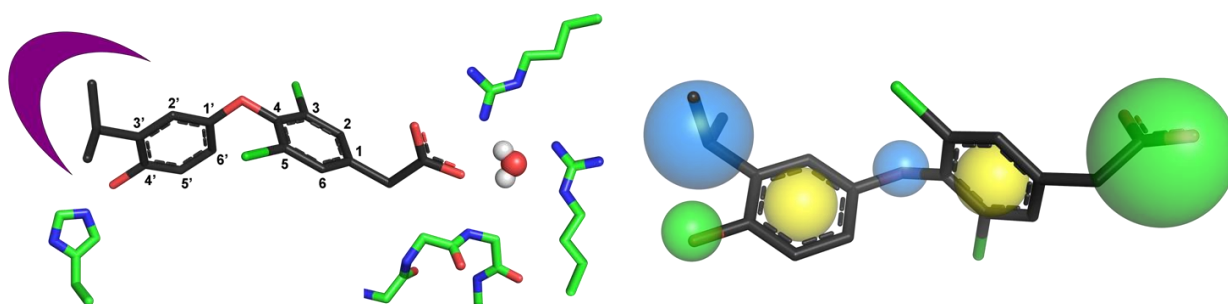


Figura 3.9 - Esquema da cavidade de interação do receptor de hormônios tireoidianos e do modelo farmacofórico baseado nas estruturas de um conjunto de moduladores desse receptor, construído utilizando os programas Galahad e UNITY^{127, 162, 163}. O modelo contém 2 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (verde), 2 grupos aromáticos (amarelo) e 2 superfícies estéricas (azul)¹³¹.

3.2.3 Simplificação molecular

A simplificação molecular de um composto-líder é outra estratégia de LBDD. No processo de simplificação molecular, a identificação e preservação das subunidades farmacofóricas é essencial para o planejamento dos novos padrões estruturais⁹³. Na Figura 3.10 é ilustrada a proposição de análogos simplificados do discodermolídeo, potente estabilizador dos microtúbulos com 13 centros estereogênicos¹⁶⁴⁻¹⁶⁷. A síntese de análogos simplificados é importante também para o estabelecimento de relações estrutura-atividade. As avaliações biológicas de fragmentos e intermediários da síntese da dictioestatina selecionados foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Carlos Dias, que coordena o Laboratório de Química Orgânica Sintética – IQ/UNICAMP. Os trabalhos de identificação de produtos naturais da classe dos clerodanos diterpenos, como possíveis análogos simplificados dos promotores da polimerização da tubulina (Figuras 1.6 e 1.7), foram executados juntamente com o doutorando Ricardo Nascimento e a doutoranda Marília

Valli, orientada pela Profa. Dra. Vanderlan Bolzani, do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE), do Instituto de Química da UNESP.

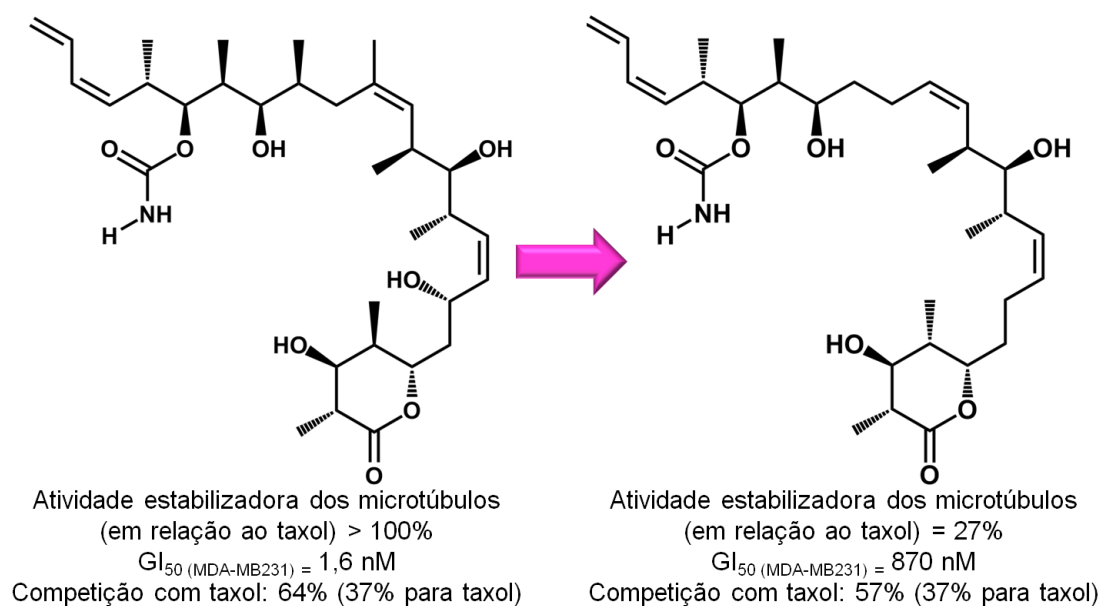


Figura 3.10 – Ligante do sítio do taxol obtido por simplificação molecular do discodermólideo¹⁶⁷.

3.3 PLANEJAMENTO DE INIBIDORES DA INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

Os sítios de interação proteína-proteína constituem um dos alvos mais importantes para o planejamento de compostos bioativos, embora planejar moduladores desses sistemas seja ainda muito complexo, pois, diferentemente dos receptores acoplados a proteínas G e das enzimas, as interfaces dos sítios de interação proteína-proteína são comumente extensas e mal delimitadas. Alguns estudos têm, entretanto, demonstrado que o tamanho da interface não é crucial, que algumas regiões preferenciais de interação podem ser identificadas na cavidade e que a energética da formação de complexos não necessariamente desqualifica moléculas de baixa massa molar. O planejamento e a identificação de um crescente número de inibidores de interações proteína-proteína reforçam que é possível trabalhar com esses sistemas complexos. Adequações às regras de Lipinski ao sistema estudado e a construção de coleções dirigidas de compostos são importantes estratégias para aumentar a eficiência do processo de planejamento, uma vez que inibidores da interação proteína-proteína em geral possuem massa molar significativamente maior, são mais hidrofóbicos e contêm maior número de grupos aceptores de ligações de hidrogênio, maior número de ligações aromáticas e maior superfície de área polar quando comparados com outros fármacos¹⁶⁸.

Capítulo 4

Métodos Bioquímicos

*"Mestre não é quem sempre ensina, mas quem de repente aprende."
Guimarães Rosa (Grande Sertão : Veredas)*

4.1 ENSAIO DE POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA

4.1.1 O ensaio baseado em fluorescência

Os efeitos de compostos diversos sobre o processo de polimerização da tubulina, na presença de GTP, podem ser monitorados através de mudanças na intensidade de fluorescência do sistema devido à incorporação de um marcador de fluorescência nos protofilamentos, os quais se formam quando a polimerização ocorre. O fluoróforo utilizado é o 4',6,diamino-2-fenilindol (DAPI, do inglês, *4',6-diamidino-2-phenylindole*, Figura 4.1) que interage em uma cavidade hidrofóbica formada pelos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina quando polimerizados, distinta das cavidades de interação do taxol, vincristina e colchicina, provocando aumento da intensidade de fluorescência – embora não interferindo significativamente – na ocorrência de polimerização¹⁶⁹⁻¹⁷². Promotores ou inibidores da polimerização podem ser avaliados utilizando variações pequenas nas condições do ensaio para realçar as características dos ligantes pesquisados (Figura 4.2). Pequenos volumes, mas concentrações relativamente altas (18 μ M, 2 mg/mL) de tubulina (Cytoskeleton, tubulina purificada de cérebro bovino ou porcino, liofilizada), são necessários para o ensaio.

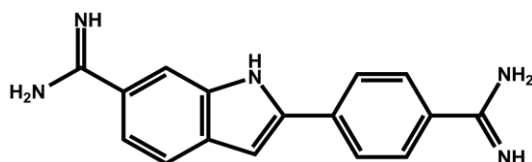


Figura 4.1 – 4',6,diamino-2-fenilindol, fluoróforo utilizado nos ensaios de polimerização da tubulina.

Esse ensaio é uma variação do ensaio clássico de polimerização da tubulina, baseado no espalhamento de luz devido à formação dos polímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. Uma comparação do ensaio clássico com o ensaio baseado em fluorescência demonstrou que as quantidades de tubulina purificada utilizada por ensaio e os volumes de reação são menores para o segundo ensaio (aproximadamente a metade), embora os valores de potência para os padrões de inibição e promoção da polimerização (vimblastina ou colchicina e taxol, respectivamente) sejam similares. Por essa razão, o ensaio baseado em fluorescência foi selecionado^{169, 171, 172}.

A tubulina purificada liofilizada é previamente reconstituída para uma solução estoque de 10 mg/mL de proteína em tampão PIPES (do inglês, *piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid)* 80 nM, pH 6,9, cloreto de magnésio 2 mM ($MgCl_2$) como cofator, EGTA (do inglês, *ethylene glycol-bis[β -aminoethylether]-N,N,N',N'-tetraacetic acid*) 0,5 mM e GTP 10 mM, e acondicionada em criotubos, onde é então congelada em

nitrogênio líquido para depois ser armazenada em freezer a -80°C . Para o ensaio, a solução estoque de tubulina é diluída 5 vezes (para 2 mg/mL) no mesmo tampão (PIPES pH 6,9, cloreto de magnésio e EGTA). Quantidades diferentes de glicerol podem ser adicionadas para aumentar a viscosidade do sistema e, em consequência, a polimerização.

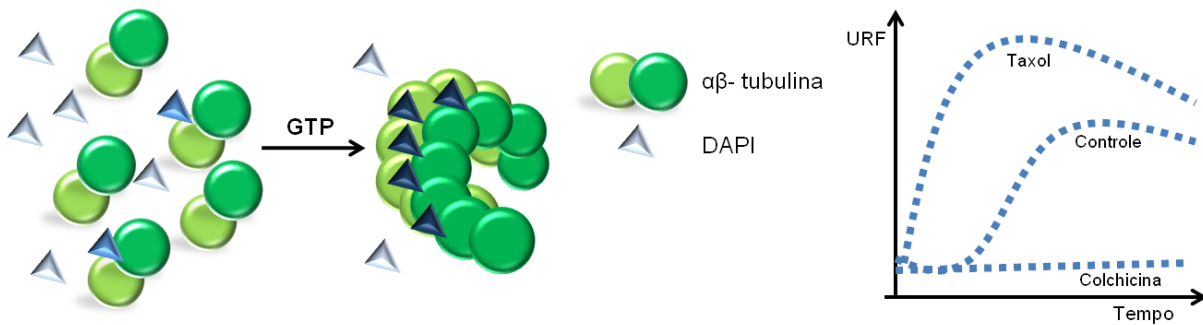


Figura 4.2 - Ensaio de polimerização da tubulina baseado em fluorescência. O fluoróforo DAPI emite na região do azul quando em solução. O máximo de emissão é em torno de 470 nm. Quando interage com os dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, a intensidade da emissão é aumentada e ligeiramente deslocada para menores valores de comprimento de onda (cerca de 445 nm), de maior energia (deslocamento hiperacrômico e hipsocrômico). Para os experimentos, a leitura é feita aproximadamente em 460 nm. Na presença de polímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, a intensidade da emissão (medida em unidades relativas de fluorescência, URF) é máxima. DAPI possui, ainda, maior afinidade pelo polímero do que pelo dímero de $\alpha\beta$ -tubulina^{171, 172}. Na presença de estabilizadores de microtúbulos, como o Taxol em altas concentrações, a intensidade de emissão será maior que na ausência de ligantes. Quando inibidores da polimerização, como a colchicina em altas concentrações, são adicionados, não há aumento no sinal de emissão da fluorescência. A reação é acompanhada por um período de 60 min.

Os testes são realizados em placas de microtitulação de 96 poços e observados utilizando leitor de placa. As curvas de polimerização são acompanhadas pelo aumento da emissão de fluorescência a 410-460 nm por um período de 60 min a 37°C , utilizando um comprimento de excitação de 340-360 nm. A temperatura deve ser rigorosamente controlada, uma vez que há um decréscimo de aproximadamente 5% na formação do polímero a cada grau de redução da temperatura (a 4°C os microtúbulos se despolimerizam nas subunidades de $\alpha\beta$ -tubulina)¹⁶⁹⁻¹⁷².

4.1.2.1 Curva de polimerização da tubulina na presença de GTP

Para encontrar as melhores condições e parâmetros para o ensaio, as curvas de polimerização da tubulina, na presença de GTP, foram obtidas em várias condições de agitação da placa de microtitulação (linear, orbital ou orbital duplo em diferentes

velocidades), porcentagens de glicerol como auxiliar da polimerização, número e intervalo entre as medidas.

4.1.2.2 Determinação da potência de promoção da polimerização (EC_{50}) do taxol

O valor de EC_{50} é uma medida quantitativa da potência de um composto e pode ser definida como a concentração do composto necessária para atingir 50% da polimerização máxima obtida nas condições padrão. Para determinar o valor da potência do taxol nas condições padrão (em glicerol 15%), os valores de concentração de 0,25, 1, 4 e 20 μM de taxol em dimetilsulfóxido (DMSO) 0,2% foram primeiramente selecionados, uma vez que os dados da literatura, em condições de reação ligeiramente diferentes, apontavam para o valor de IC_{50} como sendo próximo de 1 μM ¹⁶⁹⁻¹⁷³. A concentração mais alta de taxol (20 μM) foi considerada como 100% de polimerização. A leitura da emissão foi feita após 20 min do início da polimerização, durante a fase de crescimento do polímero. Os comportamentos das curvas de polimerização nessas concentrações foram utilizados para selecionar outras concentrações para a determinação do valor de EC_{50} , que foi calculado através da regressão não-linear dos valores das porcentagens de polimerização para as diferentes concentrações de taxol. As medidas foram feitas em duplicata e os valores dos erros foram calculados a partir de dois experimentos independentes.

4.1.2.3 Determinação da potência de inibição da polimerização (IC_{50}) da colchicina

O valor de IC_{50} é uma medida da potência de um composto em inibir a polimerização da tubulina, e se refere à concentração necessária para reduzir em 50% a polimerização obtida nas condições padrão, na presença de GTP e na ausência de qualquer ligante. Para determinar o valor da potência da colchicina nas condições padrão, os valores de concentração de 2, 20 e 100 μM de colchicina em DMSO 1% foram primeiramente selecionados, uma vez que os dados da literatura apontam para o valor de IC_{50} como sendo próximo de 5 μM , em condições experimentais ligeiramente diferentes^{169, 174-176}. A concentração mais alta (100 μM) foi considerada como 0% de polimerização. A leitura da emissão foi feita após 20 min (1200 s) do início da polimerização, durante a fase de crescimento do polímero. Os comportamentos das curvas de polimerização nessas concentrações foram utilizados para selecionar outras concentrações para a determinação do valor de IC_{50} , que foi calculado através da regressão não-linear dos valores porcentagens de polimerização para diferentes concentrações de colchicina. Todas as medidas foram

feitas em duplicata e os valores dos erros foram calculados a partir de dois experimentos independentes.

4.1.2.4 O efeito do solvente na polimerização da tubulina

O efeito provocado por crescentes concentrações de DMSO nas curvas de polimerização também foi investigado. Sabe-se que a maioria dos ligantes da tubulina é pouco solúvel em água¹⁷⁰. Ao mesmo tempo, as altas concentrações da proteína que são requeridas para o ensaio refletem nos altos valores de IC₅₀ e EC₅₀, mesmo para os ligantes mais potentes (na faixa de μM)^{169-173, 175}. Por isso, o efeito do co-solvente orgânico nas curvas de polimerização e nos valores de potência para esses padrões foi investigado.

4.1.2.5 Determinação do efeito de diferentes compostos sobre a polimerização da tubulina

Os mesmos ensaios empregados para avaliar o efeito de taxol e colchicina foram utilizados para avaliar o efeito de diferentes compostos sobre as curvas de polimerização da tubulina. Os compostos foram inicialmente avaliados em concentração única, geralmente em altas concentrações, em duplicata, e os valores de potência (IC₅₀ ou EC₅₀) foram determinados a partir das variações das concentrações dos compostos que apresentaram atividade.

4.1.2 O ensaio clássico baseado em espalhamento de luz

O ensaio clássico de polimerização da tubulina foi realizado durante o período de doutorado-sanduiche na *University of Pittsburgh, Department of Pharmaceutical Sciences*, sob orientação do Prof. Dr. Billy W. Day e em colaboração com o Dr. Hikmat N. Daghestani. O fundamento do ensaio está ilustrado na Figura 4.3. Para os ensaios, foi empregada tubulina de cérebro bovino estocada em nitrogênio líquido, anteriormente purificada (concentração final 10 μM) por um protocolo padrão incluindo ciclos sucessivos de polimerização e despolimerização dependentes de temperatura. A proteína estoque em solução foi diluída em tampão viscoso MSG (do inglês, *monosodium glutamate*, concentração final 0,8 M) e pré-incubada a 30° C com os compostos a serem testados, dissolvidos em DMSO (concentração final 1% v/v), em placas de microtitulação de 96 poços. As misturas reacionais foram resfriadas a 0° C por 10 min e, em seguida, GTP 0,4 M foi

adicionado. A absorbância a 350 nm foi imediatamente acompanhada em um espectrofotômetro. As linhas de base foram estabelecidas e a temperatura foi rapidamente aumentada para 30° C. A reação de polimerização foi acompanhada por 60 min, período em que a temperatura foi rigorosamente mantida a 30° C. Os valores da turbidez após 20 min do início da polimerização a 30° C para DMSO 1% foram considerados como 100% de polimerização e para colchicina 10 µM como 0% de polimerização. Os compostos foram inicialmente ensaiados em concentração única de 10 e 50 µM. Para os compostos que apresentaram capacidade de inibir a polimerização da tubulina na concentração mais baixa (10 µM), os valores de IC₅₀ foram calculados através de regressão não-linear dos valores percentagens de polimerização para diferentes concentrações dos compostos. Todas as medidas foram feitas em duplicata e os valores dos erros foram calculados a partir de dois experimentos independentes¹⁷⁷⁻¹⁸⁰.

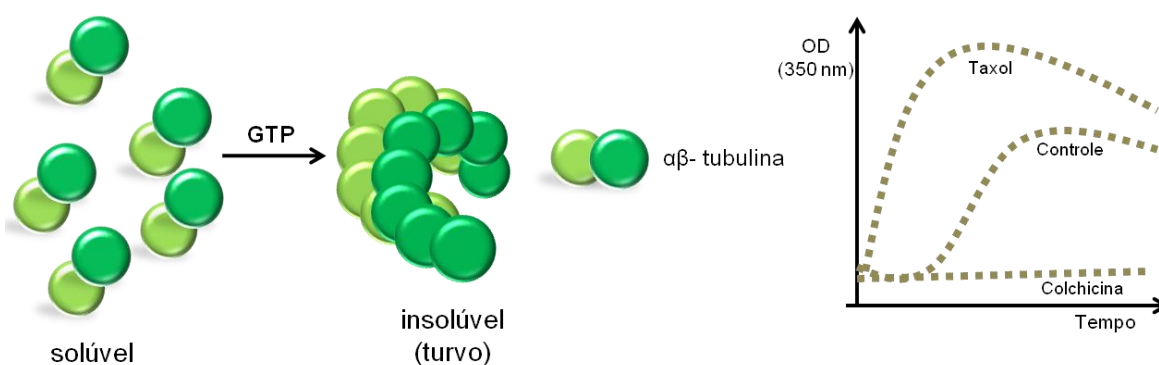


Figura 4.3 - Ensaio de polimerização da tubulina baseado em espalhamento de luz. Na presença de GTP, os dímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, inicialmente em solução, formam polímeros que turvam a mistura reacional em extensão proporcional à formação dos polímeros. Na presença de estabilizadores de microtúbulos, como o Taxol em altas concentrações, o espalhamento de luz será maior que na ausência de ligantes. Quando inibidores da polimerização, como a colchicina em altas concentrações, são adicionados, não há aumento no sinal de absorbância a 350 nm, pois os heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina são solúveis. A reação é acompanhada por um período de 60 min^{177, 178, 180}.

4.2 ENSAIOS CELULARES

4.2.1 Ensaios celulares de alto conteúdo

Os avanços em genômica e proteômica ao longo dos últimos anos representaram um impacto significativo no processo de investigação da estrutura, função e modulação das macromoléculas. A dependência da atividade dessas macromoléculas, e das interações entre elas e pequenos moduladores, de seu ambiente natural físico e químico, entretanto, é uma questão igualmente relevante a ser considerada nos estudos de química medicinal.

Com a finalidade de incluir essas variáveis e de ampliar os estudos das interações dos ligantes com seus receptores-alvo, têm sido desenvolvidos métodos para estudar os efeitos provocados por diferentes compostos em células vivas, nas quais as macromoléculas se apresentam em condições ótimas para a execução de suas funções biológicas. Esses estudos, que consideram a localização intracelular, o transporte e o controle espacial e temporal da atividade das macromoléculas, têm revelado significativas informações funcionais sobre as interações ligante-receptor no ambiente celular. As técnicas de microscopia de fluorescência acopladas às imagens eletrônicas são particularmente importantes para esses estudos, uma vez que são compatíveis com as células vivas e permitem que medidas específicas sejam feitas com apreciável sensibilidade^{101, 177, 178, 181, 182}.

Nos ensaios de alto conteúdo, as proteínas ou complexos de proteínas de interesse presentes nas células são detectadas através do uso de marcadores de fluorescência, que podem ser proteínas fluorescentes (como a GFP, do inglês, *green fluorescent protein*) ou coquetéis de anticorpos marcados com agentes fluorescentes (como isotiocianato de fluoresceína). O núcleo pode ser visualizado através de compostos intercalantes do DNA que fluorescem, como o próprio DAPI ou o corante HOECHST 33342, da classe dos bis-benzimidazóis. A partir da combinação de vários marcadores compatíveis, múltiplos processos bioquímicos e parâmetros morfológicos podem ser simultaneamente avaliados nos sistemas celulares. O termo “alto conteúdo” se refere aos processos que são espacialmente e temporalmente definidos no contexto da integridade funcional e estrutural de cada célula individual em um conjunto de células estudadas. Uma das grandes vantagens dos ensaios celulares de alto conteúdo é que, além de poder ser integrado com estudos realizados com ligantes e proteínas purificadas, esses ensaios celulares também podem ser utilizados como ferramentas para a identificação dos alvos moleculares e, portanto, do mecanismo de ação^{182, 183}.

Uma grande revolução na utilização dos métodos em biologia celular para estudar funções de constituintes celulares foi alcançada com o desenvolvimento dos ensaios celulares automatizados de alto conteúdo integrados com microscopia de fluorescência quantitativa. Os ensaios celulares automatizados de alto conteúdo (HCS, do inglês, *high content screening*) são, portanto, definidos como a automatização dos ensaios de investigação biológica de alto conteúdo de coleções de células. Como ilustrado na Figura 4.4, os ensaios de HCS abrangem uma série de operações importantes que incluem planejamento experimental, preparação das amostras, aquisição de imagens, arquivamento de dados, processamento e análises dos resultados e construção de conhecimento a partir dos processos celulares. Tipicamente, os ensaios automatizados permitem a análise de mais de 10⁶ células por experimento^{101, 182}.

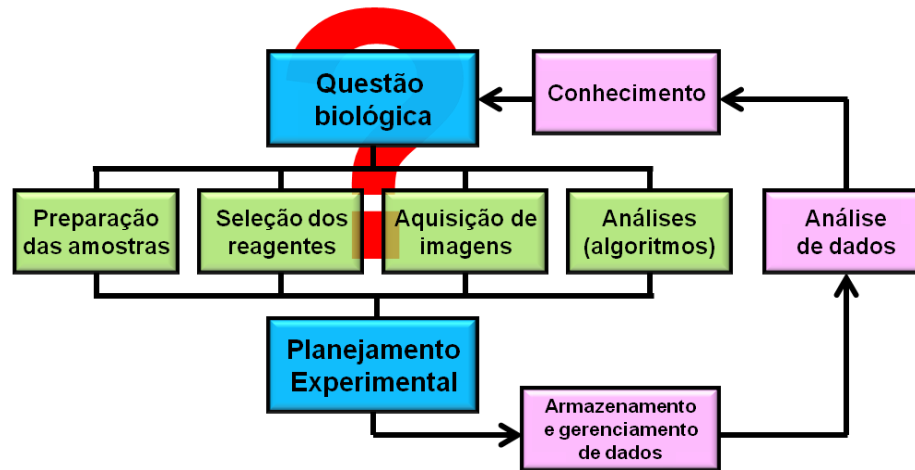


Figura 4.4 - Fluxograma esquemático de um experimento de HCS, desde a questão biológica até a geração de conhecimento sobre o funcionamento celular. O ciclo é iterativo: variações de diversos parâmetros como linhagem celular, concentrações dos ligantes, tempos de tratamento, parâmetros a serem considerados e número/frequência de pontos a serem analisados devem ser apreciados. Durante a análise de dados, diferentes tipos de informação celular a partir do mesmo conjunto de imagens podem ser considerados¹⁸².

4.2.1.1 Análises de alto conteúdo para interrupção da mitose

Uma característica peculiar dos compostos que interagem com tubulina é o bloqueio do ciclo celular nas fases da mitose, provocando posterior apoptose. Dessa maneira, estudar efeitos celulares relacionados à interrupção da mitose, à morfologia nuclear e aos microtúbulos celulares, provocados por compostos que apresentam atividade de estabilização dos microtúbulos, ou de inibição da polimerização da tubulina, é parte relevante da caracterização do mecanismo de ação dos compostos estudados^{21, 177, 178, 181}.

Os ensaios de alto conteúdo para avaliação dos efeitos de diferentes compostos sobre a mitose, das alterações nucleares e das modificações nos microtúbulos de células de carcinoma cervical humano (HeLa) foram realizados durante o período de doutorado-sanduíche na *The University of Pittsburgh Drug Discovery Institute* (UPDDI), sob orientação do diretor associado Dr. Andreas Vogt e supervisão da técnica Laura Vollmer. Os protocolos para as análises automatizadas eram muito bem estabelecidos e amplamente validados e apenas pequenos ajustes foram necessários (Figura 4.5).

Para os experimentos, as células HeLa foram cultivadas em monocamadas na forma aderida em frascos apropriados para cultura celular, em meio de cultura DMEM fresco (do inglês, *dulbecco's modified eagle medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino, gentamicina e anfotericina B, em estufa a 37° C e 5% de CO₂. Para os subcultivos frequentes, em condições de assepsia em capela de fluxo laminar e materiais estéreis, as células aderidas foram descoladas utilizando solução de tripsina 0,025% em tampão PBS

(do inglês, *phosphate buffered saline*) para formar uma suspensão contendo o número adequado de células para o inóculo em meio de cultura fresco (normalmente 3 milhões de células eram inoculadas).

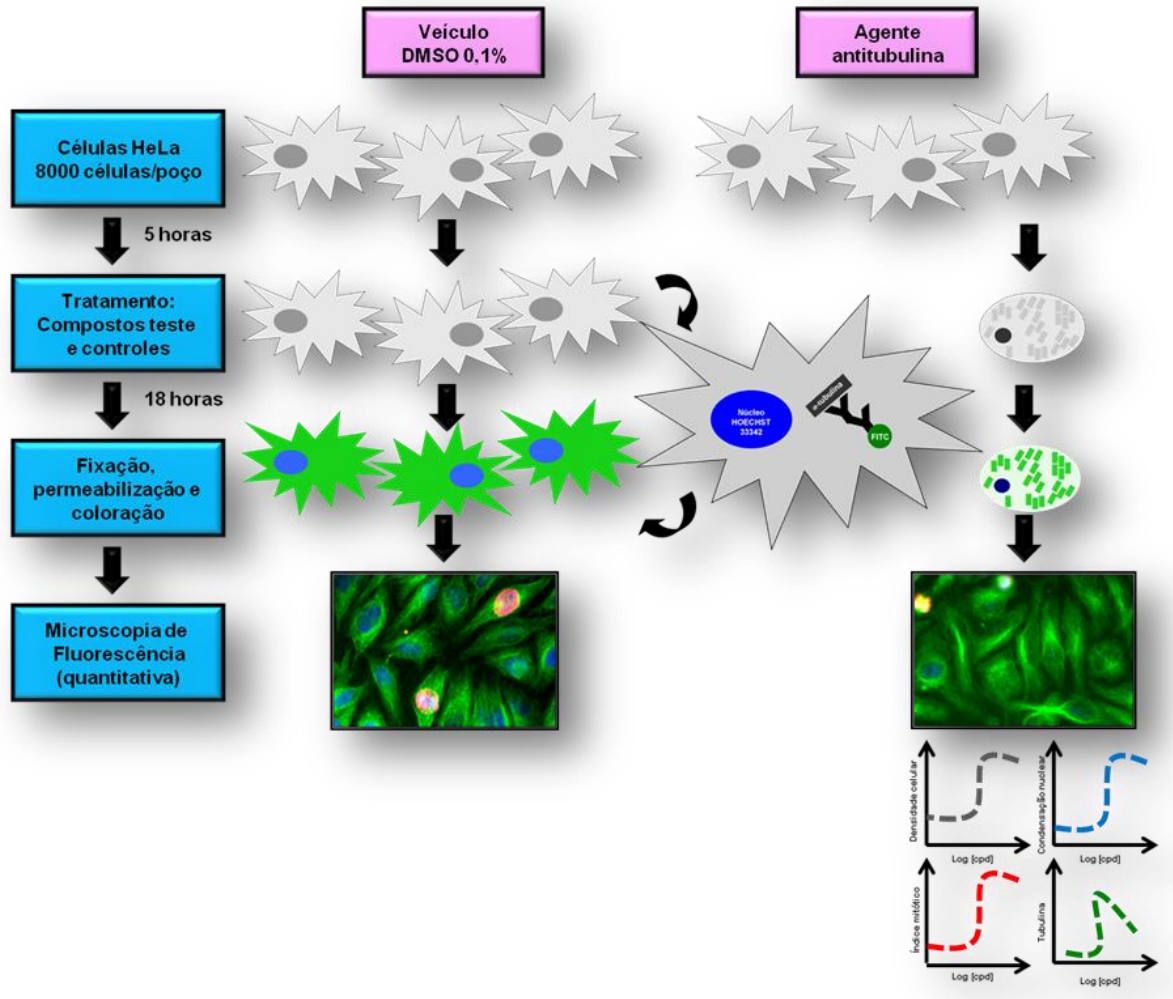


Figura 4.5 - Esquema das etapas de um experimento de HCS para verificar se os compostos apresentam atividade antimitótica. Coquetéis de anticorpos são utilizados para possibilitar a visualização das alterações fenotípicas das células estudadas por microscopia de fluorescência.

Os estoques de células HeLa assim mantidos foram utilizados para o preparo da suspensão de células que era inoculada em microplacas de 384 poços revestidos de colágeno, de maneira a fornecer uma quantidade de 8.000 células por poço. Após 5 h do inóculo nas placas de 384 poços, as células já aderidas foram tratadas com o veículo (DMSO 0,1% de concentração final) ou dez gradientes de concentração dos compostos a serem ensaiados, iniciando por concentrações tão altas quanto 50 μ M. As células tratadas foram então incubadas por 18 h em estufa a 37 $^{\circ}$ C e 5% de CO $_2$ para o estudo da toxicidade aguda dos compostos ensaiados sobre as células que permaneciam nos poços após a

fixação com formaldeído. Após 18 h, enquanto as células restantes foram fixadas por 30 min, foram também marcadas com o corante do núcleo Hoechst 33342, 10 µg/mL em tampão HBSS (do inglês, *hank's balanced salt solution*), para estudos dos efeitos de condensação e fragmentação nuclear e apoptose. As placas foram então lavadas com tampão HBSS para a retirada das células não aderidas e do excesso de corante (Figura 4.5).

Para o tratamento com os coquetéis de anticorpos para os estudos dos efeitos nos microtúbulos celulares e índice mitótico, as células foram permeabilizadas com o surfactante Triton-X-100 0,5% (p/p) por 5 min em temperatura ambiente. O excesso de surfactante foi também lavado com tampão HBSS. Em seguida, as células permeabilizadas foram incubadas por 1 h com o coquetel primário de anticorpos contendo uma solução de anticorpos policlonais de coelho anti-fosfo-histona H3 (1:500, PH3) e de anticorpos monoclonais de camundongo anti- α -tubulina, em tampão HBSS (1:1000). Após as lavagens, foi adicionado o coquetel secundário, contendo uma mistura de anticorpos IgG anti-camundongo de macaco (1:500) rotulados com isotiocianato de fluoresceína (FITC, do inglês, *fluorescein isothiocyanate*) e IgG anti-coelho de macaco (1:500) marcado com indocarbocianina, Cy3 (do inglês, *indocarbocyanine with three methine spacer*), por mais 1 h. As células foram então novamente enxaguadas com tampão HBSS. As microplacas resultantes desses experimentos, devidamente seladas e rotuladas, foram armazenadas a 4° C até a análise em microscópio de fluorescência ArrayScan II (Cellomics).

Para as análises, em cada poço, 1.000 células individuais foram fotografadas em três diferentes comprimentos de onda de excitação/emissão: 350/461 nm (Hoechst), 494/519 nm (FITC), and 556/573 nm (Cy3). Os seguintes parâmetros foram previamente selecionados e utilizados para as análises de dados: núcleos por campo, intensidade nuclear média, intensidade média de FITC e intensidade média de Cy3. Densidade de microtúbulos e fosforilação de histona H3 (índice mitótico) foram medidas pelos canais de FITC e Cy3, respectivamente. Para determinação do índice mitótico e condensação nuclear, os limites de intensidade para Hoechst e fosfo-histona H3 foram definidos como suas médias mais um desvio padrão nos poços tratados com DMSO 1%. As células foram classificadas como positivas se suas médias excediam os limites assim definidos. Para as ilustrações dos efeitos dos compostos ensaiados sobre os microtúbulos celulares e interrupção da mitose, as mesmas placas de 384 poços foram utilizadas para a aquisição de imagens de alta resolução dos poços selecionados, com o mesmo tratamento gráfico para brilho e contraste (Figura 4.5)^{21, 177, 178, 181}.

4.2.1 Efeitos na migração celular

Além dos efeitos na divisão celular, compostos que interagem com o sistema tubulina/microtúbulos frequentemente interferem com migração celular. Vários estudos têm demonstrado que o taxol e os alcalóides da vinca possuem atividade inibitória da migração celular, até mesmo em concentrações mais baixas que as necessárias para provocar citotoxicidade, sendo que esse efeito não foi ainda estudado para colchicina¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Para compostos representativos que apresentaram atividade antimetabólica nos ensaios celulares de alto conteúdo, os efeitos inibitórios sobre a migração celular de células de câncer de mama invasivas, da linhagem MDA-MB231, também foram estudados, e comparados com a colchicina. Os ensaios de *wound healing* e as avaliações da migração celular em câmara de Boyden foram desenvolvidos e executados pela doutoranda Wanessa Altei.

*Capítulo 5**Planejamento de Estabilizadores
da Polimerização de Microtúbulos*

*"Vivendo, se aprende; mas o que se aprende, mais, é só a fazer outras maiores perguntas."
Guimarães Rosa (Grande Sertão : Veredas)*

Os taxanos são os compostos antitubulina mais conhecidos da classe dos agentes estabilizadores de microtúbulos. Taxol e taxotere, os mais importantes representantes dos taxanos (Figura 1.3), têm sido utilizados como fármacos de primeira linha para o tratamento de diversos tipos de câncer desde a década de 90. Apesar do sucesso clínico dos fármacos dessa classe, limitações importantes como alta complexidade química, resistência devido a vários fatores celulares e baixa solubilidade, que resultam em formulações complexas e alta toxicidade, têm estimulado a pesquisa por novas classes de agentes estabilizadores de microtúbulos^{22, 29, 32-34, 37, 43-45}. Recentemente, foram identificados vários agentes estabilizadores de microtúbulos, estruturalmente diferentes dos taxanos, incluindo as epotilonas, a dictiostatina e o discodermolídeo (Figura 1.6). Esses produtos naturais, assim como o taxol, possuem atividade antimetabólica, mas diferentemente, induzem apoptose em linhagens celulares resistentes aos taxanos. Epotilonas e análogos do discodermolídeo e da dictiostatina são, ainda, mais solúveis que o taxol. Além disso, esses compostos inibem competitivamente a ligação do taxol à sua cavidade de interação, sugerindo que os seus sítios de interação são comuns ou sobrepostos^{28, 32-34, 41, 46-48, 187-191}.

O taxol promove a estabilização das interações laterais entre protofilamentos. Esse produto natural interage na cavidade de ligação das proteínas Tau, que são moduladoras endógenas da dinâmica dos microtúbulos^{9, 38-40}. A análise da informação estrutural disponível no banco de dados do PDB sobre a interação entre taxol ou epotilona A (Figura 1.6) com a β -tubulina (códigos PDB 1JFF e 1TVK, respectivamente), a partir de uma combinação de dados de cristalografia eletrônica dos polímeros de tubulina estabilizados por zinco, de ressonância magnética nuclear (RMN) e de modelagem molecular, demonstra que esses agentes estabilizadores interagem em uma região não muito bem delimitada, com uma superfície extensa (Figura 5.1). Esses compostos compartilham a mesma cavidade de interação na β -tubulina, mas sua sobreposição é apenas parcial, já que exploram o mesmo bolsão de interação de uma maneira única e independente (Figura 5.2)^{35, 187}. Essa informação estrutural é bastante útil para o entendimento das interações receptor-ligantes importantes para o processo de reconhecimento molecular¹.

O modo de ligação do discodermolídeo à cavidade de interação da β -tubulina ainda não é conhecido. Vários análogos têm sido sintetizados para o estudo das relações estrutura-atividade e diversos experimentos têm sido executados para construção de hipóteses de interação que racionalizem as propriedades de ligação desses compostos ao sistema tubulina/microtúbulos^{32, 33, 57, 191, 194-198}.

¹ As estruturas dos dímeros de tubulina determinadas por cristalografia eletrônica fornecem informação sobre a localização do taxol e epotilona A na estrutura da proteína. Há, entretanto, ainda controvérsias sobre a conformação exata desses ligantes no polímero de tubulina^{188, 190, 192, 193}.

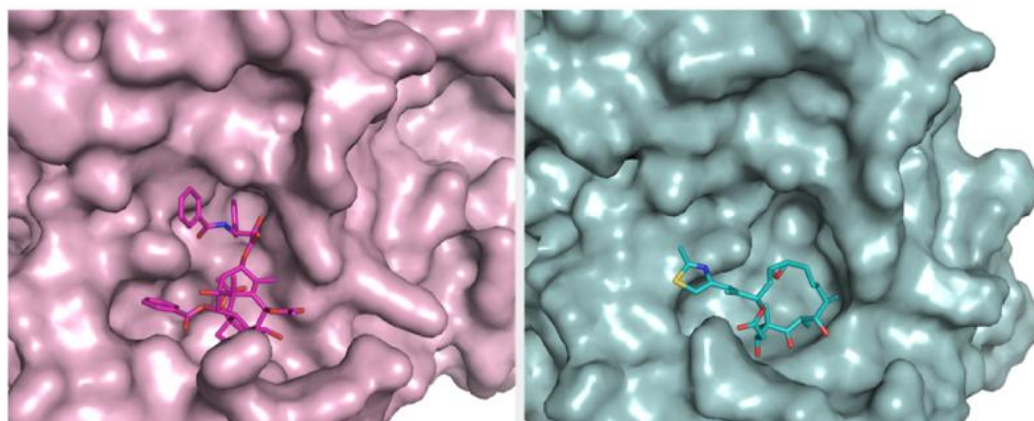


Figura 5.1 - As cavidades de interação do taxol (rosa) e da epotilona (azul) não são bem delimitadas^{35, 187}.

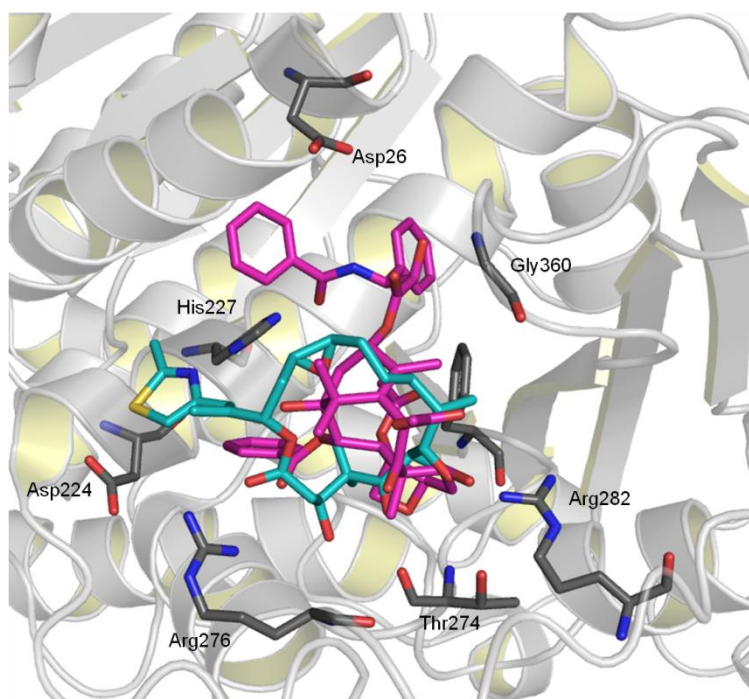


Figura 5.2 - Taxol (rosa) e epotilona (azul) exploram a mesma cavidade de interação da β -tubulina (cinza) de maneiras diferentes. Resíduos importantes são mostrados em bastão na estrutura 1TVK¹⁸⁷.

5.1 BASES ESTRUTURAIS PARA ATIVIDADE ANTICÂNCER DE ANÁLOGOS DO DISCODERMOLÍDEO^{78, 100, 140}

Em razão de sua considerável potência para promover a polimerização da tubulina, apreciável citotoxicidade contra múltiplas linhagens celulares resistentes aos taxanos, e maior solubilidade que taxol, o discodermolídeo foi considerado como candidato em testes clínicos para o tratamento do câncer em 2002^{32, 33, 46, 164, 199}. Inesperadamente, esse

composto não demonstrou um adequado perfil em fase II de testes clínicos em humanos por apresentar toxicidade pulmonar^{54, 199-201}. Entretanto, por causa de suas notáveis propriedades biológicas, compostos semelhantes em estrutura e atividade têm sido estudados. Por isso, a definição do provável sítio de interação do discodermolídeo e seus análogos, assim como seu modo de ligação, são, ainda hoje, objetos de investigação^{33, 164, 194, 202-204}. Entretanto, uma vez que o sistema discodermolídeo-tubulina é extremamente flexível e as estruturas 3D dos complexos de discodermolídeo com tubulina não foram ainda determinadas, uma estratégia razoável para identificação das características estruturais mais importantes relacionadas à afinidade de ligação à β -tubulina e consequente atividade antitumoral é a utilização de métodos independentes da conformação integrados com evidências experimentais produzidas por uma variedade de técnicas^{m32,33,194}.

No presente trabalho, foi empregado o HQSAR, um método independente da conformação, para a construção de modelos preditivos de QSAR 2D para uma série de análogos sintéticos do discodermolídeo apresentando atividade antiproliferativa. Os modelos construídos foram recentemente utilizados para avaliar análogos simplificados do discodermolídeo, que estão sendo sintetizados pelo doutorando Daniel Brody, orientado pelo Prof. Dr. Billy Day, no *Department of Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, University of Pittsburgh*. As moléculas propostas estão sendo sintetizadas a partir de reações multicomponentes e apresentaram um potencial promissor de acordo com os modelos de HQSAR desenvolvidos nesse trabalho. Além disso, estudos de modelagem molecular na cavidade da β -tubulina foram integrados com os padrões de reconhecimento molecular resultantes da modelagem de HQSAR como uma ferramenta para a proposição das características moleculares importantes para as interações ligante-receptor nessa série de agentes antiproliferativos ligantes da tubulina. Os modelos de conformação bioativa, propostos dessa forma, foram então utilizados para o alinhamento estrutural do conjunto de análogos sintéticos do discodermolídeo, permitindo o desenvolvimento de modelos de QSAR 3D, utilizando o método CoMFA. O alinhamento estrutural baseado na superposição das conformações de baixa energia dessas moléculas também foi utilizado para a construção de modelos de QSAR 3D CoMFA com a finalidade de explorar a alta flexibilidade conformacional desses compostos. Os modelos finais de QSAR 2D e 3D construídos, em conjunto com as informações obtidas pelos mapas de contribuição individuais, de contorno 3D, e dos estudos de modelagem molecular na cavidade de interação da β -tubulina, forneceram algumas idéias sobre os determinantes estruturais para a potente estabilização

^m É importante reconhecer as limitações dos modelos propostos nesse trabalho. Os modelos sugeridos para a epitilona A, por exemplo, anteriormente à obtenção da estrutura do complexo com tubulina, não foram confirmados após a resolução do seu complexo cristalográfico. Isso porque a cavidade de ligação é extensa, e pode ser ocupada de maneiras distintas pelos diferentes ligantes¹⁸⁷.

dos microtúbulos e propriedades antitumorais dos análogos do discodermolídeo.^{36, 37} A Figura 5.3 ilustra a estratégia de integração dos métodos de QSAR e de docagem molecular para a proposição de modelos de interação entre discodermolídeo e a cavidade do taxol na β -tubulina, discutida adiante. Esse sistema estudado é de particular interesse devido aos desafios proporcionados por sua elevada complexidade molecular.

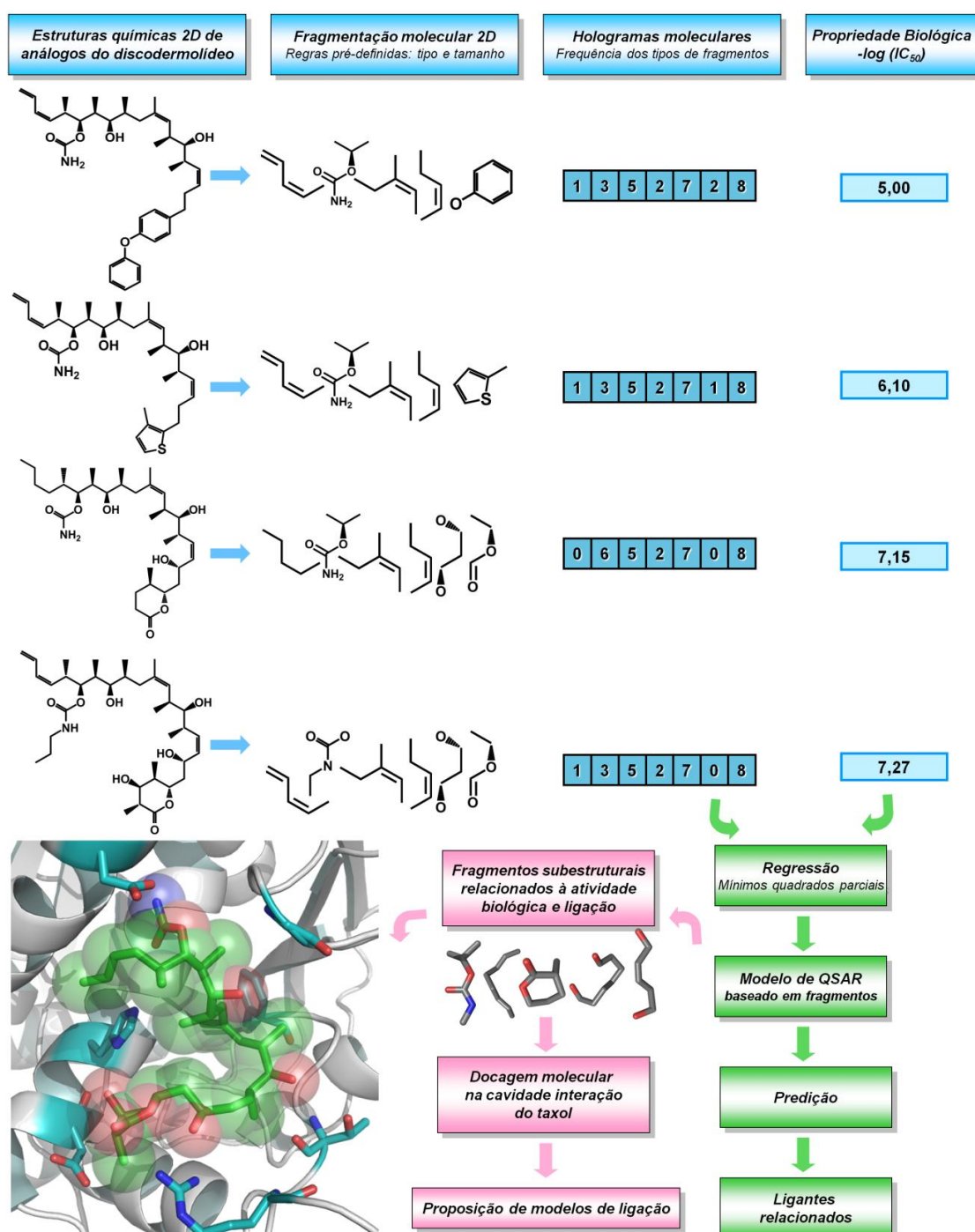


Figura 5.3 - Integração de estratégias para o estudo da modulação da polimerização da tubulina por análogos do discodermolídeo: geração de fragmentos moleculares, construção de modelos de QSAR, identificação de padrões de reconhecimento molecular e estudos de docagem molecular^{77, 100, 140}.

5.1.1 Estratégias computacionais

Todos os estudos de QSAR 2D e 3D e de docagem molecular foram realizados em estações computacionais, operando no sistema operacional Linux, utilizando as interfaces computacionais SYBYL 8.0[®] (Tripos, St. Louis, EUA), GOLD 3.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK)⁴¹ e Pymol 1.0 (DeLano Scientific, San Carlos, USA).

5.1.2 Caracterização do conjunto de dados

O conjunto de dados utilizado para os estudos de HQSAR é constituído por 47 análogos do discodermolídeo, os quais foram coletados a partir de seis publicações de um único grupo de pesquisas^{165, 166, 194, 205-207}. Destes compostos, 42 foram utilizados para os estudos de QSAR 3D CoMFA. Como mostrado na Figura 5.4, esse conjunto de análogos apresenta variações estruturais na região A (cadeia lateral ligada ao C₂₁ e no grupo carbamato do C₁₉), na região B (substituinte em C₁₄) e na região C (no anel lactona e na posição C₇). As estruturas químicas e os valores de pIC₅₀ correspondentes para a série completa de ligantes estão incluídos na Tabela 5.1. O valor de pIC₅₀ corresponde ao logaritmo negativo da medida de IC₅₀, $-\log IC_{50}$, em que IC₅₀ é a concentração do composto requerida para inibir em 50% o crescimento de células de câncer de pulmão da linhagem A549. Os valores de IC₅₀ variam de 3,7 a 10.000 nM (um fator de cerca de 2.700) e foram medidos sob as mesmas condições experimentais, uma condição essencial para o desenvolvimento de modelos de QSAR. Os valores de IC₅₀ foram convertidos nos respectivos valores de pIC₅₀ e utilizados como variáveis dependentes nas investigações de QSAR. Os valores de pIC₅₀ se estendem, portanto, por 3,5 ordens de magnitude.

As estruturas 3D dos análogos do discodermolídeo foram construídas utilizando os parâmetros geométricos padrão do programa SYBYL 8.0. Cada conformação de cada molécula foi energeticamente minimizada empregando o campo de forças Tripos e as cargas parciais foram calculadas segundo o método clássico de Gasteiger–Hückel^{136,208}.

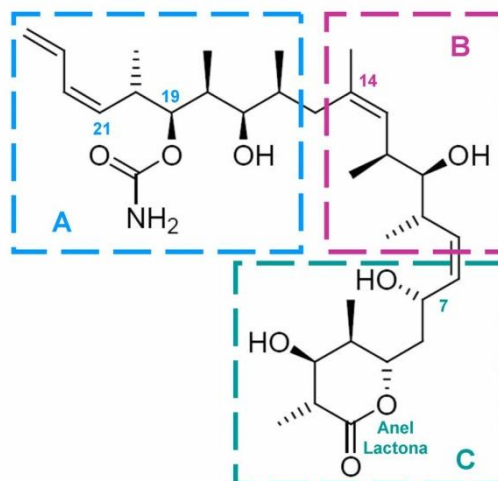


Figura 5.4 - O conjunto de dados de análogos do discodermolídeo apresenta variações estruturais nas regiões A, B e C^{140, 165, 166, 194, 205-207}

Tabela 5.1 - Conjunto de dados de análogos do discodermolídeo (e valores correspondentes de pIC_{50}) empregado para as análises de QSAR 2D e 3D e para os estudos de docagem molecular^{165, 166, 194, 205-207}

	R ₁	R ₂	X	pIC_{50}		R ₁	R ₂	X	pIC_{50}
1 T		H		5,00	2 T		H		5,40
3 t		H		5,40	4 T		H		5,40
5 T				5,70	6 t				5,70
7		H		6,00	8		H		6,04
9 T		H		6,10	10		H		6,19

Continua...

Continuação,,									
11 T		H		6,22	12 T		H		6,24
13 T		H		6,24	14 T		H		6,27
15 t		H		6,29	16		H		6,31
17 T				6,39	18 T				6,40
19 t		H		6,51	20 T				6,61
21 T		H		6,72	22 t		H		6,80
23 T				6,87	24 T				6,90
25 T				6,96	26 t		H		7,00
27 T				7,05	28 T		H		7,15
29 T				7,17	30 t				7,24
31 T				7,27	32 T		H		7,30
33 T		H		7,44	34 T				7,52
35 T				7,57	36 T		H		7,66
37 T		H		7,89	38 t		H		7,89

Continua,,

Continuação,...									
39 T				8,00	40 T				8,03
41 t		H		8,10	42 T		H		8,11
43 T		H		8,22	44 T				8,29
45		H		8,31	46 T		H		8,40
47 T		H		8,43					

5.1.3 Análises de QSAR

Para a modelagem de QSAR, o conjunto de dados foi dividido em cinco subconjuntos representativos, dois contendo 10 compostos e os outros três contendo 9 compostos. O primeiro subconjunto continha os análogos numerados como **1, 6, 11...** (Tabela 5.1), o segundo continha os análogos **2, 7, 12...** e assim sucessivamente. Cinco modelos foram construídos utilizando cada um dos subconjuntos uma vez como conjunto teste (predição) e os outros quatro subconjuntos combinados (com 37 ou 38 compostos) como conjunto treinamento (estimativa)²⁰⁹. Uma vez que os modelos de QSAR podem ser afetados pelos parâmetros relacionados à geração dos hologramas, várias combinações de distinção dos fragmentos foram consideradas para a construção dos modelos – diferentes combinações dos parâmetros de distinção átomo (A), ligação (B), conectividade (C), presença de átomos de hidrogênio (H), quiralidade (Ch) e átomos doadores e aceptores de ligação de hidrogênio foram utilizadas^{148, 152}. As análises foram realizadas utilizando as 12 séries padrão de comprimentos do holograma, de 53 a 401 posições, inicialmente empregando o tamanho do fragmento padrão (4-7). Os padrões de contagem dos fragmentos para os moduladores do conjunto treinamento foram relacionados aos parâmetros biológicos experimentais utilizando análise de PLS. Os resultados das análises de QSAR para os 5 conjuntos treinamento utilizando várias combinações de distinção dos fragmentos estão resumidos na Tabela 5.2. Esses modelos individuais podem ser avaliados pelos seus coeficientes de correlação (r^2) e de validação cruzada (q^2_{LOO}) obtidos pelo

método “deixe um fora” (LOO, do inglês, *leave-one-out*). Como mostrado na Tabela 5.2, os melhores resultados foram obtidos utilizando A/B/C/Ch (Modelos 2-5, $q^2_{\text{LOO}} = 0,60, 0,62, 0,61$ e $0,70$, respectivamente), exceto apenas para o modelo 1 ($q^2_{\text{LOO}} = 0,69$), para o qual a melhor distinção dos fragmentos também incluiu H (A/B/C/H/Ch).

A influência do tamanho dos fragmentos é determinante para a geração dos modelos de HQSAR, uma vez que esse parâmetro controla o comprimento mínimo e máximo dos fragmentos a serem codificados no holograma^{148, 152}. Portanto, combinações distintas de tamanho do fragmento (2–5, 3–6, 4–7, 5–8, 6–9, e 7-10) foram investigadas para os melhores modelos da Tabela 5.2. Como mostrado na Tabela 5.3, a variação do tamanho do fragmento resultou na geração de melhores modelos de HQSAR quando comparados aos modelos construídos com o tamanho do fragmento padrão. Resultados estatísticos significativos foram obtidos para os 5 modelos de HQSAR ($q^2_{\text{LOO}} = 0,70$ (1), $0,63$ (2), $0,75$ (3), $0,62$ (4) e $0,74$ (5), com $r^2 > 0,90$ em todos os casos) confirmando a importância da verificação das várias combinações de parâmetros de distinção e tamanho dos fragmentos para obter melhores modelos finais de HQSAR, por causa das diferenças intrínsecas dos diferentes conjuntos de dados¹⁴¹. Para uma melhor avaliação da consistência interna dos modelos, foi empregado outro coeficiente de validação cruzada, o q^2_{LMO} , que se refere ao método “deixe muitos fora” (LMO, do inglês, *leave-many-out*). Para tal, os conjuntos treinamento individuais foram divididos em 10 (LMO_{10}) e 5 (LMO_5) grupos aleatoriamente selecionados e cada modelo foi avaliado 25 vezes na medida de sua exatidão em prever os 10 ou 20% dos compostos restantes. Os resultados confirmaram a estabilidade e significância dos modelos de HQSAR construídos, uma vez que os valores estatísticos obtidos para as análises de LMO foram comparáveis aos valores obtidos com o procedimento de LOO. Esses parâmetros indicam a boa capacidade de correlação dos dados nos conjuntos treinamento e a elevada consistência interna dos modelos¹³⁵.

Embora as avaliações da consistência interna dos modelos (realizadas através dos valores de q^2_{LOO} , q^2_{LMO} e r^2) sejam importantes, o teste mais significativo para avaliar a capacidade de predição dos modelos de QSAR é a sua habilidade em prever o valor da propriedade-alvo para compostos não incluídos no conjunto treinamento. Uma vez que a estrutura codificada nos hologramas moleculares está diretamente relacionada à atividade biológica das moléculas pertencentes ao conjunto treinamento, os modelos de HQSAR construídos devem ser capazes de prever a atividade de análogos do discodermolídeo a partir da impressão digital molecular gerada para estes compostos^{78, 100, 140, 153, 154}. Dessa forma, a capacidade preditiva dos melhores modelos de HQSAR foi avaliada pela predição dos valores de pIC_{50} para cada um dos subconjuntos utilizados como conjunto teste (utilizando os outros 4 subconjuntos como conjunto treinamento). Os resultados do processo de validação externa estão listados na Tabela 5.4 e também mostrados na Figura 5.5.

Tabela 5.2 - Resultados das análises de HQSAR para várias distinções dos fragmentos nos parâmetros estatísticos, utilizando o tamanho do fragmento padrão (4-7).

HQSAR	Parâmetros Estatísticos																			
	Modelo 1				Modelo 2				Modelo 3				Modelo 4				Modelo 5			
	q^2_{LOO}	r^2	HL	N	q^2_{LOO}	r^2	HL	N	q^2_{LOO}	r^2	HL	N	q^2_{LOO}	r^2	HL	N	q^2_{LOO}	r^2	HL	N
A/B/C	0,53	0,84	307	5	0,59	0,86	61	6	0,54	0,76	61	5	0,39	0,77	59	5	0,56	0,83	61	6
A/B/C/H	0,63	0,86	257	5	0,57	0,87	71	6	0,43	0,68	71	4	0,36	0,75	307	5	0,51	0,83	71	6
A/B/C/Ch	0,58	0,90	59	5	0,60	0,91	97	6	0,62	0,91	59	6	0,61	0,92	59	6	0,70	0,94	59	6
A/B/C/H/Ch	0,69	0,90	257	5	0,57	0,88	71	6	0,51	0,85	61	6	0,38	0,76	199	5	0,58	0,93	353	6
A/B/C/H/DA	0,65	0,92	257	6	0,50	0,89	307	6	0,43	0,68	71	4	0,37	0,79	61	5	0,42	0,85	199	6
A/B/C/H/Ch/DA	0,73	0,94	257	6	0,54	0,90	307	6	0,54	0,95	307	6	0,40	0,91	307	6	0,57	0,93	307	6

q^2_{LOO} , coeficiente de correlação da validação cruzada (retirando uma molécula de cada vez); r^2 , coeficiente de correlação; HL, comprimento de holograma; N, número ótimo de componentes principais. Distinção de fragmentos: A, átomo; B, ligação; C, conectividade; H, hidrogênio; Ch, quiralidade; DA, doador e aceptor.

Tabela 5.3 - Análises de HQSAR para a influência de tamanhos dos fragmentos nos parâmetros estatísticos para os melhores modelos.

Modelo	Parâmetros Estatísticos					
	q^2_{LOO}	r^2	HL	N	Tam*	r^2_{pred}
1	0,70	0,93	257	6	7-10	0,72
2	0,63	0,91	83	6	6-9	0,62
3	0,75	0,96	83	6	6-9	0,60
4	0,62	0,94	257	6	6-9	0,85
5	0,74	0,94	83	6	6-9	0,77

q^2_{LOO} , coeficiente de correlação da validação cruzada (retirando uma molécula de cada vez); r^2 , coeficiente de correlação; HL, comprimento de holograma; N, número ótimo de componentes principais; Tam, tamanho de fragmento; r^2_{pred} , coeficiente de correlação da predição. *Tamanhos de fragmentos analisados: 2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9 e 7-10.

Tabela 5.4 - Valores de pIC₅₀ experimentais, estimados e preditos para o conjunto de análogos do discodermolídeo utilizado nos estudos de HQSAR.

CPT	pIC ₅₀ Experimental	pIC ₅₀ Estimado ou Predito ^a					Δ	
		1	2	3	4	5	Estimado ^b	Predito ^c
1	5,00	6,14*	4,87	5,11	4,79	5,06	0,04	-1,14
2	5,40	5,44	6,39*	5,49	5,75	5,53	-0,15	-0,99
3	5,40	5,60	5,82	6,45*	5,50	5,71	-0,26	-1,05
4	5,40	5,50	5,66	5,41	6,09*	5,41	-0,09	-0,69
5	5,70	6,18	5,95	5,98	5,81	6,33*	-0,22	-0,89
6	5,70	6,59*	6,05	6,17	6,09	5,95	-0,42	-0,63
7	6,00	5,97	6,71*	6,00	5,96	5,86	0,05	-0,71
8	6,04	6,18	6,41	6,61*	6,30	6,50	-0,31	-0,57
9	6,10	6,05	5,80	5,97	6,41*	5,78	0,20	-0,31
10	6,19	6,12	6,55	6,11	6,15	6,07*	-0,04	0,12
11	6,22	6,22*	6,11	6,36	6,25	6,25	-0,02	0
12	6,24	6,69	6,29*	6,22	6,69	6,78	-0,46	-0,71
13	6,24	6,10	6,63	6,95*	6,17	6,17	0,07	-0,05
14	6,27	6,23	5,86	6,31	6,18*	6,46	0,05	0,09
15	6,29	6,21	6,39	6,23	6,34	6,23*	0,00	0,06
16	6,31	6,57*	6,19	6,29	6,36	6,27	0,03	-0,26
17	6,39	6,16	6,43*	6,41	6,27	6,25	0,12	-0,04
18	6,40	6,57	6,83	7,04*	6,56	6,37	-0,18	-0,64
19	6,51	6,38	6,20	6,40	6,33*	6,32	0,19	0,18
20	6,61	6,61	6,82	6,83	6,46	7,05*	-0,07	-0,44
21	6,72	6,20*	6,23	6,31	6,38	6,27	0,42	0,52
22	6,80	7,10	7,00*	7,02	6,97	6,76	-0,16	-0,2
23	6,87	6,86	6,94	7,00*	6,91	7,02	-0,06	-0,13
24	6,90	7,00	6,78	6,78	6,76*	6,80	0,06	0,14
25	6,96	6,69	7,02	7,06	6,81	6,60*	0,07	0,36
26	7,00	6,75*	6,76	6,99	6,69	6,89	0,17	0,25
27	7,05	7,06	6,54*	6,97	7,01	6,96	0,05	0,51
28	7,15	6,77	6,91	7,30*	6,63	6,84	0,36	-0,15
29	7,17	7,20	7,14	7,22	7,11*	7,31	-0,05	0,06
30	7,24	7,09	6,93	6,82	7,12	6,94*	0,25	0,3
31	7,27	7,23*	7,06	6,96	7,12	7,09	0,21	0,04
32	7,30	7,28	6,88*	7,11	7,20	7,22	0,10	0,42
33	7,44	7,91	7,94	7,98*	7,78	7,81	-0,42	-0,54
34	7,52	7,53	7,61	7,56	7,05*	7,49	-0,03	0,47
35	7,57	7,53	7,67	7,64	7,92	7,79*	-0,12	-0,22
36	7,66	8,21*	7,70	7,88	7,99	7,76	-0,17	-0,55
37	7,89	7,79	*7,74	8,06	7,82	7,77	0,04	-0,18
38	7,89	8,15	8,03	8,07*	7,87	8,22	-0,19	0,15
39	8,00	8,14	7,96	7,99	7,89*	7,84	0,02	0,11
40	8,03	7,42	7,48	7,62	7,68	7,56*	0,48	0,47
41	8,10	7,95*	7,79	8,31	8,09	8,12	0,02	0,15
42	8,11	8,14	7,39*	8,35	8,17	8,27	-0,12	0,72
43	8,22	8,31	8,14	8,18*	8,33	8,10	0,00	0,04
44	8,29	8,47	8,50	8,41	8,70*	8,32	-0,14	-0,41
45	8,31	8,04	7,99	8,16	8,07	7,74*	0,24	0,57
46	8,40	8,57*	8,39	8,40	8,55	8,34	-0,02	-0,17
47	8,43	8,00	7,52*	8,14	7,98	7,93	0,42	0,91

^a Os valores preditos são os valores únicos obtidos para cada análogo do discodermolídeo como membro do conjunto teste e estão designados por asteriscos; os valores estimados são médias de quatro valores obtidos para cada análogo do discodermolídeo enquanto membro dos conjuntos treinamentos. ^b Diferença entre os logaritmos dos valores medidos e estimados. ^c Diferença entre os logaritmos dos valores medidos e preditos.

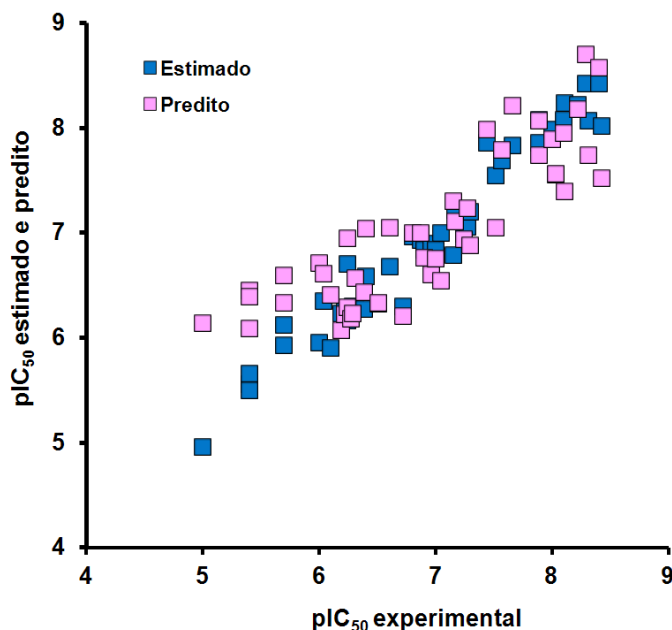


Figura 5.5 - Valores de pIC_{50} estimados (azul) e preditos (rosa) *versus* valores experimentais correspondentes para os análogos do discodermolídeo.

A validação externa é uma etapa importante da modelagem de QSAR porque os compostos do conjunto teste são completamente excluídos da calibração do modelo. Como pode ser visto na Tabela 5.4, os valores preditos se aproximam dos valores experimentais de pIC_{50} , desviando menos que 0,60 unidades logarítmicas para 36 compostos e menos que 0,95 unidades logarítmicas para 8 compostos. As únicas exceções são os compostos **1**, **2** e **3**, para os quais os valores preditos possuem maiores erros (1,05; 0,99 e 1,14 unidades logarítmicas, respectivamente). Esses três compostos estão entre os menos potentes do conjunto de dados e a reduzida capacidade de predição desses compostos reflete, em parte, as limitações na predição dos valores fora da faixa utilizada para a geração dos modelos, uma vez que diferentes conjuntos treinamento foram empregados para derivá-los. De uma maneira geral, a boa concordância entre os valores experimentais e preditos de pIC_{50} nos conjuntos teste (Figura 5.5), juntamente como os significativos valores dos coeficientes de predição, r^2_{pred} (Tabela 5.3), indicam a robustez dos modelos construídos e a consistência e qualidade do conjunto de dados utilizado para derivá-los.

5.1.4 Identificação de fragmentos moleculares especializados

As análises de HQSAR podem fornecer indicações sobre os fragmentos moleculares diretamente relacionados à atividade biológica estudada a partir de uma cuidadosa interpretação dos fragmentos estruturais incorporados nos modelos baseados em fragmentos^{77, 78, 100, 136, 146, 149, 151}. Na Figura 5.6 são apresentados, como exemplos, os mapas

de contribuições individuais 2D para os compostos 36 (discodermolídeo) e 47 (o mais potente), resultantes do modelo de HQSAR mais preditivo (modelo 4 da Tabela 5.4). O módulo de HQSAR, implementado na plataforma SYBYL 8.0, utiliza um esquema de cores para diferenciar as contribuições atômicas individuais para a atividade (Figura 3.6). As cores no extremo vermelho do espectro (vermelho e laranja) refletem contribuições negativas enquanto as cores no extremo verde (amarelo, verde azulado e verde) refletem contribuições favoráveis à propriedade-alvo. Átomos com contribuições intermediárias são mostrados em branco. De acordo com o mapa de contribuições na Figura 5.6A, o anel lactona e os grupos hidroxila ligados aos carbonos C₇ e C₁₁ são contribuições positivas para a citotoxicidade. O mapa correspondente para o análogo mais potente da série (Figura 5.6B) revela a contribuição positiva do hidrogênio do grupo carbamato ligado a C₁₉ e a importância do fragmento C₇-C₁₁.

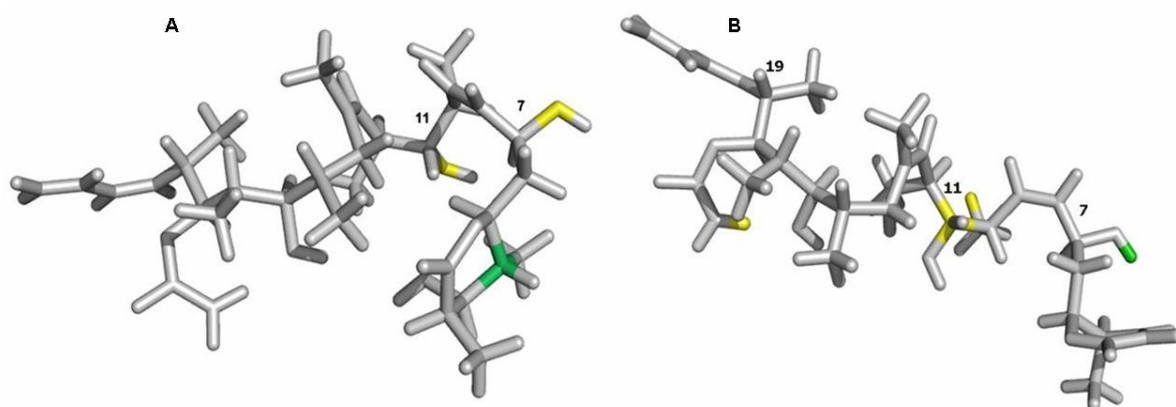


Figura 5.6 - Mapas de contribuição do HQSAR para **A**) o discodermolídeo (**36**) e **B**) o seu análogo mais potente (**47**)¹⁴⁰.

As contribuições individuais mais importantes para a propriedade estudada (pIC_{50}) foram inspecionadas para uma interpretação mais completa dos 5 modelos preditivos em termos de sua significância química e biológica. Os fragmentos moleculares com altas contribuições para a citotoxicidade, os quais afetam substancialmente os modelos de HQSAR, foram selecionados e investigados. Os principais fragmentos moleculares evidenciados, incluindo o fragmento C₁-C₁₄ e o substituinte em C₁₉ estão mostrados na Figura 5.7. Em particular, os substituintes conectados a C₁₉-carbamato (região A), o grupo metila ligado a C₁₄, o grupo (S)-OH ligado a C₁₁ (região B) e o substituinte (S)-OH conectado a C₇, bem como o anel lactona (região C) foram os grupos mais frequentemente observados entre os fragmentos moleculares importantes, de acordo modelos de HQSAR. A atividade citotóxica apresentada pelos análogos do discodermolídeo, se considerada como consequência de sua afinidade pela tubulina, pode ser relacionada a múltiplas interações

intermoleculares, que determinam o modo de ligação desses compostos à cavidade da β -tubulina. Por essa razão, a integração das análises baseadas nas estruturas dos ligantes com estudos de docagem molecular, baseados na estrutura do receptor, representa uma estratégia razoável para a proposição de interações entre a tubulina e seus moduladores que são essenciais para a atividade biológicaⁿ.

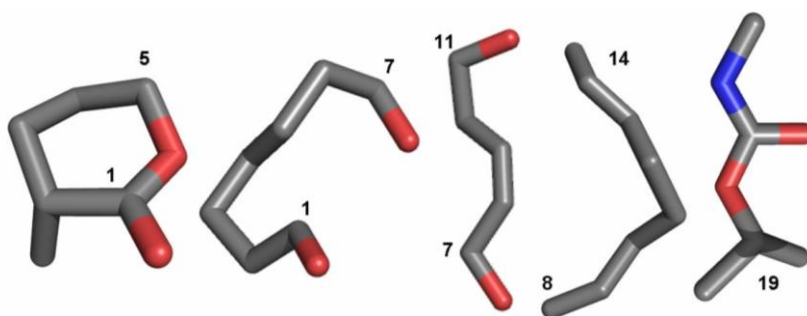


Figura 5.7 - Fragmentos moleculares com contribuições importantes para a citotoxicidade, preditos pelos modelos de HQSAR¹⁴⁰.

5.1.5 Estudos de modelagem molecular baseados na estrutura do receptor

As estruturas dos complexos de $\alpha\beta$ -tubulina com taxol e epotilona A, obtidas por cristalografia eletrônica, fornecem não apenas informações sobre as características estruturais do heterodímero de tubulina, mas também sobre a cavidade ligação desses produtos naturais na estrutura da β -tubulina^{25, 35, 187, 210}. A partir dessa informação 3D, pode-se inferir que os taxanos e as epotilonas se sobrepõem em sua ocupação da mesma ampla cavidade de interação na β -tubulina, mas exploram o bolsão de ligação de maneira singular (Figura 5.2). Resultados de ensaios de competição com taxol e com as proteínas Tau demonstraram que a cavidade da β -tubulina também é capaz de acomodar o discodermolídeo, seus análogos e uma variedade de outros moduladores^{40, 46, 211}. Após a validação dos modelos de HQSAR, os fragmentos estruturais altamente associados à atividade biológica (contribuições positivas) foram utilizados para a proposição de interações intermoleculares no sistema tubulina-discodermolídeo. De maneira a explorar apropriadamente a flexibilidade conformacional do receptor e seus ligantes, as estruturas cristalográficas do taxol e da epotilona A foram utilizadas nos estudos de docagem molecular. Os protocolos de docagem e pontuação foram utilizados como implementados

ⁿ Medidas dos parâmetros termodinâmicos de ligação para 12 agentes estabilizadores dos microtúbulos que interagem no sítio do taxol, incluindo o discodermolídeo, demonstraram que existe uma correlação entre os valores de IC₅₀ (citotoxicidade) e os valores de variação de entalpia de ligação^{49, 50}.

nos programas GOLD 3.1¹¹⁷ e FlexX¹¹⁸. As estruturas cristalográficas da $\alpha\beta$ -tubulina ligadas ao taxol e à epotilona A (códigos PDB: 1JFF e 1TVK) foram acessadas a partir do PDB^{35, 187, 210}. Para os cálculos, os ligantes foram removidos e os átomos de hidrogênio na geometria padrão foram adicionados utilizando o módulo Biopolymer (SYBYL 8.0). As estruturas foram sobrepostas utilizando os seus átomos de C_{α} para caracterizar a cavidade de ligação e identificar as regiões variáveis mais importantes. Os resíduos de His, Gln e Asn foram manualmente verificados para possíveis rotâmeros e estados de protonação e tautoméricos utilizando o programa Pymol 1.0. Em particular, os estados tautoméricos e de protonação, além dos rotâmeros e das diferentes posições 3D dos resíduos Asp26, Leu215, Asp224, His227, Leu228, Thr274, Arg276, Arg282, Arg359 e Gly360, envolvidos em interações importantes com os ligantes, foram cuidadosamente examinados. A cavidade de ligação foi centralizada nas coordenadas cartesianas dos átomos O5 do taxol e O2 da epotilona A e um raio de esfera de 12 Å foi considerado para os procedimentos de docagem, os quais foram repetidos 10 vezes para cada composto. As funções de pontuação padrão FlexX¹¹⁸ e GOLDScore¹¹⁷ foram empregadas para a seleção das conformações para cada composto e apenas as conformações mais bem pontuadas foram consideradas. Após os procedimentos de alinhamento molecular e docagem, as conformações do discodermolídeo e seus análogos, bem como dos fragmentos estruturais mais importantes para a atividade, foram inspecionados individualmente. Os modelos de interação propostos para o discodermolídeo (composto 36) estão mostrados na Figura 5.8.

Para serem aceitáveis, os modelos propostos devem ser capazes de descrever possíveis conformações de ligação, adotadas no interior da cavidade de interação do receptor, através da incorporação de interações intermoleculares específicas. Como mostrado na Figura 5.9 (para o primeiro modelo de interação mostrado na Figura 5.8), os substituintes mais fortemente relacionados à citotoxicidade, que foram enfatizados nos modelos baseados em fragmentos, estabelecem importantes ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas no interior da cavidade da β -tubulina.

Como mostrado na Figura 5.9, o discodermolídeo adota uma conformação curvada no interior da cavidade, trazendo os grupos lactona e a cadeia lateral ligada a C_{19} em razoável proximidade. A extremidade lactona se acomoda em um bolsão delimitado pelos resíduos Asp224 e His227, permitindo a formação de uma ligação de hidrogênio entre o oxigênio carbonílico do anel e a cadeia lateral de Arg276, enquanto, na outra extremidade, o substituinte amina do grupo carbamato ligado a C_{19} é disposto em direção à cadeia lateral de Asp26 para formar mais uma ligação de hidrogênio. É importante notar que essas observações concordam com estudos anteriores, os quais demonstraram a preferência de uma conformação em U para o discodermolídeo em solução (Figura 5.10) e também indicaram a interação do anel lactona no bolsão demarcado por Asp224 e His227^{32, 194, 195}.

Além disso, de acordo com o modelo de interação proposto, o grupo metila ligado ao C₁₄ é orientado em direção à cadeia lateral de Phe270, através de contatos hidrofóbicos, em concordância com estudos de SAR anteriores¹⁹⁶. Os substituintes (S)-C₇-OH, (S)-C₁₁-OH e (R)-C₁₇-OH estabelecem ligações de hidrogênio com os resíduos Arg276, Thr274 e Gly360, respectivamente. Também é interessante ressaltar a importância do parâmetro de distinção quiralidade para os modelos de HQSAR construídos, uma vez que, como se pode notar, várias interações intermoleculares entre a tubulina e os moduladores são dependentes da estereoquímica dos grupos substituintes no esqueleto do discodermolídeo.

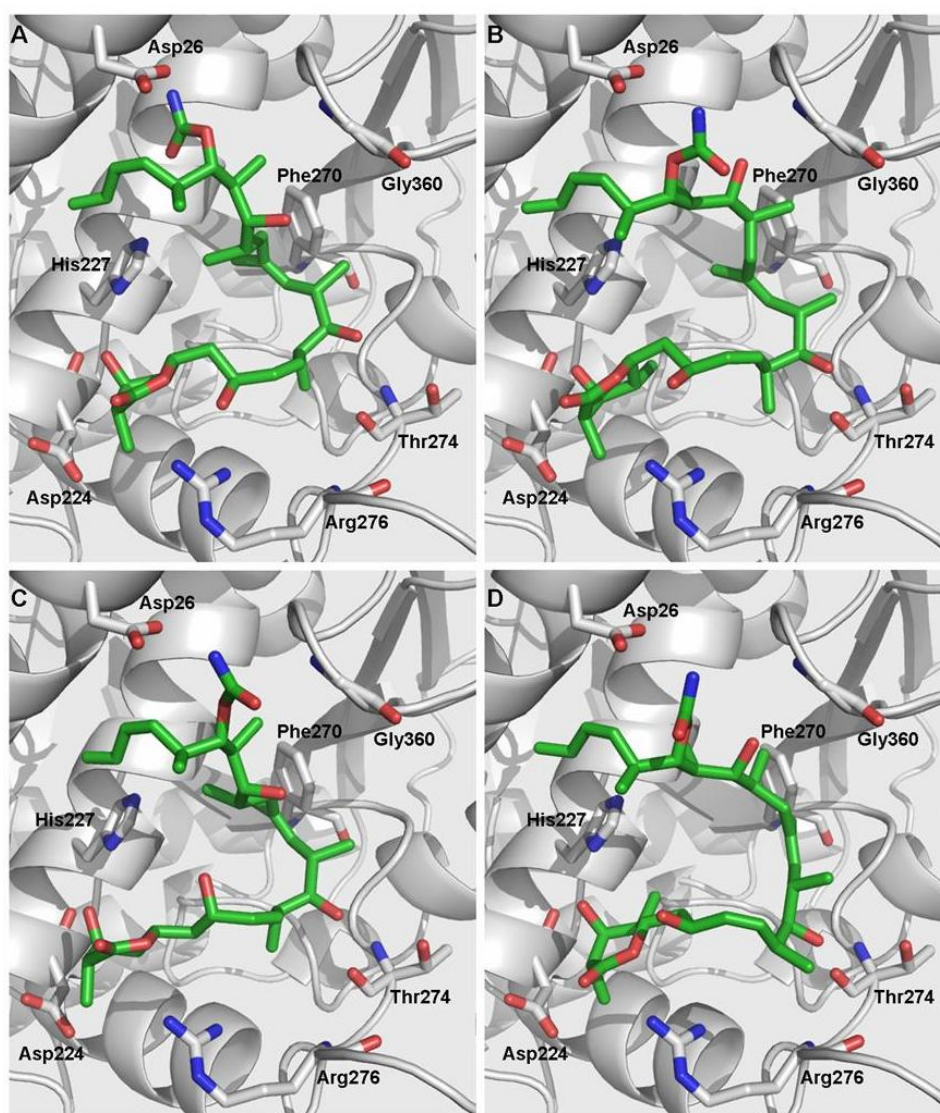


Figura 5.8 - Modelos 3D para o discodermolídeo no interior da cavidade da β -tubulina (código PBD: 1TVK). Os átomos de hidrogênio foram eliminados para maior clareza¹⁴⁰.

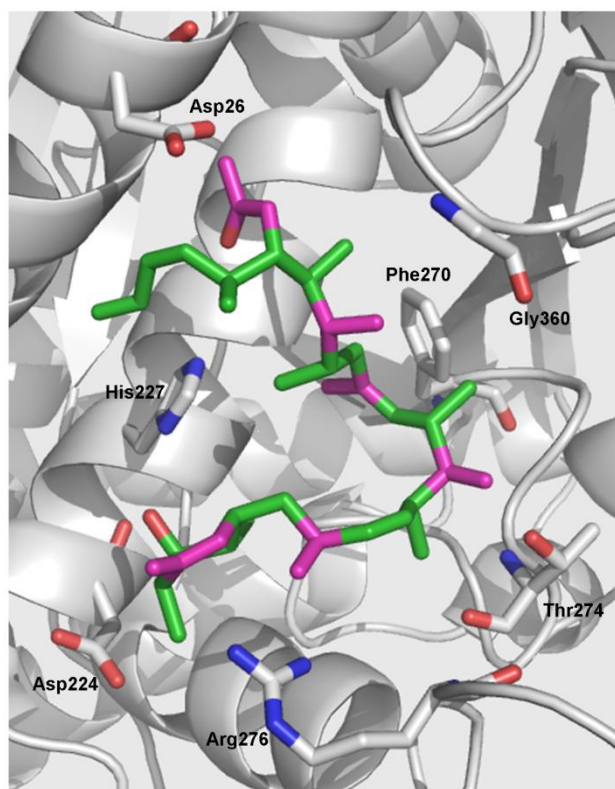


Figura 5.9 - Grupos substituintes com contribuições positivas para citotoxicidade (C_{19} -carbamato, C_{14} - CH_3 , (S)- C_{11} -OH, (S)- C_7 -OH e oxigênio da carbonila; rosa) no discodermolídeo (verde). Código PBD: 1TVK. Os átomos de hidrogênio foram eliminados para maior clareza¹⁴⁰.

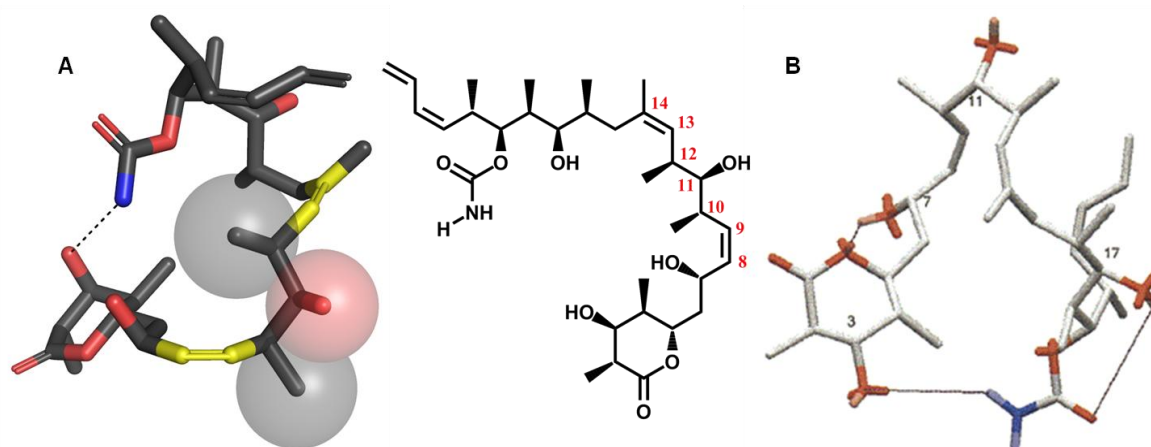


Figura 5.10 - **A)** Conformação minimizada do discodermolídeo pelo campo de forças Tripos. **B)** Os estudos em solução demonstram que, embora tenha 15 ligações rotacionáveis, a conformação preferencial do discodermolídeo é curvada. Essa preferência se deve à existência de duas ligações (Z)-alqueno (C_8 - C_9 e C_{13} - C_{14} , amarelo em A) e à minimização das interações *sin*-pentano nos carbonos entre as duplas ligações, em C_{10} - C_{12} (os raios de van der Waals estão mostrados como esferas em A). Na região A do discodermolídeo (Figura 5.4), a minimização das interações *sin*-pentano representam contribuição adicional para a curvatura da molécula. A conformação em U permite, ainda, a formação de fraca interação polar intramolecular entre o grupo carbamato e o grupo lactona nos dois terminais da molécula^{195, 202}.

A despeito de suas estruturas químicas bastante diferentes, discodermolídeo, taxol e epotilona A apresentam, pelo menos em parte, cavidades de ligação comuns. Entretanto, de acordo com o modelo proposto, as características estruturais do discodermolídeo podem resultar em interações diferentes com o receptor, quando comparadas a outros moduladores, como ilustrado na Figura 5.11. O modo de ligação proposto corrobora com dados experimentais de estudos anteriores utilizando RMN, através dos quais foi demonstrado que as regiões do tiazol-C₁-C₅ da epotilona A e C₁-C₁₁ do discodermolídeo ocupam sítios próximos nos seus complexos com a tubulina. O mesmo foi proposto para outros grupos, como 8-CH₃ na epotilona A e 14-CH₃ no discodermolídeo¹⁹¹.

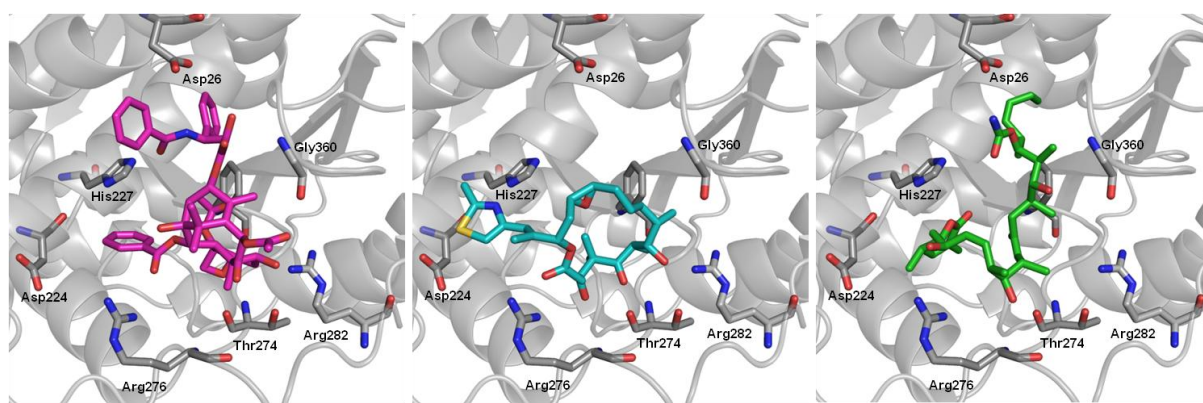


Figura 5.11 - Taxol (rosa), epotilona (azul) e discodermolídeo (modelo em verde) exploram a mesma cavidade da tubulina (código PDB: 1TVK) de maneiras diferentes.

Moléculas estruturalmente diversas que afetam a dinâmica dos microtúbulos são compostos bioativos a serem considerados nos programas de planejamento de novos candidatos a fármacos anticâncer. Ao longo dos últimos anos, esforços consideráveis têm sido direcionados à elucidação do modo de ligação do discodermolídeo na cavidade de interação do taxol. Recentemente, alguns modelos de interação foram propostos baseados em evidências experimentais e em estudos computacionais²⁰²⁻²⁰⁴. Dentre esses, o modelo proposto por Canales e colaboradores (Figura 5.12 A), baseado em vários estudos de RMN, docagem molecular e simulações de dinâmica molecular, demonstra algumas semelhanças com os modelos baseados em fragmentos moleculares e docagem molecular propostos nesse trabalho²⁰³. O modelo proposto por Khrapunovich-Baine e colaboradores, baseado em mapeamento das alterações de troca hidrogênio-deutério e em docagem molecular, é significativamente diferente do modelo proposto nesse trabalho (Figura 5.12 B). De acordo com esse último modelo, discodermolídeo e taxol ocupariam subsítios de interação complementares na mesma cavidade²⁰⁴. Um modelo alternativo proposto por Jogalekar e colaboradores, baseado em cálculos computacionais e RMN, é também bastante diferente do modelo proposto nesse trabalho (Figura 5.12 C)²⁰². Interessantemente, todos esses

modelos citados são também substancialmente diferentes entre si. É importante ter em mente que a obtenção da estrutura do complexo entre a tubulina e o discodermolídeo, ou um de seus análogos, será de considerável importância para a distinção entre esses e outros possíveis modelos para a ligação do discodermolídeo na tubulina.

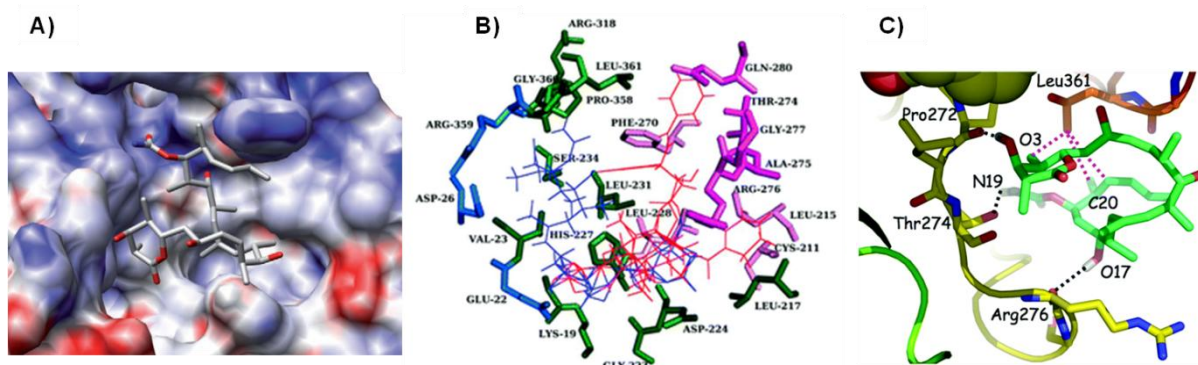


Figura 5.12 - Outros modelos de interação para o discodermolídeo na cavidade da β -tubulina recentemente propostos na literatura²⁰²⁻²⁰⁴.

5.1.6 Análises de QSAR 3D¹⁵⁰

Para melhor compreender as contribuições estéricas e eletrostáticas para a atividade citotóxica dos análogos do discodermolídeo, estudos de QSAR 3D CoMFA foram desenvolvidos baseados em dois alinhamentos moleculares distintos do conjunto de dados. O alinhamento estrutural é um parâmetro muito importante nos estudos de QSAR 3D CoMFA e várias estratégias para esse propósito têm sido descritas na literatura^{131, 132, 135, 136, 157, 158, 161}. Para o presente estudo, duas abordagens foram utilizadas e comparadas: uma baseada na sobreposição de corpo rígido da subestrutura comum entre os confôrmeros de menor energia de cada análogo do discodermolídeo e outra baseada nas conformações propostas a partir dos estudos de HQSAR e docagem molecular no interior da cavidade da β -tubulina¹⁴⁰. Para a geração do primeiro alinhamento, todas as moléculas nas suas respectivas conformações de baixa energia, minimizadas pelo campo de forças Tripos, foram individualmente sobrepostas ao discodermolídeo utilizando um procedimento baseado no menor desvio quadrático médio entre os átomos de uma subestrutura comum, presente em todos os compostos e os mesmos átomos constituintes da estrutura do discodermolídeo. O alinhamento molecular obtido e a subestrutura máxima comum utilizada para o alinhamento estão ilustrados na Figura 5.13 A^{151, 161}. Para a geração do segundo alinhamento estrutural, mostrado na Figura 5.13 B, os modos de ligação propostos para o discodermolídeo e seus análogos, na cavidade da β -tubulina, foram utilizados^{135, 140, 212}.

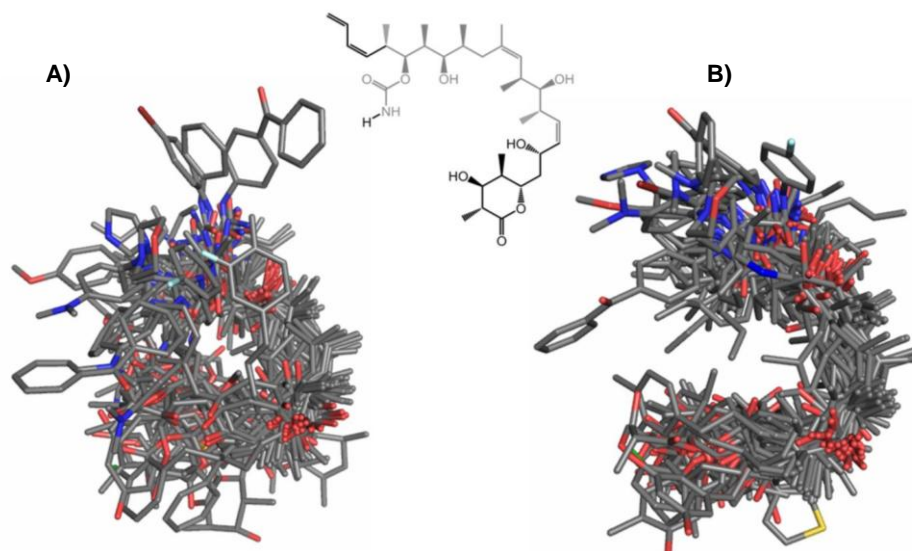


Figura 5.13 - **A)** Alinhamento tridimensional do conjunto de dados para os análogos minimizados do discodermolídeo. O discodermolídeo, molécula utilizada como padrão para o alinhamento; está mostrado com a subestrutura comum a todos os análogos em cinza. **B)** Alinhamento 3D do conjunto de dados gerado a partir de estudos de docagem molecular na cavidade da β -tubulina¹⁵⁰.

As propriedades estéricas e eletrostáticas foram calculadas de acordo com os potenciais de Lennard-Jones e Coulomb, respectivamente. O conjunto treinamento alinhado foi posicionado numa grade tridimensional reticulada, selecionada de tal forma a conter todas as moléculas, com uma extensão de 4 Å em cada direção. Os campos do CoMFA foram gerados em cada intersecção dos retículos utilizando o campo de forças Tripos e um átomo de carbono sp^3 com carga positiva (+1). O espaçamento entre as intersecções na grade reticulada foi de 2 Å nas direções x, y e z. Um limite de 30 kcal/mol foi selecionado como máximo para os valores de energia estérica e eletrostática. Os descritores do CoMFA foram utilizados como variáveis independentes enquanto os valores pIC_{50} foram utilizados como variáveis dependentes nas análises de PLS para derivar os modelos 3D. Os modelos foram investigados a partir dos valores de q^2_{LOO} e q^2_{LMO} com as variáveis escalonadas pelo método CoMFA padrão, e externamente validados utilizando um conjunto teste, não considerado para a geração dos modelos de QSAR. Os valores de pIC_{50} foram preditos para os compostos do conjunto teste, permitindo a determinação dos valores de r^2_{pred} para os modelos de QSAR 3D individuais.

A geração de modelos estatísticos consistentes depende da qualidade dos conjuntos treinamento e teste em termos de sua diversidade estrutural e distribuição dos valores da propriedade biológica. Do conjunto de dados original contendo 47 compostos, 42 análogos do discodermolídeo, para os quais modelos de conformação bioativa e alinhamentos estruturais 3D razoáveis foram obtidos, foram utilizados para os estudos de QSAR 3D, 33 (79%) dos quais foram selecionados para a calibração do modelo (conjunto treinamento,

moléculas marcadas com **T**, Tabela 5.1) e os 9 (21%) restantes para o processo de validação externa (conjunto teste, moléculas marcadas com **t**, Tabela 5.1). Os compostos foram cuidadosamente separados em conjuntos treinamento e teste, de maneira a assegurar adequada cobertura da faixa de pIC_{50} , como pode ser visto na Figura 5.14. Portanto, os conjuntos treinamento e teste são apropriados para o desenvolvimento de modelos de QSAR^{153, 154}. Os mesmos conjuntos treinamento e teste foram utilizados para as análises de QSAR 3D empregando as duas estratégias de alinhamento distintas. A capacidade preditiva dos modelos foi avaliada pelos valores de r^2_{pred} .

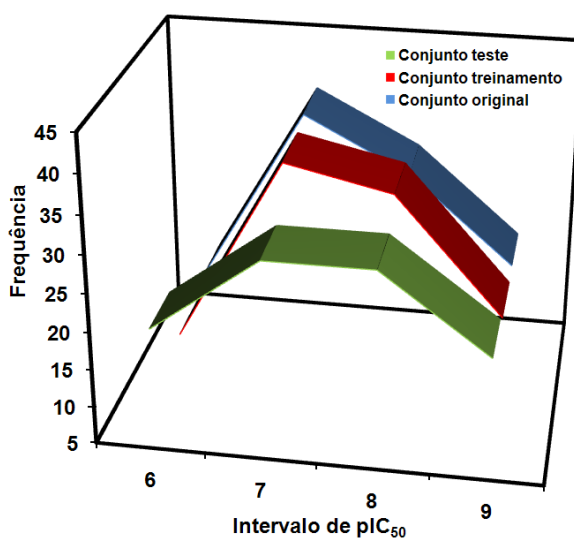


Figura 5.14 - Distribuição dos valores de pIC_{50} para os conjuntos teste, treinamento e para o conjunto de dados completo.

Os alinhamentos estruturais, baseados na sobreposição dos confôrmeros de baixa energia e nos modelos de conformação bioativa, foram empregados em várias análises de PLS e os modelos foram otimizados através do recurso da focagem da melhor região^o (do

^o Cada análise de PLS associa uma série de parâmetros a cada vértice em que os campos são calculados. O escalonamento CoMFA padrão atribui, inicialmente, o mesmo peso para todos esses parâmetros. Muitos descritores gerados em vários pontos da grade reticulada, entretanto, não contribuem de forma significativa para o modelo, sendo considerados pontos de redundância ou baixa variância. Como muitos desses pontos são incluídos na análise, geralmente os modelos gerados inicialmente possuem menor qualidade. O recurso da focagem da melhor região consiste em atribuir um peso maior para aqueles pontos da grade que contribuem de maneira mais significativa para o modelo e menor peso para pontos que apresentem redundância ou baixa variância. Vários parâmetros podem ser selecionados para evidenciar os campos apropriados, incluindo o método pelo qual os campos terão seus pesos diferenciados e a magnitude dessa diferenciação (de 0,3 a 1,5 geralmente). Um desses métodos é a diferenciação dos campos pelo coeficiente de desvio padrão (SDC, do inglês, *Standard Deviation Coefficient*), que a partir de uma análise previamente realizada, atribui o peso que determinado ponto terá em uma nova análise, multiplicando a variação dos valores dos campos de interação deste ponto pelo coeficiente que foi atribuído a este ponto pela análise de PLS anterior. Além disso, o espaçamento da grade reticulada pode ser modificado na nova região criada. O espaçamento padrão inicial é de 2 Å e pode ser modificado para valores menores, com aumento do número de descritores gerados, podendo aumentar o ruído em alguns casos²¹³.

inglês, *QSAR CoMFA region focus*), variando os pesos do produto do desvio padrão pelos coeficientes da PLS de 0,3 a 1,5 e o espaçamento dos vértices da grade de 0,5 a 2,0 Å. Essa estratégia não apenas aumenta os valores de q^2_{LOO} durante o processo de geração dos modelos, mas também resulta no refinamento dos mapas de contorno 3D^{132, 212}. Os melhores resultados estatísticos estão apresentados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Resultados dos melhores modelos CoMFA construídos.

Alinhamento	q^2_{LOO}	N	r^2	SEE	r^2_{pred}	Fraction	
						S	E
Corpo-rígido	0,68	6	0,94	0,23	0,68	0,30	0,70
Baseado no receptor	0,63	6	0,91	0,31	0,85	0,53	0,47

q^2_{LOO} , coeficiente de correlação da validação cruzada (retirando uma molécula de cada vez); N , número ótimo de componentes principais; r^2 , coeficiente de correlação; SEE , erro padrão da estimativa; r^2_{pred} , coeficiente de correlação da predição; S, campo estérico; E, campo eletrostático

Coefficientes significativos para a avaliação da consistência interna dos modelos foram obtidos (valores de $q^2_{LOO} > 0,60$ e de $r^2 > 0,90$ para ambos os alinhamentos estudados). Procedimentos de LMO foram executados e os resultados confirmaram a estabilidade e significância dos modelos de QSAR 3D construídos, uma vez que os valores estatísticos obtidos para as análises de LMO (q^2_{LMO}) foram comparáveis aos valores obtidos com o procedimento de LOO (q^2_{LOO}). A possibilidade de geração de modelos aleatórios foi verificada através da permutação progressiva dos valores da propriedade biológica entre os compostos (do inglês, *progressive scrambling*) e a estabilidade dos modelos foi confirmada. Resumidamente, os modelos construídos demonstraram ser estáveis e possuir significância estatística e razoável consistência interna.

A capacidade preditiva dos modelos de QSAR 3D CoMFA construídos com os 33 análogos do discodermolídeo foi analisada pela sua capacidade em prever o valor da propriedade biológica (pIC_{50}) para os 9 compostos do conjunto teste externo, os quais foram completamente excluídos da geração dos modelos (Tabela 5.1). Antes da predição, os compostos do conjunto teste foram processados de forma idêntica às moléculas pertencentes ao conjunto treinamento. Todos os valores experimentais e preditos de pIC_{50} para os conjunto teste, para ambas as estratégias de alinhamento molecular, estão incluídos na Tabela 5.6 e os resultados gráficos mostrados na Figura 5.15. Valores de r^2_{pred} de 0,68 e 0,85 foram obtidos, respectivamente, para os modelos construídos a partir do alinhamento de corpo rígido dos confôrmeros de baixa energia e do alinhamento baseado na estrutura do receptor (Tabela 5.6). A boa concordância entre os valores experimentais e preditos de pIC_{50} indica a robustez dos modelos preditivos construídos. Portanto, pode-se inferir que os

modelos apresentam uma boa capacidade de predição para novos ligantes da β -tubulina dentro dessa diversidade estrutural.

Tabela 5.6 - Valores de pIC_{50} experimentais e preditos pelos melhores modelos CoMFA, com valores residuais, para os compostos do conjunto teste. Alinhamento de corpo-rígido (1) e baseado na estrutura do receptor (2).

CPT	Experimental ^a	Predito CoMFA ₁ ^a	Resíduos CoMFA ₁ ^b	Predito CoMFA ₂ ^a	Resíduos CoMFA ₂ ^b
03	5,40	5,93	-0,53	5,90	-0,50
06	5,70	6,02	-0,32	5,83	-0,13
15	6,29	6,86	-0,57	6,17	0,12
19	6,51	6,52	-0,01	5,97	0,54
22	6,80	7,14	-0,34	6,76	0,04
26	7,00	6,73	0,27	7,01	-0,01
30	7,24	7,44	-0,20	7,22	0,02
38	7,89	6,80	1,09	7,19	0,70
41	8,10	7,69	0,41	7,94	0,16

^a valores em pIC_{50} . ^b Diferença entre os logaritmos dos valores experimentais e preditos.

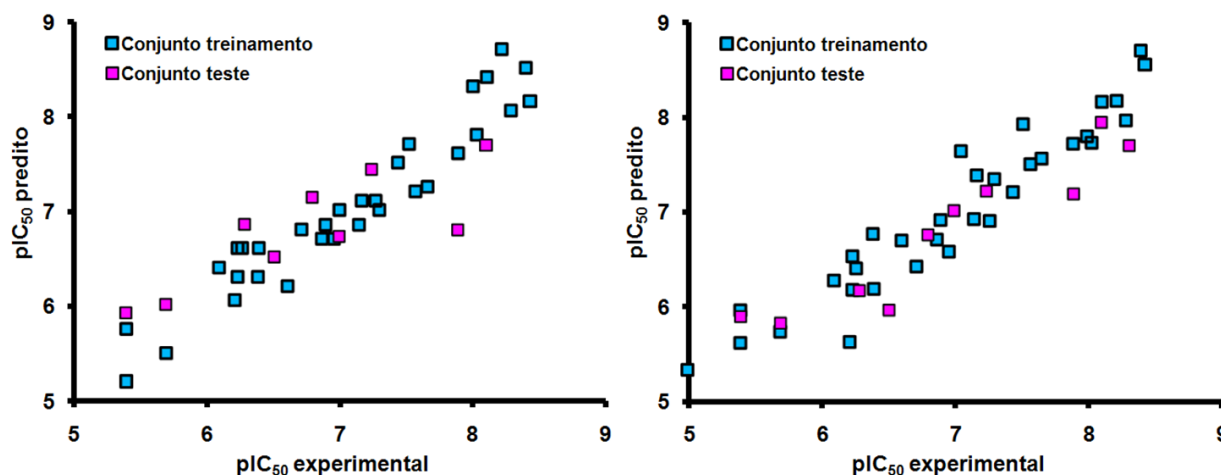


Figura 5.15 - Valores de pIC_{50} preditos *versus* valores experimentais correspondentes para os compostos dos conjuntos treinamento (azul) e teste (rosa) para os alinhamentos estruturais baseados **A)** nas estruturas minimizadas dos análogos do discodermolídeo e **B)** na estrutura do receptor.

O modelo de QSAR 3D CoMFA construído para o alinhamento baseado na estrutura do receptor possui maior capacidade preditiva que o modelo obtido para o alinhamento de corpo-rígido, como indicado pelo maior valor de r^2_{pred} e pelos menores valores residuais, mostrados nas Tabelas 5.5 e 5.6, respectivamente. Além disso, as contribuições relativas

dos campos estéricos e eletrostáticos para a atividade biológica são diferentes para os dois modelos. Como apresentado na Tabela 5.6, o descritor de campos estéricos para o modelo baseado nas estruturas minimizadas dos análogos do discodermolídeo explicou 30% da variância dos dados, enquanto o descritor eletrostático foi o responsável pelos 70% restantes. Para o modelo baseado na estrutura do receptor, os campos estéricos e eletrostáticos correspondentes explicaram 53% e 47%, respectivamente. Esses resultados estão em concordância com estudos anteriores sobre a interação dos taxanos com a tubulina, utilizando QSAR clássico e 3D, que indicaram que a característica hidrofóbica dos substituintes e os parâmetros estéricos são cruciais para a atividade biológica e refletem diretamente o ambiente químico da cavidade de ligação na estrutura da β -tubulina^{214, 215}.

Além da predição dos valores da propriedade biológica para moléculas não incluídas no modelo, os modelos de QSAR 3D também fornecem sugestões a respeito das propriedades moleculares relacionadas à atividade biológica (Figura 3.8). Uma característica relevante do método CoMFA é a simples visualização das regiões estéricas e eletrostáticas no espaço responsáveis por aumentos e reduções nos valores da variável dependente em estudo (pIC_{50})^{77, 131, 135, 136, 157}. Os mapas de contorno 3D resultantes dos modelos CoMFA representam uma ferramenta para o entendimento das possíveis interações no sistema discodermolídeo-tubulina relacionadas à citotoxicidade.

Os campos moleculares podem ser analisados considerando dois aspectos nos mapas de contorno resultantes dos modelos de QSAR 3D CoMFA: regiões estéricas desfavoráveis são representadas em amarelo e regiões favoráveis em verde, enquanto os contornos vermelhos representam regiões onde substituintes eletronegativos poderiam aumentar a atividade biológica e os contornos azuis indicam regiões onde grupos eletropositivos poderiam contribuir para o aumento da potência citotóxica. Para comparação, os mapas de contorno eletrostáticos para os modelos baseados no alinhamento de corpo-rígido e na estrutura do receptor estão mostrados na Figura 5.16. Embora seja destacada a importância dos grupos C_{19} -carbamato e carbonila da lactona, bem como a relevância dos substituintes eletronegativos próximos a C_{11} , em ambos os modelos, apenas o modelo baseado na estrutura do receptor apresenta um contorno vermelho ao redor da região de (S)- C_7 , indicando que grupos eletronegativos (como aceptores de ligação de hidrogênio) estão relacionados ao aumento da potência antiproliferativa. Essas observações concordam com as evidências experimentais anteriores e com os modelos de HQSAR, que sugerem a importância dos substituintes em C_{19} , (R)- C_{17} -OH e (S)- C_7 -OH e do oxigênio carbonílico do anel lactona, para a citotoxicidade dos análogos do discodermolídeo^{32, 140, 194, 195}.

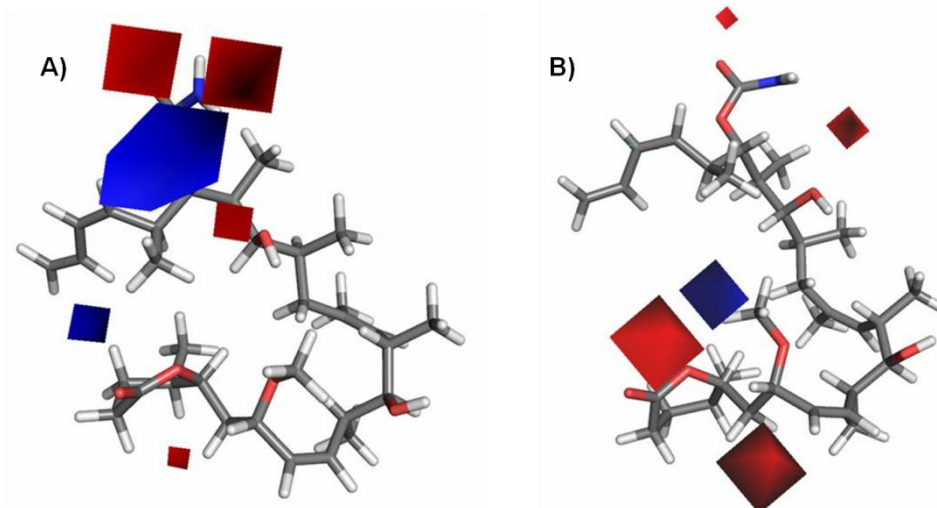


Figura 5.16 - Mapas de contorno eletrostáticos. **A)** Alinhamento de corpo-rígido dos confôrmeros de baixa energia. **B)** Alinhamento baseado na estrutura do receptor. Maiores valores de pIC_{50} estão associados com maior carga positiva próxima aos campos azuis e maior carga negativa próxima aos campos vermelhos. O composto 46 é mostrado para referência¹⁵⁰.

Os mapas estéricos correspondentes para os dois alinhamentos moleculares utilizados estão mostrados na Figura 5.17. Os contornos verdes ao redor do anel lactona do discodermolídeo sugerem que substituintes volumosos poderiam ser favoráveis de acordo com os modelos gerados para ambos alinhamentos. Entretanto, apenas os mapas estéricos para o modelo baseado na estrutura do receptor explicam em maiores detalhes que grupos ainda mais volumosos nessa região poderiam ser detrimental para a potência citotóxica, como enfatizado pelas regiões estéricas desfavoráveis, em amarelo. Além disso, o substituinte ligado a C_{14} é importante para o aumento da citotoxicidade, sendo que esse resultado também confirma estudos anteriores e os resultados das análises de QSAR 2D¹⁹⁶.

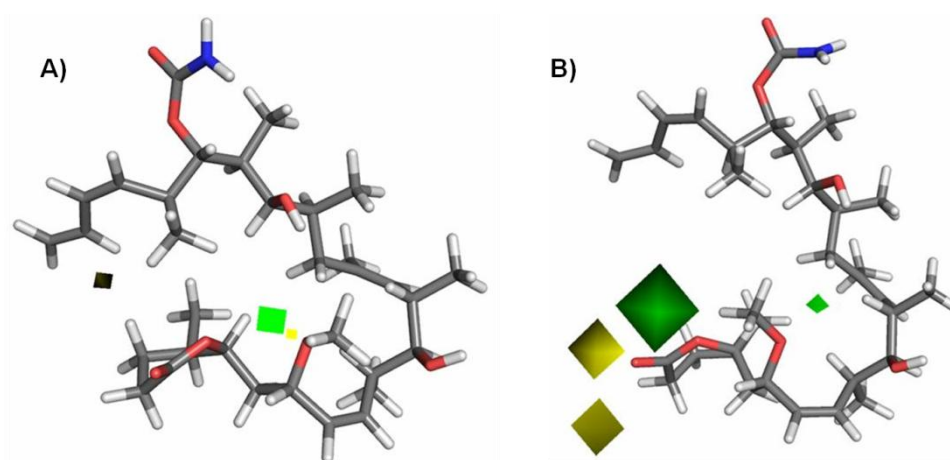


Figura 5.17 - Mapas de contorno estéricos. **A)** Alinhamento de corpo-rígido dos confôrmeros de baixa energia. **B)** Alinhamento baseado na estrutura do receptor. Maiores valores de pIC_{50} estão associados com grupos mais volumosos próximos aos campos verdes e menor volume próximo aos campos amarelos. O composto 46 é mostrado para referência¹⁵⁰.

O modelo 3D baseado na estrutura do receptor, construído nesse trabalho, também concorda com o ambiente químico da cavidade do taxol na β -tubulina, como ilustrado na Figura 5.18. A importância dos substituintes C_{19} -carbamato, (R) - C_{17} -OH, C_{14} - CH_3 e (S) - C_7 -OH, e do anel lactona, corrobora com os sítios de interação na cavidade da β -tubulina, formados pelos resíduos de Asp26, Gly360, Phe270, Arg276, Arg282 e His227^{32, 140, 194, 195}. A identificação dessas características estruturais pode ser útil no planejamento de novos ligantes da tubulina estruturalmente relacionados com potência otimizada e estrutura mais simples.

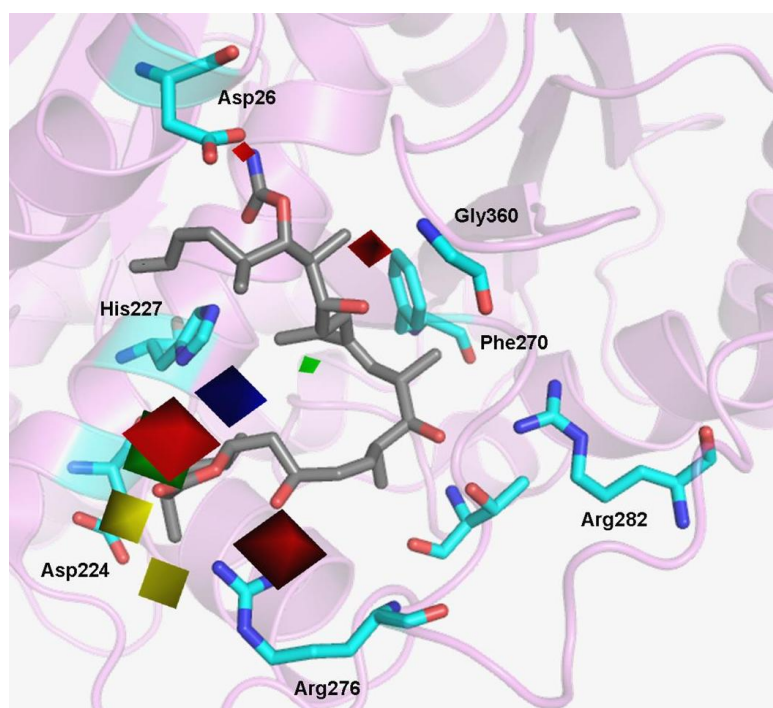


Figura 5.18 - Modelo 3D para o discodermolídeo na cavidade da β -tubulina (código PBD: 1TVK) juntamente com os campos estéricos e eletrostáticos resultantes do modelo de QSAR 3D CoMFA baseado na estrutura do receptor¹⁵⁰.

O entendimento das interações intermoleculares entre uma proteína e seus moduladores é importante para o planejamento de compostos apresentando propriedades como potência e afinidade apropriadas. Nesse trabalho, modelos preditivos de QSAR 2D e 3D foram construídos, empregando os métodos HQSAR e CoMFA. A partir da modelagem de HQSAR foi possível propor modelos de ligação para os análogos flexíveis do discodermolídeo e a β -tubulina e, a partir dos estudos de QSAR 3D CoMFA, foram destacadas regiões 3D no espaço onde modificações das características estéricas e eletrostáticas poderiam levar ao aumento da potência antiproliferativa. Os modelos foram compatíveis com o ambiente químico da superfície de interação do taxol na β -tubulina e, portanto, podem ser usados para orientar a proposição de modificações estruturais e o planejamento baseado na estrutura do receptor de novos ligantes da tubulina. A integração

dos métodos de QSAR 2D, 3D e de docagem molecular foi uma estratégia útil para a proposição das características químicas e estruturais possivelmente responsáveis pela afinidade de ligação ao receptor e consequente estabilização dos microtúbulos e propriedades antitumorais para essa série de análogos do discodermolídeo.

5.2 PROPOSIÇÃO DE UM MODELO FARMACOFÓRICO BASEADO EM PRODUTOS NATURAIS MODULADORES DA β -TUBULINA COM POTENTE AÇÃO ANTITUMORAL

Para a proposição dos requerimentos farmacofóricos para ligação à β -tubulina e promoção da estabilização dos microtúbulos, estratégias de SBDD e LBDD foram empregadas. Para este estudo, foram utilizadas as características químicas das estruturas de três agentes estabilizadores de microtúbulos de origem natural – taxol, epotilona A e discodermolídeo, em seus modelos de conformação bioativa – assim também como a informação estrutural sobre a cavidade de interação da β -tubulina. Os promotores da polimerização de tubulina selecionados – taxol, epotilona A e discodermolídeo – são oriundos de fontes naturais bastante diferentes – cascas de árvores, fermentação de mixobactérias e esponjas marinhas, respectivamente – e também apresentam estrutura química diversa (Figuras 1.3 e 1.6). Apesar dessa significativa variação, esses compostos competem pela mesma cavidade de interação na β -tubulina, mas a exploram de maneira diferente, como apresentado na Figura 5.11 para os complexos cristalográficos de taxol e epotilona A com tubulina e para um dos modelos de interação propostos para o discodermolídeo^{40, 46, 211}. Portanto, em teoria seria possível identificar padrões de reconhecimento molecular comuns para essas estruturas de esqueletos diferentes, os quais poderiam evidenciar as interações intermoleculares essenciais para o processo de estabilização dos microtúbulos¹⁹¹.

5.2.1 Identificação de características estereoelétrônicas comuns

Para a identificação das características químicas comuns aos ligantes estudados, a informação estrutural para o taxol e a epotilona A foi extraída a partir das estruturas dos seus complexos cristalográficos com a tubulina (códigos PDB: 1JFF e 1TVK), considerada como a conformação bioativa correta e interpretada em termos das suas características químicas^{35, 187}. Hibridação, características de ligação e átomos tipo foram verificados utilizando o programa SYBYL 8.0. Os átomos de hidrogênio foram adicionados na geometria padrão. Para o discodermolídeo, os modelos de conformação bioativa propostos a partir dos

estudos de QSAR 2D e 3D foram empregados. As energias de cada conformação para cada modulador foram calculadas empregando o campo de forças Tripos e as cargas parciais foram assinaladas segundo o método clássico de Gasteiger–Hückel.

Para as conformações selecionadas dos ligantes, os campos de interação molecular hidrofóbicos e doador e acceptor de ligação de hidrogênio foram calculados utilizando uma sonda de carga positiva (+1), de raio 1, propriedades de hidrofobicidade e de ligação de hidrogênio +1 e um fator de atenuação de 0,3 para a função Gaussiana dependente da distância, de acordo com os campos gerados pelo método CoMSIA¹⁵⁹. A grade tridimensional reticulada foi gerada como descrito para o método CoMFA e as energias de interação hidrofóbicas e de ligação de hidrogênio calculadas em cada vértice. Os campos de interação hidrofóbicos e doador e acceptor de ligações de hidrogênio foram analisados em diferentes valores limites de energia. Os campos de interação molecular para os produtos naturais estabilizadores de microtúbulos estudados podem ser visualizados na Figura 5.19, em que as energias de interação hidrofóbicas atrativas estão mostradas em amarelo e as repulsivas em cinza. As regiões para doadores de ligações de hidrogênio estão coloridas em azul e para aceptores de ligações de hidrogênio em rosa.

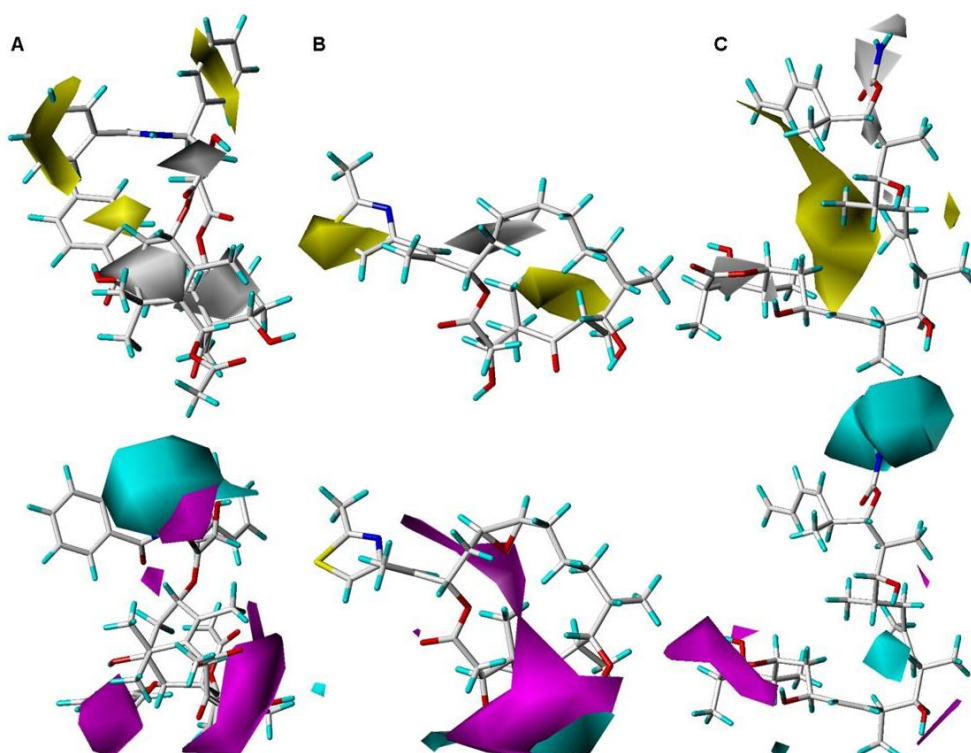


Figura 5.19 - Campos de interação molecular hidrofóbicos favoráveis (amarelo) e hidrofílicos (cinza) e campos de interação molecular doadores (azul) e aceptores (rosa) de ligação de hidrogênio para **A)** Taxol; **B)** Epopilona A e **C)** Discodermolídeo. O limite de valores das energias de interação hidrofóbicas foi selecionado para a faixa de -38 a -36 kcal/mol, e as hidrofílicas entre -40 e -30 kcal/mol. Para doadores de ligação de hidrogênio, as energias foram selecionadas para o limite de -13 kcal/mol e para aceptores entre -40 e -33 kcal/mol.

5.2.2 Identificação de subsítios comuns de interação

Os mapas de interação molecular, polares e não polares, para cada ligante foram comparados aos seus posicionamentos na cavidade da β -tubulina (Figura 5.11). Alguns subsítios de interação comuns, possivelmente importantes para a atividade dos diferentes moduladores, foram identificados. Como se pode observar a partir dos mapas de interação molecular (Figura 5.19), há uma região hidrofóbica aproximadamente comum representada pelo anel fenil do éster benzoato no taxol, que penetra profundamente num bolsão hidrofóbico delimitado pelos resíduos Asp224 e His227 (Figura 5.11). Essa região corresponde aproximadamente à posição do anel lactona do discodermolídeo (que apresenta características mais hidrofílicas). O grupo tiazol da epotilona A, que também apresenta características hidrofóbicas (Figura 5.19) não penetra profundamente na cavidade, mas interage lateralmente com o bolsão (Figura 5.11). Além disso, existe outra região hidrofóbica comum importante, representada pelo substituinte metila em C₁₄ e C₁₆ no discodermolídeo, que corresponde ao mesmo substituinte em C₄ e C₈ no arcabouço da macrolactona da epotilona A. Para os grupos doadores de ligação de hidrogênio existe uma região bastante proeminente representada pelo grupo NH da amida no taxol e do carbamato no discodermolídeo. Esse grupo se dispõe na direção do resíduo de Asp26 na parte superior da cavidade de interação. Entretanto, essa interação polar não é explorada pelo esqueleto da epotilona A (Figuras 5.11 e 5.19).

O assoalho da cavidade de interação parece bastante importante para a formação de ligações de hidrogênio com os estabilizadores de microtúbulos (Figura 5.11). Como mostrado nos mapas para grupos aceptores de ligação de hidrogênio, o oxigênio carbonílico do éster benzoato do taxol, da macrolactona da epotilona e da lactona do discodermolídeo podem estabelecer ligações de hidrogênio com resíduo de Arg276, carregado positivamente. Para a epotilona e para o taxol, até duas ligações de hidrogênio podem ser estabelecidas entre esses grupos. Já para o discodermolídeo, a segunda interação com Arg276 é provavelmente mediada pelo substituinte C₇-OH, como sugerido pelos estudos de QSAR 2D e 3D e os mapas para aceptores de ligação de hidrogênio. Arg282 também pode doar ligações de hidrogênio para os grupos hidroxila em C₇ da epotilona, C₁₁ do discodermolídeo e cicloexanol do taxol (Figuras 5.18 e 5.19). Além disso, tanto doadores quanto aceptores de ligações de hidrogênio podem ser grupos importantes para a interação com o resíduo de Thr274 para os três ligantes estudados. Os estudos das relações estrutura-atividade em análogos de epotilonas demonstram que essa rede de ligações de hidrogênio é importante para a atividade dos análogos da epotilona A e do taxol^{35, 37}.

5.2.3 Construção e refinamento dos modelos

A partir da identificação de resíduos de aminoácidos na cavidade da tubulina que são possivelmente importantes para a interação com ligantes, e da sobreposição dos grupos químicos nas moléculas envolvidas nessas interações ligante-receptor, modelos representativos da hipótese formulada foram construídos e refinados com o programa UNITY¹⁶³, variando-se características como a posição tridimensional dos centróides dos requerimentos farmacofóricos selecionados, raios de tolerância para cada uma das características farmacofóricas, distâncias entre os centróides de requerimentos farmacofóricos escolhidos e demais restrições (características obrigatórias e opcionais), num total de 35 diferentes variações do modelo. A seletividade dos modelos obtidos foi avaliada utilizando a busca 3D rígida e flexível dos moduladores utilizados para a proposição dos modelos, o que permitiu a seleção do melhor modelo farmacofórico, mostrado na Figura 5.20.

As seguintes características foram incorporadas: i) duas regiões favoráveis para interação com grupos aniônicos ou aceptores de ligação de hidrogênio, próximas aos grupos guanidina positivamente carregados das cadeias laterais dos resíduos de Arg276 e Arg282 (em vermelho, ambas obrigatórias); ii) uma região favorável para interação com grupos doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio, próxima à cadeia lateral do resíduo de Thr274 (em roxo, opcional); iii) uma região favorável para interação com grupos doadores de ligação de hidrogênio, próxima ao grupo carbonila da cadeia principal do resíduo de Thr274 (em azul, opcional); (iv) duas regiões favoráveis para interação com grupos hidrofóbicos, a primeira para interação no bolsão delimitado pelos resíduos de Asp226 e His227, incluindo a tríade de leucinas Leu215, Leu217 e Leu228, e a segunda próxima ao grupo benzila do resíduo de Phe270 (em amarelo, a primeira obrigatória e a segunda opcional); (V) uma região favorável para interação com grupos doadores de ligação de hidrogênio ou catiônicos, próxima ao grupo carboxilato da cadeia lateral do resíduo de Asp26 (em azul, opcional).

O modelo farmacofórico proposto pode ser utilizado como uma ferramenta para o entendimento das interações intermoleculares nesse sistema de alta complexidade, podendo ser útil na integração com estratégias de triagem virtual e síntese planejada para a identificação e obtenção de novos moduladores da tubulina com atividade antiproliferativa.

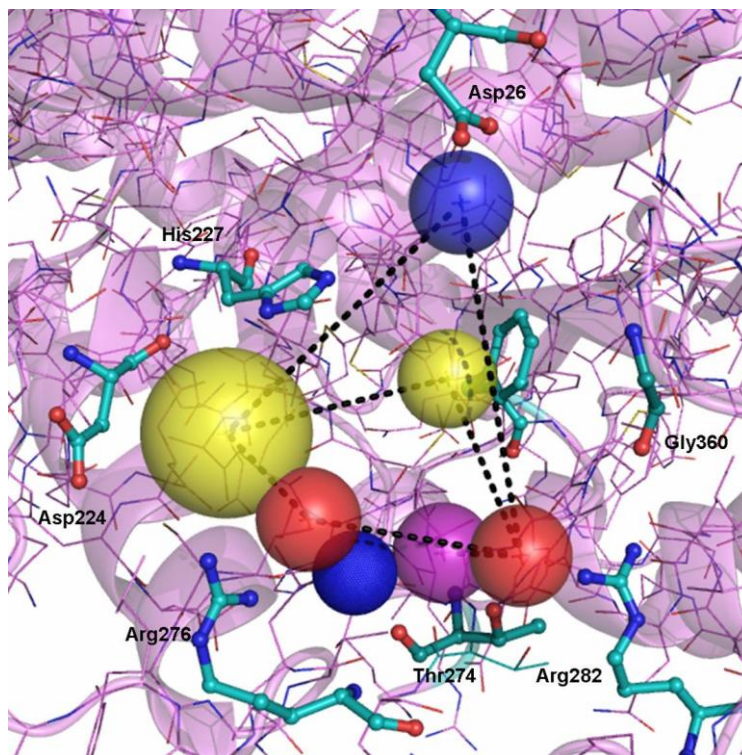


Figura 5.20 - Modelo farmacofórico 3D final proposto (código PBD: 1TVK). Azul, doador de ligação H; vermelho, aceptor de ligação H; roxo, doador ou aceptor de ligação H; amarelo, região hidrofóbica. Raios de tolerância de 2,8 Å, exceto para a região hidrofóbica próxima a Asp224, de 5,8 Å. As distâncias entre os centróides não foram restritas.

5.2.4 Proposição de um modelo farmacofórico simplificado

Os estudos baseados na estrutura dos ligantes e da estrutura da β -tubulina demonstram que a subcavidade hidrofóbica delimitada pelos resíduos de Asp224 e His227 e o subsítio formado pelo assoalho da cavidade de interação (principalmente por Thr274, Arg276 e Arg282) são regiões importantes para a proposição de ligantes de estrutura química mais simples, capazes de se ancorar no sítio e possivelmente modular a atividade da tubulina (Figuras 5.18 e 5.20). A partir dessas informações, um modelo farmacofórico 3D simplificado foi proposto, contendo as características representadas na Figura 5.21: i) duas regiões favoráveis para interação com grupos aniônicos (Arg276 e Arg282, obrigatórias); ii) uma região favorável para interação com grupos doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio (cadeia lateral da Thr274, opcional); iii) uma região favorável para interação com grupos doadores de ligação de hidrogênio (cadeia principal da Thr274, opcional); e (iv) uma região favorável para interação com grupos hidrofóbicos (Leu215, Leu217 e Leu228, obrigatória). Esse modelo simplificado pode ser utilizado para a identificação de ligantes de fragmentos ou ligantes menos complexos com posterior potencial de otimização utilizando o modelo mostrado na Figura 5.21.

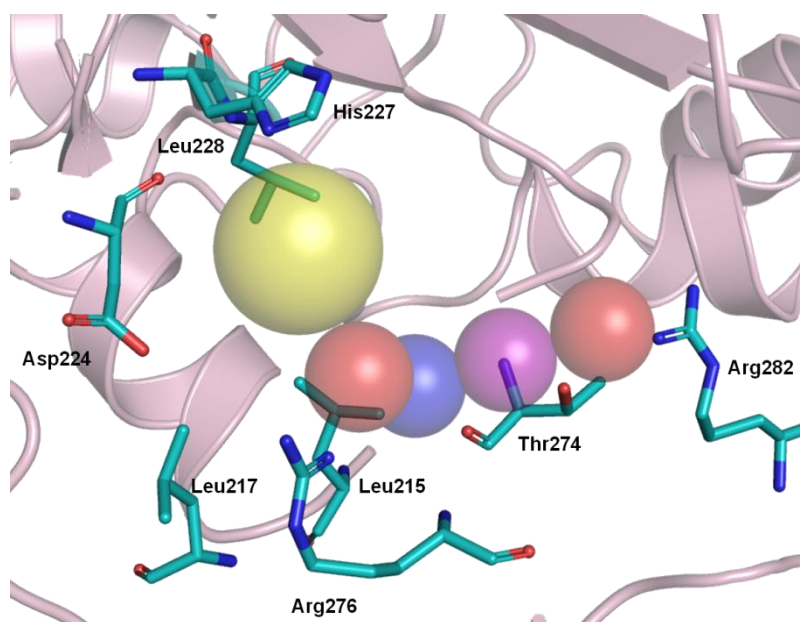


Figura 5.21 - Modelo farmacofórico simplificado 3D (código PBD: 1TVK). Azul, doador de ligação H; vermelho, aceptor de ligação H; roxo, doador ou aceptor; amarelo, região hidrofóbica. Raios de tolerância de 2,8 Å, exceto para a região hidrofóbica próxima a Asp224, de 5,8 Å. As distâncias entre os centróides não foram restritas.

5.3 TRIAGEM VIRTUAL DE PROMOTORES DA POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS

Num procedimento de triagem virtual baseado na estrutura do receptor, em que a docagem molecular é utilizada para a predição das múltiplas interações intermoleculares entre os grupos funcionais das moléculas pequenas e os resíduos de aminoácidos formadores da cavidade do receptor, objetiva-se avaliar o grau de complementaridade, estérica e eletrostática, entre os milhares de compostos presentes nas bases de dados e a cavidade de interação da macromolécula-alvo. A aplicação de restrições fundamentadas nas características das moléculas que conhecidamente interagem com o receptor e nas propriedades da cavidade alvo tem demonstrado melhores resultados nas taxas de sucesso para os compostos mais bem classificados em procedimentos de triagem virtual^{77, 97, 111}.

As estruturas de cristalografia eletrônica da cavidade da β -tubulina em complexo com estabilizadores pertencentes a diferentes classes químicas^p foram obtidas em resoluções relativamente baixas (2,89 Å a 3,70 Å)^{35, 187, 216}. A utilização de filtros hierárquicos, baseados no conhecimento das características dos ligantes e da cavidade, para identificação de novos estabilizadores dos microtúbulos utilizando triagem virtual é, portanto, uma estratégia

^p As estruturas dos polímeros de tubulina estabilizadas por zinco em complexo com taxol, taxotere e epotilona A estão depositadas no PBD sob os códigos 1JFF, 1 TUB e 1TVK, respectivamente^{35, 187, 216}.

plausível nesse sistema. A estratégia para a triagem virtual, executada em colaboração com o Prof. Dr. Rafael Guido, está esquematizada na Figura 5.22.

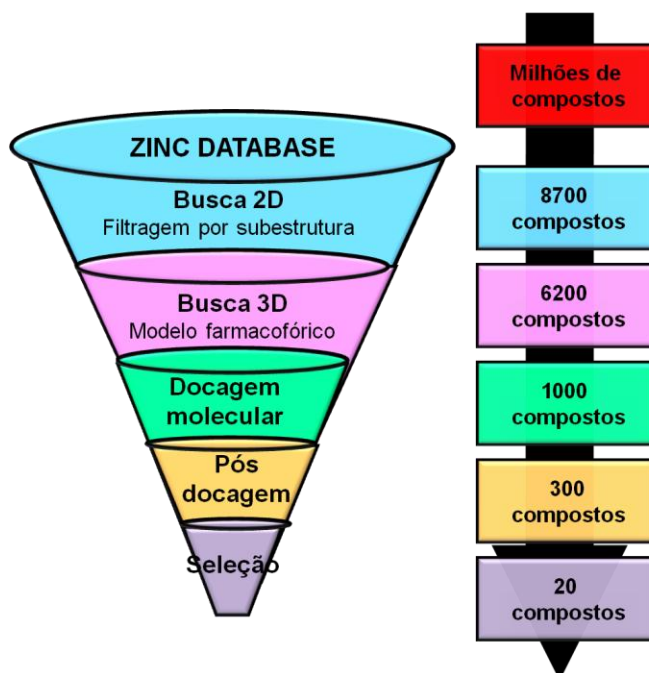


Figura 5.22 - Filtros hierárquicos sucessivos utilizados na estratégia de triagem virtual para a identificação de estabilizadores de microtúbulos.

5.3.1 Filtragem 2D das bases de dados

As análises das características dos ligantes e da cavidade de interação do taxol demonstraram a importância do bolsão hidrofóbico e das redes de ligações de hidrogênio para o ancoramento de ligantes no assoalho do sítio de interação da β -tubulina, que inclui dois resíduos de arginina (Arg276 e Arg282). Localizadas nas porções terminais da subcavidade, as cadeias laterais desses resíduos apresentam o grupo guanidina, que está protonado em pH fisiológico, e portanto, carregado positivamente (Figuras 5.20 e 5.21). Essa característica pode ser explorada para interação com moléculas pequenas que apresentam grupos de cargas opostas, uma vez que as interações eletrostáticas estão entre as mais importantes interações intermoleculares presentes nos complexos de proteínas com ligantes em sistemas biológicos^{217, 218}. Dessa forma, foi utilizada uma coleção dirigida de compostos contendo moléculas que apresentavam grupos químicos carregados frequentemente encontrados em complexos cristalográficos interagindo com grupos guanidina de resíduos de arginina. Esses grupos incluíram os carboxilatos, sulfonatos e os fosfonatos, mostrados na Figura 5.23.

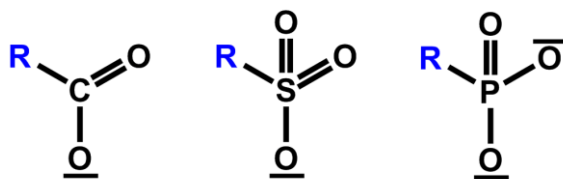


Figura 5.23 - Grupos funcionais negativamente carregados recorrentemente encontrados interagindo com grupos guanidina de resíduos de arginina em complexos ligante-proteína²¹⁸.

O processo de filtragem 2D foi realizado no banco de dados de moléculas comercialmente disponíveis ZINC, versão 11 (disponível em <http://zinc.docking.org/>), através da busca por moléculas contendo, como subestruturas, os grupos carregados negativamente selecionados²¹⁹. As regras de Lipinski também foram utilizadas no processo de filtragem¹²⁵. Após a filtragem de toda a base de dados comercialmente disponível, foram selecionados 8700 moléculas contendo grupos carregados negativamente possivelmente capazes de interagir com os resíduos de arginina da cavidade do taxol.

5.3.2 Aplicação do filtro 3D no processo de triagem virtual

O modelo farmacofórico simplificado (Figura 5.21) foi utilizado como um filtro hierárquico 3D (Figura 5.22), previamente à etapa de docagem molecular, para selecionar os compostos possivelmente capazes de estabelecer as interações intermoleculares essenciais com o receptor, de acordo com as restrições impostas pelo modelo, e ao mesmo tempo para descartar aqueles compostos que não podiam se ajustar a esses requerimentos. Os 8700 compostos negativamente carregados foram submetidos a buscas flexíveis 3D no programa UNITY e aproximadamente 6200 compostos foram então selecionados para os estudos de docagem molecular. Os mil compostos mais bem classificados foram avaliados pelo programa Surfex (SYBYL 8.0) e os 300 compostos mais bem classificados por consenso foram selecionados para inspeção visual.

5.3.3 Seleção dos compostos para aquisição e avaliação biológica

Após a inspeção visual dos compostos mais bem classificados utilizando combinações de diferentes funções de pontuação, aproximadamente 20 compostos foram selecionados para aquisição e avaliação biológica. Os posicionamentos de 3 compostos representativos selecionados estão mostrados na Figura 5.24.

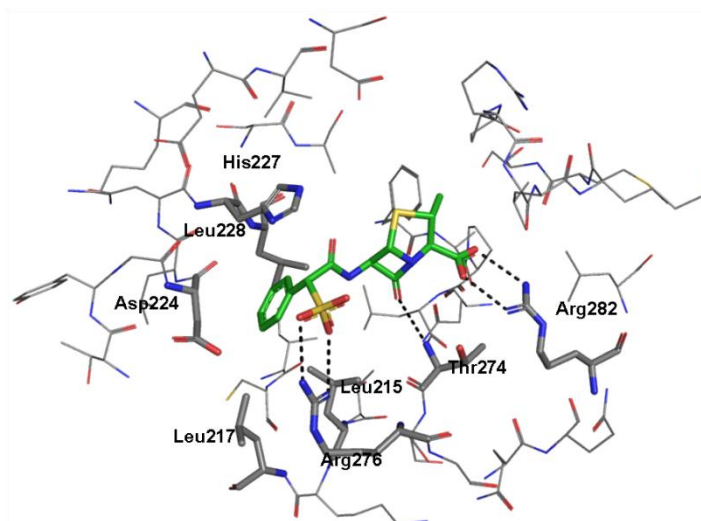
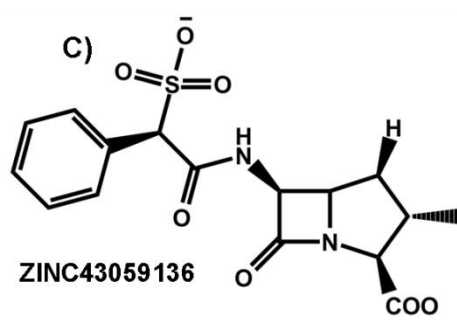
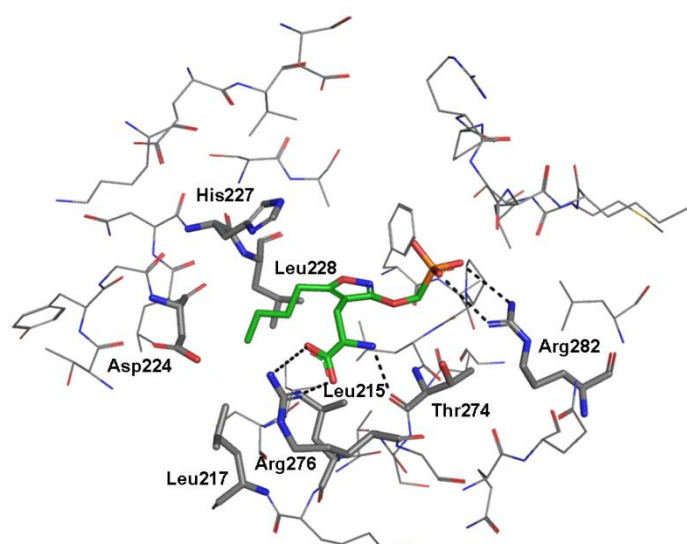
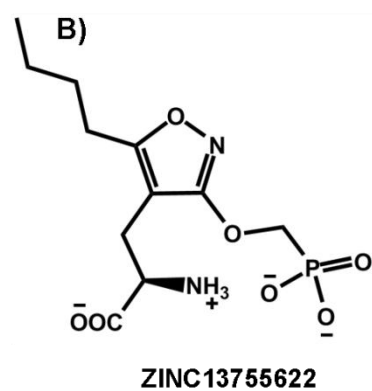
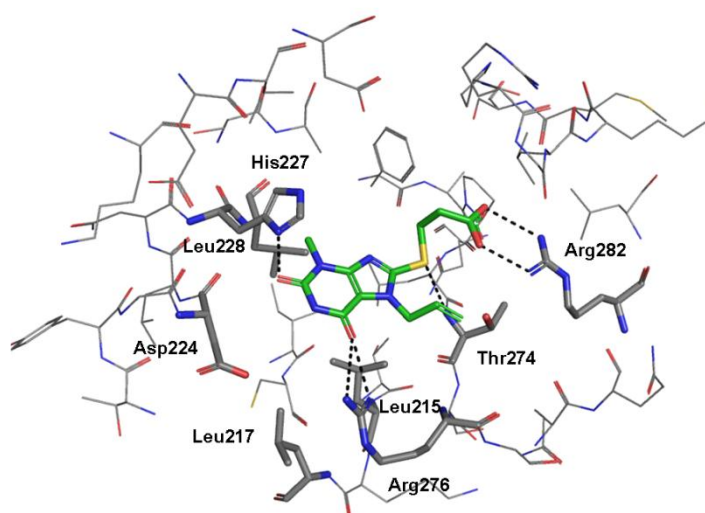
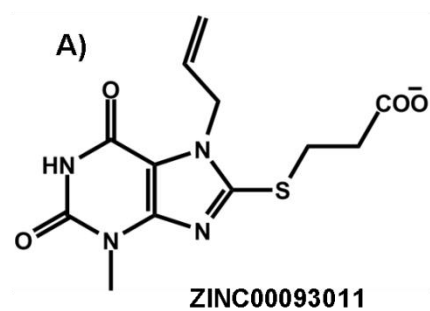


Figura 5.24 - Posicionamentos de três compostos representativos (verde), selecionados dentre os mais bem pontuados nos procedimentos de docagem molecular. Interações polares são mostradas em linhas tracejadas. Resíduos importantes para interações são mostrados em bastão. Código PDB: 1TVK. Átomos de hidrogênio não são mostrados para maior clareza.

Os resultados da avaliação biológica dos compostos selecionados poderão ser importantes não só para a identificação de novos estabilizadores de microtúbulos com estrutura química simplificada, mas também para a validação dos modelos de interação desenvolvidos durante esse trabalho. De acordo com as predições de alvos moleculares possíveis, baseadas na similaridade dos ligantes²²⁰, no site da ZINC (<http://zinc.docking.org>), o segundo composto mostrado (Figura 5.24 B), um aminoácido, é possivelmente um ligante dos receptores metabotrópicos de glutamato. De fato, altas concentrações de glutamato, ou análogos de glutamato, como o cainato, induzem polimerização de tubulina²²¹⁻²²³. O terceiro composto (Figura 5.24 C), além de possuir o esqueleto básico β -lactâmico típico dos inibidores de β -lactamases, pode ser ainda um inibidor da proteína inibidora de apoptose 3, também relacionada ao câncer. Para o primeiro composto selecionado, um análogo de purina, nenhum alvo molecular foi predito (Figura 5.24 A).

5.4 ENSAIOS DE POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA

5.4.1 Estabelecimento das condições padrão de reação

Alguns compostos selecionados a partir das estratégias de simplificação molecular descritas nessa tese foram avaliados experimentalmente para determinação do efeito na polimerização da tubulina purificada *in vitro*. As melhores condições de reação encontradas estão resumidas na Tabela 5.7. Nas condições selecionadas, a curva de polimerização da tubulina apresentou as 3 fases características da formação dos microtúbulos, denominadas nucleação (fase I), crescimento (fase II) e equilíbrio (fase III) mostradas na Figura 5.25 A (Figura 4.2)^{179, 224, 225}. Um máximo de emissão foi atingido em aproximadamente 40 min do início da reação (2400 s), a partir do qual a fase estacionária foi atingida na ausência de ligantes. Quando há depleção de GTP, que é convertido em GDP durante o processo de formação do polímero, há o deslocamento do equilíbrio da dinâmica de polimerização-despolimerização, favorecendo a despolimerização, com redução nos valores das unidades de fluorescência (Figuras 1.5 e 4.2)^{26, 172, 180, 224}.

Os compostos que interagem com a tubulina alteram uma ou mais dessas fases típicas de polimerização e por isso a importância de sua caracterização²²⁶⁻²²⁸. Na Figura 5.25 B estão demonstrados, como exemplo, os efeitos da adição de taxol (concentração final 4 μ M) ou de colchicina (concentração final 5 μ M) à mistura reacional padrão. Como se pode notar, o taxol reduz significativamente a duração da fase de nucleação e aumenta a

velocidade máxima da fase de crescimento e a quantidade final de polímero formado, enquanto a colchicina provoca redução da quantidade de polímero formado²²⁶⁻²²⁸.

Tabela 5.7 - Condições de reação selecionadas para os ensaios de polimerização de tubulina purificada *in vitro*.

Parâmetro	Condição selecionada
Concentração de tubulina e tampão	18 μM (2 mg/mL) em 80 mM de tampão PIPES; 2 mM de MgCl_2 ; 0,5 mM EGTA e 1 mM GTP
Concentração de glicerol	15%, podendo ser alterada
Leitura/temperatura	Acompanhada durante 1 h a 37° C (temperatura rigorosamente controlada). As leituras são feitas aproximadamente a cada 30 s para a construção da curva. Para as determinações da porcentagem de polimerização, os valores após 20 min do início da polimerização são utilizados.
Tipo/frequência de agitação	Antes de iniciar as leituras, agitação orbital dupla rápida por 1 min. Entre as medidas, agitação linear lenta por 1 s.

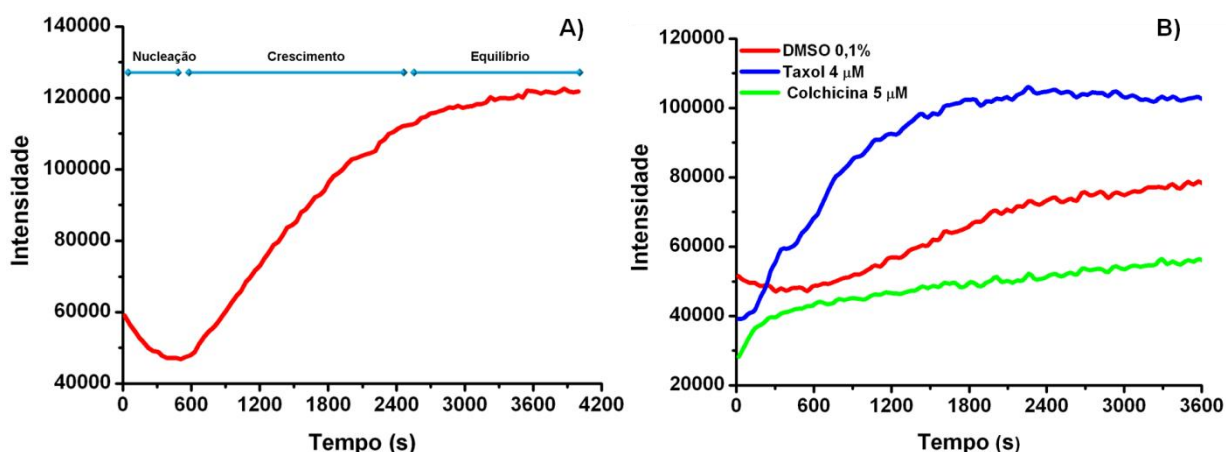


Figura 5.25 - **A)** Comportamento típico da curva de polimerização da tubulina purificada nas condições padrão^{179, 224, 225, 227}. **B)** Efeitos dos padrões de promoção (Taxol, concentração final 4 μM) e inibição (colchicina, concentração final 5 μM) da polimerização da tubulina nas curvas padrão²²⁶⁻²²⁸.

As condições de reação podem ser modificadas para se adequar a requerimentos particulares, por exemplo, para realçar as alterações provocadas por inibidores ou promotores da polimerização de tubulina. Concentrações menores de glicerol podem ser úteis para a detecção de promotores da polimerização enquanto concentrações maiores (20%) são úteis na detecção de inibidores. Na Figura 5.26, estão apresentadas as variações nas curvas utilizando diferentes concentrações de glicerol. Como se pode notar, para a detecção específica de promotores da estabilização dos microtúbulos, concentrações menores de glicerol podem ser utilizadas (5.26 A), enquanto para detecção de inibidores,

concentrações de até 20% podem ser empregadas (5.26 B). Para a triagem inicial dos compostos, entretanto, a concentração padrão de glicerol (15%) foi utilizada, podendo ser alterada nas etapas posteriores. Entretanto, deve-se notar que pequenas alterações nas concentrações do glicerol podem alterar significativamente as curvas de polimerização, razão pelas quais quantidades exatamente medidas devem ser utilizadas para a reação^{221, 229}.

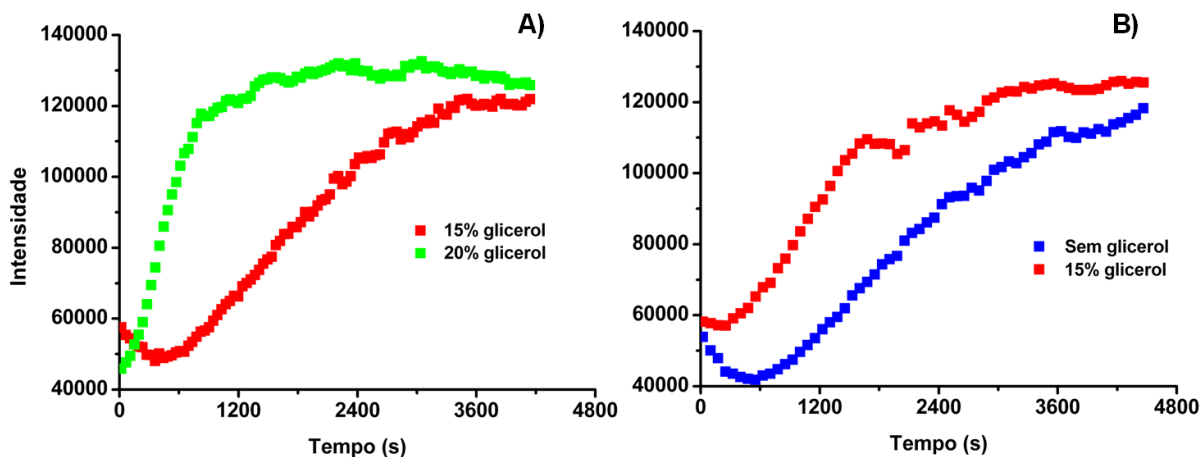


Figura 5.26 - Efeitos provocados por diferentes concentrações de glicerol no comportamento da curva de polimerização da tubulina. A concentração de 15% é a concentração padrão. **A)** Na ausência de glicerol, a polimerização é mais suave e **B)** Na presença de glicerol, o processo de polimerização é aumentado.

5.4.2 Determinação da potência de promoção da polimerização (EC_{50}) do taxol

As avaliações iniciais das intensidades de promoção da polimerização concentração-dependente provocadas pelo taxol foram realizadas, nas condições padrão, para as concentrações de 0,25, 1, 4 e 20 μM de taxol (DMSO 0,2%), uma vez que os dados da literatura apontavam para um valor de EC_{50} próximo a 1 μM ^{169-171, 173}. Não houve diferenças significativas no processo de polimerização nas concentrações de 4 ou 20 μM de taxol, podendo-se, portanto, aproximar que 4 μM de taxol provocam polimerização máxima. Curvas representativas, correspondendo à média das medidas em duplicata, estão mostradas na Figura 5.27 A. As leituras dos valores de emissão, realizadas após 20 min do início da polimerização, durante a fase de crescimento do polímero, demonstram que o valor de EC_{50} para o taxol está próximo de 1 μM .

As medidas dos valores de porcentagem da polimerização máxima nas diferentes concentrações de taxol avaliadas resultaram na construção de gráficos como o apresentado na Figura 5.27 B. Utilizando regressão não-linear de melhor ajuste para essa curva, obteve-se um valor de 0,98 μM para EC_{50} do taxol.

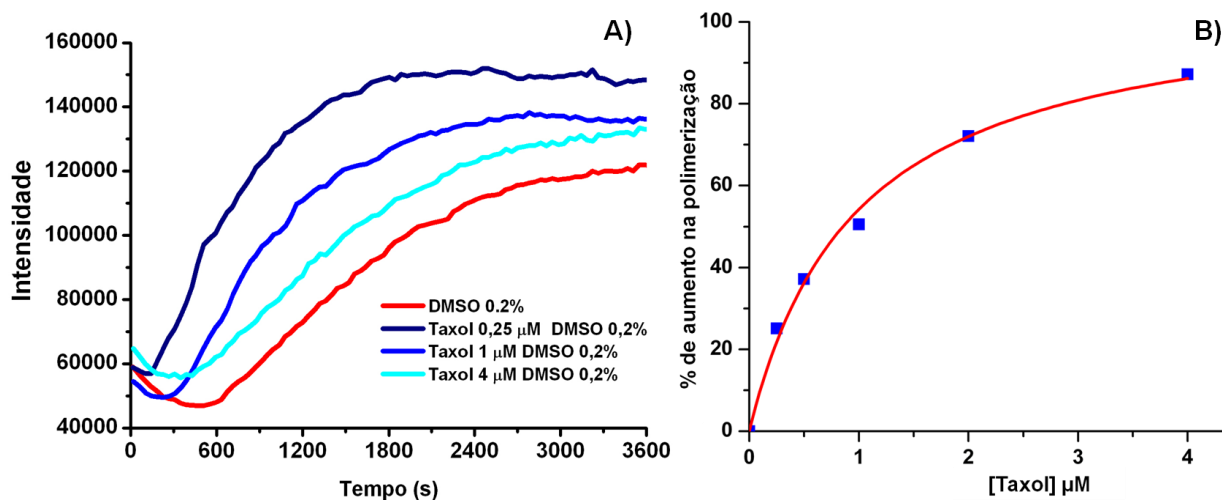


Figura 5.27 - **A)** Efeitos na polimerização da tubulina causados pela adição de concentrações crescentes de Taxol. **B)** Determinação da potência do taxol.

5.4.3 Determinação da potência de inibição da polimerização (IC_{50}) da colchicina

As avaliações iniciais das intensidades de inibição da polimerização dose-dependente provocadas pela colchicina foram realizadas, nas condições padrão, para as concentrações de 1, 2, 10 e 20 μM de colchicina (DMSO 1%), uma vez que os dados da literatura apontavam para um valor de IC_{50} próximo a 5 μM ^{169, 174-176}. Não houve diferenças significativas na inibição da polimerização provocada por 10 ou 20 μM de colchicina. A partir dos dados obtidos, com as leituras em duplicata realizadas após 20 min do início da polimerização, pode-se inferir que a potência da colchicina está em torno de 0,61 μM , como exemplificado pela curva da Figura 5.28.

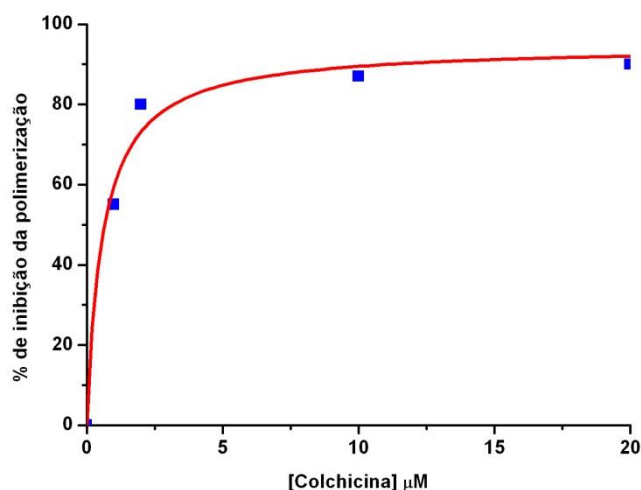


Figura 5.28 - Determinação da potência da colchicina.

5.4.4 O efeito aparente do co-solvente orgânico na polimerização da tubulina

Primeiramente, foi estudado o efeito provocado pelo co-solvente orgânico (DMSO) nas curvas de polimerização na ausência de ligantes^{169-173, 175}. Como mostrado na Figura 5.29, concentrações acima de 5% (v/v) de DMSO provocam um aumento bastante abrupto na leitura da intensidade de fluorescência. Mesmo para concentrações de 1% do co-solvente orgânico já são verificados efeitos de aumento da intensidade de emissão. Esse efeito provocado pelo co-solvente, se não for considerado nas avaliações biológicas, pode resultar em falso-positivos, como exemplificado na Figura 5.30. Dessa forma, as concentrações do co-solvente devem ser cuidadosamente consideradas nos ensaios biológicos.

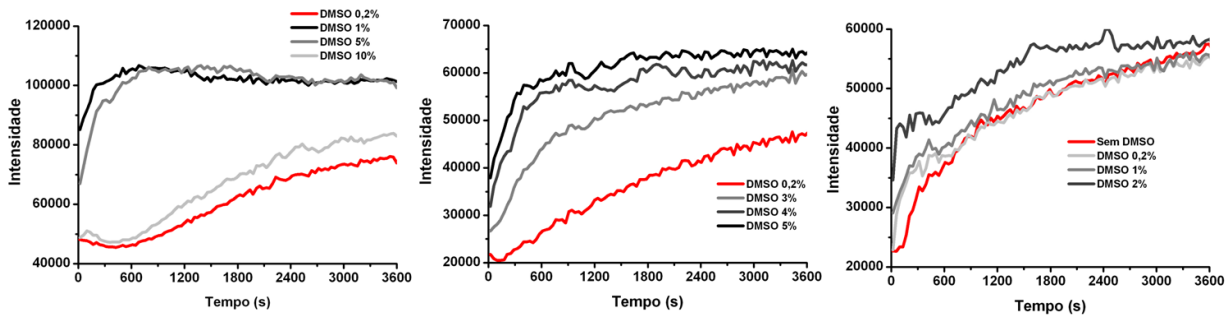


Figura 5.29 - Efeitos das concentrações DMSO (v/v) nas curvas de polimerização da tubulina. Concentrações tão pequenas quanto 1% v/v do co-solvente provocam alterações na curva padrão de polimerização.

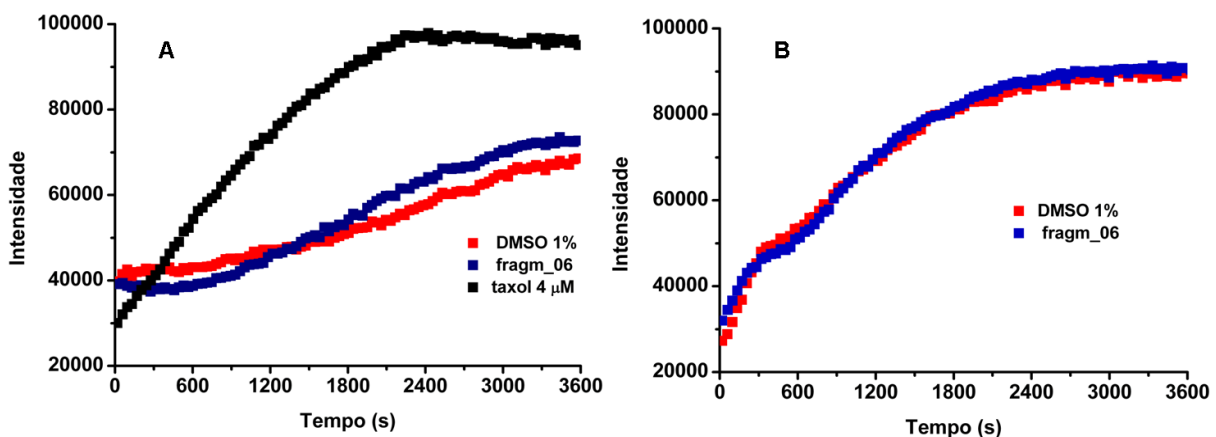


Figura 5.30 - **A)** Concentrações de DMSO tão baixas como 1% (v/v) podem resultar em falso-positivos nas avaliações biológicas se não consideradas no controle negativo, como demonstrado para o fragmento 6. **B)** Quando DMSO 1% é utilizado como branco, percebe-se que o aumento aparente na polimerização em A foi na realidade provocado pelo co-solvente.

Uma vez que a maioria dos compostos que interage com a tubulina é pouco solúvel em água, resultando que concentrações de solvente orgânico de pelo menos 1% (v/v) são requeridas para os testes, os valores de potência biológica para o taxol e a colchicina foram determinados em diferentes concentrações de DMSO para verificar o efeito aparente do co-solvente nas medidas. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.8.

Tabela 5.8 - Potências biológicas aparentes dos controles taxol e colchicina em diferentes concentrações de DMSO como co-solvente orgânico.

% de DMSO (v/v)	Colchicina (IC ₅₀)	Taxol (EC ₅₀)
0,2 %	-	0,9 µM
1 %	0,6 µM	1,1 µM
2,5 %	7,8 µM	0,5 µM
4 %	29,7 µM	-

Para concentrações crescentes de DMSO, houve um aumento considerável no valor do IC₅₀ para a colchicina. Entretanto, alterações significativas no valor de EC₅₀ para o taxol não foram observadas. A partir desses resultados, a concentração final de DMSO 1% (v/v) foi selecionada para os ensaios de avaliação biológica dos compostos selecionados.

5.5 SIMPLIFICAÇÃO MOLECULAR

5.5.1 Triagem biológica de fragmentos

Taxol, taxotere, epotilona A, discodermolídeo, dictioestatina, eleuterobina e cicloestrepina possuem estruturas químicas bastante complexas, contendo vários centros estereogênicos (Figuras 1.3, 1.6 e 1.7). A complexidade sintética e as pequenas quantidades obtidas por meio do isolamento desses compostos a partir de suas fontes naturais são fatores essenciais que impulsionam a procura por moléculas mais simples, capazes de modular a dinâmica dos microtúbulos. Em trabalhos anteriores, demonstrou-se a atividade inibitória da migração celular, em ensaios de *wound healing*, de compostos menores, intermediários da síntese de moléculas mais complexas, sintetizadas no Laboratório de Química Orgânica Sintética, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Carlos Dias, na UNICAMP^{230, 231}. Por essa razão, intermediários da síntese da dictioestatina, sintetizados no mesmo laboratório, foram avaliados em relação ao seu efeito na polimerização da tubulina purificada *in vitro*. Esses fragmentos foram sintetizados utilizando rotas sintéticas alternativas, que não tinham sido descritas na literatura para a síntese da dictioestatina, e,

portanto, poderiam ser capazes de gerar intermediários de reação inéditos, que poderiam ser empregados em estudos de SAR²³².

As condições padrão de reação foram utilizadas para a avaliação bioquímica dos sete intermediários e fragmentos apresentados na Figura 5.31. Esses compostos foram avaliados em concentração única de 50 μM , concentrações aproximadamente 50-100 vezes maiores que os valores determinados de potência para o taxol e a colchicina. As medidas foram feitas em duplicata em dois experimentos independentes.

Nenhum dos fragmentos avaliados em concentração única de 50 μM provocou alterações na curva de polimerização da tubulina. Alguns trabalhos apontam, entretanto, que a triagem biológica inicial para a identificação de agentes antitubulina, especialmente para ligantes que interagem na cavidade de ligação do taxol, deveria ser realizada em concentrações mais altas dos ligantes, o que poderia ser ainda mais razoável no caso de fragmentos, que são em geral menos potentes e podem ser estruturalmente modificados. Por essa razão, dependendo de sua solubilidade, os compostos poderiam ser novamente avaliados em concentrações próximas a 1 mM. Concentrações na faixa do baixo molar já foram descritas em procedimentos de triagem na literatura²²¹.

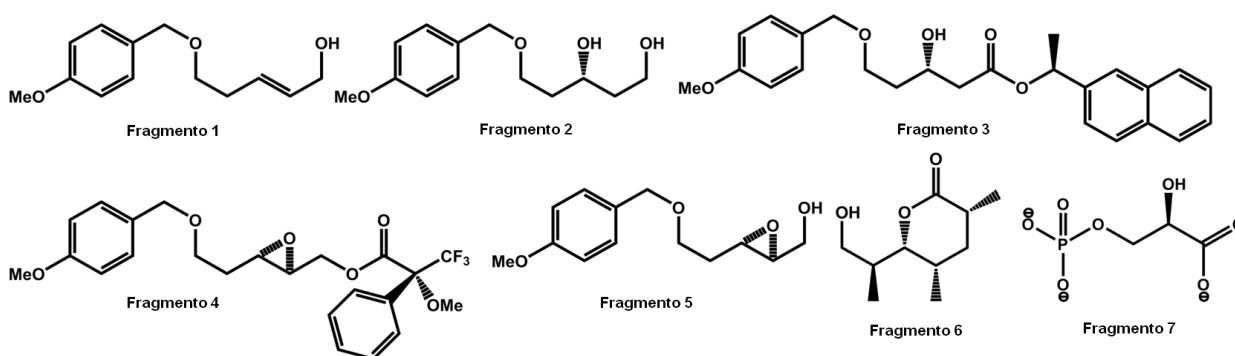


Figura 5.31 - Intermediários sintéticos avaliados pelo ensaio de polimerização da tubulina em concentração única de 50 μM .

5.5.2 Análogos simplificados do taxol e estabilizadores de microtúbulos

O taxol é um diterpeno^q que apresenta estrutura química complexa e atividade citotóxica em uma variedade de linhagens de células de câncer. Outros produtos naturais estabilizadores de microtúbulos com estruturas químicas complexas e diversas foram identificados (Figuras 1.6 e 1.7) O mecanismo de ação comum desses compostos sugere a existência de uma cavidade de interação compartilhada^{53, 57, 233}.

^q Os diterpenos contêm um esqueleto central formado por 20 átomos de carbono e são encontrados em muitas famílias de plantas e alguns animais. Esses compostos possuem diversas propriedades biológicas, incluindo a atividade citotóxica do taxol e a eleuterobina²³³.

Os clerodanos constituem uma das classes estruturais dos diterpenos que contêm quatro estereocentros contíguos num anel *cis*- ou *trans*-decalina (Figura 5.32)^{233, 234}. As casearinas, casearrupestrinas, caseanigrescenas e caseobliquinas são diterpenos clerodanos tricíclicos oxigenados isoladas dos extratos de espécies de *Casearia* que têm demonstrado atividade antiproliferativa em várias linhagens celulares. Dentre elas, a casearina X (Figura 5.33), recentemente isolada, demonstra relevante atividade citotóxica em linhagens celulares de leucemia, melanoma e glioblastoma, além de capacidade de induzir apoptose, efeito também provocado por agentes antimitóticos, como taxol e eleuterobina²³⁵⁻²³⁹. As relações entre a estrutura química e atividade biológica das casearinas têm sido desvendadas ao longo dos últimos anos. Os substituintes acila na posição 6 são importantes para a atividade citotóxica, assim também como a presença do anel tetraidrofurano formado por C₁₈ e C₁₉ (Figura 5.32)^{235, 236}. Compostos relacionados, como as bucidarinas, isoladas de *Bucida buceras*, possuem atividade citotóxica que se mantém mesmo em linhagens de células de câncer resistentes ao taxol, sugerindo que o mecanismo de ação responsável pela atividade antiproliferativa desses produtos naturais não deve estar associado com a estabilização de microtúbulos²⁴⁰. Entretanto, as conformações de baixa energia para as estruturas das caseobliquinas, obtidas com o campo de forças Tripos, indicam que é possível que esses diterpenos clerodanos adotem uma conformação parecida com a conformação do tipo borboleta do taxol na sua cavidade de interação na β -tubulina. A presença do sistema de anéis fundidos não-aromáticos nas caseobliquinas (sistema decalina) é outro indicativo de que possam provocar seus efeitos antimitóticos a partir da interação com o sítio do taxol, pois, além dos taxanos, o GS-164, um estabilizador de microtúbulos sintético de baixa potência, possui um sistema de anéis fundidos tetraidro-oxazolo-oxazol possivelmente relacionado aos requerimentos mínimos de ligação a essa cavidade²⁴¹. Por essa razão, o efeito de três caseobliquinas na polimerização da tubulina foi investigado (Figura 3.33, uma delas é, na realidade, uma mistura de dois isômeros). Os compostos foram isolados pelo grupo da Profa. Dra. Vanderlan Bolzani²³⁹.

Os compostos foram inicialmente ensaiados em concentração única de 50 μ M e seus efeitos foram comparados àqueles provocados por Taxol em concentrações de 20 μ M (polimerização máxima) e 10 μ M (DMSO 1%). Os resultados indicaram que as caseobliquinas foram capazes de promover a polimerização da tubulina nas concentrações ensaiadas (Figura 5.34). Aparentemente, esses produtos naturais apresentam baixa potência. Com a finalidade de melhor entender as relações entre a estrutura química e a potência de promoção da polimerização dos microtúbulos, outras caseobliquinas estão sendo avaliadas e os valores de EC₅₀ estão sendo determinados pelos doutorandos Ricardo Nascimento e Marília Valli.

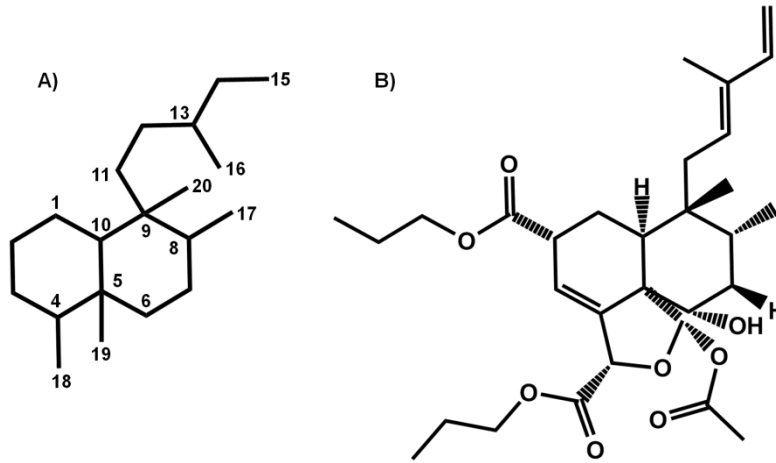


Figura 5.32 - A) Estrutura geral do esqueleto carbônico dos clerodanos. B) Estrutura química da casearina X^{234, 236}.

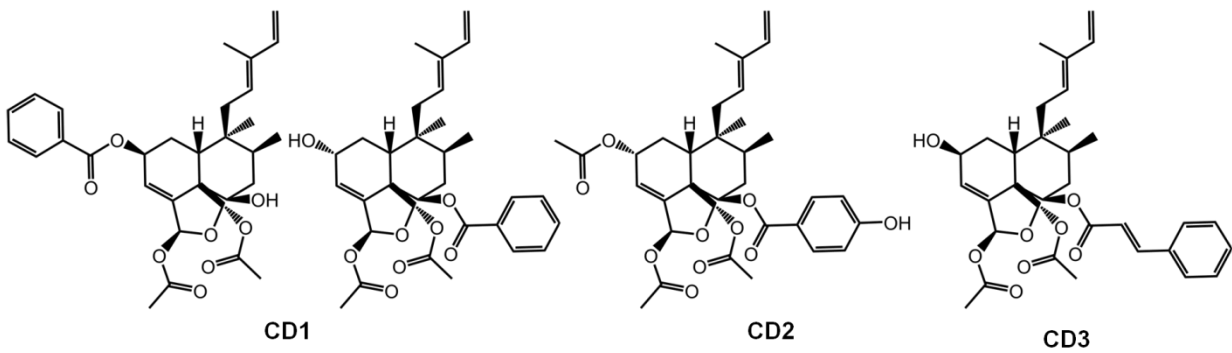


Figura 5.33 - Estruturas das caseobliquinas ensaiadas²³⁹.

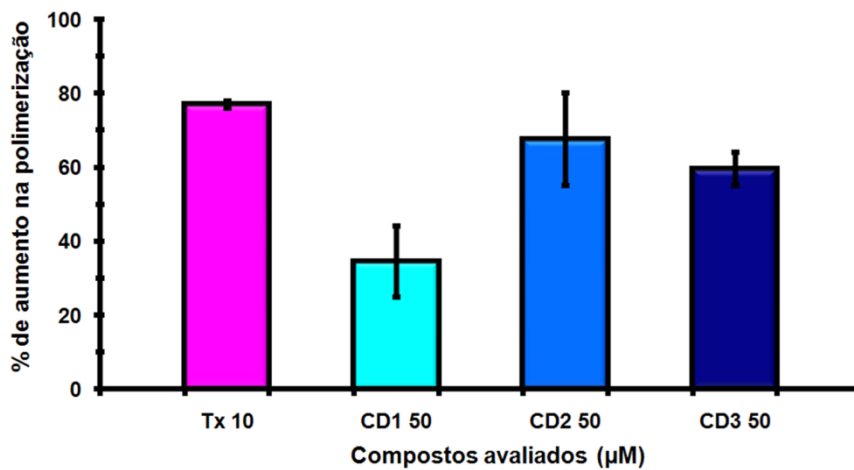


Figura 5.34 - Efeito na polimerização da tubulina purificada *in vitro* provocado pelos clerodanos diterpenos avaliados.

*Capítulo 6**Planejamento de Inibidores da
Polimerização da Tubulina*

*"O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem."
Guimarães Rosa (Grande Sertão : Veredas)*

A colchicina inibe a polimerização dos microtúbulos como consequência de sua interação na interface dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina. A podofilotoxina, um análogo de colchicina, possui mecanismo de ação semelhante (Figura 6.1). Entretanto, a utilização clínica desses produtos naturais é limitado em razão de sua elevada toxicidade sistêmica^{22, 66, 189, 242-244}. A combretastatina A4 (Figura 6.1) é um inibidor da polimerização dos microtúbulos que também interage no sítio da colchicina. Além de ser um potente inibidor da proliferação celular, a combretastatina A-4 ainda apresenta atividade antiangiogênica em baixas concentrações e seu pró-fármaco de fosfato encontra-se atualmente em fase clínica de desenvolvimento em humanos para o tratamento do câncer da tireóide. Em conjunto com todas essas razões, o fato de combretastatina A-4 não ser reconhecida pela glicoproteína-P, relacionada à multi-resistência de linhagens celulares aos fármacos disponíveis, e ter estrutura química significativamente mais simples que vários agentes antitubulina conhecidos, tem reforçado a importância do planejamento de ligantes do sítio da colchicina nos últimos anos^{54, 69, 70, 243, 245, 246}.

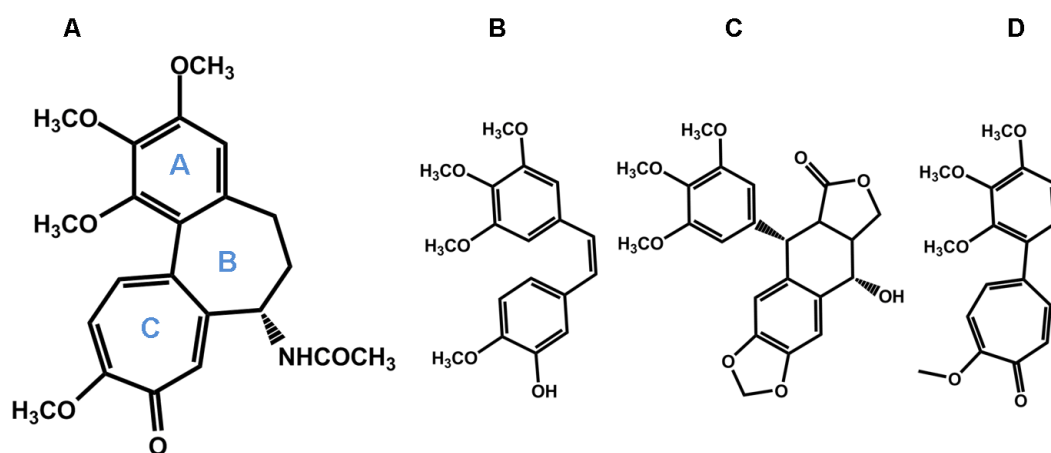


Figura 6.1 - Ligantes do sítio da colchicina. **A)** colchicina, **B)** combretastatina A-4, **C)** podofilotoxina e **D)** colcemida^{66, 247}.

A estrutura tridimensional do sítio de interação da colchicina e o mecanismo pelo qual a polimerização é bloqueada ao interagir com pequenos moduladores têm sido desvendados ao longo dos últimos anos. Os complexos de tubulina ligados à colchicina[†] e podofilotoxina, obtidos por cristalografias de raios-X (códigos PDB 1SA0 e 1SA1, respectivamente), sugerem que esses inibidores da polimerização interagem numa região da proteína em que previnem a reversão da conformação curvada do heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina para uma conformação reta, necessária para a formação dos protofilamentos, contendo várias unidades heterodiméricas (Figura 6.2). Os inibidores como a colchicina e a podofilotoxina, portanto, estabilizam as conformações curvadas dos heterodímeros,

[†] A estrutura 1SA0 foi obtida em complexo com um análogo da colchicina, 2-mercapto-colchicina.

provocando uma redução dos contatos laterais entre diferentes heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina (Figura 6.3). A conseqüente despolimerização e instabilidade dinâmica do sistema tubulina/microtúbulos na presença de inibidores seria dessa maneira explicada²⁴⁸⁻²⁵⁰.

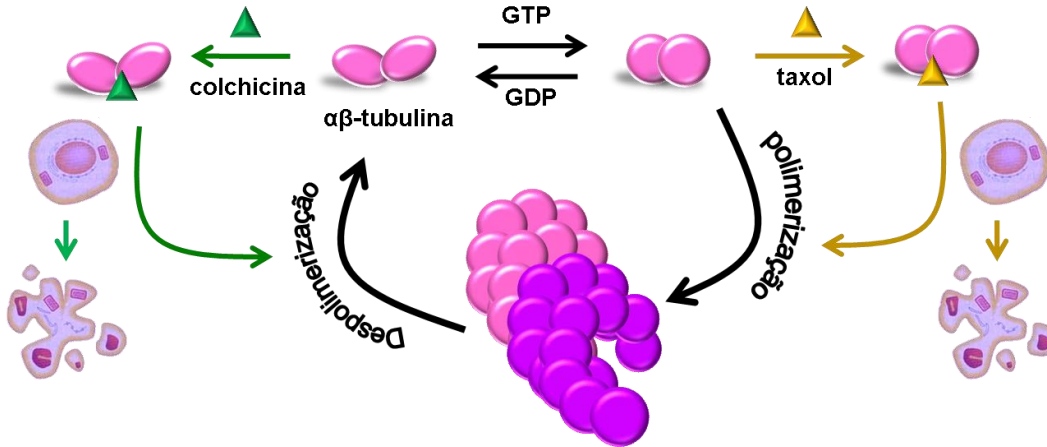


Figura 6.2 - Representação esquemática dos efeitos provocados pelo taxol (estabilizador de microtúbulos) e colchicina (inibidor da polimerização, que previne a alteração para conformação alinhada dos heterodímeros, adequada para formação do polímero) no sistema tubulina-microtúbulos. Alterações no equilíbrio celular da polimerização-despolimerização desencadeiam mecanismos que culminam em apoptose.

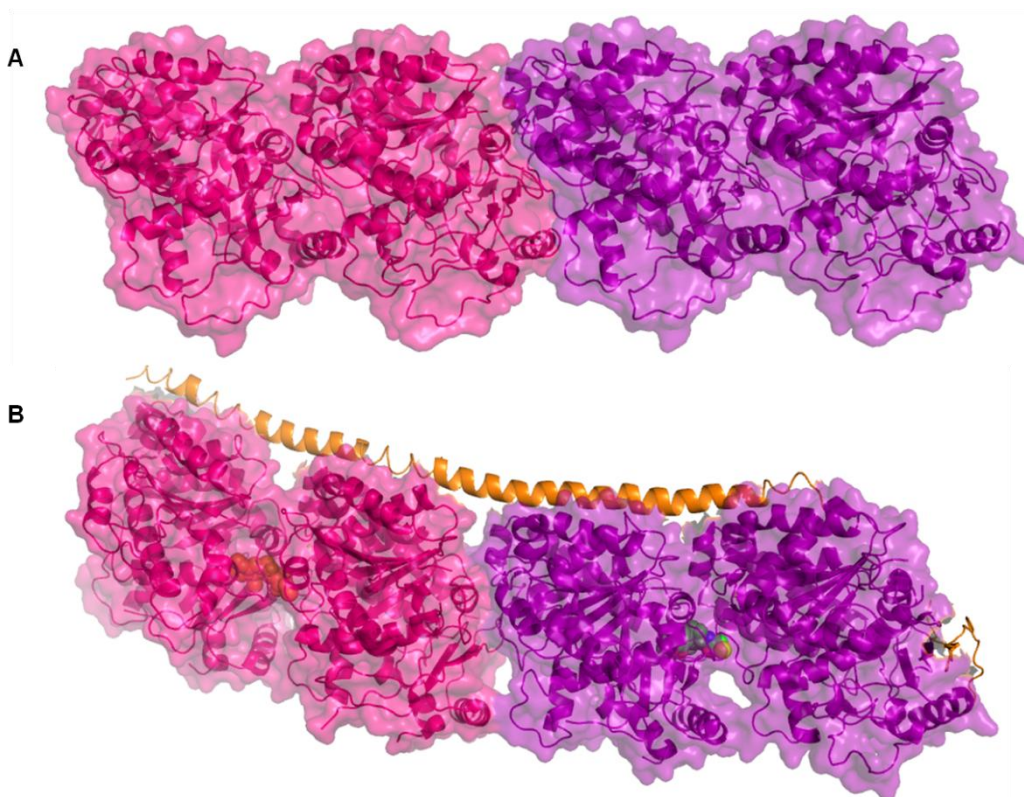


Figura 6.3 - Comparação da estrutura do dímero de tubulina **A**) estabilizado por zinco em complexo com taxol, obtido por cristalografia eletrônica do polímero (código PDB 1JFF) e **B**) e ligado à colchicina (verde) na interface entre os monômeros α e β , obtido por cristalografia de raio X (código PDB 1SA0). Na presença de colchicina, os dímeros se curvam, dificultando a formação do polímero.

Os mecanismos através dos quais a colchicina inibe a polimerização dos microtúbulos vêm sendo extensivamente investigados desde a década de 70. Os estudos indicam que a colchicina se comporta como um ligante bifuncional, no qual o anel tropolona (anel C) se associa primeiramente com a tubulina, numa etapa rápida, seguida por uma etapa lenta de mudança conformacional, desencadeada pelo primeiro evento de ligação, que permite a formação de um subsítio para a interação do anel trimetoxifenila (anel A, Figura 6.1). O complexo colchicina-tubulina que se forma tem alta afinidade, mas se forma lentamente, e sua associação é quase irreversível. Entretanto, alguns compostos com modificações estruturais no anel ciclo-heptila (anel B), como a colcemida (Figura 6.1), podem se ligar mais rapidamente e de maneira reversível à tubulina. A podofilotoxina e a combretastatina A-4 compartilham o mesmo anel trimetoxifenila presente na colchicina e, portanto, é de se esperar que esses grupos compartilhem o mesmo subsítio de interação na estrutura da tubulina, como mostrado na Figura 6.4^{226, 247-253}.

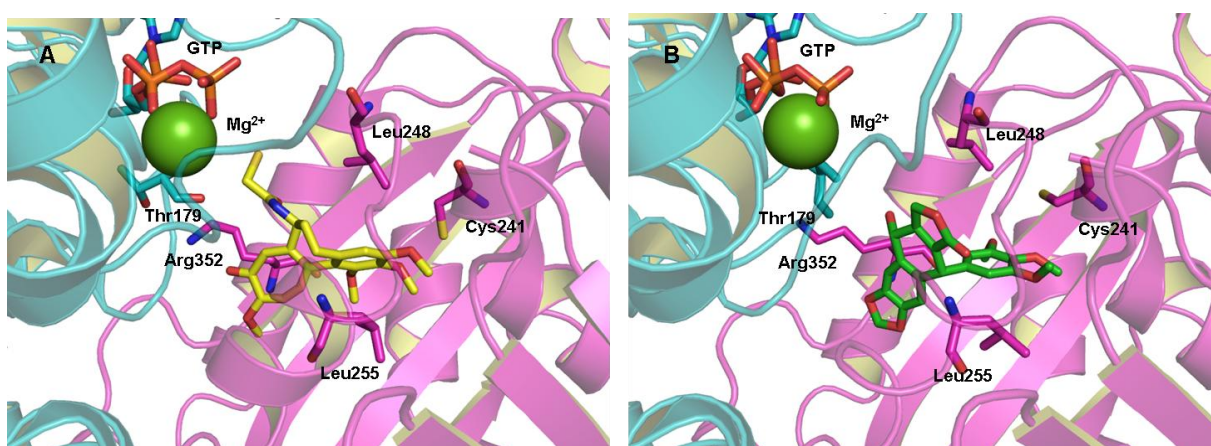


Figura 6.4 - **A)** 2-mercapto-colchicina (amarelo, código PDB: 1SA0) e **B)** podofilotoxina (verde, código PDB: 1SA1) interagem na mesma região de interface dos heterodímeros de tubulina (α -tubulina em azul e β -tubulina em rosa) e seus grupos trimetoxifenila comuns compartilham o mesmo subsítio de interação^{248, 249}. Resíduos importantes, ligantes e GTP estão mostrados em bastão. O íon magnésio, cofator, está mostrado em esfera. Átomos de hidrogênio não foram mostrados.

Além dos requerimentos estruturais para a ligação de análogos e de fragmentos da colchicina, um conjunto extenso de compostos que se ligam ao sítio da colchicina tem sido também estudado^{66, 75, 76, 243, 248, 249, 254}. Utilizando uma combinação de estratégias baseadas na estrutura de vários desses ligantes e na estrutura do receptor, alguns estudos se propuseram a determinar critérios estruturais para o planejamento de ligantes ideais do sítio da colchicina^{66, 255}. Embora uma combinação de características farmacofóricas tenha sido identificada (incluindo doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, centros hidrofóbicos e grupos planares), a identificação de compostos estruturalmente diversos que possuem, inclusive, seu modo de ligação à tubulina conhecido através de estruturas cristalográficas,

demonstra que o estabelecimento dos padrões de reconhecimento molecular para os ligantes do sítio da colchicina é um objetivo bastante complexo²⁴⁹. Esses ligantes interagem na mesma interface, mas exibem posicionamentos bastante distintos, como mostrado nas Figuras 6.5 e 6.6.

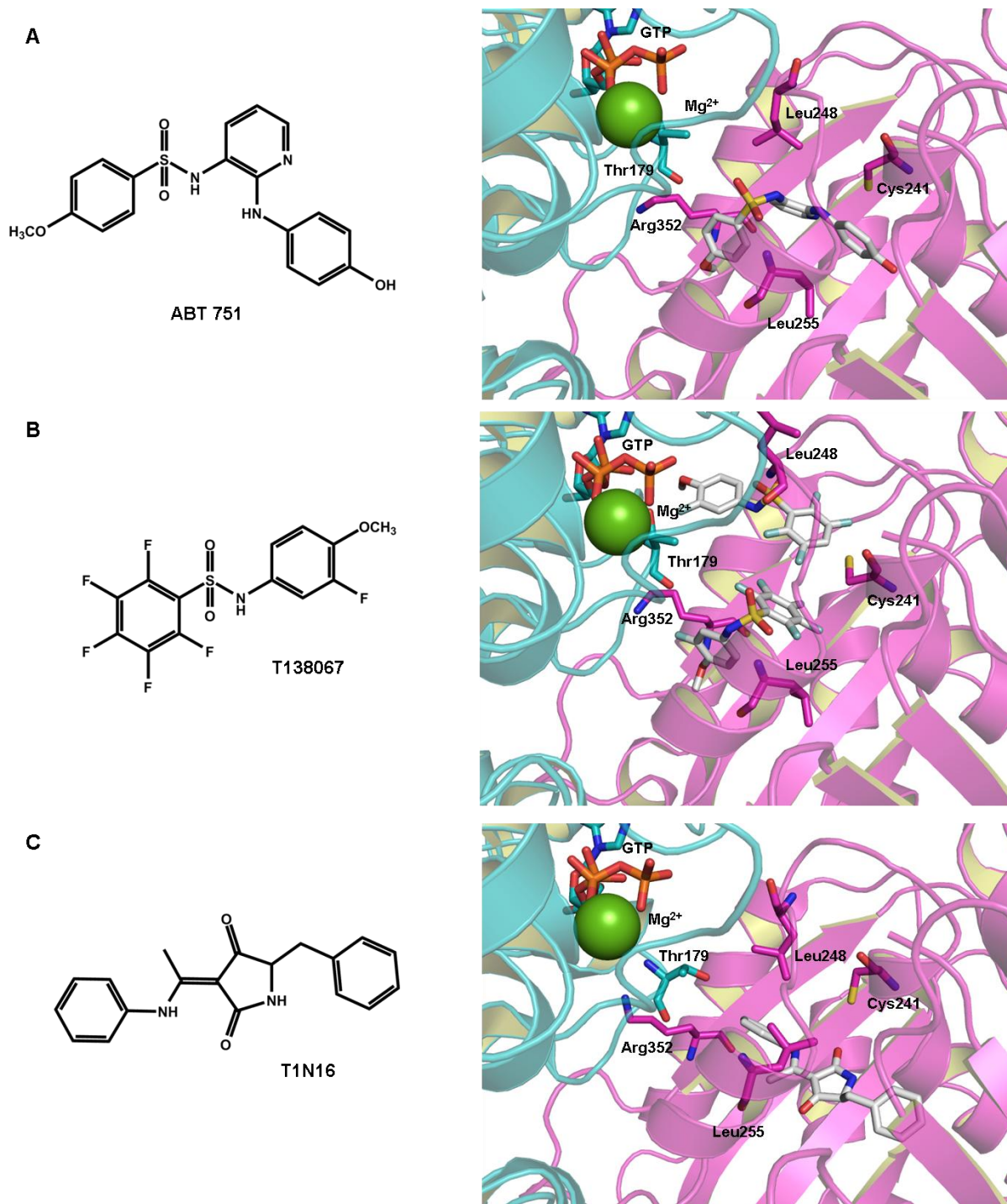


Figura 6.5 - Ligantes diversos do sítio da colchicina para os quais existem complexos cristalográficos com a tubulina (α -tubulina em azul, β -tubulina em rosa). **A)** ABT751, PDB: 3HKC, **B)** T138067 (2 por sítio, um deles covalentemente ligado), PDB: 3HKE e **C)** TN16, PDB: 3HKD^{248, 249}. Resíduos importantes para as interações, além do GTP e dos ligantes, estão mostradas em bastão. O íon magnésio está mostrado em esfera.

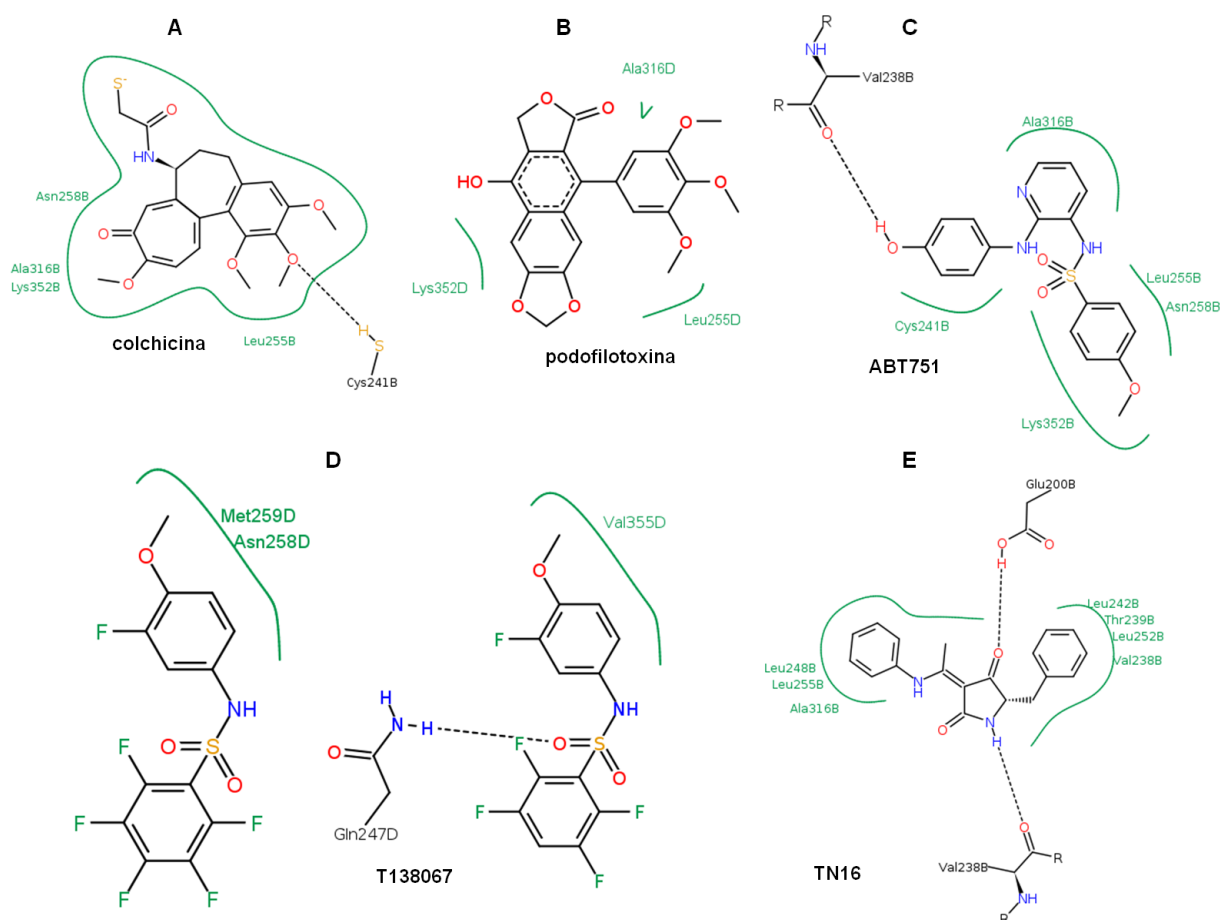


Figura 6.6 - Interações dos ligantes **A)** colchicina, **B)** Podofilotoxina, **C)** ABT751, **D)** T138067 (duas moléculas por sítio) e **E)** TN16 no sítio da colchicina^{248, 249}. Os diagramas de interação 2D foram gerados com o programa Poseview (<http://poseview.zbh.uni-hamburg.de>)^{256, 257}.

6.1 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA EM FRAGMENTOS MOLECULARES E NA ESTRUTURA DO RECEPTOR PARA A IDENTIFICAÇÃO DE INIBIDORES DA POLIMERIZAÇÃO DE MICROTÚBULOS⁷⁸

Dentre os vários compostos estruturalmente distintos que interagem no sítio de ligação da colchicina, na interface dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina, alguns são particularmente relevantes. O núcleo indol, por exemplo, foi descrito em vários estudos como o esqueleto central de um grande número de inibidores da polimerização da tubulina estruturalmente diversos, alguns deles potentes inibidores da proliferação de tumores resistentes ao taxol (Figura 1.9)^{75, 76, 254}.

Neste trabalho, o método HQSAR foi utilizado para a construção de modelos de QSAR 2D para um amplo conjunto de derivados de indol sintéticos apresentando atividade antitumoral como consequência de sua ligação ao sítio de interação da colchicina. Como uma estratégia para a triagem virtual baseada na estrutura dos ligantes conhecidos e na

estrutura do sítio da colchicina, os modelos de QSAR construídos foram integrados a estudos baseados na estrutura do receptor e aplicados a uma base extensa de compostos contendo o núcleo indol ou indolina, como esquematicamente mostrado na Figura 6.7^{78, 100}.

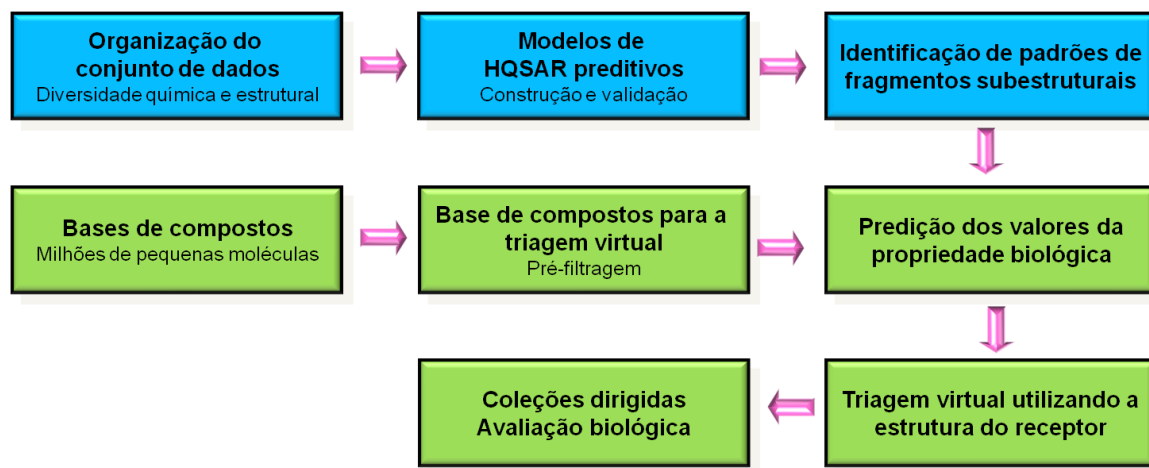


Figura 6.7 - Integração das estratégias de modelagem de QSAR e triagem virtual para identificação de ligantes do sítio da colchicina⁷⁸.

Um requerimento importante para os estudos de QSAR é o de que os valores da propriedade biológica - utilizados como variáveis dependentes no processo de modelagem - sejam todos obtidos nas mesmas condições experimentais, para que possam ser quantitativamente comparados¹³¹. No presente estudo, os modelos de QSAR foram utilizados para atribuir diferentes pesos de importância para diversos fragmentos estruturais componentes de compostos cujos valores de potência citotóxica eram conhecidos. Nesse caso específico, para que os modelos pudessem ser utilizados para a avaliação de grandes bases de dados de compostos estruturalmente diversos, compostos quimicamente diferentes, embora ainda apresentando o núcleo indol, foram utilizados para a calibração dos modelos. Por essa razão, compostos experimentalmente avaliados em condições diferentes, pertencentes a conjuntos de dados não congêneros, foram incluídos no conjunto de dados para a modelagem. Estratégias semelhantes já foram descritas na literatura²⁵⁸.

6.1.1 Estratégias computacionais

Todos os estudos de QSAR 2D e docagem molecular, assim também como as análises estatísticas, foram realizados em estações computacionais, operando no sistema operacional Linux, e utilizando as interfaces computacionais SYBYL 8.0[®] (Tripos, St. Louis,

EUA), GOLD 3.1 (Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, UK) e Pymol 1.0 (DeLano Scientific, San Carlos, USA).

6.1.2 Caracterização do conjunto de dados

O conjunto de dados utilizado para os estudos baseados em fragmentos moleculares consiste de 170 derivados de indóis e indolinas (assim também como alguns benzotiofenos e benzofuranos) associados aos seus valores correspondentes de IC_{50} (citotoxicidade *in vitro*), os quais foram selecionados de diversos artigos^{75, 174, 176, 259-264}. Como pertenciam a conjuntos de dados diferentes, os valores da propriedade biológica para esses compostos foram compilados, criticamente avaliados, e subsequentemente acrescentados ao conjunto de dados final para a obtenção dos modelos 2D globais. Os valores de IC_{50} para compostos de referência selecionados, colchicina e combretastatina A4, foram utilizados para comparar os diferentes conjuntos de compostos e aqueles que apresentaram variações menores que 0,4 nos valores de pIC_{50} para os compostos de referência foram retidos. Os valores de pIC_{50} dentro de cada conjunto individual foram normalizados de acordo com os valores para os compostos de referência, e os valores resultantes de resposta biológica relativa (RBR) foram utilizados nos estudos de HQSAR. Com esse procedimento, objetivou-se incluir máxima diversidade química na modelagem, para que houvesse representatividade no espaço químico que permitisse a avaliação dos compostos estruturalmente diversos, presentes em bases de dados para triagem virtual. Na Tabela 6.1 estão apresentados os compostos utilizados para a modelagem. Como se pode notar, o conjunto de 170 indóis e derivados, utilizado para a modelagem apresenta variações estruturais por todo o anel indol, como mostrado para os substituintes R_1 a R_7 (Figura 6.8)^{75, 174, 176, 259-264}. Os valores padronizados de RBR, utilizados como variáveis dependentes, variam de 0,24 a 3,74, se estendendo por 3,5 ordens de magnitude.

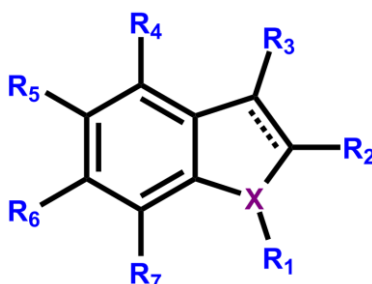
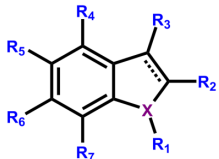


Figura 6.8 - O conjunto indóis utilizado para a modelagem de HQSAR é estruturalmente diverso, apresentando modificações estruturais em X e R_1 a R_7 .

Tabela 6.1 – Conjuntos de dados de derivados indólicos e seus valores correspondentes de RBR, empregados nas análises de HQSAR.

										
CPT ⁸	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	X	R ₂ - R ₃	RBR
c_1_01	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	-OCH ₃	- H	- H	N	Du	2,07
c_1_02	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- OCH ₃	- H	N	Du	2,94
c_1_03	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	-F	- H	N	Du	2,71
c_1_04	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	-F	- H	- H	N	Du	1,75
c_1_05	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- Cl	- H	N	Du	3,05
c_1_06	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₃	- Cl	- H	N	Du	3,07
c_1_07	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₃	- H	- H	N	Du	2,55
c_1_08	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	3,18
c_1_09	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH(CH ₃) ₂	- H	- H	N	Du	3,02
c_1_10	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	3,65
c_1_11	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH(CH ₃) ₂	- H	- H	N	Du	2,62
c_1_12	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH(CH ₃) ₃	- H	- H	N	Du	2,03
c_1_13	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- (CH ₂) ₄ CH ₃	- H	- H	N	Du	3,74
c_1_14	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- (CH ₂) ₅ CH ₃	- H	- H	N	Du	3,61
c_1_15	-H	3-OH-4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- OCH ₃	- H	N	Du	1,58
c_1_16	-H	4-CH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- OCH ₃	- H	N	Du	1,58
c_1_17	-H	4-CH ₃ -Ph	-CHCO	- H	-CH ₃	- H	- H	N	Du	2,80
c_1_18	-H	4-CH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	2,95
c_1_19	-H	4-CH ₂ CH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	3,05
c_1_20	-H	4-(CH ₂) ₃ CH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	2,00
c_1_21	-H	4-F-Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	1,94
c_1_22	-H	4-CF ₃ -Ph	-CHCO	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	2,96
c_1_23	-H	4-CF ₃ -Ph	-CHCO	- H	- (CH ₂) ₄ CH ₃	- H	- H	N	Du	2,86
c_1_24	-H	4-CF ₃ -Ph	-CHCO	- H	- (CH ₂) ₅ CH ₃	- H	- H	N	Du	2,85

Continua...

Continuação...										
c_1_25	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCNCH ₃	- H	- H	- OCH ₃	- H	N	Du	2,95
c_1_26	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCNCH ₃	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	3,70
c_1_27	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCNCH ₃	- H	- (CH ₂) ₄ CH ₃	- H	- H	N	Du	3,70
c_1_28	-H	4-CF ₃ -Ph	-CHCNCH ₃	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	2,97
c_1_29	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCN-OH	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	2,88
c_1_30	-H	4-CF ₃ -Ph	-CHCN-OH	- H	- CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₃	- H	- H	N	Du	1,78
c_1_31	-H	Ph	-CHCO	- H	- H	- H	- H	N	Du	1,86
c_1_32	-H	Ph	-CHCO	- H	- OCH ₃	- H	- H	N	Du	2,10
c_1_33	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- H	- H	N	Du	1,81
c_1_34	-H	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- OCH ₃	- OCH ₃	- H	N	Du	2,14
c_1_35	-CH ₃	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- OCH ₃	- H	N	Du	1,10
c_1_36	-(CH ₂) ₄ CH ₃	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- OCH ₃	- H	N	Du	0,96
c_1_37	-	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- OCH ₃	- H	- H	O	Du	0,56
c_1_38	-	4-OCH ₃ -Ph	-CHCO	- H	- H	- OCH ₃	- H	S	Du	1,48
c_1_39	H	4-OH-Ph	-CHCO	- H	- OH	- H	- H	N	Du	1,08
c_1_40	H	Ph	-CHCO	- H	- H	- OH	- H	N	Du	0,58
c_1_41	-	4-OH-Ph	-CHCO	- H	- H	- OH	- H	S	Du	0,51
c_1_42	6-(CH ₂) ₃ CH ₃ -3-OCH ₃ -2,1-α-isoquinolina		-CHCO	- H	- H	- OCH ₃	- H	N	Du	0,54
c_2_01	-H	-CO-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,47
c_2_02	-H	-CO-(2,3)-di-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	0,79
c_2_03	-H	-CO-(2,4)-di-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,29
c_2_04	-H	-CO-(3,5)-di-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	3,02
c_2_05	-H	-CO-(2,3,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	0,33
c_2_06	-H	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,54
c_2_07	-H	-CO-2-CH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,72
c_2_08	-H	-CO-4-CH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,03
c_2_09	-H	-CO-(2,5)-di-CH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,44
c_2_10	-H	-CO-3-OH-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,96
c_2_11	-H	-CO-3-OCO(CH ₂) ₂ CH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,92
c_2_12	-H	-CO-3-OCF ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,98
c_2_13	-H	-CO-3-SCF ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,50
c_2_14	-H	-CO-3-SHCF ₂ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,74

Continua...

Continuação...										
c_2_15	-H	-CO-3-NH ₂ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,30
c_2_16	-H	-CO-(2-CH ₃ ,3-NH ₂)-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,94
c_2_17	-H	-CO-4-CH ₂ CH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	0,24
c_2_18	-H	-CO-4-Cl-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,06
c_2_19	-H	-CO-4-Br-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,34
c_2_20	-H	-CO-2-F-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,43
c_2_21	-H	-CO-4-F-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	0,43
c_2_22	-H	-CO-(2,6)-di-F-Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	0,36
c_2_23	-H	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	N	Du	0,32
c_2_24	-H	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-CH ₃	-H	-H	N	Du	2,82
c_3_01	-H	-CO-OCH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	2,71
c_3_02	-H	-CO-OCH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,49
c_3_03	-H	-CO-OCH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	3,00
c_3_04	-H	-CO-OCH ₂ CH ₃	-S-3-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,93
c_3_05	-H	-CO-OCH ₂ CH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,51
c_3_06	-H	-CO-OCH ₃	-S-2-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	1,00
c_3_07	-H	-CO-OCH ₃	-S-3-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	1,59
c_3_08	-H	-CO-OCH ₃	-S-(3,5)-di-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,58
c_3_09	-H	-CO-OCH ₂ CH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,07
c_3_10	-H	-CO-OCH ₂ CH ₃	-S-2-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,57
c_3_11	-H	-CO-OCH ₂ CH ₃	-S-3-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,66
c_3_12	-H	-CO-OCH ₂ CH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,45
c_3_13	-H	-CO-OCH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-NO ₂	-H	-H	N	Du	2,03
c_3_14	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	2,58
c_3_15	-H	-CH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	2,45
c_3_16	-H	-H	-S-(3,5)-di-CH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	1,03
c_3_17	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,22
c_3_18	-H	-CH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,20
c_3_19	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,48
c_3_20	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-I	-H	-H	N	Du	2,28
c_3_21	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-F	-H	-H	N	Du	1,91
c_3_22	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-NO ₂	-H	-H	N	Du	1,36

Continua...

Continuação...										
c_3_23	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-CH ₃	-H	-H	N	Du	2,91
c_3_24	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,77
c_3_25	-H	-CH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,85
c_3_26	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-O-CH(CH ₃) ₂	-H	-H	N	Du	0,93
c_3_27	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OH	-H	-H	N	Du	1,83
c_3_28	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-O-CH ₂ CH ₂ OH	-H	-H	N	Du	2,13
c_3_29	-H	-H	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-O-CH ₂ CH ₂ O-benzila	-H	-H	N	Du	1,70
c_3_30	-H	-H	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	1,93
c_3_31	-H	-COOCH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	2,59
c_3_32	-H	-COOCH ₃	-CH ₂ -(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	1,83
c_3_33	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	2,21
c_3_34	-H	-H	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,39
c_3_35	-H	-COOCH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,63
c_3_36	-H	-COOCH ₃	-CH ₂ -(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,17
c_3_37	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	2,07
c_3_38	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-CH ₂ -(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Cl	-H	-H	N	Du	1,75
c_3_39	-H	-H	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,33
c_3_40	-H	-COOCH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,59
c_3_41	-H	-COOCH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,85
c_3_42	-H	-COOCH ₃	-CH ₂ -(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,63
c_3_43	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-S-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,19
c_3_44	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,30
c_3_45	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-CH ₂ -(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-Br	-H	-H	N	Du	2,11
c_3_46	-H	-H	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	1,81
c_3_47	-H	-COOCH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,88
c_3_48	-H	-COOCH ₃	-CH ₂ -(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,59
c_3_49	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-CO-(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,16
c_3_50	-H	-COOCH ₂ CH ₃	-CH ₂ -(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₃	-H	-H	N	Du	2,14
c_4_01	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-benzoila	N	Si	1,61
c_4_02	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-4-F-benzoila	N	Si	2,11
c_4_03	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-4-NO ₂ -benzoila	N	Si	2,07
c_4_04	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-4-CN-benzoila	N	Si	2,06

Continua...

Continuação...										
c_4_05	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-4-isonicotinoila	N	Si	3,10
c_4_06	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-2-furoila	N	Si	3,10
c_4_07	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-2-tienoila	N	Si	2,41
c_4_08	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-bzsulfonila	N	Si	1,27
c_4_09	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-4-NO ₂ -bzsulfonila	N	Si	1,04
c_4_10	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NH-4-F- bzsulfonila	N	Si	1,00
c_4_11	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NHCOCH ₃	N	Si	2,13
c_4_12	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	-NHCOC(CH ₃) ₃	N	Si	1,52
c_4_13	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-Br	-NH-4-isonicotinoila	N	Si	2,12
c_4_14	-SO ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-Br	-NH-2-furanoila	N	Si	3,10
c_4_15	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	-H	N	Du	0,62
c_4_16	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	-H	N	Du	0,88
c_4_17	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	N	Du	2,37
c_4_18	-H	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	N	Du	2,06
c_4_19	-H	-H	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	N	Du	1,37
c_4_20	-H	-H	-H	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	N	Du	1,59
c_4_21	-CH ₃	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-H	N	Du	2,74
c_4_22	-CH ₃	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	N	Du	2,95
c_4_23	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	N	Du	0,80
c_4_24	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	N	Du	0,82
c_4_25	-CH ₂ OH	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	N	Du	2,49
c_4_26	-CH ₂ COOH	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	N	Du	1,36
c_4_27	-CH ₂ CH ₂ N(CH ₃) ₂	-H	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	N	Du	0,36
c_4_28	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-CH ₃	-H	N	Du	3,18
c_4_29	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-NH ₂	-H	N	Du	1,54
c_4_30	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-NHCH ₃	-H	N	Du	2,52
c_4_31	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-N(CH ₃) ₂	-H	N	Du	3,30
c_4_32	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OH	-OCH ₃	-H	N	Du	0,85
c_4_33	-H	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-OCH ₂ Ph	-OCH ₃	-H	N	Du	1,58
c_4_34	-CH ₃	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	2,55
c_4_35	-CH ₂ CH ₃	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	2,27
c_4_36	-CH ₂ CH ₂ CH ₃	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,83

Continua...

Continuação...										
c_4_37	-CH(CH ₃) ₂	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,62
c_4_38	-(CH ₂) ₃ CH ₃	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,77
c_4_39	-(CH ₂) ₂ N(CH ₃) ₂	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,14
c_4_40	-CH ₂ Ph	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,45
c_4_41	-CH ₂ -4-NO ₂ -Ph	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,61
c_4_42	-CH ₂ -4-CN-Ph	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,69
c_4_43	-CH ₂ -4-OCH ₃ -Ph	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,76
c_4_44	-CH ₂ -4-Piridila	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,93
c_4_45	-benzoila	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	3,30
c_4_46	-furoila	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	3,48
c_4_47	-tienila	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	3,30
c_4_48	COO-Phe	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	3,23
c_4_49	-COO(CH ₂) ₂ CH ₃	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	3,00
c_4_50	-COO-CH ₃	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	2,97
c_4_51	-COO-CH ₂ CH ₃	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	2,22
c_4_52	-CO-morfolil	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,71
c_4_53	-SO ₂ -Ph	-H	-CO(3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,78
c_4_54	-H	-H	-SO ₂ (3,4,5)-tri-OCH ₃ -Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	N	Du	1,75

c-1, conjunto 1; c_2, conjunto 2, c_3, conjunto 3, c_4, conjunto 4; CPT*, composto; Ph, fenila; Du, dupla; Si, simples.

As estruturas 3D dos derivados indólicos foram construídas utilizando os parâmetros geométricos padrões do programa SYBYL 8.0. Cada conformação de cada molécula foi energeticamente minimizada empregado o campo de forças Tripos e as cargas foram calculadas segundo o método clássico de Gasteiger–Hückel.

6.1.3 Análises de HQSAR

O conjunto de dados original foi decomposto em cinco subconjuntos representativos, cada um deles contendo 34 compostos. O primeiro subconjunto continha os análogos numerados como **1, 6, 11, ...**(Tabela 6.2), o segundo continha os análogos **2, 7, 12,...** e assim sucessivamente. Cinco modelos foram construídos utilizando cada um dos subconjuntos uma vez como conjunto teste (predição) e os outros quatro subconjuntos combinados (com 136 compostos) como conjunto treinamento (estimativa). Os modelos de HQSAR para cada subconjunto foram qualificados por sua capacidade em prever os valores da propriedade de cada molécula dentro dos conjuntos teste, empregando os hologramas moleculares como descritores¹⁴⁰.

A influência dos parâmetros comprimento do holograma, tamanho do fragmento e distinção dos fragmentos para a geração dos hologramas moleculares foi avaliada. Os padrões de contagem dos fragmentos para os compostos pertencentes ao conjunto treinamento foram relacionados aos valores de citotoxicidade utilizando análises de PLS. Os resultados das análises de QSAR para os 5 conjuntos treinamento utilizados estão resumidos na Tabela 6.3.

Resultados estatísticos significativos foram obtidos para os 5 melhores modelos de HQSAR construídos ($q^2_{\text{LOO}} \geq 0,60$ com $r^2 \geq 0,84$ em todos os casos), indicando a razoável consistência interna dos modelos. Procedimentos de validação cruzada utilizando 5 e 10 grupos confirmaram a estabilidade dos modelos construídos. A capacidade preditiva dos 5 melhores modelos de HQSAR foi avaliada pela predição dos valores de RBR para cada um dos subconjuntos utilizados como conjunto teste. Os resultados do processo de validação externa estão mostrados no gráfico apresentado na Figura 6.9. Como se pode notar pelos valores residuais indicados na Figura 6.9 e pelos valores de r^2_{pred} mostrados na Tabela 6.3, os modelos construídos foram razoavelmente capazes de prever os valores de RBR para moléculas não incluídas na calibração dos modelos.

Tabela 6.2 – Derivados indólicos utilizados para os estudos de HQSAR.

N	Composto	RBR	N	Composto	RBR	N	Composto	RBR	N	Composto	RBR
1	conj_2_17	0,24	44	conj_1_15	1,58	87	conj_1_32	2,10	130	conj_1_03	2,71
2	conj_2_23	0,32	45	conj_4_20	1,59	88	conj_4_02	2,11	131	conj_4_21	2,74
3	conj_2_05	0,33	46	conj_3_07	1,59	89	conj_3_45	2,11	132	conj_3_24	2,77
4	conj_4_27	0,36	47	conj_4_41	1,61	90	conj_4_13	2,12	133	conj_1_17	2,80
5	conj_2_22	0,36	48	conj_4_01	1,61	91	conj_3_28	2,13	134	conj_2_24	2,82
6	conj_2_21	0,43	49	conj_4_37	1,62	92	conj_4_14	2,13	135	conj_3_25	2,85
7	conj_1_41	0,51	50	conj_3_11	1,66	93	conj_4_11	2,13	136	conj_1_24	2,85
8	conj_1_42	0,54	51	conj_4_42	1,69	94	conj_3_50	2,14	137	conj_3_41	2,85
9	conj_1_37	0,56	52	conj_3_26	1,70	95	conj_1_34	2,14	138	conj_1_23	2,86
10	conj_1_40	0,58	53	conj_4_52	1,71	96	conj_3_49	2,16	139	conj_1_29	2,88
11	conj_4_15	0,62	54	conj_2_07	1,72	97	conj_3_36	2,17	140	conj_3_47	2,88
12	conj_2_02	0,79	55	conj_2_14	1,74	98	conj_3_43	2,19	141	conj_3_23	2,91
13	conj_4_23	0,80	56	conj_4_54	1,75	99	conj_3_18	2,20	142	conj_1_02	2,94
14	conj_4_24	0,82	57	conj_1_04	1,75	100	conj_3_33	2,21	143	conj_1_18	2,95
15	conj_4_32	0,85	58	conj_3_38	1,75	101	conj_4_51	2,22	144	conj_4_22	2,95
16	conj_4_16	0,88	59	conj_4_43	1,76	102	conj_3_17	2,22	145	conj_1_25	2,95
17	conj_3_23	0,93	60	conj_4_38	1,77	103	conj_4_35	2,27	146	conj_1_22	2,96
18	conj_1_36	0,96	61	conj_4_53	1,78	104	conj_3_20	2,28	147	conj_4_50	2,97
19	conj_3_06	1,00	62	conj_3_39	1,78	105	conj_2_15	2,30	148	conj_1_28	2,97
20	conj_4_10	1,00	63	conj_3_46	1,81	106	conj_3_44	2,30	149	conj_1_16	2,99
21	conj_2_08	1,03	64	conj_1_33	1,81	107	conj_3_39	2,33	150	conj_3_03	3,00
22	conj_3_16	1,03	65	conj_3_32	1,83	108	conj_4_17	2,37	151	conj_4_49	3,00
23	conj_4_09	1,04	66	conj_4_36	1,83	109	conj_3_34	2,39	152	conj_2_04	3,02
24	conj_2_18	1,06	67	conj_3_27	1,83	110	conj_4_07	2,41	153	conj_1_09	3,02
25	conj_1_39	1,08	68	conj_1_31	1,86	111	conj_3_12	2,45	154	conj_1_19	3,05
26	conj_1_35	1,10	69	conj_3_21	1,91	112	conj_3_36	2,45	155	conj_1_05	3,05
27	conj_4_39	1,14	70	conj_2_11	1,92	113	conj_3_19	2,48	156	conj_1_06	3,07
28	conj_4_08	1,27	71	conj_3_30	1,93	114	conj_4_25	2,49	157	conj_4_06	3,10
29	conj_2_03	1,29	72	conj_3_04	1,93	115	conj_3_02	2,49	158	conj_4_05	3,10
30	conj_2_19	1,34	73	conj_4_44	1,93	116	conj_3_05	2,51	159	conj_4_28	3,18
31	conj_4_26	1,36	74	conj_2_16	1,94	117	conj_4_30	2,52	160	conj_1_08	3,18
32	conj_3_22	1,36	75	conj_1_21	1,94	118	conj_2_06	2,54	161	conj_4_48	3,23
33	conj_4_19	1,37	76	conj_2_10	1,96	119	conj_4_34	2,55	162	conj_4_31	3,30
34	conj_2_20	1,43	77	conj_2_12	1,98	120	conj_1_07	2,55	163	conj_4_47	3,30
35	conj_2_09	1,44	78	conj_1_20	2,00	121	conj_3_14	2,58	164	conj_4_45	3,30
36	conj_4_40	1,45	79	conj_3_13	2,03	122	conj_3_08	2,58	165	conj_4_46	3,48
37	conj_2_01	1,47	80	conj_1_12	2,03	123	conj_3_48	2,59	166	conj_1_14	3,61
38	conj_1_38	1,48	81	conj_4_04	2,06	124	conj_3_40	2,59	167	conj_1_10	3,65
39	conj_2_13	1,50	82	conj_4_18	2,06	125	conj_3_31	2,59	168	conj_1_27	3,70
40	conj_4_12	1,52	83	conj_3_09	2,07	126	conj_1_11	2,62	169	conj_1_26	3,70
41	conj_4_29	1,54	84	conj_1_01	2,07	127	conj_3_42	2,63	170	conj_1_13	3,74
42	conj_3_10	1,57	85	conj_3_37	2,07	128	conj_3_35	2,63			
43	conj_4_33	1,58	86	conj_4_03	2,07	129	conj_3_01	2,71			

Os padrões de contagem de fragmentos relacionados com o aumento da citotoxicidade, de acordo com os modelos preditivos construídos, foram utilizados para a avaliação de uma base de dados contendo derivados de indóis e indolinas diversos. Antes da avaliação, entretanto, uma série de análises estatísticas relacionadas à capacidade de predição do valor da propriedade biológica dos compostos não incluídos na calibração dos modelos foi efetuada.

Tabela 6.3 – Melhores modelos de HQSAR construídos.

Modelo	Distinção	Parâmetros Estatísticos						
		q^2_{LOO}	r^2	SEE	HL	N	Tam*	r^2_{pred}
1	A/C/H/DA	0,64	0,85	0,32	401	8	4-7	0,57
2		0,60	0,85	0,32	401	8	4-7	0,68
3		0,63	0,85	0,32	401	8	4-7	0,56
4		0,62	0,86	0,31	401	8	4-7	0,72
5		0,61	0,84	0,33	401	8	4-7	0,60
6**		0,65	0,83	0,33	401	8	4-7	-

q^2_{LOO} , coeficiente de correlação da validação cruzada (retirando uma molécula de cada vez); r^2 , coeficiente de correlação; SEE, erro padrão da estimativa; HL, comprimento de holograma; N, número ótimo de componentes principais; Tam, tamanho de fragmento; r^2_{pred} , coeficiente de correlação da predição, *Tamanhos de fragmentos analisados: 2-5, 3-6, 4-7, 5-8, 6-9 e 7-10. ** O modelo 6 foi desenvolvido com todas as 170 moléculas.

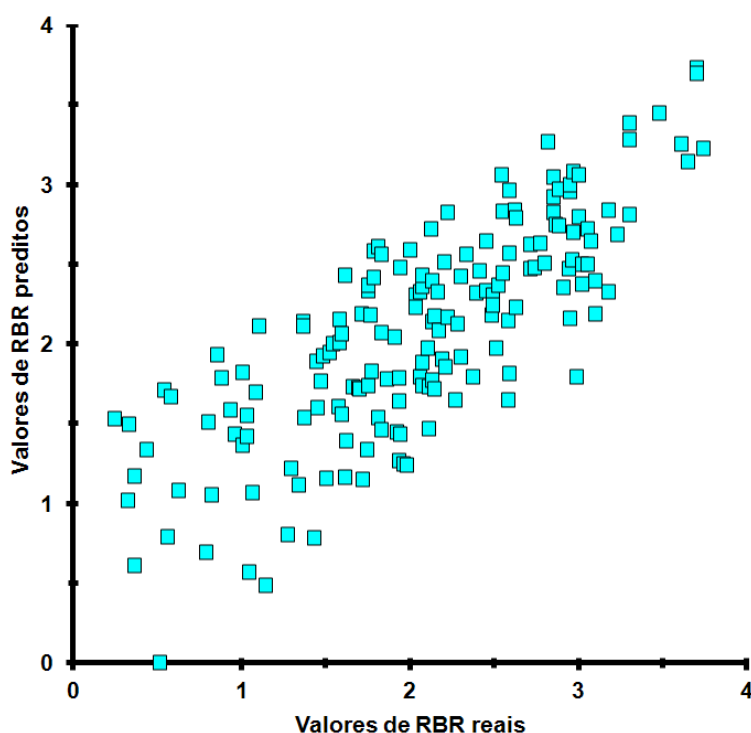


Figura 6.9 - Valores de RBR preditos versus valores experimentais correspondentes para os compostos indólicos e derivados utilizados para a modelagem de HQSAR.

6.1.3.1 HQSAR e triagem virtual

Os métodos de QSAR têm sido tradicionalmente utilizados para a obtenção de modelos com consistência interna e externa e capacidade preditiva em séries congênicas. Alguns estudos sugerem que esses métodos também podem integrados em estratégias de triagem virtual para a identificação de novos ligantes bioativos^{146, 155}. A demanda cada vez maior por métodos de análise que possam ser aplicados às grandes quimiotecas, como aquelas geradas pela química combinatória e o HTS, demonstra uma oportunidade para a aplicação da estratégia baseada em fragmentos moleculares especializados: simples, independente da conformação e capaz de gerar modelos robustos, comparáveis aos modelos de QSAR 3D²¹². A atribuição dos diferentes pesos de importância para as diversas contribuições relativas dos diferentes fragmentos é dirigida pelos valores experimentais da atividade biológica, o que torna esse método de avaliação especialmente apropriado à rápida avaliação e predição de grandes bases de dados de compostos⁷⁸. A estratégia para a triagem virtual utilizada nesse trabalho está esquematizada na Figura 6.10.

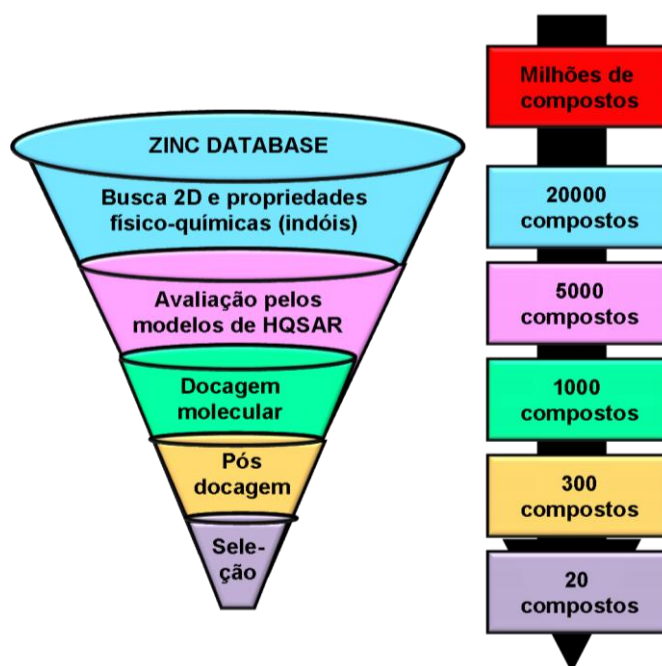


Figura 6.10 - Filtros hierárquicos sucessivos utilizados na estratégia de triagem virtual para a identificação de inibidores da polimerização de tubulina.

6.1.3.2 Avaliação da aplicabilidade dos modelos construídos

A caracterização do espaço químico e dos domínios de predição é um fator importante a ser considerado na definição da aplicabilidade dos modelos obtidos. Para

avaliar esse componente nos modelos de HQSAR construídos para os 170 indóis, um conjunto de análises estatísticas de predição foi empregado.

Para analisar se o valor de RBR para um determinado composto foi corretamente predito utilizando um modelo de HQSAR específico, consideramos o resíduo de sua predição, que é a diferença entre o valor experimental e o predito de RBR quando este compõe o conjunto teste (ou seja, não faz parte da calibração do modelo), em relação ao valor da estimativa do erro padrão (SEE) associado a esse modelo. De acordo com os limites estipulados nesse trabalho, o valor da propriedade biológica é considerado como corretamente predito se o resíduo de sua predição é menor que 1,5 vezes o valor do SEE. Utilizando esse valor como limite, que é bastante restrito, pode-se comparar a frequência de compostos que são considerados como sendo corretamente preditos para diferentes porcentagens de tipos de fragmentos presentes nesses compostos, mas ausentes no conjunto de treinamento que deu origem ao modelo utilizado para a predição (tipos de fragmentos extrapolados). Essas análises de predição podem ser utilizadas para entender algumas limitações dos modelos gerados e o risco de erros na extrapolação dos resultados para a aplicação dos modelos a bases de compostos quimicamente diversos. A avaliação da capacidade de predição de compostos não incluídos na calibração dos modelos, para os 5 diferentes modelos construídos, utilizando as diferentes combinações de conjuntos testes representativos, revelou que o número de compostos que não eram bem preditos aumentava com o acréscimo da porcentagem de tipos de fragmentos ausentes no conjunto treinamento e que eram de fato requeridos para a predição externa, como mostra a Figura 6.11. A linha verde no gráfico indica que, quando os modelos de HQSAR validados são empregados para as análises nesses conjuntos treinamento e teste, a porcentagem de predições corretas é maior que 50% nos casos em que até 25% dos tipos de fragmentos são extrapolados. Entretanto, quando se consideram compostos bem preditos para uma relação resíduo/SEE maior, por exemplo, $\text{resíduo/SEE} \leq 3$, os modelos são capazes de prever corretamente mais que 50% dos valores da propriedade biológica para compostos com mais de 75% de fragmentos extrapolados. A partir desses resultados, pode-se inferir que variedade estrutural suficiente (diversidade química) deve ser incluída na calibração dos modelos de QSAR para garantir que os padrões de reconhecimento molecular resultantes sejam capazes de abranger o espaço químico representado pelos compostos presentes em outros conjuntos de dados⁷⁸. Os domínios de predição de modelos de QSAR podem ser também avaliados a partir de análises estatísticas comparativas dos descritores utilizados para descrever os compostos do conjunto de dados utilizado para a modelagem e os compostos a serem preditos.

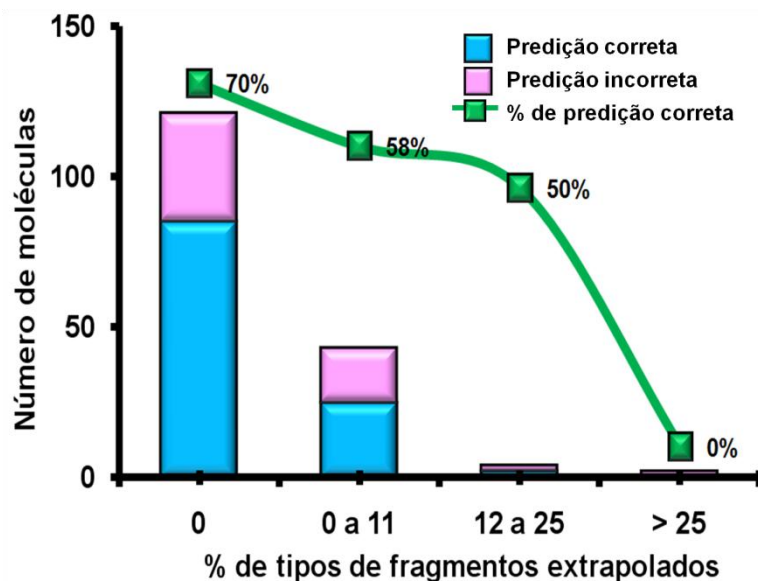


Figura 6.11 - Avaliação da capacidade preditiva dos modelos de HQSAR para um conjunto de 170 indóis. A porcentagem de predições corretas decresce com o aumento da porcentagem de tipos de fragmentos extrapolados nos modelos⁷⁸.

6.1.4 Bases de compostos para a triagem virtual

Compostos apresentando o núcleo indol ou o núcleo indolina foram recuperados a partir da base de dados de compostos comercialmente disponíveis ZINC e submetidos a filtros físico-químicos (Tabela 6.4) para a seleção de compostos contendo características moleculares apresentadas pelos ligantes conhecidos, utilizados para a modelagem de HQSAR. Ao final do processo de filtragem, aproximadamente 20000 indóis e indolinas foram selecionados para avaliação pelos modelos de HQSAR construídos. Uma comparação da distribuição percentual de algumas características encontradas nos ligantes conhecidos e na base de dados filtrada está apresentada na Figura 6.12.

Tabela 6.4 – Filtros físico-químicos utilizados para a filtragem da base de dados inicial.

Características	Valores típicos para os ligantes conhecidos*	Faixa de valores selecionada
Massa molar	220-500	150-400
Doadores de ligação de H	-	≤ 4
Aceptores de ligação de H	-	≤ 8
clogP	0,4-8,11	≤ 4
Número de ligações rotacionáveis	≤ 7	≤ 10

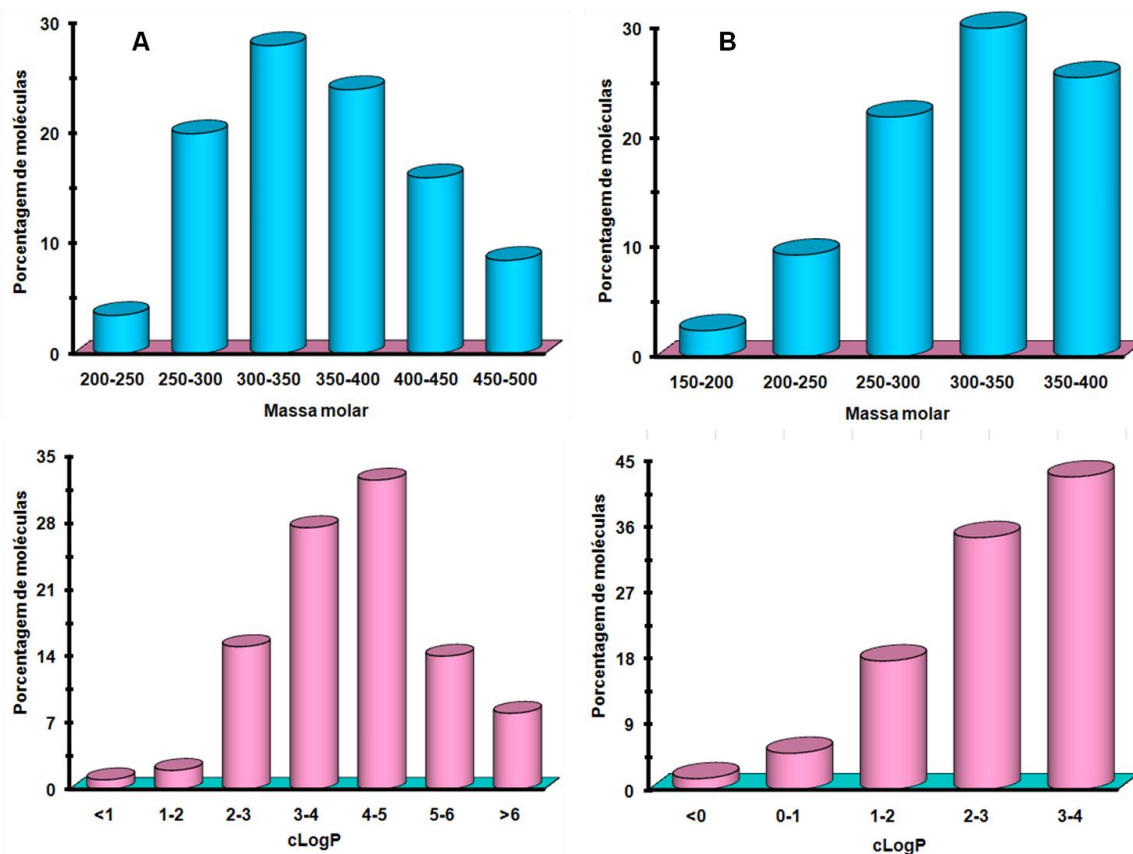


Figura 6.12 - Comparação da distribuição percentual de características físico-químicas (massa molar e cLogP) apresentadas **A)** pelos ligantes do conjunto de dados de 170 indóis e derivados e **B)** pelos indóis e indolinas recuperados da base de dados ZINC e filtrados de acordo com características apresentadas por ligantes conhecidos.

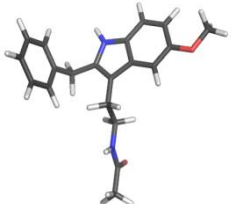
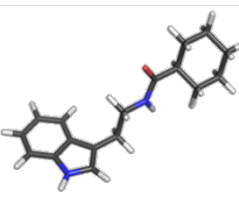
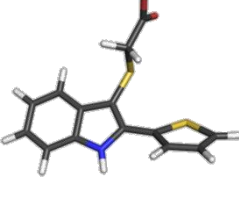

6.1.5 Avaliação da base de dados filtrada através dos modelos de HQSAR

Os valores de RBR foram preditos para todos os 20000 compostos da base de dados filtrada utilizando os 6 modelos de HQSAR construídos (um modelo com todas as moléculas e os 5 modelos individuais). A porcentagem de tipos de fragmentos extrapolados para a predição de cada um desses compostos foi avaliada. Aproximadamente 5000 compostos, os quais apresentaram os melhores valores de predição da atividade biológica em vários modelos, com menos de 75% de fragmentos extrapolados, foram selecionados para os estudos utilizando a estrutura 3D da cavidade de interação da colchicina. Alguns deles, juntamente com algumas de suas características, estão mostrados na Tabela 6.5, em que a porcentagem de fragmentos extrapolados foi calculada utilizando o modelo 6 (Tabela 6.3).

Com a finalidade de definir a aplicabilidade dos modelos de HQSAR construídos para a predição da propriedade biológica para os indóis representativos (Figura 6.13), foram aplicados métodos estatísticos multivariados de análises não-supervisionadas, utilizando os hologramas moleculares como descritores das estruturas químicas dos compostos dos

conjuntos de dados e das moléculas selecionadas. As análises hierárquicas de agrupamento (HCA, do inglês, *hierarchical cluster analysis*) utilizando os hologramas gerados com os parâmetros do modelo 6 (Tabela 6.3), realizadas com o programa SYBYL 8.0, indicaram que os compostos selecionados podiam ter seus valores de citotoxicidade preditos pelos modelos de QSAR construídos, por pertencerem à mesma diversidade química dos compostos utilizados para a modelagem. As análises de componentes principais (PCA, do inglês, *principal component analysis*) geradas no programa SYBYL 8.0 para os mesmos descritores indicaram que os compostos selecionados, apesar de não apresentarem vizinhos muito próximos em PC1xPC2, poderiam ser razoavelmente considerados estruturalmente relacionados aos compostos pertencentes ao conjunto de dados (Figura 6.13).

Tabela 6.5 – Compostos representativos selecionados para os estudos baseados na estrutura do sítio da colchicina.

Composto	% tipos de fragmentos extrapolados	cLogP	Massa molar
 ZINC00025226	72%	2,1	322
 ZINC00049207	50%	3,0	270
 ZINC00036657	41%	3,6	288
 ZINC00029594	4%	3,2	289

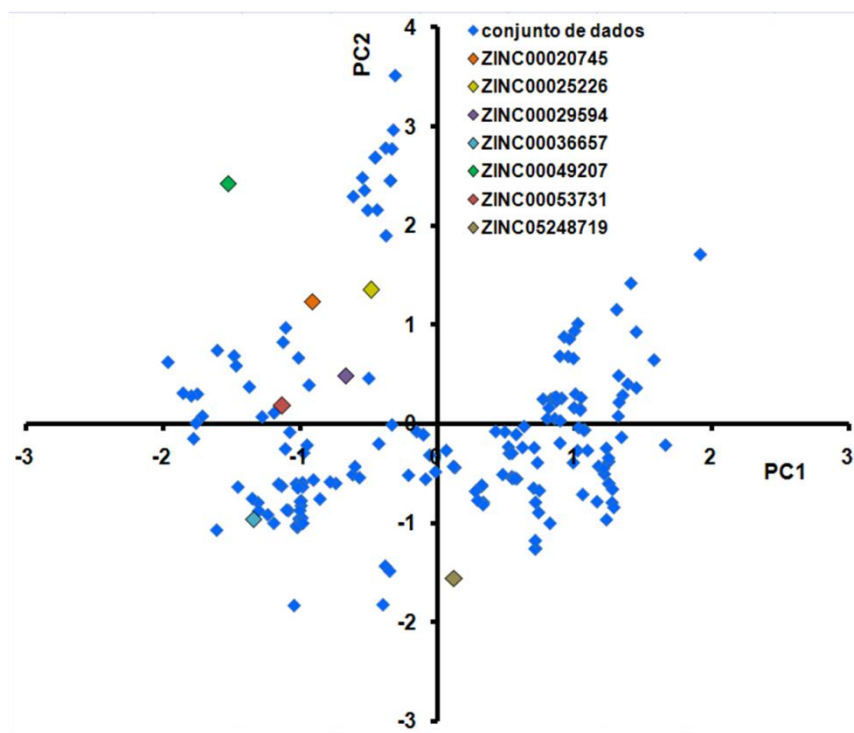
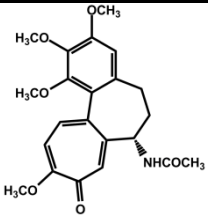
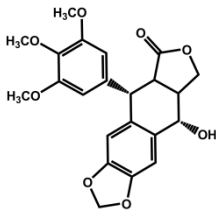
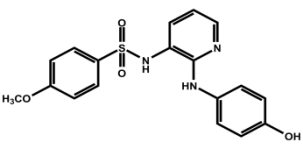
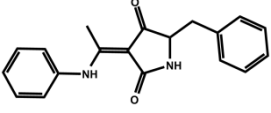
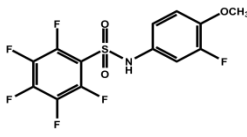


Figura 6.13 - Gráfico dos scores de PC1 x PC2 para os descritores moleculares gerados para o modelo 6.

6.1.6 Estudos de docagem molecular

A estratégia de triagem virtual para a identificação de ligantes do sítio da colchicina selecionada nesse trabalho baseou-se primariamente na diversidade química dos ligantes conhecidos dessa cavidade por duas razões: i) as estruturas do receptor foram obtidas em baixa resolução (Tabela 6.6) e ii) informação estrutural sobre um conjunto de ligantes diversos do sítio da colchicina era disponível (Tabela 6.1). A análise das estruturas cristalográficas dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina em complexo com inibidores da polimerização, entretanto, permite sugerir que os diversos ligantes se sobrepõem parcialmente em sua ocupação da cavidade de interação (Figuras 6.4 a 6.6). A interface de interação não é bem delimitada e sua extensão deve permitir, portanto, a ligação de uma variedade de esqueletos químicos capazes de inibir a polimerização da tubulina. Por essa razão, é importante considerar diferentes possibilidades de ocupação dessa interface. Apesar das limitações aos estudos baseados na estrutura do receptor, em razão das dificuldades geradas pela resolução das estruturas, pela extensão da interface de interação e pelas diversas possibilidades de ocupação do sítio, a informação estrutural disponível sobre a cavidade de interação da colchicina foi considerada como uma das etapas para a seleção de compostos na estratégia de triagem virtual selecionada nesse trabalho.

Tabela 6.6 – Informação 3D disponível sobre a cavidade de interação da colchicina, obtida por cristalografia de raios-X.

Código PDB	Ligante	Estrutura (ligante)	Resolução
1SA0	DAMA-Colchicina (Figura 6.4)		3,58 Å
1SA1	Podofilotoxina (Figura 6.4)		4,20 Å
1Z2B	DAMA-Colchicina	Ver estrutura 1SA0	4,10 Å
3DU7	DAMA-Colchicina	Ver estrutura 1SA0	4,10 Å
3E22	Colchicina	Ver estrutura 1SA0	3,80 Å
3HKB	Sem ligantes	-	3,65 Å
3HKC	ABT 751 (Figura 6.5)		3,80 Å
3HKD	TN16 (Figura 6.5)		3,70 Å
3HKE	T130867 (Figura 6.5)		3,60 Å

Para explorar as possíveis conformações de interação para o conjunto de compostos selecionados a partir da avaliação pelos modelos de HQSAR, os protocolos de docagem utilizando a função de pontuação GoldScore (GOLD 3.1) foram utilizados. As estruturas dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina em complexo com inibidores (Tabela 6.6) foram recuperadas do PDB, superpostas, inspecionadas para a identificação de características semelhantes e resíduos flexíveis, e preparadas. A cavidade de ligação foi centralizada no átomo C21 da colchicina e um raio de esfera de 7 Å foi considerado para os procedimentos de ancoramento na cavidade formada na interface dos monômeros de α e β tubulina. Os procedimentos foram repetidos 10 vezes para cada composto. Os 1000 compostos com as

conformações mais bem pontuadas foram novamente avaliados utilizando a função de pontuação ChemScore (GOLD 3.1). Os posicionamentos para os 300 compostos mais bem pontuados por consenso foram visualmente inspecionados para a seleção de um subconjunto final de 20 compostos (Figura 6.10).

Na Figura 6.14 estão apresentados os posicionamentos de dois compostos representativos selecionados. De acordo com as predições de alvos moleculares possíveis, baseadas na similaridade dos ligantes²²⁰, no site da ZINC, o primeiro composto mostrado (Figura 6.14A), um derivado da triptamina, é um possível ligante dos receptores de serotonina, de melatonina e das metaloproteinases da matriz, esse último receptor enzimático também relacionado ao câncer. Em altas concentrações, a melatonina, uma amida derivada da triptamina, inibe a polimerização dos microtúbulos²⁶⁵. O segundo composto mostrado (Figura 6.14B) é uma indolinona relacionada ao A-432411, um inibidor da polimerização da tubulina, ligante do sítio da colchicina, que não é substrato da glicoproteína-P²⁶⁶. As predições de alvos moleculares indicam que esse composto pode ser um inibidor de tirosina quinase, alvo molecular de fármacos utilizados na quimioterapia do câncer.

As chalconas também são análogas aos aroilindóis utilizados para a calibração dos modelos de HQSAR. Em razão de sua simplicidade sintética, as chalconas, que possuem atividade antiproliferativa, antimitótica e capacidade de induzir apoptose, também foram avaliadas pelos modelos de HQSAR construídos²⁶⁷. A estrutura geral mostrada na Figura 6.15, recuperada da base de dados ZINC, foi avaliada como apresentando baixa-média potência com apenas 1% de tipos de fragmentos extrapolados, dentro da diversidade química utilizada para a modelagem de HQSAR (Figura 6.13). Assim como os aroilindóis, é possível modificar o esqueleto das chalconas para a obtenção de análogos mais potentes, em razão da versatilidade sintética dos compostos dessa classe, que podem ser substituídos nos anéis A e B. Análogos planejados de chalconas, em colaboração com a Dra Louise Chiaradia, sintetizados no laboratório Estrutura e Atividade, no departamento de Química da UFSC, coordenado pelos Profs. Rosendo Yunes e Ricardo Nunes, foram avaliados experimentalmente e otimizados.

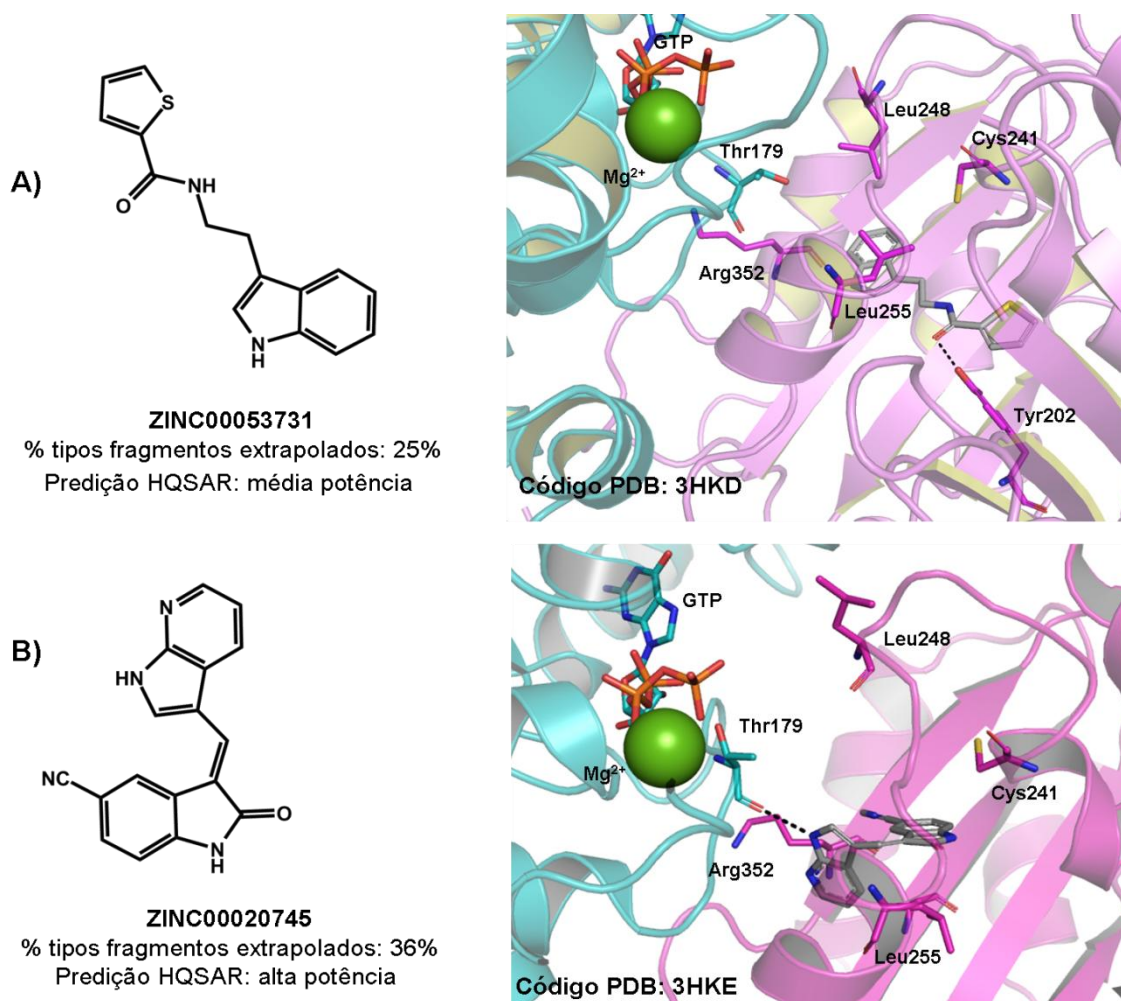


Figura 6.14 - Compostos representativos selecionados a partir do procedimento de triagem virtual para identificação de ligantes do sítio da colchicina (cinza). Interações polares são mostradas em linhas tracejadas. Átomos de hidrogênio não são mostrados para maior clareza.

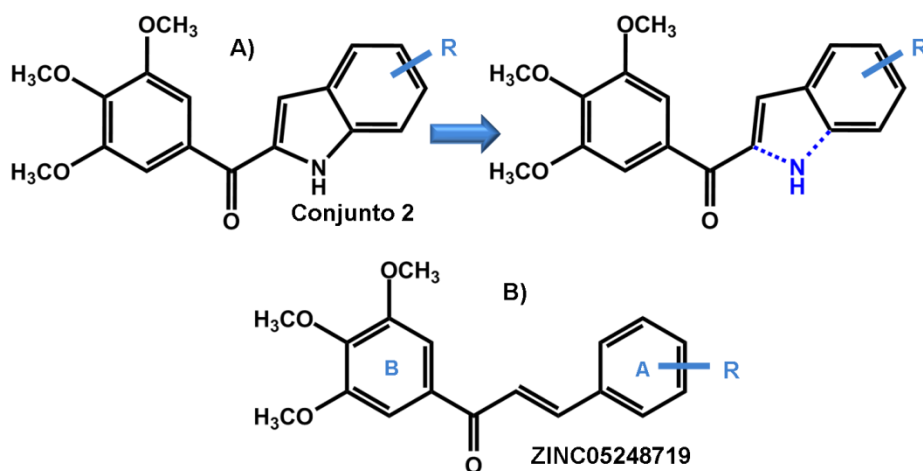


Figura 6.15 - Chalconas (B) são análogas aos aroilindóis (A) e foram selecionadas para avaliação experimental como possíveis ligantes do sítio da colchicina.

6.2 CONSTRUÇÃO DE MODELOS FARMACOFÓRICOS E ESTUDOS DE QSAR 3D PARA CONJUNTOS DE DERIVADOS INDÓLICOS ESTRUTURALMENTE DIVERSOS

As conformações de ligação propostas para os compostos selecionados a partir da estratégia de triagem virtual utilizada nesse trabalho (Figura 6.10) sugerem que o anel indol, comum a vários inibidores da polimerização, pode se posicionar na cavidade de interação da colchicina de diferentes maneiras, o que é um comportamento típico de estruturas privilegiadas. Para melhor entender a influência dos grupos substituintes na atividade citotóxica dos compostos indólicos, três dos quatro conjuntos de dados contendo indóis e derivados, utilizados para a modelagem de HQSAR, foram individualmente estudados a partir de modelos de QSAR 3D. Para o alinhamento estrutural dos conjuntos de dados, hipóteses farmacofóricas baseadas na estrutura dos ligantes foram formuladas e modelos preditivos de QSAR CoMFA e CoMSIA foram então construídos.

6.2.1 Caracterização dos conjuntos de dados

Os três conjuntos de dados distintos utilizados para a proposição de modelos farmacofóricos e modelagem de QSAR 3D consistem de 43 fenilindóis^{262, 263, 27} aroilindóis²⁶¹ e 49 ariltiondóis^{75, 259, 260} e derivados, associados aos valores correspondentes de IC₅₀ (citotoxicidade *in vitro*), variando pelo menos em 2 ordens de magnitude em cada conjunto. (Tabela 6.7). A diversidade química em cada conjunto de dados individual está mostrada na Figura 6.16.

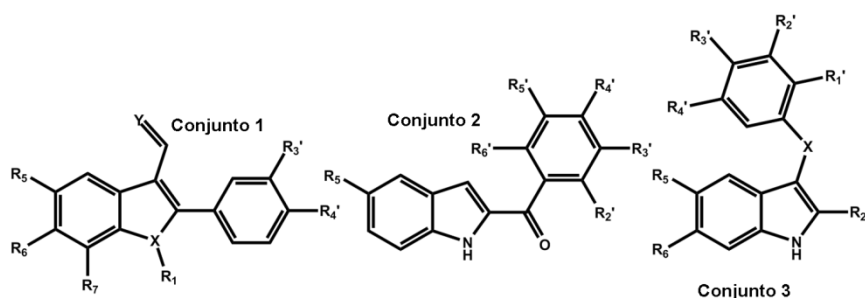


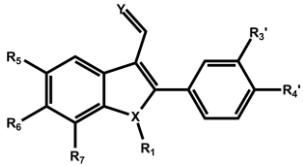
Figura 6.16 – Variações estruturais nos três conjuntos de dados estudados individualmente.

6.2.1.1 Conjunto 1 (2-Fenilindóis)

O conjunto de dados 1 inclui 43 2-fenilindóis-3-substituídos (Figura 6.16). Os valores de IC₅₀, medidos para a linhagem celular MDA-231 (câncer de mama independente de

estrógenos), nas mesmas condições experimentais, variam de 5,5 a 9300 nM, um fator de aproximadamente 1700 vezes (Tabela 6.7). Os valores de pIC_{50} se estendem por mais de 3 ordens de magnitude (5,03 a 8,26)^{262, 263}.

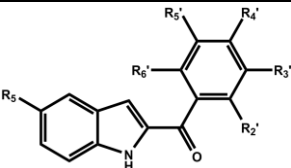
Tabela 6.7 – Conjunto 1 - 2-fenilindóis-3-substituídos.

									
CPT	X	Y	R ₁	R ₅	R ₆	R ₇	R _{3'}	R _{4'}	pIC_{50}
Conjunto treinamento									
1	S	O	-	-H	-OH	-H	-H	-OH	5,03
2	O	O	-	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	5,08
3	N	O	-H	-H	-OH	-H	-H	-H	5,10
4	N	O	-C ₅ H ₁₁	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	5,48
5	N	O	-H	-OH	-H	-H	-H	-OH	5,60
6	N	O	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	5,62
7	N	O	-CH(C ₄ H ₉)CH ₂ -6'	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OH	5,85
8	S	O	-	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	6,00
9	N	O	-H	-F	-H	-H	-H	-OCH ₃	6,27
10	N	N-OH	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-CF ₃	6,30
11	N	O	-H	-H	-H	-H	-H	-OCH ₃	6,33
12	N	O	-H	-H	-H	-H	-H	-H	6,38
13	N	O	-H	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	6,57
14	N	O	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	6,59
15	N	O	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	6,62
16	N	O	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	6,66
17	N	O	-H	-CH ₂ CH(CH ₃) ₂	-H	-H	-H	-OCH ₃	7,14
18	N	O	-H	-H	-F	-H	-H	-OCH ₃	7,23
19	N	O	-H	-CH ₃	-H	-H	-H	-CH ₃	7,32
20	N	O	-H	-C ₅ H ₁₁	-H	-H	-H	-CF ₃	7,38
21	N	N-OH	-H	-C ₅ H ₁₁	-H	-H	-H	-OCH ₃	7,40
22	N	O	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	7,46
23	N	O	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-CH ₃	7,47
24	N	N-OH	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	7,47
25	N	O	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-CF ₃	7,48
26	N	O	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃	7,51
27	N	O	-H	-CH(CH ₃) ₂	-H	-H	-H	-OCH ₃	7,54
28	N	O	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-CH ₂ CH ₃	7,57
29	N	O	-H	-H	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	7,57
30	N	O	-H	-C ₃ H ₇	-H	-H	-H	-OCH ₃	7,70
31	N	O	-H	-H	-Cl	-H	-H	-CH ₃	8,11
32	N	O	-H	-C ₆ H ₁₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	8,13
33	N	N-OH	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-OCH ₃	8,22
34	N	N-OH	-H	-C ₅ H ₁₁	-H	-H	-H	-OCH ₃	8,22
35	N	O	-H	-C ₅ H ₁₁	-H	-H	-H	-OCH ₃	8,26
Conjunto teste									
36	N	O	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	5,55
37	N	O	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-F	6,46
38	N	O	-H	-CH ₂ CH ₃	-H	-H	-H	-C ₄ H ₉	6,52
39	N	O	-H	-CH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	7,07
40	N	O	-H	-C ₆ H ₁₃	-H	-H	-H	-CF ₃	7,37
41	N	N-OH	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-CF ₃	7,49
42	N	O	-H	-CH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	7,59
43	N	O	-H	-C ₄ H ₉	-H	-H	-H	-OCH ₃	8,17

6.2.1.2 Conjunto 2 (Aroilindóis)

O conjunto de dados 2 é composto por 27 aroilindóis (Figura 6.16). Os valores de IC_{50} , medidos para a linhagem celular SK-OV-3 (câncer ovariano) nas mesmas condições experimentais, variam de 11 a 11500 nM, um fator de aproximadamente 1050 vezes (Tabela 6.8). Os valores de pIC_{50} se estendem por 3 ordens de magnitude (4,94 a 7,96)²⁶¹.

Tabela 6.8 – Conjunto 2 – Aroilindóis.

							
CPT	R ₅	R _{2'}	R _{3'}	R _{4'}	R _{5'}	R _{6'}	pIC_{50}
Conjunto treinamento							
1	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₂ CH ₃	-H	-H	4,94
2	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	4,94
3	-OCH ₃	-F	-H	-H	-H	-F	5,06
4	-OCH ₃	-NH ₂	-H	-H	-H	-H	5,42
5	-OCH ₃	-H	-H	-CH ₃	-H	-H	5,73
6	-OCH ₃	-H	-H	-Cl	-H	-H	5,76
7	-OCH ₃	-H	-H	-Br	-H	-H	6,04
8	-CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H	6,12
9	-OCH ₃	-F	-H	-H	-H	-H	6,13
10	-OCH ₃	-CH ₃	-H	-H	-CH ₃	-H	6,14
11	-OCH ₃	-H	-H	-H	-H	-H	6,17
12	-OCH ₃	-CH ₃	-H	-H	-H	-H	6,42
13	-OCH ₃	-H	-SCHF ₂	-H	-H	-H	6,44
14	-OCH ₃	-H	-OCOCH ₂ CH ₃	-H	-H	-H	6,62
15	-OCH ₃	-H	-OH	-H	-H	-H	6,66
16	-OCH ₃	-H	-OCF ₃	-H	-H	-H	6,68
17	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	7,06
18	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	7,24
19	-OCH ₃	-H	-CF ₃	-H	-H	-H	7,52
20	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	7,72
21	-OCH ₃	-H	-F	-H	-H	-H	7,82
22	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	7,96
Conjunto teste							
23	-OCH ₃	-H	-H	-F	-H	-H	5,13
24	-OCH ₃	-H	-SCF ₃	-H	-H	-H	6,20
25	-OCH ₃	-H	-NH ₂	-H	-H	-H	6,64
26	-OCH ₃	-H	-Cl	-Cl	-H	-H	7,00
27	-CH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	7,52

6.2.1.3 Conjunto 3 (Arilindóis e derivados)

O conjunto de dados 3 é constituído por 49 compostos (Figura 6.16). Os valores de IC_{50} , medidos nas mesmas condições experimentais para a linhagem celular MCF-7 (câncer

de mama dependente de estrógenos), variam de 13,30 a 1580 nM, um fator de aproximadamente 120 vezes (Tabela 6.9). Os valores de pIC_{50} se estendem por aproximadamente 2 ordens de magnitude (5,80 a 7,89) ^{75, 259, 260}.

6.2.1.4 Divisão do conjunto de dados

Para a modelagem de QSAR 3D, os conjuntos de dados foram decompostos entre conjuntos teste e treinamento de maneira a assegurar apropriada cobertura da faixa de pIC_{50} , como mostrado na Figura 6.17. Dos conjuntos de dados originais, aproximadamente 80% das moléculas de cada conjunto foi selecionado para calibração dos modelos (conjunto treinamento), sendo que os compostos restantes (aproximadamente 20%) foram utilizados para o processo de validação externa (conjunto teste). Dessa maneira, dos 43 compostos do conjunto de dados 1, 35 compostos foram selecionados para o conjunto treinamento (81%), ficando as 8 moléculas restantes para o conjunto teste (19%). Do total de 27 compostos do conjunto de dados 2, 22 foram utilizados para a calibração do modelo (81%), sendo os 5 restantes utilizados para a validação externa (19%). Dos 49 compostos do conjunto de dados 3, 38 foram utilizados no conjunto treinamento (78%) e 11 para o conjunto teste (22%). Os mesmos conjuntos treinamento e teste foram utilizados para as análises de QSAR 3D CoMFA e CoMSIA, e a qualidade dos modelos foi avaliada pelos valores de q^2_{LOO} e r^2_{pred} .

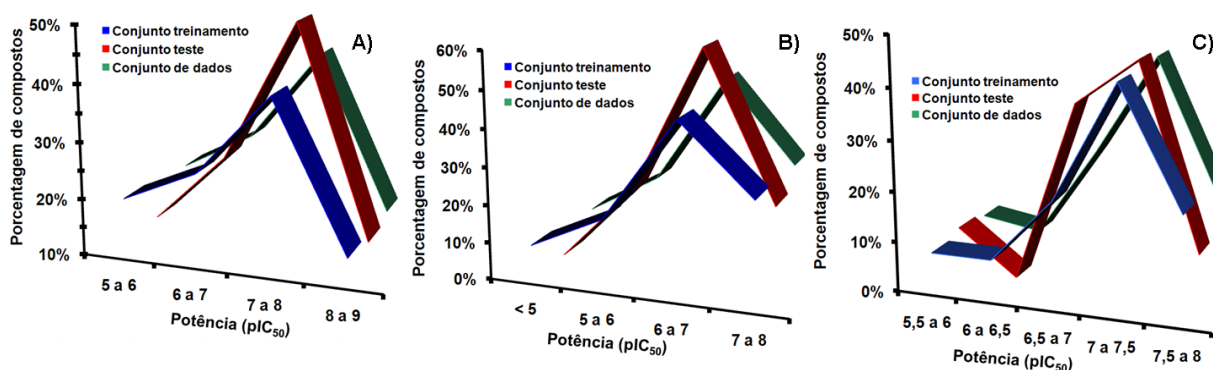


Figura 6.17 - Distribuição dos valores de potência para os conjuntos de derivados indólicos utilizados para a modelagem de QSAR 3D. **A)** conjunto 1, **B)** conjunto 2 e **C)** conjunto 3.

Tabela 6.9 – Conjunto 3 – Ariltioindóis.

CPT	X	R ₂	R ₅	R ₆	R ₁ '	R ₂ '	R ₃ '	R ₄ '	pIC ₅₀
1	S	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	5,80
2	S	-H	-Cl	-H	-H	-CH ₃	-H	-CH ₃	5,92
3	S	-COOCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,00
4	S	-H	-NO ₂	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,25
5	S	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	6,46
6	S	-COOCH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	6,48
7	S	-H	-O(CH ₂) ₂ OCH ₂ Ph	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	6,59
8	CH ₂	-COOCH ₂ CH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,64
9	S	-H	-OH	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,72
10	S	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	6,82
11	CO	-H	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,82
12	S	-COOCH ₃	-NO ₂	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,92
13	S	-COOCH ₂ CH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,96
14	CH ₂	-COOCH ₂ CH ₃	-Br	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,00
15	CH ₂	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,03
16	CO	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,05
17	CH ₂	-COOCH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,06
18	S	-CH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,09
19	CO	-COOCH ₂ CH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,10
20	S	-H	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,11
21	S	-H	-I	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,17
22	CO	-H	-Br	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,22
23	CO	-H	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,28
24	S	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,34
25	S	-COOCH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,38
26	S	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,40
27	S	-COOCH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-H	-OCH ₃	7,47
28	S	-H	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,47
29	S	-COOCH ₃	-Br	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,48
30	CH ₂	-COOCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,48
31	CO	-COOCH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,52
32	CH ₂	-COOCH ₃	-Br	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,52
33	S	-COOCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,60
34	S	-CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,74
35	CO	-COOCH ₃	-Br	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,74
36	CO	-COOCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,77
37	S	-H	-CH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,80
38	S	-COOCH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,89
Conjunto teste									
39	S	-COOCH ₃	-Cl	-H	-OCH ₃	-H	-H	-H	5,89
40	S	-COOCH ₂ CH ₃	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-H	-H	6,55
41	CO	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,70
42	S	-H	-F	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,80
43	CO	-COOCH ₂ CH ₃	-Cl	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	6,96
44	S	-H	-O(CH ₂) ₂ OH	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,02
45	S	-COOCH ₂ CH ₃	-Br	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,08
46	CO	-COOCH ₂ CH ₃	-Br	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,17
47	S	-CH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,34
48	CO	-COOCH ₃	-H	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,48
49	S	-H	-OCH ₃	-H	-H	-OCH ₃	-OCH ₃	-OCH ₃	7,66

6.2.2 Proposição de hipóteses farmacofóricas

Aproximadamente 20% de ligantes estruturalmente representativos de cada um dos conjuntos treinamento (Tabela 6.7) foram selecionados para a construção dos modelos farmacofóricos individuais a partir da superposição de características farmacofóricas e fármaco-estéricas^s compartilhadas, utilizando o programa GALAHAD^{127, 161, 162}. A estratégia utilizada por esse programa consiste na geração de múltiplas conformações de baixa energia para cada um dos compostos selecionados para a construção dos modelos farmacofóricos, e subsequentemente, em múltiplos alinhamentos das características farmacofóricas encontradas nesses ligantes. Os melhores modelos são selecionados tendo-se em vista os melhores compromissos entre a máxima superposição de grupos farmacofóricos e estéricos e os valores mínimos de energia para as conformações superpostas. A informação obtida a partir dos 20 melhores modelos, contendo diferentes balanços entre essas características, foi utilizada para a construção das hipóteses farmacofóricas finais utilizando o programa UNITY, uma vez que esse programa permite maior flexibilidade na escolha das características selecionadas (como raios de tolerância e restrições opcionais)¹⁶³. As hipóteses farmacofóricas finais para os compostos representativos de cada um dos conjuntos de dados podem ser vistas na Figura 6.18.

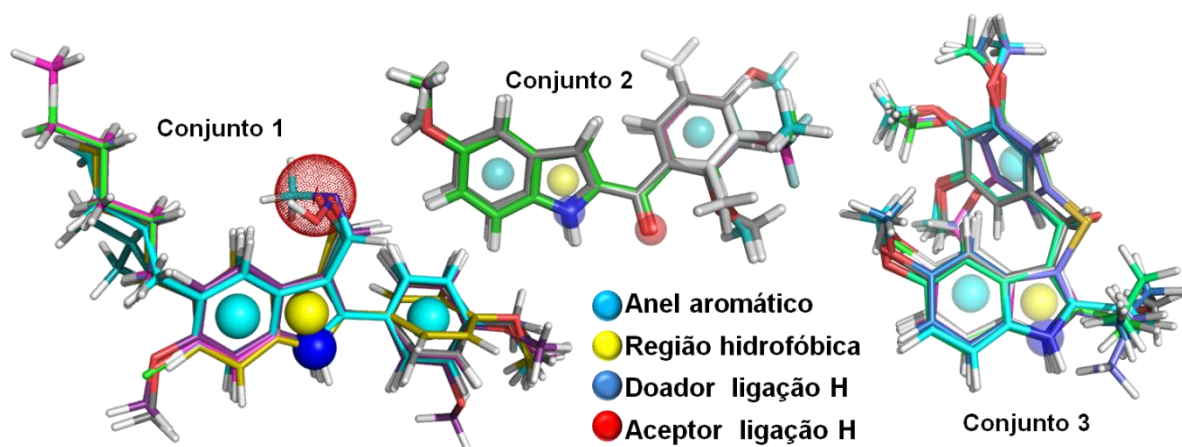


Figura 6.18 - Modelos farmacofóricos criados para os 3 conjuntos de dados utilizados para a modelagem de QSAR 3D.

Como se pode notar, o sistema de anéis aromáticos fundidos, representado pelo grupo indol, assim como o átomo de nitrogênio desse grupo (embora opcional para o primeiro conjunto de dados), são as únicas características comuns mais evidentes presentes nas hipóteses selecionadas para os 3 conjuntos de dados, o que sugere que os demais

^s Não apenas a superposição de características farmacofóricas comuns, mas também o volume, a forma e a geometria dos ligantes são levados em consideração.

grupos substituintes podem modular o modo como esses compostos interagem na cavidade de ligação da colchicina. Para o conjunto 1, o anel fenila substituinte na posição 2 do anel indol, assim também como os grupos aceptores de ligação de hidrogênio substituintes na posição 3, foram também considerados no modelo farmacofórico. Para o conjunto 2, o grupo espaçador carbonila na posição 2, aceptor de ligação de hidrogênio, e também o anel fenila ligado a este espaçador, foram identificados como importantes para a atividade desses compostos. A identificação de características essenciais diferentes para esses 2 conjuntos de dados sugere que essas classes de compostos podem interagir diferentemente na cavidade de interação da colchicina. Para o conjunto 3, o substituinte aromático ligado a um grupo espaçador na posição 3 foi identificado como relevante. Os modelos farmacofóricos 3D construídos foram utilizados para o alinhamento das moléculas pertencentes aos conjuntos de dados individuais para os estudos de QSAR 3D, utilizando a busca flexível 3D implementada no UNITY. As moléculas alinhadas em cada conjunto de dados estão apresentadas na Figura 6.19.

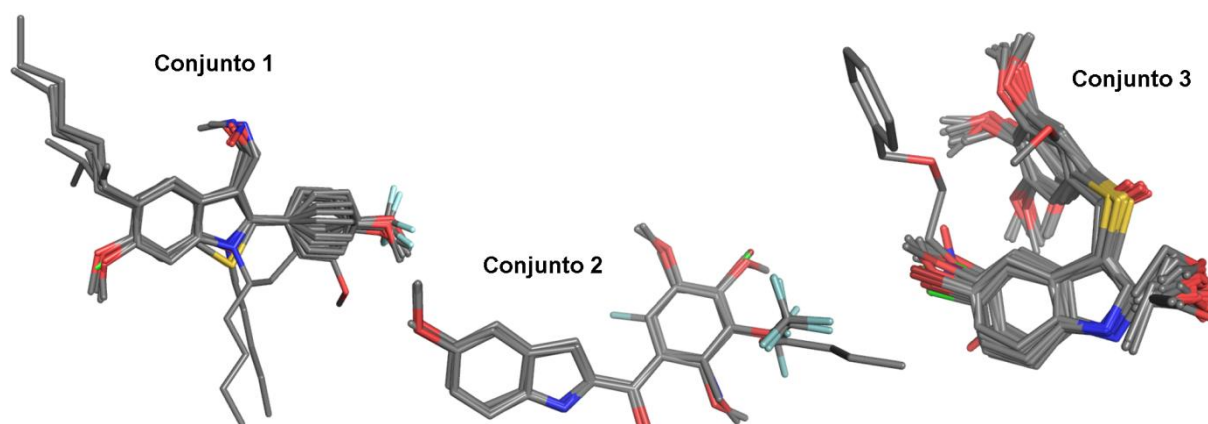


Figura 6.19 – Alinhamentos tridimensionais para os 3 conjuntos de dados estudados individualmente.

6.2.3 Análises de QSAR 3D

6.2.3.1 Estudos de QSAR 3D CoMFA

As propriedades estéricas e eletrostáticas foram calculadas de acordo com os potenciais de Lennard-Jones e Coulomb, respectivamente. O conjunto treinamento alinhado foi posicionado numa grade tridimensional reticulada e os campos do CoMFA foram gerados em cada intersecção dos retículos utilizando o campo de forças Tripos e um átomo de carbono sp^3 com carga positiva (+1). O espaçamento entre as intersecções na grade reticulada foi de 0,5 Å nas direções x, y e z. O processo de focagem da melhor região foi

aplicado para aumentar a resolução dos modelos gerados. Um limite de 30 kcal/mol foi selecionado como valor máximo para as energias de interação estérica e eletrostática. Os descritores do CoMFA foram utilizados como variáveis independentes enquanto os valores pIC_{50} foram utilizados como variáveis dependentes nas análises de PLS para derivar os modelos 3D.

6.2.3.2 Estudos de QSAR 3D CoMSIA

Nesse trabalho, modelos de QSAR 3D CoMSIA também foram construídos para os alinhamentos moleculares propostos, uma vez que os modelos de CoMSIA, via de regra, são menos sensíveis ao alinhamento molecular e resultam em mapas de contorno apresentando interpretação mais simples. Além disso, os modelos de CoMSIA permitem a incorporação de campos de interação molecular adicionais^{159, 160}. Os campos de interação para as propriedades estéricas, eletrostáticas, hidrofóbicas e ligação de hidrogênio foram calculados em cada intersecção da grade reticulada utilizando uma sonda molecular com carga +1, raio 1 Å, hidrofobicidade e atômica e propriedade de ligação de hidrogênio +1^{160, 268}, com fator de atenuação da função Gaussiana dependente da distância (α) de 0,3. O processo de focagem da melhor região foi aplicado para aumentar a resolução dos modelos gerados. Os descritores assim gerados foram utilizados como variáveis independentes enquanto os valores pIC_{50} foram utilizados como variáveis dependentes nas análises de PLS para derivar os modelos 3D.

Os modelos finais de QSAR 3D CoMFA e CoMSIA foram avaliados utilizando os valores de coeficiente de predição (q^2_{LOO}) e correlação (r^2) e externamente validados utilizando os conjuntos testes, não considerados para a geração dos modelos. Os valores de pIC_{50} foram preditos para os compostos do conjunto teste, permitindo a determinação da capacidade preditiva (valores de r^2_{pred}) para os modelos de QSAR 3D individuais. Os melhores resultados estatísticos, para todos os modelos, estão apresentados na Tabela 6.10. Coeficientes estatísticos significativos foram obtidos, uma vez que valores de q^2_{LOO} maiores que 0,64 e r^2 maiores que 0,86 foram alcançados para todos os modelos, utilizando ambos os métodos de QSAR 3D. Como se pode notar, modelos de comparável significância estatística foram obtidos em todos os casos. Procedimentos de LMO com 10 e 5 grupos também foram efetuados e os resultados confirmaram a significância dos modelos de QSAR 3D construídos. A possibilidade de geração de modelos aleatórios foi verificada através da permutação progressiva dos valores da propriedade biológica entre os compostos e a estabilidade dos modelos foi confirmada. Os modelos gerados demonstraram ser estáveis e possuir razoável significância estatística.

Tabela 6.10 – Melhores modelos de QSAR 3D construídos.

Conj	Método	q^2_{LOO}	r^2	SEE	N	E	S	HY	DON	ACC	r^2_{pred}
1	CoMFA	0,76	0,90	0,31	3	0,47	0,53	-	-	-	0,88
	CoMSIA	0,75	0,89	0,31	3	0,18	0,31	0,22	0,20	0,09	0,60
2	CoMFA	0,69	0,86	0,34	2	0,27	0,73	-	-	-	0,70
	CoMSIA	0,84	0,90	0,31	3	0,23	0,54	0,23	-	-	0,60
3	CoMFA	0,64	0,90	0,18	4	0,45	0,55	-	-	-	0,82
	CoMSIA	0,68	0,92	0,16	7	0,31	0,31	0,21	-	0,17	0,70

Conj., conjunto; q^2_{LOO} , coeficiente de correlação da validação cruzada (retirando uma molécula de cada vez); r^2 , coeficiente de correlação; SEE, erro padrão da estimativa; N, número ótimo de componentes principais; S, campo estérico; E, campo eletrostático; HY, campo hidrofóbico; DON, campo doador de ligação de hidrogênio; ACC, campo receptor de ligação de hidrogênio; r^2_{pred} , coeficiente de correlação da predição.

Os resultados do processo de validação externa estão apresentados na Figura 6.20. Valores de r^2_{pred} maiores que 0,60 foram obtidos para os modelos construídos, sendo que os modelos CoMFA apresentaram capacidade preditiva superior em todos os casos (Tabela 6.10). A boa concordância entre os valores experimentais e preditos de pIC_{50} indica a robustez dos modelos construídos. Portanto, pode-se inferir que os modelos individuais apresentaram aceitável capacidade de predição para novos inibidores da polimerização da tubulina dentro da diversidade estrutural em cada conjunto.

As contribuições relativas dos campos estéricos, eletrostáticos, hidrofóbicos e de ligações de hidrogênio variaram bastante para os diferentes conjuntos de dados, como mostrado na Tabela 6.10. Para os modelos CoMFA, os campos estéricos foram mais importantes para a descrição da variância total dos conjuntos de dados do que os eletrostáticos, principalmente para o conjunto 2. Para os modelos CoMSIA, a contribuição das características hidrofóbica e estérica foi ainda mais significativa para o segundo conjunto de dados, enquanto que, para os outros conjuntos de dados, os campos de ligação de hidrogênio apresentaram importância significativa.

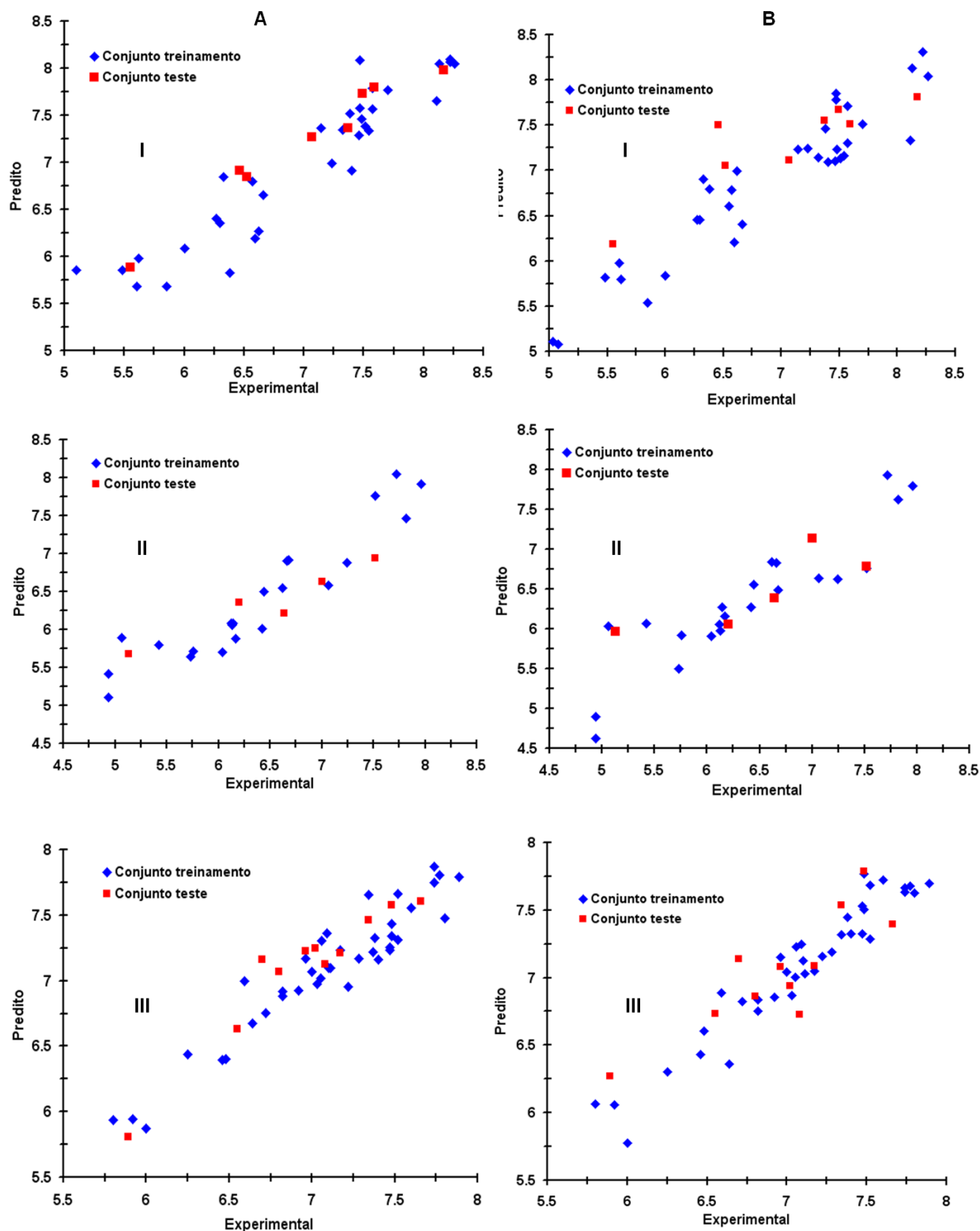


Figura 6.20 - Valores preditos (vermelho) e experimentais (azul) de pIC_{50} para os modelos de QSAR 3D desenvolvidos para os conjuntos de dados individuais. **A)** modelos gerados utilizando o método CoMFA; **B)** modelos gerados utilizando o método CoMSIA; **I)** conjunto 1; **II)** conjunto 2; **III)** conjunto 3.

Os mapas de contorno 3D CoMFA e CoMSIA evidenciam regiões 3D no espaço associadas às características estudadas (estereoquímicas, eletrostáticas, hidrofóbicas e

ligação de hidrogênio) e responsáveis por aumentos e reduções nos valores da variável dependente (pIC_{50}). Tradicionalmente, para os modelos CoMFA e CoMSIA, regiões estéricas desfavoráveis são representadas em amarelo e regiões favoráveis em verde, enquanto os contornos vermelhos representam regiões onde substituintes eletronegativos podem aumentar a atividade biológica e os contornos azuis indicam regiões onde grupos eletropositivos poderiam contribuir para o aumento da potência antiproliferativa. Os mapas de contorno para os modelos construídos estão mostrados na Figura 6.21. Outras sondas moleculares implementadas no programa CoMSIA também foram utilizadas (Figura 6.21B). Os contornos alaranjados e brancos indicam regiões favoráveis para presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, respectivamente. A presença de grupos doadores de ligação de hidrogênio é favorecida nas regiões mostradas em azul claro e desfavoráveis nas regiões mostradas em rosa. As posições mostradas em magenta são favoráveis para a presença de grupos aceptores de ligação de hidrogênio, enquanto as regiões mostradas em vermelho são desfavoráveis para essa característica. Enquanto no método CoMFA os mapas de contorno evidenciam regiões no espaço onde as moléculas poderiam apresentar agrupamentos químicos que contribuem favorável ou desfavoravelmente para a atividade biológica (tomando-se em conta o raio de van der Waals dos substituintes), no método CoMSIA as regiões no ligante são demonstradas. Como esperado, os mapas gerados a partir das análises de QSAR CoMSIA foram significativamente mais contínuos (Figura 6.21) quando se considerou um espaçamento de 0,5 Å entre os vértices da grade reticulada 3D (correspondentes a um quarto do valor padrão).

Para o conjunto de dados 1, o átomo de hidrogênio pouco volumoso e eletropositivo, ligado ao átomo de nitrogênio do anel indol, doador de ligação de hidrogênio, contribui positivamente para a atividade citotóxica dos compostos, como evidenciado nos mapas de contorno 3D CoMFA e CoMSIA. Além disso, grupos substituintes de caráter ambivalente (*i.e.*, grupos volumosos hidrofóbicos, mas eletronegativos) na posição 6, como -Cl ou -OCH₃, mas não -OH, também contribuem para o aumento da potência nessa série de compostos. A atividade antiproliferativa também foi ampliada com o aumento da cadeia alquílica não ramificada, substituinte na posição 5 do sistema de anéis aromáticos, onde grupos doadores de ligações de hidrogênio ou ramificações na cadeia não são favoráveis. Os campos do CoMFA e do CoMSIA também confirmaram a importância do substituinte eletronegativo, hidrofílico e aceptor de ligação de hidrogênio (desfavorável para doador) na posição 3, evidenciada nos modelos farmacofóricos, para a potência dos compostos. Além disso, o substituinte -OCH₃ na posição 4', representado pelo caráter hidrofílico e eletronegativo do átomo de oxigênio e pelo caráter eletropositivo volumoso do grupo -CH₃, foi associado ao aumento da potência para essa classe de compostos (Figura 6.21 I).

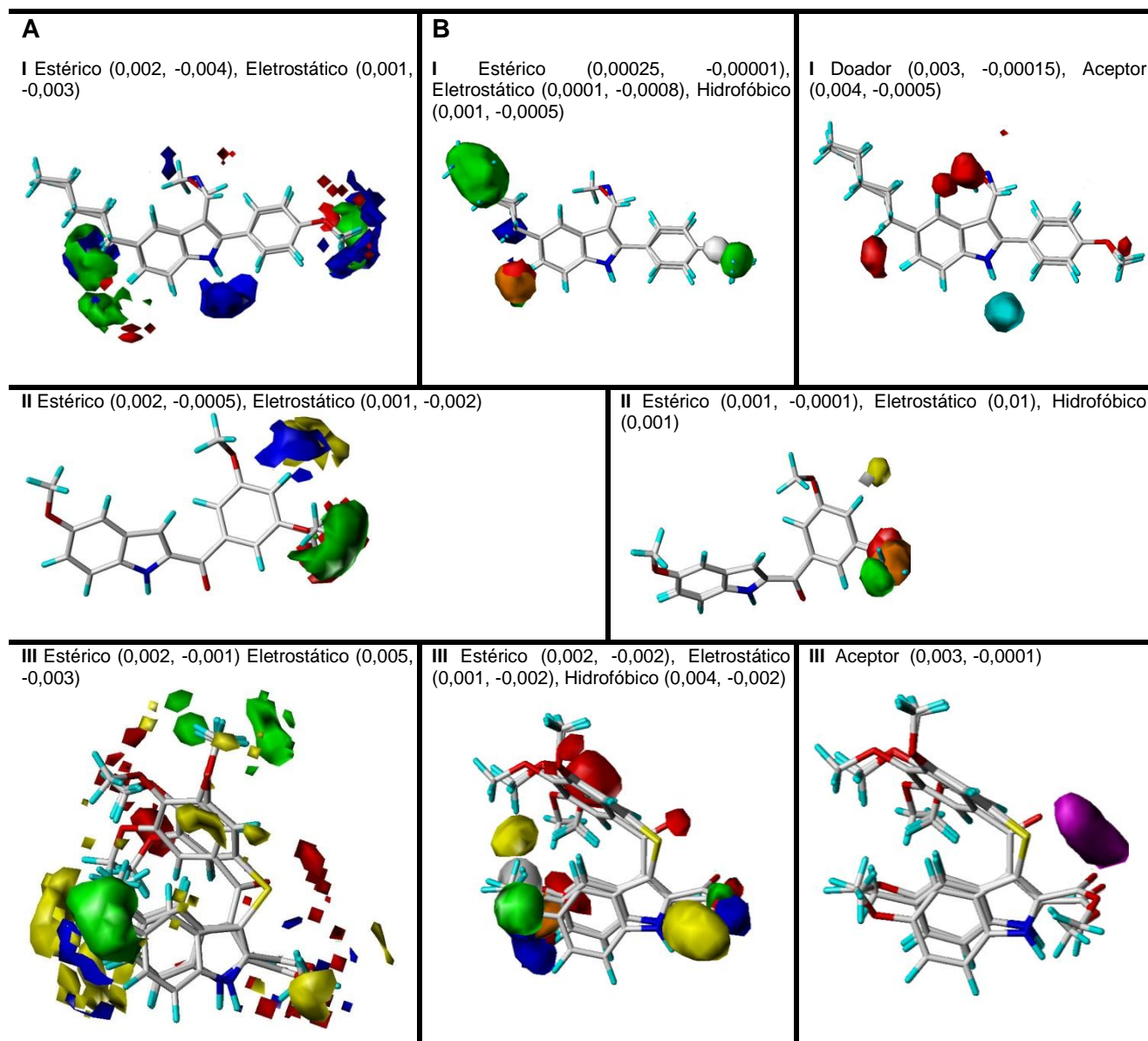


Figura 6.21 - Mapas de contorno **A)** CoMFA e **B)** CoMSIA para os melhores modelos construídos para os conjuntos **(I)** 1, **(II)** 2 e **(III)** 3. Os 3 compostos mais potentes em cada conjunto estão representados em bastão para visualização.

Para o conjunto de dados 2, para o qual as contribuições dos componentes estéricos e hidrofóbicos foram particularmente significativas (Tabela 6.8), grupos não-volumosos e hidrofóbicos em 4' estão relacionados ao aumento da citotoxicidade dos compostos, enquanto em 3' características opostas são favoráveis, já que grupos volumosos, hidrofílicos e eletronegativos são associados ao aumento da potência nessa série de compostos (Figura 6.21 II). Para o último conjunto de dados, substituintes volumosos (com limite de 3 átomos) com as características do grupo éster na posição 2 são associados com o aumento da potência dos compostos. Espaçadores eletronegativos aceptores de ligação de hidrogênio na posição 3, como $-S-$ ou carbonila, mas não $-CH_2$, são também favoráveis para o aumento da citotoxicidade. Além disso, substituintes volumosos e eletronegativos em 2', 3' e 4', mas

não em 1', como $-\text{OCH}_3$, estão relacionados à otimização da potência. Na posição 5, grupos substituintes volumosos, mas não ramificados, hidrofílicos e eletronegativos são favoráveis para a atividade citotóxica nessa série de compostos (Figura 6.21 III).

Como se pode notar, não há uma conexão simples entre as relações estrutura-atividade em cada um dos conjuntos de dados individuais estudados nesse trabalho, o que indica que os derivados indólicos de diferentes conjuntos de dados podem interagir de modos distintos na interface dos heterodímeros de $\alpha\beta$ -tubulina.

6.2.4 Estudos de docagem molecular

Os mapas de QSAR foram analisados no contexto da cavidade de interação da colchicina utilizando os posicionamentos dos compostos dos conjuntos de dados individuais, os quais foram obtidos a partir de estudos de docagem molecular realizados de acordo com o descrito no item 1.6 desse capítulo. Embora os 2-fenilindóis e derivados (conjunto de dados 1) sejam potentes inibidores da polimerização da tubulina através da interação no sítio da colchicina, esses compostos não apresentam o grupo 3,4,5-trimetoxifenila presente nos inibidores clássicos da polimerização da tubulina, como a colchicina, a podofilotoxina e as combretastatinas (Figura 6.1)²⁶³. O mesmo grupo substituinte também está ausente em outros ligantes do sítio da colchicina, como TN16 (Figura 6.5). A importância do grupo formila e dos anéis aromáticos para a atividade citotóxica corrobora com a proposição de um posicionamento semelhante ao TN16, mais enterrado na cavidade (Figura 6.21 A). Para o composto mais potente da série (composto 35), por exemplo, o grupo $-\text{NH}$ do anel indol, identificado como importante para o aumento da potência citotóxica nos modelos de QSAR 3D, estabelecerá uma interação polar com o resíduo de Val238, que também interage com TN16 (Figura 6.22 A). Os substituintes nas posições 5, 6 e 4' preenchem a cavidade de interação, resultando em complementaridade estrutural. O substituinte formila na posição 3 ocupa o mesmo posicionamento da carbonila do grupo pirrolidinadiona do ligante TN16.

Para os aroilindóis (conjunto de dados 2), a importância das contribuições estérica e hidrofóbica, além do substituinte na posição 3', sugere que o composto mais potente da série (composto 22, Figura 6.22 B) pode se posicionar na subregião da cavidade que é ocupada pela região hidrofóbica da colchicina, com o grupo metoxifenila em 3' ocupando a posição desse mesmo substituinte no composto T138067 (Figuras 6.5 e 6.6). O grupo carbonila que liga os dois anéis aromáticos nos aroilindóis estaria ocupando posição similar à do espaçador sulfonamida do inibidor T138067, numa região onde os grupos amida das cadeias principais de Asp251 e Leu255 estariam voltados para o inibidor. Finalmente para os ariltioindóis e derivados (conjunto de dados 3), o grupo 3,4,5-trimetoxifenila, presente

nos inibidores clássicos da polimerização da tubulina, está relacionado ao aumento da potência inibitória de acordo com as análises de QSAR 3D, o que concorda com a proposição de um posicionamento semelhante ao da colchicina, sobreposto ao do composto ABT751 (Figura 6.4), mostrado na Figura 6.22 C para o composto mais potente da série (composto 38). De acordo com o modelo de interação proposto, o substituinte eletronegativo na posição 5, evidenciado nos modelos de QSAR 3D, deve corresponder à posição do grupo metoxila ligado ao anel C da colchicina (Figura 6.4). Além disso, o grupo éster na posição 3 pode ocupar posição semelhante ao grupo 2-acetamida da colchicina, razão pela qual substituintes de volume semelhantes são provavelmente favorecidos de acordo com os modelos de QSAR 3D. A análise dos posicionamentos propostos sugere que, apesar de compartilharem uma estrutura comum, os compostos indólicos podem interagir no mesmo sítio de interação da colchicina, mas de maneiras muito diversas.

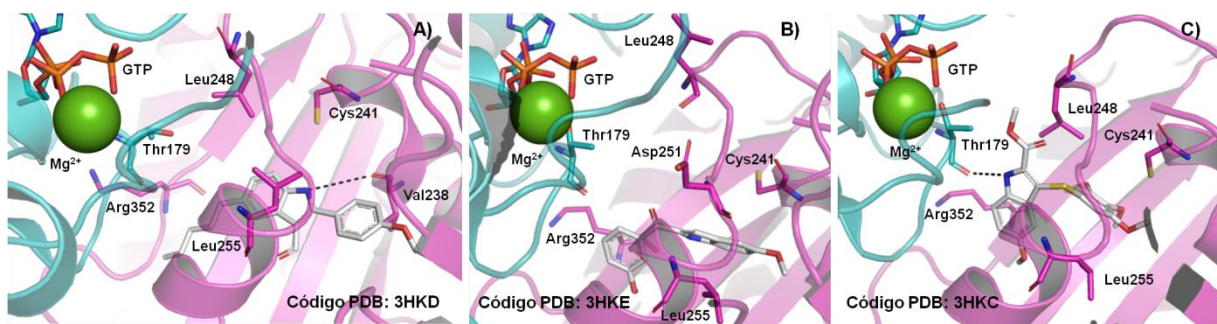


Figura 6.22 - Posicionamentos propostos para compostos representativos de cada conjunto de dados estudado. **A)** composto 35 (conjunto 1); **B)** composto 22 (conjunto 2) e **C)** composto 38 (conjunto 3). O núcleo indol se repete nesses conjuntos de dados, mas ocupa regiões diferentes nos 3 posicionamentos propostos. Os átomos de hidrogênio não foram mostrados.

6.3 PLANEJAMENTO DE CHALCONAS COM ATIVIDADE ANTIMITÓTICA²⁶⁹

6.3.1 Planejamento de chalconas do tipo 1

As chalconas (Figura 6.23) são uma classe de compostos quimicamente versáteis e de fácil síntese e, portanto, representam esqueletos químicos convenientes para o planejamento de novos ligantes do sítio da colchicina (Figura 6.14). Ao longo dos últimos anos, chalconas estruturalmente diversas, com diferentes atividades biológicas, têm sido sintetizadas e avaliadas em trabalhos do laboratório Estrutura e Atividade, coordenado pelos Profs. Rosendo Yunes e Ricardo Nunes, da UFSC²⁷⁰⁻²⁷⁴. Além disso, alguns outros estudos demonstraram que derivados de chalconas apresentam atividade antiproliferativa em várias

linhagens celulares, podendo ter aplicações potenciais no tratamento do câncer²⁷⁵⁻²⁷⁷. Chalconas capazes de competir com [³H] colchicina pela ligação à tubulina também já foram reportadas²⁷⁵.

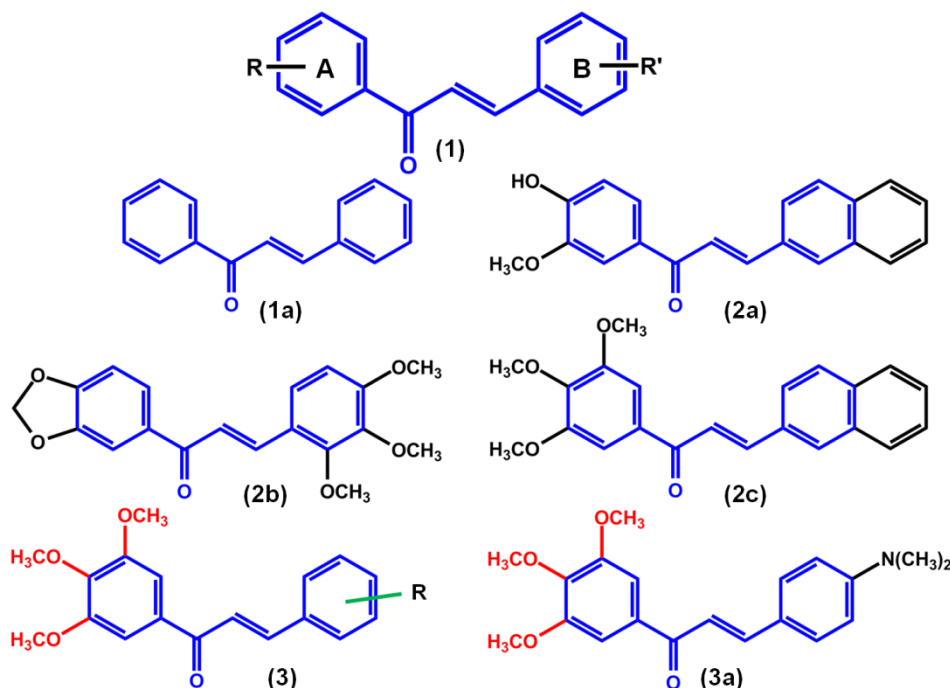


Figura 6.23 – Chalconas dos tipos 1 (**1a**, **2a-2c**) e 2 (**3** e **3a**) planejadas.

Em trabalhos anteriores envolvendo o grupo dos Profs. da UFSC, uma série de chalconas derivadas do 2-naftaldeído foi sintetizada e avaliada em células de leucemia²⁶⁷. Dentre os compostos ensaiados, a chalcona **2a** (Figura 6.23) apresentou citotoxicidade seletiva em células L-1210 (leucemia linfóide aguda murina) e capacidade de provocar interrupção da mitose e de promover apoptose, efeitos celulares característicos de agentes antitubulina¹⁷⁸. A chalcona **2a** apresenta grupos substituintes encontrados na combretastatina A-4 (Figura 6.1), produto natural cujo pró-fármaco de fosfato encontra-se atualmente em triagens clínica para o tratamento de câncer da tireóide.

Nesse trabalho, uma série de chalconas (**1**), baseadas em ligantes clássicos do sítio da colchicina (Figura 6.23), foi planejada, sintetizada e avaliada em relação à sua potência antiproliferativa em células de leucemia L-1210 e aos seus efeitos na polimerização da tubulina purificada. O núcleo fundamental das chalconas (NFC, **1a**) e os derivados **2a**, **2b** e **2c** foram sintetizados por condensação pela Dra. Louise Chiaradia e o mestrando Marlon Cordeiro, supervisionados pelos Profs. Drs. Rosendo Yunes e Ricardo Nunes (Figura 6.23). Como se pode notar, os compostos planejados contêm substituintes nos anéis A e B também encontrados em produtos naturais que se ligam ao sítio da colchicina. A chalcona **2b** contém um grupo dioxol também presente na estrutura da podofilotoxina, com função

semelhante aos substituintes 2-metoxicicloheptatrienona na colchicina ou 2-metoxifenol na combrestastatina A-4. O grupo 2-metoxifenol também está presente no derivado **2a** (Figuras 6.1 e 6.23). O derivado do 2-naftaldeído **2c** contém o grupo 3,4,5-trimetoxifenila, recorrente nas estruturas da colchicina, podofilotoxina e combrestastatina A-4 (Figuras 6.1 e 6.23).

Os derivados de chalconas planejados e sintetizados foram ensaiados em células L-1210, utilizando o método colorimétrico de redução do MTT (do inglês, *3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*) a formazan^t, pela doutoranda Evelyn Winter e o aluno de iniciação científica Bruno Mattei, orientados pela Profa. Dra. Tânia Creczynski-Pasa, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC e pela mestrandia Fernanda Pedrini, orientada pela Profa. Maria Cláudia da Silva, do Departamento de Análises Clínicas da UFSC. Os ensaios de polimerização *in vitro* em tubulina purificada foram realizados em colaboração com o Dr. Hikmat Daghestani, orientado pelo Prof. Dr. Billy Day, do *Department of Pharmaceutical Sciences, University of Pittsburgh*. Os resultados estão mostrados na Tabela 6.11. Enquanto o esqueleto geral não substituído 1,3-difenilpropenona, (**1a**), não inibiu a polimerização da tubulina em concentrações de até 10 µM, o derivado **2c**, contendo o grupo 3,4,5-trimetoxifenila presente em vários ligantes clássicos do sítio da colchicina, foi o composto mais potente da série, inclusive mais citotóxico que o derivado **2a**, também derivado do 2-naftaldeído. O derivado **2c** inibiu a polimerização da tubulina com potência similar à encontrada para a colchicina.

Tabela 6.11 – Efeitos de citotoxicidade (células L-1210) e de inibição da polimerização da tubulina para as chalconas avaliadas.

Chalcona	IC ₅₀ (48 hs)	IC ₅₀
	Inibição do crescimento celular (L-1210)	Inibição da polimerização da tubulina
Colchicina	não determinado	2,3 ± 0,4 µM
NFC	não determinado	< 10 µM
2a	54 ± 0,5 µM	3,6 ± 1,2 µM
2b	47,5 ± 1,5 µM	< 10 µM
2c	26 ± 1,0 µM	2,2 ± 0,5 µM
3a	30 ± 1,0 µM	2,8 ± 0,9 µM

6.3.2 Planejamento de chalconas do tipo 2

A importância do substituinte 3,4,5-trimetoxifenila para a inibição da polimerização da tubulina e para a atividade citotóxica motivou a síntese de uma nova série de chalconas

^t O ensaio é baseado na redução do corante amarelo MTT, pelas desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas, a formazan, de coloração púrpura²⁷⁸.

apresentando o esqueleto geral **3**, mostrado na Figura 6.23. Dezenove chalconas do tipo 2 foram sintetizadas e avaliadas em células de leucemia L-1210. A mais potente delas, a chalcona **3a**, apresentou potência similar à chalcona **2c**, a mais potente do tipo 1 (Figura 6.23 e Tabela 6.11). A chalcona **3a**, juntamente com algumas chalconas do tipo 1, foi também avaliada em células JURKAT (linhagem de linfócitos T linfoblásticos humanos) e REH (linhagem celular linfóide humana), como modelos adicionais de leucemia, no laboratório de Biologia Molecular do Hospital Infantil Boldrini, em Campinas, pelos mestrandos Rafael Canevarolo e Carolina Souza, orientados pelo Dr. José Andrés Yunes. O método colorimétrico MTT-formazan foi utilizado para os testes. A chalcona **3a**, do tipo 2, apresentou IC₅₀ próximo a 1 µM em ambas as linhagens de células. As chalconas do tipo 1 apresentaram potência semelhante e a colchicina foi cerca de 10 vezes mais potente que as chalconas nessas linhagens celulares. A chalcona **3a** também apresentou capacidade de inibir a polimerização da tubulina com potência similar à encontrada para a colchicina (Tabela 6.11).

Os efeitos das chalconas mais potentes dos tipos 1 e 2 foram também comparados em ensaios celulares de alto conteúdo, realizados em *The University of Pittsburgh Drug Discovery Institute*, sob orientação do Dr. Andreas Vogt, e em ensaios de inibição da migração em células de câncer de mama MDA-MB231, realizados em colaboração com a doutoranda Wanessa Alteji, orientada pelo Prof. Dr. Adriano Andricopulo.

6.3.3 Ensaios celulares de alto conteúdo comparativos

Os agentes antitubulina caracteristicamente provocam interrupção do ciclo e perturbações nos microtúbulos celulares^{177, 178}. Para estudar os efeitos das chalconas dos tipos 1 e 2 em células e se esses compostos provocam interrupção da mitose assim como a colchicina, análises celulares de alto conteúdo multiparamétricas foram realizadas. Para tal, a colchicina e as chalconas **1a**, **2a**, **2b** e **2c**, do tipo 1, além da chalcona **3a**, a mais potente do tipo 2, foram investigadas e comparadas em suas habilidades em provocar perturbações dos microtúbulos, morfologia de apoptose e fosforilação de histona H3 (um marcador de mitose) em células HeLa. As células foram detectadas por contracoloração nuclear por HOECHST 33342, que também fornece informação sobre condensação da cromatina e densidade celular como marcadores de morte celular. Os ensaios celulares de alto conteúdo foram utilizados para verificar os efeitos agudos provocados pelos compostos testados nas células que permaneceram nos poços após o tempo de exposição (18 h). As células mortas ou não aderidas foram lavadas e desprezadas, e as alterações fenotípicas foram estudadas nas células restantes.

A avaliação quantitativa dos marcadores para morfologia nuclear (contracoloração com HOECHST 33342), interrupção da mitose (imunomarcação com anticorpos anti-fosfo-histona H3) e perturbação dos microtúbulos (imunomarcação com anticorpos anti- α -tubulina) confirmou que, enquanto **1a** e **2b** não provocaram toxicidade para as células HeLa em concentrações tão altas quanto 50 μ M, a colchicina e as chalconas **2a** e **2c**, derivadas do 2-naftaldeído, além de **3a**, provocaram redução da densidade celular nos poços, condensação da cromatina e aumento da porcentagem de células com níveis elevados de fosfo-histona H3 (Tabela 6.12). Em concordância com os ensaios em células de leucemia, colchicina foi cerca de 10 vezes mais potente que as chalconas mais potentes em células HeLa. A chalcona **3a** foi cerca de duas vezes mais potente que a chalcona **2c** e nove vezes mais potente que **2a**. As curvas para colchicina, **2a**, **2c** e **3a** também apresentaram a resposta bifásica típica para agentes desestabilizadores de microtúbulos: em baixas concentrações, a densidade dos microtúbulos aumentou, possivelmente em razão do encolhimento e arredondamento das células, provocando concentração dos microtúbulos numa área celular menor. Em altas concentrações, houve uma redução da intensidade nas medidas para a densidade dos microtúbulos, provavelmente provocada pela modificação do equilíbrio da dinâmica dos microtúbulos para a formação de heterodímeros não polimerizados (Figura 6.2) que puderam ser extraídos durante os processos de permeabilização e lavagem das células (Figura 6.24)^{177, 178}. Os valores de EC₅₀ foram obtidos a partir das curvas de dose-resposta para as medidas de densidade celular (Figura 6.24 A). Para as curvas de condensação da cromatina, densidade de microtúbulos e índice mitótico, medidas de concentração mínima efetiva detectável (MDEC, do inglês, *minimum detectable effective concentration*) foram utilizadas (Figuras 6.24 B-D) porque a forma das curvas obtidas inviabilizou a determinação de valores de IC₅₀^{177, 178}.

Tabela 6.12 – Análises de alto conteúdo para interrupção da mitose em células HeLa tratadas com derivados de chalconas.

Composto	EC ₅₀ (nM) Densidade celular	MDEC(nM)		
		Condensação nuclear	Intensidade para tubulina	Índice mitótico
Colchicina	33 ± 4	12 ± 5	10 ± 4	16 ± 3
NFC	> 50000	> 50000	> 50000	> 50000
2a	3300 ± 600	2200 ± 700	1100 ± 200	1400 ± 100
2b	> 50000	> 50000	> 50000	> 50000
2c	684 ± 139	317 ± 23	283 ± 52	397 ± 24
3a	357 ± 35	217 ± 67	139 ± 13	200 ± 15

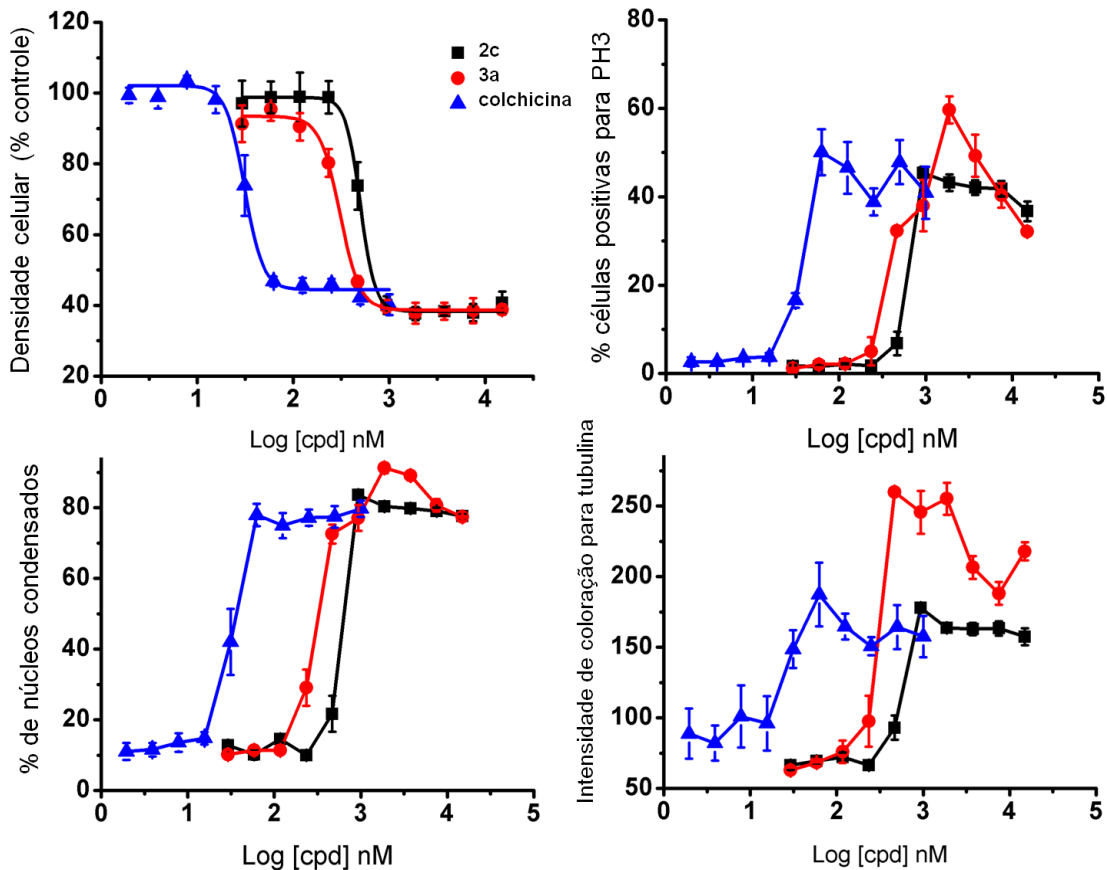


Figura 6.24 - Análises de alto conteúdo para interrupção da mitose e alterações nos microtúbulos para células expostas a agentes antitubulina. As células foram tratadas em placas de 384 poços com diluições de 10 vezes de colchicina ou das chalconas **2c** e **3a**, e analisadas para **A)** densidade celular, **B)** índice mitótico, **C)** condensação da cromatina e **D)** densidade de microtúbulos. Todos os compostos provocaram perda celular, aumento do índice mitótico, condensação nuclear e aumento inicial da densidade de microtúbulos que foi revertida em altas concentrações.

A análise de fotomicrografias para a marcação do núcleo (em azul), da tubulina (em verde) e de fosfo-histona H3 (amarelo-vermelho) sugeriu que as células expostas ao veículo (DMSO 0,1%, controle negativo) apresentaram microtúbulos organizados e baixa porcentagem de células mitóticas (campos representativos estão mostrados na Figura 6.25). Concentrações citotóxicas, na faixa do médio nanomolar de colchicina (controle positivo), e alto nanomolar de **2c** e **3a**, provocaram desorganização dos microtúbulos e aumento da porcentagem de células mitóticas. A análise da contracoloração do núcleo indicou também a presença de núcleos apoptóticos, condensados e fragmentados.

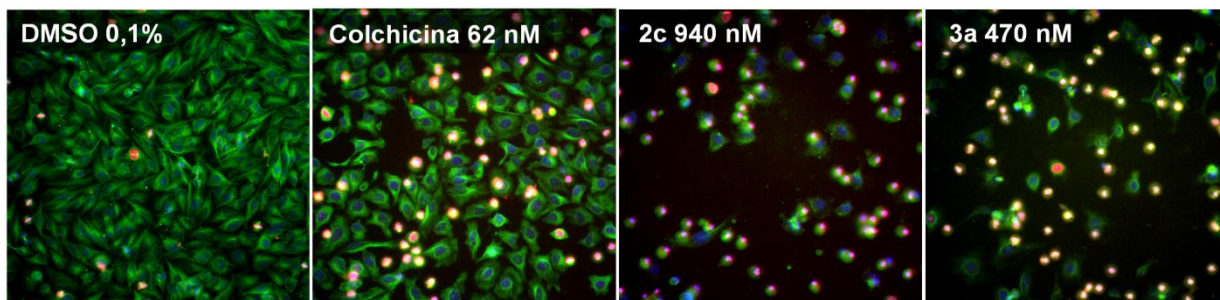


Figura 6.25 - Imunomarcção para interrupção na mitose em células HeLa. As células foram tratadas com **A)** DMSO 0,1%, **B)** colchicina 62 nM, **C)** chalcona **2c**, mais potente do tipo 1 (940 nM) ou **D)** chalcona **3a**, mais potente do tipo 2 (470 nM), e marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde), anti-fosfo-histona H3 (amarelo-vermelho) e HOECHST 33342 (azul).

6.3.4 Efeitos na migração celular

A migração direcional de células de câncer metastáticas requer alterações na polaridade das células e o remodelamento do citoesqueleto, o que depende da regulação dos microtúbulos, actina e filamentos intermediários nas células. Dessa forma, além dos efeitos na divisão celular, agentes antitubulina também interferem com a migração celular¹⁸⁴⁻¹⁸⁶. Por essa razão, os efeitos na migração celular provocados por colchicina, e as chalconas mais potentes dos tipos 1 e 2, **2c** e **3a**, foram também avaliados e comparados em células de câncer de mama invasivas não-dependentes de estrógenos (MDA-MB-231).

Os compostos foram primeiramente avaliados em ensaios de cicatrização celular *in vitro* (*wound healing*). Os resultados, apresentados na Figura 6.26, foram utilizados para a seleção das concentrações seriadas para os ensaios de migração quantitativos utilizando câmaras de Boyden. Como esperado, a chalcona **3a**, do tipo 2, foi mais potente que a chalcona **2c**, do tipo 1, em ambos em ensaios. Interessantemente, como mostrado na Tabela 6.13, a chalcona **3a** demonstrou potência semelhante à da colchicina nos ensaios de migração em células MDA-MB-231.

Os resultados dos testes celulares para as chalconas planejadas nesse trabalho corroboraram com os resultados para inibição da polimerização da tubulina e encorajaram o planejamento e a investigação do mecanismo de ação citotóxica de outros análogos de chalconas modificados no esqueleto central. Dessa forma, *N*-acilhidrazonas e tiosemicarbazonas também foram estudadas.

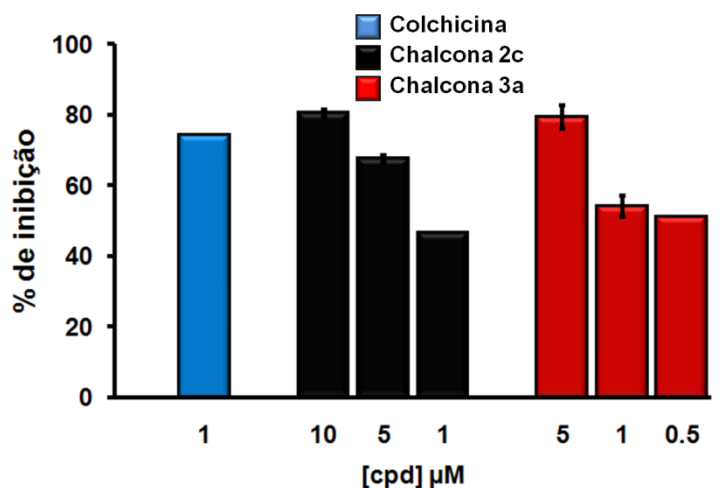


Figura 6.26 - Ensaio de cicatrização celular *in vitro* para avaliação da inibição da migração de células MDA-MB-231 por colchicina e pelas chalconas **2c** e **3a** em três concentrações diferentes.

Tabela 6.13 – Efeitos das chalconas 2c e 3a na migração das células MDA-MB-231.

Composto	Cicatrização celular <i>in vitro</i> (% de inibição a 1 μM)	IC ₅₀ (nM) ^z Ensaio de migração celular quantitativo em câmara de Boyden
Colchicina	74 ± 2	475 ± 106
2c	46 ± 2	1095 ± 29
3a	54 ± 3	656 ± 119

6.3.5 Proposição de análogos restritos

O sistema enona, presente na estrutura das chalconas, pode adotar duas conformações distintas, *s-cis* ou *s-trans*, dependendo das posições relativas das ligações C=O e C=C (Figura 6.27). Análises conformacionais demonstraram que as chalconas não substituídas em α preferencialmente adotam a conformação *s-cis*. Entretanto, análogos contendo substituintes que favoreçam a conformação *s-trans* por impedimento estérico, ou análogos conformacionalmente restritos, resultam em maior afinidade por tubulina^u. A orientação dos dois anéis aromáticos é, portanto, uma característica relevante para a atividade das chalconas^{74, 275, 280}. Esse resultado já era esperado, levando-se em consideração que os grupos substituintes nas *s-trans* chalconas podem se sobrepor aos

^u Em estudos em que foram utilizados cálculos de mecânica molecular, a diferença entre os conformeros *s-cis* e *s-trans* de mais baixa energia para chalconas não substituídas em α, como as estudadas nesse trabalho, é da ordem de 3,87 kJ.mol⁻¹^{278, 279}.

grupos de propriedades semelhantes na estrutura da colchicina, o mesmo não sendo verificado para os análogos *s-cis* (Figuras 6.1 e 6.23). Além disso, a configuração do sistema enona é também importante (Figura 6.27)^{275, 278}. As constantes de acoplamento dos sinais nos espectros de RMN ¹H para a série de chalconas do tipo 1 e 2 sintetizadas nesse trabalho revelam que as estruturas são *E*-chalconas, exceto para a chalcona **3a**, a mais potente do tipo 2, que é uma mistura dos isômeros configuracionais *E* e *Z* (2:1). A configuração *Z* é menos estável em razão dos efeitos estéricos entre a carbonila e o anel B. Alguns trabalhos demonstram que chalconas de configuração *E* são mais potentes que as correspondentes *Z*-chalconas, o que seria contrário à observação de que a chalcona **3a** está entre as mais potentes dentre as chalconas avaliadas nesse trabalho^{275, 278}.

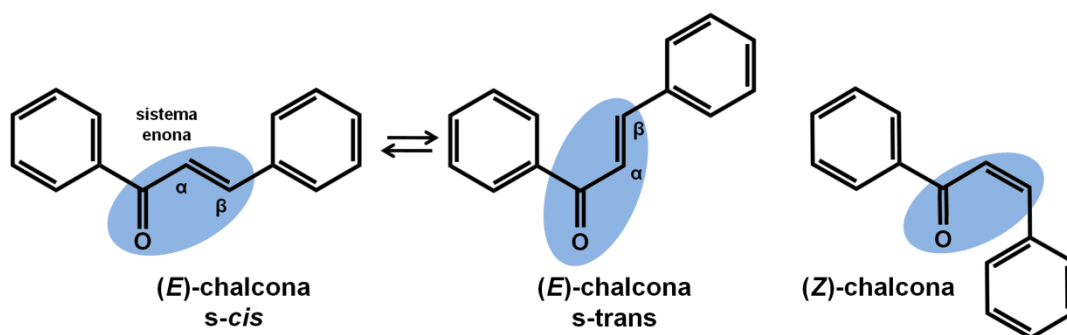


Figura 6.27 – Configurações e conformações das chalconas.

Uma vez que a orientação espacial dos anéis aromáticos é uma característica importante para a inibição da polimerização da tubulina, diferentes condições de reação estão sendo utilizadas para obtenção de diferentes proporções dos isômeros geométricos da chalcona **3a** para avaliações biológicas. Além disso, análogos conformacionalmente restritos da chalcona **3a** estão sendo planejados e sintetizados pelo mestrando Marlon Cordeiro e a Dra. Louise Chiaradia, no grupo dos Profs. Rosendo Yunes e Ricardo Nunes. A avaliação desses análogos em ensaios de polimerização da tubulina e em ensaios de crescimento e migração celular será importante para o estudo da influência da posição dos grupos substituintes para a atividade desses compostos.

6.4 PLANEJAMENTO DE DERIVADOS *N*-ACIL-HIDRAZÔNICOS COM ATIVIDADE ANTI-PROLIFERATIVA

Chalconas dos tipos 1 e 2 foram planejadas, sintetizadas, avaliadas em ensaios celulares e de polimerização da tubulina, e comparadas com a colchicina. Os derivados mais potentes, **2c** e **3a**, apresentaram potência inibitória da polimerização da tubulina e da

migração celular na mesma ordem de grandeza que as determinadas para a colchicina. Esses mesmos compostos também demonstraram atividade antimitótica em ensaios de alto conteúdo para interrupção da mitose. Entretanto, as chalconas mais potentes foram cerca de 10 vezes menos tóxicas em células de leucemia que o controle positivo. Concentrações maiores que as de colchicina também foram necessárias para inibir a adesão e a sobrevivência de células HeLa. Uma nova série de *N*-benzilideno-3,4,5-trimetoxi-benzo-hidrazidas, análogas às 3,4,5-trimetoxichalconas, foi então planejada (Figura 6.28). Assim como as chalconas, as benzilidenos-benzo-hidrazidas apresentam esqueletos químicos convenientes para o planejamento de inibidores da polimerização da tubulina em razão de sua simplicidade e versatilidade química.

Derivados de *N*-acil-hidrazonas são compostos amplamente descritos na literatura, com diferentes atividades biológicas reportadas. O próprio esqueleto central das *N*-acil-hidrazonas pode ser considerado uma estrutura privilegiada ao qual podem ser adicionados substituintes em posições específicas para fornecer grupos capazes de interagir seletivamente com diferentes alvos biológicos, resultando em diferentes atividades farmacológicas^{281, 282}.

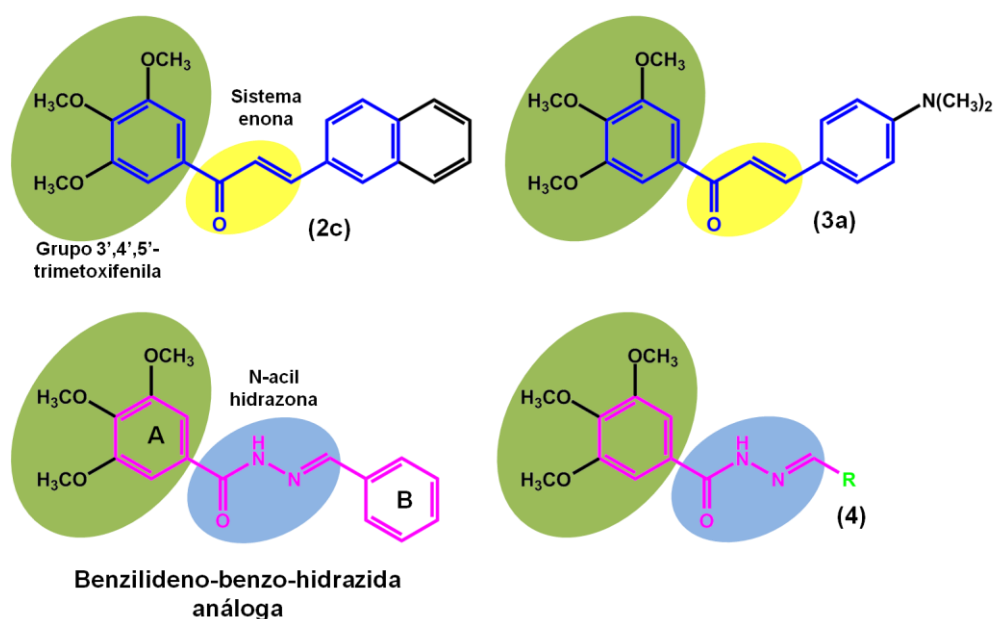


Figura 6.28 - Derivados de 3',4',5'-trimetoxichalconas inibidoras da polimerização dos microtúbulos (2c e 3a) inspiraram a proposição de 24 análogos modificados no esqueleto central, os derivados da *N'*-benzilideno-3,4,5-trimetoxibenzo-hidrazida (4) que contêm um esqueleto central *N*-acil-hidrazona substituído com um grupo 3,4,5-trimetoxifenila no anel A e um anel aromático em R (anel B).

Quatro estados conformacionais principais podem ser atribuídos à unidade central *N*-acil-hidrazona e devem ser levados em consideração no planejamento de novos inibidores da tubulina (Figura 6.29). Estruturas cristalográficas de derivados das (*E*)-*N*-benzilideno-

benzo-hidrazidas sugerem que, nos confôrmeros mais estáveis, a estrutura é linear, mais parecida com a representada em 2D para o conformação A. Nessa conformação, entretanto, os substituintes do sistema *N*-acil-hidrazona não podem se sobrepor aos grupos de características semelhantes na estrutura dos ligantes clássicos do sítio da colchicina. Análises conformacionais de derivados de *N*-acil-hidrazonas análogos às (*E*)-*N*-benzilideno-benzo-hidrazidas estudadas nesse trabalho, sugerem, entretanto, que, em solvente aquoso, as diferenças de energia entre diferentes conformações populadas podem ser tão pequenas quanto 1 kcal/mol, permitindo que diferentes estados conformacionais coexistam nesse ambiente^v. Os derivados de *N*-acil-hidrazonas foram sintetizados e avaliados em células de leucemia, em ensaios de polimerização da tubulina e através de análises de alto conteúdo. Como os compostos encontram-se atualmente em processo de proteção intelectual, os resultados não serão apresentados nessa tese.

Assim como algumas substituições em α nas (*E*)-chalconas favorecem a conformação *s*-trans, a conformação B pode ser favorecida em análogos *N*-metil-substituídos das *N*-acil-hidrazonas em solvente aquoso²⁸². Restrições conformacionais provocadas pelo substituinte podem resultar em aumento da afinidade devido à redução do custo entrópico para ligação ao alvo molecular. Análogos conformacionalmente restritos também estão sendo planejados para a continuação desse trabalho.

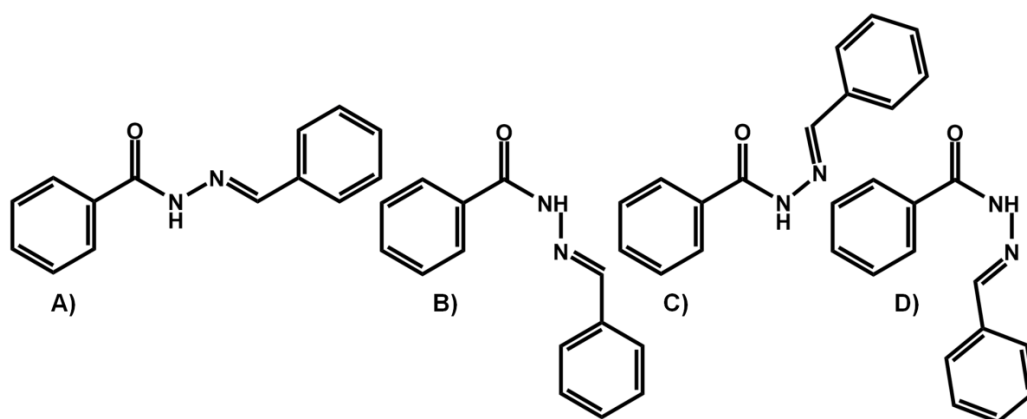


Figura 6.29 - Principais estados conformacionais que podem ser atribuídos à unidade central *N*-acil-hidrazona.

^v Para *N*-acil-hidrazonas não substituídas em *N*, como as estudadas nesse trabalho, o mesmo estudo indicou que a conformação D se convertia espontaneamente para B em solução. As diferenças energéticas entre as conformações A, B e C eram desprezíveis.

6.5 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE TIOSEMICARBAZONAS CITOTÓXICAS²⁸³

Uma série de 13 derivados da 2-acetilpiridina-*N*⁴-fenil-tiosemicarbazona (Figura 6.31, H₂Ac₄Ph, **5**) e seus complexos de Gálio correspondentes foi planejada e sintetizada pela doutoranda Josane Lessa, orientada pela Profa. Dra. Heloísa Beraldo, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Os compostos foram avaliados em células de câncer de mama humano dependente de estrógenos (MCF-7) e em linhagens de células de glioma malignos (T98G e U87) pela doutoranda Marcella Soares, orientada pela Dra. Raquel Santos, do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, CDTN, em Belo Horizonte. Os derivados foram citotóxicos para as três linhagens celulares em concentrações nanomolares, mas não apresentaram toxicidade significativa em eritrócitos humanos, sugerindo aceitável toxicidade preliminar. Estudos das alterações fenotípicas provocadas pelos compostos em células indicaram que apoptose e autofagia poderiam estar envolvidos no mecanismo de ação dos derivados. Uma vez que, além de apoptose, morte celular autofágica pode ser provocada por agentes antitubulina, os efeitos provocados pelo análogo *para*-clorofenila, H₂Ac₄pClPh, **5a**, na polimerização da tubulina *in vitro*, e em ensaios de alto conteúdo, foram estudados (Figura 6.30)²⁸⁴. O complexo de gálio do análogo **5a**, [Ga(2Ac₄pClPh)₂]NO₃, assim como o sal de gálio, Ga(NO₃)₃.xH₂O, também foram investigados, para estabelecer se a complexação ao metal provoca um aumento na potência do ligante, uma vez que sais de gálio já foram previamente reportados como capazes de inibir a polimerização da tubulina e provocar efeitos antimitóticos em células L-1210²⁸⁵.

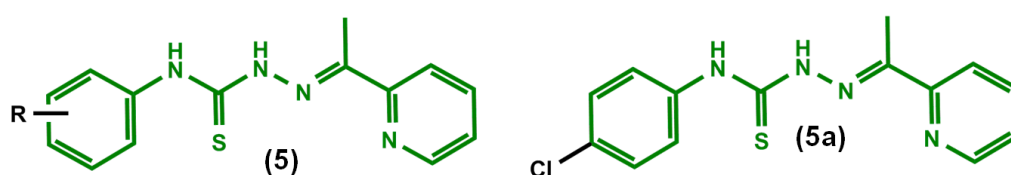


Figura 6.30 - Uma série de tiosemicarbazonas (**5**) foi investigada. O análogo **5a** e seu complexo de gálio, Ga(**5a**)₂NO₃, foram avaliados em seus efeitos na polimerização da tubulina e em ensaios celulares de alto conteúdo para a determinação do mecanismo de ação citotóxica desses compostos.

6.5.1 Efeitos na polimerização da tubulina

Pelo menos 3 concentrações seriadas do ligante **5a**, seu complexo de gálio Ga(**5a**)₂NO₃ e do sal de gálio Ga(NO₃)₃.xH₂O foram avaliadas em relação aos seus efeitos na polimerização da tubulina (Figura 6.31). O sal de gálio Ga(NO₃)₃.xH₂O não apresentou atividade mesmo em concentrações de 40 μM, enquanto o derivado **5a** e seu complexo de

gálio $\text{Ga}(\mathbf{5a})_2\text{NO}_3$ inibiram a polimerização da tubulina em altas concentrações. Embora uma pequena concentração de colchicina ($2,5 \mu\text{M}$) tenha reprimido completamente a formação dos polímeros, 100% de inibição da polimerização não foi observado para a tiosemicarbazona $\mathbf{5a}$ ou seu complexo de gálio, mesmo em concentrações próximas aos limites de solubilidade para esses compostos.

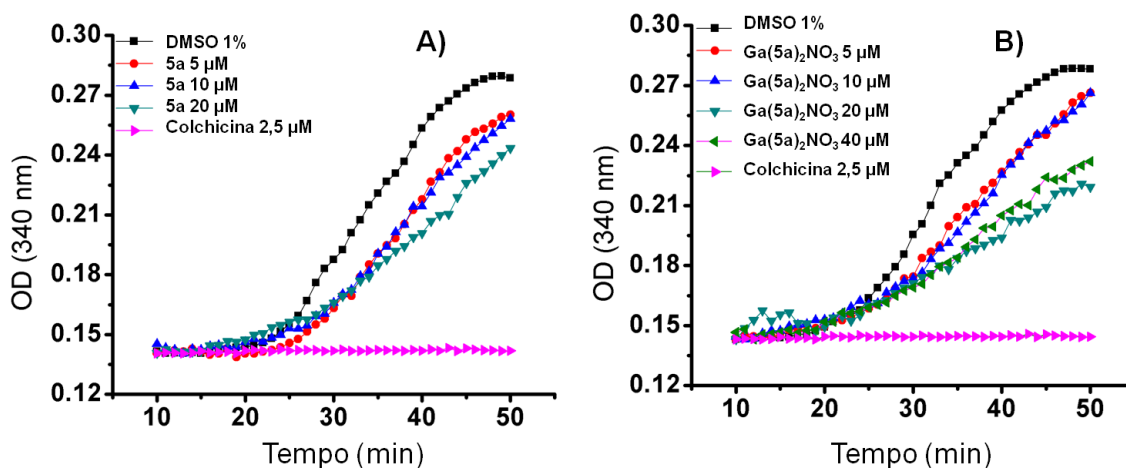


Figura 6.31 - Inibição da polimerização da tubulina purificada *in vitro*. **A)** $\mathbf{5a}$ e **B)** o seu complexo $\text{Ga}(\mathbf{5a})_2\text{NO}_3$ inibiram parcialmente a polimerização da tubulina de maneira concentração-dependente.

6.5.2 Análises mutiparamétricas de alto conteúdo

O fato de que a tiosemicarbazona $\mathbf{5a}$ e seu complexo de gálio $\text{Ga}(\mathbf{5a})_2\text{NO}_3$ aparentemente inibiram a polimerização da tubulina purificada *in vitro* de maneira concentração-dependente motivou a investigação do efeito desses compostos na perturbação dos microtúbulos celulares e na interrupção da mitose utilizando ensaios celulares de alto conteúdo.

A análise de fotomicrografias de fluorescência para a marcação do núcleo, da tubulina e de fosfo-histona H3 indicou que, enquanto as células tratadas com DMSO 0,1% apresentaram microtúbulos organizados e baixa porcentagem de células mitóticas, concentrações nanomolares de colchicina induziram desorganização de microtúbulos e interrupção na mitose. Concentrações na faixa do baixo micromolar de $\mathbf{5a}$ e do complexo $\text{Ga}(\mathbf{5a})_2\text{NO}_3$ provocaram desorganização dos microtúbulos com diminuição aparente da quantidade de tubulina nas células e perda da estrutura celular. A análise da contracoloração dos núcleos indicou também a presença de núcleos condensados e fragmentados típicos de apoptose. Entretanto, em contraste com a colchicina, que provocou um aumento do número de células positivas para fosfo-histona H3, esse mesmo fenótipo não foi observado

para **5a** e **Ga(5a)₂NO₃**, sugerindo que esses compostos não interrompem a células em mitose (Figura 6.32).

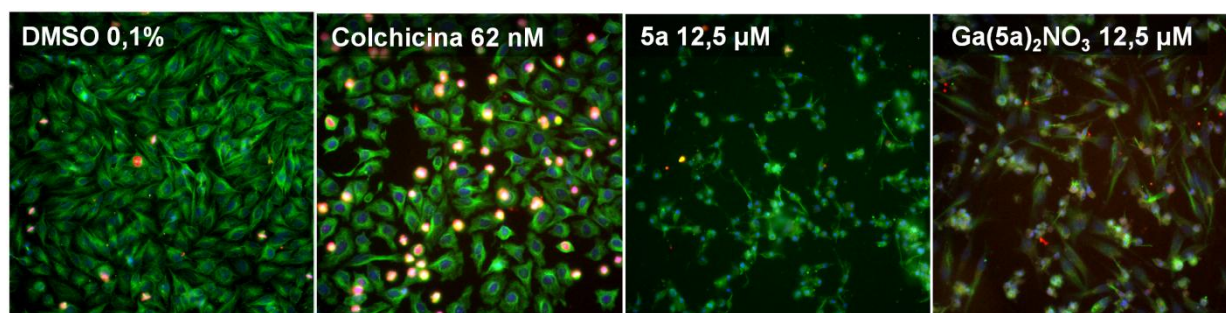


Figura 6.32 - Imunomarcção para interrupção da mitose em células HeLa, tratadas com **A)** DMSO 0,1% (controle negativo), **B)** colchicina 62 nM, **C)** 5a 12,5 μM ou **D)** o complexo de Gálio **Ga(5a)₂NO₃** 12,5 μM e marcadas com anticorpos anti- α -tubulina (verde), anti-fosfo-histona H3 (amarelo-vermelho) e HOECHST 33342 (azul).

Os resultados do ensaio para interrupção da mitose multiparamétrico também indicaram que colchicina, **5a** e **Ga(5a)₂NO₃** provocaram redução da densidade celular (Figura 6.33). Conquanto a tiosemicarbazona **5a** e seu complexo de gálio **Ga(5a)₂NO₃** tenham demonstrado atividade citotóxica em concentrações na faixa do baixo nanomolar em células de glioma e de câncer de mama, concentrações maiores (micromolares) foram requeridas para inibir a adesão e a sobrevivência das células HeLa (Tabela 6.14)²⁸⁶. É importante ressaltar, entretanto, que, os ensaios de alto conteúdo são utilizados nesse trabalho para avaliar efeitos tóxicos agudos provocados pela exposição das células aos compostos, e, portanto, as avaliações são realizadas em diferentes períodos de tempo (48 e 18 h, respectivamente). As células tratadas com colchicina, **5a** e **Ga(5a)₂NO₃** apresentaram cromatina condensada e alterações dos microtúbulos. A colchicina também provocou um aumento concentração-dependente da porcentagem de células com níveis elevados de fosfo-histona H3, enquanto **5a** e **Ga(5a)₂NO₃** não demonstraram o mesmo comportamento (Figura 6.33). Portanto, apesar da habilidade de **5a** e de seu complexo de gálio **Ga(5a)₂NO₃** em inibir parcialmente a polimerização da tubulina e provocar desorganização dos microtúbulos, esses compostos não provocaram interrupção da mitose. Como consequência, interação direta com tubulina provavelmente não é responsável pela potente atividade citotóxica e efeitos pro-apoptóticos associados a esses compostos. Novos análogos contendo grupos metoxila nas posições 3, 4 e 5 em R poderão ser planejados (Figura 6.30).

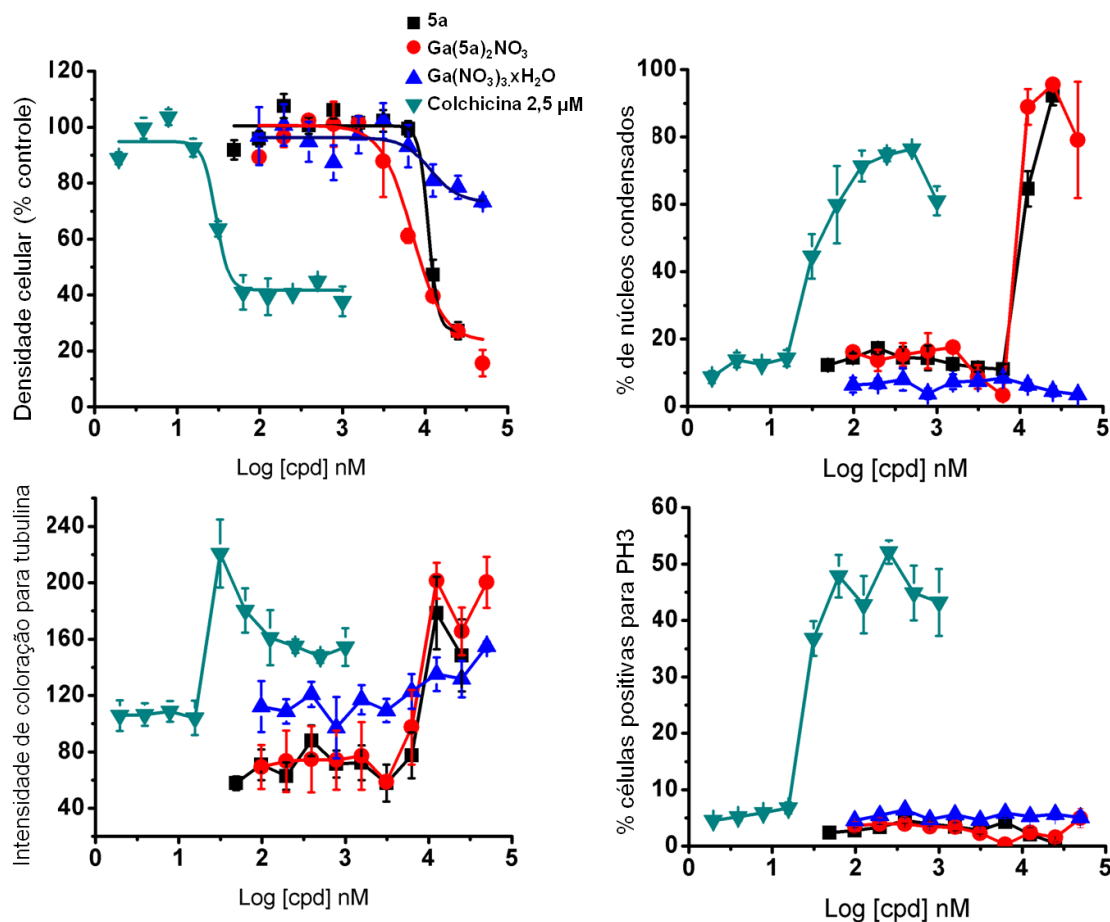


Figura 6.33 - Análises de alto conteúdo para perfis de interrupção da mitose e alterações nos microtúbulos para células expostas aos compostos avaliados. As células foram tratadas em placas de 384 poços com diluições de 10 vezes de colchicina ou dos derivados **5a**, **Ga(5a)₂NO₃**, ou **Ga(NO₃)₃.xH₂O** e analisadas para **A**) densidade celular, **B**) condensação da cromatina, **C**) densidade de microtúbulos e **D**) índice mitótico. Todos os compostos, exceto o sal de gálio, **Ga(NO₃)₃.xH₂O**, provocaram redução da densidade celular, condensação nuclear e perturbações dos microtúbulos celulares. Colchicina, um agente antimitótico típico, provocou aumento do índice mitótico, o que não foi observado para os outros compostos.

Tabela 6.14 - Resultados das análises de alto conteúdo em células HeLa.

Composto	EC ₅₀ (nM) Densidade celular	MDEC(nM)		
		Condensação nuclear	Intensidade de tubulina	Índice mitótico
Colchicina	33 ± 4	12 ± 5	10 ± 4	16 ± 3
5a	9200 ± 800	5800 ± 2000	3600 ± 100	> 50000
Ga(5a) ₂ NO ₃	7300 ± 300	4400 ± 900	2700 ± 500	> 50000
Ga(NO ₃) ₃ .xH ₂ O	> 50000	> 50000	> 50000	> 50000

Capítulo 7

Conclusões & Perspectivas

Contar é muito, muito difícil. Não pelos anos que se já passaram. Mas pela astúcia que têm certas coisas passadas - de fazer balancê, de se remexerem dos lugares.
Guimarães Rosa (Grande Sertão: Veredas)

7.1 CONCLUSÕES

Nessa tese de doutorado, as estratégias de planejamento baseadas na estrutura do receptor e do ligante foram integradas para estudar os requerimentos de ligação de agentes antitubulina às suas cavidades de interação nos microtúbulos, os quais representam um importante alvo molecular para o desenvolvimento de compostos com atividade anticâncer. A informação obtida a partir dos estudos de ligantes estruturalmente diversos e quimicamente complexos das diversas cavidades de interação extensas da tubulina, um alvo flexível e dinâmico, foi utilizada para a proposição e para a seleção de compostos estruturalmente mais simples em diferentes estratégias de triagem virtual. Em conjunto com abordagens experimentais, os estudos resultaram na identificação de chalconas e *N*-acil-hidrazonas, versáteis e de fácil síntese, apresentando atividade antiproliferativa, antitubulina, antimitótica e inibitória da migração celular, e de caseobliquinas, produtos naturais estabilizadores de microtúbulos com atividade citotóxica.

A integração de métodos computacionais de SBDD e LBDD com métodos bioquímicos foi característica importante nesse projeto de doutorado, evidenciada pelos artigos em colaboração e de revisão publicados durante esse período, listados nos anexos da presente tese.

7.2 PERSPECTIVAS

A organização de informações relevantes a respeito da interação da tubulina com seus ligantes resultou na proposição de modelos de interação entre promotores e inibidores da polimerização dos microtúbulos com suas respectivas cavidades de ligação no receptor-alvo. Estudos adicionais do sistema tubulina/microtúbulos poderão contribuir para confirmar essas hipóteses ou fundamentar a proposição de outras sugestões no processo iterativo de planejamento de compostos com atividade anticâncer. Nesse contexto, tentativas de cristalização da tubulina com os ligantes identificados nesse trabalho foram executadas em colaboração com a doutoranda Daiana Martil, orientada pelo prof. Dr. Otávio Thiemann, do IFSC, e a profa. Dra. Tatiane Balliano, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sendo que esse projeto está sendo continuado pelo doutorando Ricardo Santos. A obtenção de uma estrutura cristalográfica da tubulina em complexo com esses ligantes seria de grande importância para o entendimento das interações ligante-receptor relevantes para o reconhecimento molecular e atividade biológica. Essa tarefa é, entretanto, bastante complexa já que não há estruturas em complexo com estabilizadores que tenham sido

obtidas por cristalografia de raios-X e nem informação estrutural para inibidores em complexo com tubulina na ausência da proteína acessória estatimina. Além disso, uma nova série de caseobliquinas está sendo avaliada em ensaios de polimerização da tubulina purificada *in vitro* pelo doutorando Ricardo Santos, para o estabelecimento das relações estrutura-atividade nessa classe de produtos naturais identificados como estabilizadores de microtúbulos.

Uma vez que a orientação espacial dos anéis aromáticos foi identificada como uma característica importante para a ligação ao sítio da colchicina e inibição da polimerização da tubulina, análogos conformacionalmente restritos das chalconas e *N*-acilhidrazonas identificadas estão sendo sintetizados no Laboratório Estrutura e Atividade, UFSC, e avaliados pela doutoranda Wanessa Altei. Os resultados gerados a partir dessas novas análises serão importantes para a proposição de novos compostos e otimização da estrutura molecular dos ligantes da tubulina identificados durante esse período.

Referências

"Porque a cabeça da gente é uma só, e as coisas que há e que estão para haver são demais de muitas, muito maiores diferentes, e a gente tem de necessitar de aumentar a cabeça, para o total."

Guimarães Rosa (Grande Sertão : Veredas)

- 1 NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). *Comprehensive cancer information*. 2007. Disponível em: < <http://progressreport.cancer.gov/> >. Acesso em: maio 2011.
- 2 AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). *Cancer facts and figures 2010*. 2008. Disponível em: < <http://www.cancer.org> >. Acesso em: maio 2011.
- 3 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). *Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil*. 2009. Disponível em: < www.inca.gov.br >. Acesso em: maio 2011.
- 4 WEINBERG, R. A. How cancer arises. *Scientific American*, v. 275, n. 3, p. 62-70, 1996.
- 5 HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.
- 6 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n.5, p. 646-674, 2011.
- 7 BROWN, C. J.; LAIN, S.; VERMA, C. S.; FERSHT, A. R.; LANE, D. P. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. *Nature Reviews Cancer*, v. 9, n. 12, p. 862-873, 2009.
- 8 WARNER, S. L.; GRAY, P. J.; VON HOFF, D. D. Tubulin-associated drug targets: Aurora kinases, Polo-like kinases, and others. *Seminars in Oncology*, v. 33, n. 4, p. 436-448, 2006.
- 9 KEEN, N.; TAYLOR, S. Aurora-kinase inhibitors as anticancer agents. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 12, p. 927-936, 2004.
- 10 ROWINSKY, E. K. The development and clinical utility of the taxane class of antimicrotubule chemotherapy agents. *Annual Reviews of Medicine*, v. 48, p. 353-374, 1997.
- 11 RUDOLF, E.; CERVINKA, M. Topoisomerases and tubulin inhibitors: a promising combination for cancer treatment. *Current Medicinal Chemistry – Anti-cancer Agents*, v. 3, n. 6, p. 421-429, 2003.
- 12 HOCHHAUSER, D. Modulation of chemosensitivity through altered expression of cell cycle regulatory genes in cancer. *Anticancer Drugs*, v. 8, n. 10, p. 903-910, 1997.
- 13 SHEN, Z. Genomic instability and cancer: an introduction. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 3, n. 1, p. 1-3, 2011.
- 14 KAPOOR, T. M.; MAYER, T. U.; COUGHLIN, M. L.; MITCHISON, T. J. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *The Journal of Cell Biology*, v. 150, n. 5, p. 975-988, 2000.
- 15 LUO, L. et al. ATP-competitive inhibitors of the mitotic kinesin KSP that function via an allosteric mechanism. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 11, p. 722-726, 2007.

16 WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 93, n. 9, p. 2325-2327, 1971.

17 NAMES for hi-jacking. *Nature*, v. 373, n. 6513, p. 370, 1995.

18 ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C. Taxol: twenty years later, the story unfolds. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 83, n. 24, p. 1778-1781, 1991.

19 DONEHOWER, R. C.; ROWINSKY, E. K. An overview of experience with TAXOL (paclitaxel) in the U.S.A. *Cancer Treatment Reviews*, v. 19, Supplement C., p. 63-78, 1993.

20 CRAGG, G. M. Paclitaxel (Taxol): a success story with valuable lessons for natural product drug discovery and development. *Medicinal Research Reviews*, v. 18, n. 5, p. 315-331, 1998.

21 LAZO, J. S.; TAMURA, K.; VOGT, A.; JUNG, J. K.; RODRIGUEZ, S.; BALACHANDRAN, R.; DAY, B. W.; WIPF, P. Antimitotic actions of a novel analog of the fungal metabolite palmarumycin CP1. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 296, n. 2, p. 364-371, 2001.

22 JORDAN, A.; HADFIELD, J. A.; LAWRENCE, N. J.; MCGOWN, A. T. Tubulin as a target for anticancer drugs: agents which interact with the mitotic spindle. *Medicinal Research Reviews*, v. 18, n. 4, p. 259-296, 1998.

23 ISLAM, M. N.; ISKANDER, M. N. Microtubulin binding sites as target for developing anticancer agents. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 4, n. 10, p. 1077-10104, 2004.

24 FRENSE, D. Taxanes: perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, n. 6, p. 1233-1240, 2007.

25 LI, H.; DEROSIER, D. J.; NICHOLSON, W. V.; NOGALES, E.; DOWNING, K. H. Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure*, v. 10, n. 10, p. 1317-1328, 2002.

26 HOWARD, J.; HYMAN, A. A. Growth, fluctuation and switching at microtubule plus ends. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 10, n. 8, p. 569-574, 2009.

27 KERSSEMAKERS, J. W.; MUNTEANU, E. L.; LAAN, L.; NOETZEL, T. L.; JANSON, M. E.; DOGTEROM, M. Assembly dynamics of microtubules at molecular resolution. *Nature*, v. 442, n. 7103, p. 709-712, 2006.

28 BERGSTRALH, D. T.; TING, J. P. Microtubule stabilizing agents: their molecular signaling consequences and the potential for enhancement by drug combination. *Cancer Treatment Reviews*, v. 32, n. 3, p. 166-179, 2006.

29 KESKIN, O.; DURELL, S. R.; BAHAR, I.; JERNIGAN, R. L.; COVELL, D. G. Relating molecular flexibility to function: a case study of tubulin. *Biophysical Journal*, v. 83, n. 2, p. 663-680, 2002.

- 30 JORDAN, M. A.; WENDELL, K.; GARDINER, S.; DERRY, W. B.; COPP, H.; WILSON, L. Mitotic block induced in HeLa cells by low concentrations of paclitaxel (Taxol) results in abnormal mitotic exit and apoptotic cell death. *Cancer Research*, v. 56, n. 4, p. 816-825, 1996.
- 31 OJIMA, I. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new-generation taxoids. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3203-3221, 2008.
- 32 XIA, S.; KENESKY, C. S.; RUCKER, P. V.; SMITH, A. B. III; ORR, G. A.; HORWITZ, S. B. A photoaffinity analogue of discodermolide specifically labels a peptide in beta-tubulin. *Biochemistry*, v. 45, n. 39, p. 11762-11775, 2006.
- 33 TER HAAR, E.; KOWALSKI, R. J.; HAMEL, E.; LIN, C. M.; LONGLEY, R. E.; GUNASEKERA, S. P.; ROSENKRANZ, H. S.; DAY, B. W. Discodermolide, a cytotoxic marine agent that stabilizes microtubules more potently than taxol. *Biochemistry*, v. 35, n. 1, p. 243-250, 1996.
- 34 JUNG, W. H.; HARRISON, C.; SHIN, Y.; FOURNIER, J. H.; BALACHANDRAN, R.; RACCOR, B. S.; SIKORSKI, R. P.; VOGT, A.; CURRAN, D. P.; DAY, B. W. Total synthesis and biological evaluation of C16 analogs of (-)-dictyostatin. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 13, p. 2951-2966, 2007.
- 35 LÖWE, J.; LI, H.; DOWNING, K. H.; NOGALES, E. Refined structure of alpha beta-tubulin at 3.5: a resolution. *Journal of Molecular Biology*, v. 313, n. 5, p. 1045-1057, 2001.
- 36 XIAO, H.; VERDIER-PINARD, P.; FERNANDEZ-FUENTES, N.; BURD, B.; ANGELETTI, R.; FISER, A.; HORWITZ, S. B.; ORR, G. A. Insights into the mechanism of microtubule stabilization by Taxol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 103, n. 27, p. 10166-10173, 2006.
- 37 MYLES, D. C. Novel biologically active natural and unnatural products. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, n. 6, p. 627-633, 2003.
- 38 DRUBIN, D. G.; KIRSCHNER, M. W. Tau protein function in living cells. *The Journal of Cell Biology*, v. 103, n. 6, p. 2739-2746, 1986.
- 39 HIROKAWA, N.; SHIOMURA, Y.; OKABE, S. Tau proteins: the molecular structure and mode of binding on microtubules. *The Journal of Cell Biology*, v. 107, n. 4, p. 1449-1459, 1988.
- 40 KAR, S.; FLORENCE, G. J.; PATERSON, I.; AMOS, L. A. Discodermolide interferes with the binding of tau protein to microtubules. *FEBS Letters*, v. 539, n. 1-3, p. 34-36, 2003.
- 41 KHRAPUNOVICH-BAINE, M.; MENON, V.; YANG, C. P.; NORTHCOTE, P. T.; MILLER, J. H.; ANGELETTI, R. H.; FISER, A.; HORWITZ, S. B.; XIAO, H. Hallmarks of molecular action of microtubule stabilizing agents: effects of epothilone B, ixabepilone, peloruside A, and laulimalide on microtubule conformation. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 13, p. 11765-78, 2011.
- 42 ALLER, S. G.; YU, J.; WARD, A.; WENG, Y.; CHITTABOINA, S.; ZHUO, R.; HARRELL, P. M.; TRINH, Y. T.; ZHANG, Q.; URBATSCH, I. L.; CHANG, G. Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding. *Science*, v. 323, n. 5922, p. 1718-1722, 2009.

43 WIESEN, K. M.; XIA, S.; YANG, C. P.; HORWITZ, S. B. Wild-type class I beta-tubulin sensitizes Taxol-resistant breast adenocarcinoma cells harboring a beta-tubulin mutation. *Cancer Letters*, v. 257, n. 2, p. 227-235, 2007.

44 ORR, G. A.; VERDIER-PINARD, P.; MCDAID, H.; HORWITZ, S. B. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. *Oncogene*, v. 22, n. 47, p. 7280-7295, 2003.

45 VERDIER-PINARD, P.; SHAHABI, S.; WANG, F.; BURD, B.; XIAO, H.; GOLDBERG, G. L.; ORR, G. A.; HORWITZ, S. B. Detection of human betaV-tubulin expression in epithelial cancer cell lines by tubulin proteomics. *Biochemistry*, v. 44, n. 48, p. 15858-15870, 2005.

46 KOWALSKI, R. J.; GIANNAKAKOU, P.; GUNASEKERA, S. P.; LONGLEY, R. E.; DAY, B. W.; HAMEL, E. The microtubule-stabilizing agent discodermolide competitively inhibits the binding of paclitaxel (Taxol) to tubulin polymers, enhances tubulin nucleation reactions more potently than paclitaxel, and inhibits the growth of paclitaxel-resistant cells. *Molecular Pharmacology*, v. 52, n. 4, p. 613-622, 1997.

47 ISBRUCKER, R. A.; CUMMINS, J.; POMPONI, S. A.; LONGLEY, R. E.; WRIGHT, A. E. Tubulin polymerizing activity of dictyostatin-1, a polyketide of marine sponge origin. *Biochemical Pharmacology*, v. 66, n. 1, p. 75-82, 2003.

48 MADIRAJU, C.; EDLER, M. C.; HAMEL, E.; RACCOR, B. S.; BALACHANDRAN, R.; ZHU, G.; GIULIANO, K. A.; VOGT, A.; SHIN, Y.; FOURNIER, J. H.; FUKUI, Y.; BRUCKNER, A. M.; CURRAN, D. P.; DAY, B. W. Tubulin assembly, taxoid site binding, and cellular effects of the microtubule-stabilizing agent dictyostatin. *Biochemistry*, v. 44, n. 45, p. 15053-15063, 2005.

49 BUEY, R. M.; BARASOAIN, I.; JACKSON, E.; MEYER, A.; GIANNAKAKOU, P.; PATERSON, I.; MOOBERRY, S.; ANDREU, J. M.; DÍAZ, J. F. Microtubule interactions with chemically diverse stabilizing agents: thermodynamics of binding to the paclitaxel site predicts cytotoxicity. *Chemistry & Biology*, v. 12, n. 12, p. 1269-1279, 2005.

50 BUEY, R. M.; DÍAZ, J. F.; ANDREU, J. M.; O'BRATE, A.; GIANNAKAKOU, P.; NICOLAOU, K. C.; SASMAL, P. K.; RITZÉN, A.; NAMOTO, K. Interaction of epothilone analogs with the paclitaxel binding site: relationship between binding affinity, microtubule stabilization, and cytotoxicity. *Chemistry & Biology*, v. 11, n. 2, p. 225-236, 2004.

51 EDLER, M. C.; BUEY, R. M.; GUSSIO, R.; MARCUS, A. I.; VANDERWAL, C. D.; SORENSEN, E. J.; DÍAZ, J. F.; GIANNAKAKOU, P.; HAMEL, E. Cyclostreptin (FR182877), an antitumor tubulin-polymerizing agent deficient in enhancing tubulin assembly despite its high affinity for the taxoid site. *Biochemistry*, v. 44, n. 34, p. 11525-11538, 2005.

52 BUEY, R. M.; CALVO, E.; BARASOAIN, I.; PINEDA, O.; EDLER, M. C.; MATESANZ, R.; CEREZO, G.; VANDERWAL, C. D.; DAY, B. W.; SORENSEN, E. J.; LÓPEZ, J. A.; ANDREU, J. M.; HAMEL, E.; DÍAZ, J. F. Cyclostreptin binds covalently to microtubule pores and luminal taxoid binding sites. *Nature Chemical Biology*, v. 3, n. 2, p. 117-125, 2007.

53 LONG, B. H.; CARBONI, J. M.; WASSERMAN, A. J.; CORNELL, L. A.; CASAZZA, A. M.; JENSEN, P. R.; LINDEL, T.; FENICAL, W.; FAIRCHILD, C. R. Eleutherobin, a novel cytotoxic agent that induces tubulin polymerization, is similar to paclitaxel (Taxol). *Cancer Research*, v. 58, n. 6, p. 1111-1115, 1998.

54 KINGSTON, D. G. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. *Journal of Natural Products*, v. 72, n. 3, p. 507-515, 2009.

55 MOOBERRY, S. L.; TIEN, G.; HERNANDEZ, A. H.; PLUBRUKARN, A.; DAVIDSON, B. S. Laulimalide and isolaulimalide, new paclitaxel-like microtubule-stabilizing agents. *Cancer Research*, v. 59, n. 3, p. 653-660, 1999.

56 DALY, E.; TAYLOR, R. Entropy and enthalpy in the activity of tubulin-based antimetabolic agents. *Current Chemical Biology*, v. 3, n.1, p. 367-379, 2009.

57 OJIMA, I.; CHAKRAVARTY, S.; INOUE, T.; LIN, S.; HE, L.; HORWITZ, S. B.; KUDUK, S. D.; DANISHEFSKY, S. J. A common pharmacophore for cytotoxic natural products that stabilize microtubules. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 96, n. 8, p. 4256-4261, 1999.

58 GUPTA, S.; BHATTACHARYYA, B. Antimicrotubular drugs binding to vinca domain of tubulin. *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 253, n. 1-2, p. 41-47, 2003.

59 GIGANT, B.; WANG, C.; RAVELLI, R. B.; ROUSSI, F.; STEINMETZ, M. O.; CURMI, P. A.; SOBEL, A.; KNOSSOW, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. *Nature*, v. 435, n. 7041, p. 519-522, 2005.

60 CRONSTEIN, B. N.; MOLAD, Y.; REIBMAN, J.; BALAKHANE, E.; LEVIN, R. I.; WEISSMANN, G. Colchicine alters the quantitative and qualitative display of selectins on endothelial cells and neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 96, n. 2, p. 994-1002, 1995.

61 CHIA, E. W.; GRAINGER, R.; HARPER, J. L. Colchicine suppresses neutrophil superoxide production in a murine model of gouty arthritis: a rationale for use of low-dose colchicine. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. 6, p. 1288-1295, 2008.

62 NIEL, E.; SCHERRMANN, J. M. Colchicine today. *Joint Bone Spine*, v. 73, n. 6, p. 672-8, 2006.

63 KRISHNA, S. Comparison of podophyllotoxin and imiquimod as anal condyloma acuminata therapy. *Dermatology Online Journal*, v. 15, n. 1, p. 14, 2009.

64 SACKETT, D. L. Vinca site agents induce structural changes in tubulin different from and antagonistic to changes induced by colchicine site agents. *Biochemistry*, v. 34, n. 21, p. 7010-7019, 1995.

65 BISWAS, B. B.; SEN, K.; GHOSH CHOUDHURY, G.; BHATTACHARYYA, B. Molecular biology of tubulin: its interaction with drugs and genomic organization. *Journal of Biosciences*, v.6, n.4, p. 431-457, 1984.

66 NGUYEN, T. L.; MCGRATH, C.; HERMONE, A. R.; BURNETT, J. C.; ZAHAREVITZ, D. W.; DAY, B. W.; WIPF, P.; HAMEL, E.; GUSSIO, R. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 19, p. 6107-16, 2005.

67 RAPPL, C.; BARBIER, P.; BOURGAREL-REY, V.; GRÉGOIRE, C.; GILLI, R.; CARRE, M.; COMBES, S.; FINET, J. P.; PEYROT, V. Interaction of 4-arylcoumarin analogues of combretastatins with microtubule network of HBL100 cells and binding to tubulin. *Biochemistry*, v. 45, n. 30, p. 9210-9218, 2006.

68 BAI, R.; COVELL, D. G.; PEI, X. F.; EWELL, J. B.; NGUYEN, N. Y.; BROSSI, A.; HAMEL, E. Mapping the binding site of colchicinoids on beta -tubulin. 2-Chloroacetyl-2-demethylthiocolchicine covalently reacts predominantly with cysteine 239 and secondarily with cysteine 354. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 51, p. 40443-40452, 2000.

69 PETTIT, G. R.; SINGH, S. B.; HAMEL, E.; LIN, C. M.; ALBERTS, D. S.; GARCIA-KENDALL, D. Isolation and structure of the strong cell growth and tubulin inhibitor combretastatin A-4. *Experientia*, v. 45, n. 2, p. 209-211, 1989.

70 MENG, F.; CAI, X.; DUAN, J.; MATTEUCCI, M. G.; HART, C. P. A novel class of tubulin inhibitors that exhibit potent antiproliferation and in vitro vessel-disrupting activity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 61, n. 6, p. 953-963, 2008.

71 MOONEY, C. J.; NAGAI AH, G.; FU, P.; WASMAN, J. K.; COONEY, M. M.; SAVVIDES, P. S.; BOKAR, J. A.; DOWLATI, A.; WANG, D.; AGARWALA, S. S.; FLICK, S. M.; HARTMAN, P. H.; ORTIZ, J. D.; LAVERTU, P. N.; REMICK, S. C. A phase II trial of fosbretabulin in advanced anaplastic thyroid carcinoma and correlation of baseline serum-soluble intracellular adhesion molecule-1 with outcome. *Thyroid*, v. 19, n. 3, p. 233-240, 2009.

72 DRULEY, T. E.; STEIN, W. D.; RUTH, A.; RONINSON, I. B. P-glycoprotein-mediated colchicine resistance in different cell lines correlates with the effects of colchicine on P-glycoprotein conformation. *Biochemistry*, v. 40, n. 14, p. 4323-4331, 2001.

73 MCGOWN, A. T.; FOX, B. W. Differential cytotoxicity of combretastatins A1 and A4 in two daunorubicin-resistant P388 cell lines. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 26, n. 1, p. 79-81, 1990.

74 LAWRENCE, N. J.; PATTERSON, R. P.; OOI, L. L.; COOK, D.; DUCKI, S. Effects of alpha-substitutions on structure and biological activity of anticancer chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 22, p. 5844-5848, 2006.

75 DE MARTINO, G.; LA REGINA, G.; COLUCCIA, A.; EDLER, M. C.; BARBERA, M. C.; BRANCALE, A.; WILCOX, E.; HAMEL, E.; ARTICO, M.; SILVESTRI, R. Arylthioindoles, potent inhibitors of tubulin polymerization. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 25, p. 6120-6123, 2004.

76 BRANCALE, A.; SILVESTRI, R. Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. *Medicinal Research Reviews*, v. 27, n. 2, p. 209-238, 2007.

77 ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 9, p. 771-790, 2009.

78 SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR: perspectives in drug design. *Molecular Diversity*, v.13, n.3, p. 277-285, 2009.

79 BARREIRO, E. J. A Química medicinal e o paradigma do composto-protótipo. *Revista Virtual de Química*, v. 1, n. 1, p. 26-34, 2009.

80 SALUM, L. B. *Estudos in silico no planejamento de candidatos a novos fármacos na terapia do câncer de mama e de reposição hormonal*. 2007. 140 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2007.

81 LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, n. 10, p. 853-862, 2004.

82 WERMUTH, C. G.; GANELLIN, C. R.; LINDBERG, P.; MITSCHER, L. A. Glossary of terms used in medicinal chemistry (IUPAC Recommendations 1998). *Pure and Applied Chemistry*, v.70, n.5, p. 1129-1143, 1998.

83 WESS, G.; URMANN, M.; SICKENBERGER, B. Medicinal chemistry: challenges and opportunities. *Angewandte Chemie*, v. 40, n. 18, p. 3341-3350, 2001.

84 RUSSO, E. Chemistry plans a structural overhaul. *Nature*, v. 419, n. 6903, p. 4-7, 2002.

85 JÓNSDÓTTIR, S. O.; JØRGENSEN, F. S.; BRUNAK, S. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. *Bioinformatics*, v. 21, n. 10, p. 2145-2160, 2005.

86 ANDRICOPULO, A. D.; MONTANARI, C. A. Structure-activity relationships for the design of small-molecule inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 5, n. 6, p. 585-593, 2005.

87 BUNIN, B. A. Increasing the efficiency of small-molecule drug discovery. *Drug Discovery Today*, v. 8, n. 18, p. 823-826, 2003.

88 JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. *Science*, v. 303, n. 5665, p. 1813-1818, 2004.

89 JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 10, n. 1, p. 123-130, 1998.

90 GIBBS, J. B. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science*, v. 287, n. 5460, p. 1969-1973, 2000.

91 ALTMANN, K. H. Microtubule-stabilizing agents: a growing class of important anticancer drugs. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 5, n. 4, p. 424-431, 2001.

92 LIMA, L. M.; BARREIRO, E. J. Bioisosterism: a useful strategy for molecular modification and drug design. *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, n. 1, p. 23-49, 2005.

93 BARREIRO, E. Strategy of molecular simplification in rational drug design: the discovery of a new cardioactive agent. *Quimica Nova*, v. 25, n.6, p. 1172-1180, 2002 .

94 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, n. 11, p. 935-949, 2004.

95 GUIDO, R. V.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008.

96 LEACH, A. R.; SHOICHET, B. K.; PEISHOFF, C. E. Prediction of protein-ligand interactions. docking and scoring: successes and gaps. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 20, p. 5851-5855, 2006.

97 CAVASOTTO, C. N.; ORRY, A. J. Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 10, p. 1006-1014, 2007.

98 SCHUSTER, D.; KOWALIK, D.; KIRCHMAIR, J.; LAGGNER, C.; MARKT, P.; AEBISCHER-GUMY, C.; STRÖHLE, F.; MÖLLER, G.; WOLBER, G.; WILCKENS, T.; LANGER, T.; ODERMATT, A.; ADAMSKI, J. Identification of chemically diverse, novel inhibitors of 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 3 and 5 by pharmacophore-based virtual screening. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, v.125, n.1-2, p. 148-161, 2011.

99 WOLBER, G.; SEIDEL, T.; BENDIX, F.; LANGER, T. Molecule-pharmacophore superpositioning and pattern matching in computational drug design. *Drug Discovery Today*, v. 13, n. 1-2, p. 23-29, 2008.

100 SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR strategies in drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 5, n. 5, p. 405-412, 2010.

101 WALTERS, W. P.; NAMCHUK, M. Designing screens: how to make your hits a hit. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 2, n. 4, p. 259-266, 2003.

102 ANDERSON, A. C. The process of structure-based drug design. *Chemistry & Biology*, v. 10, n. 9, p. 787-797, 2003.

103 BAJORATH, J. Integration of virtual and high-throughput screening. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 1, n. 11, p. 882-894, 2002.

104 BERMAN, H. M.; BHAT, T. N.; BOURNE, P. E.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; WEISSIG, H.; WESTBROOK, J. The Protein Data Bank and the challenge of structural genomics. *Nature Structural Biology*, v. 7, p. 957-959, 2000. DOI:10.1038/80734

105 BERMAN, H. M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T. N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I. N.; BOURNE, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

106 LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. *Drug Discovery Today*, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.

107 KLEBE, G. Virtual ligand screening: strategies, perspectives and limitations. *Drug Discovery Today*, v. 11, n. 13-14, p. 580-594, 2006.

108 SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Protein docking and complementarity. *Journal of Molecular Biology*, v. 221, n. 1, p. 327-346, 1991.

109 JOSEPH-MCCARTHY, D.; BABER, J. C.; FEYFANT, E.; THOMPSON, D. C.; HUMBLET, C. Lead optimization via high-throughput molecular docking. *Current Opinion in Drug Discovery & Development*, v. 10, n. 3, p. 264-274, 2007.

110 GRUNEBERG, S.; WENDT, B.; KLEBE, G. Subnanomolar inhibitors from computer screening: a model study using human carbonic anhydrase II. *Angewandte Chemie*, v. 40, n. 2, p. 389-393, 2001.

111 GRUNEBERG, S.; STUBBS, M. T.; KLEBE, G. Successful virtual screening for novel inhibitors of human carbonic anhydrase: strategy and experimental confirmation. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 17, p. 3588-3602, 2002.

112 POWERS, R. A.; MORANDI, F.; SHOICHET, B. K. Structure-based discovery of a novel, noncovalent inhibitor of AmpC beta-lactamase. *Structure*, v. 10, n. 7, p. 1013-1023, 2002.

113 BOEHM, H. J.; BOEHRINGER, M.; BUR, D.; GMUENDER, H.; HUBER, W.; KLAUS, W.; KOSTREWA, D.; KUEHNE, H.; LUEBBERS, T.; MEUNIER-KELLER, N.; MUELLER, F. Novel inhibitors of DNA gyrase: 3D structure based biased needle screening, hit validation by biophysical methods, and 3D guided optimization. A promising alternative to random screening. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 14, p. 2664-2674, 2000.

114 DOMAN, T. N.; MCGOVERN, S. L.; WITHERBEE, B. J.; KASTEN, T. P.; KURUMBAIL, R.; STALLINGS, W. C.; CONNOLLY, D. T.; SHOICHET, B. K. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 11, p. 2213-2221, 2002.

115 SHOICHET, B. K.; MCGOVERN, S. L.; WEI, B.; IRWIN, J. J. Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 6, n. 4, p. 439-446, 2002.

116 MOITESSIER, N.; ENGLEBIENNE, P.; LEE, D.; LAWANDI, J.; CORBEIL, C. R. Towards the development of universal, fast and highly accurate docking/scoring methods: a long way to go. *British Journal of Pharmacology*, v. 153, n. 1, p. S7-S26, 2008.

117 JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *Journal of Molecular Biology*, v. 267, n. 3, p. 727-748, 1997.

118 RAREY, M.; KRAMER, B.; LENGAUER, T.; KLEBE, G. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *Journal of Molecular Biology*, v. 261, n. 3, p. 470-489, 1996.

119 JAIN, A. N. Surflex: fully automatic flexible molecular docking using a molecular similarity-based search engine. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 4, p. 499-511, 2003.

120 KIRCHMAIR, J.; DISTINTO, S.; SCHUSTER, D.; SPITZER, G.; LANGER, T.; WOLBER, G. Enhancing drug discovery through in silico screening: strategies to increase true positives retrieval rates. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 20, p. 2040-2053, 2008.

121 AMADASI, A.; SURFACE, J. A.; SPYRAKIS, F.; COZZINI, P.; MOZZARELLI, A.; KELLOGG, G. E. Robust classification of "relevant" water molecules in putative protein binding sites. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 4, p. 1063-1067, 2008.

122 COZZINI, P.; KELLOGG, G. E.; SPYRAKIS, F.; ABRAHAM, D. J.; COSTANTINO, G.; EMERSON, A.; FANELLI, F.; GOHLKE, H.; KUHN, L. A.; MORRIS, G. M.; OROZCO, M.; PERTINHEZ, T. A.; RIZZI, M.; SOTRIFER, C. A. Target flexibility: an emerging consideration in drug discovery and design. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 51, n. 20, p. 6237-6255, 2008.

123 CHARIFSON, P. S.; CORKERY, J. J.; MURCKO, M. A.; WALTERS, W. P. Consensus scoring: a method for obtaining improved hit rates from docking databases of three-dimensional structures into proteins. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 25, p. 5100-5109, 1999.

124 CHARIFSON, P. S.; WALTERS, W. P. Filtering databases and chemical libraries. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 16, n. 5-6, p. 311-323, 2002.

125 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. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

126 GHOSH, S.; NIE, A.; AN, J.; HUANG, Z. Structure-based virtual screening of chemical libraries for drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 10, n. 3, p. 194-202, 2006.

127 RICHMOND, N. J.; ABRAMS, C. A.; WOLOHAN, P. R.; ABRAHAMIAN, E.; WILLETT, P.; CLARK, R. D. GALAHAD: 1. pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 20, n. 9, p. 567-587, 2006.

128 TINTORI, C.; CORRADI, V.; MAGNANI, M.; MANETTI, F.; BOTTA, M. Targets looking for drugs: a multistep computational protocol for the development of structure-based pharmacophores and their applications for hit discovery. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 11, p. 2166-2179, 2008.

129 VARADY, J.; WU, X.; FANG, X.; MIN, J.; HU, Z.; LEVANT, B.; WANG, S. Molecular modeling of the three-dimensional structure of dopamine 3 (D3) subtype receptor: discovery of novel and potent D3 ligands through a hybrid pharmacophore- and structure-based database searching approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 21, p. 4377-4392, 2003.

130 KUMAR, A.; CHATURVEDI, V.; BHATNAGAR, S.; SINHA, S.; SIDDIQI, M. I. Knowledge based identification of potent antitubercular compounds using structure based virtual screening and structure interaction fingerprints. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 1, p. 35-42, 2009.

- 131 VALADARES, N. F.; SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D.; GARRATT, R. C. Role of halogen bonds in thyroid hormone receptor selectivity: pharmacophore-based 3D-QSSR studies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 11, p. 2606-2616, 2009.
- 132 WEBER, K.C.; SALUM, L. B.; HONÓRIO, K. M.; ANDRICOPULO, A. D.; DA SILVA, A. B. Pharmacophore-based 3D QSAR studies on a series of high affinity 5-HT_{1A} receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 1508-1514, 2010.
- 133 GOODFORD, P. J. A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 28, n. 7, p. 849-857, 1985.
- 134 HINDLE, S. A.; RAREY, M.; BUNING, C.; LENGAE, T. Flexible docking under pharmacophore type constraints. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 16, n. 2, p. 129-149, 2002.
- 135 SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-based approach for the study of estrogen receptor binding affinity and subtype selectivity. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 11, p. 2243-2253, 2008.
- 136 SALUM, L. B.; VALADARES, N. F. Fragment-guided approach to incorporating structural information into a CoMFA study: BACE-1 as an example. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 24, n. 10, p. 803-817, 2010.
- 137 ECKERT, H.; BAJORATH, J. Molecular similarity analysis in virtual screening: foundations, limitations and novel approaches. *Drug Discovery Today*, v. 12, n. 5-6, p. 225-233, 2007.
- 138 GARDINER, E. J.; HOLLIDAY, J. D.; O'DOWD, C.; WILLETT, P. Effectiveness of 2D fingerprints for scaffold hopping. *Future Medicinal Chemistry*, v. 3, n. 4, p. 405-414, 2011.
- 139 WILLETT, P. Similarity searching using 2D structural fingerprints. *Methods in Molecular Biology*, v. 672, p. 133-158, 2011. DOI: 10.1007/978-1-60761-839-3_5
- 140 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR and molecular modeling studies on a series of discodermolide analogs as microtubule-stabilizing anticancer agents. *QSAR & Combinatorial Science*, v. 28, n. 3, p. 325-337, 2009.
- 141 OPREA, T. I.; DAVIS, A. M.; TEAGUE, S. J.; LEESON, P. D. Is there a difference between leads and drugs? a historical perspective. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 41, n. 5, p. 1308-1315, 2001.
- 142 KUBINYI, H. QSAR and 3D QSAR in drug design. Part 1: methodology. *Drug Discovery Today*, v. 2, n. 11, p. 457-467, 1997.
- 143 KUBINYI, H. QSAR and 3D QSAR in drug design. Part 2: applications and problems. *Drug Discovery Today*, v. 2, n.12, p. 538-546,1997.

144 KUBINYI, H.; SADOWSKI, J. QSAR, 3D QSAR and beyond. In: ACS NATIONAL MEETING, 217, 1999, Anaheim. Anaheim : ACS, 1999. p. U667-U667.

145 THIBAUT, U.; FOLKERS, G.; KLEBE, G.; KUBINYI, H.; MERZ, A.; ROGNAN, D. Recommendations for CoMFA studies and 3D QSAR publications. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, v.13, n. 1,p. 1-3, 1994.

146 TONG, W.; LOWIS, D. R.; PERKINS, R.; CHEN, Y.; WELSH, W. J.; GODDETTE, D. W.; HERITAGE, T. W.; SHEEHAN, D. M. Evaluation of quantitative structure-activity relationship methods for large-scale prediction of chemicals binding to the estrogen receptor. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 38, n. 4, p. 669-677, 1998.

147 ARIF, S.; HOLLIDAY, J.; WILLETT, P. Analysis and use of fragment-occurrence data in similarity-based virtual screening. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 23, n. 9, p. 655-668, 2009.

148 SEEL, M.; TURNER, D. B.; WILLETT, P. Effect of parameter variations on the effectiveness of HQSAR analyses. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, v. 18, n. 3, p. 245-252, 1999.

149 SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Quantitative structure-activity relationships for a series of selective estrogen receptor-beta modulators. *SAR and QSAR in Environmental Research*, v. 18, n. 7-8, p. 711-727, 2007.

150 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Structural and chemical basis for anticancer activity of a series of β -tubulin ligands: molecular modeling and 3D QSAR studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 4, p. 693-703, 2009.

151 CASTILHO, M. S.; POSTIGO, M. P.; DE PAULA, C. B.; MONTANARI, C. A.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Two- and three-dimensional quantitative structure-activity relationships for a series of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 14, n. 2, p. 516-527, 2006.

152 HONORIO, K. M.; GARRATT, R. C.; ANDRICOPULO, A. D. Hologram quantitative structure-activity relationships for a series of farnesoid X receptor activators. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 12, p. 3119-3125, 2005.

153 GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q2! *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 20, n. 4, p. 269-76, 2002.

154 GOLBRAIKH, A.; SHEN, M.; XIAO, Z.; XIAO, Y. D.; LEE, K. H.; TROPSHA, A. Rational selection of training and test sets for the development of validated QSAR models. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 17, n. 2-4, p. 241-253, 2003.

155 TROPSHA, A.; GOLBRAIKH, A. Predictive QSAR modeling workflow, model applicability domains, and virtual screening. *Current Pharmaceutical Design*, v. 13, n. 34, p. 3494-3504, 2007.

156 NAIR, P. C.; SOBHIA, M. E. Fingerprint directed scaffold hopping for identification of CCR2 antagonists. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 48, n. 9, p. 1891-1902, 2008.

157 CRAMER, R. D.; PATTERSON, D. E.; BUNCE, J. D. Recent advances in comparative molecular field analysis (CoMFA). *Progress in Clinical and Biological Research*, v. 291, p. 161-165, 1989.

158 CRAMER, R. D. Topomer CoMFA: a design methodology for rapid lead optimization. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 3, p. 374-388, 2003.

159 KLEBE, G.; ABRAHAM, U.; MIETZNER, T. Molecular similarity indices in a comparative analysis (CoMSIA) of drug molecules to correlate and predict their biological activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 37, n. 24, p. 4130-4146, 1994.

160 KLEBE, G.; ABRAHAM, U. Comparative molecular similarity index analysis (CoMSIA) to study hydrogen-bonding properties and to score combinatorial libraries. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 13, n. 1, p. 1-10, 1999.

161 ANDRADE, C. H.; SALUM, L. B.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Three-dimensional quantitative structure-activity relationships for a large series of potent antitubercular agents. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 5, n. 6, p. 377-387, 2008.

162 SHEPPHARD, J. K.; CLARK, R. D. A marriage made in torsional space: using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 20, n. 12, p. 763-771, 2006.

163 HURST, T. Flexible 3D searching: the directed tweak technique. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 34, n. 1, p. 190-196, 1994.

164 MINGUEZ, J. M.; GIULIANO, K. A.; BALACHANDRAN, R.; MADIRAJU, C.; CURRAN, D. P.; DAY, B. W. Synthesis and high content cell-based profiling of simplified analogues of the microtubule stabilizer (+)-discodermolide. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 1, n. 14, p. 1305-1313, 2002.

165 SMITH, A. B.; XIAN, M. Design, synthesis, and biological evaluation of simplified analogues of (+)-discodermolide. additional insights on the importance of the diene, the C7 hydroxyl, and the lactone. *Organic Letters*, v. 7, n. 23, p. 5229-5932, 2005.

166 SMITH, A. B.; FREEZE, B. S.; LAMARCHE, M. J.; HIROSE, T.; BROUARD, I.; RUCKER, P. V.; XIAN, M.; SUNDERMANN, K. F.; SHAW, S. J.; BURLINGAME, M. A.; HORWITZ, S. B.; MYLES, D. C. Design, synthesis, and evaluation of carbamate-substituted analogues of (+)-discodermolide. *Organic Letters*, v. 7, n. 2, p. 311-314, 2005.

167 CHOY, N.; SHIN, Y.; NGUYEN, P. Q.; CURRAN, D. P.; BALACHANDRAN, R.; MADIRAJU, C.; DAY, B. W. Simplified discodermolide analogues: synthesis and biological evaluation of 4-epi-7-dehydroxy-14,16-didemethyl-(+)-discodermolides as microtubule-stabilizing agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 14, p. 2846-2864, 2003.

168 SPERANDIO, O.; REYNÈS, C. H.; CAMPROUX, A. C.; VILLOUTREIX, B. O. Rationalizing the chemical space of protein-protein interaction inhibitors. *Drug Discovery Today*, v. 15, n. 5-6, p. 220-229, 2010.

169 BARRON, D. M.; CHATTERJEE, S. K.; RAVINDRA, R.; ROOF, R.; BALOGLU, E.; KINGSTON, D. G.; BANE, S. A fluorescence-based high-throughput assay for antimicrotubule drugs. *Analytical Biochemistry*, v. 315, n. 1, p. 49-56, 2003.

170 SHARMA, S.; GANESH, T.; KINGSTON, D. G.; BANE, S. Promotion of tubulin assembly by poorly soluble taxol analogs. *Analytical Biochemistry*, v. 360, n. 1, p. 56-62, 2007.

171 BONNE, D.; HEUSÉLE, C.; SIMON, C.; PANTALONI, D. 4',6-Diamidino-2-phenylindole, a fluorescent probe for tubulin and microtubules. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 260, n. 5, p. 2819-2825, 1985.

172 HEUSÉLE, C.; BONNE, D. Role of DAPI in microtubule reactions at steady-state. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 133, n. 2, p. 662-669, 1985.

173 SENGUPTA, S.; BOGE, T. C.; LIU, Y.; HEPPELLE, M.; GEORG, G. I.; HIMES, R. H. Probing the environment of tubulin-bound paclitaxel using fluorescent paclitaxel analogues. *Biochemistry*, v. 36, n. 17, p. 5179-5184, 1997.

174 LIOU, J. P.; MAHINDROO, N.; CHANG, C. W.; GUO, F. M.; LEE, S. W.; TAN, U. K.; YEH, T. K.; KUO, C. C.; CHANG, Y. W.; LU, P. H.; TUNG, Y. S.; LIN, K. T.; CHANG, J. Y.; HSIEH, H. P. Structure-activity relationship studies of 3-aryloxyindoles as potent antimitotic agents. *ChemMedChem*, v. 1, n. 10, p. 1106-1118, 2006.

175 NAKAGAWA-GOTO, K.; CHEN, C. X.; HAMEL, E.; WU, C. C.; BASTOW, K. F.; BROSSI, A.; LEE, K. H. Antitumor agents. Part 236: synthesis of water-soluble colchicine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 1, p. 235-238, 2005.

176 LIOU, J. P.; WU, C. Y.; HSIEH, H. P.; CHANG, C. Y.; CHEN, C. M.; KUO, C. C.; CHANG, J. Y. 4- and 5-aryloxyindoles as novel classes of potent antitubulin agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 18, p. 4548-4552, 2007.

177 VOGT, A.; MCPHERSON, P. A.; SHEN, X.; BALACHANDRAN, R.; ZHU, G.; RACCOR, B. S.; NELSON, S. G.; TSANG, M.; DAY, B. W. High-content analysis of cancer-cell-specific apoptosis and inhibition of in vivo angiogenesis by synthetic (-)-pironetin and analogs. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 74, n. 4, p. 358-368, 2009.

178 WANG, Z.; MCPHERSON, P. A.; RACCOR, B. S.; BALACHANDRAN, R.; ZHU, G.; DAY, B. W.; VOGT, A.; WIPF, P. Structure-activity and high-content imaging analyses of novel tubulysins. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 70, n. 2, p. 75-86, 2007.

179 BRYAN, J. A quantitative analysis of microtubule elongation. *The Journal of Cell Biology*, v. 71, n. 3, p. 749-767, 1976.

180 CARLIER, M. F.; PANTALONI, D. Kinetic analysis of cooperativity in tubulin polymerization in the presence of guanosine di- or triphosphate nucleotides. *Biochemistry*, v. 17, n. 10, p. 1908-1915, 1978.

181 RACCOR, B. S.; VOGT, A.; SIKORSKI, R. P.; MADIRAJU, C.; BALACHANDRAN, R.; MONTGOMERY, K.; SHIN, Y.; FUKUI, Y.; JUNG, W. H.; CURRAN, D. P.; DAY, B. W. Cell-based and

biochemical structure-activity analyses of analogs of the microtubule stabilizer dictyostatin. *Molecular Pharmacology*, v. 73, n. 3, p. 718-726, 2008.

182 ABRAHAM, V. C.; TAYLOR, D. L.; HASKINS, J. R. High content screening applied to large-scale cell biology. *Trends in Biotechnology*, v. 22, n. 1, p. 15-22, 2004.

183 EDWARDS, B. S.; OPREA, T.; PROSSNITZ, E. R.; SKLAR, L. A. Flow cytometry for high-throughput, high-content screening. *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 8, n. 4, p. 392-398, 2004.

184 YANG, H.; GANGULY, A.; CABRAL, F. Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting drugs. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 42, p. 32242-32250, 2010.

185 POURROY, B.; HONORÉ, S.; PASQUIER, E.; BOURGAREL-REY, V.; KRUCZYNSKI, A.; BRIAND, C.; BRAGUER, D. Antiangiogenic concentrations of vinflunine increase the interphase microtubule dynamics and decrease the motility of endothelial cells. *Cancer Research*, v. 66, n. 6, p. 3256-32563, 2006.

186 SMALL, J. V.; GEIGER, B.; KAVERINA, I.; BERSHADSKY, A. How do microtubules guide migrating cells? *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 3, n. 12, p. 957-964, 2002.

187 NETTLES, J. H.; LI, H.; CORNETT, B.; KRAHN, J. M.; SNYDER, J. P.; DOWNING, K. H. The binding mode of epothilone A on alpha,beta-tubulin by electron crystallography. *Science*, v. 305, n. 5685, p. 866-869, 2004.

188 KINGSTON, D. G. A natural love of natural products. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 73, n. 11, p. 3975-3984, 2008.

189 PELLEGRINI, F.; BUDMAN, D. R. Review: tubulin function, action of antitubulin drugs, and new drug development. *Cancer Investigation*, v. 23, n. 3, p. 264-273, 2005.

190 REESE, M.; SÁNCHEZ-PEDREGAL, V. M.; KUBICEK, K.; MEILER, J.; BLOMMERS, M. J.; GRIESINGER, C.; CARLOMAGNO, T. Structural basis of the activity of the microtubule-stabilizing agent epothilone a studied by NMR spectroscopy in solution. *Angewandte Chemie*, v. 46, n. 11, p. 1864-1868, 2007.

191 SÁNCHEZ-PEDREGAL, V. M.; KUBICEK, K.; MEILER, J.; LYOTHIER, I.; PATERSON, I.; CARLOMAGNO, T. The tubulin-bound conformation of discodermolide derived by NMR studies in solution supports a common pharmacophore model for epothilone and discodermolide. *Angewandte Chemie*, v. 45, n. 44, p. 7388-7394, 2006.

192 GANESH, T.; GUZA, R. C.; BANE, S.; RAVINDRA, R.; SHANKER, N.; LAKDAWALA, A. S.; SNYDER, J. P.; KINGSTON, D. G. The bioactive Taxol conformation on beta-tubulin: experimental evidence from highly active constrained analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 101, n. 27, p. 10006-10011, 2004.

193 GENEY, R.; SUN, L.; PERA, P.; BERNACKI, R. J.; XIA, S.; HORWITZ, S. B.; SIMMERLING, C. L.; OJIMA, I. Use of the tubulin bound paclitaxel conformation for structure-based rational drug design. *Chemistry & Biology*, v. 12, n. 3, p. 339-348, 2005.

194 MARTELLO, L. A.; LAMARCHE, M. J.; HE, L.; BEAUCHAMP, T. J.; SMITH, A. B.; HORWITZ, S. B. The relationship between Taxol and (+)-discodermolide: synthetic analogs and modeling studies. *Chemistry & Biology*, v. 8, n. 9, p. 843-855, 2001.

195 SMITH, A. B.; LAMARCHE, M. J.; FALCONE-HINDLEY, M. Solution structure of (+)-discodermolide. *Organic Letters*, v. 3, n. 5, p. 695-698, 2001.

196 SHIN, Y.; FOURNIER, J. H.; BALACHANDRAN, R.; MADIRAJU, C.; RACCOR, B. S.; ZHU, G.; EDLER, M. C.; HAMEL, E.; DAY, B. W.; CURRAN, D. P. Synthesis and biological evaluation of (-)-16-normethyldictyostatin: a potent analogue of (-)-dictyostatin. *Organic Letters*, v. 7, n. 14, p. 2873-2876, 2005.

197 GUNASEKERA, S. P.; LONGLEY, R. E.; ISBRUCKER, R. A. Acetylated analogues of the microtubule-stabilizing agent discodermolide: preparation and biological activity. *Journal of Natural Products*, v. 64, n. 2, p. 171-174, 2001.

198 ISBRUCKER, R. A.; GUNASEKERA, S. P.; LONGLEY, R. E. Structure-activity relationship studies of discodermolide and its semisynthetic acetylated analogs on microtubule function and cytotoxicity. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 48, n. 1, p. 29-36, 2001.

199 MITA, A.; LOCKHART, A. C.; CHEN, T. L.; BOCHINSKI, K.; CURTTIGHT, J.; COOPER, W.; HAMMOND, L.; ROTHENBERG, M.; ROWINSKI, E.; SHARMA, S. A phase I pharmacokinetic (PK) trial of XAA296A (Discodermolide) administered every 3 wks to adult patients with advanced solid malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, v. 22, n. 14, p. 2025, 2004.

200 NOBILI, S.; LANDINI, I.; MAZZEI, T.; MINI, E. Overcoming tumor multidrug resistance using drugs able to evade P-glycoprotein or to exploit its expression. *Medicinal Research Reviews*, 2011. DOI: 10.1002/med.20239

201 NOBILI, S.; LIPPI, D.; WITORT, E.; DONNINI, M.; BAUSI, L.; MINI, E.; CAPACCIOLI, S. Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, v. 59, n. 6, p. 365-378, 2009.

202 JOGALEKAR, A. S.; KRIEL, F. H.; SHI, Q.; CORNETT, B.; CICERO, D.; SNYDER, J. P. The discodermolide hairpin structure flows from conformationally stable modular motifs. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 1, p. 155-165, 2010.

203 CANALES, A.; MATESANZ, R.; GARDNER, N. M.; ANDREU, J. M.; PATERSON, I.; DÍAZ, J. F.; JIMÉNEZ-BARBERO, J. The bound conformation of microtubule-stabilizing agents: NMR insights into the bioactive 3D structure of discodermolide and dictyostatin. *Chemistry*, v. 14, n. 25, p. 7557-7569, 2008.

204 KHRAPUNOVICH-BAINE, M.; MENON, V.; VERDIER-PINARD, P.; SMITH, A. B.; ANGELETTI, R. H.; FISER, A.; HORWITZ, S. B.; XIAO, H. Distinct pose of discodermolide in taxol binding pocket drives a complementary mode of microtubule stabilization. *Biochemistry*, v. 48, n. 49, p. 11664-11677, 2009.

205 BURLINGAME, M. A.; SHAW, S. J.; SUNDERMANN, K. F.; ZHANG, D.; PETRYKA, J.; MENDOZA, E.; LIU, F.; MYLES, D. C.; LAMARCHE, M. J.; HIROSE, T.; SCOTT FREEZE, B.; SMITH, A. B. Design, synthesis and cytotoxicity of 7-deoxy aryl discodermolide analogues. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 14, n. 9, p. 2335-2338, 2004.

206 SHAW, S. J.; SUNDERMANN, K. F.; BURLINGAME, M. A.; MYLES, D. C.; FREEZE, B. S.; XIAN, M.; BROUARD, I.; SMITH, A. B. III. Toward understanding how the lactone moiety of discodermolide affects activity. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 18, p. 6532-6533, 2005.

207 SMITH, A. B.; FREEZE, B. S.; LAMARCHE, M. J.; HIROSE, T.; BROUARD, I.; XIAN, M.; SUNDERMANN, K. F.; SHAW, S. J.; BURLINGAME, M. A.; HORWITZ, S. B.; MYLES, D. C. Design, synthesis, and evaluation of analogues of (+)-14-normethyldiscodermolide. *Organic Letters*, v. 7, n. 2, p. 315-318, 2005.

208 GASTEIGER, J.; MARSILI, M. Iterative partial equalization of orbital electronegativity – a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron*, v. 36, p. 3219-3288, 1980.

209 FARUTIN, V.; MASTERSON, L.; ANDRICOPULO, A. D.; CHENG, J.; RILEY, B.; HAKIMI, R.; FRAZER, J. W.; CORDES, E. H. Structure-activity relationships for a class of inhibitors of purine nucleoside phosphorylase. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 42, n. 13, p. 2422-2431, 1999.

210 SNYDER, J. P.; NETTLES, J. H.; CORNETT, B.; DOWNING, K. H.; NOGALES, E. The binding conformation of Taxol in beta-tubulin: a model based on electron crystallographic density. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 98, n. 9, p. 5312-5316, 2001.

211 HUNG, D. T.; CHEN, J.; SCHREIBER, S. L. (+)-Discodermolide binds to microtubules in stoichiometric ratio to tubulin dimers, blocks taxol binding and results in mitotic arrest. *Chemistry & Biology*, v. 3, n. 4, p. 287-293, 1996.

212 SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Structural and chemical basis for enhanced affinity and potency for a large series of estrogen receptor ligands: 2D and 3D QSAR studies. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 26, n. 2, p. 434-42, 2007.

213 CoMFA Manual. St Louis: Tripos Inc. 2006.

214 MANETTI, F.; MACCARI, L.; CORELLI, F.; BOTTA, M. 3D QSAR models of interactions between beta-tubulin and microtubule stabilizing antimitotic agents (MSAA): a survey on taxanes and epothilones. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 4, n. 2, p. 203-217, 2004.

215 HANSCH, C.; VERMA, R. P. Understanding tubulin/microtubule-taxane interactions: a quantitative structure-activity relationship study. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 1, p. 151-161, 2008.

216 NOGALES, E.; WOLF, S. G.; DOWNING, K. H. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, v. 391, n. 6663, p. 199-203, 1998.

217 CHAN, A. W.; LASKOWSKI, R. A.; SELWOOD, D. L. Chemical fragments that hydrogen bond to Asp, Glu, Arg, and His side chains in protein binding sites. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 53, n. 8, p. 3086-3089, 2010.

218 GUIDO, R. V. C. *Planejamento de inibidores da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de Trypanosoma cruzi: biologia estrutural e química medicinal*. 2008. 302 f. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008.

219 IRWIN, J. J.; SHOICHET, B. K. ZINC - a free database of commercially available compounds for virtual screening. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.

220 KEISER, M. J. et al. Predicting new molecular targets for known drugs. *Nature*, v. 462, n. 7270, p. 175-181, 2009.

221 HAMEL, E.; DEL CAMPO, A. A.; LOWE, M. C.; WAXMAN, P. G.; LIN, C. M. Effects of organic acids on tubulin polymerization and associated guanosine 5'-triphosphate hydrolysis. *Biochemistry*, v. 21, n. 3, p. 503-509, 1982.

222 HAMEL, E.; LIN, C. M. Glutamate-induced polymerization of tubulin: characteristics of the reaction and application to the large-scale purification of tubulin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 209, n. 1, p. 29-40, 1981.

223 LÓPEZ-COLOMÉ, A. M.; CASAS, A. Kainate reversibly aggregates brain tubulin in vitro. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 122, n. 3, p. 925-931, 1984.

224 BONFILS, C.; BEC, N.; LACROIX, B.; HARRICANE, M. C.; LARROQUE, C. Kinetic analysis of tubulin assembly in the presence of the microtubule-associated protein TOGp. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 282, n. 8, p. 5570-5581, 2007.

225 CLARK, D. C.; MARTIN, S. R.; BAYLEY, P. M. Conformation and assembly characteristics of tubulin and microtubule protein from bovine brain. *Biochemistry*, v. 20, n. 7, p. 1924-1932, 1981.

226 DEERY, W. J.; WEISENBERG, R. C. Kinetic and steady-state analysis of microtubules in the presence of colchicine. *Biochemistry*, v. 20, n. 8, p. 2316-2324, 1981.

227 WONG, V. K.; CHIU, P.; CHUNG, S. S.; CHOW, L. M.; ZHAO, Y. Z.; YANG, B. B.; KO, B. C. Pseudolaric acid B, a novel microtubule-destabilizing agent that circumvents multidrug resistance phenotype and exhibits antitumor activity in vivo. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 16, p. 6002-6011, 2005.

228 KUMAR, N. Taxol-induced polymerization of purified tubulin. mechanism of action. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 20, p. 10435-10441, 1981.

229 SHELANSKI, M. L.; GASKIN, F.; CANTOR, C. R. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 70, n. 3, p. 765-768, 1973.

230 STEVANATTO, K. B. *Identificação de novos inibidores da migração celular em células de câncer de mama e próstata*. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2008;

231 FINELLI, F. G. *Síntese da macrolactona da migrastatina e análogo. sínteses e aplicações de novos substratos em reações de RCAM catalisadas por [Mo]*. 2009. 254 f. Tese (Doutorado em Química). Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

232 DIAS, L. C. ; LIMA, D. J. P. ; GONCALVES, C. C. S. ; ANDRICOPULO, A. D. Synthesis of the C11-C23 fragment of the potent antitumor agent dictyostatin. *European Journal of Organic Chemistry*, p. 1491-1494, 2009. DOI: 10.1002/ejoc.200801234

233 LOZAMA, A.; PRISINZANO, T. E. Chemical methods for the synthesis and modification of neoclerodane diterpenes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 19, n. 18, p. 5490-5495, 2009.

234 MERRITT, A. T.; LEY, S. V. Clerodane diterpenoids. *Natural Product Reports*, v. 9, n. 3, p. 243-287, 1992.

235 FERREIRA, P. M.; SANTOS, A. G.; TININIS, A. G.; COSTA, P. M.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C. Casearin X exhibits cytotoxic effects in leukemia cells triggered by apoptosis. *Chemico-Biological Interactions*, v. 188, n. 3, p. 497-504, 2010.

236 DOS SANTOS, A. G.; FERREIRA, P. M.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; PEREZ, C. C.; GOMES TININIS, A.; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; CAVALHEIRO, A. J. Casearin X, its degradation product and other clerodane diterpenes from leaves of *Casearia sylvestris*: evaluation of cytotoxicity against normal and tumor human cells. *Chemistry & Biodiversity*, v. 7, n. 1, p. 205-215, 2010.

237 VIEIRA, G. M.; DUTRA, L. A.; FERREIRA, P. M.; DE MORAES, M. O.; COSTA LOTUFO, L. V.; PESSOA, C. O.; TORRES, R. B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Cytotoxic clerodane diterpenes from *Casearia rupestris*. *Journal of Natural Products*, v. 74, n. 4, p. 776-781, 2011.

238 WILLIAMS, R. B.; NORRIS, A.; MILLER, J. S.; BIRKINSHAW, C.; RATOVOSON, F.; ANDRIANTSIFERANA, R.; RASAMISON, V. E.; KINGSTON, D. G. Cytotoxic clerodane diterpenoids and their hydrolysis products from *Casearia nigrescens* from the rainforest of Madagascar. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 2, p. 206-209, 2007.

239 VIEIRA JUNIOR, G. M.; GONÇALVES, T. O.; REGASINI, L. O.; FERREIRA, P. M.; PESSOA, C. O.; COSTA LOTUFO, L. V.; TORRES, R. B.; BORALLE, N.; BOLZANI, V. S.; CAVALHEIRO, A. J. Cytotoxic clerodane diterpenoids from *Casearia obliqua*. *Journal of Natural Products*, v. 72, n. 10, p. 1847-1850, 2009.

240 HAYASHI, K.; NAKANISHI, Y.; BASTOW, K. F.; CRAGG, G.; NOZAKI, H.; LEE, K. H. Antitumor agents. Part 212. Bucidasins A-C, three new cytotoxic clerodane diterpenes from *Bucida buceras*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 12, n. 3, p. 345-348, 2002.

241 SHINTANI, Y.; TANAKA, T.; NOZAKI, Y. GS-164, a small synthetic compound, stimulates tubulin polymerization by a similar mechanism to that of Taxol. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 40, n. 6, p. 513-520, 1997.

242 JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nature Reviews Cancer*, v. 4, n. 4, p. 253-265, 2004.

243 BECKERS, T.; MAHBOOBI, S. Natural, semisynthetic and synthetic microtubule inhibitors for cancer therapy. *Drugs of the Future*, v. 28, n. 8, p. 767-785, 2003.

244 WILSON, L.; BAMBURG, J. R.; MIZEL, S. B.; GRISHAM, L. M.; CRESWELL, K. M. Interaction of drugs with microtubule proteins. *Federation Proceedings*, v. 33, n. 2, p. 158-166, 1974.

245 DARK, G. G.; HILL, S. A.; PRISE, V. E.; TOZER, G. M.; PETTIT, G. R.; CHAPLIN, D. J. Combretastatin A-4, an agent that displays potent and selective toxicity toward tumor vasculature. *Cancer Research*, v. 57, n. 10, p. 1829-1834, 1997.

246 TOZER, G. M.; KANTHOU, C.; BAGULEY, B. C. Disrupting tumour blood vessels. *Nature Reviews Cancer*, v. 5, n. 6, p. 423-435, 2005.

247 RAY, K.; BHATTACHARYYA, B.; BISWAS, B. B. Role of B-ring of colchicine in its binding to tubulin. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 256, n. 12, p. 6241-6244, 1981.

248 RAVELLI, R. B.; GIGANT, B.; CURMI, P. A.; JOURDAIN, I.; LACHKAR, S.; SOBEL, A.; KNOSSOW, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, v. 428, n. 6979, p. 198-202, 2004.

249 DORLÉANS, A.; GIGANT, B.; RAVELLI, R. B.; MAILLIET, P.; MIKOL, V.; KNOSSOW, M. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v. 106, n. 33, p. 13775-13779, 2009.

250 BHATTACHARYYA, B.; PANDA, D.; GUPTA, S.; BANERJEE, M. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. *Medicinal Research Reviews*, v. 28, n. 1, p. 155-183, 2008.

251 ANDREU, J. M.; GORBUNOFF, M. J.; LEE, J. C.; TIMASHEFF, S. N. Interaction of tubulin with bifunctional colchicine analogues: an equilibrium study. *Biochemistry*, v. 23, n. 8, p. 1742-1752, 1984.

252 GARLAND, D. L. Kinetics and mechanism of colchicine binding to tubulin: evidence for ligand-induced conformational change. *Biochemistry*, v. 17, n. 20, p. 4266-4272, 1978.

253 MEDRANO, F. J.; ANDREU, J. M.; GORBUNOFF, M. J.; TIMASHEFF, S. N. Roles of colchicine rings B and C in the binding process to tubulin. *Biochemistry*, v. 28, n. 13, p. 5589-5599, 1989.

254 BANERJEE, M.; PODDAR, A.; MITRA, G.; SUROLIA, A.; OWA, T.; BHATTACHARYYA, B. Sulfonamide drugs binding to the colchicine site of tubulin: thermodynamic analysis of the drug-tubulin interactions by isothermal titration calorimetry. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, n. 2, p. 547-555, 2005.

255 KIM, N. D.; PARK, E. S.; KIM, Y. H.; MOON, S. K.; LEE, S. S.; AHN, S. K.; YU, D. Y.; NO, K. T.; KIM, K. H. Structure-based virtual screening of novel tubulin inhibitors and their characterization as anti-mitotic agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 19, p. 7092-7100, 2010.

256 STIERAND, K.; RAREY, M. From modeling to medicinal chemistry: automatic generation of two-dimensional complex diagrams. *ChemMedChem*, v. 2, n. 6, p. 853-860, 2007.

257 STIERAND, K.; MAASS, P. C.; RAREY, M. Molecular complexes at a glance: automated generation of two-dimensional complex diagrams. *Bioinformatics*, v. 22, n. 14, p. 1710-1716, 2006.

258 GAILLARD, P.; CARRUPT, P. A.; TESTA, B.; SCHAMBEL, P. Binding of arylpiperazines, (aryloxy)propanolamines, and tetrahydropyridylindoles to the 5-HT_{1A} receptor: contribution of the molecular lipophilicity potential to three-dimensional quantitative structure-affinity relationship models. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 1, p. 126-134, 1996.

259 DE MARTINO, G.; EDLER, M. C.; LA REGINA, G.; COLUCCIA, A.; BARBERA, M. C.; BARROW, D.; NICHOLSON, R. I.; CHIOSIS, G.; BRANCALE, A.; HAMEL, E.; ARTICO, M.; SILVESTRI, R. New arylthioindoles: potent inhibitors of tubulin polymerization. 2. structure-activity relationships and molecular modeling studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 947-954, 2006.

260 LA REGINA, G. et al. Arylthioindole inhibitors of tubulin polymerization. 3. biological evaluation, structure-activity relationships and molecular modeling studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 50, n. 12, p. 2865-2874, 2007.

261 MAHBOOBI, S.; PONGRATZ, H.; HUFISKY, H.; HOCKEMEYER, J.; FRIESER, M.; LYSSENKO, A.; PAPER, D. H.; BURGERMEISTER, J.; BÖHMER, F. D.; FIEBIG, H. H.; BURGER, A. M.; BAASNER, S.; BECKERS, T. Synthetic 2-aryloindole derivatives as a new class of potent tubulin-inhibitory, antimitotic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 44, n. 26, p. 4535-4553, 2001.

262 GASTPAR, R.; GOLDBRUNNER, M.; MARKO, D.; VON ANGERER, E. Methoxy-substituted 3-formyl-2-phenylindoles inhibit tubulin polymerization. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 41, n. 25, p. 4965-4972, 1998.

263 KAUFMANN, D.; POJAROVÁ, M.; VOGEL, S.; LIEBL, R.; GASTPAR, R.; GROSS, D.; NISHINO, T.; PFALLER, T.; VON ANGERER, E. Antimitotic activities of 2-phenylindole-3-carbaldehydes in human breast cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 15, p. 5122-5136, 2007.

264 LIOU, J. P.; CHANG, Y. L.; KUO, F. M.; CHANG, C. W.; TSENG, H. Y.; WANG, C. C.; YANG, Y. N.; CHANG, J. Y.; LEE, S. J.; HSIEH, H. P. Concise synthesis and structure-activity relationships of combretastatin A-4 analogues, 1-aryloindoles and 3-aryloindoles, as novel classes of potent antitubulin agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, n. 17, p. 4247-4257, 2004.

265 BENÍTEZ-KING, G.; ANTÓN-TAY, F. Calmodulin mediates melatonin cytoskeletal effects. *Experientia*, v. 49, n. 8, p. 635-641, 1993.

266 CHEN, Z.; MERTA, P. J.; LIN, N. H.; TAHIR, S. K.; KOVAR, P.; SHAM, H. L.; ZHANG, H. A-432411, a novel indolinone compound that disrupts spindle pole formation and inhibits human cancer cell growth. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 4, n. 4, p. 562-568, 2005.

267 PEDRINI, F. S.; CHIARADIA, L. D.; LICÍNIO, M. A.; DE MORAES, A. C.; CURTA, J. C.; COSTA, A.; MASCARELLO, A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; SANTOS-SILVA, M. C. Induction of apoptosis and cell cycle arrest in L-1210 murine lymphoblastic leukaemia cells by (2E)-3-(2-naphthyl)-1-(3'-methoxy-4'-hydroxy-phenyl)-2-propen-1-one. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 62, n. 9, p. 1128-1136, 2010.

268 VISWANADHAN, V. N.; GHOSE, A. K.; REVANKAR, G. R.; ROBINS, R. K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v. 29, n. 3, p. 163-172, 1989.

269 SALUM, L. B.; ALTEI, W. F.; CHIARADIA, L. D.; CORDEIRO, M. S. N.; MATTEI, B.; CANEVAROLO, R. R.; SOUZA, C.; DAGHESTANI, H. K.; SANTOS-SILVA, M. C. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; YUNES, J. A.; NUNES, R. J.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; VOGT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *Em preparação*, 2011.

270 ALBERTON, E. H.; DAMAZIO, R. G.; CAZAROLLI, L. H.; CHIARADIA, L. D.; LEAL, P. C.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; SILVA, F. R. Influence of chalcone analogues on serum glucose levels in hyperglycemic rats. *Chemico-Biological Interactions*, v. 171, n. 3, p. 355-362, 2008.

271 DAMAZIO, R. G.; ZANATTA, A. P.; CAZAROLLI, L. H.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; SILVA, F. R. Nitrochalcones: potential in vivo insulin secretagogues. *Biochimie*, v. 91, n. 11-12, p. 1493-1498, 2009.

272 BORCHHARDT, D. M.; MASCARELLO, A.; CHIARADIA, L. D.; NUNES, R. J.; OLIVA, G.; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D. Biochemical evaluation of a series of synthetic chalcone and hydrazone derivatives as novel inhibitors of cruzain from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 21, n. 1, p. 142-150, 2010.

273 DAMAZIO, R. G.; ZANATTA, A. P.; CAZAROLLI, L. H.; CHIARADIA, L. D.; MASCARELLO, A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; BARRETO SILVA, F. R. Antihyperglycemic activity of naphthylchalcones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 1332-1337, 2010.

274 WINTER, E.; CHIARADIA, L. D.; DE CORDOVA, C. A.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: the relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, n. 22, p. 8026-8034, 2010.

275 DUCKI, S. Antimitotic chalcones and related compounds as inhibitors of tubulin assembly. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 3, p. 336-347, 2009.

276 EDWARDS, M.; STEMERICK, D.; SUNKARA, P. Chalcones: a new class of antimitotic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 33, n. 7, p. 1948-1954, 1990.

277 DUCKI, S.; RENNISON, D.; WOO, M.; KENDALL, A.; CHABERT, J. F.; MCGOWN, A. T.; LAWRENCE, N. J. Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. Part 1:

synthesis and biological evaluation of antivasular activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, n. 22, p. 7698-7710, 2009.

278 DUCKI, S.; FORREST, R.; HADFIELD, J. A.; KENDALL, A.; LAWRENCE, N. J.; MCGOWN, A. T.; RENNISON, D. Potent antimitotic and cell growth inhibitory properties of substituted chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 8, n. 9, p. 1051-1056, 1998.

279 XUE, Y.; GONG, X. The conformational, electronic and spectral properties of chalcones: a density functional theory study. *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, v. 901, n. 1-3, p. 226-231, 2009.

280 LAWRENCE, N. J.; ARMITAGE, E. S. M.; GREEDY, B.; COOK, D.; DUCKI, S.; MCGOWN, A. T. The synthesis of indanones related to combretastatin A-4 via microwave-assisted Nazarov cyclization of chalcones. *Tetrahedron Letters*, v. 47, n. 10, p. 1637-1640, 2006.

281 VILA, C. M.; LOPES, A. B.; GONÇALVES, A. S.; DA SILVA, L. L.; ROMEIRO, N. C.; MIRANDA, A. L.; SANT'ANNA, C. M.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. Structure-based design and biological profile of (E)-N-(4-Nitrobenzylidene)-2-naphthohydrazide, a novel small molecule inhibitor of I κ B kinase- β . *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 46, n. 4, p. 1245-1253, 2011.

282 POL-FACHIN, L.; FRAGA, C. A.; BARREIRO, E. J.; VERLI, H. Characterization of the conformational ensemble from bioactive N-acylhydrazone derivatives. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, v. 28, n. 5, p. 446-454, 2010.

283 SANTOS, M. A.; LESSA, J. A.; MENDES, I. C.; SILVA, J. G.; SANTOS, R. G.; PESQUERO, J. L.; SALUM, L. B.; DAGHESTANI, H. N.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; VOGT, A.; ROCHA, W. W.; BERALDO, H. *N*⁴-phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumour cells, SAR studies and investigation on the mechanism of action. *Em preparação*, 2011.

284 HØYER-HANSEN, M.; JÄÄTTELÄ, M. Autophagy: an emerging target for cancer therapy. *Autophagy*, v. 4, n. 5, p. 574-580, 2008.

285 PERCHELLET, E. M.; LADESICH, J. B.; COLLERY, P.; PERCHELLET, J. P. Microtubule-disrupting effects of gallium chloride in vitro. *Anticancer Drugs*, v. 10, n. 5, p. 477-488, 1999.

286 LESSA, J. A.; MENDES, I. C.; DA SILVA, P. R.; SOARES, M. A.; DOS SANTOS, R. G.; SPEZIALI, N. L.; ROMEIRO, N. C.; BARREIRO, E. J.; BERALDO, H. 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxic activity in nanomolar doses against malignant gliomas. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 5671-5677, 2010.

Anexo - Produção Científica

*Eu sou é eu mesmo. Diverjo de todo o mundo.
Guimarães Rosa (Grande Sertão : Veredas)*

Durante o período do doutorado, alguns trabalhos relacionados aos estudos descritos nessa tese e outros desenvolvidos em colaborações foram apresentados em congressos científicos e/ou publicados em periódicos especializados. Essas contribuições estão listadas nos tópicos abaixo.

CONGRESSOS

Apresentação de trabalhos relacionados ao projeto de pesquisa

1 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Estudos de modelagem molecular e QSAR de análogos do discodermolídeo com potente ação antitumoral. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ. 2008. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0387-1.pdf> >.

2 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Geração de um modelo farmacofórico baseado em produtos naturais moduladores da β -tubulina com potente ação antitumoral. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ. 2008. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0387-2.pdf> >.

3 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Structure- and fragment-based molecular modeling for the discovery of novel tubulin modulators. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY, 4., 2008, Porto de Galinhas. *Abstract...* Porto de Galinhas: SBQ. 2008.

4 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Bases químicas e estruturais para atividade anticâncer de análogos do discodermolídeo: estudos de QSAR 3D e de modelagem molecular. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. *Apresentação oral...* Fortaleza: SBQ. 2009.

5 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Bases químicas e estruturais para atividade anticâncer de análogos do discodermolídeo: estudos de QSAR 3D e de modelagem molecular. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. *Resumos...* Fortaleza: SBQ. 2009. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0152-1.pdf> >.

6 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Identificação dos requerimentos farmacofóricos e estudos de QSAR 3D CoMFA para uma série de inibidores da polimerização da tubulina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. *Resumos...* Fortaleza: SBQ. 2009. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0152-2.pdf> >.

7 GUIDO, R. V. C.; SALUM, L. B.; OLIVA, G.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Geração de um modelo farmacofórico 3D baseado na estrutura da β -tubulina para a triagem em larga escala de moduladores seletivos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ. 2009. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T0204-1.pdf> >.

8 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Insights into the binding of discodermolide to beta-tubulin: fragment-based QSAR and molecular modeling studies. In: INTERNATIONAL NETWORK OF PROTEIN ENGINEERING CENTERS, XVIII., 2009, Ubatuba. *Abstract...* Ubatuba: INPEC 2009.

9 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Effects of the organic cosolvent on tubulin polymerization in the presence of microtubule modulators. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA, 39., 2010, Foz do Iguaçu. *Resumos...* Foz do Iguaçu: SBBQ. 2010.

10 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Caracterização do efeito de moduladores com atividade antimetabólica na polimerização da tubulina. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33., 2010, Águas de Lindóia. *Resumos..* Águas de Lindóia: SBQ. 2010. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T2509-2.pdf> > .

11 SALUM, L. B.; GUIDO, R. V. C.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Determinantes estruturais para a inibição da tubulina: estudos de QSAR 3D para compostos indólicos estruturalmente distintos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33., 2010, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ. 2010. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T2509-1.pdf> > .

12 SALUM, L. B.; CHIARADIA, L. D.; VOLLMER, L. L.; CORDEIRO, M. N. S.; WINTER, E.; MATTEI, B.; DAGHESTANI, H. N.; ANDRICOPULO, A. D.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; DAY, B. W.; VOGT, A. Second generation chalcones as mitotic arresters. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA, XL., 2011, Foz do Iguaçu. *Resumos...* Foz do Iguaçu: SBBQ. 2011.

13 SALUM, L. B.; CHIARADIA, L. D.; VOLLMER, L. L.; WINTER, E.; PEDRINI, F. S.; DAGHESTANI, H. N.; SILVA, M. C. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; NUNES, R. J.; YUNES, R. A.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; VOGT, A. Planejamento de chalconas com atividade antimetabólica. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis. *Resumos...* Florianópolis: SBQ. 2011. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0722-1.pdf> > .

Trabalhos em colaboração

1 WEBER, K. C.; HONÓRIO, K. M.; SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D.; SILVA, A. B. F. Estudos de QSAR 3D para um conjunto de arilpiperazinas com afinidade pelo receptor 5-HT_{1A}. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ. 2008. Disponível em < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T0567-1.pdf> > .

2 ANDRADE, C. H.; SALUM, L. B.; PASQUALOTO, K. F. M.; FERREIRA, E. I.; ANDRICOPULO, A. D. Modelo farmacofórico 3D e estudos de QSAR CoMFA de uma série de análogos da isoniazida com ação tuberculostática. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31., 2008, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ. 2008. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/31ra/resumos/T1688-1.pdf> > .

3 HONÓRIO, K. M.; SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C.; ANDRICOPULO, A. D. Structure-based virtual screening of a large small-molecule library in the discovery of novel potential ligands of liver X receptor. In: BRAZILIAN SYMPOSIUM ON MEDICINAL CHEMISTRY, 4., 2008, Porto de Galinhas. *Abstract...* Porto de Galinhas: SBQ. 2008.

4 HONÓRIO, K. M.; SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; GARRATT, R. C.; ANDRICOPULO, A. D. Determinantes estruturais da seletividade para as isoformas do LXR: Estudos de holograma QSAR e modelagem molecular. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. *Resumos...* Fortaleza: SBQ. 2009. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1068-2.pdf>. >

5 SILVA, D. C.; SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D.; HONÓRIO, K. M. QSAR 3D CoMFA para uma série de quinolinas moduladoras do receptor MCH1R. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 33., 2010, Águas de Lindóia. *Resumos...* Águas de Lindóia: SBQ. 2010. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/33ra/resumos/T0513-2.pdf>. >

6 SALUM, L. B.; VALADARES, N. F. Identificando fragmentos estruturais de interação em inibidores da BACE-1. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis. *Resumos...* Florianópolis: SBQ. 2011. Disponível em: < <http://sec.s bq.org.br/cdrom/34ra/resumos/T0722-2.pdf>. >

ARTIGOS

Artigos relacionados ao projeto de pesquisa

1 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR and molecular modeling studies on a series of discodermolide analogs as microtubule-stabilizing anticancer agents. *QSAR & Combinatorial Science*, v. 28, n. 3, p. 325-337, 2009.

2 SALUM, L. B.; DIAS, L. C.; ANDRICOPULO, A. D. Structural and chemical basis for anticancer activity of a series of β -tubulin ligands: molecular modeling and 3D QSAR studies. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 4, p. 693-703, 2009.

3 SANTOS, M. A.; LESSA, J. A.; MENDES, I. C.; SILVA, J. G.; SANTOS, R. G.; PESQUERO, J. L.; SALUM, L. B.; DAGHESTANI, H. N.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; VOGT, A.; ROCHA, W. W.; BERBALDO, H. N^1 -phenyl-substituted 2-acetylpyridine thiosemicarbazones: cytotoxicity against human tumour cells, SAR studies and investigation on the mechanism of action. *Em preparação*, 2011.

4 SALUM, L. B.; ALTEI, W. F.; CHIARADIA, L. D.; CORDEIRO, M. S. N.; MATTEI, B.; CANEVAROLO, R. R.; SOUZA, C.; DAGHESTANI, H. K.; SANTOS-SILVA, M. C. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; YUNES, J. A.; NUNES, R. J.; ANDRICOPULO, A. D.; DAY, B. W.; VOGT, A. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. *Em preparação*, 2011.

Artigos de revisão relacionados aos métodos computacionais utilizados no projeto de pesquisa

1 SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR: perspectives in drug design. *Molecular Diversity*, v.13, n.3, p. 277-285, 2009.

2 ANDRICOPULO, A. D.; SALUM, L. B.; ABRAHAM, D. J. Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v. 9, n. 9, p. 771-790, 2009.

3 SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR strategies in drug design. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 5, n. 5, p. 405-412, 2010.

Artigos em colaboração

1 HONÓRIO, K. M.; SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D. Two- and three dimensional quantitative structure-activity relationships studies on a series of liver X receptor ligands. *The Open Medicinal Chemistry Journal*, v. 2, p. 87-96, 2008. DOI: 10.2174/1874104500802010087

2 VALADARES, N. F.; SALUM, L. B.; POLIKARPOV, I.; ANDRICOPULO, A. D.; GARRATT, R. C. Role of halogen bonds in thyroid hormone receptor selectivity: pharmacophore-based 3D-QSSR studies. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 49, n. 11, p. 2606-2616, 2009.

3 WEBER, K.C.; SALUM, L. B.; HONÓRIO, K. M.; ANDRICOPULO, A. D.; DA SILVA, A. B. Pharmacophore-based 3D QSAR studies on a series of high affinity 5-HT_{1A} receptor ligands. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 4, p. 1508-1514, 2010.

4 SALUM, L. B.; VALADARES, N. F. Fragment-guided approach to incorporating structural information into a CoMFA study: BACE-1 as an example. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, v. 24, n. 10, p. 803-817, 2010.

5 SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D.; HONÓRIO, K. M. A fragment-based approach to study ligand binding affinity and selectivity for LXR β . *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, 2011. DOI: 10.1016/j.jmgm.2011.09.007