



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

Tese de Doutorado

**ESTUDO TEÓRICO DE INIBIDORES
DA PROTEÍNA QUINASE DE
ADESÃO FOCAL**

DANIEL AUGUSTO BARRA DE OLIVEIRA

Orientador:

PROF. DR. JOÃO BATISTA LOPES MARTINS

Brasília, 01 de novembro de 2013



Universidade de Brasília

Programa de Pós-Graduação em Química

ESTUDO TEÓRICO DE INIBIDORES DA PROTEÍNA QUINASE DE ADESÃO FOCAL

**Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação
em Química da Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do título de Doutor.**

Daniel Augusto Barra de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. João Batista Lopes Martins

Brasília 01 de novembro de 2013

Agradecimentos

À Deus, por tudo.

Ao professor João Batista por todo o aprendizado, pela paciência e dedicação em elucidar vários problemas corriqueiros deste trabalho.

À minha família pelo apoio durante todo o doutorado.

À minha esposa pela paciência.

Aos meus amigos do laboratório: Victor Bonfim, Jussara, Elton e Marcos, que além de colaborarem com a execução deste trabalho, propiciaram momentos divertidos e descontraídos.

À Secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Química pela ajuda na elucidação de problemas administrativos.

Resumo

As proteínas quinases são importantes por atuar em processos biológicos conhecidos, como a transdução de sinais. Esses processos estão intimamente relacionados com o desenvolvimento de neoplasias malignas. Desse modo, o conhecimento da atuação de drogas, relacionadas com essas proteínas, é relevante para o tratamento de alguns tipos de câncer. Neste trabalho, procurou-se estudar inibidores da proteína quinase de adesão focal (FAK), a fim de correlacionar propriedades teóricas, obtidas pela química computacional, com atividades biológicas calculadas a partir do IC_{50} , para auxiliar no entendimento entre essas drogas e a FAK. Para realizar os cálculos foram usadas diversas aproximações de modelagem molecular, dentre as quais, mecânica molecular, métodos *ab initio*, e métodos híbridos. Para a aproximação de mecânica quântica foram usados os métodos Hartree-Fock, teoria do funcional de densidade, e semi-empíricos PM3, PM6 e MNDO, para descrever a interação entre o sítio catalítico da FAK e os inibidores. O programa auto-docking Vina foi usado para o ancoramento rígido. As atividades de inibidores da classe 7-h-pirrol-pirimidina foram comparadas com dados provenientes da mecânica quântica, cujo resultado mostrou a importância dos orbitais de fronteira próximos ao aminoácido Cys502. Quanto mais estendidos esses orbitais, maior poderá ser atividade de inibição da FAK. São ainda observadas interações moleculares com os aminoácidos Arg424 e Lys454. Os inibidores dasatinib, sulfonamida e tiazole também foram estudados com métodos de química quântica. Esses inibidores mostram tendências químicas semelhantes com aqueles da classe pirrolo pirimidina, no que se refere às interações com os aminoácidos da tríade catalítica, enfatizando a necessidade dessas interações na construção de novos inibidores. Além disso, a partir da análise de componentes principais, foi mostrada uma correlação entre atividades e propriedades eletrônicas. A soma de todos esses estudos leva a novas fronteiras para o entendimento da interação de fármacos inibidores da proteína quinase e, conseqüentemente, a compreensão da inibição da metástase, que são uma das maiores causas de morte no mundo moderno.

Palavras-chave: **FAK, inibidores, química computacional, câncer.**

Abstract

The kinases proteins play important role acting in known biological process, as the signal transduction. These processes are strongly related to the development of malignant neoplasms. Therefore, the knowledge of the drug action related to the kinase protein is relevant for the cancer treatment. In this work, it was studied inhibitors of focal adhesion kinase (FAK) protein in order to correlate theoretical properties with biological activity via IC₅₀, to understand the interaction between these drugs with FAK. In order to perform the calculations it was employed several approaches of molecular modeling, as molecular mechanics, *ab initio* and hybrid methods. For the quantum mechanical approach we have used Hartree-Fock, density functional theory and semi-empirical PM3, PM6, *MNDO* methods to describe the interaction between the catalytic site of FAK binding and the selected inhibitors. *Auto Docking Vina* program was employed to perform the rigid *docking*. The inhibitor activities of 7-h-pirrole-pirimidines were compared to the results of quantum mechanical approaches, and these results shows the important relation to the frontier orbitals close to the Cys502 aminoacid. The largest contribution of these orbitals is closely related to the FAK inhibition. The molecular interaction with Arg454 and Lys454 aminoacids were also showed. Dasatinib, sulfonamide and thiazole inhibitors also presents these main interactions, emphasizing the relevance of catalytic site interaction of FAK with new inhibitors. Furthermore, from the principal component analysis, it was shown a correlation between activity and electronic properties. The present study leads to new frontiers for the understanding the interaction between focal adhesion kinase and the inhibitors, which is related to the metastase, one o the main reason of death in the world

Keywords: **FAK, inhibitors, computational chemistry, cancer.**

Sumário

Introdução.....	14
O que é câncer?	17
Estímulos ambientais.....	18
As proteínas G acopladas e a transdução de sinais.....	19
Receptores Tirosina Quinase.....	19
Integrinas	20
As proteínas quinases e o câncer	20
A proteína quinase de adesão focal	22
A proteína quinase de adesão focal e o desenvolvimento do câncer.	24
Inibidores de tirosina quinase.....	25
Alguns inibidores da proteína quinase de adesão focal.....	26
Fármaco 7-h-pirrolo-pirimidina	26
O Fármaco Dasatinibe	28
Bis Anilino Pirimidina	29
Metanosulfonamida diaminopirimidina.....	30
Pirrolo 2,3 d tiazole	31
IC ₅₀ Concentração de Inibição a 50%.....	33
A química computacional e o estudo de alvos moleculares	33
Fundamentos da teoria quântica	34

Métodos <i>Ab initio</i>	35
Métodos Semi-Empíricos	41
Mecânica Molecular	43
A aproximação MP2 Moller-Plesset	45
Simulação de Solventes	46
O método ONIOM	48
Termodinâmica estatística	50
A Dinâmica molecular	52
<i>Docking</i> Molecular	53
Análise de Componentes Principais	54
Objetivos	31
Protocolos Utilizados	56
Metodologia 1 (Estudo dos inibidores pirrolo-pirimidinas)	56
Protocolo 2 (Estudo da molécula Dasatinibe)	60
Protocolo 3 (Estudo dos complexos bis-anilino-piridina)	63
Protocolo 4 (Estudo do complexo 2-3-d-tiazole)	64
Protocolo 5 (Estudo da interação da molécula de ATP com a proteína FAK).	65
Resultados e discussão	67
Estrutura eletrônica e atividade das moléculas pirrolo-pirimidina	69
Estrutura eletrônica e <i>docking</i> molecular da molécula dasatinibe	83
Estrutura eletrônica e <i>docking</i> molecular da molécula sulfonamida	89

Estrutura eletrônica e <i>docking</i> molecular da molécula ATP	92
Estrutura eletrônica do complexo bis-anilino-pirimidina	96
Estrutura eletrônica da molécula pirrolo 2,3 d tiazole	99
Análise geral dos resultados obtidos	102
Conclusões	107
Perspectivas	110
Bibliografia.....	111

Lista de Tabelas

Tabela 1: Volume Molecular dos inibidores da proteína FAK	68
Tabela 2: Ligações de hidrogênio realizadas entre os aminoácidos da enzima FAK e as moléculas da classe pirrolopirimidina	69
Tabela 3: Energias de interação obtidas com diversos métodos e bases	77
Tabela 4: Resultados dos cálculos de energia livre usando o método B3LYP/6-31g para a interação inibidor/aminoácidos do sítio ativo.	80
Tabela 5: Contribuição entálpica e entrópica para a formação do complexo inibidor/aminoácidos.....	81
Tabela 6: Desvio de planaridade do fármaco dasatinibe utilizando diferentes aproximações	85
Tabela 7: Distâncias interatômicas das ligações de hidrogênio estabelecidas entre o fármaco dasatinibe e os aminoácidos listados.	87
Tabela 8: Distâncias de ligação entre o inibidor sulfonamida e os aminoácidos da proteína quinase de adesão focal.....	91
Tabela 9: Distâncias de ligações de hidrogênio realizada pela molécula de ATP no sítio catalítico da proteína FAK.	94
Tabela 10: Aminoácidos da proteína quinase de adesão focal que interagem com a molécula bis-anilino-pirimidina.	97

Lista de Figuras

Figura 1. Modo de interação da enzima FAK com as demais proteínas participantes do mecanismo de transdução de sinais	23
Figura 2. Estrutura molecular de molécula 7-h-pirrolo-pirimidina	27
Figura 3. Estrutura molecular da molécula de dasatinibe.	29
Figura 4. Estrutura da molécula bis anilino pirimidina	30
Figura 5. Exemplo de uma curva dose/resposta para um inibidor	Erro!
Indicador não definido.	
Figura 6. Diagrama esquemático do método ONIOM para uma proteína. .	49
Figura 7. Inibidores selecionados para o estudo de <i>docking</i> molecular com proteína quinase de adesão focal.....	57
Figura 8. Geometria otimizada dos inibidores estudados.	67
Figura 9. Potencial eletrostático calculado para os inibidores 1 e 16i.	71
Figura 10. Orbitais de Fronteira calculados para a interação entre os aminoácidos do sítio catalítico da proteína FAK com o inibidor 7-h-pirrolo-pirimidina.	72
Figura 11. Orbitais de Fronteira calculados para a interação entre os aminoácidos do sítio catalítico da proteína FAK com o inibidor 7-h-pirrolo-pirimidina.	73
Figura 12. Orbitais de fronteira para inibidor 18i.....	73
Figura 13. Orbitais HOMO e LUMO para os inibidores 18i e 16i, respectivamente.	74

Figura 14. Disposição dos orbitais HOMO e LUMO para o inibidor 32.....	75
Figura 15. Potencial eletrostático gerado para a interação entre o inibidor 17i e os aminoácidos Lys454, Arg412 e Cys502.....	76
Figura 16. Gráfico de componentes principais para os inibidores da classe pirrolo pirimidina.....	82
Figura 17. Droga dasatinibe ancorada ao sítio catalítico da proteína.	84
Figura 18. Grupos químicos que apresentaram rotação dos diedros durante a dinâmica molecular.....	86
Figura 19. Ligação de hidrogênio associada com a rotação do ângulo diedro do grupo hidroxila do fármaco dasatinib.	86
Figura 20. Mapa de potencial eletrostático obtido para o sítio da proteína FAK com o fármaco dasatinibe obtido via a aproximação PM6.....	88
Figura 21. Inibidor sulfonamida ancorado ao sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal.....	90
Figura 22. Orbitais de Fronteira para interação entre o inibidor sulfonamida e o sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal.....	92
Figura 23. Interação da molécula de ATP com a proteína quinase de adesão focal	93
Figura 24. Orbitais de fronteira calculados para a interação da molécula de ATP com o sítio da proteína FAK.....	95
Figura 25. Potencial eletrostático calculado para a molécula de ATP interagindo com o sítio catalítico da proteína FAK.	96
Figura 26. Orbitais de fronteira da molécula bis anilino pirimidina	98
Figura 27. Potencial eletrostático obtido para interação entre o fármaco bis-anilino-pirimidina.	99

**Figura 28. Fármaco 2,3 d tiazole complexado ligando-se ao aminoácido
Cys502..... 100**

**Figura 29. Orbitais de Fronteira para interação entre o fármaco 2,3,d
tiazole e o sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal..... 101**

Lista de Abreviaturas e Acrônimos

ALA - Alanina

ARG – Arginina

ASP – Aspartato

ATP – Adenosina Trisfosfato

CYS – Cisteína

DFT – Teoria do Funcional de Densidade

FAK – Focal Adhesion Kinase

GLU – Glutamina

HF – Hartre-Fock

IC₅₀ – Inibição da Concentração de 50%

LEU - Leucina

LYS – Lisina

MET - Metionina

MP2 – Método Perturbacional de Segunda Ordem

Oniom-Own-m-Layered-Integrated – Molecular Orbital and Molecular Mechanics

PCA – Análise de Componentes Principais

PCM – Modelo Contínuo

PHE - Fenilamina

QM/MM – quantum mechanics/molecular mechanics

RTK – Receptores Tirosina Quinase

SCF – Teoria do Campo Autoconsistente

SER – Serina

THR – Tirosina

UFF – Universal Force Field

Introdução

O estudo teórico de inibidores da proteína quinase de adesão focal remete ao estudo de novas drogas contra o câncer. Essas drogas têm sido utilizadas de modo diversificado no tratamento de tumores em estágio avançado, tornando-se alternativas aos atuais tratamentos, como a quimioterapia e a radioterapia. Inibir a atividade do processo bioquímico conhecido como transdução de sinais é um pressuposto para construção de novas moléculas, cuja função é bloquear a atividade do ATP e consequentemente a metástase. Nesse sentido, será abordada nesse trabalho uma definição gradual do câncer, iniciando-se com a definição macroscópica em nível de tecido, passando pelo nível bioquímico e chegando a inibição em nível molecular, que é a conjectura para o entendimento de inibição da metástase.

O que é câncer?

O termo tumor (ou neoplasia) é usado para indicar um aumento de uma parte ou totalidade de um tecido, podendo ser devido às chamadas neoplasias malignas, o qual denominamos de câncer. Este é na realidade o termo usado para um conjunto de mais de 100 doenças, nas quais as células se dividem sem controle, sendo capazes de invadir outros tecidos ¹. O câncer não é uma única doença, mas várias, cujas denominações estão orientadas ao órgão ou tecido lesado, como por exemplo, carcinoma, sarcoma, leucemia, linfoma e melanoma e no sistema nervoso central. No organismo, as células crescem e se dividem de uma maneira controlada, criando assim novas células ². Chegando por fim à morte celular que pode ser classificada de acordo com sua aparência, tal qual, apoptose, necrose, autofágica, ou associada com a mitose ³. Estudos sobre a apoptose aumentaram bastante desde a década de 1990, com o prêmio Nobel de medicina em 2002 para o trabalho que identificava os genes relacionados ao controle da apoptose. A importância dos estudos de apoptose levou a criação de periódicos especializados nesse tema tais como: Cell Death and Differentiation da Nature e a revista Apoptosis da Springer, desde 1996. O câncer tem início nas células, quando alterações genéticas levam o DNA dessas células a produzir mutações, as quais afetam um amplo espectro de funções destas células, como proliferação, migração, diferenciação e morte celular. As novas células formam um tumor que pode ser benigno ou maligno, que no último caso é denominado de câncer.

A propagação do câncer para outros tecidos do corpo se dá mediante a chamada metástase. A origem da metástase está intimamente correlacionada a reações bioquímicas que ocorrem dentro das células. Essas envolvem a comunicação celular mediante a transdução de sinais, que ocorre quando um sinal extracelular ativa uma proteína receptora presente na superfície das células. A ativação se dá pela mudança conformacional da proteína receptora, desencadeando dessa forma uma resposta física por parte da célula. Essas respostas podem ser dadas na forma de multiplicação celular ou mesmo a morte programada (apoptose).

Uma breve explanação acerca dos estímulos ambientais associado ao processo de transdução de sinais demonstrará como se inicia esse processo bioquímico de transdução de sinais. Em seguida serão demonstrados os caminhos ulteriores percorridos pela transdução de sinais.

Estímulos ambientais

Há vários modos de iniciar o processo de transdução de sinais. Fótons advindos do ambiente externo podem interagir com as células da retina do olho, desencadeando respostas bioquímicas, cuja finalização resultará na formação das imagens que enxergamos. Esse processo é conhecido como fototransdução. Pode-se ainda ressaltar, a título de exemplo, a nossa percepção acerca dos odores. Nesse mecanismo bioquímico, o estímulo ambiental ocorre pela interação das moléculas odorantes com receptores no epitélio nasal⁴. Essas realidades demonstram a vitalidade desse processo bioquímico na percepção do mundo pelos seres vivos.

De modo análogo aos exemplos anteriores, porém essencialmente deletério, verifica-se a existência de desordens transducionais propiciadas pelo meio externo à célula e aos tecidos. Nesses processos, verifica-se uma desordem no processo de transdução de sinais, cujo resultado é conhecido como câncer. Mutações no DNA, propiciadas pelos fótons ambientais, alimentos e certos organismos como vírus, têm sido correlacionadas com o descontrole do mecanismo de comunicação celular ³.

O fenômeno de transdução de sinais envolve uma série de moléculas bioquímicas cuja ênfase se faz necessária para o entendimento de processos bioquímicos que propiciam a metástase.

As proteínas G acopladas e a transdução de sinais

A sinalização celular inicia-se com uma proteína do tipo G acoplada inativa, que são proteínas transmembranares. Um ligante do meio exterior se liga à proteína G, levando a mudanças conformacionais nessa molécula, tornando-a ativa. Essas mudanças conformacionais propiciam a interação das proteínas G acopladas com outras moléculas ⁵. O tempo total de atuação das proteínas do tipo G é mediado pela interação molécula/receptor.

Receptores Tirosina Quinase

Receptores tirosina quinase (RTK) são proteínas transmembranares, com um domínio quinase intracelular e extracelular, que se liga aos íons ou moléculas específicas. Como exemplo podemos citar as proteínas de fator de crescimento, capazes de estimular o crescimento celular, ou mesmo receptores de insulina, que regulam o metabolismo de carboidratos e gorduras no corpo ⁶.

A fim de realizar a transdução de sinais, as proteínas RTK precisam formar dímeros na membrana plasmática. Esses dímeros são estabilizados por moléculas específicas que se ligam ao receptor ⁷. A interação dessas proteínas, com o meio citoplasmático, estimula a auto fosforilação de tirosinas dentro do domínio das proteínas RTK, causando mudanças conformacionais. Os receptores quinase são subseqüentemente ativados, iniciando a cascata de sinais, via fosforilação no citoplasma, que facilita vários processos celulares, tais quais a diferenciação celular e o metabolismo ⁶.

Integrinas

As integrinas são produzidas por grande variedade de células, cuja função é a adesão celular e a transdução de sinais provenientes da matriz extracelular. De forma análoga as RTKs, as integrinas são ativadas via ligação de moléculas específicas a sua cavidade catalítica, propiciando mudanças conformacionais na estrutura proteica, cuja resposta é a inicialização da transdução de sinais. Essas proteínas têm sido correlacionadas com o desenvolvimento da metástase.

As proteínas quinases e o câncer

As proteínas quinases são enzimas que catalisam as reações de fosforilação entre proteínas. Essas entidades macromoleculares propiciam a transferência de um grupo fosfato para os aminoácidos Thr e Ser.

O grupo de enzimas denominadas quinases constitui uma família muito numerosa de proteínas em eucariotos ⁸ e é o cerne da comunicação e regulação intracelular. O mecanismo regulador envolve fenômenos variados,

que vão desde a alteração de estruturas proteicas até o controle transcricional. Por isso, um entendimento detalhado dessas enzimas, bem como dos seus respectivos mecanismos de atuação, tem sido foco de constantes pesquisas científicas, principalmente na descoberta de novos fármacos ⁹. A importância singular, desse ramo científico da bioquímica, ainda pode ser vislumbrada pela existência de várias revistas científicas, de alto impacto acadêmico, dedicadas ao processo de transdução de sinais ^{10,11}.

A participação de proteínas quinases no desenvolvimento da metástase está bem estabelecida, pois verifica-se que essas enzimas se encontram desreguladas em tumores, mantendo a fosforilação, que leva aos sinais de transdução a um estado permanentemente ativado ¹².

Atualmente há inúmeros medicamentos antitumorais cuja atuação se dá em nível do processo de transdução de sinais. Dentre esses medicamentos pode-se destacar o imatinibe (Gleevec)[®] que teve grande relevância para o tratamento da leucemia mielóide crônica. O imatinibe inibe especificamente a enzima BCR-ABL, uma tirosina quinase que participa do processo de transdução de sinais, bem como no desenvolvimento de tumores ¹³. Esse medicamento teve especial importância no desenvolvimento de moléculas inibidoras de quinase ^{14 15}.

Apesar da singularidade dessa molécula, cuja inibição se dá em alvos enzimáticos específicos, tem se verificado um aumento da resistência ao tratamento com esse fármaco. Essa resistência se dá através da aquisição de mutações secundárias nas quinases, aumento do fluxo e metabolismo dos fármacos, bem como a utilização de vias oncogênicas distintas ⁹. Diante dessa

realidade, são propostos outros fármacos inibidores de proteínas quinases, cuja inibição ocorre em diferentes tipos de enzimas ¹⁶.

A proteína quinase de adesão focal

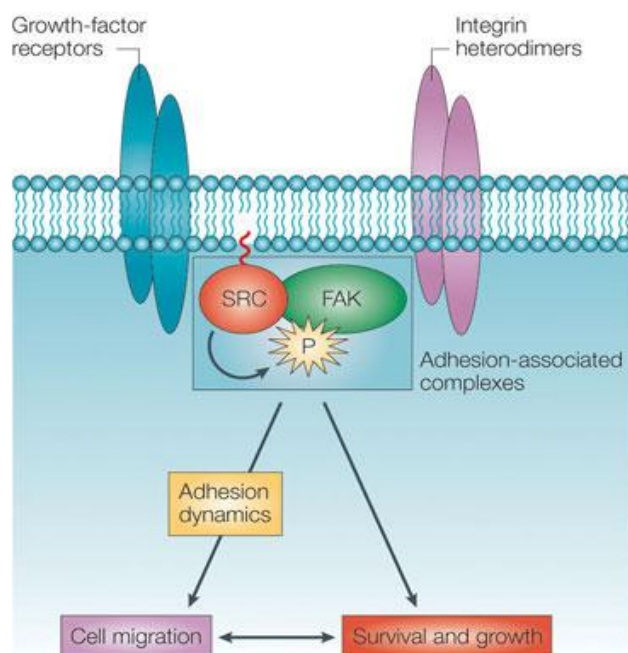
As enzimas quinases de adesão focal (FAK) se localizam no meio citoplasmático, conectadas com as integrinas. O aumento da fosforilação da proteína FAK tem sido correlacionado com a interação das integrinas com a fibronectina, que é uma proteína adesiva que ajuda as células a aderirem a matriz celular ¹⁷.

A enzima FAK faz parte da família dos receptores de tirosinas quinases. Essa é encontrada em muitos tipos de tecidos e células e é conservada em mamíferos bem como em eucariotos como as drosófilas ¹⁸.

A estrutura da enzima FAK compreende um domínio catalítico, ao lado de domínios não catalítico de terminais N-C, que são os átomos finalizadores da cadeia polipeptídica ¹⁹. Possui uma massa de 125kDa e é encontrada no citosol. Em geral, os membros dessa família são ligados à glicoproteínas transmembranares. *In vitro* verifica-se que os domínios N terminais se ligam às subunidades das β integrinas ²⁰, embora essa interação *in vivo* ainda seja desconhecida. O domínio N terminal, da enzima FAK, também regula a interação com as proteínas de fator de crescimento epidérmicas, embora ainda não seja claro onde ocorra essa interação ²¹.

A fosforilação da proteína FAK é uma resposta da interação das proteínas integrinas com sinalizadores químicos, cuja continuidade induz mudanças conformacionais que promovem a interação com outras proteínas,

prossequindo dessa forma, o mecanismo de transdução de sinais. Essa realidade é mais bem contemplada com o auxílio da Figura 1.



Copyright © 2005 Nature Publishing Group
Nature Reviews | Cancer

Figura 1. Modo de interação da enzima FAK com as demais proteínas participantes do mecanismo de transdução de sinais

Consideráveis evidências mostram que a proteína FAK está intimamente envolvida no processo de regulação da migração celular. Quando se verifica a deficiência da proteína FAK, as células se espalham mais lentamente, exibindo dessa forma mais adesões celulares ²³.

Pode-se verificar, portanto que a enzima FAK é um componente crucial na sinalização celular, ativando numerosos estímulos e biosensores integrados com o controle da motilidade celular. Através das múltiplas conexões moleculares, a enzima FAK pode influenciar o citoesqueleto, estruturas de adesão celular e sítios regulam o movimento celular ²⁴.

A proteína quinase de adesão focal e o desenvolvimento do câncer.

A enzima FAK é uma importante mediadora nos processos de proliferação celular, sobrevivência celular e migração celular. Dado que o desenvolvimento de tumores malignos está associado com a perturbação nesses processos, não é surpreendente o fato de que a atividade da proteína FAK esteja alterada em células cancerígenas.

Modelos usando ratos têm mostrado que a FAK está envolvida na formação e progressão de tumores. Outros estudos mostram ainda que a super expressão da FAK é observada em tumores malignos, tornando a FAK, dessa forma, um alvo interessante no desenvolvimento de fármacos contra o câncer²⁵.

Estudos sobre a expressão anormal da FAK demonstraram alterações fenotípicas nas células, bem como em outras funções celulares. Em vários tipos de tumores como os de tireoide, próstata, cólon e ovário observa-se uma expressão elevada da proteína FAK correlacionando-se ainda com o aumento substancial da metástase^{26 27 28 29 30}. Em adição, a FAK regula a formação do tumor e a progressão do mesmo³¹. Nesse sentido, a inibição da proteína FAK é evidenciada como uma nova estratégia para o tratamento do câncer²⁵.

As proteínas quinases existem em duas conformações de equilíbrio: uma é ativa e a outra inativa³². A ativação da FAK se dá pela fosforilação de aminoácidos no conhecido laço de ativação. Essa parte da proteína contém três resíduos altamente conservados que formam o motivo DFG, que são curtas sequências de aminoácidos que se repetem em outras proteínas. A conformação derivada da fosforilação do laço de ativação é a estrutura da FAK

ativada. A conformação ativa do padrão DFG é muito similar entre as quinases. Desse modo, muitos inibidores da proteína FAK são construídos a fim de inibir a ativação da proteína FAK, via alvos moleculares no padrão DFG. Essas moléculas são conhecidas como inibidores do tipo I. Inibidores dessa categoria se ligam diretamente ao sítio de ligação do ATP, competindo diretamente com o mesmo.

Inibidores de tirosina quinase

Existem no mercado vários fármacos para o tratamento de tumores específicos, cujo enfoque é a inibição de proteínas quinases. Dentre esses podemos destacar a droga imatinibe, cujo desenvolvimento se deu para o tratamento do câncer de mieloide, e inaugurou a era das drogas do tipo *tinibes*³³.

O exacerbado uso desse medicamento gerou a resistência por parte das doenças tratáveis, o que levou ao aparecimento de novas drogas no mercado. Surgiram, dessa maneira, as drogas inibidoras de multiquinases. Dentre essas podemos destacar o lapatinibe³⁴, cernitinibe³⁵, nilotinibe³⁶ e o dasatinibe conhecido como sprycel®³⁷.

A observação das estruturas moleculares desses fármacos revelam estruturas farmacofóricas comuns entre eles. O cernitinibe e o lapatinibe possuem núcleos quinazolínicos. Essas características farmacofóricas em comum foram inseridas, a fim de mimetizar o anel de adenina do substrato ATP facilitando assim a ligação na região de dobradura, conectando os domínios N e C terminal do sítio catalítico¹⁰.

Geralmente os inibidores de proteína quinase competem pelo sítio da ligação da molécula de ATP, possuindo aspectos terapêuticos garantidos, podendo ser combinados com outros tipos de tratamento como aqueles provenientes de fontes radioativas e aqueles de quimioterápicos ³⁸.

Existem mais de noventa proteínas quinases, cujo modo de ativação se dá pela transferência de grupos fosfato, provenientes do seu sítio catalítico. Observa-se desse modo que a topologia do sítio catalítico nessas enzimas é bastante similar, porém altamente seletiva, constituindo, desse modo, um desafio à construção de moléculas que inibam a atividade dessas enzimas ^{39 40}
⁴¹.

Para a molécula de ATP são observadas ligações com o sítio através dos aminoácidos Asp381, Phe382 e Gly383.

Alguns inibidores da proteína quinase de adesão focal

Como seria demasiado longo trabalhar atomisticamente com todos os inibidores da proteína quinase de adesão focal, podendo dizer que é não tratável nas condições atuais, restringir-se-á este trabalho a algumas moléculas de aplicabilidade mais recente na indústria farmacêutica.

Fármaco 7-h-pirrolo-pirimidina

A molécula 7-h-pirrolopirimidina, produzida pela indústria Astrazeneca, tem sido correlacionada com a inibição da proteína FAK. Estudos em ratos, utilizando células de melanoma humano, mostraram que o bloqueio da atividade da enzima FAK propicia a inibição do crescimento de tumores

primários e virtualmente eliminam a metástase ⁴². Por conseguinte, o fármaco da classe 7-h-pirrolopirimidina atua como uma importante regra no tratamento desses tipos de cânceres. A estrutura molecular dessa droga é mostrada na Figura 2:

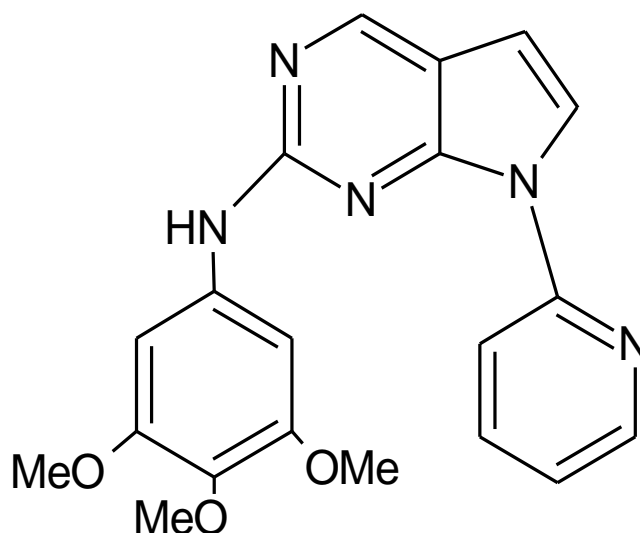


Figura 2. Estrutura molecular de molécula 7-h-pirrolo-pirimidina

Nesse trabalho foram escolhidas as drogas da classe 7-h-pirropirimidina sintetizadas por Choi e colaboradores ⁴², cuja diferenciação se dá pelo acréscimo do grupo carboxilato em diferentes posições no anel piridínico. Nesse artigo, essas drogas foram denominadas utilizando a mesma notação do autor, **1, 16i, 18i, 17g, 17h, 17i e 32**⁴². A disposição do grupo carboxilato em diferentes substituições no anel piridínico, associada com o computo do IC₅₀ para cada droga, foi associada nesse trabalho com a energia de interação. Esse estudo teve o intuito de estabelecer uma possível relação entre energia de interação inibidor/sítio com o IC₅₀, seguindo trabalho estudos da literatura ⁴².

Para estes inibidores procedeu-se ainda estudos estatísticos, cujo resultado propicia o agrupamento desses fármacos de acordo com suas atividades.

O Fármaco Dasatinib

Dasatinibe é uma droga produzida pela indústria farmacêutica Bristol-Myers Squibb®, a qual é utilizada para o tratamento do câncer de mielóide e próstata. A venda dessa droga se dá sobre o nome de Sprycel. Essa molécula tem conhecida atividade inibitória de receptores tirosina quinase. De modo específico, está correlacionada com inibição das enzimas BCR/ABL, Src e c-Kit.

O fármaco Dasatinibe foi escolhido pois apresenta também atividade inibitória para a proteína FAK⁴³. Portanto, o uso dessa droga poderia se estender ao tratamento de outros tipos de câncer, tais quais os relacionados ao pulmão, esôfago, tireóide, mama entre outros^{44 45}. A estrutura do fármaco dasatinibe pode ser vislumbrada na Figura 3. Nesse trabalho, a droga dasatinib foi ancorada ao sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal, com o intuito de estabelecer quais aminoácidos poderiam interagir com essa molécula, no sítio catalítico. A fim de auxiliar na busca de uma conformação de equilíbrio para o complexo inibidor/proteína, foram empregados métodos quânticos semi-empíricos para a otimização do complexo molecular. Uma dinâmica molecular foi ainda empregada para a busca de possíveis ligações fora do equilíbrio. Cálculos de propriedades eletrônicas foram usados para corroborar esses resultados, que podem ser comparados com aqueles das drogas da classe pirropirimidina.

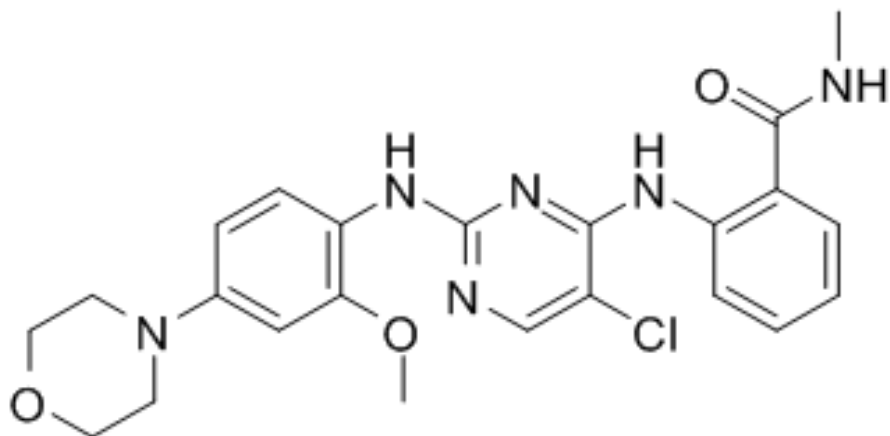


Figura 3. Estrutura molecular da molécula de dasatinibe.

Bis Anilino Pirimidina

O fármaco da classe bis anilino pirimidina ⁴⁶ inibe a autofosforilação da matriz celular induzida, pela proteína quinase de adesão focal. Essa droga retarda o crescimento de células tumorais, atenua a progressão do ciclo celular e, ainda, inibe a invasão da célula tumoral, em pelo menos 50%. Pode ser utilizado no tratamento de tumores de mama e de pulmão. A estrutura dessa droga pode ser visualizada na Figura 4. Esta droga apresenta um padrão molecular semelhante a dasatinib, portanto também foi selecionada para o cálculo de estrutura e atividade.

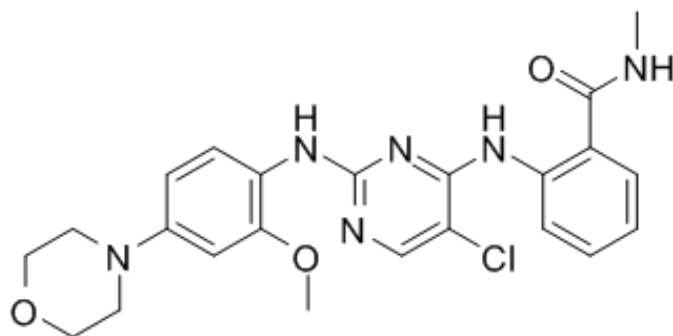


Figura 4. Estrutura da molécula bis anilino pirimidina

Neste trabalho foram realizados cálculos de estrutura eletrônica para essa droga ancorada ao sítio catalítico, na intenção de determinar possíveis interações com aminoácidos encontrados em outras classes de drogas como aquelas provenientes da estrutura da 7-h-pirrolopirimidina.

Metanosulfonamida diaminopirimidina

A molécula da classe metanosulfonamida diaminopirimidina ⁴⁷ é um potente inibidor competitivo da molécula de ATP, apresentando inibição robusta da proteína quinase de adesão focal em ensaios celulares. Tem aplicações no tratamento de câncer de cólon e pulmão.

No presente trabalho, a droga metanosulfonamida foi estudada ancorada ao sítio catalítico da proteína FAK, empregando-se cálculos de estrutura eletrônica que pudessem determinar interações com aminoácidos específicos presentes no sítio catalítico. A realização desses cálculos teve o intuito de verificar interações dessa droga com aminoácidos presentes em outros inibidores da FAK.

Pirrolo 2,3 d tiazole

O composto 2,3 d tiazole é capaz de induzir a morte programada das células em diferentes linhas de células antitumorais ⁴⁸. A droga foi estudada nesse trabalho ancorada ao sítio catalítico da proteína FAK, empregando-se cálculos de estrutura eletrônica para encontrar geometrias de equilíbrio. Esse estudo teve o objetivo de confrontar as interações presentes no complexo droga/enzima com interações presentes em outros inibidores da proteína FAK.

IC₅₀ Concentração de Inibição a 50%

O IC₅₀ será utilizado ao longo deste estudo como uma base para acessar a informação de atividade da droga. Esta é uma medida de efetividade de um composto na inibição de atividades biológicas ou bioquímicas. Essa medida quantitativa indica quanto de uma droga ou substância particular é necessário para inibir uma resposta bioquímica pela metade. Em outras palavras, é a metade de máxima inibição de uma substância. Essa medida experimental é utilizada como medida do potencial de drogas na pesquisa farmacológica. O IC₅₀ de uma droga pode ser determinado construindo-se a curva dose-resposta, e verificando o efeito de diferentes concentrações do antagonista invertendo a atividade do agonista, conforme o gráfico ilustrativo presente na Figura 5.

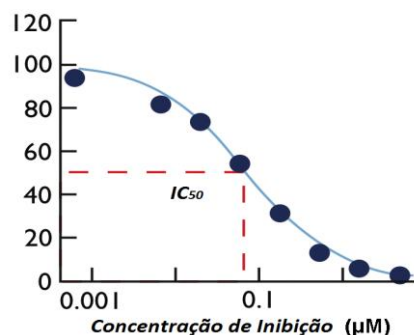


Figura 5. Exemplo de uma curva dose/resposta para um inibidor

Os valores de IC_{50} são dependentes das condições nos quais eles são aferidos. Além disso, dependendo do tipo de inibição, outros fatores podem influenciar os valores de IC_{50} . Para enzimas dependentes de ATP, os valores de IC_{50} tem interdependência com a concentração de ATP, principalmente se a inibição deles é competitiva. O IC_{50} pode ser usado para comparar o potencial de dois ou mais antagonistas.

Objetivos

Objetivo Geral

Esse trabalho tem como objetivo correlacionar às propriedades biológicas dos inibidores da proteína quinase de adesão com determinadas propriedades eletrônicas, procurando-se estabelecer padrões que ajudem na construção de novas moléculas inibidores da enzima FAK.

Objetivos específicos

a) Comparação da atividade biológicas (IC_{50}) dos inibidores da classe pirrolopirimidina com propriedades eletrônicas derivadas de cálculos de estrutura eletrônica.

b) Estudo da interação fármaco/receptor para a droga dasatinib, com consequente obtenção de propriedades químicas e eletrônicas via cálculos de estrutura eletrônica.

c) Estudo teórico do ATP, da droga sulfonamida, anilinoimidazolidina, e tiazole com o intuito de obter uma descrição química e eletrônica da interação fármaco receptor.

d) Inferir características químicas e eletrônicas comuns, que tornam os inibidores estudados em potenciais drogas para o combate do câncer, auxiliando dessa forma na construção de novas drogas com maior potencial de inibição para a enzima quinase de adesão focal.

Fundamentação Teórica

A química computacional e o estudo de alvos moleculares

As proteínas possuem alta especialização em relação às reações que catalisam, bem como na interação com o substrato que interage com o seu sítio catalítico. Nesse sentido, os inibidores devem possuir geometria complementar ao do sítio catalítico das enzimas, de modo a propiciar um dos requisitos que é a interação fármaco-receptor com menor energia livre possível, podendo estar associada ainda a ganhos entrópicos pela desordem de águas de solvatação. Esse tipo de interação é analisado mediante a técnica de *docking* molecular, que é uma técnica computacional que prediz a melhor orientação da droga em relação ao sítio catalítico da enzima estudada ⁴⁹. A

interação da molécula alvo com o sítio catalítico da enzima pode ser utilizada na predição da afinidade e a atividade da droga.

O uso da técnica de *docking* molecular requer conhecimento da estrutura eletrônica de átomos e moléculas, cujas orientações e disposições no espaço são descritas pela mecânica clássica. Nesse sentido, serão avaliados alguns conceitos e metodologias essenciais para o cálculo de estruturas eletrônicas que figuram em uma importante regra na obtenção das propriedades de átomos e moléculas. Esses métodos diferem essencialmente na exatidão da obtenção de certas propriedades, estabelecendo uma relação inversamente proporcional com o custo computacional exigido para a obtenção dessas propriedades.

Fundamentos da teoria quântica

A fim de descrever sistemas microscópicos, faz-se o uso da mecânica quântica. Essa ciência foi erguida sobre as controvérsias experimentais do início do século XX, cujos resultados divergiam inesperadamente dos resultados previstos pela mecânica clássica. Dentre esses, merece destaque o experimento da radiação do corpo negro, que é aquele que absorve toda radiação eletromagnética. Muitos estudiosos tentaram conciliar o conceito do corpo negro com a distribuição de energia prevista pela termodinâmica, porém essas explicações resultaram em divergências como a conhecida catástrofe do ultravioleta. Planck sanou o problema em 1901, ao introduzir a constante de Planck como mero recurso matemático, bem como introduziu a quantização de energia. Essa ideia inicial levaria aos fundamentos da mecânica quântica. De

Broglie demonstrou mais tarde que a matéria se comporta como onda e partícula baseando-se no conceito de quanta desenvolvido por Planck na radiação do corpo negro e por Einstein no experimento do efeito fotoelétrico. Em 1927 Werner Heisenberg, trabalhando com variáveis observáveis, enuncia o Princípio da Incerteza. Existe uma incerteza na determinação do momento da partícula quando se determina a posição da mesma. Baseado em tais realidades, foi desenvolvido o conceito de função de onda Ψ , cuja aplicação de um operador retorna uma propriedade observável. O quadrado dessa função de onda é a probabilidade de encontrar a partícula em um elemento diferencial de espaço.

Métodos *Ab initio*

Os métodos *ab initio* são aqueles cuja obtenção das propriedades eletrônicas de átomos e moléculas, é feita a partir das equações da mecânica quântica⁵⁰. A implementação da mecânica quântica para átomos e moléculas se dá pela resolução da equação de Schrödinger.

$$\hat{H}\psi(R, r) = E\psi(R, r) \quad (1)$$

onde R e r representam as coordenadas nucleares e eletrônicas do sistema molecular, respectivamente.

A energia do sistema é obtida através da solução da Equação 1, com a atuação do operador hamiltoniano descrito pela Equação 2 sobre a função de

onda (em unidades atômicas). O hamiltoniano (Equação 2) descreve uma molécula constituída por elétrons e núcleos.

$$H = -\sum_A \frac{1}{2M_A} \nabla^2_A - \sum_i \frac{1}{2} \nabla^2_i - \sum_i \sum_A \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_i \sum_j \frac{1}{r_{ij}} + \sum_A \sum_{B>A} \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} \quad (2)$$

Nessa equação, o primeiro termo representa a energia cinética dos elétrons, o segundo termo diz respeito à energia cinética dos núcleos. O terceiro termo representa a interação entre núcleos e elétrons. O quarto termo denota a interação dos elétrons. O quinto termo é a interação entre os núcleos.

A Equação 1, com o hamiltoniano dado pela Equação 2, não tem solução analítica para sistemas de muitos corpos, tanto analiticamente quanto computacionalmente. Dessa forma, aproximações se fazem necessárias.

Em 1926, Max Born e Robert Oppenheimer propuseram uma aproximação para equação de Schrödinger para o movimento dos núcleos. Usando a expansão adiabática descrita pela equação 3 na equação1, é possível desacoplar a equação de Schrödinger em duas outras: Uma eletrônica e outra nuclear. Esta aproximação é conhecida como aproximação de Born-Oppenheimer.

$$\psi(\mathbf{R},\mathbf{r}) = \mathbf{Q}_{\text{núcleos}}(\mathbf{R}) \mathbf{F}_{\text{elétrons}}(\mathbf{R},\mathbf{r}) \quad (3)$$

A equação eletrônica irá assumir uma dependência paramétrica em relação a posição do núcleo. Pode-se agora resolver a equação eletrônica e nuclear separadamente.

Uma segunda aproximação remete ao problema de muitos corpos presente nos problemas de química quântica desde o advento dessa ciência na segunda década do século XX ⁵¹. Para sistemas multieletrônicos a solução das integrais de interação entre dois ou mais elétrons é o problema de interação entre muitos corpos. Essa dificuldade física é o gargalo temporal dos cálculos computacionais de química quântica, cujas aproximações para contornar essa realidade vão caracterizar o surgimento de múltiplos métodos de química computacional.

Os cientistas Hartree e Fock propuseram um método alternativo para tratar o problema de interação entre muitos elétrons. Nesse método, cada elétron interage com o campo médio gerado pelos demais elétrons (Hartree), seguido da antissimetrização (Fock). Essa metodologia negligencia o efeito de correlação que existe na interação entre dois elétrons.

Outro método que se vale de aproximações para contornar o problema de correlação eletrônica é o método DFT (*Density Functional Theory*). A teoria do funcional de densidade é uma alternativa aos cálculos de estruturas eletrônicas. Essa metodologia propicia um ganho de tempo computacional e uma redução do uso de memória na execução de cálculos de estruturas eletrônicas.

Diferente das metodologias provenientes do método Hartree-Fock-Roothaan e pós-Hartree-Fock, o método DFT usa a densidade eletrônica como entidade mecânico-quântico em vez da função de onda presente nos outros métodos de cálculo de estrutura eletrônica. A teoria do DFT foi inicialmente desenvolvida por P. Hohenberg e W. Kohn. A partir desse estudo foram

desenvolvidas equações auto-consistentes para o tratamento do efeito de troca e correlação ⁵². De modo geral, o método DFT é regido por dois postulados essenciais:

1) A função de onda do estado fundamental, e daí todas as propriedades desse estado são funcionais da densidade eletrônica.

2) A energia do estado fundamental de um sistema multieletrônico sob um potencial elétrico $V(r)$, pode ser escrita como:

$$E_v[\rho(r)] = \int v(r)\rho(r)dr + F(\rho) \quad (4)$$

Onde F é o funcional universal de ρ que independe de $v(r)$.

Um problema inerente à equação (4) é a obtenção da função analítica que represente ρ . Essa representação é geralmente derivada de um cálculo do tipo HF (Hartree-Fock) através de um método auto-consistente de modo que a função de onda esteja no mínimo de energia.

Para se iniciar um cálculo do tipo DFT, procede-se a escolha das bases atômicas, para construção dos orbitais moleculares de acordo com a Equação 5.

$$\Phi_i = \sum_{\alpha}^M C_{\alpha i} \chi_{\alpha} \quad (5)$$

A aplicação do método variacional conduz a equação matricial (6)

$$h^{KS} C = SC\varepsilon \quad (6)$$

onde

$$h_{\alpha\beta} = \langle \chi_{\alpha} | h_{KS} | \chi_{\beta} \rangle$$

$$S_{\alpha\beta} = \langle \chi_{\alpha} | \chi_{\beta} \rangle$$

$$h_{KS} = -\frac{1}{2}\nabla^2 + V_{ne} + \int \frac{\rho(r')}{|r-r'|} dr' + V_{xc}$$

Nessa equação h é o operador hamiltoniano para a teoria do funcional de densidade, e S é a integral de sobreposição dos orbitais atômicos. O operador h contém a energia cinética dos elétrons, a interação núcleo-elétron, interação elétron-elétron e o conhecido potencial de troca. A resolução da equação matricial é análoga àquela aplicada à matriz de Fock. Temos ainda que a resolução das partes que correspondem à energia cinética eletrônica e a interação de Coulomb são idênticas aos dos elementos da matriz de Fock. Todavia, o termo de troca e correlação é dado em termos da densidade eletrônica, podendo envolver a derivada da densidade eletrônica como mostrado na equação 7.

$$\int \chi_{\alpha}(r) V_{xc} [\rho(r), \nabla\rho(r)] \chi_{\beta}(r) dr \quad (7)$$

O funcional V_{xc} depende da integração de variáveis implícitas via obtenção da densidade eletrônica. Essas integrais geralmente não podem ser calculadas analiticamente, mas precisam ser geradas por uma integração numérica.

$$\int \chi_{\alpha}(r) V_{xc} [\rho(r), \nabla \rho(r)] \chi_{\beta}(r) dr \approx \sum_{k=1}^G V_{xc} [\rho(r_k), \nabla \rho(r)] \chi_{\alpha}(r_k) \chi_{\beta}(r_k) \nabla v_k \quad (8)$$

Como o número de pontos da malha vai para o infinito, a aproximação se torna exata. No ambiente computacional o número de pontos da malha vai depender da precisão que se almeja no resultado final.

Metodologias para a resolução da equação de energia no método DFT

Uma das diferenças do método DFT em relação aos demais métodos *ab initio* é o uso de funções matemáticas para representar os termos que compõem o funcional de energia. A partir da equação 5 pode-se descrever o funcional $F(\rho)$ pela soma dos funcionais de energia cinética $T(\rho)$ e de repulsão eletrônica $V(\rho)$, assim a energia eletrônica se torna:

$$E_{el}(\rho) = T(\rho) + \int \rho(r) v(r) dr + V_{ee} \quad (9)$$

A descrição de cada termo do funcional energia denotará uma metodologia diferente para a obtenção das propriedades eletrônicas na teoria do DFT.

Nesse trabalho será utilizada a aproximação GGA (Generalized Gradient Approximation) para a correção do termo de troca e correlação devido à repulsão eletrônica⁵³. A energia de correlação irá depender não somente de

densidade eletrônica, mas também da derivada da densidade. Esse método apresenta ainda tratamento exato para energia cinética com uma descrição simples para o termo de troca e correlação dada pela equação (9).

$$E_x^{CGA}[p] = -\frac{3}{4} \left(\frac{3}{\pi} \right)^{\frac{1}{3}} \int \rho(r)^{\frac{4}{3}} F(s) dr \quad (10)$$

Onde s é igual

$$s = \frac{|\nabla\rho(r)|}{2K_F\rho(r)}$$

Métodos Semi-Empíricos

Os cálculos de estrutura eletrônica que fazem o uso da teoria do DFT ainda são excessivamente complexos para serem aplicados a moléculas biológicas como proteínas. Dessa forma, novas aproximações são necessárias para tornar os métodos de mecânica quântica aplicáveis ao estudo de estruturas de macromoléculas biológicas. Por conseguinte, é recorrente o uso dos métodos semi-empíricos, os quais utilizam dados experimentais para simplificar o cálculo de integrais de dois elétrons, diminuindo substancialmente o tempo computacional para o cálculo de estruturas eletrônicas.

Porém, esses cálculos, apesar de serem mais robustos que aqueles ditos *ab initio*, apresentam dificuldades quanto ao tempo computacional quando aplicados a maior número de átomos, pois apresentam escalonamento

quadrático quanto ao uso da memória devido à diagonalização da matriz de Fock.

Com efeito, atualmente estão sendo desenvolvidos algoritmos de escalonamento linear para contornar o problema de diagonalização da matriz de Fock. No presente trabalho, será utilizado o método de escalonamento linear desenvolvido por Stewart⁵⁴. Este método de escalonamento, proposto por Stewart e colaboradores, aplica as rotações de Jacobi ao bloco ocupado virtual da matriz de Fock em orbitais moleculares localizados. Esses tipos de orbitais moleculares são limitados a uma região específica da molécula a exemplo de ligações específicas, ou um par de elétrons isolados.

Orbitais moleculares localizados (LMO) são obtidos pela transformação unitária sobre um conjunto de orbitais moleculares canônicos⁵⁵. A transformação geralmente envolve a otimização do valor esperado de um determinado operador. De modo genérico, a forma do operador de localização \hat{L} pode ser escrito como (equação 11):

$$\langle \hat{L} \rangle = \sum_{i=1}^n \langle \phi_i \phi_i | \hat{L} | \phi_i \phi_i \rangle \quad (11)$$

Onde ϕ é o orbital molecular espacial.

A qualidade dos resultados de cálculos de estrutura eletrônica que fazem uso dos métodos semi-empíricos, dependerá da escolha de uma aproximação que possa descrever de forma acurada as propriedades das macromoléculas biológicas. Neste trabalho, será utilizada a aproximação PM6, AM1, MNDO, PM3 presentes no programa Cache⁵⁶ e Gaussian. Cada uma

dessas aproximações semi-empíricas apresenta tratamentos distintos na parametrização e funções usadas para substituir as integrais. No método MNDO (Modified Neglect of Diatomic Overlap), tem-se o negligenciamento da integral diatômica de sobreposição. O método PM3 (Parameterized Mode) e o AM1 (Austin Model) usam a mesma aproximação que o método MNDO, o diferencial reside nas parametrizações e nas funções para representar a repulsão dos elétrons do caroço, que foram corrigidas devido aos erros em sistemas com ponte de hidrogênio. No método PM3 são usadas duas gaussianas, enquanto no método AM1 usa-se de três a quatro funções gaussianas por elemento. Outra diferença substancial reside na abordagem filosófica dos métodos. Enquanto no método AM1 existem parâmetros oriundos de dados experimentais, no método PM3 esses foram reotimizados. O método PM6 incorpora a filosofia do método PM3, porém com a parametrização para mais de 70 átomos, melhorias nos mesmos.

Mecânica Molecular

Os métodos semi-empíricos têm conquistado um espaço relevante no cálculo de estruturas moleculares com grande número de átomos. Entretanto, tais métodos ainda são limitados quando o sistema molecular é excessivamente grande ou demanda uma evolução temporal do sistema, com o uso da dinâmica molecular. A fim de contornar essa problemática, tem-se utilizado a mecânica molecular para cálculos de estruturas moleculares com milhares e até milhões de átomos.

A mecânica molecular é um método de química computacional que se vale das leis clássicas da física propostas por Robert Hooke. Nessa metodologia, a descrição da ligação química é feita através do uso de funções harmônicas. Tais funções são parametrizadas por métodos quânticos a fim de representar o comportamento da molécula. Cálculos que se valem dessa aproximação, apresentam escalonamento linear no tempo de cálculo computacional.

A essência da mecânica molecular é a construção de um campo de força clássico, através do somatório de diversas funções harmônicas e termos de interação de van der Waals e eletrostáticos. De modo mais particular, deve-se realizar o somatório de funções que representem o estiramento das ligações químicas, a deformação angular, a deformação de diedros, bem como componentes que representem a interação entre os átomos. Nesse caso, constroem-se funções que envolvem o potencial eletrostático e interações de curto e longo alcance. Em geral, pode-se representar um campo de força da seguinte forma:

$$\begin{aligned}
 V(r^N) = & \sum_{LIGAÇÕES} \frac{1}{2} K_B (l - l_0)^2 + \sum_{ÂNGULOS} \frac{1}{2} K_a (\theta - \theta_0)^2 + \sum_{TORSÕES} \frac{1}{2} V_N [1 + (\cos \eta \omega - \gamma)] \\
 & + \sum_{j=1}^{N-1} \sum_{i=j+1}^N \left[\epsilon_{i,j0} \left[\left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - 2 \left(\frac{r_{0ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right] + \frac{q_i q_j}{4\pi \epsilon_0 r_{ij}} \right]
 \end{aligned} \tag{12}$$

O primeiro termo descreve o estiramento das ligações químicas, o segundo a deformação angular, o terceiro os ângulos diedros, o quarto o

potencial de Lennard-Jones e o quinto a interação eletrostática existente entre as moléculas.

A aproximação MP2 Moller-Plesset

A aplicabilidade dos métodos de química computacional em moléculas biológicas não se restringe a sistemas moleculares com milhares de átomos, mas também se dá em sistemas com pouco mais de cem átomos. Nessa situação, métodos mais refinados de cálculo são utilizados para estimar propriedades que são dependentes do efeito de correlação eletrônica.

Um dos vários métodos que consideram o efeito de correlação eletrônica é o método MP2 (Moller-Plesset Theory)⁵⁸. Assim, os efeitos de correlação eletrônica são adicionados através da teoria de perturbação de Rayleigh-Schrödinger. Nessa aproximação, adiciona-se uma perturbação ao operador Hamiltoniano, cuja simulação é conhecida, para simular a correlação eletrônica, como pode ser visto na Equação 13.

$$\hat{H} = \hat{H}_0 + \lambda \hat{V} \quad (13)$$

Nesta equação o H_0 é o operador não perturbado e \hat{V} é uma perturbação externa corrigida pelo parâmetro λ . A energia e a função de onda são perturbadas pela expansão em série em torno de λ , segundo a equação 14:

$$\psi = \lim_{n \rightarrow \infty} \sum_{i=0}^n \lambda^i \psi^{(i)}$$

$$E = \lim_{n \rightarrow \infty} \sum_{i=0}^n \lambda^i E^{(i)} \quad (14)$$

A substituição dessas séries na equação de Schrödinger, independente do tempo, nos dá uma nova equação.

$$(\hat{H}_0 + \lambda \hat{V}) \left(\sum_{i=0}^n \lambda^i \psi^{(i)} \right) = \left(\sum_{i=0}^n \lambda^i E^{(i)} \right) \left(\sum_{i=0}^n \lambda^i \psi^{(i)} \right) \quad (15)$$

Igualando os termos de perturbação λ^i nessa equação, obtém-se a ordem de perturbação. Nesse trabalho, será utilizado a perturbação de ordem 2 para calcular as propriedades eletrônicas dos sistemas biológicos em estudo, para incluir a correlação no cálculo da energia de interação fármaco/receptor.

Simulação de Solventes

Foram apresentados diversos métodos de química computacional que permitem estimar as propriedades de estruturas eletrônicas. Nestes, o cálculo quântico é feito considerando que a molécula ou o átomo esteja no vácuo. Todavia, esse ambiente é bastante diferenciado dos ambientes biológicos, os

quais estão essencialmente solvatados por moléculas de água. Dessa maneira, surge a necessidade de simular solventes em cálculos de estrutura eletrônica.

Existem basicamente duas formas de simular solventes em cálculos de estrutura eletrônica. A primeira faz o uso da adição de águas explícitas no sistema molecular em estudo. São adicionadas geralmente condições de contorno, que são moléculas de águas envoltas por uma caixa de dimensões compatíveis com o sistema de interesse, que ajudarão a aproximar o problema do meio biológico. A segunda maneira é a simulação implícita do solvente, os quais usam modelos teóricos para simular um meio contínuo que leva em conta a constante dielétrica do solvente, com o soluto considerado numa cavidade. A definição dessa cavidade é o que fundamentalmente difere os vários métodos. A inclusão de um solvente explícito é a aproximação mais próxima de um sistema biológico, porém demandará maior tempo computacional de cálculo, pois se estará adicionando mais átomos e moléculas ao sistema molecular. A utilização de meios contínuos uma alternativa computacionalmente mais exequível e serve para estimar propriedades como a energia livre do complexo inibidor/receptor^{59,60}.

Um dos modelos mais simples para a simulação de solvente implícito é o COSMOS (Conductor-like-Screening Model), que é um método de cálculo utilizado para estimar a interação eletrostática entre o soluto e o solvente.

Nessa metodologia, o solvente é tratado como um contínuo com permissividade ϵ . Deste modo, aproxima-se o solvente por um contínuo dielétrico fora da cavidade molecular⁶¹. Com este método é utilizada a equação (16) de Poisson para descrever o meio contínuo.

$$\nabla^2 \phi(r) = -\frac{\rho(r)}{\epsilon\epsilon_0} \quad (16)$$

onde ρ representa a densidade eletrônica do soluto, $\nabla^2\phi(r)$ gradiente do potencial eletrostático e ϵ_0 é o fator de permissividade.

Porém os métodos que usam dessa aproximação podem dissimular alguns resultados nos cálculos teóricos que envolvem a interação de moléculas, pois a contribuição termodinâmica para a formação de interações químicas pode estar associada ao aumento entrópico de águas explícitas. Além disso, há a dificuldade da construção do grid, que denotará a área de influência do solvente sobre o soluto trabalhado. Dessa forma o uso dessa aproximação requer prévios estudos com o objetivo de adequar uma boa proposta de simulação para o sistema.

O método ONIOM

A combinação de aproximações clássicas com aproximações quânticas é uma alternativa para moléculas com elevado número de elétrons, cuja essência catalítica esteja restrita a uma parte do sistema molecular. Dentro dessa perspectiva, os métodos de cálculo de estrutura eletrônica podem ser utilizados para a descrição do sítio catalítico da proteína, e os métodos clássicos provenientes de campos de força, são utilizados para tratar o resto da proteína.

O método ONIOM (*Our own n-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*)⁶² é um método que permite tratar o sistema em até 3 camadas, atribuindo a cada camada um grau de acurácia nos cálculos de modelagem molecular. Segundo essa metodologia, qualquer sistema molecular pode ser separado em diferentes níveis ligados de acordo com uma ordem pré-estabelecida para o tratamento do problema. Portanto o primeiro problema tratado para usar o ONIOM é a partição/corte do sistema, principalmente para ligações covalentes, onde uma partição deve ser bem analisada. Ao integrar os resultados obtidos nas diferentes camadas, obtém-se uma extrapolação chegando-se a valores mais acurados sobre todo o sistema molecular estudado⁶³. Quando dois métodos são combinados na metodologia ONIOM, segue o modelo apresentado na Figura 6:

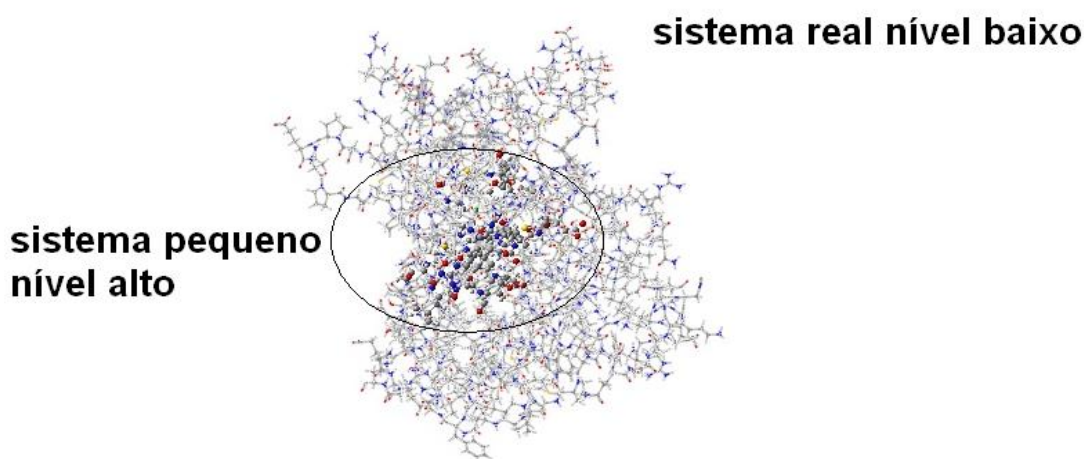


Figura 6: Diagrama esquemático do método ONIOM para uma proteína.

A equação para a energia final do sistema contendo duas camadas pode ser descrita como:

$$E = E_{H,S\text{ model}} + E_{L,real} - E_{L,S\text{ model}} \quad (17)$$

Onde H (*high*) e L (*Low*) dizem respeito aos níveis de teoria alto e baixo de aproximação respectivamente, enquanto Smodel (*small*) e Real referem-se ao tamanho do sistema, pequeno e “real” respectivamente. Aqui é importante frisar que a palavra real não deve ser entendida na sua definição, mas sim dentro de um modelo, a parte indicada como real seria todo o modelo, enquanto que a parte pequena é apenas uma parte do modelo.

Termodinâmica estatística

Os programas de química computacional se valem da termodinâmica estatística para a computação de propriedades termoquímicas de sistemas moleculares. O ponto de partida da termodinâmica estatística é a construção da função de partição, que é uma grandeza que descreve as propriedades estatísticas de um sistema em equilíbrio termodinâmico.

Existem vários tipos de função de partição, as quais correspondem a diferentes *ensembles*. A função de partição canônica, por exemplo, aplica-se ao *ensemble* canônico, que é um sistema que permite troca de calor com o ambiente, mantendo-se a temperatura, o volume e o número de partículas fixas (NVT). Matematicamente a função de partição canônica pode ser descrita como:

$$Z = \sum_j e^{-\beta E_j} \quad (18)$$

Onde E é a energia total do sistema quando está no microestado j e β é a temperatura inversa definida como:

$$\beta = \frac{1}{k_B T} \quad (19)$$

Onde k_B é a constante de Boltzmann.

Para os sistemas moleculares, existem contribuições na função de partição originadas dos movimentos rotacionais, translacionais, vibracionais e eletrônica. A soma dessas contribuições poderá ser computada na função de partição total, podendo-se derivar algumas funções básicas da termodinâmica, tais quais a energia (Equação 20), capacidade calorífica (Equação 21), entropia (Equação 22), e energia de Helmholtz (Equação 23).

$$\langle E \rangle = -\frac{\partial \ln Z}{\partial \beta} \quad (20)$$

$$C_V = \frac{\partial \langle E \rangle}{\partial T} = \frac{1}{k_B T^2} \langle \delta E^2 \rangle \quad (21)$$

$$S = k_B (\ln Z + \beta \langle E \rangle) = \frac{\partial}{\partial T} (k_B \ln Z) \quad (22)$$

$$A = \langle E \rangle - TS = -k_B T \ln Z \quad (23)$$

A Dinâmica molecular

A dinâmica molecular é uma técnica muito utilizada para o estudo de macromoléculas biológicas^{64 65 66 67}, bem como no desenho e planejamento de novas drogas^{68 69}.

A dinâmica molecular é uma técnica que propicia a evolução temporal do sistema microscópico via a integração das equações de Newton^{70 56 71 68 64} passo a passo no tempo. Essas equações são descritas abaixo.

$$F_i(t) = m_i a_i$$
$$F_i(t) = - \frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i}$$

Onde F_i é a força que atua sobre cada partícula em um instante de tempo t , a_i é a aceleração do átomo i de massa m_i . A função V é um campo de força clássico como aquele definido na Equação 12. Para calcular a força, calcula-se a derivada da energia em relação às posições dos átomos do sistema molecular. O cálculo da força gera automaticamente a aceleração. A partir desta, pode se obter a integração das equações do movimento e conseqüentemente a velocidade, cuja integração propicia a mudança de posição dos átomos. Com as novas posições atômicas, calcula-se a energia cinética e potencial do sistema molecular em estudo. Aplicando-se esse procedimento gera-se uma trajetória, que nada mais é que o conjunto de posições e velocidades dos átomos em cada tempo.

A integração das equações do movimento é feita via algoritmos baseados nos métodos da diferenças finitas, nos quais a integração é dividida

em pequenos intervalos de tempo da ordem de femtosegundos a fim de poder computar as vibrações associadas ao átomo de hidrogênio⁷². Um dos métodos mais comuns aplicados na integração das equações do movimento é o algoritmo de Verlet, que utiliza as posição e acelerações dos átomos no tempo t e as posições do passo anterior $r(\Delta t-t)$, para determinar as novas posições no tempo $t+\Delta t$ de acordo com a equação abaixo.

$$r(t + \Delta t) = 2r(t) - r' + a(t)\Delta t^2$$

Em sistemas biológicos é comum o uso de *ensembles* NVT e NVP.

***Docking* Molecular**

Uma metodologia essencial usada no desenvolvimento de novos fármacos é o ancoramento molecular, conhecida como *docking* em inglês. O objetivo do cálculo do tipo ancoramento molecular consiste na avaliação das interações energéticas de algumas conformações moleculares em relação a outras, a busca de conformação é feita segunda uma contagem de funções. Para as melhores soluções de *docking*, os programas quantificam estimativas aproximadas da energia livre.

Para realizar este feito, as moléculas são descritas como corpos rígidos em uma primeira aproximação. Nesse sentido, o ancoramento molecular pode ser entendido como um problema de interação química de moléculas à cavidade catalítica de uma determinada proteína

No entanto, essa aproximação não é suficiente para a determinação de uma configuração inicial satisfatória, especialmente para sistemas envolvendo interações de pequenas moléculas no sítio catalítico de enzimas. Pode-se, então, escolher modelos que levem em conta a flexibilidade das moléculas. Nesse modo de atuação, as moléculas sofrerão transições conformacionais de maneira a alcançar um melhor ajuste para as interações moleculares.

Nesta técnica, as interações químicas são computadas pela contribuição dos termos de van der Waals e eletrostáticos, sem considerar os demais termos de um campo de força clássico, ou seja, usa-se para este fim um campo de força clássico simplificado, que descreverá a energia dos ligantes e receptores. A inserção de solventes torna a aproximação mais realística por computar o ganho entrópico de águas de solvatação associada à perda entrópica do ligante. Nessa aproximação há um excessivo ganho de custo computacional associado ao cálculo de energias de interação.

Estas interações são computadas dentro de uma grade que envolverá parte do sistema estudado, como por exemplo, a cavidade catalítica da enzima a ser estudada. A construção da grade de energia depende do campo de força estudado ⁷³.

Análise de Componentes Principais

Dentre os métodos de natureza multivariada destaca-se a análise de componentes principais, a qual é amplamente utilizada para a construção de modelos teóricos que relacionem atividade do inibidor a propriedades descritivas. Essas propriedades podem ser $\log p$, que é a partição molécula/octanol, energia dos orbitais HOMO e LUMO, número heteroátomos,

volume das moléculas, peso molecular, entre outros milhares de descritores. Por isso a análise de componentes principais é muito aplicada no estudo de fármacos.

O PCA é uma maneira de identificar a relação entre características extraídas de descritores. A componente principal é o arranjo que melhor representa a distribuição dos dados e a componente secundária é perpendicular a componente principal. Os passos para calcular as componentes principais são:

- Obtém-se os dados ou as M amostras de vetores de dimensão M .
- Calcula-se a média ou o vetor médio destes dados.
- Subtrai-se a média de todos os dados.
- Calcula-se a matriz de covariância usando todas as subtrações. Ela é o resultado da média do produto de cada subtração por ela mesma, e terá dimensão $M \times N$.
- Calcula-se os autovalores e autovetores da matriz covariância.

O auto vetor com o maior autovalor associado, corresponde a componente principal do conjunto de dados utilizados.

A aplicação desse método tem duas importantes metas: Diminuir a quantidade de dados em problemas que envolvam estudos de análise multivariacional, bem como filtrar as propriedades mais descritivas do problema multivariado.

Protocolos Utilizados

Como neste trabalho foram utilizadas técnicas e moléculas diferenciadas, o capítulo relativo às metodologias será separado em subcapítulos, detalhando os métodos aplicados, bem como as abordagens dos problemas dentro do âmbito da química computacional.

Metodologia 1 (Estudo dos inibidores pirrolo-pirimidinas)

O estudo dos inibidores **pirrolo-pirimidinas** da proteína quinase de adesão focal foi realizado da seguinte forma.

- Foram selecionados 7 inibidores da classe pirrolo-pirimidina com substituintes do tipo carboxila em diferentes posições do anel aromático piridinico^{74 75} segundo a Figura 7.
- Todas as moléculas selecionadas foram submetidas a otimização de geometria com o método DFT/B3LYP 6-31* (d) utilizando a camada fechada para a distribuição dos elétrons na molécula. Os cálculos foram realizados no programa Gaussian 2009⁷⁶.

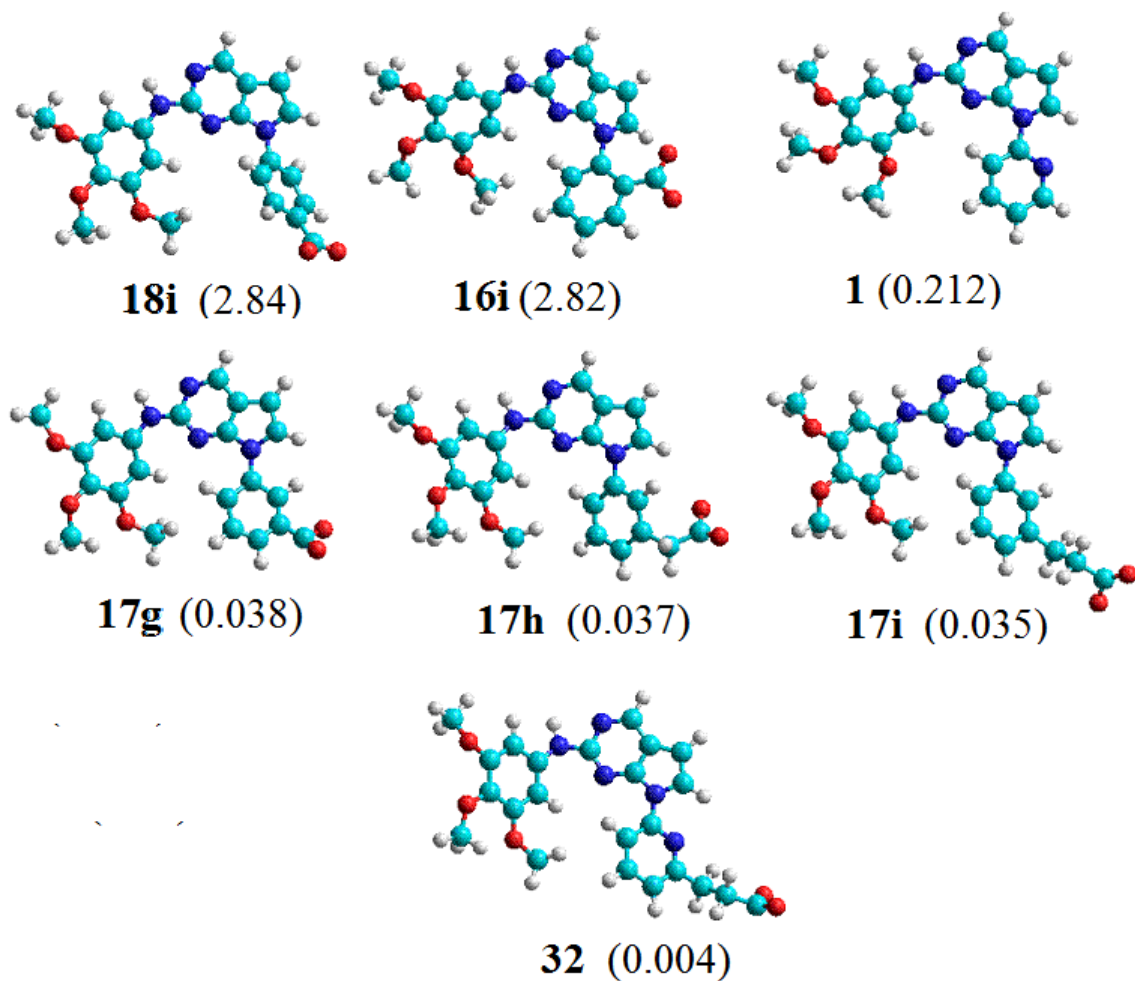


Figura 7. Inibidores selecionados para o estudo de *docking* molecular com proteína quinase de adesão focal.

- Nas geometrias de equilíbrio foram adicionados comandos no programa Gaussian09 fim de se obter a distribuição dos orbitais moleculares, cargas do tipo Chelpg bem como o potencial eletrostático.
- Em seguida, foi selecionada a proteína quinase de adesão focal do site de banco de dados www.pdb.org ^{54,77}. O código de

acesso para a proteína quinase de adesão focal foi o 2ETM ⁷⁷ com inibidor 7-h-pirrolo-pirimidina complexado no sítio catalítico.

- Tendo como base o inibidor 7-h-pirrolopirimidina foram ancoradas as demais moléculas descritas na Figura 7 ao sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal utilizando o programa *Auto-Docking Vina* ⁷⁸.
- Após esse procedimento, os complexos formados pela proteína FAK e os demais inibidores foram otimizados utilizando o campo de força clássico AMBER presente no programa Hyperchem. Em seguida, procedeu-se à análise das interações e ligações moleculares presentes entre os inibidores e a proteína FAK, selecionando dessa forma os aminoácidos que se ligam quimicamente com as moléculas estudadas.
- Os complexos aminoácidos/inibidores foram separados do resto da proteína. Nessa estrutura molecular foram realizados cálculos de estrutura eletrônica com o método B3LYP/6-31g(p).
- Utilizando o método B3LYP e a mesma função de base da etapa anterior foram extraídas informações relativas aos orbitais de fronteira, densidade eletrônica, bem como o potencial eletrostático do complexo fármaco/receptor.
- Associado às propriedades eletrônicas foram obtidas informações relativas à energia livre de Gibbs de interação, entalpia e entropia de interação fármaco/receptor através do cálculo das frequências no programa Gaussian 09 para o complexo aminoácidos/inibidores. Foram realizados cálculos de

estrutura eletrônica para o complexo fármaco/receptor. A energia foi computada como diferença entre aquela dos produtos (complexos) menos dos reagentes (fármaco e sítio). Esses cálculos foram realizados com o uso do método DFT e os seguintes funcionais – LANLDZ, B3LYP, M06. Foram também computadas energias de interação com o método MP2 com o objetivo de verificar se o fator de correlação eletrônica era essencial na descrição da interação química.

- Os resultados advindos da etapa anterior foram comparados com as atividades das drogas em estudo.
- Todos os cálculos anteriores foram realizados utilizando o modelo de solvente polarizado contínuo IEFPCM (water)⁷⁹.

A fim de se comparar as moléculas da classe pirrolo-pirimidina foi realizado um estudo com a análise de componentes principais (PCA) como um método de análise multivariada. Para esse fim, foram utilizadas as seguintes propriedades: Topologia da superfície polar, *log de p*, volume molecular, número de ângulos diedros, número de átomos passivos de realizar ligações de hidrogênio, número de doadores de ligação de hidrogênio. Essas propriedades foram obtidas utilizando o pacote computacional *Property Calculation Service*. As propriedades obtidas por esse pacote computacional, associadas às propriedades energéticas e termodinâmicas de interação foram utilizadas no cálculo PCA.

Protocolo 2 (Estudo da molécula Dasatinibe)

Nessa etapa, é descrito o protocolo aplicado ao *docking* do fármaco Dasatinibe no sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal.

- Em uma primeira etapa foi selecionada a proteína FAK do banco de dados www.pdb.org, cuja abreviatura é 2ETM.
- À essa enzima foi aplicada um campo de força clássico, com o intuito de obter o relaxamento da estrutura molecular via otimização de geometria. Para esse fim, foi utilizado o campo de força AMBER presente no programa Hyperchem.
- Em uma etapa ulterior, foi desenhado o fármaco Dasatinibe usando o programa Cache.
- A molécula de Dasatinibe e a proteína FAK foram convertidas para o arquivo do tipo pdbqt, o qual é utilizado pelo programa *Auto-Docking Vina*.
- De posse das estruturas em formato de arquivo adequado, foi realizado o *docking* molecular do fármaco Dasatinibe ao sítio catalítico da FAK. Nessa etapa, foram permitidas rotações nos ângulos diedros e ângulos de deformações durante a realização do ancoramento do ligante. A descrição dos dados computacionais do ancoramento são descritos abaixo.
- No programa *Auto-Docking Vina* definiu-se um grid com as seguintes dimensões em angstroms: $x=-18$, $y=22$ e $z=16$.

- Esse grid foi centrado no centro da proteína FAK de modo a abranger toda a cavidade catalítica.
- O grid foi orientado segundo os seguintes pontos: $x=-0.444$, $y=10.627$ e $z=6.613$.
- O tempo utilizado para a procura exaustiva das conformações do ligante no sítio catalítico foi de 500 segundos.
- Após o ancoramento do fármaco ao sítio catalítico da enzima, foi realizada a otimização de geometria do complexo utilizando o campo de força clássico AMBER.
- A fim de se obter uma descrição quântica do complexo Dasatinibe-FAK, foi realizado um cálculo do tipo QM/MM utilizando o programa ONIOM presente no programa Gaussian 09. Aos aminoácidos Cys502, Lys454, Met499, Arg426, Ala 452, Glu506, Glu471, Arg508, Arg550, Asp564, Leu501, Glu430, Thr605 e ao fármaco Dasatinibe foi aplicado à aproximação quântico semi-empírica PM6, definindo dessa forma a camada alta do cálculo. Ao restante da proteína foi aplicado um campo de força clássico, definindo dessa forma a camada baixa do cálculo. Em seguida, se averiguou quais aminoácidos do sítio catalítico da proteína FAK podem ligar-se ao fármaco Dasatinib.
- No que concerne as tentativas de otimização, foram utilizados os seguintes protocolos para o programa ONIOM.

AM1/UFF, B3LYP/3-21G, HF/LANL2DZ/UFF, MNDO/UFF

- Em um passo posterior gerou-se um arquivo com a camada alta, ou seja, aquela camada que continha os aminoácidos selecionados e o fármaco dasatinibe.
- Associado ao método *ab initio* foram calculadas as seguintes propriedades da camada alta: Potencial eletrostático, Orbitais de Fronteira e Densidade eletrônica da camada alta descrita pela aproximação PM6.
- Foram computadas ainda as propriedades termodinâmicas de interação fármaco/receptor a partir da frequência e termodinâmica estatística.
- Os cálculos das propriedades acima mencionadas foram realizados com o programa Materials Studio.
- Realização de uma dinâmica molecular de 1nanosegundo em todo o complexo FAK/dasatinib para verificar ligações de hidrogênio não quantificadas pelo método ONIOM. Essa dinâmica foi realizada utilizando o campo de força AMBER a temperatura constante 300K. 100ps foram utilizados para o banho térmico. Os passos utilizados para a dinâmica molecular foram da ordem de 1femtosegundo

Protocolo 3 (Estudo dos complexos bis-anilino-piridina)

- Foi selecionado o arquivo 2JKK⁸⁰ do banco de dados de proteína (PDB).
- A estrutura obtida foi otimizada utilizando o campo de força clássico implementado no programa Hyperchem.
- Posteriormente foi realizado um cálculo QM/MM para a otimização do complexo inibidor/proteína utilizando o programa Gaussian 09. A definição da camada alta e camada baixa, no cálculo ONIOM, foram os mesmos que aqueles utilizados para o fármaco dasatinib.

Protocolo 4 (Estudo do complexo 2-3-d-tiazole)

- Foi selecionado o código de acesso 3PXK ¹ do banco de dados que contém a droga tiazole complexada com proteína FAK.
- A estrutura obtida foi otimizada utilizando o campo de força clássico AMBER e o programa Hyperchem.
- Posteriormente foi realizado um cálculo QM/MM para a otimização do complexo inibidor/proteína. Os protocolos de cálculos para a definição da camada alta e camada baixa, no cálculo tipo ONIOM, foram os mesmos que aqueles utilizados para o fármaco dasatinib.

Protocolo 5 (Estudo da interação da molécula de ATP com a proteína FAK).

- Foi selecionado o código de acesso 2JIM⁸¹ do banco de dados pdb, que contém o complexo ATP interagindo com a proteína FAK.
- A estrutura obtida foi otimizada utilizando o campo de força clássico AMBER implementado no programa Hyperchem.
- Posteriormente foi realizado um cálculo. A definição da camada alta e camada baixa no cálculo tipo ONIOM foram do tipo HF/LANL2DZ:UFF.

Protocolo 6 (Estudo da interação entre o complexo metano sulfonamida com a proteína FAK)

- Foi selecionado o código de acesso 3BZ3⁸² do pdb, que contém o complexo cristalizada FAK/sulfonamida.
- A estrutura obtida foi otimizada utilizando o campo de força clássico AMBER implementado no programa Hyperchem
- Posteriormente foi realizado um cálculo QM/MM para a otimização do complexo inibidor/proteína. Os protocolos de cálculos para a definição da camada alta e camada baixa no cálculo tipo ONIOM foram os mesmos que aqueles utilizados para o fármaco Dasatinibe.

Resultados e discussão

Volume molecular dos inibidores estudados

Os inibidores utilizados neste trabalho são ilustrados na Figura 8, com suas respectivas geometrias otimizadas com o método semi empírico PM6.

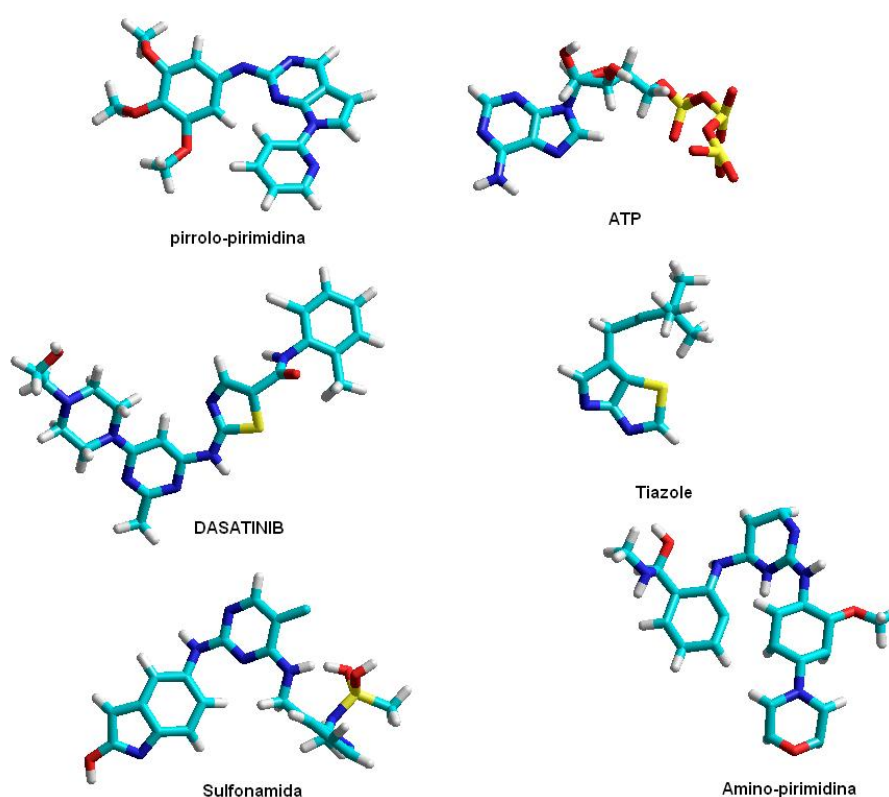


Figura 8. Geometria otimizada dos inibidores estudados.

Todos os inibidores, com exceção do fármaco dasatinibe, apresentam em suas estruturas o anel de adenina presente no ATP. No que concerne a geometria de equilíbrio, apenas os inibidores da classe pirrolo-pirimidina, tiazole e amino-pirimidina apresentam estrutura planar. As demais estruturas apresentam deformações angulares, para a estrutura de equilíbrio, fora do

plano. Esse fato gerou dificuldades particulares para a validação da otimização de geometria com os cálculos do tipo QM/MM utilizando o programa ONIOM presente no software Gaussian09. Isto porque a estrutura deverá ser encaixada em uma cavidade pouco flexível. Essas dificuldades serão descritas de modo mais adequado nos respectivos tópicos de estudo da interação de cada inibidor com a proteína quinase de adesão focal.

A estrutura de cada inibidor difere substancialmente em termos de volume molecular, o que suscitará também diversos tipos de interação molecular com a proteína FAK, bem como problemas de otimização concernentes a pouca mobilidade dessas drogas no sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal. Os volumes moleculares de cada inibidor são ilustrados abaixo na Tabela 1.

Tabela 1: Volume Molecular dos inibidores da proteína FAK

Inibidor	Volume Molecular A ³
Pirrolo-pirimidina	1510,93
ATP	1044,64
Dasatinibe	2303,61
Tiazole	1411,87
Sulfonamida	3702,42
Amino-pirimidina	1260,35

Estrutura eletrônica e atividade das moléculas pirrolo-pirimidina

Os resultados devidos aos ancoramentos inibidor/enzima mostram que as moléculas da classe pirrolo-pirimidina podem estabelecer ligações de hidrogênio com os aminoácidos Cys502, Arg426 e Lys454, conforme pode ser visto na Tabela 2. Essas ligações são computadas pelo programa Hyperchem a partir do ângulo entre doadores e receptores de elétrons pelo programa Hyperchem, bem como usando distâncias de até 2.5 Å.

Tabela 2: Ligações de hidrogênio realizadas entre os aminoácidos da enzima FAK e as moléculas da classe pirrolo-pirimidina

Inibidor	Ligações de Hidrogênio calculadas (Å)			
	Lys454	Lys454	Cys502	Arg424
16i	1,88	---	---	---
17g	1,99	2,18	---	---
17h	2,13	2,20	---	---
17i	1,90	---	2,20	1,74
18i	2,20	---	---	---
32	2,18	2,01	2,05	1,74

Duas exceções são observadas para os inibidores 17i e 32, os quais podem estabelecer ligações de hidrogênio com os aminoácidos Ser e Glu. A substituição na posição orto e meta no anel aromático de pirimidina para o inibidor 32 ou benzeno para os demais inibidores, permite a realização de mais

ligações de hidrogênio. Em contraposição à substituição na posição para presente no inibidor 18i resulta em poucas ligações de hidrogênio com o aminoácido Lys454. Um entendimento mais refinado das ligações químicas estabelecidas pelos aminoácidos e os inibidores pirrolo-pirimidina pode ser contemplado pelos métodos *ab initio*.

Pode-se verificar através dos cálculos de potencial eletrostático obtidos pelo método MP2, que o par de elétrons não ligados do átomo de nitrogênio presente no anel pirimidínico apresenta interação com o aminoácido Lys454.

Interações com os aminoácidos Arg426 e Cys502 são também observadas para o inibidor 1. A adição do substituinte na posição para no anel benzênico no inibidor 16i pode ser visualizada pela concentração de densidade eletrônica entre o grupo substituído carboxila e os hidrogênios do aminoácido LYS. Essa concentração de carga negativa no inibidor 16i, bem como a interação do inibidor 1 com o aminoácido Lys454 pode ser visualizado na Figura 9. O resultado mostrado na figura 9 ressalta ainda o melhoramento da interação com os aminoácidos Lys454, Arg412 e Cys502 mediante a clara formação de uma ligação de hidrogênio com o aminoácido Lys454 quando se adiciona o substituinte carboxila à molécula 7-h-pirrolo-pirimidina.

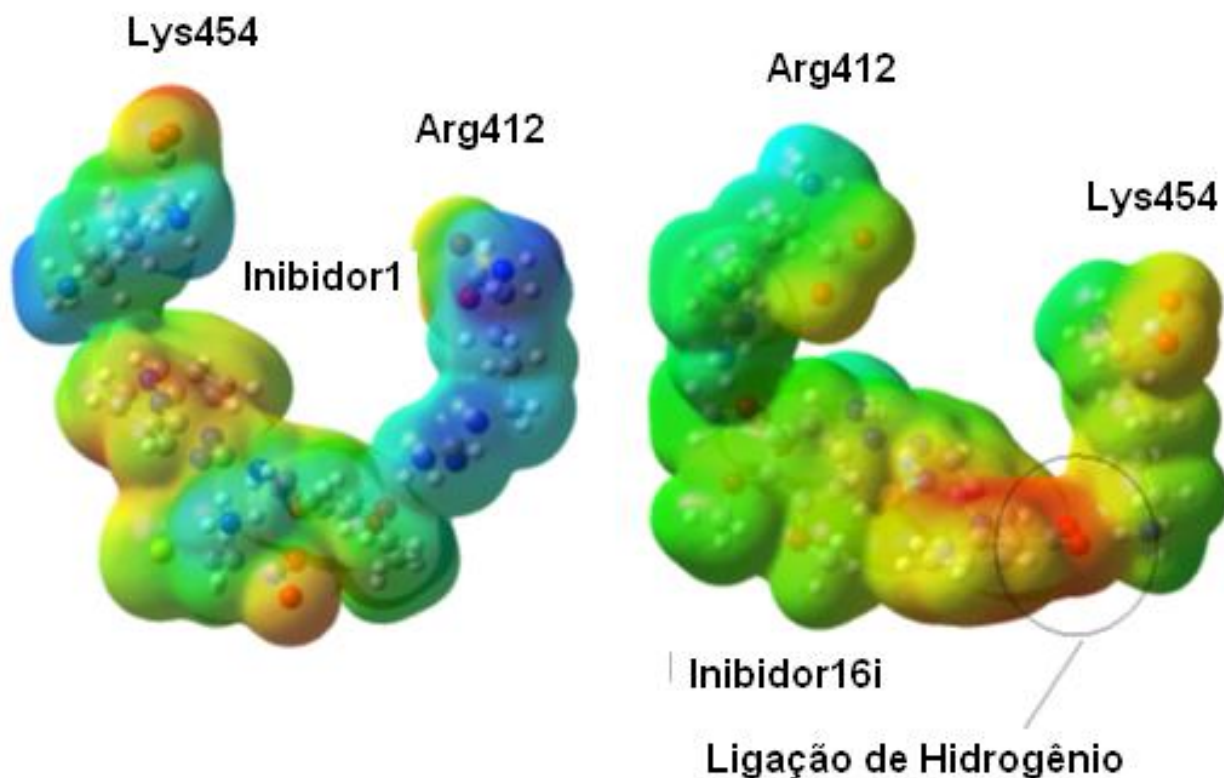


Figura 9. Potencial eletrostático calculado para os inibidores 1 e 16i.

No que concerne aos orbitais moleculares, o orbital HOMO do inibidor 1 está localizado sobre o anel pirimidínico, enquanto o LUMO está localizado sobre o anel pirrólico. Esta disposição dos orbitais de fronteira mostra que as principais ligações químicas são realizadas com os aminoácidos Lys454 e Cys 502, conforme pode ser visualizado na Figura 10. Essa disposição dos orbitais confere ao inibidor 1 uma atividade de inibição intermediária quando comparado às demais moléculas.

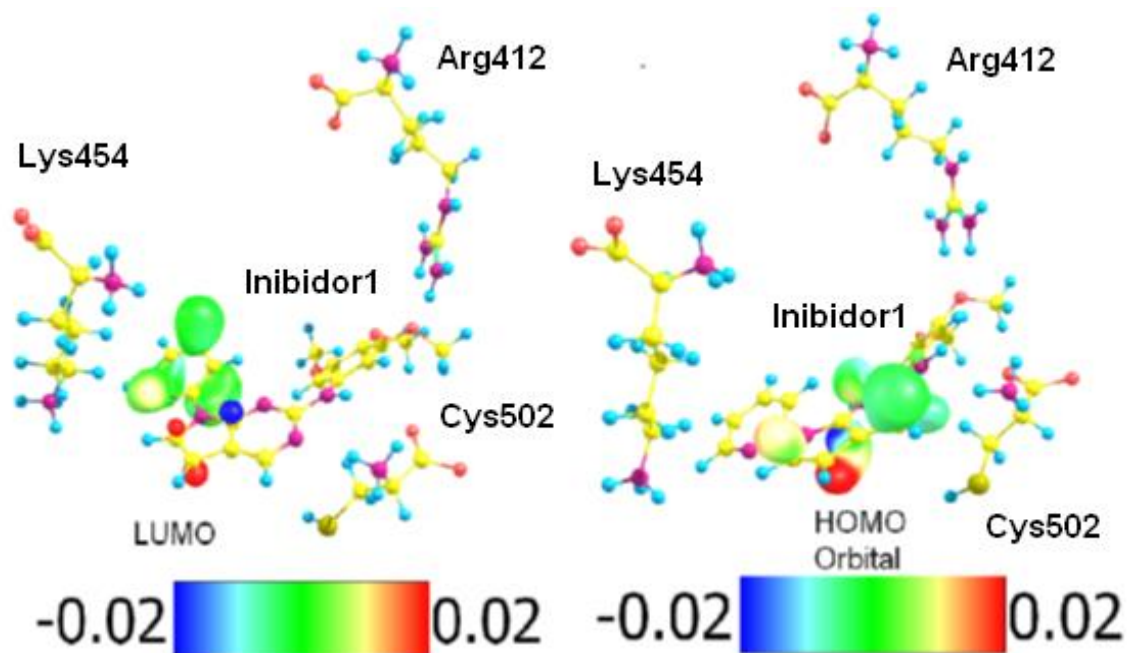


Figura 10. Orbitais de Fronteira calculados para a interação entre os aminoácidos do sítio catalítico da proteína FAK com o inibidor 7-h-pirrolo-pirimidina.

No que reporta aos inibidores 18i e 16i o orbital HOMO está essencialmente localizado sobre o grupo aril, e o orbital LUMO está situado sobre o anel metoxifenil. Esses inibidores são os que apresentam maior IC_{50} , ou seja, são aqueles inibidores que inibem menos eficientemente a enzima FAK, sendo necessário, portanto, doses relativamente altas dessas moléculas para controlar o processo de transdução de sinais.

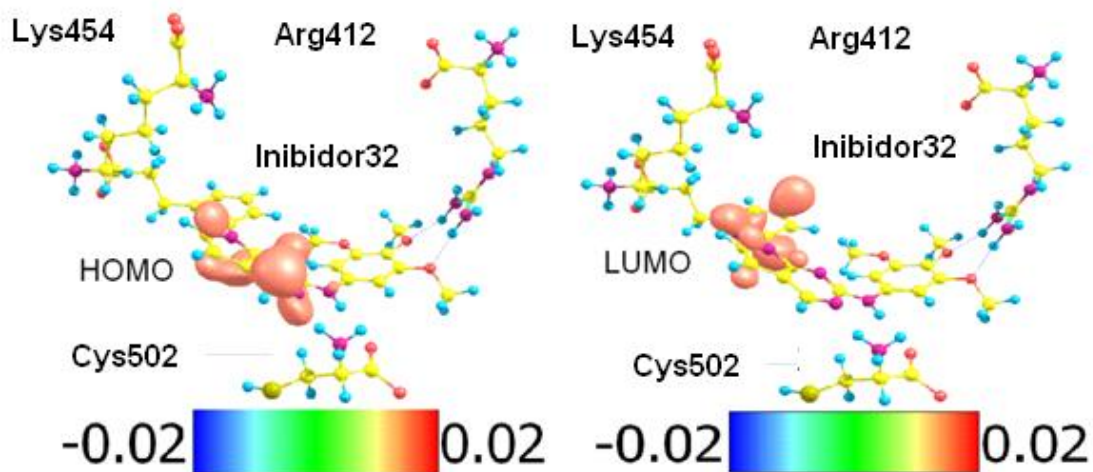


Figura 11: Orbitais de Fronteira calculados para a interação entre os aminoácidos do sítio catalítico da proteína FAK com o inibidor 7-h-pirrolo-pirimidina.

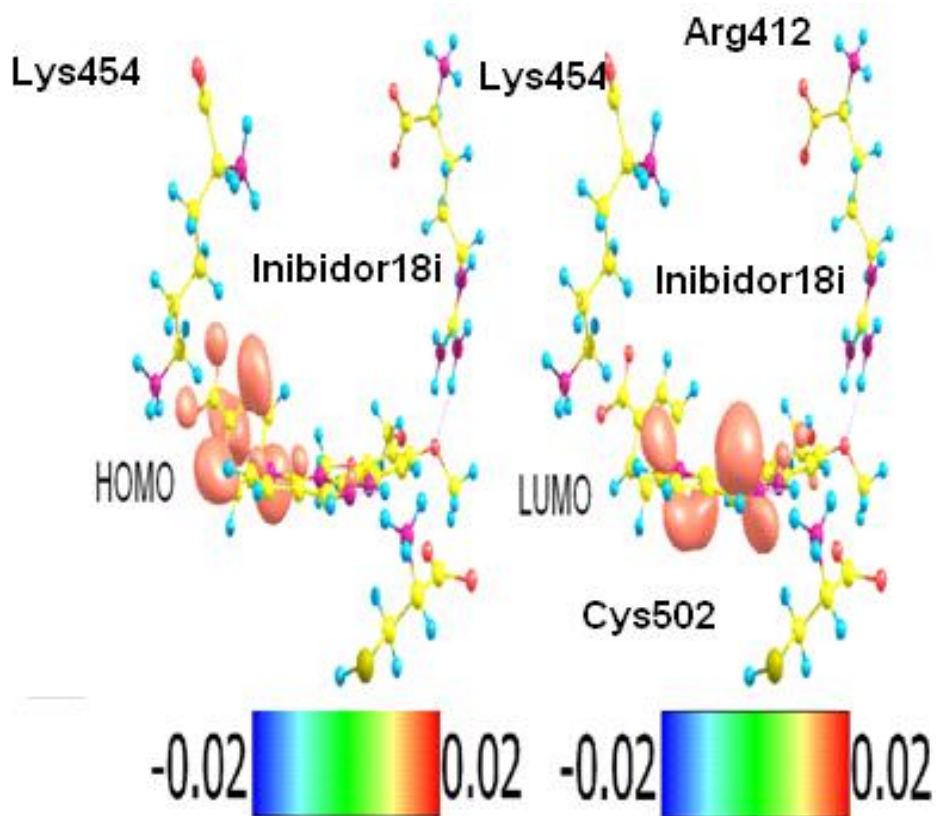


Figura 12. Orbitais de fronteira para inibidor 18i.

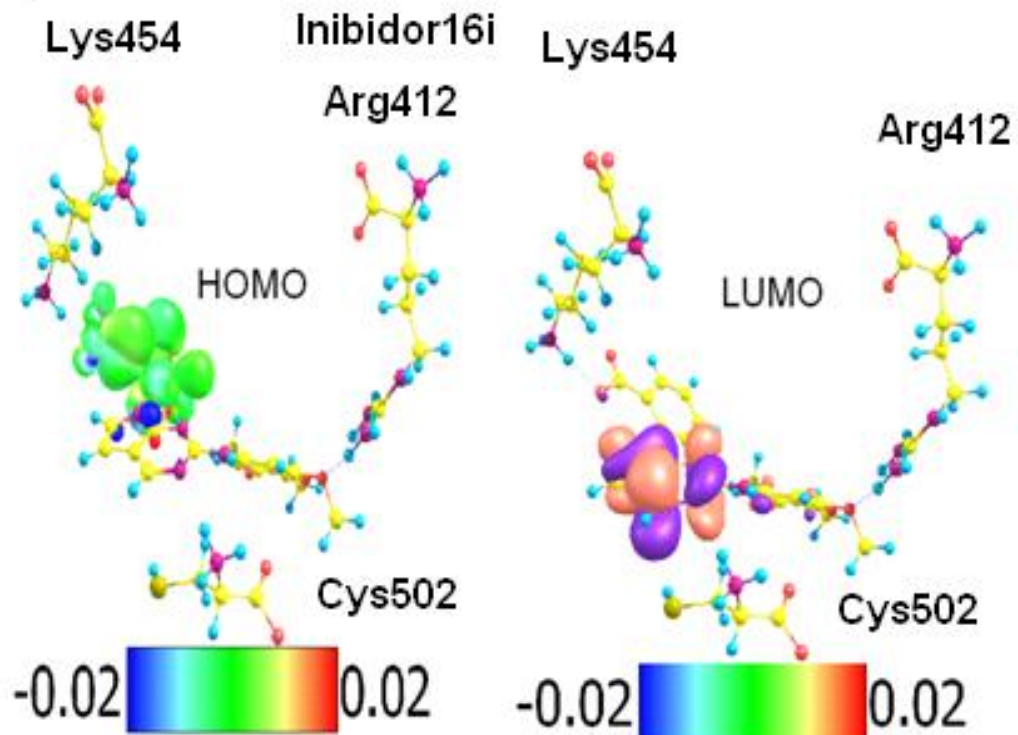


Figura 13. Orbitais HOMO e LUMO para os inibidores 18i e 16i, respectivamente.

A analogia dos orbitais moleculares com as atividades dos demais inibidores pode ser feita da mesma forma. Com efeito, verifica-se através dos cálculos de estrutura eletrônica, que o orbital HOMO dos inibidores 17g,17h,17i e 32 está localizado sobre o anel pirimidínico próximo ao aminoácido Cys502, enquanto nos inibidores 16i e 18i os orbitais estão mais próximos do aminoácido Lys454. Pode-se dizer dessa maneira, que o aumento da atividade das drogas está correlacionado com ocupação de orbitais próximos ao aminoácido Lys454. Essa realidade é verificada na disposição dos orbitais moleculares do inibidor 32, que é aquele que apresenta o menor IC_{50} , ou seja, é a molécula que melhor inibe a enzima FAK. Na disposição dos orbitais moleculares HOMO, verifica-se que a maior contribuição eletrônica se dá

próximo ao aminoácido Cys502 conforme pode ser verificado na Figura 14. O aumento de densidade eletrônica próxima ao aminoácido Cys502 contribui de maneira significativa para o melhoramento da atividade das drogas da classe pirrolo-pirimidina.

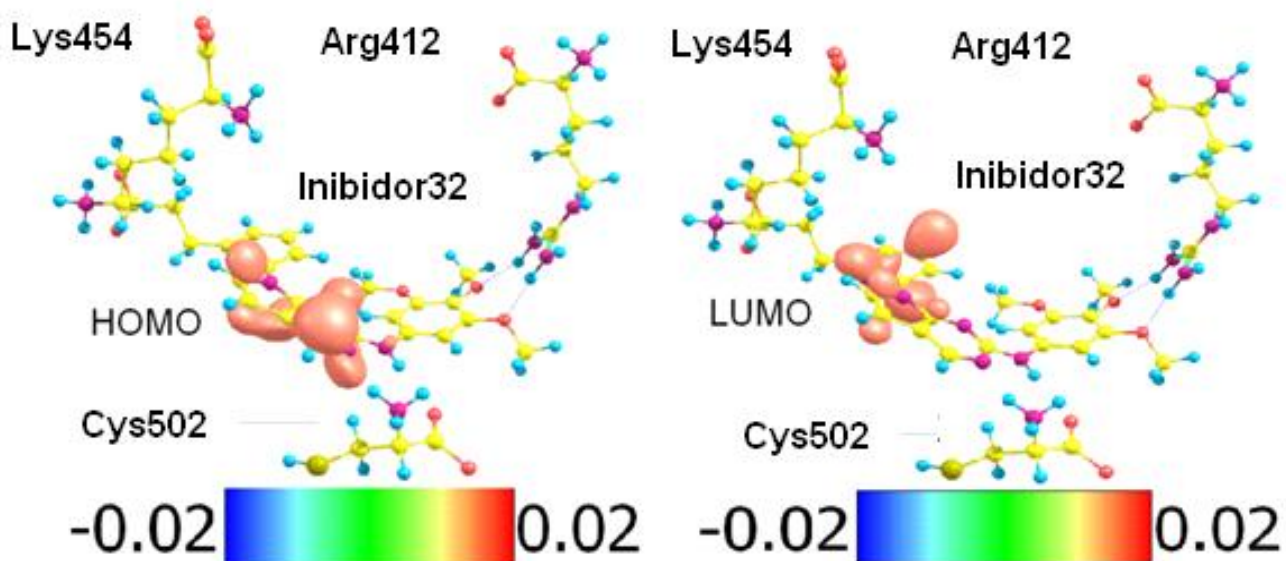


Figura 14. . Disposição dos orbitais HOMO e LUMO para o inibidor 32.

A perda da atividade por parte dos inibidores 16i e 18i pode ser visualizada também do ponto de vista do potencial eletrostático. Para o inibidor 16i o acréscimo do substituinte na posição meta enseja um aumento da concentração de densidade eletrônica próxima ao aminoácido Lys454, com consequente perda daquela, próxima ao aminoácido Cys502. Para a classe de inibidores 17g, 17h, 17i e 32 as densidades eletrônicas estão próximas do aminoácido Cys502, conforme pode ser visualizado na Figura 15.

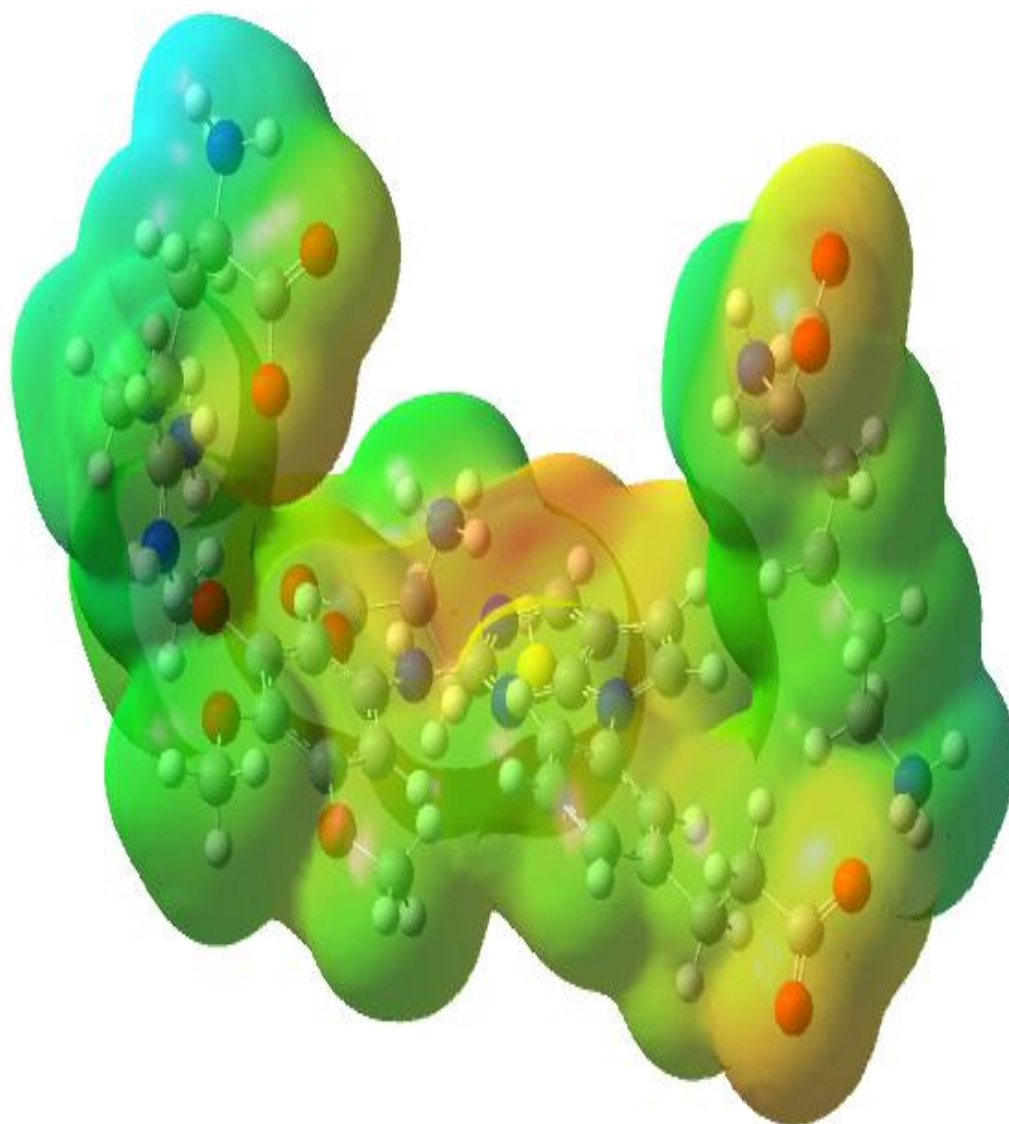


Figura 15. Potencial eletrostático gerado para a interação entre o inibidor 17i e os aminoácidos Lys454, Arg412 e Cys502.

Os resultados dos cálculos de energia de interação são mostrados na Tabela 3:

Tabela 3: Energias de interação obtidas com diversos métodos e bases em Kcal.

Inibidor	IC ₅₀ contra FAK* (μM)	M06	B3LYP	B3LYP	MP2	MP2
		LANL2DZ	LANL2DZ	6-31G	6-31G	LANL2DZ
18i	2.84	-419.15	-353.46	-310.54	-414.63	-99.86
16i	2.82	-410.62	-351.04	-307.06	683.04	162.43
1	0.212	-367.56	-337.82	-248.11	-368.40	158.46
17g	0.038	-380.49	-329.28	-286.35	737.35	-114.81
17h	0.037	-379.61	-309.45	-314.05	-456.89	152.788
17i	0.035	-393.84	-340.74	-333.38	-452.58	-109.32
32	0.004	-446.35	-380.70	-349.78	-490.66	-117.70

- Energia de interação computada em unidades atômicas.

As energias derivadas do método MP2 com a base LANL2DZ não apresentaram correlação com as atividades das moléculas da classe pirrolopirimidina. As energias de interação para os inibidores 17h e 17i foram positivas, caracterizando uma repulsão entre essas moléculas e os aminoácidos pertencentes ao sítio catalítico da proteína, demonstrando a ineficiência da metodologia na obtenção de uma linearidade entre energia de interação e atividade da droga 7-h-pirrolopirimidina.

Em oposição aos resultados da aproximação MP2, os funcionais com base 6-31g proporcionaram resultados mais relacionadas com dados de IC₅₀, não apresentando energias que caracterizassem repulsão entre os inibidores e os aminoácidos componentes do sítio catalítico da proteína FAK. Os resultados mostraram uma razoável conexão com os dados experimentais, com desvio de linearidade entre relação atividade e energia de interação. A mais baixa energia

de interação foi obtida para o inibidor 32, podendo-se correlacionar esse resultado com a boa atividade de inibição dessa droga. Em contraposição a esses resultados, foram obtidas energias de interação não correlatas com as suas respectivas atividades. O inibidor 18i não apresentou a energia de interação mais baixa, não apresentando, dessa forma, uma correlação com sua baixa atividade na inibição da proteína FAK.

Para os demais métodos, ocorreram problemas similares de relação entre a atividade da droga com suas energias de interação, sugerindo dessa forma que a energia de interação não é a única variável necessária para caracterizar a atividade inibitória de uma droga. Atenta-se ao fato de que não foram computadas águas explícitas no cálculo, podendo ser o fator entrópico nesse caso mais importante que a energia de interação. O tamanho do sistema molecular trabalhado pode ainda não ser representativo para esse tipo de relação. Baseando-se nesses resultados, foram realizados cálculos termodinâmicos relativos à ligação fármaco e receptor a fim de estudar a relação de energia com a descrição das atividades das drogas. Esses cálculos possibilitaram o conhecimento da contribuição de cada função de estado termodinâmica para a realização da ligação química entre o inibidor e os aminoácidos componentes do sítio catalítico da proteína FAK.

No que se refere às propriedades termodinâmicas de um sistema biológico, pode-se correlacionar a atividade de uma droga com a energia livre do complexo enzima/inibidor através da Equação 24.

$$\Delta G = -RT \ln k_i \quad (24)$$

Onde k_i é a constante afinidade da droga. Essa constante pode ser relacionada com a constante de inibição aparente ¹⁵.

$$K_i = \frac{IC50}{1 + \frac{[S]}{K_m}} \quad (25)$$

Essa relação matemática permite correlacionar a constante de afinidade de uma droga com a propriedade IC₅₀. A concentração do substrato S bem como k_m (constante que denota atividade máxima da enzima) é constante para o caso aqui exposto. Assim sendo, podem-se obter as propriedades termodinâmicas com intuito de entender a correlação existente entre a atividade biológica da droga, e sua interação com os aminoácidos componentes do sítio catalítico da proteína FAK. Os resultados referentes aos cálculos da energia livre são mostrados abaixo na Tabela 4.

Tabela 4: Resultados dos cálculos de energia livre usando o método B3IYP/6-31G para a interação inibidor/aminoácidos do sítio ativo.

Inibidor	IC ₅₀ contraFAK (μM)	Energia Livre Teórica (kcal/mol)
18i	2,84	-55,6
16i	2,82	-52,3
1	0,212	-11,1
17g	0,038	-74,4
17h	0,037	-71,2
17i	0,035	-58,2
32	0,004	-82,4

No que reporta aos resultados de energia livre, pode-se verificar que o inibidor 32 é aquele com o resultado mais exergônico. Esse resultado é correspondente com o fato dessa molécula ser aquela com o menor IC₅₀. Os inibidores 17g e 17h também foram bem correlacionados com a sua atividade inibitória tendo em vista suas energias livres. Todavia, os inibidores 1, 17i apresentaram energias livres não condizentes com suas atividades intermediárias aos inibidores 18i e 16i.

A fim de se vislumbrar de modo mais sistemático a contribuição da energia livre para os sistemas em estudo, foram também realizados cálculos

para verificar a contribuição da entropia e da entalpia. Os resultados referentes a essas funções de estado termodinâmicas são mostradas na Tabela 5:

Tabela 5: Contribuição entálpica e entrópica para a formação do complexo inibidor/aminoácidos.

Inibidor	Entalpia kcal/mol	Entropia (cal/K.mol)
18i	1,0	189,8
16i	-0,4	174,0
1	1,1	41,2
17g	3,0	259,6
17h	3,2	249,6
17i	0,0	195,5
32	-2,2	269,2

Os resultados mostram que o inibidor 32 apresenta a maior entropia e a menor entalpia, colocando-o com o maior potencial de inibição da proteína FAK. Para os demais inibidores, não se verifica a mesma correlação entre a entalpia e a atividade das drogas. Observa-se, no entanto, que a função entropia parece reger a interação inibidor/aminoácidos. Verifica-se que os inibidores 17g, 17h e 17i, que tem potencial de inibição intermediário aos demais inibidores, possuem contribuições entrópicas essencialmente maiores que o 18i e 16i, os quais são os que apresentam alto IC₅₀.

Através da análise de componentes principais podemos ter maior entendimento das propriedades eletrônicas e estruturais. A Figura 16 abaixo mostra as componentes principais 1 e 2 usando a energia dos orbitais HOMO e LUMO, momento de dipolo, energias de interação (M06/B3LYP/PM6) calor de formação, nON, nOHN, nORTB e os resultados experimentais do IC₅₀. Três grupos de moléculas foram encontrados, independentemente de qual energia de interação funcional de densidade era utilizada (B3LYP ou M06). O primeiro foi composto pelas moléculas 17h, 17i e 32, que são as moléculas mais ativas, e a segunda foi constituída por 16i, 18i e 17g que são as moléculas menos ativas. A estrutura 1 ficou isolada, já que esta estrutura não tem grupo carboxílico e tem o menor número de ligações de hidrogênio. A informação acerca das atividades dos inibidores está espalhada entre a PC1 e PC2.

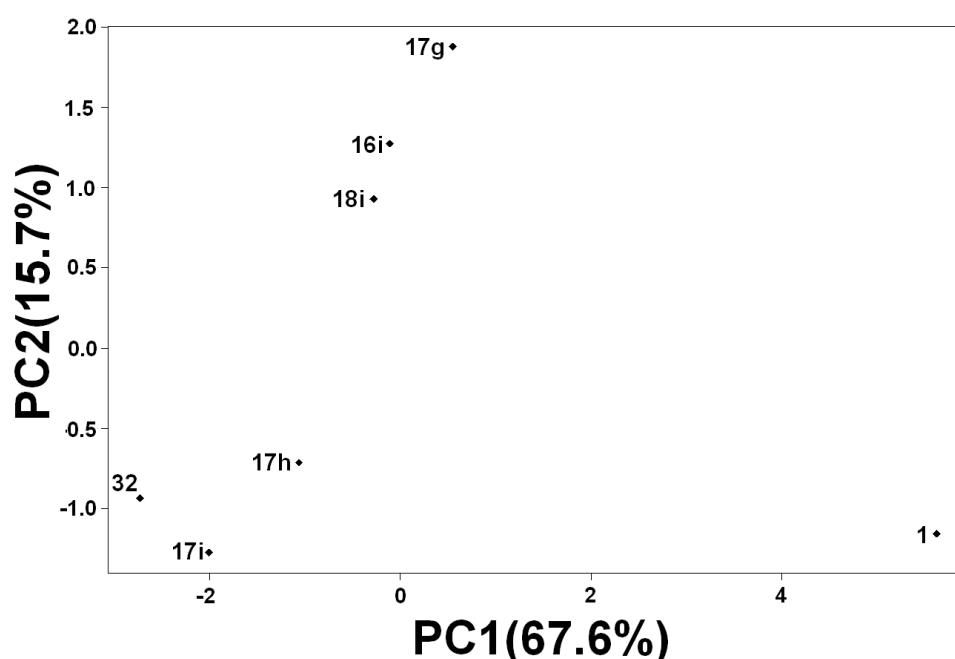


Figura 16. Gráfico de componentes principais para os inibidores da classe pirrolo pirimidina.

A componente principal 2 carrega informações acerca da atividade inibitória e a estrutura 1 divide as moléculas com mais e menos atividades. No entanto, a estrutura 32 que tem o grupo carboxila também divide o conjunto de moléculas em mais menos ativas. É importante ressaltar que, apesar de não se obter uma relação direta entre as componentes principais e os valores de IC_{50} , consegue-se agrupar as moléculas em relação a sua estrutura e atividade. Além disso, para o inibidor 32 os valores das PC1 e PC2 encontra-se no extremo esquerdo do gráfico, com o valor da PC1 mais afastado em relação aos outros, o que conduz a correlacioná-los com a molécula de maior IC_{50} , o que está em conformidade com a atividade esperada.

Estrutura eletrônica e *docking* molecular da molécula dasatinibe

A droga dasatinibe ocupa uma grande porção do sítio catalítico. Essa situação ocasionou sucessivos problemas de convergência nos cálculos de estrutura eletrônica do tipo QM/MM. No intuito de entender essa problemática, foi realizado uma curta dinâmica molecular de 1 ns no programa Hyperchem, cujo resultado certificou severas restrições no movimento do inibidor no sítio catalítico. Essas restrições propiciaram inúmeros erros de otimização quando da utilização do programa ONIOM e as aproximações combinadas AM1/MM, PM3/MM e B3LYP/3-21g/MM, onde MM se refere ao campo de força UFF. O uso dessas aproximações propiciou otimizações incompletas com erros inerentes as coordenadas internas do sistema inibidor/proteína. Os resultados

relativos ao *docking* molecular do fármaco dasatinibe são mostrados na Figura 17.

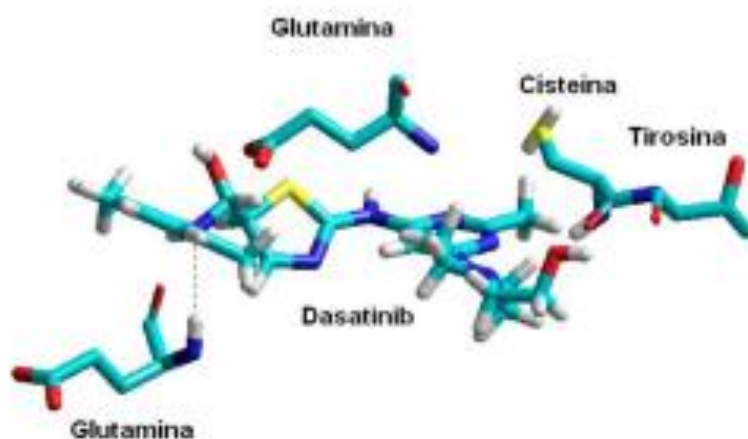


Figura 17. Droga dasatinibe ancorada ao sítio catalítico da proteína.

No entanto, quando se fez o uso do método *MNDO/MM* e do método *HF/MM* observou-se otimizações completas para o sistema inibidor/proteína. Na interação entre a droga dasatinibe e a proteína FAK, verificou-se interações do tipo π -stacking, que são interações entre a nuvem π dos anéis aromáticos com o nuvem eletrônica do sítio catalítico da proteína FAK. A aproximação quântica HF e a aproximação semi-empírica possuem deficiências relativas à descrição de ligações de hidrogênio, que são sanadas na maioria dos casos pelos métodos pós-Hartree-Fock e por alguns funcionais de densidade. Esses métodos apesar de apresentarem maior acurácia no cálculo de propriedades eletrônicas, são essencialmente caros computacionalmente, sendo impraticável em se tratando de moléculas biológicas. As outras aproximações cujo resultado foi a não convergência do sistema fazem com que a droga dasatinibe realize movimentos mais bruscos na cavidade catalítica, propiciando dessa forma erros nos cálculos de otimização de estrutura eletrônica. Esses

movimentos bruscos associados a desvio de planaridade podem ser verificados quando se realiza otimizações de geometria para os diferentes métodos utilizando somente o fármaco dasatinibe. Os desvios de planaridade são mostrados na Tabela 6 para os diferentes métodos utilizados neste trabalho. Tendo em vista esses deslocamentos em relação ao plano, foi utilizado o método quântico semi-empírico *MNDO* para o cálculo do tipo QM/MM, o qual possui menores deslocamentos planares.

Tabela 6: Desvio de planaridade do fármaco dasatinibe utilizando diferentes aproximações

Método	$\Theta 1$	$\Theta 2$	HOMO	LUMO
PM6	175,89	119,09	-0,3677	-0,4509
MNDO	158,93	136,62	-0,34708	-0,03196
AM1	132,57	102,91	-0,32586	-0,03548
PM3	132,57	102,91	-0,32705	-0,04244
HF	174,75	121,91	-0,31023	0,08797
M06	132,57	102,909	-0,22463	-0,0493
MP2	132,57	102,91	-0,8461	0,06146

Baseando-se no mínimo local encontrado pela aproximação *MNDO*, foi realizada uma otimização com a aproximação semi-empírica PM6 obtendo-se êxito nesses cálculos. As demais aproximações foram empregadas do mesmo modo, porém não obtiveram êxito na otimização do sistema biológico, devido a repetidas falhas na convergência do SCF.

Os cálculos relativos à dinâmica molecular propiciaram a visualização de rotações de ângulos diedros, permitindo analisar as ligações de hidrogênio antes não existentes. Os grupos químicos cuja rotação levou a ligações de hidrogênio são mostrados na Figura 18.

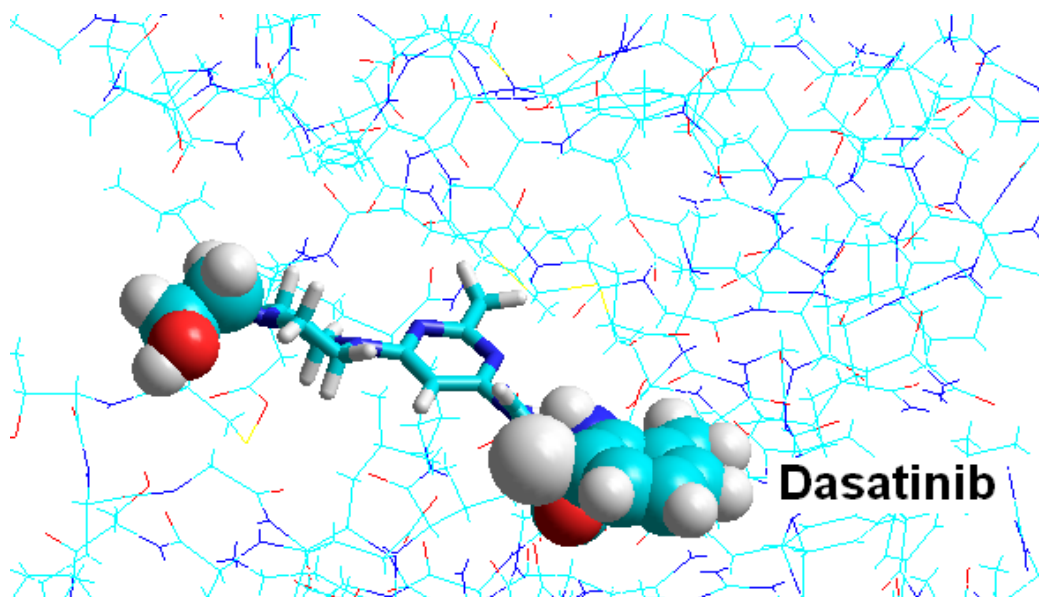


Figura 18. Grupos químicos que apresentaram rotação dos diedros durante a dinâmica molecular.

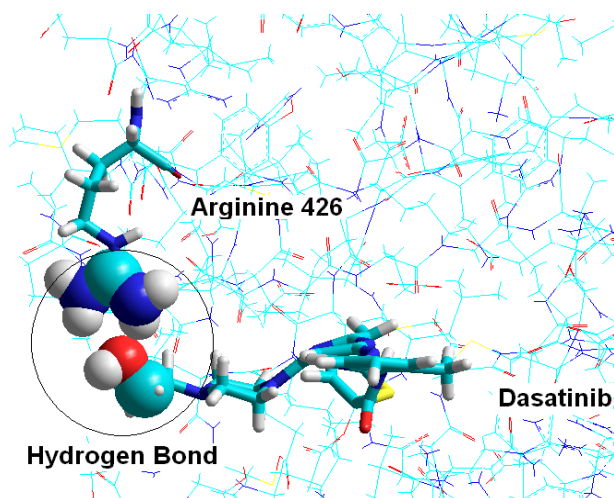


Figura 19. Ligação de hidrogênio associada com a rotação do ângulo diedro do grupo hidroxila do fármaco dasatinib.

A rotação do ângulo diedro associado com o grupo hidroxila terminal do fármaco dasatinibe propicia a formação de ligações de hidrogênio com o aminoácido terminal Arg426 como mostrado na Figura 19. A ligação de

hidrogênio é vista através do formato molecular do tipo “esferas de sobreposição” presente no programa Hyperchem.

Ligações de hidrogênio permanentes, ratificadas pelos cálculos de otimização de geometria com a aproximação PM6/UFF para esse modelo teórico, foram encontradas com os aminoácidos Glu18, Thr91, Asp152 e Gly93. Na geometria de equilíbrio, o programa ONIOM não permitiu observar ligações de hidrogênio com o grupo hidroxila terminal do fármaco dasatinibe. As distâncias interatômicas estabelecidas para as ligações de hidrogênio são mostradas na Tabela 7. Ressalta-se que a ligação com o aminoácido Cys502 tem sido encontrada em diversas interações entre drogas inibidoras da proteína quinase de adesão focal^{83 84}.

Tabela 7: Distâncias interatômicas das ligações de hidrogênio estabelecidas entre o fármaco dasatinibe e os aminoácidos listados.

Aminoácidos	Distância das Ligações de Hidrogênio (Å)
Glu(18)	2,80
Thr(91)	3,65
Asp(152)	1,60, 2,60
Gly(93)	3,39

O mapa de potencial eletrostático derivado de cálculos quânticos semi-empíricos mostram que o fármaco dasatinibe pode estabelecer ligações de hidrogênio com os aminoácidos Lys454 e Arg426. Essa interação pode ser observada através do mapa de potencial eletrostático presente na Figura 20.

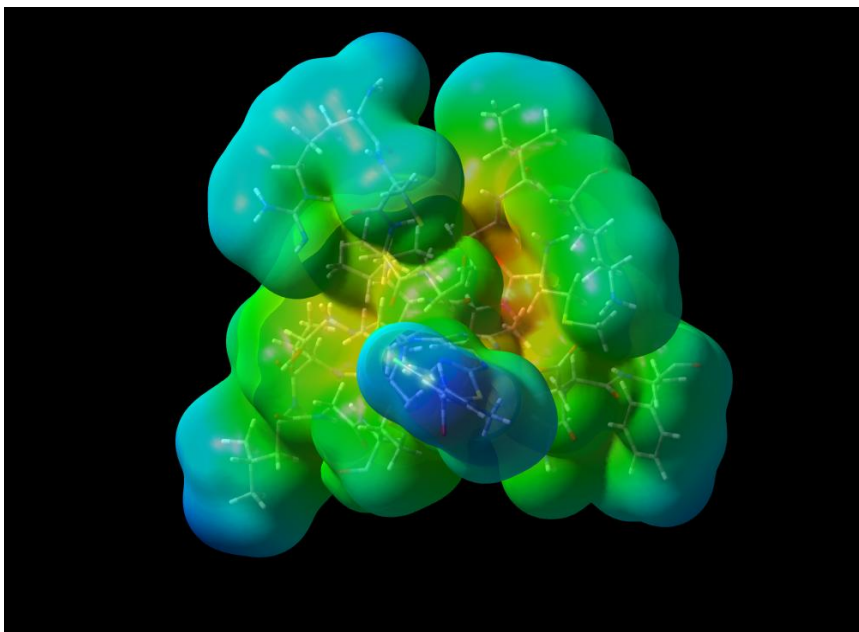


Figura 20. Mapa de potencial eletrostático obtido para o sítio da proteína FAK com o fármaco dasatinibe obtido via a aproximação PM6.

A ligação com o aminoácido Arg426 não é tão clara na geometria de equilíbrio, porém o mapa de potencial eletrostático mostra densidade eletrônica negativa no grupo hidroxila terminal. Essa interação se torna acessível quando se verifica que o diedro associado ao grupo hidroxila terminal da molécula dasatinibe pode rotacionar em direção ao aminoácido Arg426.

No que concerne aos resultados dos cálculos de estrutura eletrônica para obtenção dos orbitais de fronteira, verifica-se que os mesmos se localizam sobre o aminoácido Arg426 e o anel central heterocíclico do fármaco dasatinibe, salientando dessa forma, a importância desse aminoácido na descrição da interação dasatinibe/FAK.

Estrutura eletrônica e *docking* molecular da molécula sulfonamida

Para o cálculo de otimização de geometria do complexo sulfonamida/FAK houve problemas devido à otimização de geometria utilizando o método ONIOM. Os métodos PM6, B3LYP, PM3, AM1 combinados com um campo de força clássico em cálculos do tipo QM/MM foram incapazes de propiciar uma completa otimização de geometria, suscitando em diversos momentos, erros nas coordenadas internas do sistema molecular. Somente o método HF e o método *MNDO* foram capazes de propiciar uma otimização de energia completa. O primeiro fato a destacar é o grande volume ocupado pela molécula sulfonamida no sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal quando comparado ao volume da molécula de ATP, conforme a Tabela 1. Um segundo fator, não menos importante, são as deformações angulares dos diedros fora do plano molecular. Métodos mais recentes, como aqueles problemáticos no que se refere à otimização de geometria do complexo sulfonamida/FAK, apresentam melhor descrição das interações entre inibidor e enzima, aceitando mudanças abruptas de geometria no sítio catalítico. Dessa forma, o uso dessas metodologias se torna problemática quando aplicadas a sistemas moleculares com essas características. De modo antagônico as aproximações quânticas HF e *MNDO* possuem em suas aproximações, problemas relativos à descrição de interações intermoleculares e intramoleculares como aquelas provenientes da interação de um elétron com o campo gerado pelos demais elétrons no método HF. Essa baixa descrição da interação do sistema faz com que hajam baixos deslocamentos fora do plano molecular, propiciando otimizações completas de geometria. Foi então utilizado o método quântico semi-empírico *MNDO* como

primeira aproximação seguido do método HF com um pseudo potencial LANLDZ. O uso do pseudo-potencial LANL2DZ, foi escolhido pelo fato de ser um potencial que descreve orbitais do tipo *d*, ao mesmo tempo possui um baixo custo computacional, quando comparado com outras funções de onda. As ligações de hidrogênio formadas pela molécula sulfonamida são mostrados na Figura 21.

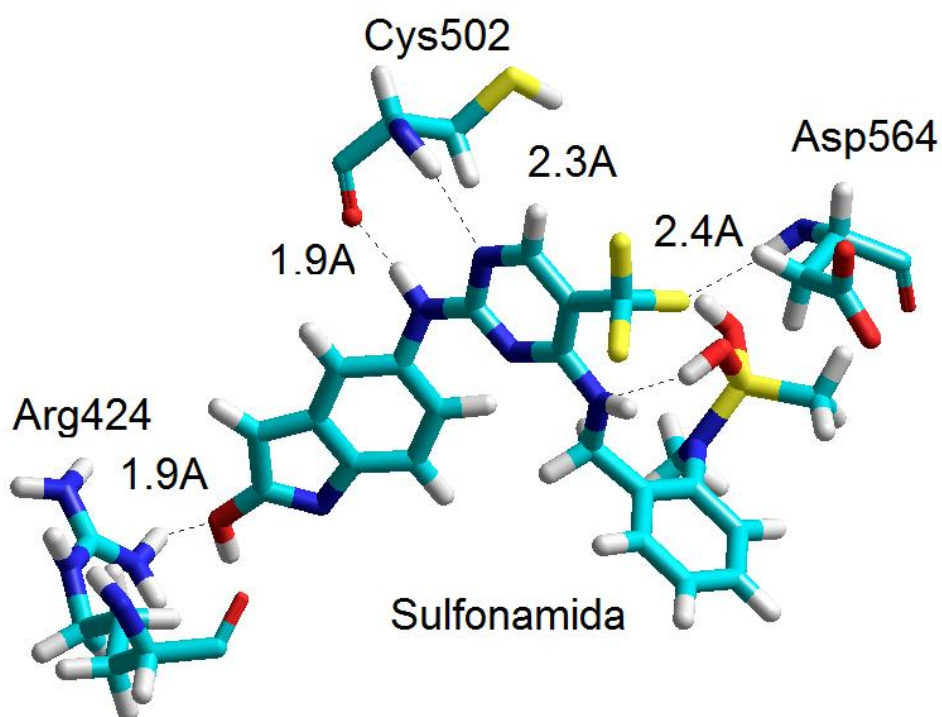


Figura 21. Inibidor sulfonamida ancorado ao sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal.

São observadas ligações de hidrogênio com o aminoácido Cys502, Asp564 e Arg424. As distâncias de ligação relativas a essas ligações são mostradas na Tabela 8.

Tabela 8: Distâncias de ligação entre o inibidor sulfonamida e os aminoácidos da proteína quinase de adesão focal.

Aminoácidos	Distância das ligações de hidrogênio (Å)
Cys502	2,3,1.9
Asp564	2,4
Arg424	1,9

Os orbitais de fronteira do sistema sulfonamida e o sítio catalítico da proteína FAK são ilustrados na Figura 22. Como pode ser observado, o orbital HOMO se encontra espalhado entre os aminoácidos Arg426 e Glu431, enquanto os orbitais LUMO se encontram sobre o aminoácido Lys454.

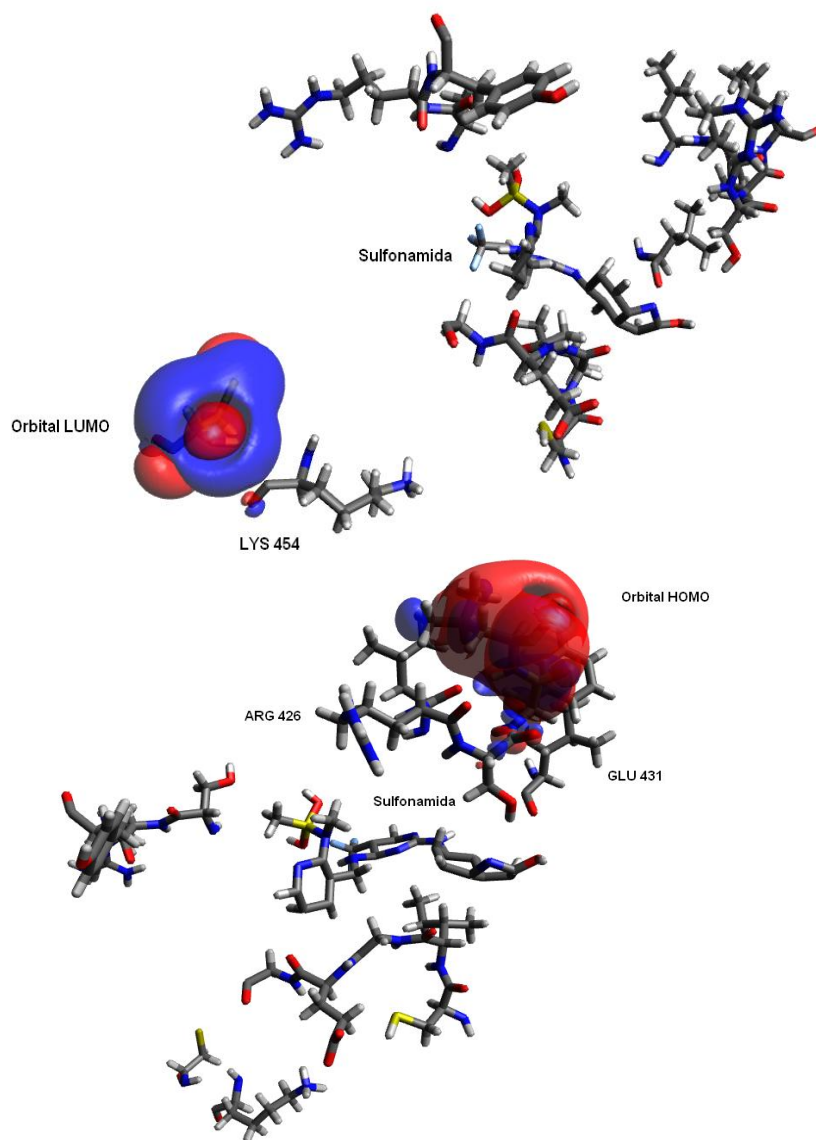


Figura 22. Orbitais de Fronteira para interação entre o inibidor sulfonamida e o sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal.

Estrutura eletrônica e *docking* molecular da molécula ATP

A molécula de ATP (adenosina trifosfato) é aquela responsável pela propagação dos sinais celulares mediante reações de fosforilação do aminoácido Thr397, por isso é crucial a descrição de sua interação com a enzima quinase de adesão focal no intuito de entender a ação desse substrato. Devido aos problemas provenientes da estrutura obtida do banco de dados de

proteína, foram necessárias correções no que diz respeito à geometria da molécula de ATP. Essas correções foram realizadas dentro do sítio catalítico da proteína FAK, eliminando a sobreposição de átomos e proximidade excessiva de ligações químicas. Após a eliminação desses problemas, se tornou praticável a otimização de geometria utilizando o método QM/MM. Seguindo o protocolo dos cálculos anteriores, foi utilizado o método *MNDO* para uma primeira aproximação. Em seguida foi realizado um cálculo HF com o pseudo-potencial LANL2DZ. Ambas as otimizações ocorreram sem os erros nas coordenadas internas, observados nos cálculos dos sistemas anteriores. As ligações de hidrogênio formadas entre a molécula de ATP e FAK são mostradas na Figura 23.

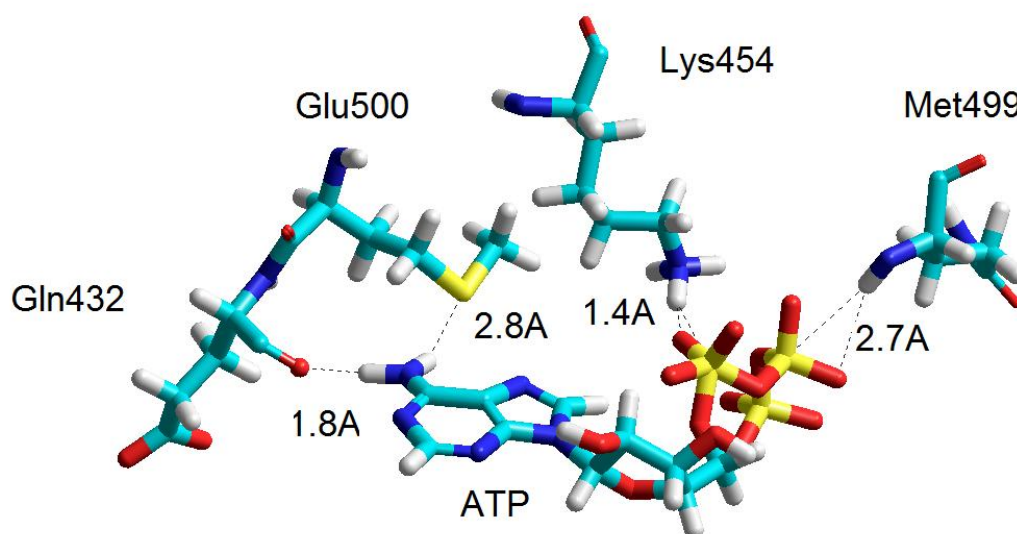


Figura 23. Interação da molécula de ATP com a proteína quinase de adesão focal .

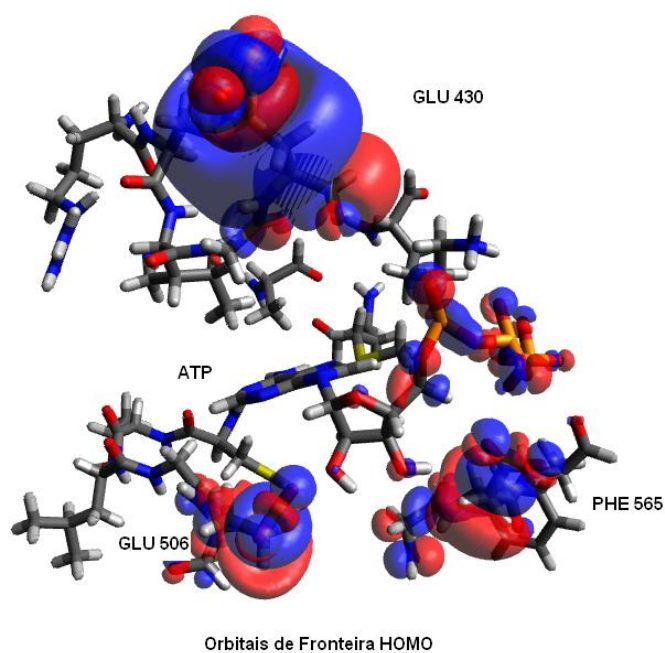
No que concerne à ligação da molécula de ATP com o sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal, são observadas as seguintes ligações de hidrogênio conforme pode ser visualizado na Tabela 9.

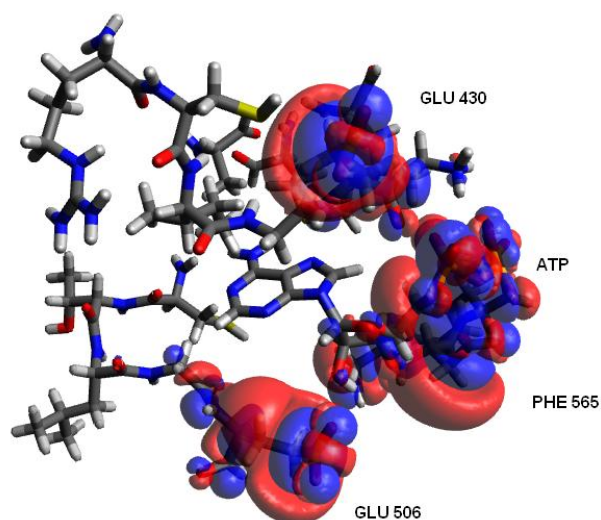
Tabela 9: Distâncias de ligações de hidrogênio realizada pela molécula de ATP no sítio catalítico da proteína FAK.

Aminoácidos	Ligações de Hidrogênio (Å)
Met499	2,7
Gln432	1,8
Lys454	1,3

A energia livre de ligação calculada para interação entre a molécula de ATP e os aminoácidos componentes do sítio catalítico da proteína FAK foi da ordem de -58,91 kcal mostrando que essa interação química é favorável termodinamicamente.

Os orbitais de fronteira calculados para a molécula de ATP são mostrados abaixo na Figura 24. Os orbitais estão localizados sobre os grupos fosfatos da molécula de ATP e os aminoácidos Glu 430, Phe 565 e Glu 506.





Orbitais de Fronteira LUMO

Figura 24. Orbitais de fronteira calculados para a interação da molécula de ATP com o sítio da proteína FAK.

Os cálculos de potencial eletrostático mostram uma concentração de carga negativa sobre os anéis de adenina da molécula de ATP, ressaltando a importância dessa estrutura molécula, presente na maioria dos fármacos inibidores da enzima quinase de adesão focal. Essa relação é mostrada na Figura 25.

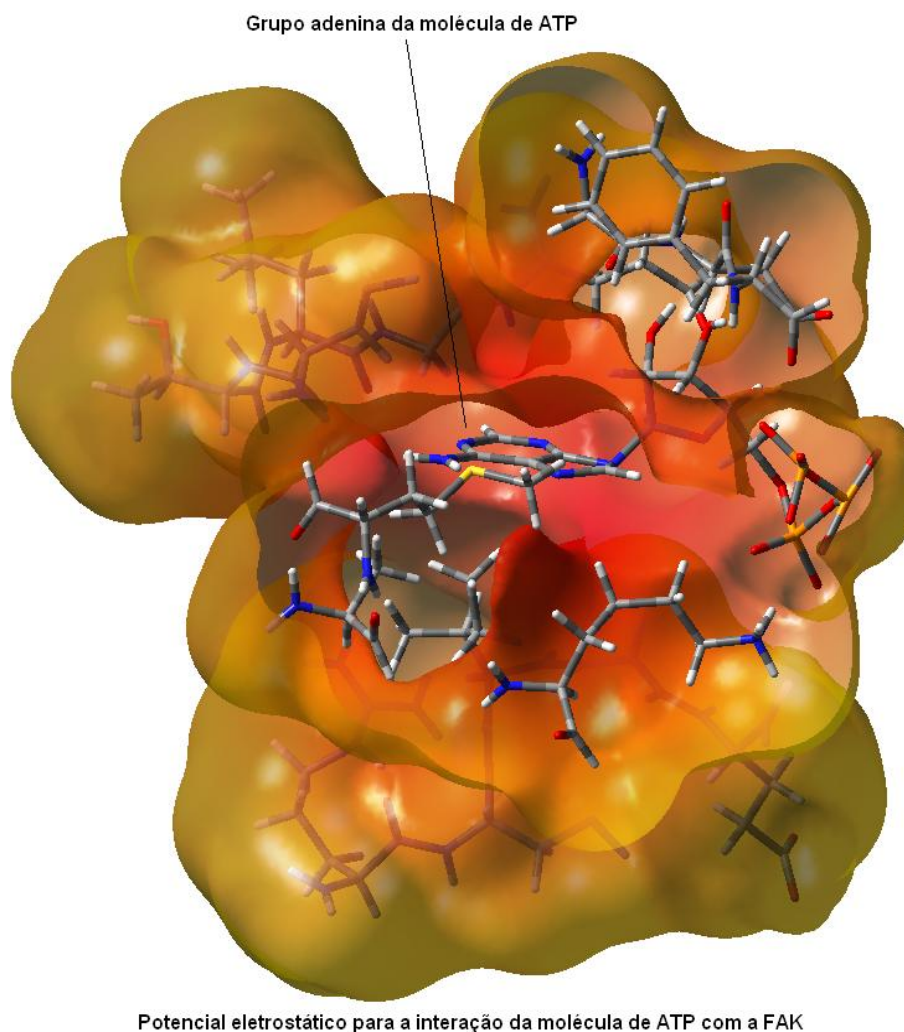


Figura 25. Potencial eletrostático calculado para a molécula de ATP interagindo com o sítio catalítico da proteína FAK.

Estrutura eletrônica do complexo bis-anilino-pirimidina

Para a otimização de geometria do sistema bis-anilino-pirimidina não foram encontrados problemas como erros de coordenadas internas. Esse fato é explicado pelo pequeno volume molecular do inibidor quando comparado à molécula de ATP, bem como com o baixo deslocamento fora do plano quanto à movimentação dos diedros dessa molécula. Os protocolos de cálculos foram os

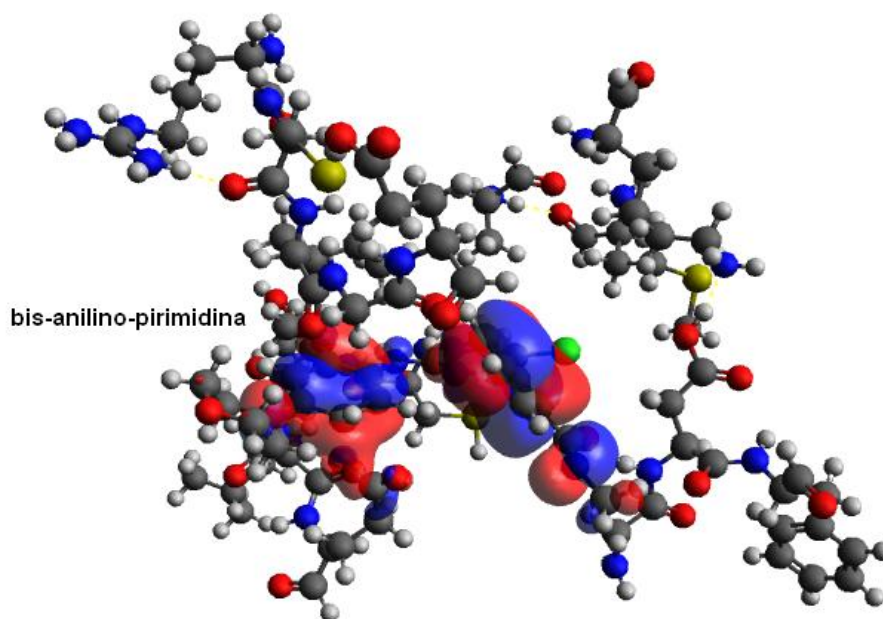
mesmos utilizados nos protocolos anteriores. Os resultados dos cálculos provenientes da aproximação ONIOM mostram que são possíveis ligações de hidrogênio com os aminoácidos Cys502 e Asp564. As distâncias de ligação relativas a essa interação são mostradas na Tabela 10.

Tabela 10: Aminoácidos da proteína quinase de adesão focal que interagem com a molécula bis-anilino-pirimidina.

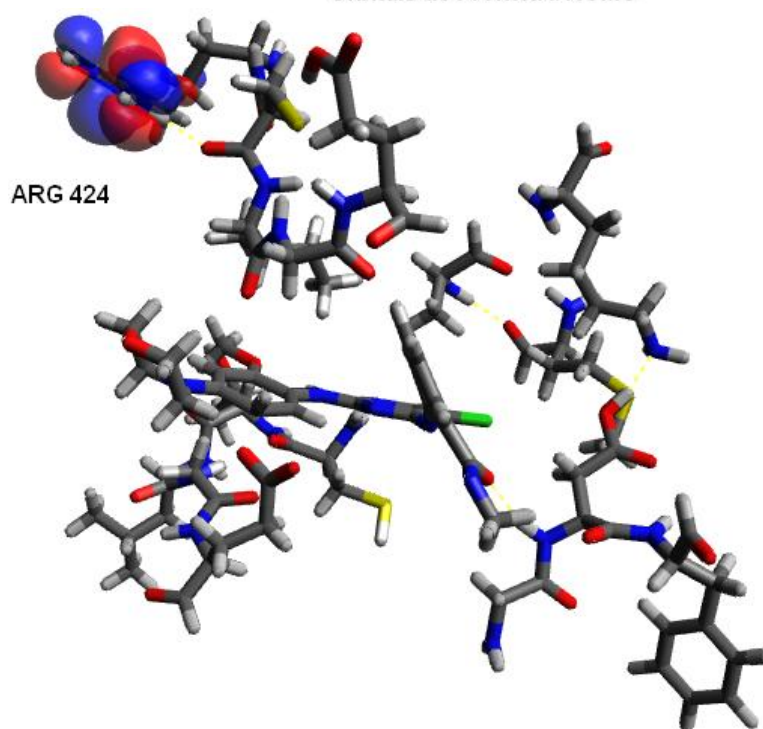
Aminoácidos	Distância das Ligações de Hidrogênio (Å)
Cys502	2,29
Asp564	1,94

A energia livre de ligação entre o fármaco e o sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal é igual -157,087kcal/mol, sugerindo desta forma espontaneidade da interação fármaco/receptor.

Com relação aos orbitais de fronteira é possível verificar que os orbitais HOMO estão essencialmente dispostos sobre o fármaco bis-anilino-pirimidina enquanto os orbitais LUMO estão localizados sobre o aminoácido Arg14, conforme a Figura 26:



Orbitais de Fronteira HOMO



Orbitais de fronteiras LUMO

Figura 26. Orbitais de fronteira da molécula bis anilino pirimidina

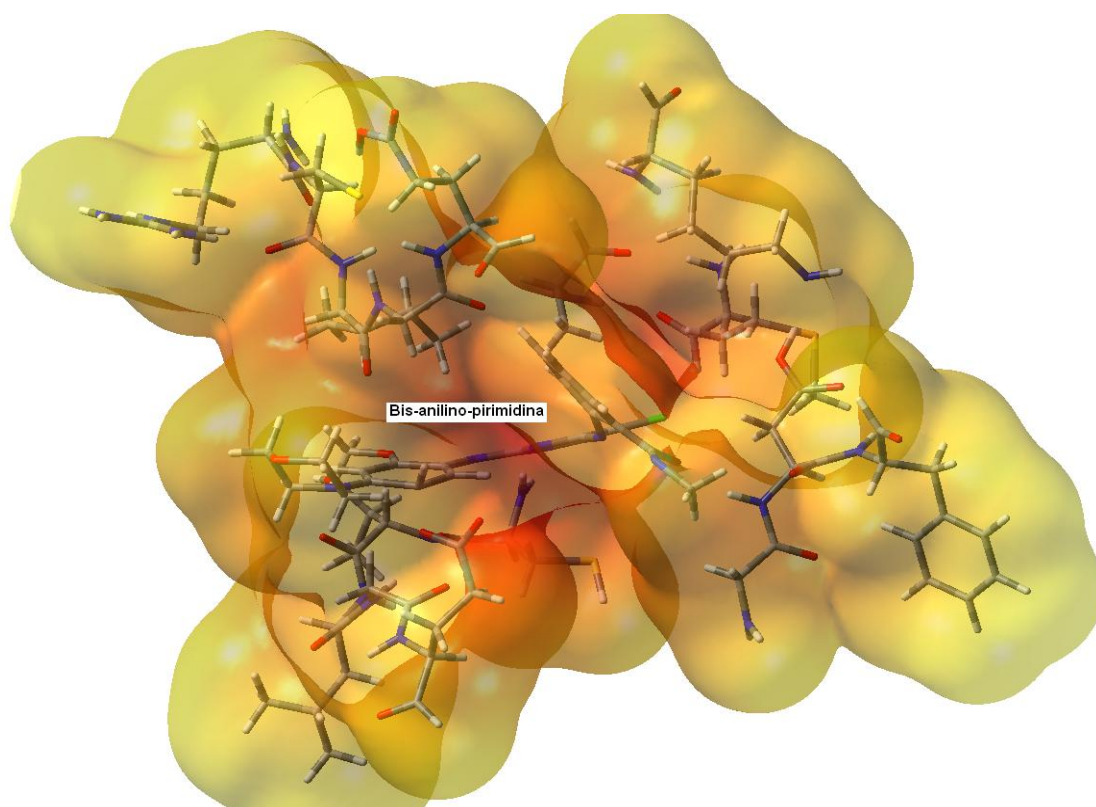


Figura 27. Potencial eletrostático obtido para interação entre o fármaco bis-anilino-pirimidina.

Os resultados do cálculo de potencial eletrostático para a interação entre o fármaco bis-anilino-pirimidina, verifica-se a interações da nuvem π do anel aromático com o substituinte cloro com o aminoácido Glu430.

Estrutura eletrônica da molécula pirrolo 2,3 d tiazole

Na otimização do sistema tiazole/FAK não foram observados problemas procedentes dos cálculos de otimização do tipo QM/MM. Apesar de esse inibidor apresentar um volume maior que o ATP, há baixos deslocamentos no plano quanto a movimento dos diedros dessa molécula. O protocolo de cálculo seguiu as mesmas aproximações e sequências dos demais, a fim de tornar os resultados comparáveis. Para a molécula de tiazole só foi observada uma

única ligação de hidrogênio com o aminoácido Cys502 conforme mostrado na Figura 28.

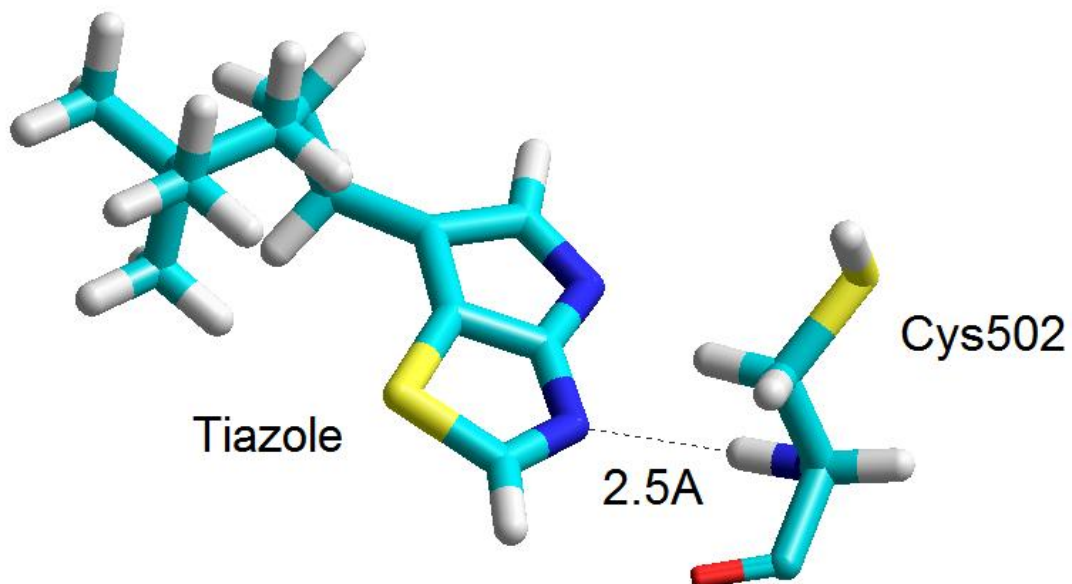


Figura 28. Fármaco 2,3 d tiazole complexado ligando-se ao aminoácido Cys502

Com respeito aos orbitais de fronteira podemos verificar que o orbital HOMO está localizado sobre o inibidor 2,3 d tiazole em sua totalidade e o orbital LUMO está localizado sobre o aminoácido Glu430. Essas informações podem ser visualizadas na Figura 29:

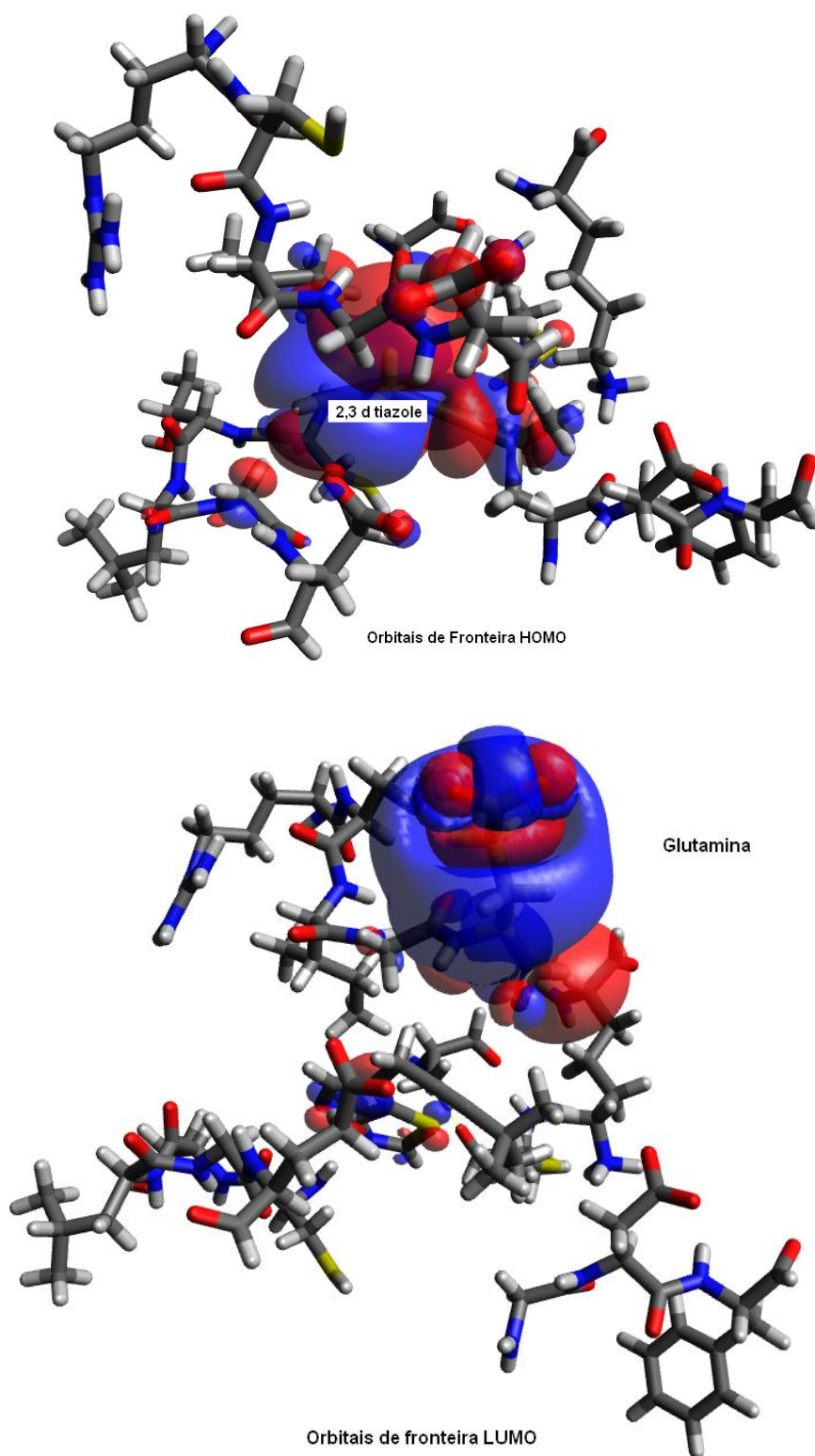


Figura 29. Orbitais de Fronteira para interação entre o fármaco 2,3,d tiazole e o sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal.

Análise geral dos resultados obtidos

Tendo previamente demonstrado os resultados procedentes dos cálculos de estrutura eletrônica da interação entre fármaco/receptor, torna-se factível uma análise crítica dos problemas abordados neste trabalho.

O mais notório dos fatos são as diferentes formas de atacar à problemática da inibição de sinal, cuja consequência é a supressão da divisão celular. O diferencial reside quimicamente nas diferentes disposições moleculares de cada fármaco, construídos para inibir o mesmo alvo molecular. Nota-se, neste sentido, a presença do grupo adenina na maioria dos fármacos estudados neste trabalho, apesar de haver uma exceção à regra, que é o fármaco dasatinibe. Esse resultado mostra que nem sempre as moléculas inibidoras devem possuir essencialmente os mesmos grupos químicos que aqueles encontrados no substrato original presente no sítio catalítico, que no caso das proteínas quinases, propicia a evolução dos sinais celulares.

Porém, apesar das substanciais diferenças geométricas entre os inibidores, encontram-se similaridades eletrônicas bastante relevantes. É bastante perceptível a interação para todos os casos estudados dos inibidores com os aminoácidos Cys502, Lys454 e Arg412. A construção dessas moléculas é propositalmente realizada para estabelecer ligações de hidrogênio com esses aminoácidos. Na maioria dos inibidores, com exceção do inibidor tiazole, se encontram grupos COCH_3 , cuja clara função é interagir com os aminoácidos terminais Arg424 e Lys454. Todavia, essa interação não pode

ocorrer de qualquer forma. O anel de adenina, presente em parte dos inibidores, deve estar orientando a fazer uma ligação de hidrogênio com o aminoácido Cys502. Os nitrogênios provenientes do anel de adenina devem estar orientados para o aminoácido Cys502. Mesmo o fármaco dasatinibe, que não possui um anel de adenina, realiza essa ligação obrigatoriamente. Essa interação é feita com o anel pirimidina do fármaco dasatinibe, que deve ter sua orientação privilegiada nesse sentido.

Um olhar sobre o estudo realizado com os inibidores da classe pirrolo-pirimidina pode abrir algumas correlações com os demais resultados obtidos, já que os mesmos possuem descrição de suas atividades biológicas na literatura. Inicialmente percebe-se que a introdução de um grupo COCH_3 próximo ao aminoácido Lys454, torna a inibição da proteína quinase de adesão focal mais efetiva. Essa “correlação” química coloca as demais drogas, excluindo-se a molécula de tiazole, próxima aos inibidores mais potentes da classe pirrolo-pirimidina. Todavia, averigua-se de forma contraditória que a adição de grupos COO , em posições **para** no anel pirimidínico próximo ao aminoácido Lys454 torna a inibição biológica muito ruim para os inibidores da classe pirrolo-pirimidina. No estudo de PCM verificou-se a separação dessas moléculas do demais conjunto, quando são utilizadas variáveis teóricas tais como energia de ligação e número de átomos de haletos. Apesar da baixa linearidade obtida entre IC_{50} e energia de ligação, é plausível pensar que a inibição também está norteadada por um boa “adequação” entre a cavidade catalítica e a geometria do inibidor associada com uma baixa energia de ligação entre os mesmos.

A corroboração dessas interações para os inibidores estudados nem sempre se deu através da medida de distâncias de ligação de hidrogênio. Resultados provenientes de cálculos de orbitais de fronteira e potencial eletrostático respaldaram a interação dos inibidores com os aminoácidos Cys502, Arg424 e Cys502. No caso do fármaco dasatinib, o resultado foi consolidado por cálculos de dinâmica molecular, que mostraram que a ligação com o aminoácido Arg424, antes não realizada na geometria de equilíbrio, pode ser realizada mediante a movimentação do ângulo diedro associado ao grupo hidroxila terminal da molécula.

O aminoácido Asp564 apareceu na interação entre a proteína FAK e os inibidores dasatinibe, sulfonamida e anillino-pirimidina. As demais ligações de hidrogênio são características peculiares de cada inibidor.

Apesar de não ser o foco deste trabalho, a problemática de otimização de sistemas biológicos, via QM/MM se tornou uma árdua tarefa para inibidores que possuem excessivo volume quando comparados ao substrato original e que possuem mudanças severas em seus diedros quando submetidos a determinados tipos de aproximações quânticas. Os métodos quânticos parecem aproximar os átomos desses inibidores de tal forma, que surgem problemas de sobreposição de átomos e conseqüentemente erros nas coordenadas internas. As aproximações utilizadas nesses métodos é o núcleo de entendimento para sanar essas situações problemáticas. Se as interações forem mais repulsivas, os métodos com pior descrição eletrônica dos sistemas moleculares como MNDO e o HF propiciam baixo deslocamento de átomos dentro do sítio catalítico da proteína quinase de adesão focal. De outro modo, o uso de métodos como o funcional de densidade e os métodos semi-empíricos

PM6 e AM1 fazem com que a os inibidores se movimentem exacerbadamente, levando a constantes erros de otimização de geometria.

Conclusões

Neste trabalho foram estabelecidas as principais ligações de hidrogênio nas geometrias de equilíbrio dos inibidores da proteína quinase listado no banco de dados de proteínas, bem como a determinação inédita da interação dessa enzima com o fármaco dasatinib através da técnica de ancoramento molecular seguido de cálculos de estrutura eletrônica com o método ONIOM, bem como de uma curta dinâmica molecular.

Foram encontradas ligações de hidrogênio com os aminoácidos Lys 454, Arg424 e Cys502 para a maioria dos inibidores, indicando a importância desses aminoácidos na construção de novas drogas para o tratamento do câncer. Mesmo com diferentes estruturas moleculares, as moléculas inibidoras da proteína quinase de adesão focal possuem uma similaridade em relação à interação com a proteína quinase de adesão focal. Essa correlação pode ser verificada quando se verificam a disposição dos orbitais de fronteira e o potencial eletrostático, cujos resultados levam a ratificação das interações com os aminoácidos citados. O tamanho do orbital próximo a Cys502 está correlacionado com as atividades de inibição dos inibidores da proteína quinase de adesão focal.

A baixa correlação entre a energia de ligação dos inibidores com os sítios catalíticos e a atividade de inibição das drogas pode estar correlacionada a fatores entrópicos que não são passíveis de descrição com solventes implícitos.

As variáveis obtidas neste trabalho, empregadas para a corroboração das ligações químicas entre os inibidores da proteína quinase, podem ser

utilizadas para a construção de novas drogas inibidoras da proteína quinase de adesão focal.

Os protocolos de otimização de geometria com os métodos estudados neste trabalho podem ser utilizados para sanar problemas relativos ao tratamento de biomoléculas. O método MNDO e HF são particularmente úteis como ponto de partida para a otimização de geometria do complexo inibidor interagindo com a FAK. Porém os resultados obtidos via essas aproximações devem ser corroborados com cálculos mais avançados utilizando o funcional de densidade B3LYP ou o método semi-empírico PM6, que levam em conta mais variáveis eletrônicas para melhor descrição do complexo molecular.

Perspectivas

Na linha das questões em aberto para trabalhos futuros, temos o estudo dinâmico de todos os sistemas inibidores deste trabalho na proteína quinase de adesão focal, no intuito de identificar interações e ligações comuns. Para execução dessa etapa, será necessária a construção de um campo de força individual para cada inibidor estudado. A fim de construir esse campo de força, serão utilizadas as bases de dados do campo de força CHARM, para a definição dos potenciais harmônicos, associados aos cálculos quânticos para a obtenção das cargas e do potencial de van der Waals.

De posse dos resultados dinâmicos, pode-se estimar a energia livre dessas interações, bem como o IC_{50} associado a essas drogas, avaliando-se a potencialidade das drogas na inibição do mecanismo de transdução de sinais.

Como os resultados provenientes dos cálculos de estrutura eletrônica conseguem correlacionar a o tamanho dos orbitais próximos a Cys502 com a atividade da droga, poderia realizar uma mutação nesse aminoácido a fim de verificar se os inibidores atuais estariam adequado a uma possível mutação da proteína quinase de adesão focal.

Bibliografia

- (1) National Institute of Cancer, <http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>. site acessado em 20 de setembro de 2013; Vol. 2013.
- (2) Silverthorn, D. U. *Human Physiology, An integrated approach* 4ed. USA, 2007.
- (3) Elmore, S. *Toxicologic Pathology* 2007, 35, 495.
- (4) Esserman, L. In *Holistic Cancer Support Services* 2013; Vol. 2013.
- (5) Jeremy M Berg, J. L. T., and Lubert Stryer *Biochemistry*; 5 ed., 2002.
- (6) Li, E.; Hristova, K. *Biochemistry* 2006, 45, 6241.
- (7) Schlessinger, J. *Trends in Biochemical Sciences* 1988, 13, 443.
- (8) Manning, G.; Whyte, D. B.; Martinez, R.; Hunter, T.; Sudarsanam, S. *Science* 2002, 298, 1912.
- (9) Engelman, J. A.; Settleman, J. *Current Opinion in Genetics and Development* 2008, 18, 73.
- (10) Chen, H.; Ma, J.; Li, W.; Eliseenkova, A. V.; Xu, C.; Neubert, T. A.; Miller, W. T.; Mohammadi, M. *Molecular Cell* 2007, 27, 717.
- (11) G., G.; Y.L, M.; H., H.; J., B.; K., K.; K., K.; S.S, A.; Stebbing J.; U., K. *Cellular Signalling* 2010, 7, 984.
- (12) William J Slichenmyer; William L Elliott; Fry, D. W. *Seminars in Oncology* 2001, 28, 80.
- (13) Szczylik, C.; Skorski, T.; Nicolaidis, N. C.; Manzella, L.; Malaguarnera, L.; Venturelli, D.; Gewirtz, A. M.; Calabretta, B. *Science* 1991, 253, 562.
- (14) Prenzel, N.; Fischer, O. M.; Streit, S.; Hart, S.; Ullrich, A. *Endocrine-Related Cancer* 2001, 8, 11.
- (15) Lyseng-Williamson, K.; Jarvis, B. *Drugs* 2001, 61, 1765.
- (16) Burgess, M. R.; Skaggs, B. J.; Shah, N. P.; Lee, F. Y.; Sawyers, C. L. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007, 102, 3395.

- (17) Schlaepfer, D. D.; Hanks, S. K.; Hunter, T.; Vandergeer, P. *Nature* 1994, 372, 786.
- (18) Fox GL; Rebay I; RO., H. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, 26, 14978.
- (19) Girault, J. A.; Labesse, G.; Mornon, J. P.; Callebaut, I. *Trends in Biochemical Sciences* 1999, 24, 54.
- (20) Schaller, M. D.; Otey, C. A.; Hildebrand, J. D.; Parsons, J. T. *Journal of Cell Biology* 1995, 130, 1181.
- (21) Calderwood, D. A.; Yan, B. X.; de Pereda, J. M.; Alvarez, B. G.; Fujioka, Y.; Liddington, R. C.; Ginsberg, M. H. *Journal of Biological Chemistry* 2002, 277, 21749.
- (22) Guo, W.; Giancotti, F. G. *Nature Review* 2004, 5, 816.
- (23) Ilc, D.; Furuta, Y.; Kanazawa, S.; Takeda, N.; Sobue, K.; Nakatsuji, N.; Nomura, S.; Fujimoto, J.; Okada, M.; Yamamoto, T.; Aizawa, S. *Nature* 1995, 377, 539.
- (24) Mitra, S. K.; Hanson, D. A.; Schlaepfer, D. D. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005, 6, 56.
- (25) McLean, G. W.; Carragher, N. O.; Avizienyte, E.; Evans, J.; Brunton, V. G.; Frame, M. C. *Nature Reviews Cancer* 2005, 5, 505.
- (26) Owens, L. V.; Xu, L. H.; Dent, G. A.; Yang, X. H.; Sturge, G. C.; Craven, R. J.; Cance, W. G. *Annals of Surgical Oncology* 1996, 3, 100.
- (27) Cance, W. G.; Harris, J. E.; Iacocca, M. V.; Roche, E.; Yang, X. H.; Chang, J. L.; Simkins, S.; Xu, L. H. *Clinical Cancer Research* 2000, 6, 2417.
- (28) Judson, P. L.; He, X. P.; Cance, W. G.; Van Le, L. *Cancer* 1999, 86, 1551.
- (29) Recher, C.; Ysebaert, L.; Beyne-Rauzy, O.; Mas, W. M. D.; Ruidavets, J. B.; Cariven, P.; Demur, C.; Payrastre, B.; Laurent, G.; Rocaud-Sultan, C. *Cancer Research* 2004, 64, 3191.
- (30) Tremblay, L.; Hauck, W.; Aprikian, A. G.; Begin, L. R.; Chapdelaine, A.; Chevalier, S. *International Journal of Cancer* 1996, 68, 164.
- (31) McLean, G. W.; Komiyama, N. H.; Serrels, B.; Asano, H.; Reynolds, L.; Conti, F.; Hodivala-Dilke, K.; Metzger, D.; Chambon, P.; Grant, S. G. N.; Frame, M. C. *Genes & Development* 2004, 18, 2998.
- (32) Johnson, L. N.; Noble, M. E. M.; Owen, D. J. *Cell* 1996, 85, 149.

- (33) Hunter, T. *Journal of Clinical Investigation* 2007, 117, 2036.
- (34) Rusnak, D. W.; Lackey, K.; Affleck, K.; Wood, E. R.; Alligood, K. J.; Rhodes, N.; Keith, B. R.; Murray, D. M.; Knight, W. B.; Mullin, R. J.; Gilmer, T. M. *Molecular Cancer Therapeutics* 2001, 1, 85.
- (35) Thomas, S. M.; Grandis, J. R. *Cancer Treatment Reviews* 2004, 30, 255.
- (36) Weisberg, E.; Manley, P.; Mestan, J.; Cowan-Jacob, S.; Ray, A.; Griffin, J. D. *British Journal of Cancer* 2006, 94, 1765.
- (37) Shah, N. P.; Tran, C.; Lee, F. Y.; Chen, P.; Norris, D.; Sawyers, C. L. *Science* 2004, 305, 399.
- (38) Pao, W.; Miller, V. A.; Politi, K. A.; Riely, G. J.; Somwar, R.; Zakowski, M. F.; Kris, M. G.; Varmus, H. *Plos Medicine* 2005, 2, 225.
- (39) Huse, M.; Kuriyan, J. *Cell* 2002, 109, 275.
- (40) Knight, Z. A.; Shokat, K. M. *Chemistry & Biology* 2005, 12, 621.
- (41) Kufareva, I.; Abagyan, R. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008, 51, 7921.
- (42) Zellweger, T.; Miyake, H.; Cooper, S.; Chi, K.; Conklin, B. S.; Monia, B. P.; Gleave, M. E. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2001, 298, 934.
- (43) L.J, L.; F.Y, L.; P., C.; D., N.; J.C, B.; K., B.; S., C.; L.A, C.; A.M, D. J. D.; C., F.; J.T, H.; I., I.; K., J.; A., K.; D., K.; H., K.; P., M.; S., P.; R., P.; S., P.; G.L, S.; R.J, S.; J., T.; M.L, W.; J., W.; R.M., B. *Journal of Medicinal Chemistry* 2004, 27, 6658.
- (44) Cheng Yung-Chi; Prusoff, W. H. *Biochemistry Pharmacology*, 22, 3099.
- (45) Bohm, H. J. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 1994, 8, 243.
- (46) Roberts WG; Ung E; Whalen P; Cooper B; C, H. *Cancer Research* 2008, 68, 1935.
- (47) Roberts WG; Ung E; Whalen P; Cooper B; Hulford C; Autry C; Richter D; Emerson E; Lin J; Kath J; Coleman K; Yao L; Martinez-Alsina L; Lorenzen M; Berliner M; Luzzio M; Patel N; Schmitt E; Lagreca S; Jani J; Wessel M; Marr E; Griffor M; F, V. *Cancer Research* 2008, 68, 1935.
- (48) Bhat, U. G.; Zipfel, P. A.; Tyler, D. S.; Gartel, A. L. *Cell Cycle* 2008, 7, 1851.

- (49) Lengauer, T.; Rarey, M. *Current Opinion in Structural Biology* 1996, 6, 402.
- (50) Levine, I. N. *Quantum Chemistry*; 4 ed. New Jersey, 1991.
- (51) Schrödinger, E. *Annalen der Physik* 1926, 80, 437.
- (52) Lieb, E. H. *International Journal of Quantum Chemistry* 1983, 24, 243.
- (53) Perdew, J. P.; Burke, K.; Wang, Y. *Physical Review B* 1996, 54, 16533.
- (54) Stewart, J. J. P. *Journal of Molecular Modeling* 2007, 13, 1173.
- (55) Kleier, D. A.; Halgren, T. A.; Hall, J. H.; Lipscomb, W. N. *Journal of Chemical Physics* 1974, 61, 3905.
- (56) Currie, J. O.; Dupray, L. M.; Gombar, V. K.; Muthyala, R.; Richards, N. G. J.; Robinson, P. J.; Stewart, D. J. J. P. São Francisco, 2013.
- (57) Cornell, W. D.; Cieplak, P.; Bayly, C. I.; Gould, I. R.; Merz, K. M.; Ferguson, D. M.; Spellmeyer, D. C.; Fox, T.; Caldwell, J. W.; Kollman, P. A. *Journal of the American Chemical Society* 1996, 118, 2309.
- (58) Møller, C.; Plesset, M. S. *Physical Review* 1934, 46, 618.
- (59) Roux, B.; Simonson, T. *Biophysical Chemistry* 1999, 78, 1.
- (60) Roux, B.; Simonso, T. *Biophysical Chemistry* 1999, 78, 1.
- (61) Klamt, A.; Schuurmann, G. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 2* 1993, 799.
- (62) Svensson, M.; Humbel, S.; Froese, R. D. J.; Matsubara, T.; Sieber, S.; Morokuma, K. *Journal of Physical Chemistry* 1996, 100, 19357.
- (63) Dapprich, S.; Komaromi, I.; Byun, K. S.; Morokuma, K.; Frisch, M. J. *Journal of Molecular Structure-Theochem* 1999, 461, 1.
- (64) Hansson, T.; Oostenbrink, C.; van Gunsteren, W. F. *Current Opinion in Structural Biology* 2002, 12, 190.
- (65) Alonso, H.; Bliznyuk, A. A.; Gready, J. E. *Medicinal Research Reviews* 2006, 26, 531.
- (66) Karplus, M.; McCammon, J. A. *Nature Structural Biology* 2002, 9, 646.
- (67) Norberg, J.; Nilsson, L. *Quarterly Reviews of Biophysics* 2003, 36, 257.

- (68) Adcock, S. A.; McCammon, J. A. *Chemical Reviews* 2006, 106, 1589.
- (69) Rognan, D. *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1998, 9-11, 181.
- (70) M. P. Allen; Tildesley, D. J. *Computer Simulation of Liquids* New York, 1989.
- (71) Scheraga, H. A.; Khalili, M.; Liwo, A. In *Annual Review of Physical Chemistry* 2007; Vol. 58, p 57.
- (72) Verlet, L. *Physical Review* 1967, 159, 98.
- (73) Taylor, R. D.; Jewsbury, P. J.; Essex, J. W. *Journal of Computer-Aided Molecular Design* 2002, 16, 151.
- (74) Choi, H. S.; Wang, Z. C.; Richmond, W.; He, X. H.; Yang, K. Y.; Jiang, T.; Sim, T. B.; Karanewsky, D.; Gu, X. J.; Zhou, V.; Liu, Y.; Ohmori, O.; Caldwell, J.; Gray, N.; He, Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006, 16, 2173.
- (75) Choi, H. S.; Wang, Z. C.; Richmond, W.; He, X. H.; Yanga, K. Y.; Jiang, T.; Karanewsky, D.; Gu, X. J.; Zhou, V.; Liu, Y.; Che, J. W.; Lee, C. C.; Caldwell, J.; Kanazawa, T.; Umemura, I.; Matsuura, N.; Ohmori, O.; Honda, T.; Gray, N.; He, Y. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006, 16, 2689.
- (76) M. J. F.; G. W. Trucks; H. B. Schlegel, G.; . E. Scuseria; M. A. Robb; J. R. Cheeseman; G. Scalmani; V. Barone; B. Mennucci; Petersson, G. A.; , H. N.; M. Caricato; X. Li, H. P. H.; A. F. Izmaylov; J. Bloino, G. Z.; J. L. Sonnenberg; M. Hada, M. E.; K. Toyota; R. Fukuda; J. Hasegawa; M. Ishida, T. N.; Y. Honda, O. K.; H. Nakai, T. V.; J. A. Montgomery; Jr., J. E. P.; F. Ogliaro; M. Bearpark; J. J. Heyd; E. Brothers; K. N. Kudin; V. N. Staroverov; R. Kobayashi; J. Normand; K. Raghavachari; A. Rendell; J. C. Burant; S. S. Iyengar; J. Tomasi; M. Cossi; N. Rega; J. M. Millam; M. Klene; J. E. Knox; J. B. Cross; V. Bakken; C. Adamo; J. Jaramillo; R. Gomperts; R. E. Stratmann; O. Yazyev; A. J. Austin; R. Cammi; C. Pomelli; J. W. Ochterski; R. L. Martin; K. Morokuma; V. G. Zakrzewski; G. A. Voth; P. Salvador; J. J. Dannenberg; S. Dapprich; A. D. Daniels; Ö.Farkas; J. B. Foresman; J. V. Ortiz; J. Cioslowski; D. J. Fox Wallingford CT, 2009.
- (77) Anderson, C. B.; Barocas, D. A. *Journal of Urology*, 187, 1637.
- (78) O. Trott, A.; Olson, J. *Journal of Computational Chemistry* 2010, 31, 455.
- (79) J. Tomasi, B.; Mennucci; Cancè's, E. *Journal of Molecular Structure (Theochem)* 1999, 464, 211.
- (80) Lietha, D.; Eck, M. J. *Plos One* 2008, 3.

(81) <http://www.pdb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2IJM>.
. site acessado em 13 de agosto de 2013.

(82) Roberts, W. G.; Ung, E.; Whalen, P.; Cooper, B.; Hulford, C.; Autry, C.; Richter, D.; Emerson, E.; Lin, J.; Kath, J.; Coleman, K.; Yao, L.; Martinez-Alsina, L.; Lorenzen, M.; Berliner, M.; Luzzio, M.; Patel, N.; Schmitt, E.; LaGreca, S.; Jani, J.; Wessel, M.; Marr, E.; Griffor, M.; Vajdos, F. *Cancer Research* 2008, 68, 1935.

(83) Barra de Oliveira, D. A.; de Oliveira Neto, M.; Martins, J. B. L. *International Journal of Quantum Chemistry*, 112, 2324.

(84) de Courcy, B.; Piquemal, J.-P.; Garbay, C.; Gresh, N. *Journal of the American Chemical Society*, 132, 3312.