



UnB

Instituto de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**Estudo de estrutura eletrônica e *docking* da
BCR-ABL na forma mutada T315I na
conformação DFG-out com inibidores clássicos**

Doutorando: Washington De Almeida Pereira

Orientador: Prof. Dr. João Batista Lopes Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Érica Cristina Moreno Nascimento

Brasília

01/11/2021

Instituto de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

TESE DE DOUTORADO

**Estudo de estrutura eletrônica e *docking* da BCR-ABL na
forma mutada T315I na conformação DFG-out com
inibidores clássicos**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Química.

Doutorando: Washington De Almeida Pereira

Orientador: Prof. Dr. João Batista Lopes Martins

Coorientadora: Profa. Dra. Érica Cristina Moreno Nascimento

Brasília
01/11/2021

Agradecimentos

- Em primeiro lugar agradeço Deus por tudo.
- Agradeço minha família pelo incentivo. A minha esposa por seu incentivo e companheirismos.
- Em especial ao meu orientador, Professor Dr. João Batista Lopes Martins, uma das mentes mais privilegiadas que tive oportunidade de conhecer. Muito obrigado pela confiança, pela excelente orientação, disponibilidade, paciência e competência, sem a qual esse trabalho não seria possível. Posso afirmar que ao longo desses anos aprendi muito. Minha gratidão!
- A minha coorientadora, Professora Dra. Érica Cristina Moreno Nascimento, meus sinceros agradecimentos pelos, ensinamentos, paciência, comprometimento, competência e incentivos, estes foram fundamentais para o resultado deste trabalho.
- Agradeço ao professor. Dr José Roberto dos Santos Politi, pelos ensinamentos ao longo desse anos de LQC, Pelas discussões proveitosas químicas e futebolísticas.
- Agradeço a todos que fazem parte do LQC.
- Agradeço ao Rogério Costa, Gustavo Olimpo, Edina, pelas inestimáveis contribuições.
- Agradeço aos servidores do Instituto de Química -UnB, em especial secretaria da PPGQ-UnB e a senhora Déborah Simões.
- Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a elaboração deste trabalho.
- Por fim, agradeço ao FAPDF pela bolsa concedida, ao Programa de Pós-Graduação em Química e ao Instituto de Química pelo suporte acadêmico no desenvolvimento de minhas atividades

Escolhe um trabalho de que gostes, e não terás que trabalhar nem um dia na tua vida.
(Confúcio)

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Revisão Bibliográfica	3
1.1.1	Proteínas Quínases	3
1.1.1.1	ATP	6
1.1.2	Conformações DFG-in e DFG-out	8
1.1.2.1	Estado de protonação de resíduos no sítio ativo	9
1.2	LMC, Visão Geral	10
1.2.1	Cromossomo Philadelphia	11
1.2.1.1	Mecanismo de transdução de sinais	12
1.2.1.2	Tratamento	12
1.3	Inibidores Tirosina Quínase - modo de atuação	13
1.4	Principais inibidores de tirosina quínase BCR-ABL	15
1.4.1	Imatinibe	15
1.4.2	Mutações	17
1.4.3	Dasatinibe	17
1.4.4	Uso de Flúor em Fármacos	19
1.4.5	Nilotinibe	20
1.4.6	Ponatinibe	22
1.5	Modelagem Molecular de Fármacos	24
1.6	Objetivos	26
1.6.1	Objetivos Específicos:	26
2	METODOLOGIA	27
2.1	Equação Schrödinger	27
2.1.1	Aproximação de Born-Oppenheimer	28
2.1.2	Método Hartree-Fock	29
2.1.3	Teoria do Funcional da Densidade	29
2.1.3.1	Aproximações de densidade local (LDA)	31
2.1.3.2	Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA)	31
2.1.3.3	Funções de Base	32
2.1.4	Métodos Semiempíricos	33
2.1.5	Campo de Força	34
2.1.6	NBO	36
2.1.7	Métodos QM/MM e ONIOM	37
2.1.8	<i>Docking</i> Molecular	39

2.1.9	Principais interações moleculares	40
2.1.10	Mapa de potencial eletrostático (MEP)	41
2.2	Análise de Componente Principal (PCA)	42
2.2.1	<i>Heatmap</i>	42
2.3	Procedimentos Computacionais	43
2.3.1	Preparo da proteína para o <i>Docking</i> molecular	43
2.3.2	Preparo dos inibidores	43
2.3.3	<i>Docking</i>	44
2.4	Estudo Eletrônico	44
2.5	Estudo de Análise de Componente Principal (PCA) e <i>HeatMap</i> . .	45
2.5.1	PCA	45
2.5.2	<i>HeatMap</i>	45
2.6	Estudo-ONIOM	45
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1	Aspectos gerais do sítio de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL em função da ancoragem molecular	48
3.1.1	Proteína tirosina quinase BCR-ABL Selvagem (1OPJ)	49
3.1.2	<i>Docking</i> da proteína selvagem 1OPJ com os inibidores clássicos	49
3.1.3	<i>Docking</i> da proteína selvagem 1OPJ com moléculas dos inibidores modificados niloH, niloCl, pontH e pontCl	53
3.1.3.1	<i>Scores</i>	54
3.1.3.2	Interações com a proteína 1OPJ	54
3.2	Tirosina quinase BCR-ABL com a mutação T315I interagindo com os inibidores clássicos	56
3.2.1	<i>Docking</i> da molécula imatinibe com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out	57
3.2.2	<i>Docking</i> da molécula dasatinibe com a proteína mutada T315I e com proteína selvagem na conformação DFG-in	58
3.2.3	<i>Docking</i> da molécula nilotinibe com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out	60
3.2.3.1	Influência dos anéis substituídos no aumento das interações π	61
3.2.3.2	<i>Docking</i> da molécula niloH com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out	62
3.2.3.3	<i>Docking</i> da molécula niloCl com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out	63
3.2.4	<i>Docking</i> da molécula ponatinibe com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out	65
3.2.4.1	<i>Docking</i> da molécula pontH com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out	66
3.2.4.2	<i>Docking</i> da molécula pontCl com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out	67
3.3	Orbitais de Fronteira	68

3.4	Orbitais de fronteira da molécula de imatinibe, protonada e sem protonação.	70
3.4.1	Análise de Componentes Principais	73
3.5	Orbitais de fronteira da molécula de dasatinibe	74
3.6	Orbitais de fronteira da molécula do nilotinibe	77
3.6.0.1	Orbitais de fronteira da molécula de niloH	79
3.6.0.2	Orbitais de fronteira da molécula de niloCl	82
3.7	Orbitais de fronteira da molécula de ponatinibe	83
3.7.1	Orbitais de fronteira da molécula do pontH ⁺	87
3.7.2	Orbitais de fronteira da molécula de pontCl ⁺	89
3.8	Considerações dos Orbitais de Fronteira	91
3.9	Orbital natural de ligação, Mapa de potencial eletrostático e Cargas atômicas	93
3.9.1	Imatinibe: NBO, MEP e cargas atômicas	94
3.9.2	Dasatinibe: NBO, MEP e cargas atômicas	96
3.9.3	Nilotinibe: NBO, MEP e cargas atômicas	98
3.9.3.1	NiloH: NBO, MEP e cargas atômicas	100
3.9.3.2	NiloCl: NBO, MEP e cargas atômicas	102
3.9.4	Ponatinibe: NBO, MEP e cargas atômicas	103
3.9.4.1	PontH: NBO, MEP e cargas atômicas	105
3.9.4.2	PontCl: NBO, MEP e cargas atômicas	106
3.9.5	Cargas atômicas (ChelpG)	109
3.10	Descritores dos inibidores clássicos	110
3.11	Considerações Gerais do Capítulo	113
3.12	ONIOM	114
3.12.1	Sítio ativo	116
3.12.2	Energias dos complexos com imatinibe ⁺ e ponatinibe ⁺	118
3.12.3	Cargas Atômicas dos resíduos do sítio ativo Asp381e Ile315	119
4	PERFIL ELETRÔNICO MOLECULAR DOS INIBIDORES TIROSINA QUÍNASE BCR-ABL MUTADA T315I	120
4.1	Sítio de ligação e as características estruturais dos inibidores	120
4.2	Importância da interação resíduos Asp381, Glu316, Glu286 com o orbital HOMO	120
4.3	Importância da interação com os resíduos Leu370, Leu248, Tyr253 e o orbital LUMO	121
4.4	Importância da interação com os resíduos Ile293, Leu298, Val379 Val299	121
4.4.1	Grupos funcionais	121
4.5	Visão geral do perfil de um provável bom candidato a inibidor	121

5	CONCLUSÕES	123
	REFERÊNCIAS	125
A	ANEXOS	141
A.1	Cargas atômicas ChelpG	141

Lista de ilustrações

Figura 1 – Ciclo de ativação da cascata quinase.	4
Figura 2 – Estrutura da proteína tirosina quinase.	5
Figura 3 – Estrutura da molécula de ATP.	6
Figura 4 – Interações feita pela molécula de ATP com principais regiões da tirosina quinase.	7
Figura 5 – Conformações do sítio da proteína tirosina quinase BCR-ABL, em (A) Conformação DFG-in. (B) Conformação DFG-out, adaptada de Ávila et.al.	8
Figura 6 – Sintomas mais comuns do surgimento da Leucemia mieloíde crônica no corpo humano.	10
Figura 7 – Translocação dos cromossomos 9 e 22 formando o cromossomo Philadelphia.	11
Figura 8 – A tirosina quinase ABL e as duas isoformas das proteína resultantes da fusão BCR-ABL, p210 e p190. A isoforma p210 é mais longa que p190.	12
Figura 9 – Linha do tempo aproximada que ilustra os marcos no desenvolvimento de inibidores da tirosina quinase BCR-ABL.	13
Figura 10 – Fenda catalítica da proteína tirosina quinase BCR-ABL, DFG-out	14
Figura 11 – Fórmula estrutural da molécula de imatinibe.	16
Figura 12 – Grupo metilpiperazina ligado ao fragmento da molécula de imatinibe, nos círculos em vermelho, possíveis locais de protonação.	16
Figura 13 – Em vermelho os pontos de possíveis mutações da proteína tirosina quinase BCR-ABL.	18
Figura 14 – Formula estrutural da molécula do dasatinibe.	19
Figura 15 – Fórmulas estruturais: fludrocortisona e fluorouracil.	20
Figura 16 – Fórmula estrutural da molécula de nilotinibe.	21
Figura 17 – Fórmula estrutural da molécula de ponatinibe.	22
Figura 18 – Estrutura do fármaco captopril.	24
Figura 19 – Princípio de QM / MM. (A) Uma abordagem típica de QM/MM divide o sistema estudado em um núcleo de QM e um MM circundante. (B) A parte tratada com MM é mostrado na representação de linha, o núcleo QM é destacado por sticks.	38
Figura 20 – Esquema da técnica de <i>docking</i> molecular.	40
Figura 21 – Esquema geral dos cortes gerados para estudo do ONIOM, no sentido horizontal crescendo apenas a camada alta, sentido vertical crescendo apenas a camada baixa.	47

Figura 22 – Bolso de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL na conformação DFG-out. No meio, a molécula de imatinibe cobrindo toda extensão do sítio de ligação, e os principais resíduos com os quais o imatinibe está interagindo.	48
Figura 23 – Alinhamento global da sequência das proteínas 3QRJ, 1OPJ e 3IK3. A presença do asterisco debaixo dos resíduos mostra que este resíduo é conservado nas três cadeias. A ausência deste asterisco, mostra que o resíduo não está presente em uma ou mais cadeias de aminoácidos. O traço mostra que aquela cadeia terminou antes da outra ou começou depois da outra. O retângulo preto mostra a mutação na posição 315, o resíduo isoleucina, que na selvagem é a treonina.	50
Figura 24 – Estruturas mais estáveis dos inibidores clássicos com a proteína selvagem 1OPJ. São apresentados o tipo de interação, quais átomos do inibidor está interagindo com qual resíduo e a distância de interação.	52
Figura 25 – As molécula modificadas de ponatinibe e nilotinibe e o grupo molecular responsável pela modificações em destaque no centro da figura. Na primeira linha nilotinibe, niloH e niloCl, na última linha ponatinibe, pontH e pontCl.	53
Figura 26 – As moléculas modificadas de ponatinibe e nilotinibe e grupo molecular responsável pelas modificações em destaque no centro da figura. Na primeira, linha nilotinibe, niloH e niloCl, na última linha ponatinibe, pontH e pontCl.	55
Figura 27 – Pose do <i>docking</i> com proteína BCR-ABL selvagem DFG-out 1OPJ e com mutação T315I, 3IK3, ambas ancoradas como a molécula do fármaco imatinibe.	57
Figura 28 – Em (A), pose do <i>docking</i> da molécula do fármaco dasatinibe com proteína tirosina quinase BCR-ABL DFG-out 3IK3, com mutação T315I. Em (B), pose do <i>docking</i> da molécula do fármaco dasatinibe com a proteína tirosina quinase BCR-ABL selvagem DFG-in 2GQG(código PDB).	58
Figura 29 – Em (A), bolso de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL DFG-out com a molécula dasatinibe. Em (B), bolso de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL DFG-in com a molécula dasatinibe.	59
Figura 30 – Estrutura do <i>docking</i> da proteína BCR-ABL mutada T315I conformação DFG-out 3IK3 (código PDB) com a molécula do fármaco nilotinibe.	60
Figura 31 – Fórmula estrutural das molécula do imatinibe e nilotinibe.	61
Figura 32 – Em (A), anel substituído com metil (niloH) e em (B), anel com trifluorometil (nilotinibe), ambos fazendo interação de natureza π	62

Figura 33 – Docking da proteína BCR-ABL mutada T315I conformação DFG-out 3IK3 (código PDB), com a molécula modificada do fármaco nilotinibe: trifluormetil por metil.	63
Figura 34 – <i>Docking</i> da proteína BCR-ABL mutada T315I conformação DFG-out 3IK3 (código PDB), com a molécula modificada fármaco nilotinibe, modificação: trifluormetil por triclorometil.	63
Figura 35 – Pose do <i>docking</i> da proteína BCR-ABL mutada T315I, conformação DFG-out 3IK3(código PDB), com a molécula do fármaco ponatinibe.	65
Figura 36 – <i>Docking</i> da proteína BCR-ABL mutada T315I, conformação DFG-out 3IK3 (código PDB), com a molécula modificada do fármaco ponatinibe, modificação: trifluormetil por metil (pontH).	66
Figura 37 – Comparativo das interações metil e trifluorometil no ponatinibe.	67
Figura 38 – Interações do sítio ativo da proteína BCR-ABL mutada T315I conformação DFG-out 3IK3 (código PDB), com a molécula modificada do ponatinibe: trifluorometil por triclorometil.	67
Figura 39 – Orbitais ocupados da molécula de imatinibe desprotonada (B) e protonada em (A), usando o método B3LYP/6-311+G(d,p).	70
Figura 40 – Orbitais desocupados da molécula de imatinibe desprotonada (B) e protonada em (A). Cálculos com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	72
Figura 41 – Análise PCA dos orbitais HOMO até HOMO-14 e LUMO até LUMO+14 para moléculas protonadas e desprotonadas.	73
Figura 42 – Análise PCA dos orbitais HOMO até HOMO-14 e LUMO até LUMO+14, para moléculas protonadas.	74
Figura 43 – Orbitais HOMO a HOMO-3 da molécula dasatinibe. Cálculos com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	74
Figura 44 – Orbitais LUMO, LUMO+1, LUMO+2 e LUMO+3 da molécula de dasatinibe. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	75
Figura 45 – Interações feitas pelo grupo tiazol presente no dasatinibe como as proteínas IOPJ, 2GQG e 3IK3.	76
Figura 46 – PCA da energias entre o orbital HOMO e o LUMO+n (n=1-14,) para todas moléculas protonadas e não protonadas.	76
Figura 47 – Orbitais HOMO da molécula de nilotinibe. (A) HOMO, (B) HOMO-1, (C) HOMO-2, (D) HOMO-3. Os cálculos foram realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	77
Figura 48 – Grupo metilimidazol circulado em preto, no círculo vermelho piridina-pirimidina da molécula de nilotinibe em (A) ancorado com proteína mutada 3IK3 em (B) ancorado com a proteína selvagem IOPJ.	78

Figura 49 – Orbitais LUMO da molécula de nilotinibe. (A) LUMO, (B) LUMO+1, (C) LUMO+2, (D) LUMO+3. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	78
Figura 50 – Gráfico de PCA, orbitais ocupados das moléculas desprotonadas.	79
Figura 51 – Orbitais ocupados para a molécula de niloH. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	80
Figura 52 – Orbitais desocupados da molécula de niloH. Os cálculos foram realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	81
Figura 53 – PCA: Energia dos orbitais LUMOs das moléculas desprotonadas.	81
Figura 54 – Orbitais ocupados da molécula de niloCl. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	82
Figura 55 – Orbitais desocupados da molécula de niloCl. Os cálculos foram realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	83
Figura 56 – Orbitais HOMO a HOMO-3 da molécula de ponatinibe, desprotonado à esquerda e protonado à direita. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	84
Figura 57 – Orbitais LUMO da molécula de ponatinibe, desprotonado à esquerda e protonado à direita, orbitais LUMO a LUMO+3. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	85
Figura 58 – Interações entre a molécula de ponatinibe+ com a proteína 3IK3.	86
Figura 59 – PCA: Energias dos orbitais LUMOs 0 a 14 para moléculas protonadas e desprotonadas.	86
Figura 60 – Fragmentos da molécula de ponatinibe encontrados em outros inibidores. Em verde, presente em todos. Em azul, presente no imatinibe; em preto, presente no nilotinibe.	87
Figura 61 – Orbitais HOMO da molécula de pontH+. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	87
Figura 62 – Orbitais LUMO da molécula de pontH+. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	88
Figura 63 – Orbitais HOMO da molécula de pontCl+. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	89
Figura 64 – Orbitais LUMO da molécula de pontCl. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).	89
Figura 65 – Molécula de imatinibe. E(2)(NBO) Círculos azuis doadores e em vermelhos receptores. No MEP, em azul baixa densidade, e em vermelho alta eletrônica.	94
Figura 66 – Cargas em ChelpG da molécula de imatinibe.	95

Figura 67 – Molécula de dasatinibe. E(2)(NBO) com círculos azuis doadores e em vermelhos receptores. No MEP, região azul indica baixa densidade eletrônica e região vermelha alta eletrônica.	97
Figura 68 – Cargas em ChelpG da molécula de dasatinibe.	98
Figura 69 – Molécula de nilotinibe. E(2)(NBO), os átomos em destaque mostram as 5 maiores transferências de carga. No (MEP) a região em azul indica baixa densidade, enquanto a região vermelha indica alta densidade eletrônica	99
Figura 70 – Cargas ChelpG da molécula de nilotinibe, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.	100
Figura 71 – Molécula de niloH. E(2)(NBO), os átomos em destaque mostra 5 maiores transferências cargas. No MEP a região em azul indica baixa densidade eletrônica e a região em vermelho indica alta eletrônica.	101
Figura 72 – Cargas em ChelpG da molécula de niloH. Átomos do grupo amida circulos em vermelho.	101
Figura 73 – E(2)(NBO), os átomos em destaque mostra as 5 maiores transferências cargas. (MEP), em Azul baixa densidade, em vermelho alta eletrônica, para molécula de niloCl.	103
Figura 74 – Cargas em ChelpG da molécula de niloCl, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.	103
Figura 75 – Molécula de ponatinibe. E(2)(NBO), os átomos em destaque mostram as 5 maiores transferências de cargas. No MEP, a região em azul indica baixa densidade eletrônica e em vermelho indica alta densidade eletrônica.	105
Figura 76 – Cargas em ChelpG da molécula de ponatinibe, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.	105
Figura 77 – Molécula de pontH. NBO E(2), os átomos em destaque mostram as 5 maiores transferências de carga. No MEP, a região em azul indica baixa densidade eletrônica e em vermelho indica alta densidade eletrônica.	106
Figura 78 – Cargas em ChelpG da molécula de pontH, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.	107
Figura 79 – Molécula de pontCl. NBO E(2), os átomos em destaque mostram 5 maiores transferências de carga. No MEP, a região em azul indica baixa densidade eletrônica e em vermelho indica alta densidade eletrônica	108
Figura 80 – Cargas ChelpG da molécula de pontCl, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.	108
Figura 81 – Correlação entre as cargas ChelpG das moléculas substituídas e não substituídas.	109
Figura 82 – Análise componente principal dos descritores eletrônicos das moléculas dos inibidores modificados e sem modificações.	111

Figura 83 – Mapa de calor, usando os valores dos descritores, das moléculas modificadas e sem modificações.	112
Figura 84 – Esquema geral corte gerados para estudo do ONIOM, no sentido horizontal crescendo apenas a camada alta, sentido vertical crescendo apenas a camada baixa (Figura descrita no capítulo de materiais e métodos).	114
Figura 85 – Apresenta os passos, partindo do passo 3, no nível 0, com 15 resíduos indo até passo 10 no nível 3, com 88 resíduos. A cor azul corresponde a quantidade de resíduos total de resíduos, em vermelho quantidade em camada alta, em verde os resíduos em camada baixa.	115
Figura 86 – Diferença de energias entre os passos com nível 1 e 2, para os inibidores: imatinibe e ponatinibe, unidade de energias expressa em kcal.mol ⁻¹ . . .	116
Figura 87 – Energias dos complexos enzima-inibidor, a proteína com a sequência completa e inibidores: em azul a molécula de imatinibe+ e em roxo a molécula de ponatinibe+. Cálculos com método ONIOM, na camada alta o método semiempírico e camada baixa o campo de força AMBER. Energias expressas em kcal.mol ⁻¹	117
Figura 88 – Energias ONIOM (B3LYP/PM6) para os passos de 3 até passo 10 em sequência toda a proteína representada por	118
Figura 89 – Cargas de Mulliken para resíduos a esquerda Ile315 e a direita Asp381. Proteína sem a presença do inibidor, cortes começando no passo 3, progressivo até o passo 10 e a proteína completa. Camada alta B3LYP/6-311-G e camada baixa PM6.	119
Figura 90 – Visão geral do perfil eletrônico com os principais resíduos de interações.	122

Lista de tabelas

Tabela 1	– Inibidores aprovados pela agencia FDA (<i>do inglês Food and Drug Administration</i>) dos EUA para RTKs (receptor tyrosine kinase) no uso em terapia de câncer, fonte: (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).	14
Tabela 2	– <i>Score</i> do <i>Docking</i> dos fármacos: imatinibe, dasatinibe, nilotinibe e ponatinibe com a proteína selvagem (1OPJ) DFG-out. Valores expressos em kcal.mol ⁻¹ e Å.	50
Tabela 3	– <i>Score</i> da proteína selvagem 1OPJ das moléculas modificadas niloH, niloCl, pontH e pontCl. Valores de <i>score</i> e RMSD expressos em kcal.mol ⁻¹ e Å, respectivamente.	54
Tabela 4	– <i>Docking</i> de fármacos: <i>score</i> do imatinibe, dasatinibe, nilotinibe, ponatinibe com proteína selvagem e mutada (T315I), energia em kcal.mol ⁻¹ . Os valores da 1OPJ, presentes na Tabela 2 , são reproduzidos nesta tabela.	56
Tabela 5	– Interações entre a proteína tirosina quinase BCR-ABL com a mutação T315I e a molécula do fármaco dasatinibe. Distâncias expressas em Å.	60
Tabela 6	– Valores das energias dos orbitais moleculares HOMO até HOMO-4, energias em eV. Funcional B3LYP na função de base 6-311+G(d,p).	68
Tabela 7	– Valores das energia dos orbitais moleculares LUMO até LUMO+4, energias em eV. Funcional B3LYP, com a função de base 6-311+G(d,p).	69
Tabela 8	– Energia de segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol ⁻¹ . Cálculos para molécula de imatinibe realizados com funcional B3LYP e função de base 6-311+G(d,p).	94
Tabela 9	– Carga ChelpG do grupo amida e do carbono do anel ligado a amida. A numeração segue a dos átomos do imatinibe (Figura 66).	96
Tabela 10	– Energia segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol ⁻¹ , no nível B3LYP/6-311+G(d,p) para a molécula de dasatinibe.	96
Tabela 11	– Energia segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol ⁻¹ , no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de nilotinibe.	98
Tabela 12	– Energia segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol ⁻¹ , no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de niloH.	100
Tabela 13	– Energia segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol ⁻¹ , no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de niloCl.	102
Tabela 14	– Energia segunda ordem, NBO E(2) em kcal.mol ⁻¹ , no nível B3LYP/6-311+G(d,p) para molécula de ponatinibe.	104
Tabela 15	– Energia de segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol ⁻¹ , no nível B3LYP/6-311+G(d,p) para a molécula de pontH.	106

Tabela 16 – Energia segunda ordem NBO $E(2)/\text{kcal.mol}^{-1}$, no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de pontCl.	107
Tabela 17 – Descritores das moléculas do inibidores clássicos, fonte: Drugbank(WISHART et al., 2017)	110
Tabela 18 – Tabela dos valores de descritores gerais: 1-imatinibe, 2-dasatinibe, 3-nilotinibe, 4-niloH, 5-niloCl, 6-ponatinibe, 7-pontCl, 8-pontH.	110
Tabela 19 – Matriz de resultados PCA em duas coordenadas, dos descritores gerais dos inibidores.	111
Tabela 20 – Resíduos presentes em cada nível da camada alta.	115
Tabela 21 – Anexo A, Cargas atômicas ChelpG para o imatinibe e dasatinibe.	142
Tabela 22 – Anexo A, continuação das Cargas atômicas ChelpG para o imatinibe e dasatinibe.	143
Tabela 23 – Anexo A, Cargas atômicas ChelpG para o nilotinibe e ponatinibe.	144
Tabela 24 – Anexo A, continuação das cargas atômicas ChelpG para o nilotinibe e ponatinibe.	145

Lista de abreviaturas e siglas

ABL	Abelson Murine Oncogene
ADP	Adenosina Difosfato
AM1	Austin Model 1
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
BCR	Break Point Cluster Region
CPK	Creatinofosfo Quínase
DFT	Density Functional Theory
eV	Electron Volt
FDA	Food and Drug Administration
HOMO	Highest occupied molecular orbital
LCAO	Linear combination of atomic orbitals
LLA	Leucemia Linfóide Aguda
LMC	Leucemia Mileóide Crônica
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
PM3	Parametric Method 3
PM6	Parametric Method 6
NDDO	Neglect of Differential Diatomic Overlap
PDGF	Platelet-derived growth subunit
QM/MM	Quantum mechanics/molecular mechanics
RMSD	Root-mean-square Deviation of Atomic Positions
RNA	Ácido Ribonucléico
RTKs	Receptor de Tirosina Quínase
TKIs	Inibidor da Tirosina Quínase
u.a.	Unidades atômicas

Resumo

A proteína tirosina quinase está associada à vários tipos de patologias. Basicamente, seu mecanismo de ação é a quebra do ATP em ADP, ativando a divisão celular. A tirosina quinase denominada BCR-ABL, é o principal alvo terapêutico da leucemia mieloíde crônica (LMC). Um dos principais fármacos de controle da LMC é o mesilato de imatinibe, que revolucionou o tratamento da doença. Entretanto, devido a intolerância que alguns pacientes apresentam e mutações, na proteína tirosina quinase BCR-ABL, como a mutação T315I, outros fármacos foram desenvolvidos e lançados no mercado. Entre estes fármacos podem ser citados o dasatinibe, nilotinibe e o ponatinibe. Neste estudo, foram analisados estes quatro inibidores clássicos da BCR-ABL, imatinibe, dasatinibe, nilotinibe e ponatinibe, seguidos de quatro moléculas derivadas do nilotinibe e ponatinibe. Para essas moléculas derivadas, os átomos de flúor foram substituídos por átomos de hidrogênio e cloro, a fim de estudar a influência de átomos de halogênios nestas estruturais. Os estudos de estrutura eletrônica foram realizados no nível da teoria do funcional da densidade, utilizando o funcional híbrido B3LYP em conjunto com a função de base 6-311+G(d,p). Os orbitais moleculares de fronteira, lacuna HOMO-LUMO e NBO foram analisados e comparados com estudos de *docking*, para a estrutura da proteína tirosina quinase selvagem (código PDB 1OPJ) e com a mutação T315I (código PDB 3IK3), na conformação DFG-out. Semelhanças estruturais foram apontadas, como a presença de grupos comuns nos inibidores, e modificações levantadas nas novas gerações de inibidores à base de imatinibe. Um deles é o grupo trifluorometil presente no nilotinibe e posteriormente incluído no ponatinibe, além do grupo metilpiperazina, que está presente no imatinibe e ponatinibe. Os orbitais moleculares de fronteira do imatinibe e do ponatinibe mostraram uma importante contribuição para os mesmos resíduos. Por fim, o estudo QM/MM usando o método *ONIOM* com diferentes cortes, de tamanhos progressivos ao redor do sítio ativo, foi utilizado com o intuito de compreender a contribuição dos grupos e a extensão do sítio ativo desta proteína com mutação T315I.

Palavras-chave: Tirosina Quínase, Inibidores Quínase, DFT, *DOCKING*, *ONIOM*.

Abstract

Protein tyrosine kinase is associated with several types of pathologies. Basically its mechanism of action is the breakdown of ATP into ADP, activating cell division. The tyrosine kinase called BCR-ABL is the main therapeutic target of chronic myeloid leukemia (CML). One of the main drugs used to control CML is imatinib mesylate, which revolutionized the treatment of this disease. However, due to the intolerance and mutations in the protein tyrosine kinase BCR-ABL, such as the T315I mutation, other drugs were developed and launched on the market. Among these drugs, dasatinib, nilotinib and ponatinib can be mentioned. In this study, these four classic inhibitors, imatinib, dasatinib, nilotinib, and ponatinib were analyzed, followed by four molecules derived from nilotinib and ponatinib. For these derived molecules, fluorine atoms were replaced by hydrogen and chlorine atoms, in order to study the influence of structural effects on this set of inhibitors. The electronic structure studies were performed at the level of density functional theory using the hybrid functional B3LYP with the 6-311+G(d,p) basis function. The frontier molecular orbitals, gap HOMO-LUMO, and NBO were analyzed and compared with docking studies, for the structure of the wild type protein tyrosine kinase (PDB code 1OPJ) and with the T315I mutation (PDB code 3IK3), in the DFG-out conformation. Structural similarities were pointed out, such as the presence of common groups in inhibitors and modifications raised in new generations of imatinib-based inhibitors. One of them is the trifluoromethyl group present in nilotinib and later included in ponatinib, in addition to the methylpiperazine group, which is present in imatinib and ponatinib. The boundary molecular orbitals of imatinib and ponatinib showed an important contribution to the same amino acid residues. Finally, the QM/MM study, using the *ONIOM* method, with different cutoffs, of progressive sizes around the active site, was used in order to understand the contribution of these groups and the extension of the active site of this protein, with T315I mutation.

Keywords: Tyrosine Kinase, Kinase Inhibitors, DFT, *DOCKING*, *ONIOM*.

1 Introdução

Câncer ou neoplasia maligna é um termo genérico para denominar um grande grupo de doenças que tem em comum o crescimento desordenado das células. Sua principal característica é a multiplicação rápida de células anormais, que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, sendo esse processo conhecido como metástase (DENMEADE; ISAACS, 2002).

Estudos estatísticos consolidados sobre a incidência e mortalidade de cânceres estão disponíveis na base de dados GLOBOCAN da "International Agency for Research on Cancer" da Organização Mundial da Saúde (OMS)¹. Os dados mais recentes referem-se ao ano de 2020. Considera-se que ocorreram no mundo 19,3 milhões de novos casos de câncer e cerca de 9,96 milhões de óbitos (SUNG et al., 2021). Destes casos, 10 milhões foram desenvolvidos em pessoas do sexo masculino, representando cerca de 52%, e 9,3 milhões de mulheres desenvolveram a doença (SUNG et al., 2021). A estimativa é que no Brasil ocorrerão 625 mil novos casos de câncer em cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2021). O número de novos casos continua a crescer, isso se deve, em grande parte, ao envelhecimento e crescimento da população mundial, junto com o aumento de comportamentos não saudáveis como: sedentarismo e má qualidade alimentar, entre outros, intensificados desde a revolução industrial (DEVITA; CHU, 2008).

Atualmente, o câncer é a principal causa de morte em países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento (JEMAL et al., 2011). Em países em desenvolvimento, como o Brasil, a sobrevida tende a ser menor, provavelmente devido a uma combinação de um estágio tardio no diagnóstico e acesso limitado aos tratamentos adequados (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005).

Neoplasia maligna é fundamentalmente uma doença causada pela falha da regulação do crescimento de tecidos. Para que uma célula normal se transforme em uma célula cancerígena, os genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular têm que ser alterados (CROCE, 2008), podendo começar em qualquer lugar do corpo humano, que é composto de trilhões de células (STEINBERG et al., 1990). Normalmente, as células humanas crescem e se dividem para formar novas células conforme a necessidade do organismo. Quando as células envelhecem ou ficam danificadas, elas morrem e novas células tomam seu lugar (CAKIR; ADAMSON; CINGI, 2012).

Há mais de 100 diferentes tipos de cânceres conhecidos que afetam os seres humanos, entre eles, estão as leucemias (ANAND et al., 2008). Este tipo de neoplasia pode ser

¹ World Health Organization (WHO). Global Health Estimates 2020, <https://gco.iarc.fr/today/home>, acessado em Outubro de 2021

classificada de acordo com o tipo de célula acometida e a velocidade de progressão da doença (TOLAR; NEGLIA, 2003). Se as células afetadas forem do tipo linfóides, linfócitos ou tecido linfóide em formação é denominada leucemia linfóide. Quando o alvo são as células mielóides (células que mais tarde se transformam em eritrócitos, leucócitos e megacariócitos) é denominada leucemia mieloíde (BOECHAT et al., 2017)

Um tipo mais raro de neoplasia leucêmica é a leucemia mieloíde crônica (LMC), com taxa de 2 casos a cada 100 mil pessoas, com maior incidência em adultos, com idade acima dos 50 anos, assintomática na fase inicial, que está crescendo em números de casos e se estendendo para todas as faixas etárias (KEY, 2010). A LMC é o resultado da atividade do cromossomo Philadelphia (Ph), presente nas células leucêmicas humanas. Este cromossomo é resultado da translocação entre os braços do cromossomo 9 e 22 (KLEIN et al., 2015), gerando uma proteína híbrida BCR-ABL que apresenta atividade enzimática anormal (AN et al., 2010).

As tirosinas quinases fazem parte de uma importante família de enzimas, que apresentam a ação de catalisar a fosforilação de resíduos de tirosina em proteínas alvo, mais especificamente transferem o grupo fosfato do ATP para resíduos de tirosina. Neste sentido, as estas proteínas estão envolvidas em diversas etapas do desenvolvimento neoplásico. Em condições normais estas proteínas regulam diversas atividades fundamentais como o ciclo celular (BOECHAT et al., 2017). Por sua importância, as proteínas quinases servem como alvos terapêuticos para uma gama de indicações clínicas e representam a maior categoria de alvos de drogas dos ensaios clínicos atuais (KALINICHENKO et al., 2019). Neste contexto, esforços têm sido feitos em todo o mundo, no sentido de elucidar o maior número possível de estruturas tridimensionais protéicas. O estudo e compreensão da tirosina quinase é atualmente a principal fonte de novos medicamentos para a LMC (FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Esses novos medicamentos representam uma grande promessa para o aperfeiçoamento dos tratamentos convencionais que se baseiam em cirurgia, na radioterapia, hormonioterapia e quimioterapia. Esses procedimentos atuam tanto nas células saudáveis como nas células modificadas (cancerígenas) e apresentam muitos efeitos colaterais severos e continuados (HUGHES, 2006). Diferentemente, os fármacos, que atuam diretamente na tirosina quinase, apresentam menores efeitos colaterais, melhorando a qualidade de vida do portador (BOECHAT et al., 2017).

A capacidade de projetar drogas racionalmente, usando estruturas de proteínas, associada à descoberta de vias envolvidas na transdução de sinais desencadeados pela ativação de receptores, por seus ligantes nas células tumorais, tornou possível a identificação e posterior validação de novos alvos terapêuticos do câncer. Desta forma, levando ao desenvolvimento de novas classes de drogas, comumente conhecidas como terapias alvo (FAJER; MENG; ROUX, 2016).

Os primeiros projetos de terapias alvo foram realizados em meados dos anos de 1980, e já no início dos anos de 1990 as primeiras histórias de sucesso destes projetos começaram a ser notadas. Hoje em dia, embora ainda que haja ajustes necessários para aperfeiçoar o processo, com avanço computacional e novas técnicas, o desenho racional de medicamentos, é uma parte integrante da maioria dos programas de descoberta de medicamentos (HUGHES, 2006). Um exemplo importante da técnica de terapia alvo é o imatinibe, um fármaco revolucionário no tratamento da LMC (DEININGER; BUCHDUNGER; DRUKER, 2005).

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 Proteínas Quínases

Proteínas são macromoléculas, constituídas por uma ou mais cadeias longas de resíduos de aminoácidos. As proteínas diferem-se uma das outras, principalmente, em sua sequência de aminoácidos, ditada pela sequência de nucleotídeos presente nos genes, e que geralmente resulta na estrutura tridimensional específica que determina sua atividade (BRUCKDORFER; MARDER; ALBERICIO, 2004; LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

As proteínas quínases atuam como reguladores dos principais processos celulares (Figura 1), dividido entre: transdução de sinal, que regulam a proliferação celular, migração, sobrevivência e progressão do ciclo celular (ELSAYED et al., 2016). Podemos dizer, então, que a BCR-ABL é a principal responsável pela oncogênese na LMC em estágio inicial da doença, que leva a um aumento da fosforilação. Estudos evidenciaram as mudanças na fosforilação da quínase BCR-ABL em resposta a tratamentos com inibidores da tirosina quínase (LIANG et al., 2006)(RADIVOJAC et al., 2008).

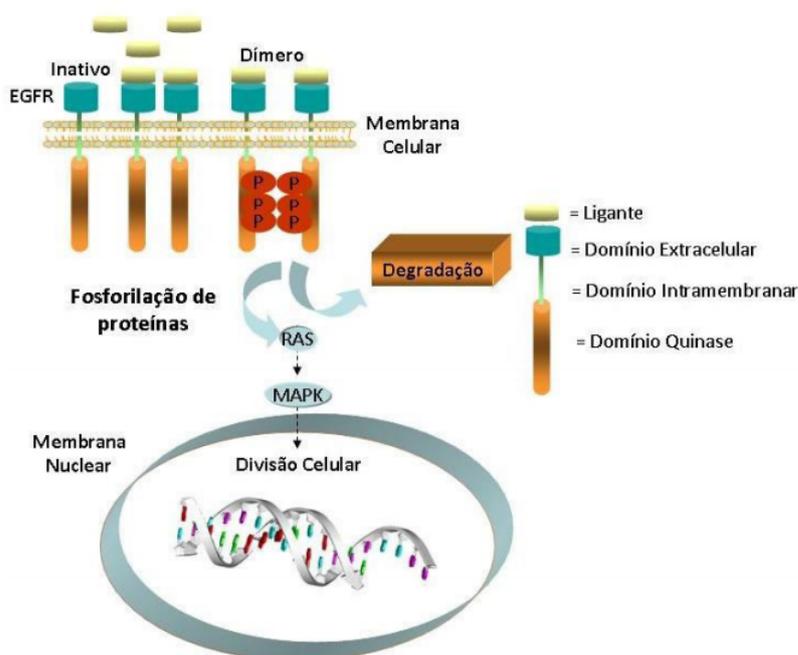


Figura 1 – Ciclo de ativação da cascata quinase, Adaptada de Lemmon et.al(LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

A fosforilação torna-se a chave que desencadeia mudanças conformacionais nas proteínas, regulando-as ou desregulando-as alterando suas propriedades e conseqüentemente seu comportamento e as respostas biológicas no meio (ROBINSON; WU; LIN, 2000).

Aproximadamente 13.000 proteínas humanas têm sítios que são fosforilados. Na função catalítica, um resíduo de aminoácido é fosforilado por uma proteína quinase pela adição de um grupo fosfato, ligando-se a esta de forma covalente (VLASTARIDIS et al., 2017).

Muitos resíduos são altamente conservados no domínio catalítico em todas as proteínas quinases (Figura 2), incluindo as glicinas da alça de ligação, uma lisina no P-loop, um ácido glutâmico em hélice C, um ácido aspártico e uma asparagina na alça catalítica, mas vale ressaltar, principalmente, a tríade Asp381-Phe382-Gly383 (DFG) próximo ao N-terminal (HUBBARD, 1999).

Esta estrutura conservada foi classificada em onze subdomínios com seqüências centrais altamente conservadas com variabilidade para as regiões intermediárias que podem ser altamente variadas em termos de seqüência e inserções ou deleções. A compreensão da construção e conformação de uma proteína quinase, totalmente ativa, pode ser avaliada usando a estrutura cristalina do domínio catalítico (REN et al., 2008).

A arquitetura geral do domínio da tirosina quinase é semelhante nas serina e treonina quinases: compreende um lobo amino-terminal, composto por uma folha de cinco cordões e uma hélice, e um lobo carboxi-terminal maior que é, principalmente, helicoidal. A molécula de ATP liga-se à fenda entre os dois lobos e o substrato peptídico contendo tirosina ligada ao lobo carboxi-terminal (BUBLIL; YARDEN, 2007).

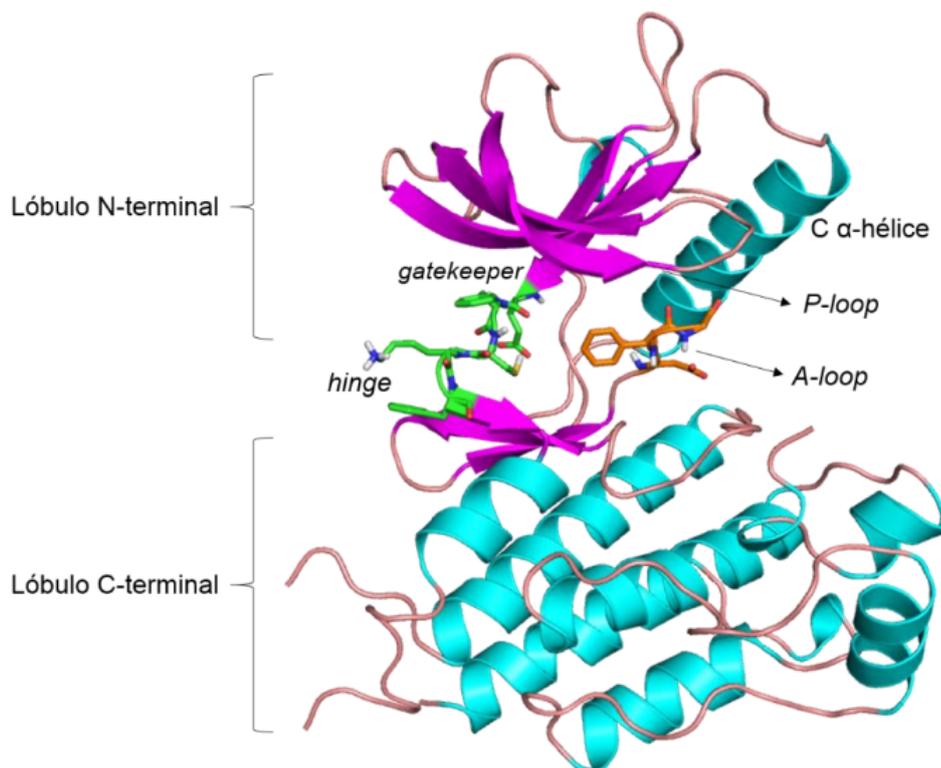


Figura 2 – Estrutura da proteína tirosina quinase, adaptada de Silva et.al (SILVA et al., 2009).

O sítio ativo da proteína é flexível e pode adotar conformações distintas. Estudos experimentais demonstraram que as proteínas quinases podem adotar múltiplos estados conformacionais e que tal variabilidade é essencial para a sua função e regulação. Como esperado, a variedade conformacional do sítio ativo influencia a afinidade de ligação e o tipo de inibidores que poderão entrar no sítio ativo da enzima (DUCHESNE et al., 2006).

1.1.1.1 ATP

O trifosfato de adenosina (ATP) é um composto orgânico complexo que fornece energia para conduzir muitos processos nas células vivas, por exemplo, a contração muscular, propagação de impulsos nervosos e síntese química. Encontrado em todas as formas de vida, o ATP é freqüentemente chamado de "unidade molecular de moeda" de transferência intracelular de energia. Quando consumido em processos metabólicos, converte-se em adenosina difosfato (ADP) ou em adenosina monofosfato (AMP) (KNOWLES, 1980).

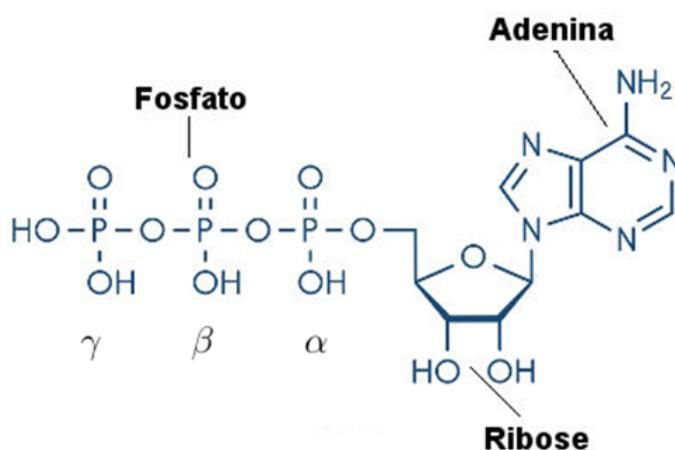


Figura 3 – Estrutura da molécula de ATP, adaptada de Zhang et.al (ZHANG et al., 2021).

A energia obtida na respiração ou na fotossíntese é utilizada para adicionar o grupo fosfato ao ADP (difosfato de adenosina) e convertê-lo em ATP. A eliminação de um grupo fosfato no ATP, a hidrólise do ATP, ocorre com a liberação de 30,6 kJ/mol (KRESGE; SIMONI; HILL, 2011).

É também um precursor do DNA e RNA e é usado como uma coenzima. Do ponto de vista da bioquímica, o ATP é classificado como um trifosfato de nucleosídeo, o que indica que consiste em três componentes: uma base nitrogenada (adenina), a ribose de açúcar e o trifosfato, como mostra a Figura 3. Em termos estruturais, o ATP consiste em um grupo de adenina ligado, pelo átomo de nitrogênio (N) ao átomo de carbono (C), a uma ribose, que se liga ao fosfato (MACHADO; NOME, 1999).

Nas reações relacionadas ao metabolismo, os grupos adenina e açúcar permanecem inalterados, mas o trifosfato é convertido em di e monofosfato, originando respectivamente os derivados ADP e AMP. Os três grupos fosforilas são referidos como α , β e γ (TORNROTH-HORSEFIELD; NEUTZE, 2008).

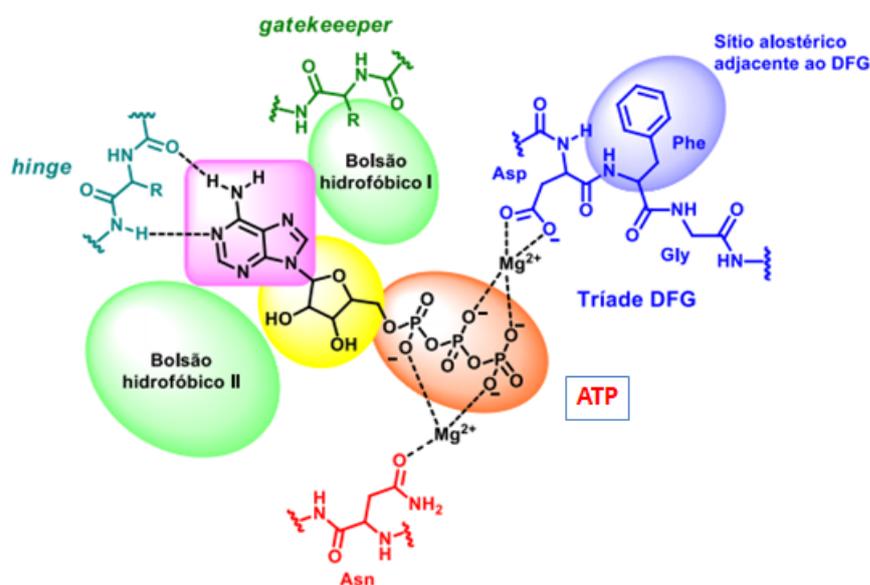


Figura 4 – Interações feita pela molécula de ATP com as principais regiões da tirosina quinase, fonte: (SILVA et al., 2009).

O ATP está envolvido na transdução de sinal, servindo como substrato para quinases, enzimas que transferem grupos fosfato. As quinases são as proteínas mais comuns de ligação ao ATP (Figura 4). Elas compartilham um pequeno número de dobras comuns (Figura 1). (SCHEEFF; BOURNE, 2005)(KAMENETSKY et al., 2006; HANOUNE; DEFER, 2001).

1.1.2 Conformações DFG-in e DFG-out

Situada em quase todos os domínios de proteína quinase eucariótica, adjacente ao local de ligação de ATP, encontra-se uma sequência de 3 resíduos, Asp-Phe-Gly (DFG). As razões para a conservação destes resíduos nas proteínas quinases ainda não são totalmente compreendidas, mas são muito importantes, como foi recentemente destacado pela identificação de potenciais mutações "condutoras" em cânceres em 8 quinases diferentes (KLEIN *et al.*, 2015).

A tríade DFG faz fronteira com o sítio de ligação ao ATP e está localizado entre os 2 lóbulos, no N terminal de um segmento flexível conhecido como loop de ativação (SHAN *et al.*, 2008). A ligação de ATP ocorre em uma fenda profunda entre os dois lobos. Um loop conectando as folhas $\beta 1$ e $\beta 2$ forma a parte superior do sítio ativo e contribui para coordenação do grupo γ -fosfato de ATP (P-loop) (BROSNAN, 2003; SEVER; BRUGGE, 2015; BERN *et al.*, 1964).

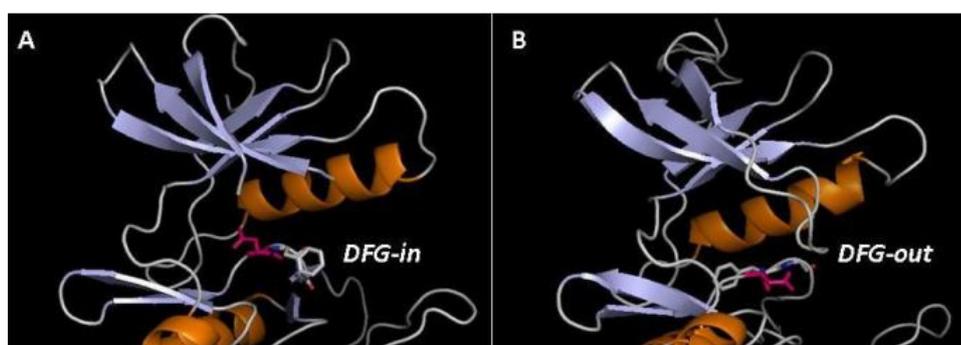


Figura 5 – Conformações do sítio da proteína tirosina quinase BRC-ABL, em (A) Conformação DFG-in (B) Conformação DFG-out, adaptada de Ávila *et al.* (AVILA; ROMEIRO, 2010).

Esta região é marcada por muita flexibilidade dos resíduos e por este motivo, o sítio de ligação pode ter mais de uma conformação. As principais conformações estudadas são: DFG-in e DFG-out. Na conformação DFG-in, o aspartato é importante para a catálise e, de fato, normalmente aponta para a ligação do ATP, em direção a uma bolsa hidrofóbica adjacente (Figura 5), onde pode se coordenar a um íon Mg^{2+} ligado ao ATP (HUBBARD, 1999). A conformação DFG-out difere da DGF-in pela mudança de posição estrutural entre o Asp e a Phe, realocando o aspartato em direção oposta ao sítio de ligação, ocasionando a perda da coordenação com o íon de Mg^{+2} e impedindo a fosforilação. A conformação DFG-out possibilita o acesso a canais hidrofóbicos da proteína, antes inacessíveis na conformação DFG-in, rompendo a estrutura do sítio catalítico da tirosina quinase (PAULI; BARREIRO; BARBOSA, 2018b; MENG; LIN; ROUX, 2015), por este motivo estas duas conformações também são conhecidas como: conformação ativa (DFG-in) e inativa (DFG-out) (VIJAYAN *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2018; GEORGOULIA *et al.*, 2019).

A descoberta destas duas formas conformacionais fomentaram o desenvolvimento de novos inibidores da tirosina quinase (TKI), em classes do tipo I e II. Os inibidores do tipo I são aqueles capazes de inibirem a forma DFG-in como, por exemplo, o dasatinibe. Já os inibidores do tipo II são aqueles capazes de inibir a proteína na sua forma DFG-out, como é o caso do imatinibe (HANTSCHHEL; SUPERTI-FURGA, 2004; DEININGER; BUCHDUNGER; DRUKER, 2005).

1.1.2.1 Estado de protonação de resíduos no sítio ativo

Dos 20 aminoácidos que ocorrem naturalmente, mais da metade destes (11 ao todo), são polares e carregados, e estão envolvidos diretamente no processo de catálise enzimática. Esses resíduos se enquadram em sete grupos químicos diferentes: imidazol (histidina), guanidínio (arginina), amina (lisina), carboxilato (glutamato, aspartato), amida (glutamina, asparagina), hidroxil (serina, treonina, tirosina) e tiol (cisteína) (GUTTERIDGE; THORNTON, 2005). Não é tarefa simples a atribuição da função de um resíduo catalítico, devido a natureza de várias etapas das reações químicas, porque ele pode desempenhar mais de um papel e pode estar envolvido em diferentes etapas da reação (BARTLETT et al., 2002).

A mais simples das funções executadas pelos aminoácidos são as funções de interação e orientação. Laços entre resíduos restringem seu movimento e garantem que eles sejam posicionados corretamente em relação ao substrato (FRAZAO et al., 1999).

A histidina existe em dois estados tautoméricos, neutro e protonado, condição associada ao átomo de nitrogênio desse aminoácido. Essas duas formas existem em proporções aproximadamente iguais, no entanto, a presença de tautomeria é essencial para função que ela exerce (FRAZAO et al., 1999).

A razão para o estudo mais abrangente do estado de protonação da histidina é devido a mesma ser um resíduo que tem seu pK_a próximo ao neutro, portanto, pode funcionar facilmente como um catalisador ácido-base. Também pode atuar como um nucleófilo, de maneira que na sua forma protonada este resíduo auxilia a estabilização dos estados de transição e podem aceitar ou doar prótons e ligações de hidrogênio (BARTLETT et al., 2002).

Além da histidina, a cisteína, também apresenta um pK_a próximo ao neutro, possui uma alta propensão catalítica, embora seu uso seja muito raro. Outros resíduos mais comumente observados são os resíduos carregados como: glutamato, aspartato, arginina e lisina. Esses resíduos têm valores de pK_a longe da faixa pH neutra e são mais difíceis de usar em reações enzimáticas do tipo ácido base (GUTTERIDGE; THORNTON, 2005).

1.2 LMC, Visão Geral

Embora a leucemia tenha sido reconhecida como uma doença sistêmica e como uma patologia em 1845, levou mais de 100 anos para que o primeiro relatório de terapia significativa fosse publicado (HUGHES, 2006).

No século XIX, o primeiro caso de leucemia foi descrito em 1827, pelo francês Alfred Velpeau, um parisiense de 63 anos, onde uma análise mais detalhada, revelou um aumento do baço e fígado associado a febre, fraqueza geral, cálculos urinários, bem como sangue espesso como mingau, que mais se parecia com pus do que sangue (CORTES, 2004).

Os sintomas típicos no diagnóstico da leucemia são fadiga, anorexia e perda de peso, mas cerca de 40% dos pacientes são assintomáticos e, nesses pacientes, o diagnóstico é baseado apenas em uma condição anormal do hemograma, Figura 6. A anormalidade mais comum no exame físico é a esplenomegalia (aumento do baço), que está presente em até metade dos pacientes (SAWYERS, 1999).

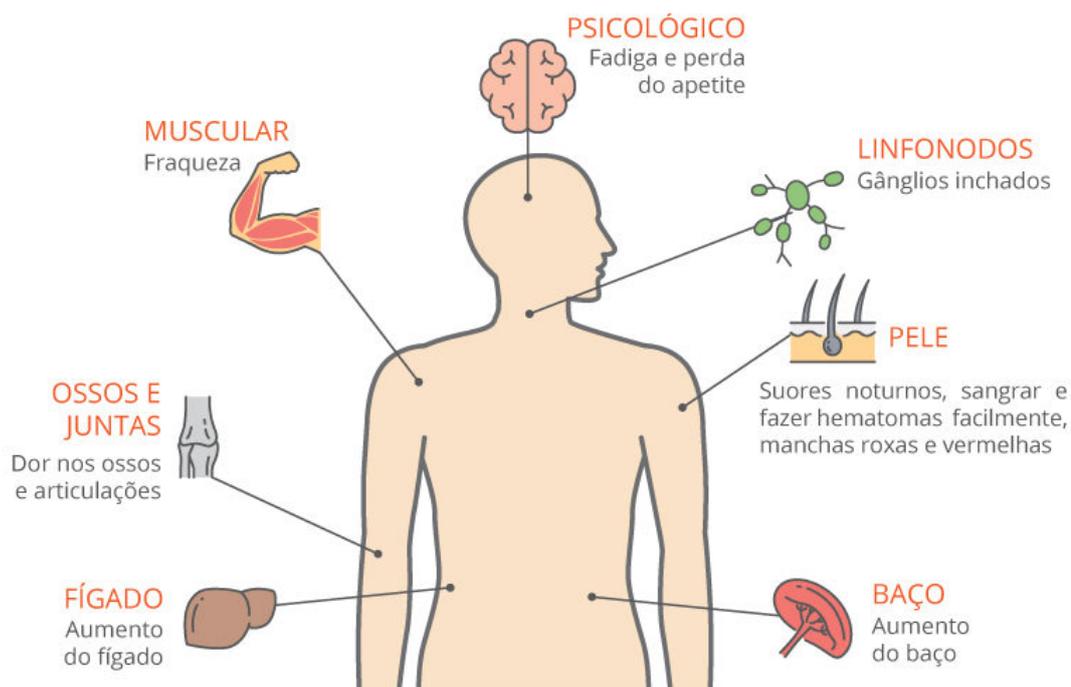


Figura 6 – Sintomas mais comuns presente na fase crônica da Leucemia mieloide crônica no corpo humano, fonte: (APOR, 2021).

Inicialmente a fase crônica (FC) período de duração variável, seguida de progressão para fase blástica (FB), precedida ou não por uma fase acelerada (FA). Cerca de 90% dos pacientes são diagnosticados na fase inicial, sendo, destes, 20 a 45% assintomáticos. Estes pacientes apresentam leucocitose com desvio à esquerda, com células granulocíticas bem diferenciadas, e esplenomegalia (CHEN et al., 1991). Quando sintomáticos, os mais comuns são: hipercatabolismo (fadiga, perda ponderal, sudorese noturna e febre) e desconforto

abdominal decorrente da esplenomegalia. Complicações trombóticas ou hemorragia ocorrem em menos de 5% dos casos em FC (SAWYERS, 1999).

1.2.1 Cromossomo Philadelphia

Em 1960, os pesquisadores Nowell e Hungerford, da Universidade da Pensilvânia, identificaram um cromossomo anormal presente nas células leucêmicas humanas. Este cromossomo, chamado de Philadelphia (Ph), é resultado da translocação entre os braços do cromossomo 9 e 22, Figura 7, sendo encontrado em 95% dos pacientes com LMC. O cromossomo Ph gera uma proteína híbrida, BCR-ABL que apresenta atividade enzimática anormal da tirosina quinase, responsável pela patogênese da doença(BOECHAT et al., 2017).

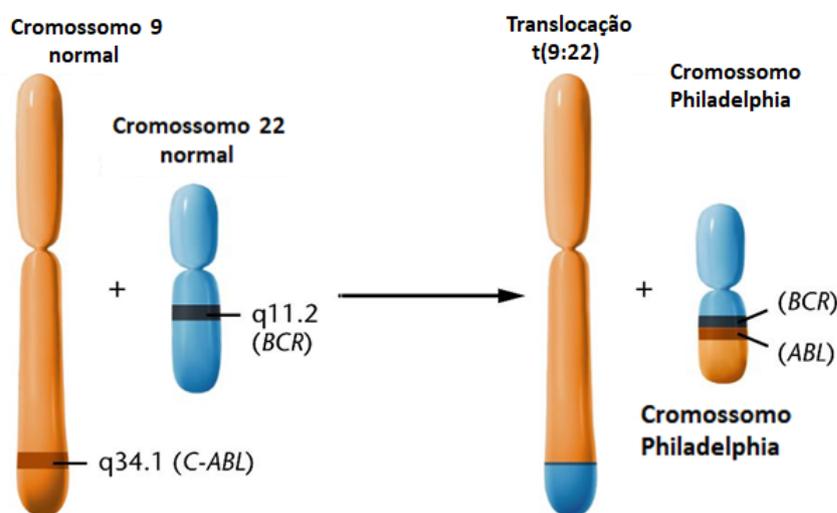


Figura 7 – Translocação do cromossomo 9 com 22 formando o cromossomo Philadelphia, adaptada de (AN et al., 2010).

O diagnóstico e o monitoramento dos estágios da doença é geralmente baseado na detecção do cromossomo Filadélfia (Ph), durante a evolução para uma crise blástica, uma série de alterações cromossômicas secundárias não aleatórias ocorre, incluindo a duplicação do cromossomo Ph. Dependendo do local do ponto de interrupção no gene BCR, a proteína pode variar em tamanho de 185 kd a 230 kd (EPSTEIN et al., 1988).

O fato de que proteínas de fusão de tamanhos diferentes podem ser correlacionado com resultados diferentes, indicando que a proteína BCR-ABL de 190 kd, Figura 8, tem maior atividade como uma tirosina quinase e é um oncogene mais potente do que a proteína de 210 kd (NOWELL, 2007).

1.2.1.1 Mecanismo de transdução de sinais

Os receptores de tirosina quinase (RTKs) são proteínas transmembranares que são submetidos a dimerização e autofosforilação. Subsequente a fosforilação das proteínas citoplasmáticas pelo receptor ativado desencadeia uma cascata de sinalização que, induz a transcrição de genes específicos (BOECHAT et al., 2017).

As enzimas que estão localizadas no meio citoplasmático. Na função celular, são a chave no processo de sinalização, ativando diversos biosensores e estímulos que estão integrados juntamente com o controle de mobilidade celular (BATTAGLINI et al., 2009).

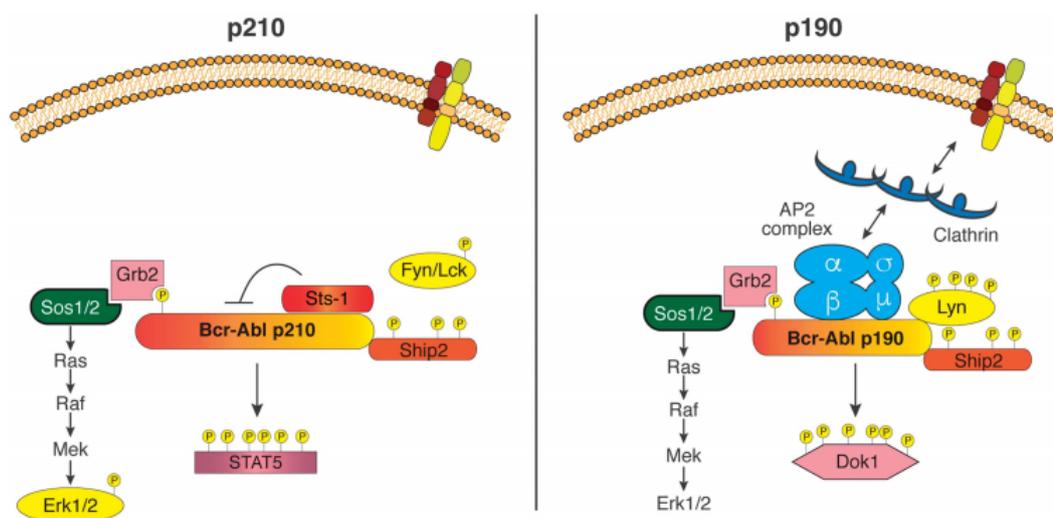


Figura 8 – A tirosina quinase ABL e as duas isoformas das proteína resultantes da fusão BCR-ABL, p210 e p190. A isoforma p210 é mais longa que p190, fonte: (RECKEL et al., 2017).

1.2.1.2 Tratamento

O tratamento da LMC passou por uma verdadeira revolução ao longo dos anos. A radioterapia, a partir do início do século XX, permaneceu como terapia padrão, por mais de 50 anos. Em 1960, foi aplicado pela primeira vez o bussulfano, seguido pela hidroxiureia, que mostrou ser um fármaco mais eficiente que o seu antecessor, em parte por ser melhor tolerado pelo organismo permitindo um pequeno aumento da sobrevida do paciente. Entretanto, nenhum desses fármacos tinha a capacidade de induzir qualquer grau de negatização do cromossomo Ph, sendo assim, incapazes de alterar a história natural da doença (FAJER; MENG; ROUX, 2016).

Em 1980, verificou-se a eficácia do interferon-alfa (IFN- α) em estabelecer respostas hematológicas e citogenéticas, parciais ou completas, prolongando a sobrevida. Gradativamente, o IFN- α substituiu a hidroxiureia e o bussulfano no tratamento de pacientes em fase crônica, recém diagnosticados (CORTES, 2004).

Segundo Bollmann (2011) em "Chronic myeloid leukemia: past, present, future", ainda em 1980, surgem as primeiras experiências de transplante alogênico de célula tronco hematopoiética (TACTH) para pacientes em fase crônica, constituindo a primeira modalidade curativa, com mortalidade relacionada ao transplante de 10 a 20%. A partir de 1990, o TACTH torna-se o tratamento de escolha para pacientes com menos de 50 anos em FC, sendo o IFN- α , associado ou não a citarabina, um medicamento de quimioterapia, reservado para os pacientes não elegíveis para TACTH (BATTAGLINI et al., 2009).

A descoberta da oncoproteína BCR-ABL em 1986 permitiu nos anos subsequentes, o desenvolvimento de uma nova droga, capaz de inibir a sua atividade enzimática. Denominada inicialmente STI571, hoje conhecido como imatinibe, revolucionou o tratamento da LMC (BOLLMANN; GIGLIO, 2011).

1.3 Inibidores Tirosina Quínase - modo de atuação



Figura 9 – Linha do tempo aproximada que ilustra os marcos no desenvolvimento de inibidores da tirosina quínase BCR-ABL, fonte: (LAMBERT et al., 2013).

Fármacos quimioterápicos são projetados para apoptose seletiva de células que se dividem de maneira desordenada e rápida, que é a principal característica da maioria das células cancerosas (AN et al., 2010). A maioria dos inibidores de quínases descritos até o momento atuam de forma competitiva à molécula de ATP. Estes agem inibindo as quínases nas formas selvagens e mutantes ou sobre expressões da proteína responsáveis pela condução de sinais oncogênicos. Essas enzimas catalisam a fosforilação de proteínas por meio de transferência de um ATP formando ADP, ativando a cascata quínase (Figura 1) (AN et al., 2010; ECK; MANLEY, 2009).

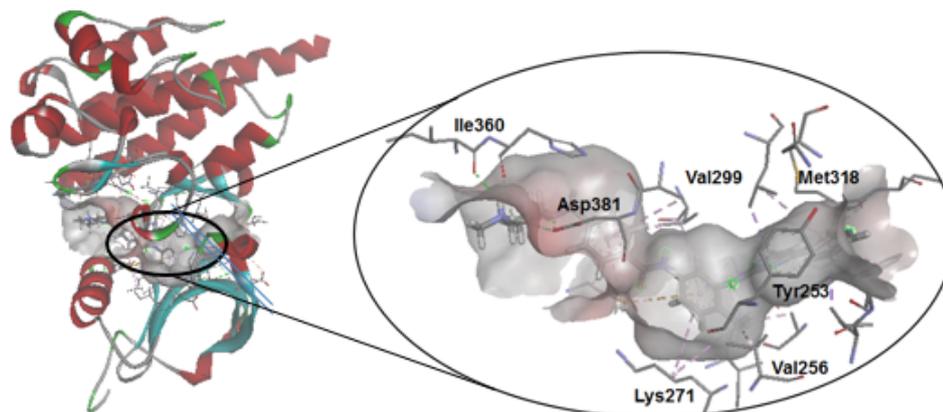


Figura 10 – Fenda catalítica da proteína tirosina quinase BCR-ABL, DFG-out, fonte: (PEREIRA; NASCIMENTO; MARTINS, 2021).

A Figura 10 mostra, em destaque, a região do sítio ativo o caso da BCR-ABL. O sítio ativo é um canal que transpassa toda a proteína, impondo aos inibidores algumas características conformacionais específicas para que estes possam acessar o sítio e interagir com o mesmo em sua totalidade.

Tabela 1 – Inibidores aprovados pela agência FDA (*do inglês Food and Drug Administration*) dos EUA para RTKs (receptor tyrosine kinase) no uso em terapia de câncer, fonte: (LEMMON; SCHLESSINGER, 2010).

Molécula	Alvo	Tipo de câncer	Ano de lançamento
Imatinibe	PDGFR, ABL,	LMC, GIST	2001
Gefitinibe	EGFR	esôfago	2003
Erlotinibe	EGFR	esôfago	2004
Sorafenibe	Raf, VEGFR, PDGFR	Renal	2005
Sunitinibe	KIT, VEGFR, PDGFR	renal, pâncreas	2006
Dasatinibe	ABL, KIT, Src	LMC	2007
Nilotinibe	ABL, Arg, KIT, PDGFR	LMC	2007
Lapatinib	EGFR, ErbB2	mamário	2007
Trastuzumabe	ErbB2	mamário	1998
Cetuximabe	EGFR	cabeça e pescoço	2004
Bevacizumabe	VEGF	pulmão, colorretal	2004

Uma série de medicamentos aprovados que são inibidores do tipo I, tais como dasatinibe, têm como alvo a bolsa de ligação de ATP e são denominados como inibidores competitivos de ATP. Enquanto que, os inibidores do tipo II, que incluem imatinibe, nilotinibe e ponatinibe, ligam-se à bolsa hidrofóbica adjacente ao bolso de ligação de ATP. Apesar da ocupação no local alostérico ser característica dos inibidores do tipo II, eles também se estendem além do “Porteiro” no bolso de adenina e formam ligações de hidro-

gênio com os resíduos da *hinge* (dobradiça) da conformação da enzima (KALINICHENKO et al., 2019).

1.4 Principais inibidores de tirosina quinase BCR-ABL

A primeira geração de TKIs é representada pelo imatinibe, a segunda pelo dasatinibe e nilotinibe e a terceira pelo bosutinibe e ponatinibe. Independente da geração, são classificados em dois tipos, os inibidores do tipo I que são competitivos com ATP e eles preferem DFG-In (forma ativa) e o tipo II, inibidores que preferem DFG-out (forma inativa) (RAMAKRISHNAN et al., 2017).

1.4.1 Imatinibe

O mesilato de imatinibe² foi introduzido no mercado em 2001 pela indústria farmacêutica Novartis, com o nome comercial Gleevec (EUA) ou Glivec. Esse fármaco é um inibidor da tirosina quinase de pequena massa molecular, que foi inicialmente desenvolvido especificamente para ser usado como inibidor do fator de crescimento derivado de plaquetas PDGFR (do inglês Platelet-derived growth factor receptors). Subsequentemente, foi constatado ser o imatinibe um potente inibidor de ABL quinases, incluindo a proteína de fusão BCR-ABL (LOPES; ABREU, 2009).

O imatinibe liderou a mudança de paradigma não apenas no tratamento da LMC, mas também na terapia direcionada ao câncer de modo geral (GEORGOULIA et al., 2019), e é colocando entre as grandes descobertas no campo farmacêuticos. Foi o primeiro medicamento a ser usado pela maioria dos pacientes com LMC, devido à importância dos seus resultados (MANDAL; MOUDGIL; MANDAL, 2009).

Com base na respectiva capacidade para bloquear a proliferação celular por meio da inibição da tirosina quinase, o imatinibe (Figura 11) tem a sua eficácia no tratamento das doenças crônicas mieloproliferativas que envolvem a ativação do PDGFR (HANNINK; DONOGHUE, 1989) e do estroma gastrointestinal (ASAKI et al., 2006).

O imatinibe (Figura 12) interage com a tirosina quinase, ligando-se à conformação DFG-out (veja seção 1.1.2). A mudança de conformação altera a forma local do bolso criando mais espaço para acomodar o imatinibe (LIU et al., 2018). Juntando-se ao bolso

² A molécula de mesilato de imatinibe trata-se do cátion imatinibe com o ânion mesilato (CH₃SO₃). Neste trabalho será tratado apenas o imatinibe protonado.

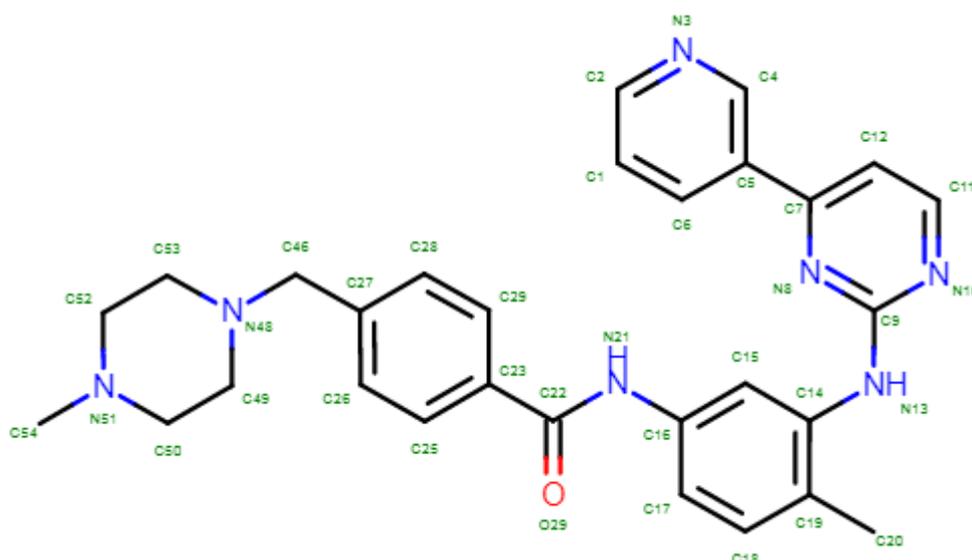


Figura 11 – Fórmula estrutural da molécula de imatinibe.

do ATP, principalmente com seu fragmento de piridina-pirimidina, próximo ao qual há um grupo metilfenil localizado em frente ao resíduo "porteiro", Thr315, enquanto o grupo metil piperazina da molécula está localizado em um bolsão hidrofóbico (YANG et al., 2019).

O imatinibe possui na sua estrutura molecular um grupo piperazina que consiste em um anel de seis membros contendo dois átomos de nitrogênio em posições opostas no anel (BISHNOI; ROCHELLE, 2002). O anel de piperazina (Figura 12) é usado com grande êxito no desenvolvimento de novos fármacos (RATHI et al., 2016), em pH fisiológico de 7,4, o grupo meti-piperazina da molécula de imatinibe passa 2/3 de seu tempo no estado neutro; o resto do tempo é protonada, geralmente no átomo de nitrogênio ligado ao grupo metil (Figura 12)(ALEKSANDROV; SIMONSON, 2009).

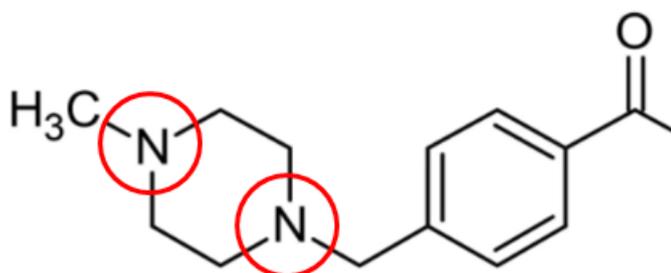


Figura 12 – Grupo metilpiperazina ligado ao fragmento da molécula de imatinibe, nos círculos em vermelho, possíveis locais de protonação.

1.4.2 Mutações

O mecanismo biológico mais comum para resistência a um medicamento é o surgimento de mutações pontuais na sequência da proteína (ROSKOSKI, 2015). No caso da BCR-ABL, alterações de nucleotídeos podem afetar uma infinidade de resíduos, criando mais de 70 pontos de mutações (ROSKOSKI, 2005), mudando profundamente o comportamento da proteína. As principais posições de mutações (Figura 13), observadas são: posição 252, onde o resíduo de glutamina pode ser substituído por dois resíduos diferentes, uma histidina ou um resíduo de arginina (Q252H ou Q252R); posição 253, na qual o resíduo de tirosina na posição 253 também é passível de sofrer mutação, vindo a ser substituído por um resíduo de fenilalanina (Y253F). Uma mutação importante é a da posição 315 onde um resíduo de treonina é substituído por um resíduo apolar de isoleucina (T315I), além da mutação na posição 351, onde um resíduo de metionina é substituído por um resíduo de treonina (M351T) (ROSKOSKI, 2015).

Localizado em ponto crucial para interações com o ATP, o *P-loop* tem a sequência Gly-x-Gly-x-Gly-x-Val que abriga 7 mutações, como a mutação E255K³, G250E⁴, que além da posição T315I⁵ e M351T⁶, estes pontos representam mais de 60% dos casos de mutações recorrentes na BCR-ABL (BANAVATH et al., 2014).

Várias mutações citadas acima estão por trás da resistência da BCR-ABL ao imatinibe. Uma nova geração de inibidores BCR-ABL foi desenvolvida, tendo como alvo essas mutações, como: dasatinibe e nilotinibe. Cada um destes novos fármacos possui seu próprio perfil de sensibilidade a cada mutação, juntos podem inibir todas as variantes mutantes, exceto a mutação no resíduo *gatekeeper*, T315I (ROSKOSKI, 2015).

Mais recentemente, foi desenvolvida uma molécula que é capaz de inibir a atividade BCR-ABL, mesmo com a mutação T315. Infelizmente, esse inibidor, o ponatinibe, está associado a efeitos colaterais severos. Devido à resposta adversa, ele é usado apenas como tratamento em último recurso (ARIGHI; BORRELLO; SARIOLA, 2005).

1.4.3 Dasatinibe

A notável eficácia do imatinibe aumentou a esperança de desenvolver novos tratamentos contra o câncer, vislumbrando uma variedade de inibidores quinases específicos (FAJER; MENG; ROUX, 2016). O Dasatinibe surgiu devido ao desenvolvimento de resistência ao imatinibe por parte dos pacientes, ocasionada durante o tratamento da LMC, e também à baixa eficácia deste medicamento nas fases mais avançadas da doença, e às mutações sofridas na sequência protéica da BCR-ABL, gerando novos estudos em desenho

³ Na posição 255 o resíduo glutamato é substituído por uma lisina

⁴ Glicina sofrendo substituição na posição 250 por um glutamato

⁵ Treonina sofrendo substituição por isoleucina

⁶ Metionina sofrendo substituição por uma treonina

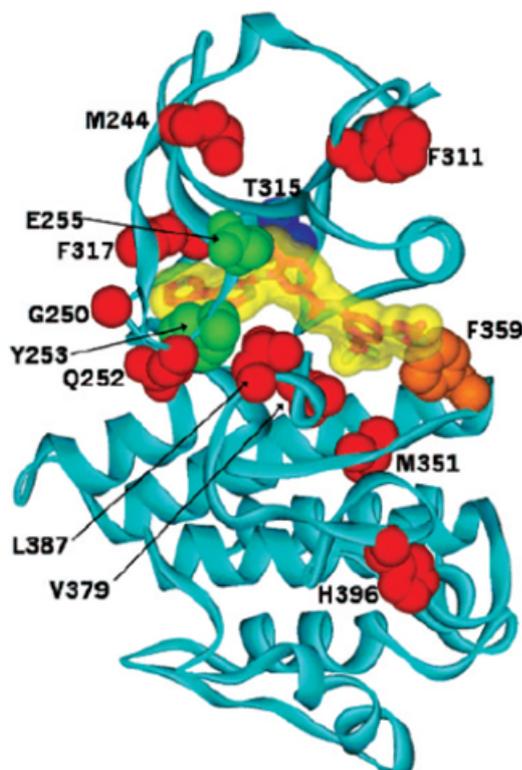


Figura 13 – Em vermelho os pontos de possíveis mutações da proteína tirosina quinase BCR-ABL, fonte:([COPLAND et al., 2009](#)).

racional de fármacos ([KEATING, 2016](#)).

Aprovado para o tratamento de adultos com LMC na fases crônica, aguda ou crise blástica resistentes ou intolerantes ao tratamento prévio com fármaco imatinibe, o dasatinibe (Sprycel)(Figura 14) é um inibidor tirosina quinase BCR-ABL disponível na forma oral, sendo, *in vitro*, 300 vezes mais ativo do que o mesilato de imatinibe. Também é eficiente para outras quinases, como a família SRC ([COHEN, 2014](#)).

A análise da estrutura cristalina do domínio da quinase ABL no complexo com dasatinibe pode indicar que os requisitos conformacionais de ABL são menos rigorosos para o dasatinibe do que para o imatinibe ([PAEZ-RIBES et al., 2019](#)), por estar ligado a conformação DFG-out. Além disso, não está envolvido em interações críticas com muitos dos resíduos possíveis de mutação da alça ligação de *P-loop* ([PISCITANI et al., 2020](#)). Podendo explicar a atividade do dasatinibe em conseguir superar 14 das 15 mutações resistentes ao imatinibe inicialmente identificadas. Posteriormente, mostrou ser menos eficaz contra mutações adicionais, como a F317L e T315A e, principalmente, a T315I ([BUFFA et al., 2013](#)).

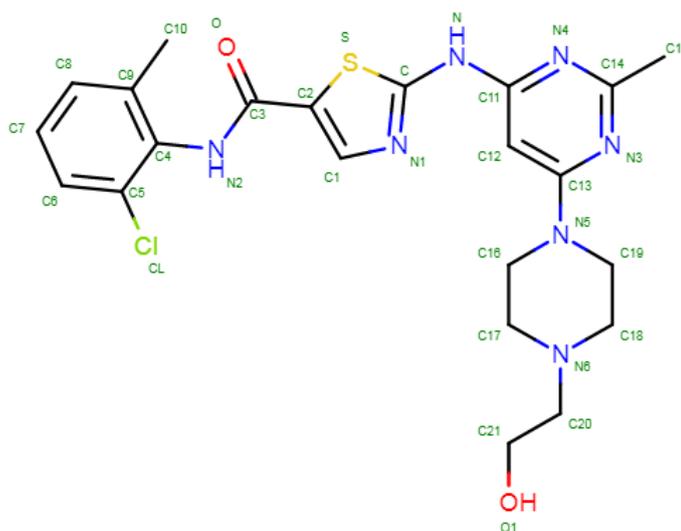


Figura 14 – Formula estrutural da molécula do dasatinibe.

1.4.4 Uso de Flúor em Fármacos

Cerca de 5000 produtos naturais contendo halogênio (Cl, Br, I) foram identificados e encontrados em grande diversidade estrutural, contendo um ou vários halogênios, incluindo o grupo CCl_3 . Considerando que o flúor é o 13^o elemento mais comum na crosta terrestre e significativamente mais abundante do que outros halogênios, há pouca incidência dos compostos naturais contendo flúor (STRONG; FRYER; KERRICH, 1984).

A importância do flúor na descoberta de medicamentos é bem reconhecida. Cerca de 20% dos medicamentos disponíveis no mercado contém pelo menos um átomo de flúor na sua composição, seja um grupo CF, CF_2 ou CF_3 . Em todos os projetos de descoberta de fármacos, a abordagem de síntese com flúor é sistematicamente aplicada, a fim de otimizar várias propriedades como: a afinidade com receptor, melhora no perfil de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME) (DALVIT; INVERNIZZI; VULPETTI, 2014).

O estudo do uso de átomos de flúor em fármacos (Figura 15) vem desde dos anos 1950 (MOORE, 2009). O fluorouracil (5-FU) foi patenteado em 1956 e entrou em uso médico em 1962 (JOAG et al., 2016) com notável atividade de inibição antitumoral, a busca por seus análogos mais potentes e seletivos para o tumor ainda é um área de pesquisa muito ativa. Fármacos como a fludrocortisona⁷ e o 5-FU, constituíram a mudança de paradigma fundamental na visão do lugar do flúor em pesquisas relacionadas à química medicinal, propondo melhorias das propriedades farmacológicas e aumento da eficácia

⁷ A fludrocortisona foi descrita na literatura em 1953 e foi introduzida para uso médico (como o éster de acetato) em 1954. Foi o primeiro corticosteroide sintético a ser comercializado e seguiu-se à introdução da cortisona em 1948 e da hidrocortisona (cortisol) em 1951. A fludrocortisona também foi o primeiro fármaco contendo flúor a ser comercializado (KHAN; PARK; LEE, 2005; POLITO et al., 2016)

terapêutica (SURESH; GHOSH; CHOPRA, 2021).

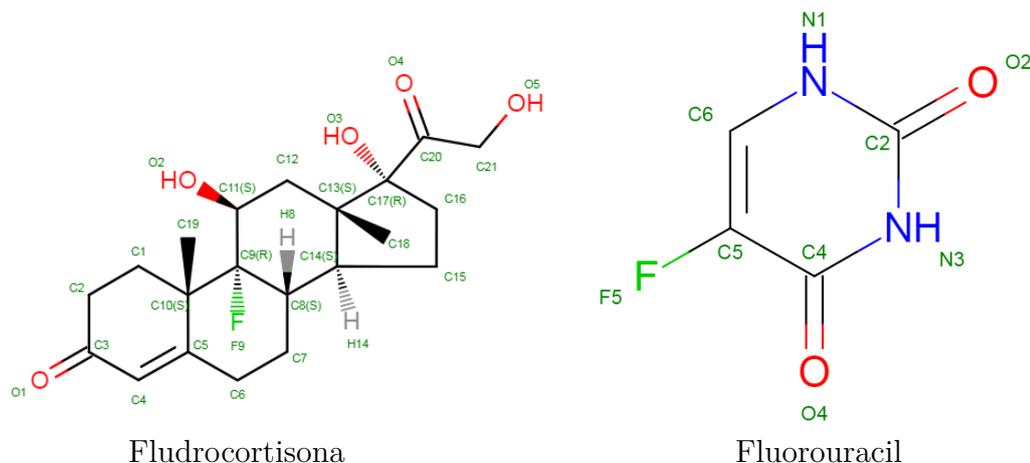


Figura 15 – Fórmulas estruturais: Fludrocortisona e Fluorouracil.

Entretanto, é interessante mencionar que, nos anos 1940–1950, a ideia de introduzir flúor em moléculas de produtos naturais era inconcebível. O pensamento prevalecente da época, sugeria claramente que o flúor é elemento abiótico (VINTELER et al., 2015).

Hoje em dia já não é surpreendente a substituição do grupo metil por trifluorometil em um anel fenílico, como acontece no nilotinibe e ponatinibe, ou por grupo pentafluorofenil, levando a um resultado estereoquímico diferente da molécula não substituída. O efeito na atividade biológica de compostos orgânicos com adição de átomos de fluor é bastante sutil e difícil de prever. Embora possa contribuir para melhor as características desejadas em um fármaco, esta adição pode potencializar a toxicidade da molécula, que pode ser um dos motivos para pouca incidência de compostos naturais contendo flúor (WANG et al., 2013; ZHOU et al., 2016).

1.4.5 Nilotinibe

O fármaco nilotinibe (Figura 16) é uma nova aminopiridina, disponível na forma oral (KANTARJIAN et al., 2006). É um inibidor de segunda geração, desenvolvido para atender a necessidade médica não atendida de seus predecessores, imatinibe e dasatinibe, relacionada a intolerância e resistência, sendo um exemplo a mutação da fenilalanina na posição 317 substituída por leucina (ZHOU et al., 2016). No entanto, não eficaz à mutação T315I (HUGHES, 2006).

Usando como molde a molécula de imatinibe, as diferenças mais explícitas em sua estrutura é, em primeiro lugar, a modificação do grupo metil-piperazina presente no imatinibe (Seção 1.4.1) por metil-imidazol. Em segundo lugar, a adição de um grupo trifluorometil no anel fenílico (GORA-TYBOR; ROBAK, 2008). É um inibidor de quinase ligado a conformação DFG-out, com alvo melhorado e específico, baseando-se na compre-

ensão dos mecanismos moleculares do fármaco de primeira geração. É um inibidor mais potente que o imatinibe e o dasatinibe. Entretanto, com efeitos colaterais mais severos, tornando-o não elegível como primeira escolha no tratamento (BUBLIL; YARDEN, 2007).

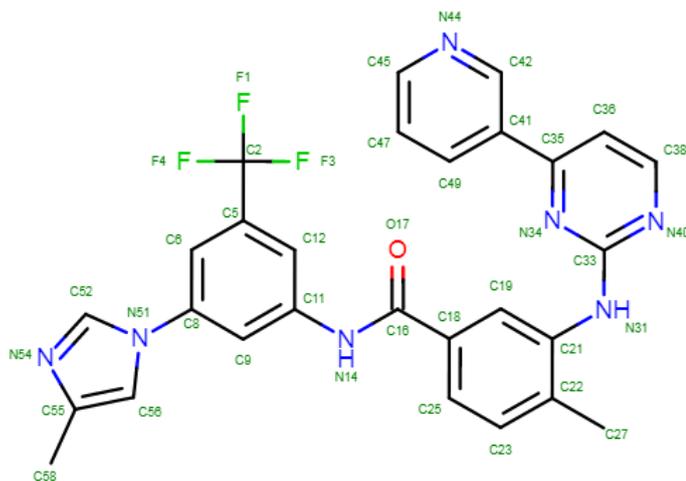


Figura 16 – Fórmula estrutural da molécula de nilotinibe.

1.4.6 Ponatinibe

O ponatinibe (Figura 17), inicialmente conhecido como AP24534 é um inibidor de multi tirosina quinase, oralmente ativo. É atualmente aprovado pela *Food and Drug Administration* dos EUA para tratar pacientes com leucemia mielóide crônica e leucemia linfoblástica aguda positiva para cromossomo Filadélfia, visando especificamente a mutação do gene ABL (BUBLIL; YARDEN, 2007).

A estrutura química e modo de ligação esquemática desse fármaco demonstraram ser um inibidor constituído por vários módulos designados de molde, como demonstraremos nos capítulos (3.1 e 3.3). Os locais dentro do domínio da quinase ABL são visados a cada módulo de ligação e também são especificados, incluindo a região da dobradiça da quinase, o bolso hidrofóbico localizado atrás do resíduo *gatekeeper*⁸ e bolso associado ao modo de ligação DFG-out (AVILA; ROMEIRO, 2010).

Ponatinibe exibe uma ligação carbono-carbono tripla (ligação etinil) entre o grupos metil-fenil e purina (O'HARE et al., 2009). Ele mantém a cadeia lateral de isoleucina sem interferência estérica e sem qualquer perda de ligação de hidrogênio. O ponatinibe também mostrou padrão de ligação semelhante (DFG-out) ao imatinibe e nilotinibe que interage com os resíduos Met318, Asp381 e a cadeia lateral de Glu286 (MEANWELL, 2018).

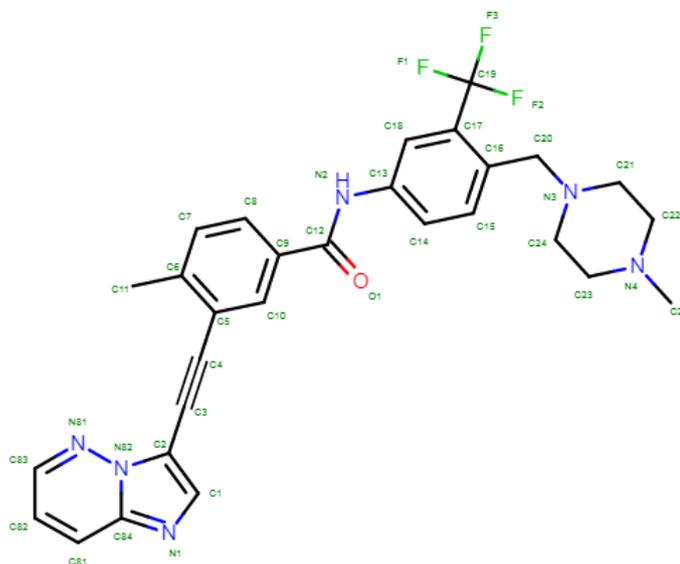


Figura 17 – Fórmula estrutural da molécula de ponatinibe.

Estudos apontam que o ponatinibe foi capaz de inibir a mutação T315I e também as outras mutações da quinase BCR-ABL. Entretanto, efeitos adversos do uso do medicamento, fez com que seja indicado apenas quando há falha no papel inibitório por outro fármaco (BUBLIL; YARDEN, 2007).

⁸ O *gatekeeper* é distinto para as diferentes quinases e é responsável por definir o volume do sítio de ligação do ATP (PAULI; BARREIRO; BARBOSA, 2018a).

Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (Food and Drug Administration) emitiu uma suspensão clínica parcial do novo estudo experimental para o ponatinibe, em 9 de outubro de 2013, devido ao aumento do número de coágulos sanguíneos observados em pacientes que tomavam o medicamento. Eventos tromboembólicos venosos ocorreram em 6% dos pacientes. Os eventos adversos mais comuns em todos os graus incluíram hipertensão (69%), erupção cutânea (63%), dor abdominal (48%), fadiga (47%), dor de cabeça (43%), isquemia arterial (42%), pele seca (42%), constipação (41%), artralgia (32%), náusea (28%), pirexia (26%), neuropatia periférica (24%), mialgia (24%), dor nas extremidades (23%), dor nas costas (21%) e diarreia (20%). Além disso, foram relatados casos da síndrome da encefalopatia reversível posterior ([LEUKEMIA, 2013](#)).

1.5 Modelagem Molecular de Fármacos

A busca por alívio e cura de doenças, usando ervas e folhas, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina. Medicinas tradicionais e milenares, como a chinesa e indígenas, desenvolveram-se com eficiência por meio do uso de produtos naturais, sendo fonte de estudo até os dias atuais. (JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

No período de 1950-1980 a química medicinal em colaboração com a farmacologia eram os pilares dos programas de pesquisa em fármacos. Devidos a avanços tecnológicos em diversas áreas como: determinação de estruturas protéicas por difração de raios-X (mioglobina e hemoglobina), a produção do primeiro computador de acesso múltiplo, protótipo para o desenvolvimento dos computadores modernos. Criação do *Protein Data Bank* (PDB), modificação molecular, criaram o ambiente favorável à obtenção do primeiro fármaco, pela aplicação da estratégia denominada descoberta de fármaco baseada em estrutura (tradução livre do inglês *structure-based drug discovery*), sendo o captopril (Figura 18) o primeiro fármaco obtido por essa via (LIMA, 2007).

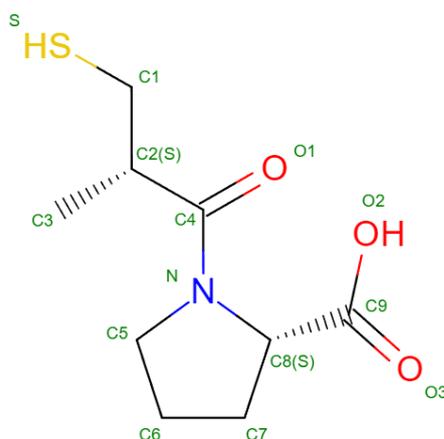


Figura 18 – Estrutura do fármaco captopril, fonte:(NOCEK et al., 2010), é inibidor enzimático, sua principal indicação é para o tratamento de hipertensão arterial. Ele também tem indicação para alguns casos de insuficiência cardíaca. O captopril foi o primeiro fármaco obtido por meio da nova técnica, resultado da pesquisa do veneno da cobra jararaca, conduzido por Sérgio Ferreira e colaboradores(AKIF et al., 2010).

A partir destes pilares, o conhecimento natural e molecular, juntamente com avanços tecnológicos, a indústria farmacêutica entrou em um novo momento, impulsionada pela elucidação de processos químicos e biológicos por meio da estrutura tridimensional de pequenas e macromoléculas. A maior parte dessas tecnologias fornece à comunidade científica grande diversidade de dados e informações que podem ser traduzidas em conhecimento químico e biológico, reunidas em grandes bancos de dados como *protein Data Bank* (BARREIRO et al., 2002).

Esses avanços deram origem à bioinformática, que incrementou a aplicação de estratégias de planejamento de fármacos. Os estudos dos processos evolutivos de reconhecimento molecular em sistemas biológicos assumem grande importância, pois constituem as bases fundamentais para o entendimento de propriedades como afinidade e seletividade, mostrando-se eficazes no manejo de dados e o conhecimento da topografia molecular tridimensional (3D) do receptor, especialmente do sítio de interação, permitindo o desenho de inibidores enzimáticos por processos de complementaridade molecular planejada de alvos moleculares e ligantes (RODRIGUES et al., 2012).

O papel desempenhado pela mecânica quântica e mecânica molecular, permite a interpretação de propriedades microscópicas, com informações em níveis atômicos e molecular (ARROIO et al., 2005). Portanto, a química computacional vem conquistando definitivamente seu espaço entre as metodologias que investigam os mais diversos fenômenos químicos (LEAL et al., 2010).

Neste intuito, a química computacional, junto à bioformática, contribui para o entendimento da noção tradicional de uma complementaridade entre a chave e a fechadura, inicialmente proposto por Emil Fischer, em 1894 (LICHTENTHALER, 1995). Esta complementaridade, em nível molecular, seria observada através de interações intermoleculares como: interações hidrofóbicas, interações de van der Waals, ligações de hidrogênio entre outras, sendo capazes de estabilizar a energia livre do complexo receptor-fármaco.

A habilidade de desenvolver modelos que predigam o reconhecimento molecular de uma molécula (ligante) por um determinado biorreceptor, impulsionou o desenvolvimento de *softwares* para triagem *in silico*, aplicando-se a abordagem conhecida como “*screening*” virtual. Esta estratégia visa acelerar o processo de identificação de ligantes, contribuindo para o processo da descoberta de fármacos (LIMA, 2007). As técnicas de triagem virtual, pela utilização de métodos computacionais, auxiliam na seleção de compostos orgânicos promissores como ligantes de alvos, tanto do ponto de vista farmacofórico como do ponto de vista de suas propriedades físico-químicas (JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Associados aos métodos de modelagem molecular, os métodos estatísticos conhecidos como quimiométricos são amplamente usados em processos quantitativos do planejamento molecular. O uso de descritores físico-químicos em correlações entre estrutura e propriedade, estão hoje embasados em informações tridimensionais que codificam a conformação molecular, e os planejamentos estatísticos, acessíveis pelos métodos computacionais (LEAL et al., 2010).

1.6 Objetivos

O objetivo desse trabalho é utilizar ferramentas computacionais para apontar semelhanças estruturais e eletrônicas entre os inibidores clássicos da leucemia mieloide crônica, como a presença de grupos comuns a todos os inibidores e modificações que cada nova geração pós-imatinibe trouxe e apontar as contribuições eletrônicas e estruturais trazidas por eles, na interação com proteína tirosina quinase BCR-ABL mutada.

No que se refere à proteína, estudar os sítios de ligação tentando determinar sua extensão, afim de mensurar por meio de técnicas híbridas, até qual distância do sítio ativo a mutação pode influenciar seu comportamento.

1.6.1 Objetivos Específicos:

- Por meio da ferramenta de *docking*, descrever as principais interações entre a proteína e a molécula do inibidor;
- Descrever o tipo e a distância da interação das oito moléculas avaliadas, entre elas estão inibidores: imatinibe, dasatinibe, nilotinibe, ponatinibe, niloH, niloCl, pontH e pontCl;
- Estudar as proteínas que estão na forma selvagem e mutada, onde a selvagem apresenta-se em duas conformações DFG-out e DFG-in;
- Comparar a ausência ou presença de interações em locais específicos da proteína e dos inibidores;
- Estudar regiões específicas de cada inibidor, comparando entre si, para traçar um padrão evolutivo, seguido no desenho das novas gerações de fármacos pós-imatinibe;
- Estudar a influência de descritores eletrônicos dos inibidores, nas interações com as proteínas, como orbitais de fronteira, cargas ChelpG, distribuição dos orbitais de fronteira no esqueleto das moléculas, interações não covalentes e NBO;
- Estudar, na proteína, os locais de ligação de cada inibidor clássico explorado, para entender como estes fatores impactaram a função de *score*.

2 METODOLOGIA

Nas últimas décadas, a química computacional vem conquistando definitivamente seu espaço entre as metodologias que investigam os fenômenos químicos. Essa conquista deve-se ao grande progresso das metodologias teóricas, assim como aos avanços tecnológicos na área de informática (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

Devido a estes progressos na área computacional e no desenvolvimento de eficientes algoritmos de cálculos, um grande avanço também foi verificado no desenvolvimento dos cálculos químico-quânticos. Cálculos químico-quânticos são, uma grande fonte de descritores moleculares que podem, em princípio, expressar muitas propriedades geométricas e eletrônicas das moléculas e suas interações. De fato, vários estudos recentes empregam descritores químico-quânticos isoladamente ou combinados com descritores convencionais (LEAL et al., 2010). Neste capítulo, serão descritos os métodos empregados neste trabalho, de uma forma resumida.

A química computacional tem apresentado resultados cada vez mais confiáveis sobre geometria molecular e outras propriedades, que são provenientes de experimentações químicas ou derivados de abordagens puramente teóricas, podendo ser obtidas através de métodos de mecânica molecular e de estrutura eletrônica, como o funcional da densidade (ARROIO; HONÓRIO; SILVA, 2010).

2.1 Equação Schrödinger

Foi em 1925 que o físico austríaco Erwin Schrödinger marcou o início da Mecânica Quântica moderna ao propor a famosa equação que hoje tem seu nome. Este trabalho resultou em seu Prêmio Nobel de Física em 1933 (SAUER; MAJER, 2009). Levando-se em consideração que estamos interessados em uma descrição de um sistema, em um estado estacionário, nós utilizamos a equação de Schrödinger independente do tempo (CUSTODIO et al., 2002). Neste sentido, a interpretação física é um postulado fundamental da mecânica quântica, onde a autofunção define o estado do sistema em cada posição espacial e temporal (DONG; XU, 2008).

A equação de Schrödinger independente do tempo é dada por:

$$\hat{H}|\Psi\rangle = \varepsilon|\Psi(\vec{r}, \vec{R})\rangle \quad (2.1)$$

Sendo \hat{H} o operador hamiltoniano, descrito na Equação 2.2 em unidades atômicas, Ψ a função de onda que descreve todo o sistema e E a energia de um dos estados desse sistema, que freqüentemente corresponde àquela do estado fundamental, ou seja, ao de menor

energia. As letras \mathbf{i} e \mathbf{j} são índices para os elétrons e $\mathbf{r}_{\mathbf{ij}}$ a distância elétron-elétron. As letras A e B referem-se aos núcleos, \mathbf{M}_A é a massa do núcleo, $\mathbf{r}_{\mathbf{iA}}$ a distância elétron-núcleo e \mathbf{R}_{AB} a distância entre os núcleos. O primeiro termo do operador Hamiltoniano é referente a energia cinética dos elétrons, o segundo termo desta equação refere-se a energia cinética dos núcleos. O terceiro termo é o potencial de atração entre os elétrons e o núcleo, com $\mathbf{r}_{\mathbf{iA}}$ a distância entre os elétrons \mathbf{i} e o núcleo A . O quarto termo é a energia potencial de repulsão entre os núcleos. O último termo é o potencial de repulsão entre os elétrons (OSTERMANN; PRADO, 2005).

$$\hat{H} = -\frac{1}{2} \sum_{i=1}^N \nabla_i^2 - \sum_{A=1}^M \frac{1}{2M_A} \nabla_A^2 - \sum_{A=1}^M \sum_{i=1}^N \frac{Z_A}{r_{iA}} + \sum_{A=1}^M \sum_{B>A}^M \frac{Z_A Z_B}{R_{AB}} + \sum_{i=1}^N \sum_{j>i}^N \frac{1}{r_{ij}} \quad (2.2)$$

Z_A número atômico do átomo A , Z_B é o número atômico do átomo B , R_{AB} , é a distância entre os núcleos A e B , ∇_i^2 e ∇_A^2 são os operadores Laplacianos em relação às coordenadas cartesianas de elétrons e núcleos, respectivamente.

2.1.1 Aproximação de Born-Oppenheimer

A aproximação de Born-Oppenheimer (BO) é a suposição de que o movimento de núcleos atômicos e elétrons em uma molécula podem ser separados. A abordagem tem o nome devido a Max Born e J. Robert Oppenheimer. Em termos matemáticos, permite que a função de onda de uma molécula seja quebrada em seus componentes eletrônicos e nucleares (vibracionais, rotacionais) (BAER, 2006).

$$\Psi_{total} = \Psi_{eletrônico} + \Psi_{nuclear} \quad (2.3)$$

A aproximação de Born-Oppenheimer, como é conhecida, trata-se de um argumento lógico para tentar solucionar parte do problema, ao impor a condição de fixos para a descrição do movimento eletrônico, núcleos levando em conta sua massa ser muito maior que a dos elétrons (cerca de 1836 vezes). Essa aproximação assume que os núcleos deslocam-se bem mais lentamente que os elétrons os quais adaptam-se instantaneamente a diferentes configurações no campo de núcleos fixos, qualquer deslocamento nuclear causa efeito quase que instantâneo sobre os elétrons (BAER et al., 1996).

A aproximação de Born-Oppenheimer consiste basicamente em resolver o operador Hamiltoniano da Equação 2.1 separando-o em duas partes, sendo uma de caráter eletrônico e a outra de caráter nuclear, ou seja, reescrevendo a Equação 2.2 (AVRON; ELGART, 1999).

2.1.2 Método Hartree-Fock

A origem do método de Hartree-Fock remonta ao final da década de 1920, logo após a descoberta da equação de Schrödinger de 1926. Em 1928, Douglas Hartree introduziu o chamado método do campo auto-consistente de Hartree (do inglês SCF) (NEST; KLAMROTH; SAALFRANK, 2005).

A aproximação de Hartree assume que a função de onda é o produto de orbitais mono-eletrônicos. Além disto, ainda há a aproximação do campo central, no qual cada elétron está sujeito a um potencial advindo da média do potencial de todos os outros elétrons. Em 1930, Slater e Fock mostraram que o método de Hartree dá a melhor função variacional. Slater e Fock apontaram a principal deficiência do método de Hartree, ao ter usado uma função de orbitais espaciais, sem levar em conta a antisimetria. Somente em 1930 é que Fock usou spin orbitais antisimetrizados, este é o chamado método de Hartree-Fock (FREITAS; OLIVEIRA, 2018).

O método Hartree-Fock, apesar de seu quadro fisicamente mais preciso, foi pouco utilizado até o advento dos computadores eletrônicos nos anos 50, devido à quantidade de cálculos a serem realizados. Inicialmente, tanto o método de Hartree quanto o método de Hartree-Fock foram aplicados exclusivamente aos átomos, onde a simetria esférica do sistema permitiu simplificar o problema (BARRETO, 2006).

O método Hartree-Fock (HF) é um método de aproximação para a determinação da função de onda e a energia de um sistema quântico de muitos corpos em um estado estacionário. A solução de Hartree-Fock é o ponto de partida central para a maioria dos métodos que descrevem o sistema de muitos elétrons com mais precisão, denominados métodos Pós-Hartree-Fock (MONTE; VENTURA, 2011).

O método de Hartree-Fock assume que a função de onda exata do sistema pode ser aproximada por um único determinante de Slater de N spin-orbitais. Pode-se derivar um conjunto de N equações acopladas para os orbitais de N spins. Uma solução dessas equações produz a função de onda de Hartree-Fock e a energia do sistema (BARRETO, 2006).

2.1.3 Teoria do Funcional da Densidade

A teoria do funcional da densidade (DFT) é um método computacional de modelagem empregado em diversos campos da ciência, química, biologia e ciência de materiais, para investigar a estrutura eletrônica de sistemas de muitos corpos, em particular átomos, moléculas e as fases condensadas. Usando esta teoria, as propriedades de um sistema de muitos elétrons podem ser determinadas utilizando densidade eletrônica (PITOŇÁK et al., 2008; DUARTE, 2001a).

A partir da década de 1970, a DFT mostrou-se, inicialmente, ser uma importante

ferramenta para a física de estado sólido (MOURIK; BüHL; GAIGEOT, 2014). Entretanto, somente começou a ter um uso mais consolidado na química, na década de 1990, quando aproximações do funcional de troca-correlação (XC) tornaram a DFT bastante precisa, principalmente impulsionados pelo método do gradiente generalizado (generalized gradient approximations, GGA) (PERDEW et al., 1992).

Embora a teoria do funcional da densidade tenha suas raízes no modelo de Thomas-Fermi para a estrutura eletrônica de materiais, a DFT foi primeiramente colocada em uma base teórica sólida por Walter Kohn e Pierre Hohenberg, no contexto dos dois teoremas de Hohenberg-Kohn (H-K). Os teoremas originais de H-K foram definidos apenas para estados fundamentais não degenerados na ausência de um campo magnético.

O primeiro teorema de H-K demonstra que as propriedades do estado fundamental de um sistema de muitos elétrons são determinadas unicamente por uma densidade de elétrons, que depende apenas de três coordenadas espaciais (COSTA et al., 2018).

O segundo teorema de H-K define uma energia funcional para o sistema e prova que a densidade eletrônica exata do estado fundamental minimiza essa energia funcional (TONELLI, 2006).

Em um trabalho que mais tarde lhes valeu o prêmio Nobel de química, o teorema de H-K foi desenvolvido por Walter Kohn e Lu Jeu Sham para produzir os denominados orbitais de Kohn-Sham DFT (KS DFT). Dentro dessa estrutura, o intratável problema de muitos corpos de elétrons interagentes em um potencial externo estático é reduzido a um problema tratável de elétrons não-interativos movendo-se em um potencial efetivo. O potencial efetivo inclui o potencial externo e os efeitos das interações de Coulomb entre os elétrons, por exemplo, as interações de troca e correlação de elétrons. Modelar os dois últimos termos é a dificuldade dentro da KS DFT. A aproximação mais simples é a aproximação de densidade local (LDA), que é baseada na energia de troca exata para um gás de elétrons uniforme, que pode ser obtido do modelo de Thomas-Fermi, e da energia de correlação para um gás de elétrons uniforme. Sistemas não interagentes são relativamente fáceis de resolver. Além disso, a energia cinética de tal sistema é conhecida exatamente. A parte de troca-correlação da energia total funcional permanece desconhecida e deve ser aproximada (DUARTE, 2001a).

Como de costume, nos cálculos de estrutura eletrônica de muitos corpos, os núcleos das moléculas ou aglomerados tratados são vistos como fixos (a aproximação de Born-Oppenheimer), gerando um potencial externo estático V no qual os elétrons estão se movendo (BARRETO, 2006).

2.1.3.1 Aproximações de densidade local (LDA)

São uma classe de aproximações para a energia de troca e correlação (XC). Muitas abordagens podem produzir aproximações locais para a energia XC. No entanto, aproximações locais extremamente bem-sucedidas são aquelas que foram derivadas do modelo homogêneo de gás de elétron (HEG). A este respeito, LDA é geralmente sinônimo de funcionais baseados na aproximação HEG, que são então aplicados a sistemas realistas (moléculas e sólidos) (DUARTE, 2001b).

Em geral, para um sistema não polarizado de spin, uma aproximação de densidade local para a energia de troca e correlação é escrita como

$$E_{xc}^{\text{LDA}}[\rho] = \int \rho(\mathbf{r}) e_{xc}(\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} , \quad (2.4)$$

em que ρ é a densidade eletrônica e e_{xc} é a energia de troca e correlação por partícula de um gás de elétron homogêneo de densidade de carga ρ . A energia de troca e correlação é decomposta em termos de troca e correlação linearmente.

2.1.3.2 Aproximação do Gradiente Generalizado (GGA)

Se a densidade eletrônica não for uniforme, a aproximação LDA não descreve bem os sistemas reais, já que os elétrons estão sujeitos a variação espacial do campo elétrico dos núcleos e se repelem mutuamente. Nesse contexto, surge a aproximação GGA (do inglês, Generalized Gradient Approximation) que considera a variação espacial da densidade ao propor o funcional de troca e correlação que depende da densidade, $\rho(\vec{r})$, e do gradiente da densidade $\nabla\rho(\vec{r})$, Genericamente (ASSADI; HANAOR, 2013):

$$E_{xc} \approx E_{xc}^{\text{GGA}}[\rho] = \int f(\rho(\mathbf{r}), \nabla\rho(\mathbf{r})) d\mathbf{r} \quad (2.5)$$

Existem várias escolhas para a função f e isso implica em diferentes aproximações GGA, como os funcionais PBE (proposto por J. P. Perdew, Kieron Burke e Matthias Ernzerhof em 1996) e BLYP (que combina o funcional de troca proposto por A. D. Becke (1988) com o funcional de correlação formulado no mesmo ano por C. Lee, W. Yang e R. Parr). As aproximações GGA descrevem bem as ligações químicas, mas falham na descrição de interações fracas como as forças de van der Waals (MOURIK; GDANITZ, 2002). Neste caso, uma das soluções mais usadas são as correções de Grimme (GRIMME et al., 2010).

São uma classe de aproximações para o funcional de energia de troca-correlação na teoria do funcional de densidade (DFT), que incorpora uma porção de troca exata da teoria Hartree-Fock com o resto da energia de correlação de outras fontes (ab initio ou empírica). Uma das versões mais comumente usadas é B3LYP (ZHAO; TRUHLAR, 2006).

A abordagem híbrida para construir aproximações funcionais de densidade foi introduzida por Axel Becke em 1993. A hibridização com troca Hartree-Fock (HF) (também chamada de troca exata) fornece um esquema simples para melhorar o cálculo de muitas propriedades moleculares, como energias de atomização, comprimentos de ligação e frequências de vibração (ZHAO; TRUHLAR, 2007).

2.1.3.3 Funções de Base

- **Funções Hidrogenóides**

Nos primeiros anos de desenvolvimento computacional dos programas a serem utilizados para resolver as equações de Hartree-Fock, a escolha pelo tipo de função de base recaiu naturalmente sobre as funções hidrogenóides, uma vez que haviam sido obtidas como solução exata da equação de Schrödinger para átomos monoelétrônicos e correspondiam a funções orbitais para esses átomos (MORGON; CUSTÓDIO, 2001).

- **Funções de Slater**

Um dos primeiros casos de funções de base bem sucedidas, no sentido de simplificar a determinação das integrais de energia foram as funções de Slater. Estas funções apresentam uma certa semelhança com as funções hidrogenóides. Uma das diferenças entre os dois tipos de funções está relacionada ao tipo de potencial que possibilitou o seu desenvolvimento. Outro aspecto que diferencia as funções hidrogenóides das funções de Slater está no fato de que as primeiras são funções ortogonais, enquanto que as funções de Slater correspondem a funções não-ortogonais (MORGON; CUSTÓDIO, 2001).

- **Funções Gaussianas**

Funções de Slater não permitem uma resolução analítica e rápida das integrais de dois elétrons de mais de um centro ou ainda integrais de atração nuclear de três centros. Para contornar o problema da solução analítica de integrais de energia, funções do tipo gaussiana (Gaussian Type Orbitals - GTO) foram introduzidas (MORGON; CUSTÓDIO, 2001).

- **Funções de Polarização**

As funções de polarização auxiliam na descrição das distorções da nuvem eletrônica em ambiente molecular, importantes na descrição das ligações químicas, e correspondem a funções adicionais com momento angular diferente daquele apresentado pela base original. Por exemplo, para o átomo de carbono uma função de base convencional incluiria apenas funções de base do tipo s e p. A inclusão de funções de polarização corresponderia a inclusão de funções do tipo d, f, g, etc (MORGON; CUSTÓDIO, 2001).

- **Funções difusas**

Um outro conjunto de funções usualmente incluído em cálculos moleculares é o das funções difusas. Ao contrário das funções de polarização que alteram significativamente diversas propriedades moleculares, este conjunto é normalmente necessário para o cálculo de propriedades de ânions. Como mencionado anteriormente, as funções de base são frequentemente desenvolvidas em sistemas atômicos neutros. Quando são utilizadas em sistemas aniônicos, a nuvem eletrônica desses sistemas apresenta uma tendência à expansão, além do que, a descrição do comportamento deste elétron adicional não havia sido contemplada na obtenção do conjunto de base atômica. Uma vez que a facilidade com que a distribuição eletrônica tem de expandir-se está diretamente relacionada ao conjunto de base utilizado, pode-se verificar que o conjunto de base original deve ser aumentado na região de valência, ou seja, devem ser incluídas funções de base do mesmo tipo das funções já existentes, mas com expoentes que descrevam melhor a região de valência (MORGON; CUSTÓDIO, 2001).

2.1.4 Métodos Semiempíricos

Os métodos semiempíricos em química quântica são baseados no formalismo Hartree-Fock, mas utilizam várias aproximações e empregam alguns parâmetros obtidos a partir de dados experimentais. São muito importantes na química computacional por serem adequados ao tratamento de grandes moléculas, onde a aplicação do método Hartree-Fock é computacionalmente cara ou não factível. O uso de parâmetros empíricos surgiu para permitir inclusão de alguns efeitos de correlação (STEWART, 2004).

Os métodos semiempíricos sucedem aos chamados métodos empíricos, onde o termo de dois elétrons do Hamiltoniano não está incluído de forma explícita. Para os sistemas com elétrons π foi bastante utilizado o método de Hückel, proposto por Erich Hückel. Para os sistemas com elétrons de valência é empregado o método de Hückel estendido, proposto por Roald Hoffmann (STEWART, 2004).

Algumas informações (como integrais de dois elétrons) são às vezes aproximadas ou completamente omitidas. Para corrigir essa perda, métodos semi-empíricos são parametrizados, ou seja, seus resultados são ajustados por um conjunto de parâmetros, normalmente de modo a produzir resultados que melhor concordem com dados experimentais, e/ou com resultados *ab initio* (JUNIOR et al., 2009). Os métodos/parametrizações semiempíricos derivados da aproximação NDDO de Pople, mais utilizados, são MNDO, AM1, PM3, PM5, PM6, RM1, e PM7. Trataremos a seguir dos dois mais bem sucedidos, o PM3 e o PM6 (STEWART, 2012).

PM3

PM3, ou Método Paramétrico 3, é um método semiempírico para o cálculo quântico da

estrutura eletrônica molecular em química computacional. Baseia-se na aproximação NDDO (do inglês Neglect of Differential Diatomic Overlap) devido a John Pople. O método PM3 usa o mesmo formalismo e equações que o método AM1. As únicas diferenças são:

1. O PM3 usa duas funções gaussianas para a função de repulsão central, em vez do número variável usado pelo AM1 (que usa entre um e quatro gaussianos por elemento)
2. Os valores numéricos dos parâmetros são diferentes. As outras diferenças estão na filosofia e na metodologia utilizadas durante a parametrização: enquanto o AM1 retira alguns dos valores dos parâmetros das medições espectroscópicas, o PM3 os trata como valores otimizáveis.

O método foi desenvolvido por J.J.P Stewart e publicado pela primeira vez em 1989. Ele é implementado no programa MOPAC (cujas versões mais antigas são de domínio público) (STEWART, 1989).

PM6

O PM6 é um método semiempírico desenvolvido recentemente, que segue a tradição de outros métodos NDDO, como MNDO, AM1, PM3, SAM1 e PM5. Embora enfatize levemente os sistemas bioquímicos na parametrização, o PM6 é um modelo de uso geral de boa qualidade (BHULLAR et al., 2009). O desempenho geral do PM6 é melhor que o do AM1, PM3 ou RM1 para sistemas tradicionais. Resultados de qualidade semelhante são obtidos para potenciais de ionização, momentos dipolares e geometrias (ŘEZÁČ; HOBZA, 2011).

2.1.5 Campo de Força

Com base na Mecânica Molecular (MM), as moléculas são tratadas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças Newtonianas, ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas é referido como “campo de força”. O campo de força empírico, tal como é conhecido como uma função energia potencial, permite que a energia potencial total do sistema, $V(r)$, seja calculada a partir da estrutura tridimensional (3D) do sistema. $V(r)$ é descrito como a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (interações de van der Waals e de Coulomb) (NAMBA; SILVA, 2008). Um típico campo de força é representado pela Equação 2.6:

$$V(r) = \Sigma V_{Ve} + \Sigma V_{\theta} + \Sigma V_{vdW} + \Sigma V_{elec} \quad (2.6)$$

Em que, $V(r)$ é a energia total de estiramento da ligação em relação a seu valor de equilíbrio (ou ideal), V_e é a energia de deformação do ângulo de ligação em relação a seu valor de equilíbrio, V_{θ} é a energia devido à torção em torno de uma ligação, V_{vdw} representa a energia das interações de van der Waals e V_{elec} representa as energias de atração ou repulsão eletrostática entre duas cargas (NAMBA; SILVA, 2008). A forma padrão para representar os potenciais harmônicos devido às oscilações dos comprimentos e ângulos de ligação com relação aos valores de equilíbrio é a utilização da Lei de Hooke (CASEWIT; COLWELL; RAPPE, 1992), mostrada nas equações 2.7 e 2.8:

$$V_l = K_l(l - l_0)^2 \quad (2.7)$$

$$V_{\theta} = K_{\theta}(\theta - \theta_0)^2 \quad (2.8)$$

em que l e θ são os comprimentos e ângulos de ligação, respectivamente, l_0 e θ_0 são os correspondentes valores de equilíbrio e K_l e K_{θ} as constantes de força para a restituição aos respectivos valores de equilíbrio. A aproximação harmônica é válida somente para pequenas distorções com relação aos valores de equilíbrio (RAPPE et al., 1992; ADDICOAT et al., 2014).

A forma funcional padrão para representar o potencial de energia para uma torção está mostrada na Equação 2.9:

$$V_{\phi} = \frac{V_n}{2}(1 + \cos(n\phi - \gamma)) \quad (2.9)$$

Em que V_n é a barreira de energia para a torção, n é o número de máximos (ou mínimos) de energia em uma torção completa, ϕ é o ângulo diedro e γ é o ângulo de fase (defasagem no ângulo diedro que pode gerar um ponto de mínimo ou de máximo na posição $\phi = 0$) (NAMBA; SILVA, 2008).

O número de campos de força desenvolvidos para aplicação em moléculas biologicamente interessantes é consideravelmente grande, provavelmente por causa da maior complexidade das interações que envolvem grupos iônicos e polares em solução aquosa (DICKSON et al., 2014).

A simulação de moléculas biológicas depende da precisão e campos de força confiáveis que reproduza a condição observada. Para habilitar simulações de grandes biomoléculas, funções empíricas de energia potencial foram criadas, usando princípios de mecânica molecular. Essas funções potenciais foram desenvolvidas nas últimas quatro décadas para permitir a simulação rápida e precisa de resíduos de aminoácidos e ácidos nucleicos (ADURI et al., 2007).

A aplicação de modelos baseados em computador, usando funções analíticas de energia potencial, dentro da estrutura da mecânica clássica, tem se mostrado uma ferramenta cada vez mais poderosa para estudar moléculas de interesse bioquímico. Essas aplicações da mecânica molecular empregaram minimização de energia, dinâmica molecular e métodos de Monte Carlo para mover-se nas superfícies de energia potencial analítica. Tais métodos têm sido usados para estudar uma ampla variedade de fenômenos, incluindo moléculas orgânicas, estrutura e dinâmica de líquidos simples e complexos, termodinâmica da ligação do ligante a proteínas e transições conformacionais em ácidos nucleicos (MEAGHER; REDMAN; CARLSON, 2003).

Em princípio, eles são capazes de fornecer uma visão de todo o espectro de interações não covalentes entre as moléculas e, quando combinados com cálculos de estrutura eletrônica da mecânica quântica, modelar mudanças de ligações covalentes, essencialmente todas as interações moleculares. Dada a sua importância, muito esforço foi despendido em consideração, tanto da forma funcional como dos parâmetros que devem ser estabelecidos para aplicar tais funções analíticas de energia potencial (ou “campos de força”) (CORNELL et al., 1995).

O uso de parâmetros empíricos permite que eles (em casos favoráveis) modelem mudanças conformacionais e energias de interação não covalentes com muita precisão. Um campo de força bem-sucedido no projeto de drogas deve funcionar bem, tanto para as moléculas biológicas quanto para as moléculas orgânicas que interagem com elas. Entre eles temos o campo de força AMBER desenvolvido por grupos de pesquisadores de diferentes instituições. O campo de força Amber funciona para a maioria das moléculas farmacêuticas (WANG et al., 2004).

AMBER é um campos de força amplamente utilizados na simulação de moléculas que possuem os parâmetros necessários para o nucleosídeos e aminoácidos comuns, fosfatos e ácidos nucleicos (ADURI et al., 2007).

2.1.6 NBO

Método de orbital natural de ligação (NBO) refere-se a um conjunto de algoritmos matemáticos para analisar as funções de ondas eletrônicas na linguagem de ligações químicas localizadas semelhantes a Lewis. Nestes métodos, as propriedades moleculares são expressas em termos de uma representação da estrutura natural de Lewis (NLS) da função de onda, em correspondência direta com o diagrama de pontos elementar de Lewis. Cada par solitário de um centro (1c) ou ligação de dois centros (2c) está associado a um membro de Lewis do conjunto ortonormal completo de NBOs. Enquanto o restante, as NBOs não-Lewis (tipo NL) descrevem efeitos de deslocalização de ressonância residual (desvios da representação idealizada do tipo NBOs), fornecendo assim uma ponte entre a moderna tecnologia de função de onda e os conceitos elementares de valência e ligação

([GLENDENING; LANDIS; WEINHOLD, 2011](#)).

O objetivo geral dos métodos da NBO é traduzir cálculos precisos em percepção química. Tais visualizações são formuladas em termos de conceitos de ligação comumente entendidos, como

- Carga atômica
- Estrutura de Lewis
- Tipo de ligação
- Hibridação
- Ordem de ligação
- Transferência de cargas
- Ressonância entre outros

A análise NBO é um importante método para estudar as interações intra e inter moleculares. NBO oferece informações necessárias sobre a transferência de carga ou interação nos sistemas moleculares. A perturbação de segunda ordem da matriz na base NBO fornece a energia associada à interação entre os orbitais naturais doadores (orbitais ocupados) e receptores de carga (orbitais desocupados). Para cada orbital NBO doador (i) e receptor (j), a energia E(2) associada com a transferência de carga (do inglês, *charge transfer CT*) é dada por ([GANGADHARAN; KRISHNAN, 2015](#)):

$$E(2) = \Delta E_{CT} = -n_i \frac{\langle i | \hat{F} | j \rangle^2}{\varepsilon_j - \varepsilon_i} \quad (2.10)$$

em que ε_i e ε_j são energias dos orbitais NBO, n_i refere-se a ocupações eletrônicas, e $\langle i | \hat{F} | j \rangle$ é o elemento de matriz do operador de Fock. Quanto maior o valor de E(2) maior a interação entre os orbitais doadores e receptores de elétrons([GHIASI; MOKARAM, 2012](#); [GANGADHARAN; KRISHNAN, 2015](#)).

2.1.7 Métodos QM/MM e ONIOM

Técnicas de simulações computacionais desempenham um papel substancial em fornecer abordagens teóricas para a exploração de mecanismos em sistemas biológicos. A dificuldade em realizar a investigação teórica em sistemas biológicos em nível eletrônico, deve-se ao grande número de átomos envolvidos, chegando aos milhares ([BRUNK; ROTH LISBERGER, 2015](#)). Tornando o custo computacional intagenciável ([MASERAS; MOROKUMA, 1995](#)).

Uma alternativa a este problema são os métodos híbridos usando mecânica quântica e mecânica molecular QM/MM. Com estes métodos é possível dividir o sistema em duas camadas, podendo delimitar a parte de estudo de maior interesse, e submetê-la a um maior rigor computacional, sem perder informação do todo, pois o restante do sistema pode ser tratado com menor rigor computacional (MORZAN et al., 2018).

A ideia básica do QM/MM (Figura 19) é usar um método QM (mecânica quântica) para a região quimicamente ativa (por exemplo, substratos e cofatores) e combiná-lo com um tratamento MM (mecânica molecular) para o entorno (por exemplo, a proteína completa e solvente). Como as duas regiões geralmente (fortemente) interagem, não é possível escrever a energia total de todo o sistema simplesmente como o somatório das energias dos subsistemas. Termos de acoplamento devem ser considerados, e é necessário tomar cuidado na fronteira entre os subsistemas, especialmente se corta ligações covalentes. A forma dos termos de acoplamento e os detalhes do tratamento de limite definem um esquema QM/MM específico (BRUNK; ROTH LISBERGER, 2015).

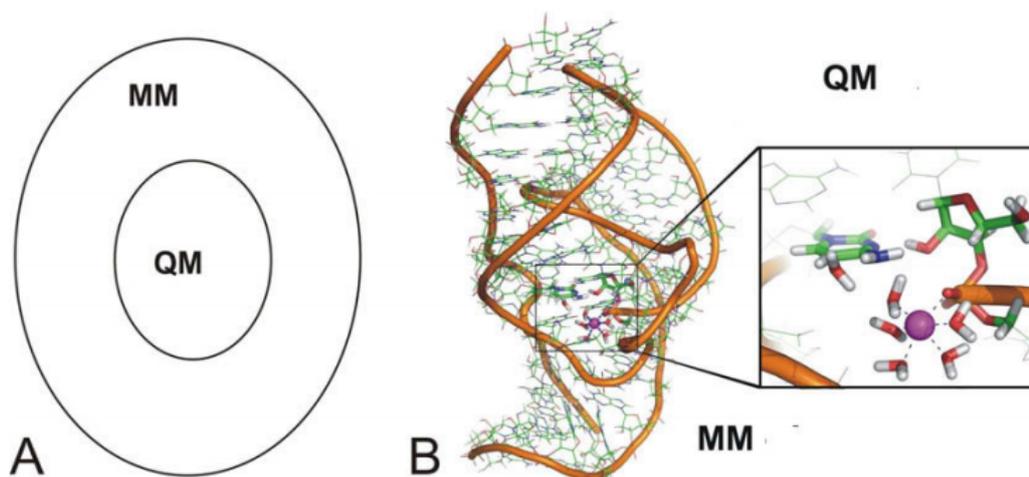


Figura 19 – Princípio de QM / MM. (A) Uma abordagem típica de QM/MM divide o sistema estudado em um núcleo de QM e um MM circundante. (B) A parte tratada com MM é mostrada na representação de linha, o núcleo QM é destacado por sticks. Moléculas de água da parte MM fonte: (WALTER; OTYEPKA, 2009).

Os métodos compostos surgiram na década de 1980 com o objetivo de obter uma energia eletrônica para uma dada geometria molecular de equilíbrio de forma aditiva, ou seja, somando termos vindos de cada parte do cálculo. Atualmente, existe uma grande variedade desses métodos (HEERDT; MORGON, 2011). A forma de adição da energia é dada nas equações 2.11.

Os métodos híbridos combinam dois ou mais métodos computacionais em um cálculo, permitindo a exploração precisa de sistemas muito grandes como proteínas, que

combinam um método da mecânica quântica (QM) com um método de mecânica molecular (MM) (MASERAS; MOROKUMA, 1995).

Desde o seu surgimento, devido aos resultados confiáveis para as quantidades termoquímicas e ao tempo computacional reduzido, o número de aplicações desses métodos cresceu rapidamente. Dentre as propriedades que podem ser estudadas por esses métodos estão: afinidades por próton, energias de ionização, entalpias de formação, energias de dissociação, energias de atomização, afinidades por elétron, dentre outras (HEERDT; MORGON, 2011).

$$E = E^{QM}(QM) + E^{MM}(QM + MM) - E^{MM}(QM) \quad (2.11)$$

em que E (QM) é a energia QM da região QM, E (MM) é a energia MM da região MM e E (QM / MM) é a energia de interação entre os dois sistemas.

A primeira implementação desta nova geração de métodos ficou conhecida como *IMOMM* (do inglês, *Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*). Após o sucesso desse método, novos estudos foram feitos para se obter maior versatilidade nos cálculos de estrutura eletrônica. Surgiu, então, o método *ONIOM* (do inglês *Our own n-layered Integrated Molecular Orbital and Molecular Mechanics*), que pode ser descrito como uma superposição de cálculos como as camadas de uma “cebola”. O esquema teórico desse método é baseado na divisão de um sistema molecular em diferentes níveis. Cada parte pode ser tratada sobre qualquer nível de cálculo e ao integrar-se os resultados obtidos nestas partes, obtém-se uma extrapolação atingindo valores de energia mais precisos sobre todo o sistema (HEERDT; MORGON, 2011).

O método *ONIOM* pode combinar métodos mecanico-quântico, bem como os métodos da mecânica molecular. A região do sistema onde o processo químico ocorre, por exemplo quebra da ligação de formação, é tratada com um método mais preciso de maior custo computacional, enquanto o restante do sistema pode ser tratado em um nível inferior (REIHER, 2007).

Os métodos híbridos QM/MM e QM/QM parecem ser muito semelhantes, mas Combinações QM/QM podem ser ainda mais poderosas porque também eletrônicas os efeitos podem cruzar a fronteira (VREVEN; MOROKUMA, 2006).

2.1.8 Docking Molecular

O *docking* (Figura 20) é um procedimento capaz de pesquisar o espaço conformacional do ligante e a sua posição e orientação no local de interação, por meio de uma função de pontuação. A função de pontuação deve ser precisa o suficiente para reconhecer, em um tempo razoável, o modo correto de interação entre todos os modos visitados (LIU et al., 2018) (CHENNA, 2003).

No campo da modelagem molecular, o *docking* é um método que prevê a orientação energeticamente favorável de uma molécula, de forma rápida, dentro do complexo receptor-ligante. O conhecimento da orientação preferida, por sua vez, pode ser utilizado para prever a afinidade de ligação entre duas moléculas. Resumindo, *docking* é um termo de procedimentos para encontrar a melhor correspondência entre duas moléculas: um receptor e um ligante (LENGAUER; RAREY, 1996).

O primeiro programa computacional desenvolvido para análise da superfície da proteína tinha como base as interações de van der Waals. Este parâmetro é usado atualmente com o complemento de outros termos de interações. O programa pioneiro utilizado em ancoragem molecular foi o DOCA(JORGENSEN, 1991).

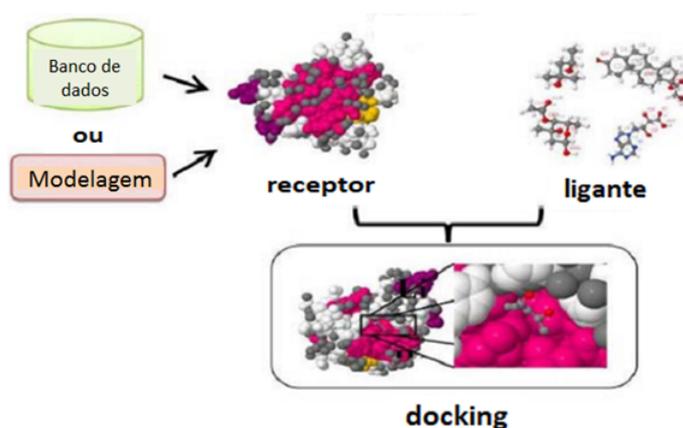


Figura 20 – Esquema da técnica de *docking* molecular, adaptado de:(CHAUDHARY; MISHRA, 2016)

Um dos maiores problemas enfrentados em *docking* molecular é a flexibilidade da proteína, que gera um número grande de graus de liberdades a serem explorados, e resulta em um esforço computacional alto. A flexibilidade da proteína pode estar associada a diferentes tipos de movimentos, tais como movimentos locais (como o movimento de cadeias laterais de resíduos de aminoácidos localizados no sítio de ligação), movimentos de média escala (como o rearranjo de alças ou reposicionamento de hélices) e movimentos de grande escala, associados a movimentos de domínios da proteína (MENG; SHOICHET; KUNTZ, 1992).

2.1.9 Principais interações moleculares

Nos últimos anos, a química e biologia deram muita atenção para compreender os vários tipos de interações e seus impactos no arranjo intermolecular e intramolecular. Interações como: cátion- π ; π - π ; ligação de hidrogênio entre outras, se destacam na

investigação de sistemas biológicos, usando os métodos de ancoragem molecular entre outros (SONY; PONNUSWAMY, 2006).

1. **cátion**– π .

Embora essa interação tenha sido notada há mais de três décadas, seu significado e importância foram firmemente estabelecidos nos últimos anos. A interação cátion– π é essencialmente de origem eletrostática, um cátion carregado positivamente interage com a nuvem eletrônica do sistema. Caracteriza-se como interação forte, podendo também ser relativamente menos intensa, dependendo da natureza do cátion (VIJAYSRINIVASAN; KANNAN; ROY, 2012).

Estudos deste tipo de interação mostram, por exemplo, que interações de resíduos de aminoácidos carregados positivamente, como Lys, Arg, Asn, Gln e His, estando localizados até 6 Å de distância dos centróides do anel dos resíduos aromáticos de Phe, Tyr e Trp, são considerada de origem eletrostática (BURLEY; PETSKE, 1986).

2. π – π

As interações do tipo π – π influenciam o enovelamento proteico e consolida a interação ligante-receptor, e são fundamentais para estabilizar a estrutura do DNA e do RNA. Estas interações freqüentemente ocorrem em geometrias paralelas. Contudo, normalmente, os anéis aromáticos não são estritamente cofaciais (configuração "sanduíche"), mas são deslocados. As estruturas sanduíche permaneceram populares em estudos teóricos porque são geometricamente mais simples, assim como a configuração perpendicular ("em forma de T"). Ambas as configurações de tipo paralelo e perpendicular (e configurações intermediárias) são freqüentemente observadas em sistemas biológicos (MARTINEZ; IVERSON, 2012).

3. **Ligação de hidrogênio**

É uma interação intensamente estudada na física, química e biologia, e seu significado é notável (TAYLOR; KENNARD; VERSICHEL, 1984). Acredita-se que a ligação de hidrogênio seja majoritariamente, um fenômeno eletrostático. A ligação de hidrogênio é classicamente descrita como a interação que ocorre entre um átomo de alta eletronegatividade e o átomo de hidrogênio, um próton com baixa densidade de elétrons, ligado covalentemente a um átomo com eletronegatividade acentuada (como oxigênio, nitrogênio e flúor) (LIU et al., 2011).

2.1.10 Mapa de potencial eletrostático (MEP)

A análise do mapa de potencial elétrico (MEP) desempenha uma função relevante no projeto de novos fármacos (LAKSHMINARAYANAN et al., 2021). O potencial eletrostático

de uma molécula é um guia na avaliação da reatividade. O MEP é normalmente visualizado através do mapeamento de seus valores na superfície, refletindo os limites das moléculas (ANNIBALE et al., 2007).

2.2 Análise de Componente Principal (PCA)

Com a crescente sofisticação das técnicas instrumentais de análise química, impulsionada pela disponibilidade de microprocessadores e microcomputadores no laboratório, técnicas de tratamentos de dados mais complexas, do ponto de vista matemático e estatístico, tornaram-se possível de serem tratadas (SENA et al., 2000).

A análise de dados é uma parte essencial em todo experimento, sendo univariada, quando somente uma variável é medida sistematicamente para várias amostras. Há muito tempo, a estatística univariada vem sendo aplicada a problemas químicos, mas a sua utilização tornou-se limitada. Nas últimas décadas, a análise multivariada foi introduzida no tratamento de dados químicos, ganhando rapidamente popularidade (SENA et al., 2000)

A análise por componentes principais (PCA) é um dos métodos mais comuns empregados na análise de dados, sendo principalmente utilizada pela sua capacidade de compressão dos dados, em função da existência de correlação entre diversas variáveis medidas. Quando aplicamos um algoritmo de PCA num conjunto de variáveis, o conjunto original destas variáveis é substituído por um novo conjunto de variáveis denominado de Componentes Principais (CPs). A principal característica deste novo conjunto é a ortogonalidade, porém o mesmo é facilmente reconstruído a partir da combinação linear das variáveis originais. Como vantagem, o novo conjunto de variáveis (CPs), geralmente concentra a maior parte da informação (variância) em poucas variáveis, diminuindo assim a dimensionalidade dos dados, sem perda significativa da informação química (SABIN; FERRÃO; FURTADO, 2004).

2.2.1 *Heatmap*

É uma técnica de visualização de dados que mostra a magnitude de um fenômeno como cor em duas dimensões. A variação na cor pode ser por matiz ou intensidade, dando pistas visuais óbvias ao leitor sobre como o fenômeno está agrupado ou varia no espaço (HARROWER; BREWER, 2003).

Para visualização, o representante gráfico mais popular tem sido o mapa de calor agrupado. Este compacta grandes quantidades de informações em um pequeno espaço para trazer à tona padrões nos dados. Nos primeiros 10 anos de uso desta ferramenta, foram mais de 4000 artigos publicados, principalmente nas áreas biomédicas e biológicas (WILKINSON; FRIENDLY, 2009).

Muitos esquemas de cores diferentes podem ser usados para ilustrar o mapa de calor, com vantagens e desvantagens de percepção para cada um (CRAMERI; SHEPHARD; HERON, 2020). O mapa de calor do cluster é um mosaico retangular de uma matriz de dados com aglomerados de árvores anexados às suas margens. Dentro de uma área de exibição compacta, facilita-se a inspeção de linha, coluna e estrutura conjunta do cluster (BORKIN et al., 2011).

2.3 Procedimentos Computacionais

2.3.1 Preparo da proteína para o *Docking* molecular

A estrutura 3D da proteína tirosina quinase foi obtida do banco de dados de proteínas *Protein Data Bank*¹, onde é possível escolher: resolução, sequência completa ou parcial da proteína, inibidores específicos complexados com a proteína, entre outros. O critério usado foi a melhor resolução juntamente com inibidor específico. Para a forma selvagem da proteína², foi selecionado o PDB código 1OPJ. Para o caso da mutação, foi utilizado o PDB 3Ik3. A 1OPJ, apresenta resolução de 1,75 Å método de difração de raio X, complexada com inibidor imatinibe, já a 3IK3 apresenta uma mutação no resíduo T315I, resolução 1,90 Å, assim como a 1OPJ foi resolvida com o método de difração de raio X, entretanto, complexada com inibidor ponatinibe.

A proteína mutada T315I representa a mutação da treonina (Thr315) pela isoleucina na posição 315. Foi depositada no banco em duas cadeias A e B, sendo a cadeia B mais completa. Tanto a estrutura da forma selvagem como a mutada foram conferidas para certificar que nenhuma parte importante estivesse faltando, alguns como por exemplo átomos pesados faltantes, átomos leves como hidrogênio, foram adicionados. A avaliação do RMSD (do inglês "root mean square deviation") foi executado para observar o alinhamento das estruturas(1OPJ, 3IK3 e 3QRJ).

2.3.2 Preparo dos inibidores

Os inibidores selecionados foram os 4 de maior uso no controle da LMC (LOPES; ABREU, 2009), são eles: imatinibe; dasatinibe; nilotinibe e ponatinibe. Para o nilotinibe e ponatinibe, foram analisadas as moléculas com e sem modificações estruturais. As modificações foram feitas ao substituir o fragmento trifluorometilo por fragmento de metila e triclorometila, gerando, assim, um total de 8 moléculas a serem analisadas. As moléculas substituídas foram identificadas como: niloH, niloCl, pontH e pontCl. O objetivo desta

¹ *Protein Data Bank* tem informações sobre as formas 3D de proteínas, ácidos nucleicos e conjuntos complexos que ajudam estudantes e pesquisadores a entender todos os aspectos da biomedicina e agricultura entre outros. <https://www.rcsb.org>.

² Neste documento a forma selvagem refere-se a proteína sem mutações

substituição é avaliar a importância destes grupos na ativação da molécula nos alvos selecionados.

As estruturas dos quatro inibidores foram obtidas por meio do banco de dados de estruturas ZINC database. As quatro moléculas desenvolvidas a partir de modificações feitas nas moléculas de nilotinibe e ponatinibe, foram obtidas por meio do *software* Avogadro. O *software AutoDock* foi usado para parametrizar e adicionar átomos de hidrogênios. A molécula de imatinibe e ponatinibe foram protonadas no nitrogênio do anel da piperazina. Dasatinibe e nilotinibe foram calculadas na forma neutra.

2.3.3 Docking

Para o estudo de *Docking* usando o pacote *AutoDock Vina* (SANDEEP et al., 2011). Os passos seguidos neste procedimento foi: usando o *software AutoDock Tools*, retiradas moléculas de água, resultante da cristalização da proteína. Em seguida retiramos a molécula do ligante e adicionamos hidrogênios faltantes. Com a proteína preparada, precisamos delimitar a busca do ligante no receptor. Para isso, dentro deste *software*, usamos a ferramenta GridBox, que permite visualizar as coordenadas espaciais da caixa onde ligante deve interagir com a proteína. Com estas coordenadas foi criado o arquivo conf.txt, essencial para rodar o programa *AutoDock Vina*, para cada uma das duas proteínas, 1OPJ e 3IK3.

Realizado o *docking* das 8 moléculas com a proteína selvagem 1OPJ e a proteína mutada 3IK3 (código PDB). O melhor encaixe de cada molécula na proteína, foi escolhido para a análise das interações. A visualização foi feita com o *software Discovery Studio*. Na análise de interações, foi observado o tipo de interação e distância de interação receptor-inibidor.

2.4 Estudo Eletrônico

O estudo de estrutura eletrônica dos TKIs foi realizado com o funcional B3LYP, com a função base de cálculos 6-311+G(d,p). As moléculas foram otimizadas, e o cálculo de frequência, possibilitou caracterizar o mínimo de energia. Foram realizados cálculos de cargas por meio do método ChelpG (do inglês, "Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method") e orbitais naturais (Natural bond Orbitals - NBO).

Os cálculos foram realizados usando o pacote *GAUSSIAN G09* (FRISCH et al., 2009). Para visualização e captura de imagens, foram usados os softwares de visualização *GaussView 4.01.*, *Chemcraft* (CHEMCRAFTPROG, 2020), *VMD* (CASALINO et al., 2021) e *Pymol* (Schrödinger, LLC, 2015).

O foco das análises foram as seguintes propriedades: orbitais de fronteira (FOM),

ou seja, highest occupied molecular orbital (HOMO), Lowest unoccupied molecular orbital (LUMO), até orbitais mais internos(HOMO-14) e mais externos(LUMO+14); momento de dipolo, *gap*; NBO, centros doadores, receptores de elétrons e estabilidade e mapas de potencial eletrostático (MEP).

2.5 Estudo de Análise de Componente Principal (PCA) e *HeatMap*

2.5.1 PCA

O estudo da PCA foi realizado usando a biblioteca *scikit-learn* (GARRETA; MONCECCHI, 2013), dentro da linguagem de programação Python (ROSSUM; JR, 1995). A análise foi usada principalmente nos orbitais HOMOs e LUMOs das oito moléculas e análise geral dos descritores.

2.5.2 *HeatMap*

As análises eletrônicas criaram com conjunto de resultados que foram compilados juntos com algumas informações da literatura, tais, como: IC₅₀, volume molecular, LogP entre outras e os resultados dos *scores* vindo do *docking*. Aplicamos a *Heatmap*, com intuito de determinar a correlação entre cada inibidor quando este grupo de informações foi reunidos. Aplicamos, ainda esta abordagem nas cargas atômicas em ChelpG dos inibidores. *Heatmap* foi realizado usando a biblioteca *Seaborn* (BISONG, 2019), dentro da linguagem de programação Python (ROSSUM; JR, 1995).

2.6 Estudo-ONIOM

Para responder algumas perguntas importantes, como extensão do sítio ativo, bem como quais os aminoácidos são mais importantes para inibição da proteína, foi aplicado a técnica *QM/MM*, usando, como assistente, o programa de acesso livre TAO PACKAGE³. Para que todos os complexos deste estudo com o *ONIOM*, usassem o mesmo padrão, foi escolhido o PDB da 3IK3, na conformação DFG-out, ancorada com os inibidores imatinibe e ponatinibe. A melhor estrutura sugerida pelo programa de ancoragem AutoDock Vina, por meio de seu esquema de pontuação, foi selecionada, a melhor geometria do ligante com a proteína. Este resultado foi comparado com a literatura para verificar que ele refletia a ancoragem original do fármaco na proteína.

O estudo ONIOM se baseia em duas orientações: aumento da camada alta, mantendo a camada baixa fixa e aumentando a camada baixa, deixando a camada alta fixa. A camada

³ Este tutorial foi desenvolvido para demonstrar o procedimento geral para um estudo de mecânica quântica e mecânica molecular (QM/MM) de um sistema bioquímico usando Gaussian, *GaussView* e o pacote TAO <http://chem.wayne.edu/schlegel/Software/oniomtoolTAO/TAOtutorial.html>.

alta será referida como a que usa métodos computacionais mais robustos em relação a camada baixa.

Usando a informações do *docking*, foram formados três clusters a serem calculados, são eles: proteína sem inibidor, proteína com imatinibe, proteína-ponatinibe.

O campo de força escolhido foi o AMBER, devido a sua capacidade de tratar sistemas biológicos (WANG et al., 2004). Ambos, proteína e ligante, precisam estar parametrizados no campo de força referido. Foi usado o programa *toolkit* (TAO et al., 2009), para parametrizar a proteína e fazer os cortes crescentes afastando-se do sítio ativo. Os inibidores foram parametrizados usando o programa AMBER-TOOLS (CASE et al., 2008).

Todos os aminoácidos foram considerados em suas formas neutras com exceção do Aspartato 281 que está desprotonado, se não estiver conectado a outro resíduo, hidrogênios foram adicionados nos terminais N e C que suas ligações foram rompidas, os inibidores imatinibe e ponatinibe estão na sua forma protonada, ambos no anel metilpiperazina, nilotinibe e dasatinibe na forma neutra.

Os cálculos foram realizados com pacote Gaussian09. Utilizamos duas configurações: A) o método DFT B3LYP com a função de base base 6-311G, na camada alta e PM6 em camada baixa; B) semiempírico PM6 em camada alta e AMBER camada baixa. Para as estruturas do cálculo ONIOM, foram usadas as poses geradas no *docking*. Assim, todos os cálculos foram realizados single-point. O objetivo deste procedimento foi testar a geometria de referência do *docking*. Ao mesmo tempo, é importante notar que a otimização destas moléculas poderia desarranjar a estrutura destas macromoléculas. Ao mesmo tempo, tornaria difícil a comparação entre os diversos cortes da estrutura.

Com a proteína completa crescendo apenas na camada alta, partindo de 1 passo até 10 passos, usamos configuração (B). Fazendo cortes na proteína ao redor do sítio ativo, usamos configuração (A). O menor corte foi o de 3 passos total, correspondendo a 7 resíduos mais o inibidor, como pode ser visto na Figura 21. O maior corte foi de 9 passos, correspondendo a 74 resíduos mais o inibidor. Dentro de cada corte, foi aumentada a camada alta em 1, 2 até 3 passos, a proporção seguida entre a camada alta e a baixa foi de até 1/3 dos resíduos. Foram analisadas cargas de Mulliken dos resíduos alvos Ile315 e Asp381, MEP e energias dos clusters.

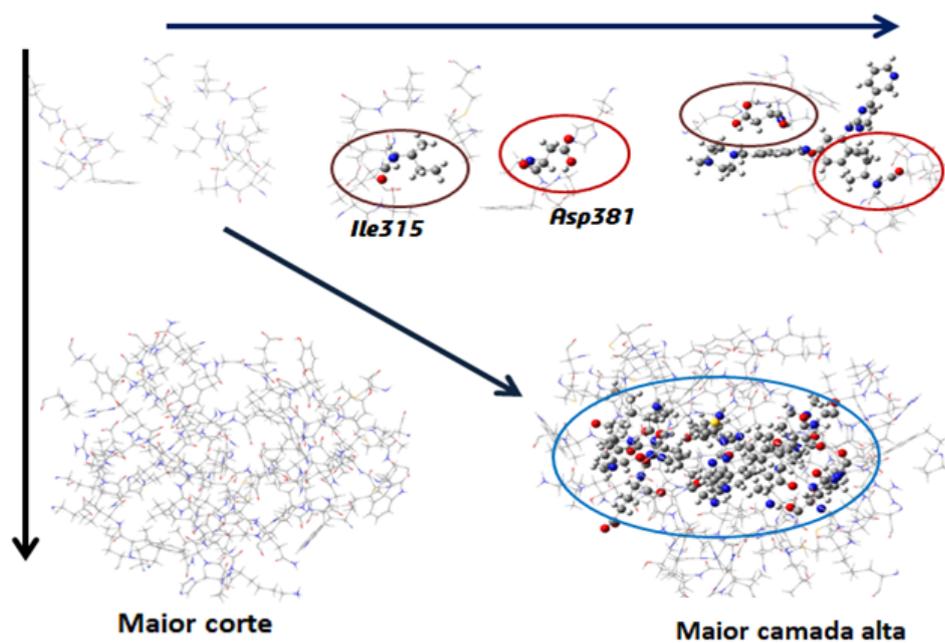


Figura 21 – Esquema geral dos cortes gerados para estudo do ONIOM, no sentido horizontal crescendo apenas a camada alta, sentido vertical crescendo apenas a camada baixa.

3 Resultados e Discussão

Neste capítulo são discriminadas e analisadas as interações feitas pela proteína tirosina quinase BCR-ABL selvagem na conformação DFG-out com inibidores clássicos, e da proteína na forma selvagem DFG-in com o inibidor dasatinibe, na forma mutada T315I da conformação DFG-out, explicitando grupos moleculares dentro dos inibidores que contribuem com um maior número de interações com a proteína.

3.1 Aspectos gerais do sítio de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL em função da ancoragem molecular

A tríade (Asp381-Phe382-Gly383) pode direcionar o inibidor para longe de possíveis sítios de interações ou aproximar a molécula favoravelmente a eles. Este grau de liberdade do bolso de ligação é um complicador a mais para aumentar a afinidade enzima-inibidor. Outro fator importante, é a presença de resíduos protonáveis no sítio de ligação, como uma histidina na posição do loop catalítico, His361 (Figura 22). Conhecer os resíduos e a forma com que eles interagem com o inibidor, é fundamental para tentar entender o comportamento da proteína para o desenvolvimento de melhores inibidores.

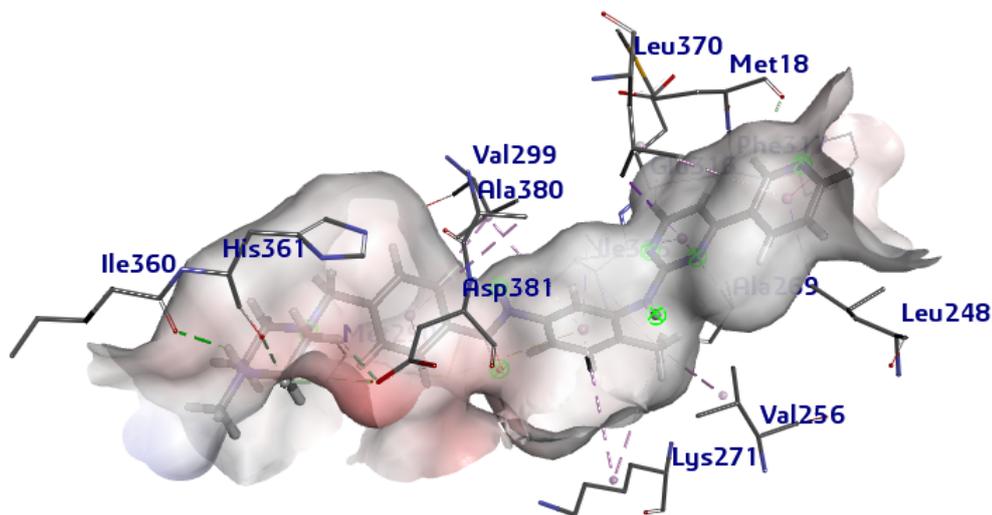


Figura 22 – Bolso de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL na conformação DFG-out. No meio, a molécula de imatinibe cobrindo toda extensão do sítio de ligação, e os principais resíduos com os quais o imatinibe está interagindo.

3.1.1 Proteína tirosina quinase BCR-ABL Selvagem (1OPJ)

As proteínas 3IK3 e 3QRJ foram obtidas do banco de dados PDB. Ambas possuem a mutação T315I, como pode ser visto na Figura 23. A estrutura cristalográfica da proteína 1OPJ (código PDB) apresenta resolução de 1,75Å e foi obtida pelo método de difração de raio-X. Foi cristalizada na forma de dímero, estando complexada com o inibidor imatinibe, e sua sequência possui 286 aminoácidos, sendo o primeiro resíduo a metionina, com numeração 244. Entretanto, esta numeração não corresponde a numeração freqüentemente encontrada na literatura. Afim de comparar a sequência, nós realizamos o alinhamento da sequência de aminoácidos com o programa *ClustalW2* (LARKIN et al., 2007).

O alinhamento entre as três formas da BCR-ABL foi realizado comparando as sequências de resíduos da proteínas tirosina quinase, depositadas no PDB (Figura 23). Estas proteínas foram amplamente utilizadas na literatura: 1OPJ (DEMIZU et al., 2016; BROWN et al., 2005), 3QRJ (RAJENDRAN; GOPALAKRISHNAN; SETHUMADHAVAN, 2017) e 3IK3 (TEDASEN et al., 2017; KALE; SONWANE; CHOUDHARI, 2020). Comparando suas sequências, observou-se tratar da mesma sequência proteica, mas com início da numeração dos resíduos de aminoácidos diferentes. A 1OPJ está como numeração avançada em 19 números (resíduos). Por exemplo: na cadeia 3IK3 e 3QRJ o resíduo aspartato da tríade catalítica está com etiqueta 381. Enquanto que na 1OPJ está com 400. Destes, a cadeia mais completa é 1OPJ. Portanto, para compararmos os resíduos de interação entre as duas proteínas, temos que considerar o avanço da numeração da 1OPJ.

Realizamos *docking* entre a proteína selvagem tirosina quinase, BCR-ABL código PDB 1OPJ, e os inibidores imatinibe, dasatinibe, nilotinibe e ponatinibe, para determinarmos o grau de afinidades de cada inibidor com esta proteína. O *software* de acoplamento usado foi o *Autodock Vina*, juntamente com o *software Autodock Tools*, ambos são programas *open source*. Como resultado do acoplamento, o programa fornece uma tabela de afinidade expressa em kcal.mol⁻¹. Os valores numéricos mais negativos apontam uma melhor interação entre enzima e receptor.

3.1.2 *Docking* da proteína selvagem 1OPJ com os inibidores clássicos

Trabalhando com a possibilidade da molécula se ligar a várias conformações diferentes, assumidas pelo sítio ativo, e respeitando os graus de liberdade que o inibidor pode ter, devido aos 7 pontos de torção (que os 4 inibidores clássicos possuem, mesmo ligando a uma conformação específica), apresentamos o valor do *score* e do RMSD (do inglês *Root Mean Square deviation*) das 5 melhores estruturas. A Tabela 2 mostra as cinco melhores estruturas dos inibidores clássicos com a proteína 1OPJ. Das quatro moléculas dos fármacos ancoradas, a que apresentou melhor afinidade foi o ponatinibe (-12,9 kcal.mol⁻¹) seguido do imatinibe (-12,5 kcal.mol⁻¹).

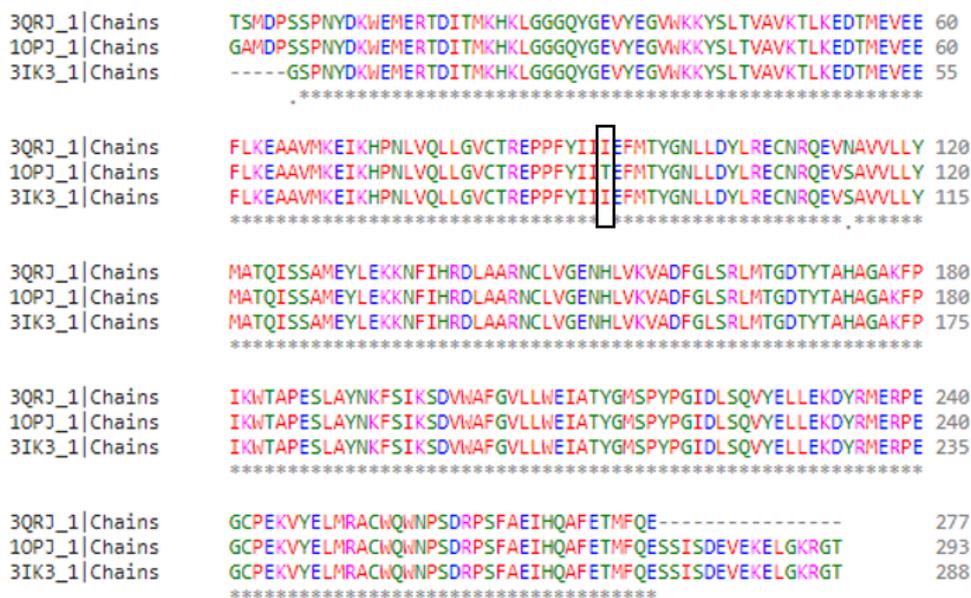


Figura 23 – Alinhamento global da sequência das proteínas 3QRJ, 10PJ e 3IK3. A presença do asterisco debaixo dos resíduos mostra que este resíduo é conservado nas três cadeias. A ausência deste asterisco, mostra que o resíduo não está presente em uma ou mais cadeias de aminoácidos. O traço mostra que aquela cadeia terminou antes da outra ou começou depois da outra. O retângulo preto mostra a mutação na posição 315, o resíduo isoleucina, que na selvagem é a treonina.

Tabela 2 – *Score* do *Docking* dos fármacos: imatinibe, dasatinibe, nilotinibe e ponatinibe com a proteína selvagem (10PJ) DFG-out. Valores expressos em kcal.mol⁻¹ e Å.

Imatinibe			Dasatinibe		Nilotinibe		Ponatinibe	
	<i>Score</i>	RMSD	<i>Score</i>	RMSD	<i>Score</i>	<i>RMSD</i>	<i>Score</i>	RMSD
1	-12,5	0,00	-9,3	0,00	-10,8	0,00	-12,9	0,00
2	-11,8	3,78	-8,8	2,47	-10,8	2,26	-11,3	2,85
3	-11,2	1,26	-8,6	5,37	-10,4	3,47	-10,3	1,62
4	-10,5	1,69	-8,6	7,22	-10,2	1,38	-9,8	2,62
5	-9,6	6,55	-8,6	6,76	-10,2	4,63	-9,6	1,69

O estudo do RMSD mostrou que o ponatinibe tem um valor máximo de RMSD de 2,85 Å, o menor intervalo dentre todos os inibidores, o que pode estar relacionado a boa afinidade do ponatinibe, mesmo na proteína selvagem 1OPJ DFG-out. Por outro lado, o dasatinibe é o que apresenta maior valor máximo de RMSD, condizente com o baixo *score* apresentado.

O imatinibe é uma molécula longa, com ramificações pequenas e não possui halogênios em sua constituição. Esta molécula consegue preencher toda a cavidade do sítio de ligação, fazendo interações com os principais resíduos de aminoácidos na orientação DFG-out. É composta por 7 átomos nitrogênios e 1 oxigênio no centro da molécula. Estes átomos, com maior afinidade eletrônica, estão participando diretamente nas interações, como pode ser visto na Figura 24, onde o nitrogênio interage com o resíduos Met337 (Met318). Para este tipo de conformação DFG-out e selvagem, o imatinibe (fármaco de primeira linha) tem *score* semelhante ao ponatinibe (fármaco de última geração), ver Tabela 2.

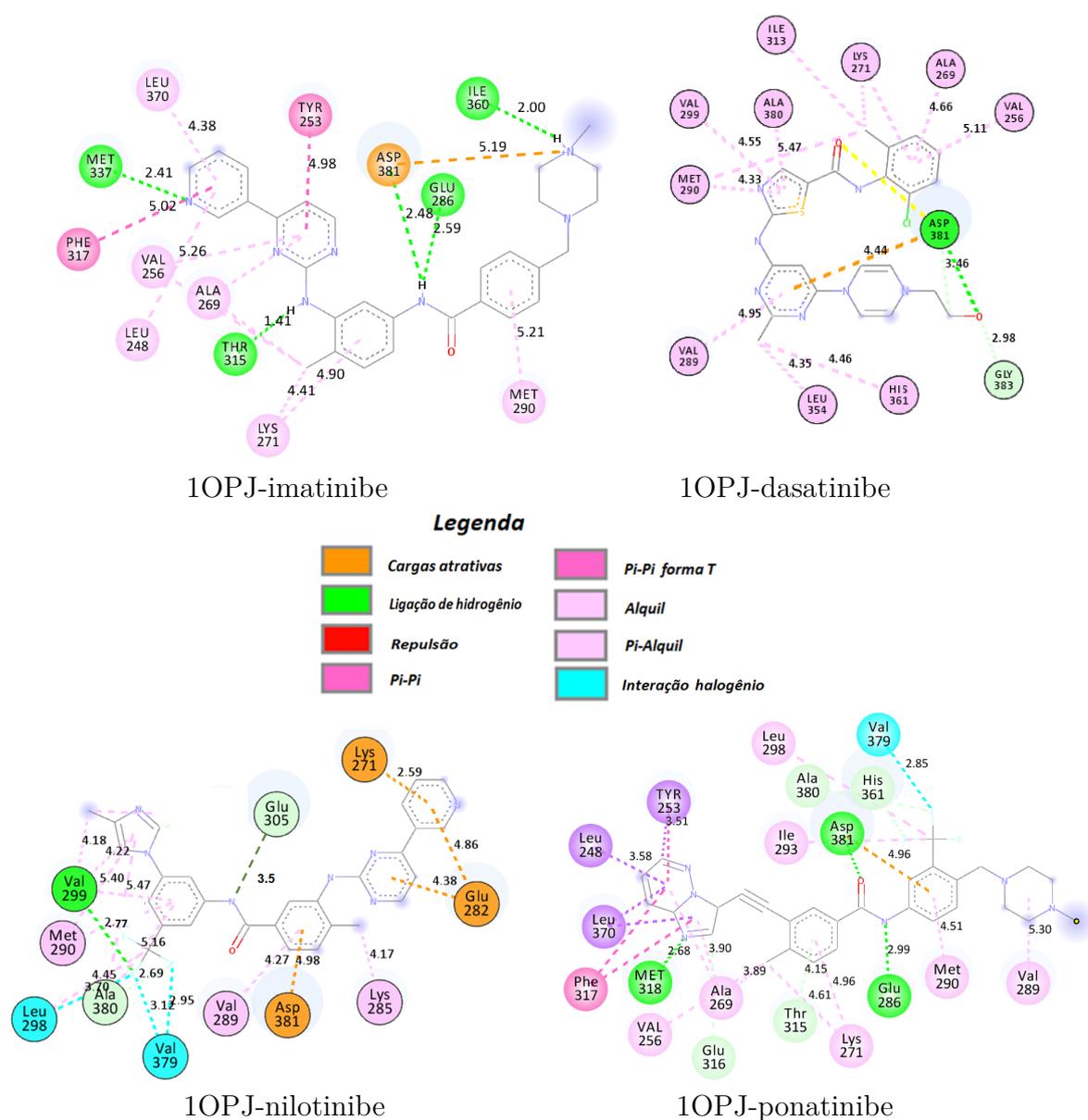


Figura 24 – Estruturas mais estáveis dos inibidores clássicos com a proteína selvagem 1OPJ. São apresentados o tipo de interação, quais átomos do inibidor está interagindo com qual resíduo e a distância de interação.

3.1.3 Docking da proteína selvagem 1OPJ com moléculas dos inibidores modificados niloH, niloCl, pontH e pontCl

As moléculas niloH, niloCl, pontH e pontCl (Figura 25), foram criadas a partir de pequenas modificações feitas no nilotinibe e ponatinibe. Iniciamos substituindo o grupo fluormetil, presente nestas moléculas, por um grupo metil, gerando niloH e pontH. A substituição do fluormetil por clorometil gerou niloCl e pontCl. A Figura 25 apresenta, na primeira coluna, as moléculas dos fármacos sem substituição com fragmento modificador no centro, nas duas últimas colunas são apresentadas as moléculas modificadas de cada fármaco.

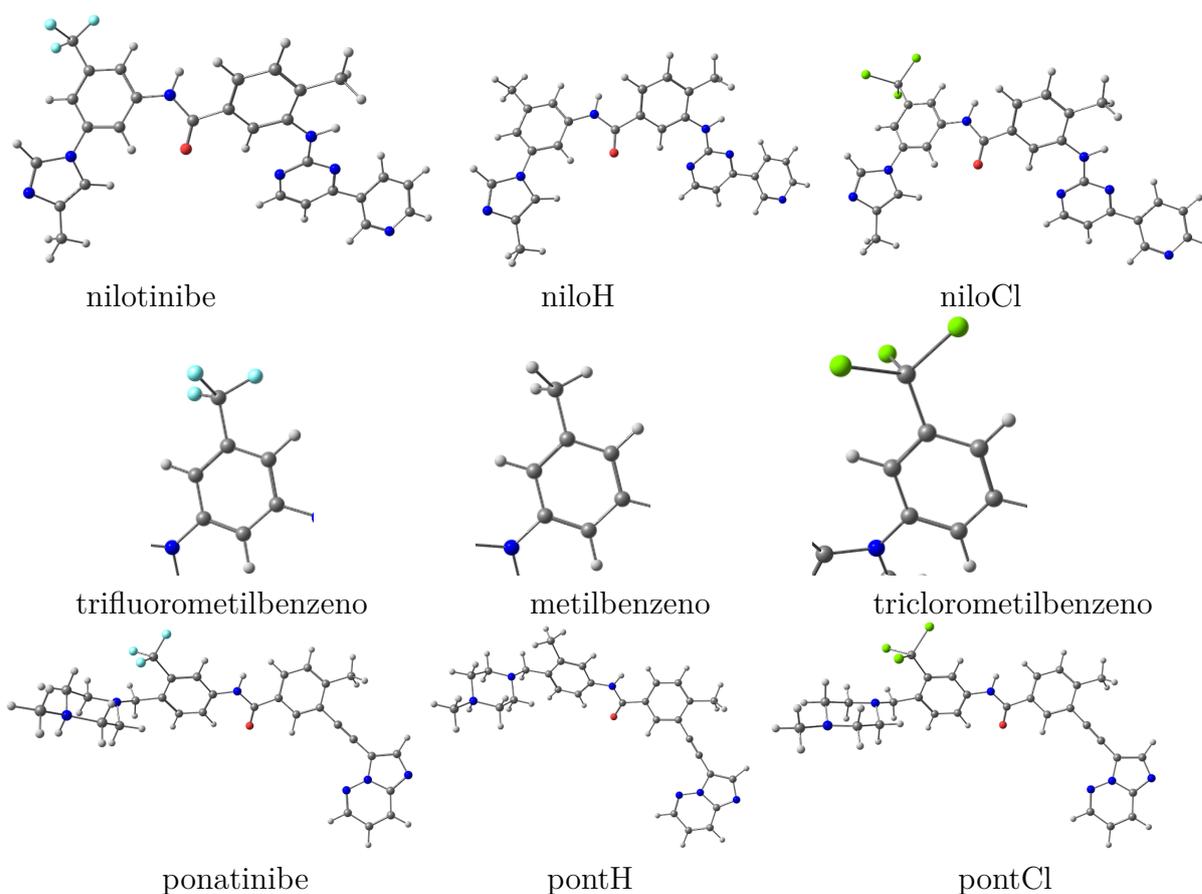


Figura 25 – As molécula modificadas de ponatinibe e nilotinibe e o grupo molecular responsável pela modificações em destaque no centro da figura. Na primeira linha nilotinibe, niloH e niloCl, na última linha ponatinibe, pontH e pontCl.

3.1.3.1 Scores

A Tabela 3 apresenta os resultados de *docking* das moléculas modificadas com a proteína 1OPJ. Primeiro serão discutidos os *scores* e, em seguida, as interações realizadas. Se compararmos com a molécula não substituída de nilotinibe, que possui o *score* de 10,8 kcal.mol⁻¹, as moléculas de niloH e niloCl não apresentam uma melhora significativa do *score*. Na melhor pose do *docking*, apresentaram o *score* de 10,1 kcal.mol⁻¹ e 10,3 kcal.mol⁻¹, respectivamente. Embora o pontH e pontCl tenham resultados melhores que outro par de moléculas modificadas, estes seguem a mesma tendência e não trazem ganho na função de *score* em relação a molécula original (Tabela 2). Comparativamente, as moléculas niloH e niloCl apresentam uma variação de -6,5% e -4,6% em relação ao *score* da molécula original de nilotinibe. Enquanto que, o pontH e pontCl apresentam uma variação de -10,1% e -7,8% em relação a molécula original de ponatinibe. Este pequeno aumento se justifica, pois o ponatinibe apresenta maior inibição, mesmo em se tratando da proteína selvagem. No entanto, o RMSD do pontH e pontCl é muito maior que o apresentado pelo niloH e niloCl. Isto pode estar relacionado com a maior flexibilidade encontrada pelo pontH e pontCl nas outras soluções do *docking*. Estes resultados de *score* são compatíveis com a escolha do trifluorometil na molécula do ponatinibe.

Tabela 3 – *Score* da proteína selvagem 1OPJ das moléculas modificadas niloH, niloCl, pontH e pontCl. Valores de *score* e RMSD expressos em kcal.mol⁻¹ e Å, respectivamente.

Pose	niloH		niloCl		pontH		pontCl	
	<i>Score</i>	RMSD	<i>Score</i>	RMSD	<i>Score</i>	RMSD	<i>Score</i>	RMSD
1	-10,1	0,00	-10,3	0,00	-11,6	0,00	-11,9	0,00
2	-10,0	2,03	-9,8	2,40	-10,3	7,37	-11,2	1,44
3	-9,9	4,67	-9,7	5,16	-10,2	5,28	-10,2	8,27
4	-9,6	2,00	-9,5	3,37	-9,9	7,19	-10,0	4,11
5	-9,6	1,44	-9,4	4,33	-9,9	2,77	-9,9	6,06

3.1.3.2 Interações com a proteína 1OPJ

A Figura 26 apresenta as diferentes interações encontradas no *docking* das moléculas substituídas na proteína 1OPJ, em comparação com as moléculas sem substituição. O resultado do *score*, do niloH e niloCl, pode ser justificado devido a capacidade do grupo fluormetil, no nilotinibe, em fazer uma rede de interações com um total de apenas 4 resíduos. São interações com os resíduos Val299, Leu298, Val379 e Ala380, com ligações de hidrogênio e com flúor. Quando passa para o niloH e niloCl, estas interações são perdidas, como era de se esperar. Entretanto, há modificações nas interações com os outros resíduos, mas mantendo as interações por ligação de hidrogênio. A principal destas modificações

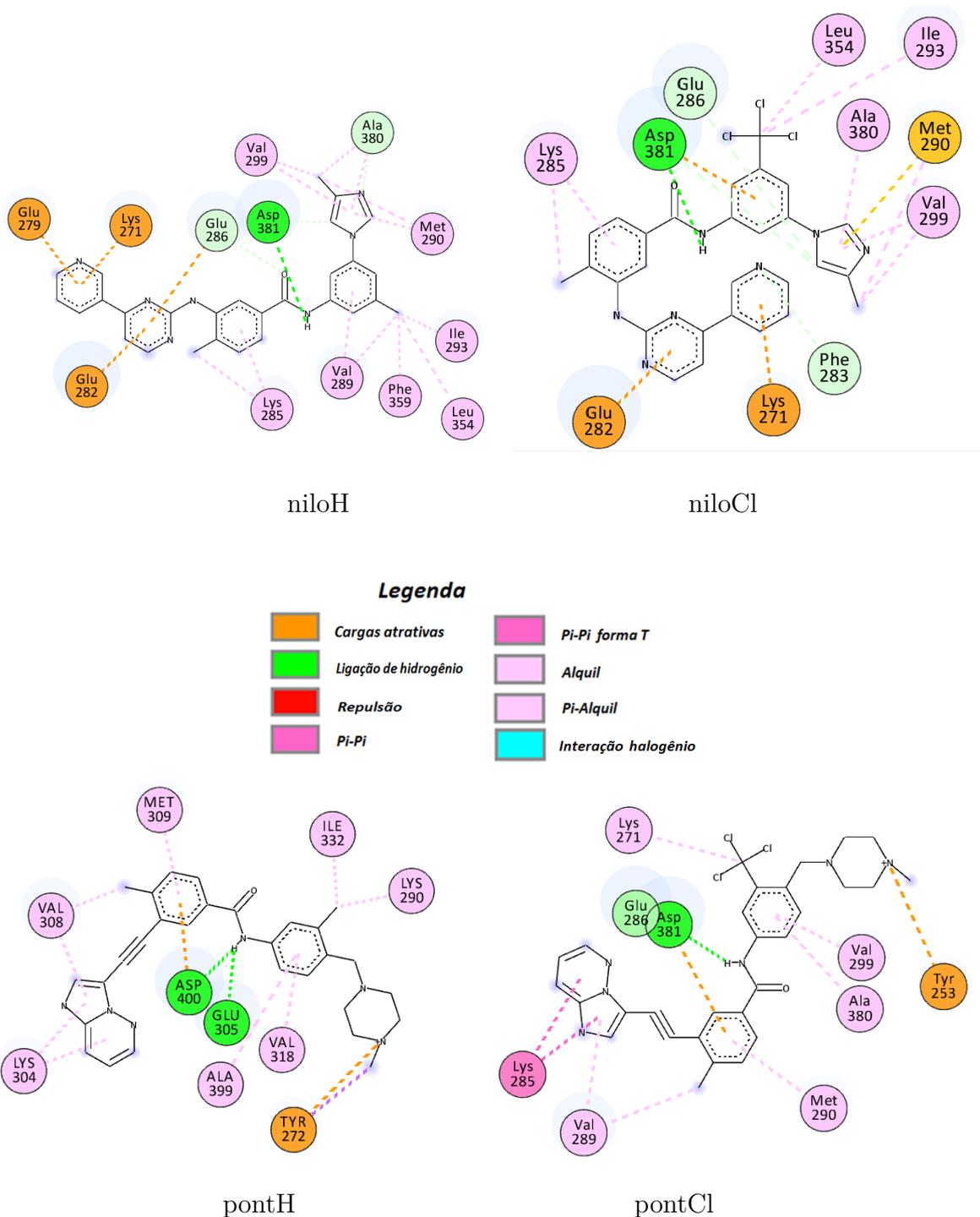


Figura 26 – Moléculas modificadas de ponatinibe e nilotinibe. Na primeira, linha niloH e niloCl. Na última linha pontH e pontCl.

é a ancoragem do Asp381, seguido das mudanças na metila que substituem ligações de hidrogênio por interações alquil e π -alquil.

3.2 Tirosina quinase BCR-ABL com a mutação T315I interagindo com os inibidores clássicos

Na estrutura da proteína com mutação T315I, há a modificação do resíduo treonina na posição 315. Este resíduo interage fortemente com os ligantes, fazendo ligação de hidrogênio com o grupo amida no centro da molécula de imatinibe, na proteína selvagem. Com isto, torna-se um dos centros estabilizadores do inibidor na proteína, devido a posição do resíduo dentro da cavidade. A ausência desta interação, permite que o inibidor tenha mais mobilidade no interior da cavidade, prejudicando os ângulos de interação, enfraquecendo e reduzindo o somatório de forças de interação. Desta forma, levando a um aumento nas distâncias pontuais de interações, refletindo diretamente na função de *score*, e consequentemente na inibição da atividade da enzima. A Tabela 4 apresenta os resultados do *docking* na proteína mutada 3IK3. Para fins de comparação, foram adicionados os valores da proteína selvagem 1OPJ. Estes resultados serão discutidos separadamente nas próximas seções.

Tabela 4 – *Docking* de fármacos: *score* do imatinibe, dasatinibe, nilotinibe, ponatinibe com proteína selvagem e mutada (T315I), energia em kcal.mol⁻¹. Os valores da 1OPJ, presentes na Tabela 2, são reproduzidos nesta tabela.

PROTEÍNA	ATP	IMAT	DASA	NILO	PONT
T315I	-7,9	-9,0	-8,2	-10,7	-13,6
1OPJ	-8,2	-12,5	-9,3	-10,8	-12,9

3.2.1 Docking da molécula imatinibe com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out

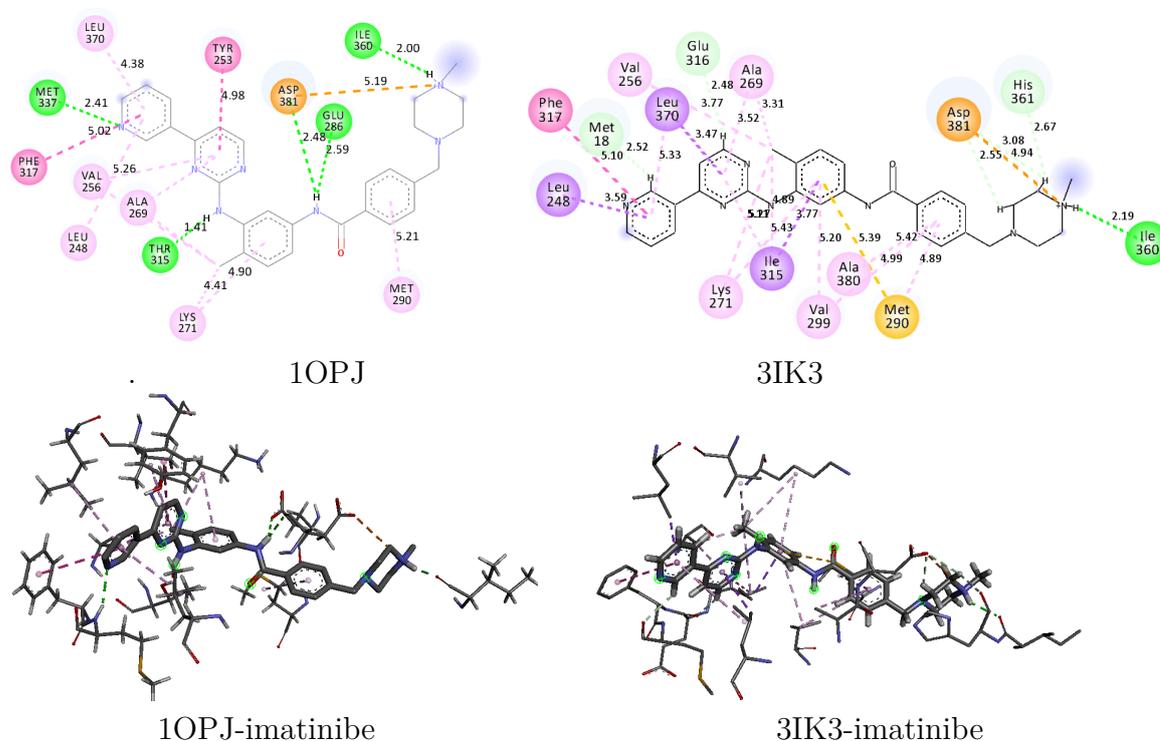


Figura 27 – Pose do *docking* com proteína BCR-ABL selvagem DFG-out 1OPJ e com mutação T315I, 3IK3, ambas ancoradas como a molécula do fármaco imatinibe.

As moléculas dos inibidores são formadas por diversos grupos moleculares, com propriedades farmacofóricas específicas, que dependendo de como são conectados conferem características únicas. A molécula de imatinibe traz na sua estrutura um anel piridínico em uma de suas extremidades, a piridina devido a sua versatilidade e densidade de interação é alvo recorrente de estudos farmacofórico (LAGOJA, 2005). A Figura 27 mostra as interações que são mantidas para as duas situações da proteína. É possível observar os tipos de interações que a piridina do imatinibe faz com a proteína, como a Phe317. Esta interação é do tipo $\pi - \pi$, na qual a piridina assume a posição paralela com anel do resíduo, a interação está presente na forma selvagem e mutada (T315I). Entretanto, com conformação menos favorecidas na proteína mutada T315I, o que pode comprometer a qualidade da interação na forma mutada. Na ligação de hidrogênio com o resíduo Met318, é uma interação curta, com distâncias de 2,41 Å para N-H ou 2,52 Å com o nitrogênio da 3IK3 do mesmo anel, ligando-se ao hidrogênio do resíduo que funciona como um ancorador da extremidade do inibidor, esta interação esta presente na proteína selvagem e na proteína mutada.

Outro grupo importante na molécula de imatinibe é o metilpiperazina, localizado na outra extremidade da molécula. Exerce um papel importante, na forma protonada e na

forma desprotonada, o próton que se liga ao nitrogênio do grupo gerando protonação, faz uma ligação de hidrogênio com o grupo carbonila de Ile360, com uma distância de 2,00 Å na selvagem e 2,19 Å na forma mutada, fixando a extremidade desta molécula no sítio.

Os *scores* da molécula de imatinibe com a proteína mutada (T315I) e selvagem são -12,5 e -9,0 kcal.mol⁻¹, respectivamente (Tabela 4). Mostrando, como esperado, a baixa atuação do imatinibe na proteína mutada.

A diferença mais explícita está na interação entre o resíduo de treonina na posição 315, que faz ligação de hidrogênio forte com imatinibe de 1,41Å. Quando mutada, a isoleucina na posição 315 faz interação tipo π -sigma, com a distância de 3,77Å. Com uma interação do tipo ligação de hidrogênio, o aspartato na posição 381 apresenta distância de 3,08Å na proteína selvagem, o que não acontece na proteína mutada T315I. Outra diferença é um discreto aumento no comprimento de ligação em quase todas as interações, que contribui para ineficiência do inibidor frente a proteína selvagem.

3.2.2 Docking da molécula dasatinibe com a proteína mutada T315I e com proteína selvagem na conformação DFG-in

Originalmente a molécula do dasatinibe foi projetada para interagir com a forma selvagem na orientação DFG-in (LEE et al., 2008). Neste estudo de *docking*, a estrutura cristalográfica PDB 2GQG, refere-se a proteína selvagem. A Figura 28 mostra a interação entre a molécula de dasatinibe e a proteína mutada T315I na conformação DFG-out (Figura 28-A) e a proteína selvagem na conformação DFG-in (Figura 28-B).

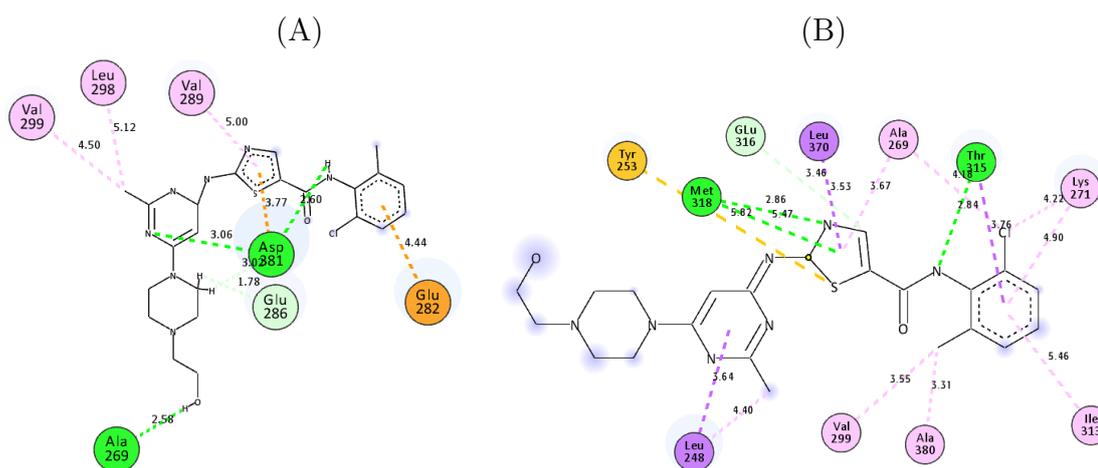


Figura 28 – Em (A), pose do *docking* da molécula do fármaco dasatinibe com proteína tirosina quinase BCR-ABL DFG-out 3IK3, com mutação T315I. Em (B), pose do *docking* da molécula do fármaco dasatinibe com a proteína tirosina quinase BCR-ABL selvagem DFG-in 2GQG(código PDB).

Na conformação DFG-in, a molécula de dasatinibe possui o número de interações maior que na forma DFG-out (Figura 28). O resíduo T315 faz interação com a molécula,

porém quando há mutação deste resíduo observa-se a perda desta e de outras interações, causadas pelas mudanças conformacionais atribuídas a esta mutação, são fatores determinantes para o desempenho insatisfatório deste ligante frente a mutação T315I.

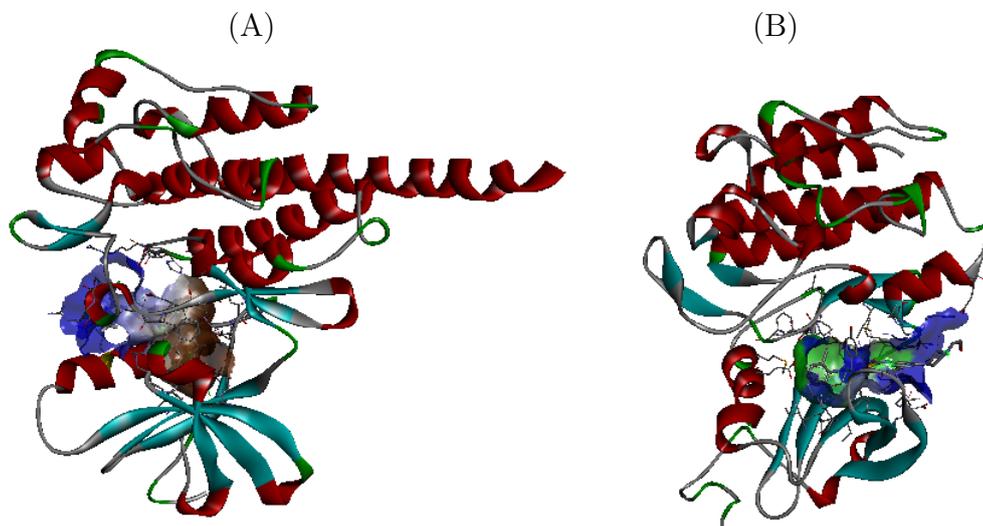


Figura 29 – Em (A), bolso de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL DFG-out com a molécula dasatinibe. Em (B), bolso de ligação da proteína tirosina quinase BCR-ABL DFG-in com a molécula dasatinibe.

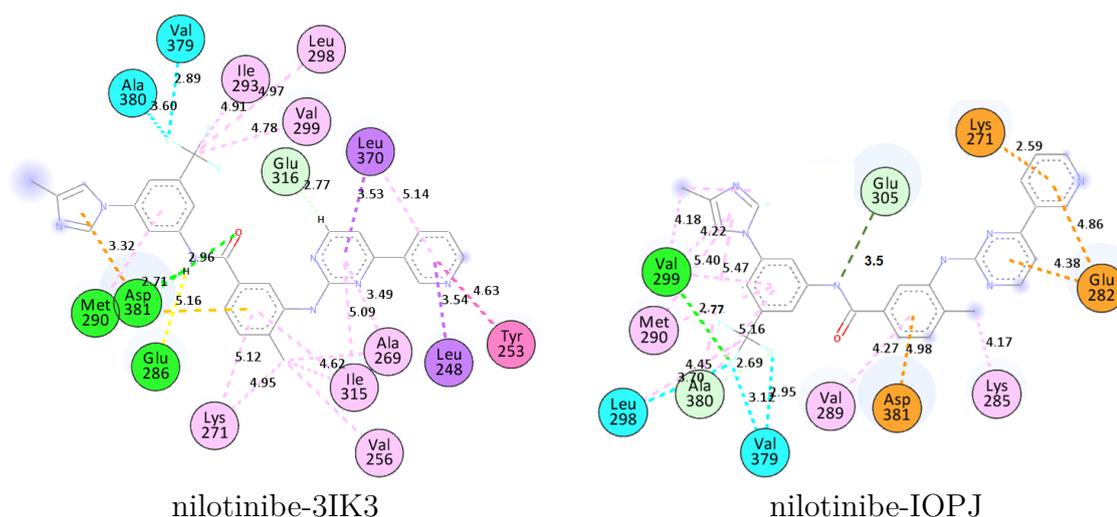
A molécula do dasatinibe surgiu como o fármaco a superar os obstáculos que o imatinibe não utrapassou. Foi o primeiro inibidor clássico a trazer em sua estrutura a presença de um halogênio, o átomo de cloro ligando ao anel benzênico, Figura 28. Na forma selvagem (2GQG), dasatinibe se liga a um número maior de resíduos (Tabela 5), devido a dificuldade da molécula adentrar inteiramente na cavidade do sítio de ligação, ficando parte da molécula fora, interagindo com resíduos externos (Figura 29-B). Isto concentra a maioria das interações entre tiazol no centro da molécula até cloro benzeno na extremidade da molécula.

O dasatinibe foi ancorado em conformação da proteína DFG-out (Figura 29-A). Esta orientação da proteína direciona o inibidor para região diferente do qual o ATP se liga à proteína (usualmente na conformação DFG-in). Esta região é predominantemente composta por resíduos polares. Os resultados de *docking* mostraram que as principais interações são: Ala269, fazendo ligação de hidrogênio a 2,58 Å, e Asp381 ligando a mais de um ponto no inibidor, fazendo 3 ligações de hidrogênio: 2,60, 3,06 e 3,02 Å. Nesta orientação, há um decréscimo no número de interações, contribuindo diretamente para o menor valor de *score*, confirmando a literatura, mostrando pouca sensibilidade do dasatinibe a esta conformação.

Tabela 5 – Interações entre a proteína tirosina quinase BCR-ABL com a mutação T315I e a molécula do fármaco dasatinibe. Distâncias expressas em Å.

Tipo de Interação	Resíduo	Átomo do Inibidor	Distância
Ligação hidrogênio	Ala269	H	2,58
Ligação hidrogênio	Glu286	H	1,78
Ligação hidrogênio	Asp381	H	3,06
Ligação hidrogênio	Asp381	H	3,02
π -ânion	Asp381	Anel	3,77
Ligação hidrogênio	Asp381	H	2,60
π -ânion	Glu286	Anel	4,44

3.2.3 *Docking* da molécula nilotinibe com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out

Figura 30 – Estrutura do *docking* da proteína BCR-ABL mutada T315I conformação DFG-out 3IK3 (código PDB) com a molécula do fármaco nilotinibe.

O fármaco nilotinibe foi desenvolvido usando como base os inibidores BCR-ABL que o antecedeu. É um inibidor mais potente e seletivo, desenvolvido por meio de mudanças modestas na molécula de imatinibe (GORA-TYBOR; ROBAK, 2008). Deste modo, a molécula do nilotinibe é uma variação da molécula do imatinibe. Apesar da semelhança estrutural entre a molécula de imatinibe e nilotinibe (Figura 31), algumas diferenças importantes são observadas, como por exemplo, a presença do grupo trifluormetil ($-\text{CF}_3$), a presença do metilimidazol e a ausência do grupo metilpiperazina.

O estudo de *docking* desta molécula mostrou que o grupo trifluormetil do nilotinibe conserva a região de contato nas proteínas, selvagem e mutada. Portanto, as interações com os resíduos na proteína selvagem não são afetados pela mutação. Na Figura 30 é apresentada a molécula do nilotinibe ancorado com a proteína selvagem e mutada. É

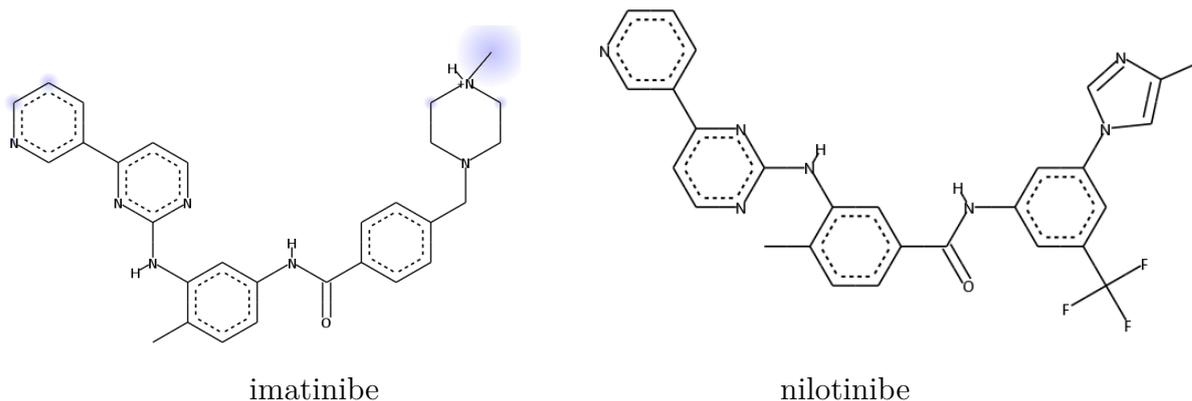


Figura 31 – Fórmula estrutural das molécula do imatinibe e nilotinibe.

possível observar os resíduos, como Val289 e Ala390, interagindo com o trifluormetil em ambas as proteínas.

Embora, a molécula do nilotinibe prefira a conformação DFG-out, ela se aloja em região intermediária ao dasatinibe e imatinibe. Como resultado, as interações feitas pela molécula ocorre com resíduos que participam na ancoragem do dasatinibe nas forma selvagem e mutada, como os resíduos Lys271 e Glu282. Mostrando a versatilidade da molécula em interagir com bolso de ligação, o valor de energia de ligação (*score*) desta molécula de $-10,7 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

3.2.3.1 Influência dos anéis substituídos no aumento das interações π

O grupo imidazol é um fragmento anfótero podendo ser usado como ácido ou como base (BOZKURT, 2003). Os átomos de nitrogênio deste anel fazem uma contribuição importante para o empilhamento de anéis aromáticos (ITAHARA; IMAIZUMI, 2007), Figura 32. No caso da interação π -ânion com o Asp381 a distância de 3,81 Å. Assim como acontece em todos os anéis substituídos desta molécula, a densidade de interações são aumentadas. O anel pirimidina, duplamente substituídos por átomos de nitrogênio, é uma região importante de interação, que faz 4 interações do tipo $\pi - \sigma$ com Leu370 3,53 Å, duas π - metil com resíduos Ile315 e Ala269 5,09 e 3,49 Å, e 1 ligação de hidrogênio com o Glu316 à 2,77 Å.

A molécula de nilotinibe tem na sua estrutura 2 anéis aromáticos de 6 membros não substituídos. O primeiro anel está ligado ao trifluorometil, que tira a densidade eletrônica deste anel. Entretanto, esta baixa densidade pode ser agravada pela presença de átomos de nitrogênio vizinhos, ligados neste anel, o que reflete no tipo de interação. Neste caso, o anel interage com grupo doador eletrônico fraco (CH_3) e a interação entre eles é do tipo π -metil e o resíduo envolvido é o Met290. O outro anel está ligado a um grupo metil, que contribui para aumento da ressonância do anel, por meio da carbonila, fazendo 3 interações duas π -metil e 1 π -S. Mesmo com as substituições, o nilotinibe faz interações

eletrostáticas entre o cátion carregado positivamente e o centro de receptores de elétrons (base de Lewis) π -cátion, com número reduzido de ligação de hidrogênio e ausência deste tipo de interação, pode ser fato determinante para um valor de *score* menor da molécula.

3.2.3.2 Docking da molécula niloH com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out

O grupo CH_3 é descrito como um doador de elétrons fraco. Efeitos eletrostáticos entre grupo metil e a proteína têm grande contribuição na energia de interação, enquanto que, o substituinte flúor, retirante de elétrons, diminui a reatividade do anel benzênico. A Figura 32 apresenta a comparação das interações do niloH frente ao nilotinibe.

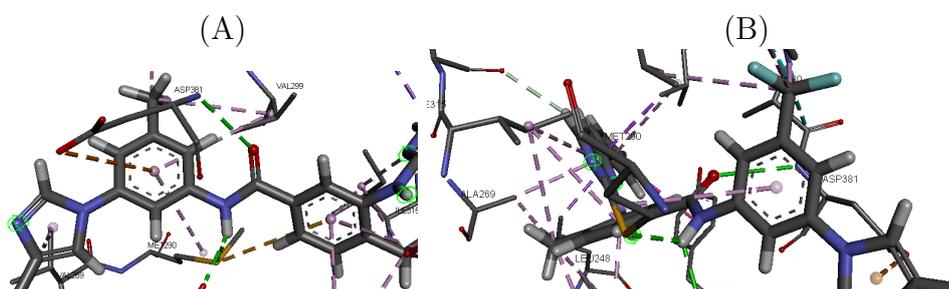


Figura 32 – Em (A), anel substituído com metil (niloH) e em (B), anel com trifluormetil (nilotinibe), ambos fazendo interação de natureza π .

O grupo trifluormetil faz um grande número de interações, entretanto, tira densidade eletrônica do anel, tornando menos ativo às interações π , que faz ligação π -metil com Met290. Por sua vez, o grupo metil tem um número menor de interações em relação ao trifluormetil (Figura 32). O grupo aumenta quantitativamente as interações do anel, perfazendo um total de 3. São eles: π -ânion com Asp381 a 4,96 Å, π -metil 4,84 Å com Met290 e π -metil 5,42 Å com Val299. Observação também evidenciada na função *score-docking*, que diminui de $-10,6 \text{ kcal.mol}^{-1}$ da molécula nilotinibe para $-10,1 \text{ kcal.mol}^{-1}$. As interações importantes como: Asp381 a 3,00 Å e Glu286 3,50 Å se mantém (Figura 33), perdendo a interação com Tyr253 e ganhando a interação com Met318 a 3,00 Å, neste ponto as interações se assemelham com as do imatinibe.

O nilotinibe faz interações na região do trifluormetil com cinco resíduos, Ala380 Val379, Ile293, Leu298 e Val299, enquanto que o niloH tem interações com apenas dois resíduos, Val299 e Leu298. O volume do niloH, em relação ao nilotinibe diminui, uma vez que o átomo de flúor tem volume 20% maior que átomo de hidrogênio, o que justifica no encurtamento da distância de ligação em 18,7%, C–H (1,09 Å) C–F (1,34 Å), contribuindo para aumento das distâncias de interação. Este fato também pode estar contribuindo para a diminuição da interação enzima-inibidor, percebido na função *score-docking*.

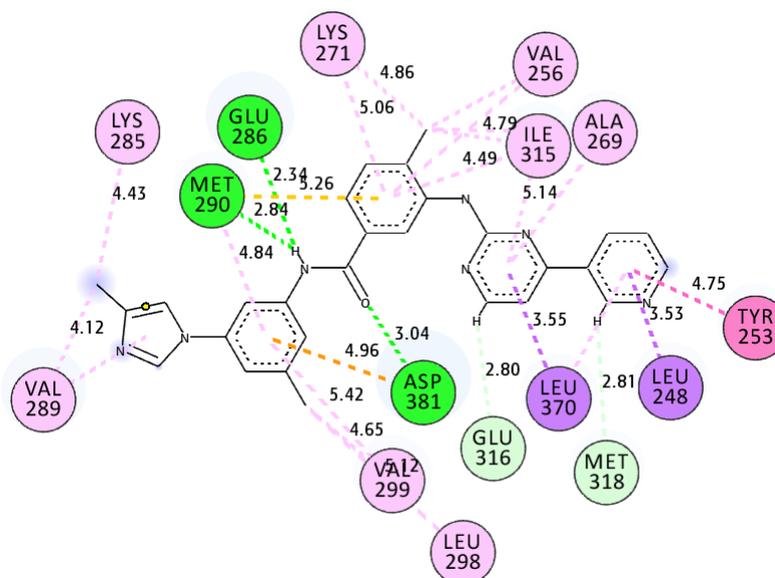


Figura 33 – Docking da proteína BCR-ABL mutada T315I conformação DFG-out 3IK3 (código PDB), com a molécula modificada do fármaco nilotinibe: trifluormetil por metil.

3.2.3.3 Docking da molécula niloCl com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out

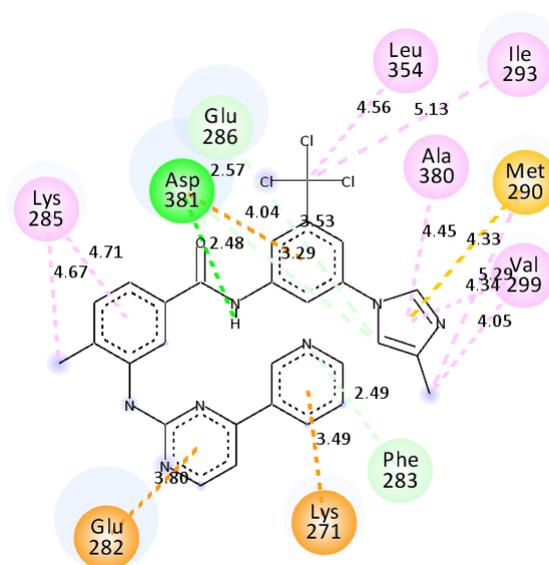


Figura 34 – Docking da proteína BCR-ABL mutada T315I conformação DFG-out 3IK3 (código PDB), com a molécula modificada fármaco nilotinibe, modificação: trifluormetil por triclorometil.

A molécula substituída do nilotinibe, por um grupo triclorometil, tem suas interações mais significativas com o resíduo Asp381, ligando-se em dois pontos com o nitrogênio a 2,90 Å e o oxigênio a 3,30 Å e com Glu286 (Figura 34). Todas as moléculas substituídas, fizeram interação usando o grupo amida no centro de suas moléculas com resíduos. Outro fato é que esta substituição perde a interação com Tyr253.

O niloCl tem o volume maior em relação ao nilotinibe, mas mantém o mesmo número de torções. O sítio ativo da TK é longo e estreito, logo para que o inibidor tenha a máxima eficiência, todos os descritores devem ser otimizados. A introdução de um grupo volumoso pode gerar impedimentos espaciais acentuados. Apesar de ser esperado que o aumento no volume favoreceria o encurtamento de alguma distância de interação, diante destas justificativas, o triclorometilo pode desfavorecer a interação ligante-receptor.

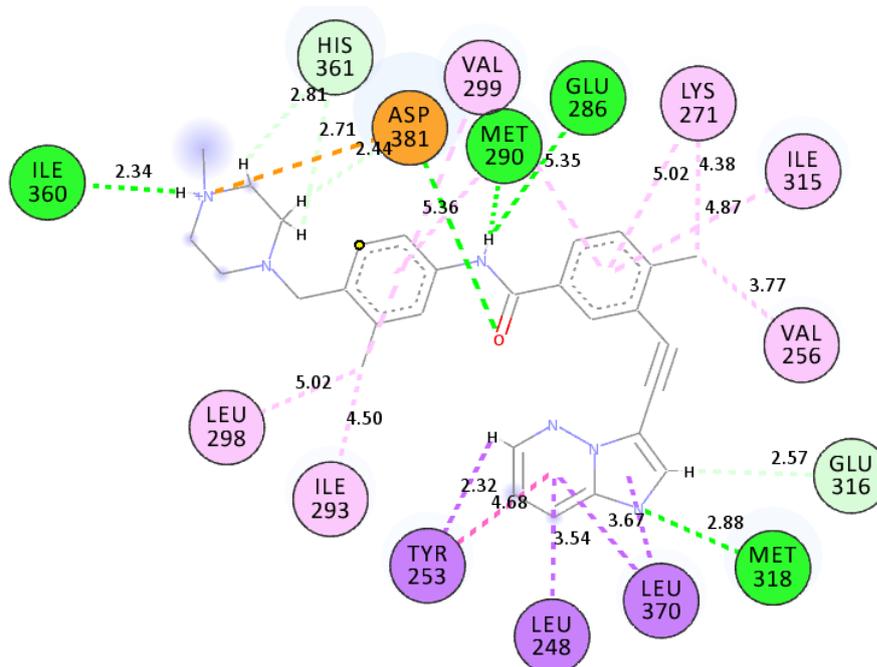
3.2.4.1 *Docking* da molécula pontH com a proteína mutada T315I na conformação DFG-out

Figura 36 – *Docking* da proteína BCR-ABL mutada T315I, conformação DFG-out 3IK3 (código PDB), com a molécula modificada do fármaco ponatinibe, modificação: trifluormetil por metil (pontH).

A molécula pontH tem interações mais significativas com resíduos Asp381, duplamente a 3,40 Å e 2,80 Å, com Glu286 a 2,40 Å e Ile360 a 2,30 Å, da mesma forma que a molécula de ponatinibe sem substituição. Conforme observado no *score* do *docking* do ponatinibe, que é de $-13,5 \text{ kcal.mol}^{-1}$, o pontH cai para $-12,9 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Esta molécula apresenta um discreto e persistente distanciamento dos resíduos de interação e perda de alguns pontos de ancoramento. Como, por exemplo, a interação com o resíduo Met318. A perda de contatos feitos pelo grupo trifluor impacta diretamente na energia de interação, diminuindo a sua afinidade.

Assim como visto na molécula de nilotinibe, o grupo metil faz um número menor de interações, mas há um aumento de interações no anel ligado ao grupo, que são interações com característica de menor energia quando comparadas à molécula não substituída. Outro aspecto observado é que o flúor interage com hidrogênios do CH₂ vizinho na estrutura do próprio inibidor, que pode agir como uma trava, impedindo torções, tirando a mobilidade deste ponto de torção (CH₂), podendo ser uma das causas do distanciamento discreto observado em algumas interações.

3.3 Orbitais de Fronteira

Os objetivos deste capítulo são: comparar as energias e a localização dos orbitais de fronteira de cada inibidor com as principais interações mostradas no estudo de *docking*; destacar a influência das modificações estruturais promovidas nas moléculas de ponatinibe e nilotinibe; e avaliar o efeito dos estados de protonação, que as moléculas de imatinibe e ponatinibe podem assumir, em *pH* fisiológico, sobre os orbitais de fronteira.

A Tabela 6, traz as energias dos orbitais HOMO até HOMO-4, e a Tabela 7, as energias dos orbitais LUMO até LUMO+4, para os quatro inibidores e os quatro derivados analisados. A molécula de imatinibe está presente em duas formas sem protonação no grupo metilpiperazina (imatinibe) e com a protonação (imatinibe⁺). O dasatinibe, nilotinibe, niloCl e niloH não apresentam estado protonado em *pH* fisiológico. O ponatinibe também apresenta a protonação no mesmo grupo que o imatinibe. Portanto, foram calculados as energias para a molécula neutra (ponatinibe) e protonada (ponatinibe⁺), com o objetivo de observar o impacto da protonação nas energias destes orbitais.

Tabela 6 – Valores das energias dos orbitais moleculares HOMO até HOMO-4, energias em eV. Funcional B3LYP na função de base 6-311+G(d,p).

Ligante	HOMO	HOMO-1	HOMO-2	HOMO-3	HOMO-4
imatinibe	-5,08	-6,01	-6,37	-6,49	-6,93
imatinibe+	-7,11	-7,75	-8,30	-8,37	-8,56
dasatinibe	-6,17	-6,39	-6,58	-6,76	-6,94
nilotinibe	-6,27	-6,31	-6,87	-7,20	-7,38
niloCl	-6,22	-6,29	-6,78	-7,13	-7,33
niloH	-5,98	-6,18	-6,44	-6,73	-7,15
ponatinibe	-5,80	-5,95	-6,08	-6,42	-7,20
ponatinibe+	-7,15	-8,59	-8,69	-8,78	-8,85
pontCl	-5,77	-6,05	-6,15	-6,37	-7,31
pontCl+	-7,12	-8,55	-8,67	-8,75	-8,81
pontH	-5,66	-5,76	-5,89	-6,00	-6,08
pontH+	-7,07	-8,25	-8,60	-8,71	-8,85

Na molécula de imatinibe desprotonada, o valor da energia de seu HOMO é -5,08 eV, enquanto o imatinibe⁺ tem o valor da energia do HOMO de -7,10 eV. Mostrando uma diferença de energia de 2,02 eV. O mesmo ocorre para os outros orbitais ocupados e desocupados, sendo que no caso do ponatinibe e derivados, a diferença entre o HOMO do protonado e desprotonado é menor que 1,41 eV. O valor da energia do HOMO do dasatinibe é de -6,17 eV, próximo ao valor da energia do HOMO da molécula de nilotinibe (-6,27 eV). O orbital HOMO da molécula de dasatinibe tem energia mais elevada do que as moléculas desprotonadas, de imatinibe (-5,08 eV) e ponatinibe (-5,80 eV). Porém,

Tabela 7 – Valores das energia dos orbitais moleculares LUMO até LUMO+4, energias em eV. Funcional B3LYP, com a função de base 6-311+G(d,p).

molécula	LUMO	LUMO+1	LUMO+2	LUMO+3	LUMO+4	Gap
imatinibe	-1,94	-1,58	-1,17	-0,82	-0,75	3,14
imatinibe+	-4,30	-3,63	-3,24	-3,07	-3,00	2,81
dasatinibe	-1,86	-0,84	-0,70	-0,67	-0,58	4,31
nilotinibe	-2,30	-1,87	-1,52	-1,49	-1,23	3,96
niloCl	-2,29	-1,92	-1,66	-1,55	-1,48	3,93
niloH	-2,22	-1,60	-1,39	-1,14	-0,84	3,76
ponatinibe	-2,20	-1,83	-1,47	-1,02	-0,60	3,60
ponatinibe+	-4,15	-3,72	-3,48	-3,32	-3,12	3,00
pontCl	-2,20	-1,83	-1,54	-1,26	-1,19	3,57
pontCl+	-4,16	-4,09	-3,77	-3,49	-3,29	2,96
pontH	-2,09	-1,65	-1,20	-0,50	-0,02	3,57
pontH+	-4,20	-3,37	-3,24	-3,20	-2,97	2,87

o dasatinibe tem energia do orbital HOMO mais alta que todas moléculas no estado protonado, como pode ser visto na Tabela 6.

A substituição por um grupo metil, que gerou o niloH, tem reflexos nos orbitais de fronteira. O orbital HOMO no niloH tem energia de -5,98 eV, superior ao nilotinibe -6,27 eV. Esta tendência é observada ao longo dos orbitais HOMO até o HOMO-4 (Tabela 6), com uma variação de 0,13 eV até 0,47 eV. A molécula do niloCl origina-se da substituição do trifluormetil por triclorometil. Portanto, dentro do contexto dos halogênios, nesta posição encontramos interferência nas energias dos orbitais de fronteira. O HOMO desta molécula tem valor energético de -6,22 eV, muito próximo ao do nilotinibe de -6,27 eV (Tabela 6), ambos abaixo do niloH -5,98 eV. Ou seja, os halogênios tendem a apresentar uma energia de HOMO mais baixa. No entanto, há uma característica presente na diferença entre o orbital E(HOMO)-E(HOMO-1) e E(LUMO)-E(LUMO+1). A diferença E(HOMO)-E(HOMO-1) é 0,05 eV e 0,07 para nilotinibe e niloCl, respectivamente, mas é de 0,20 eV para o niloH. Já a diferença E(LUMO)-E(LUMO+1) é de 0,37 eV e 0,44 eV para nilotinibe e niloCl, respectivamente, mas é de 0,62 eV para o niloH.

A molécula pontH, tem orbital HOMO com energia próxima ao ponatinibe, com valor de -5,81 eV e -5,80 eV, respectivamente. Esta pequena diferença, reflete nos demais orbitais ocupados mais internos. Assim como na comparação do pontH, o pontCl também apresenta uma energia do orbital HOMO (-5,77 eV) mais alta que a do ponatinibe (-5,80eV). Demonstrando assim que, a presença de halogênios nesta posição da molécula tem reflexos nas energias do orbitais.

3.4 Orbitais de fronteira da molécula de imatinibe, protonada e sem protonação.

Como foi dito anteriormente, a molécula de imatinibe sofre protonação em uma das suas extremidades, mais precisamente onde se encontra o fragmento metilpiperazina, o nitrogênio deste anel comporta-se como uma base recebendo um próton H^+ . As energias dos orbitais ocupados e desocupados mostram um aumento da diferença de energia entre o HOMO e os níveis ocupados internos e o LUMO e os níveis desocupados mais altos. Assim, foram realizadas investigações nas contribuições do HOMO até HOMO-3 e LUMO até LUMO+3. A Figura 39 mostra a localização dos orbitais HOMO até o HOMO-3. A presença deste próton muda completamente as energias dos orbitais e a localização destes orbitais de fronteira na molécula de imatinibe.

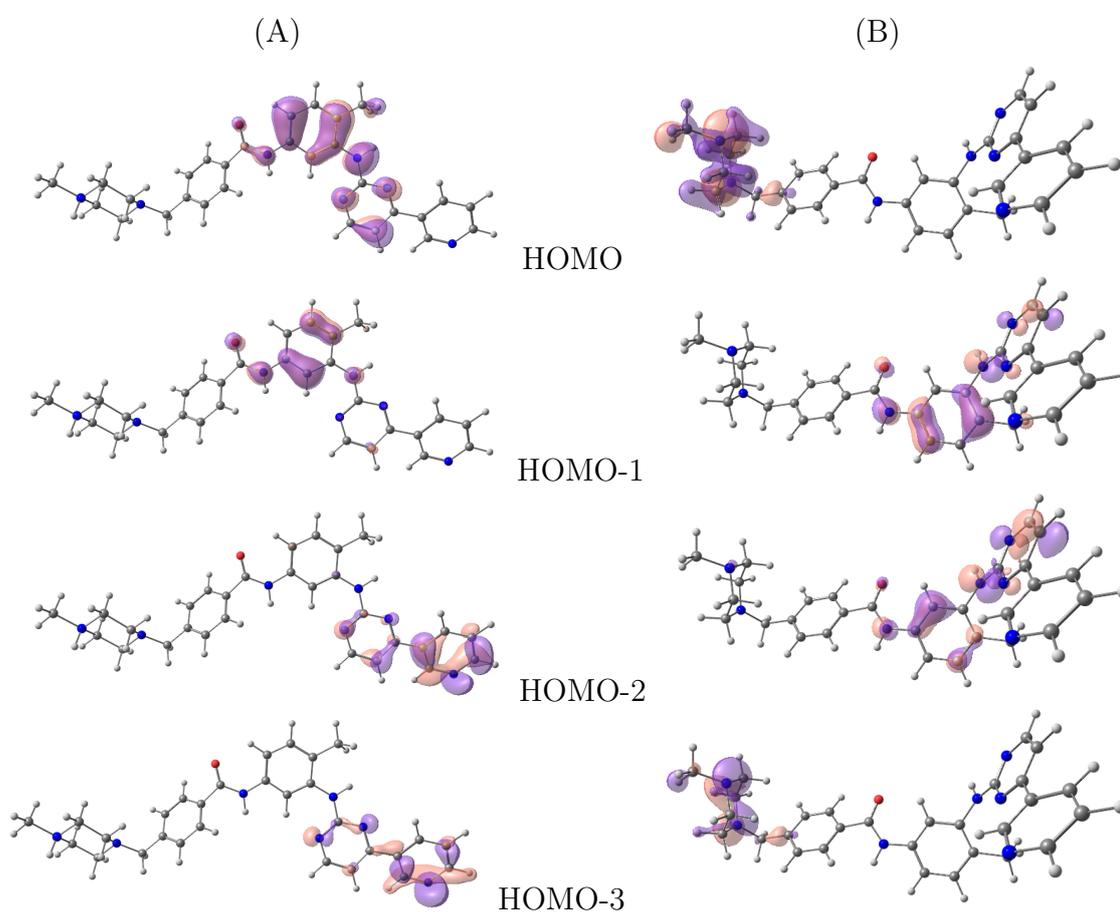


Figura 39 – Orbitais ocupados da molécula de imatinibe desprotonada (B) e protonada em (A), usando o método B3LYP/6-311+G(d,p).

Na distribuição dos orbitais na molécula de imatinibe desprotonada, o orbital HOMO encontra-se localizado na região em que ocorreu a protonação (metilpiperazina). Na molécula de imatinibe protonada, os orbitais HOMO e HOMO-1 estão posicionados mais ao centro da molécula. No estudo de *docking* para a proteína com a mutação T315I,

os grupos encontrados nestas regiões do ligante estão interagindo com os resíduos apolares Ile315, Ala269 e Leu370 e o polar Glu316 (como pode ser visto no capítulo 3.1, Figura 27).

Do mesmo modo, a protonação sofrida pela molécula de imatinibe modifica o perfil dos orbitais LUMO. O orbital LUMO desprotonado tem energia de -1.94 eV, protonado essa energia é de -4,30 eV, com a diferença de energia entre eles igual a 2,35 eV. Isto gera um decréscimo do *gap* entre o desprotonado de 3,14 eV e o protonado de 2,81 eV. O orbital LUMO da molécula protonada está mais suscetível a interações com resíduos, agindo como base de Lewis ou Bronsted-Lowry, como visto na Figura 40. Realizando a interação do tipo ponte de hidrogênio com resíduos metionina (Met318) e interações π , com os resíduos Phe317 e Tyr253 (Figura 27).

O orbital LUMO da molécula protonada de imatinibe⁺, está localizado na região do grupo da metilpiperazina, importante para interações com o bolsão catalítico DFG-out e a Ile360. Enquanto que, o LUMO da molécula de imatinibe neutra está na outra extremidade. A região de contribuição do LUMO, da forma protonada, faz interações com os resíduos Ile360, His361 e Asp381 (Figura 40). Fazendo desta região um local importante para o ancoramento enzima-ligante. Apenas o orbital LUMO+1 apresenta uma pequena contribuição do grupo piperazina.

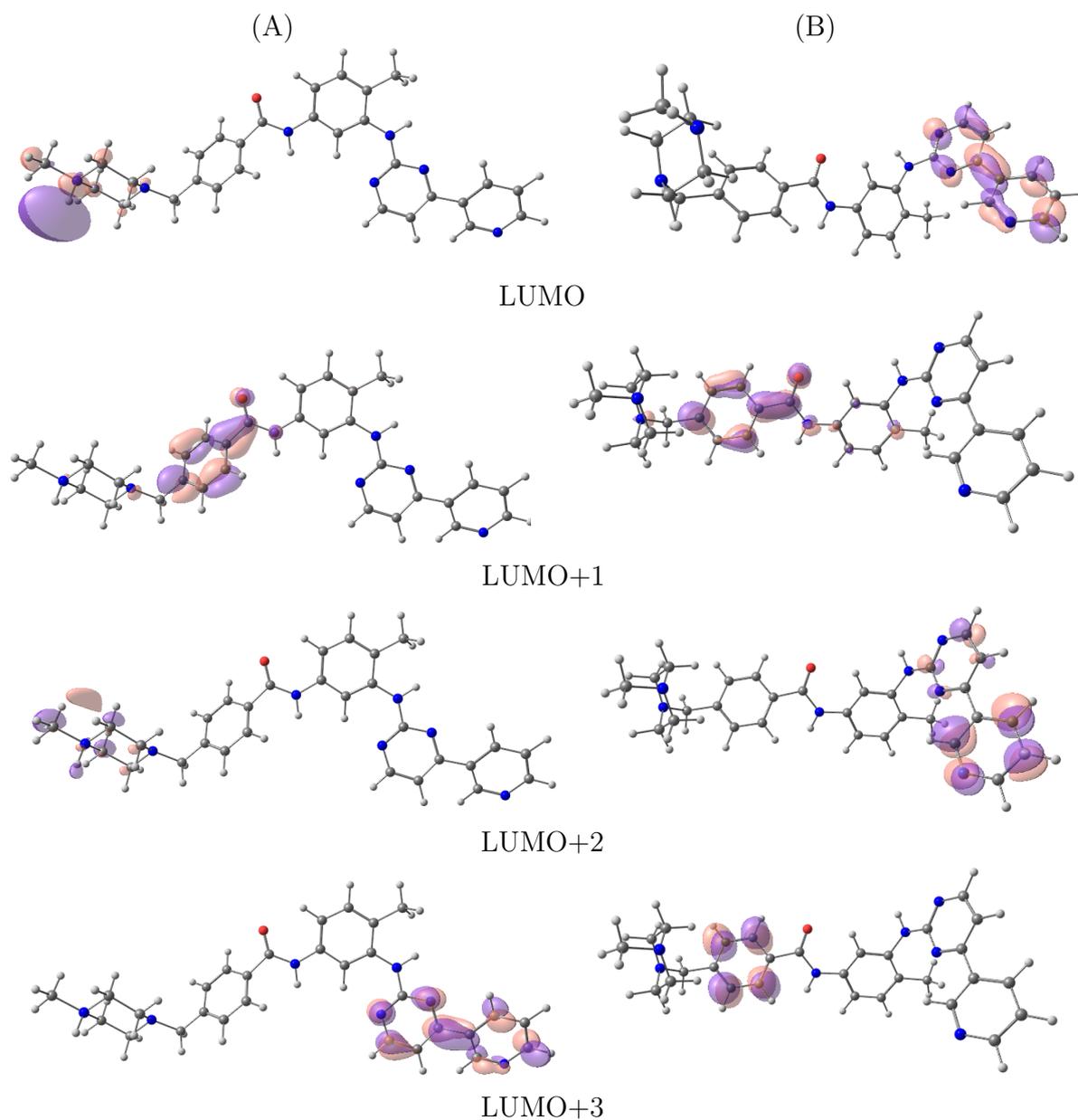


Figura 40 – Orbitais desocupados da molécula de imatinibe desprotonada (B) e protonada em (A). Cálculos com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

3.4.1 Análise de Componentes Principais

Conforme (PERONI; MARTINS; ANDO, 1999), o papel principal da análise multivariada é reduzir a dimensão de uma grande quantidade de dados, para um número menor de parâmetros com significativa relevância, para fornecer uma visão estatisticamente privilegiada do conjunto de dados.

Na Figura 41, a PCA foi construída usando os valores das energias dos orbitais HOMO até HOMO-14 e LUMO até LUMO +14, para moléculas protonadas e desprotonadas dos inibidores estudados, afim de comparar o comportamento energético destas moléculas. Observa-se a criação de dois pólos distintos, para moléculas protonadas e desprotonadas, mostrando que a protonação modifica o comportamento eletrônico não somente dos orbitais de fronteira, mas também dos orbitais internos.

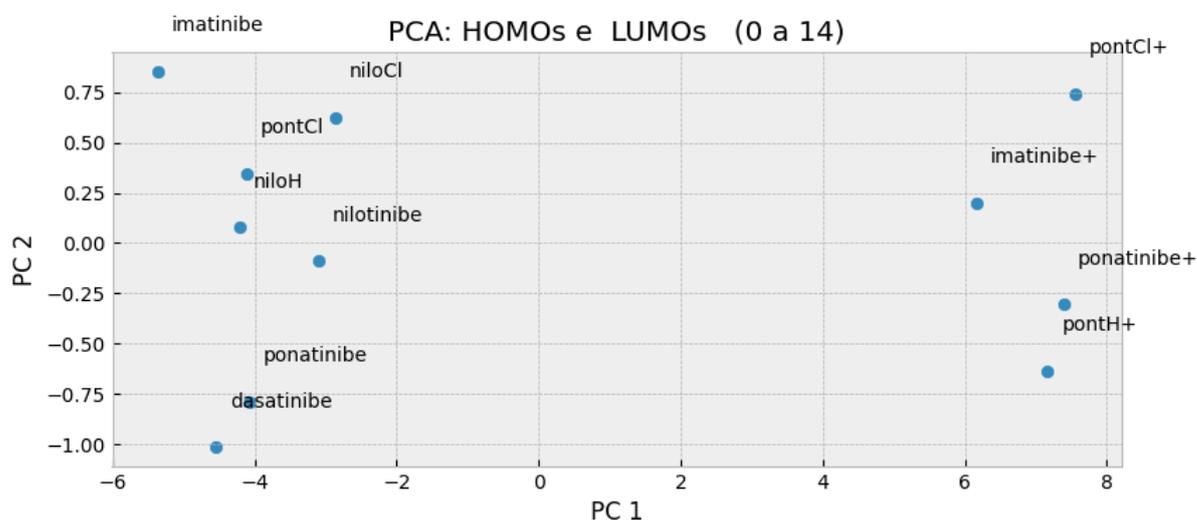


Figura 41 – Análise PCA dos orbitais HOMO até HOMO-14 e LUMO até LUMO+14 para moléculas protonadas e desprotonadas.

Esta análise da PCA (Figura 41) mostra que o imatinibe não se aproxima de qualquer um dos outros inibidores protonados. Para confirmar essa observação, foi realizado um estudo uma PCA com os orbitais HOMO e LUMO, com orbitais internos até 14, somente com as moléculas protonadas (Figura 42). Nesta nova análise, é possível observar o comportamento diferente do imatinibe⁺ frente as moléculas do ponatinibe e seu derivados.

a região da molécula onde está localizado o orbital HOMO-3 ($-6,76$ eV) em dois pontos, com a interação do tipo $\pi - \sigma$ com clorobenzeno a $3,76$ Å e uma interação tipo ligação de hidrogênio a $2,84$ Å. Isto não foi observado na ancoragem com a tirosina quinase na forma selvagem (1OPJ) na conformação DFG-out. Na conformação DFG-out, tanto na forma mutada (3IK3) quanto na forma selvagem (1OPJ), o resíduo Asp381 faz ligação de hidrogênio com a amida (HOMO-3), a uma distância de $2,60$ Å. O orbital HOMO-2 está presente na hidroxila e interage, via ligação de hidrogênio, com os resíduos Asp381 e Ala269, na forma DFG-out. Na forma selvagem, o orbital HOMO-3 demonstra ter uma função importante, pois abriga uma densidade maior de interações e pela localização dos resíduos dentro da proteína.

A região do LUMO da molécula de dasatinibe está no anel tiazol, estendendo-se no sentido do grupo amida no centro da molécula, com o valor da energia deste orbital de $-1,86$ eV. O LUMO no fragmento de tiazol apresenta-se como um sítio de interações importantes entre a molécula e a proteína, pois abriga a maioria das interações feitas, tanto para a forma selvagem DFG-in e DFG-out quanto a mutação T315I DFG-out. O orbital LUMO+1 abrange uma área maior da molécula. Dentro desta região é possível encontrar também o orbital LUMO+2 e LUMO+3. Estes dois últimos são superponíveis, podendo supor que, outros orbitais desocupados deste inibidor possam contribuir para as diversas interações desta molécula. Por este motivo, foram calculadas o *gap* de energia entre o orbital HOMO e os orbitais LUMO+n ($n=1-14$). Os valores estão disponíveis na Tabela do Anexo 1. Encontrando um valor pequeno deste *gap*, o que reforça a ideia da contribuição do LUMO para as interações do dasatinibe.

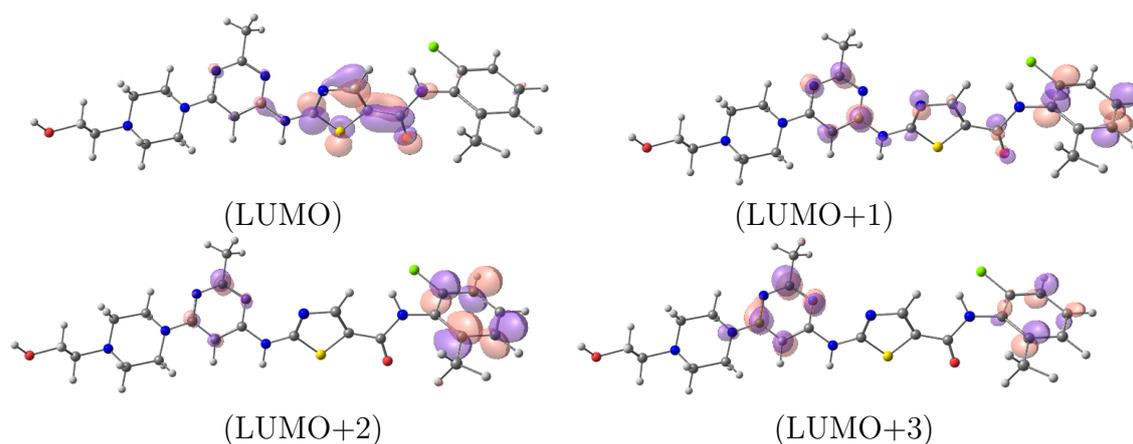


Figura 44 – Orbitais LUMO, LUMO+1, LUMO+2 e LUMO+3 da molécula de dasatinibe. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

A Figura 46 traz a análise PCA da diferença entre a energia do HOMO e os orbitais LUMO. O resultado mostrou uma separação das moléculas desprotonadas, com a formação de grupos distintos de moléculas, o imatinibe com comportamento mais próximo

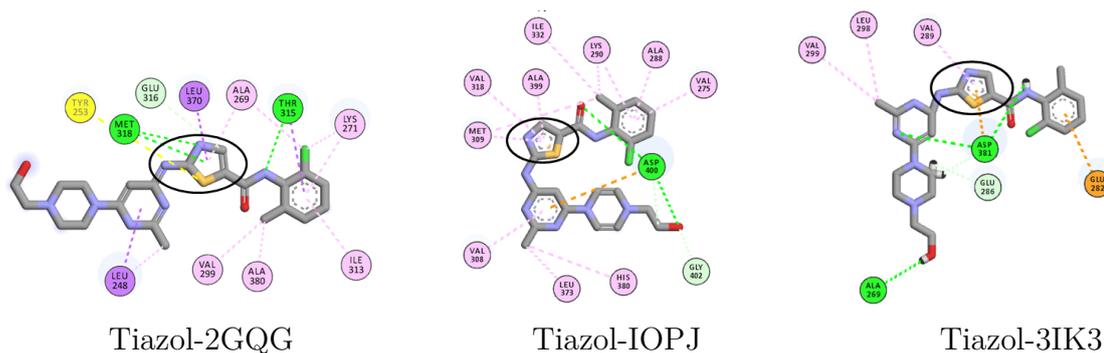


Figura 45 – Interações feitas pelo grupo tiazol presente no dasatinibe como as proteínas IOPJ, 2GQG e 3IK3.

ao ponatinibe, e o dasatinibe isolado mostrando que nesta propriedade, o dasatinibe se comporta distinto dos demais inibidores.

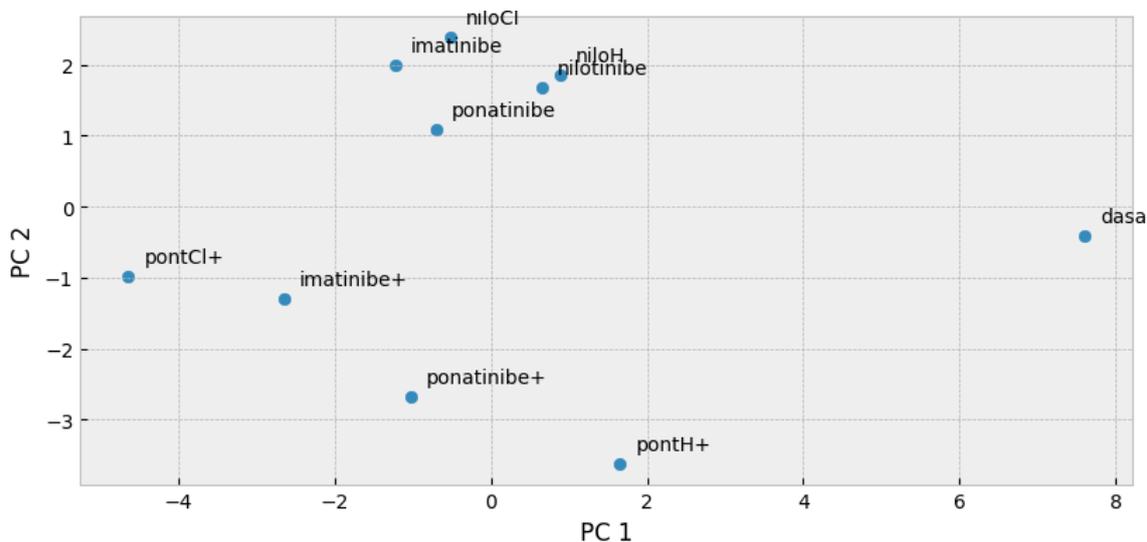


Figura 46 – PCA da energias entre o orbital HOMO e o LUMO+n (n=1-14,) para todas moléculas protonadas e não protonadas.

3.6 Orbitais de fronteira da molécula do nilotinibe

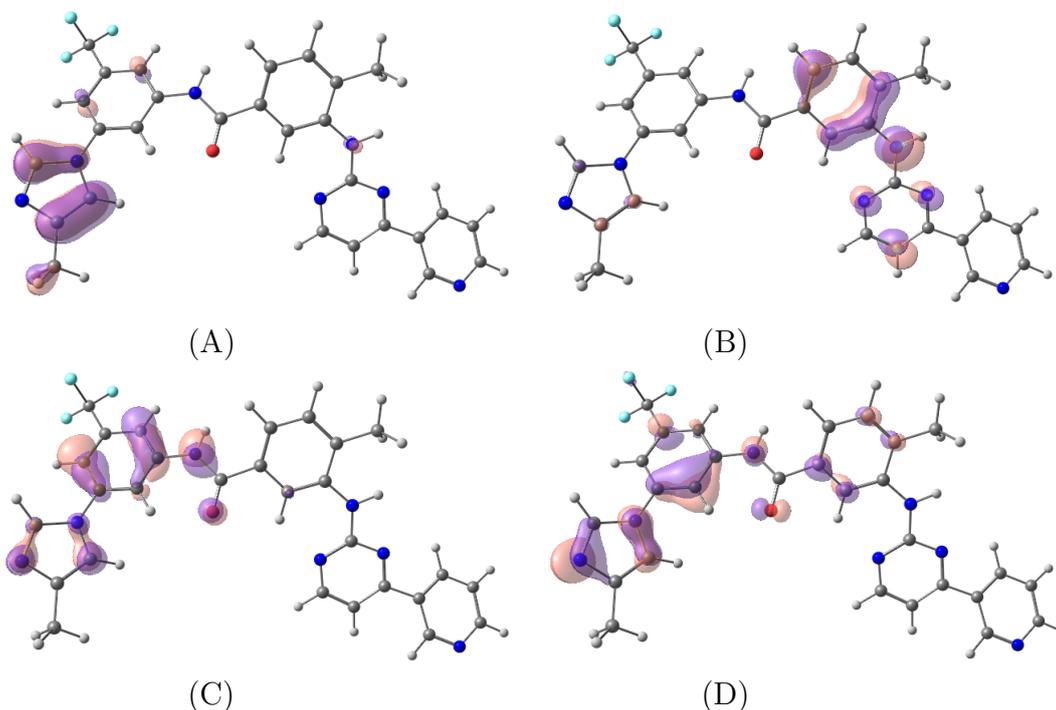


Figura 47 – Orbitais HOMO da molécula de nilotinibe. (A) HOMO, (B) HOMO-1, (C) HOMO-2, (D) HOMO-3. Os cálculos foram realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

A molécula de nilotinibe tem o orbital HOMO com menor valor de energia $-6,27$ eV, entre todas as moléculas não protonadas estudadas. Este inibidor possui um grupo metilimidazol, que está localizado na extremidade da estrutura, visto na Figura 48. Este é um grupo heterocíclico, formado por um anel de 5 membros com 2 átomos de nitrogênio, um grupo semelhante está presente na estrutura da molécula do dasatinibe. Entretanto, no dasatinibe um dos nitrogênios é substituído por um átomo de enxofre criando o grupo tiazol. No nilotinibe, o grupo imidazol é levado para extremidade da molécula, como pode ser visto na Figura 48. O orbital HOMO apresenta maior importância na forma selvagem (1OPJ), pois tem um número maior de interações, tornando-se a principal região de interação da molécula na conformação DGF-out.

O orbital LUMO está localizado sobre o fragmento de piridina e pirimidina na outra extremidade da molécula (Figura 49). A região onde está localizada este orbital demonstra ter menor importância (menor número de interações) na forma selvagem e maior importância na forma mutada, pois na forma selvagem (Figura 48-A) tem menor número de interações em relação à forma mutada (Figura 48-b). A participação da região do LUMO+2 é ainda mais emblemática, pois concentra um número de interações superior ao LUMO, tanto na forma selvagem e principalmente na mutação T315I. Assim, podemos inferir que proteína com mutação T315 dá ao inibidor uma orientação direcionada aos

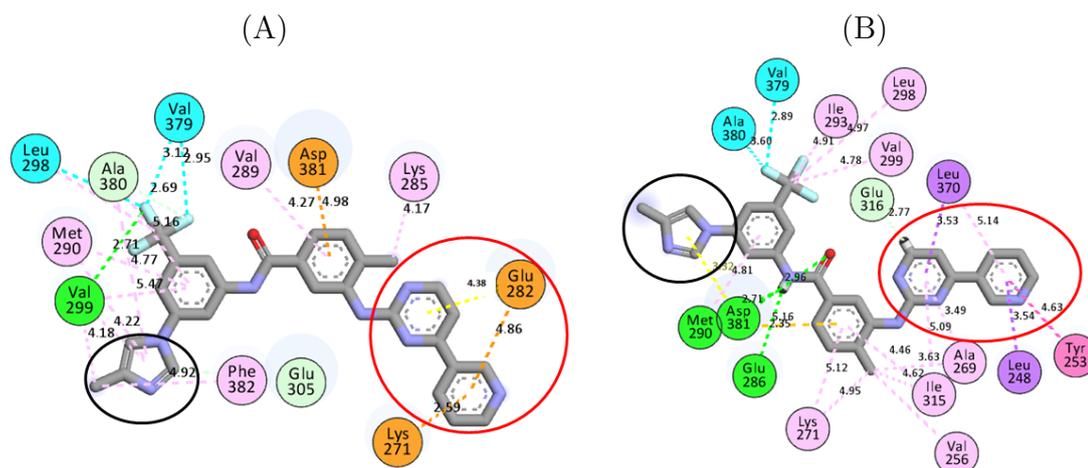


Figura 48 – Grupo metilimidazol circulado em preto, no círculo vermelho piridina-pirimidina da molécula de nilotinibe em (A) ancorado com proteína mutada 3IK3 em (B) ancorado com a proteína selvagem 1OPJ.

resíduos com capacidade doadora de elétrons, principalmente no LUMO+2, embora o nilotinibe não interage diretamente com a treonina da posição 315.

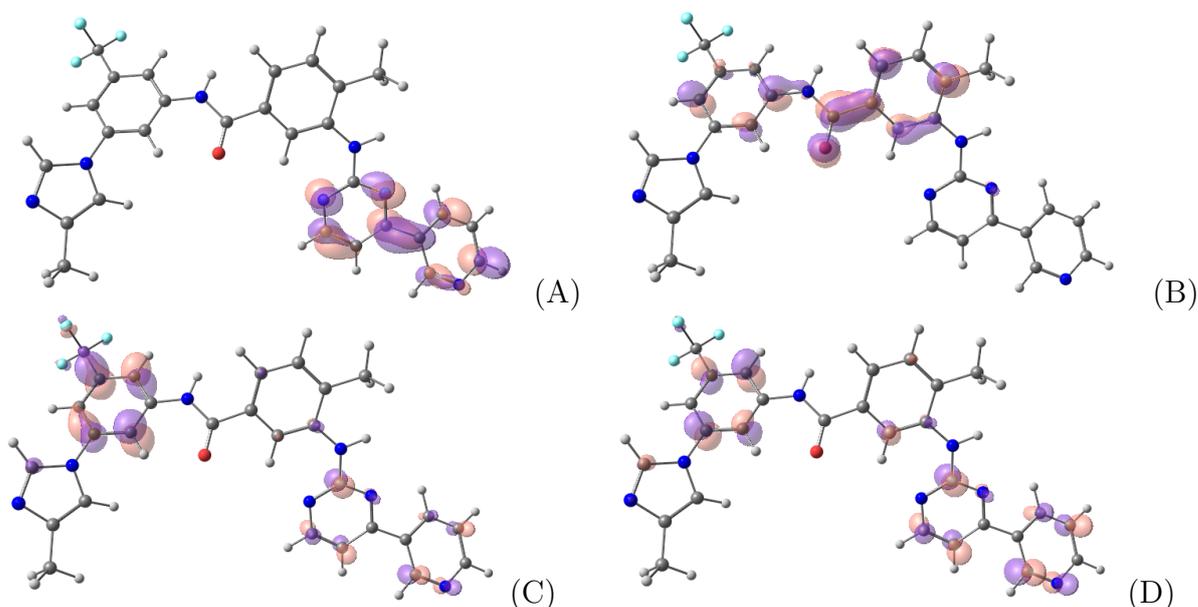


Figura 49 – Orbitais LUMO da molécula de nilotinibe. (A) LUMO, (B) LUMO+1, (C) LUMO+2, (D) LUMO+3. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

O orbital HOMO demonstra ter uma importância para esta molécula. Desta forma, fizemos uma análise PCA somente dos orbitais ocupados, indo desde o HOMO até o HOMO-14. A Figura 50 mostra a PCA com moléculas desprotonadas. O nilotinibe se assemelha ao niloCl na PCA, que parece ser ditada pela presença dos halogênios, já que sem o halogênio no niloH, os orbitais ocupados se assemelham com os do dasatinibe, e

ficam muito diferentes do imatinibe, ressaltando que o nilotinibe foi projetado com base no imatinibe.

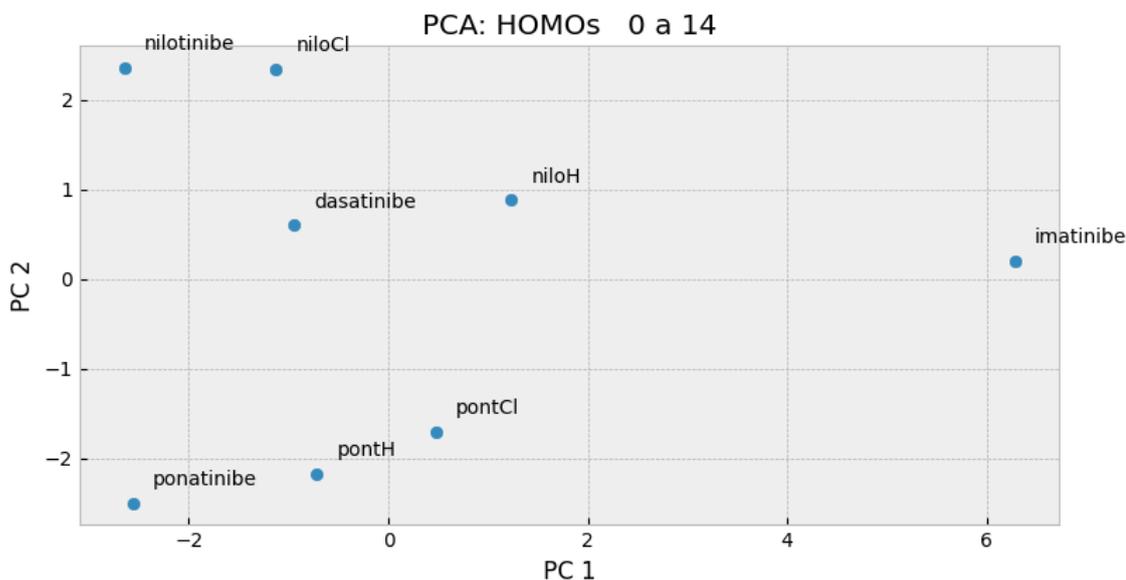


Figura 50 – Gráfico de PCA, orbitais ocupados das moléculas desprotonadas.

3.6.0.1 Orbitais de fronteira da molécula de niloH

A localização do orbital HOMO (Figura 52) é pouco afetada pela substituição, ficando sobre o anel imidazol na mesma extremidade molecular que a molécula original (Figura 47). Da mesma forma, os demais orbitais ocupados não sofrem alteração com substituição pela metila. Tal fato mostra que a presença do metil nesta posição do anel não muda a região do HOMO, e não acarreta mudanças drásticas no perfil de inibição desta molécula.

Usando análise multivariada PCA é possível identificar que a diferença entre niloH e nilotinibe é considerável, e que o perfil desses orbitais ocupados se aproximam do encontrado no dasatinibe, criando um clusters para os dois neste gráfico. Os orbitais LUMO, LUMO+1, LUMO+2, LUMO+3 (Figura 52) estão no lado oposto da molécula em relação ao orbital HOMO. Ainda pode-se perceber que os orbitais desocupados estão exatamente no grupo aminopirimidínico, do qual o nilotinibe é derivado.

Os valores de energia dos orbitais desocupados, assim como os orbitais ocupados, são afetados pela alteração molecular. Para os desocupados (Tabela 7), o *gap* de energia entre o nilotinibe e o niloH é menor que o encontrado nos ocupados. Estes valores são mais discretos que nos ocupados, que estão diretamente ligado a resíduo de Val299, assim como no imatinibe e ponatinibe. As regiões do HOMO-1 e LUMO+1 estão diretamente ligada aos resíduos Asp381 e Glu316.

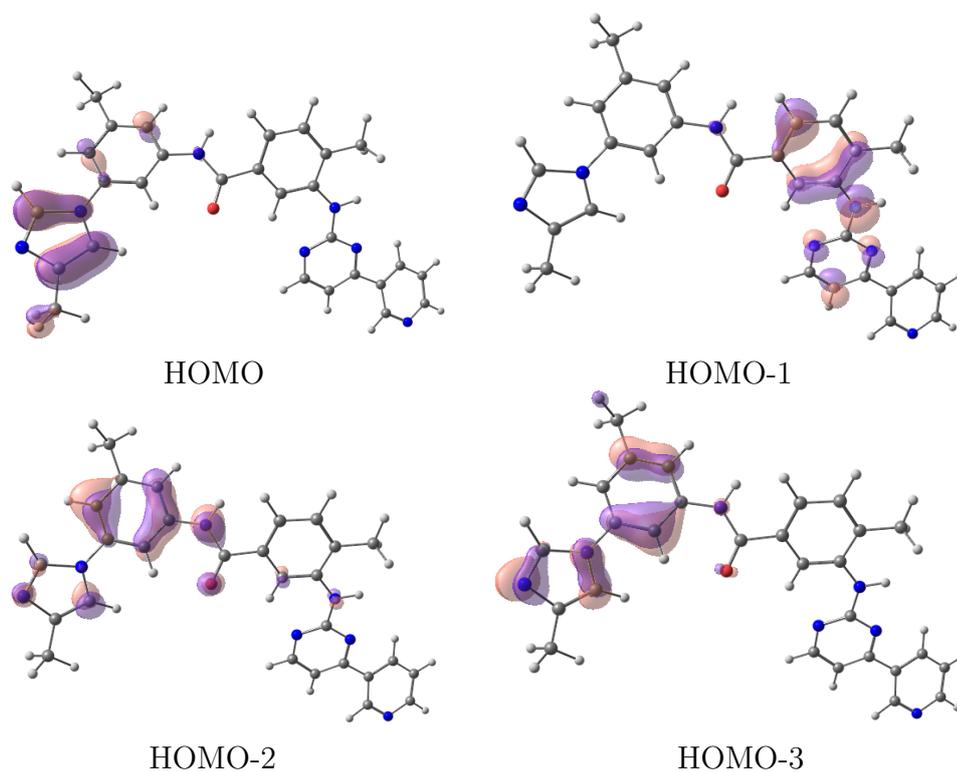


Figura 51 – Orbitais ocupados para a molécula de niloH. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

A análise multivariada dos orbitais desocupados para moléculas desprotonadas, mostra que o niloH se aproxima do nilotinibe, formando um cluster com outras moléculas, especificamente com o pontCl e pontH, e distanciado do dasatinibe (Figura 53). Ou seja, o PCA dos orbitais desocupados não traz uma relação direta com a atividade destas moléculas.

3.6.0.2 Orbitais de fronteira da molécula de niloCl

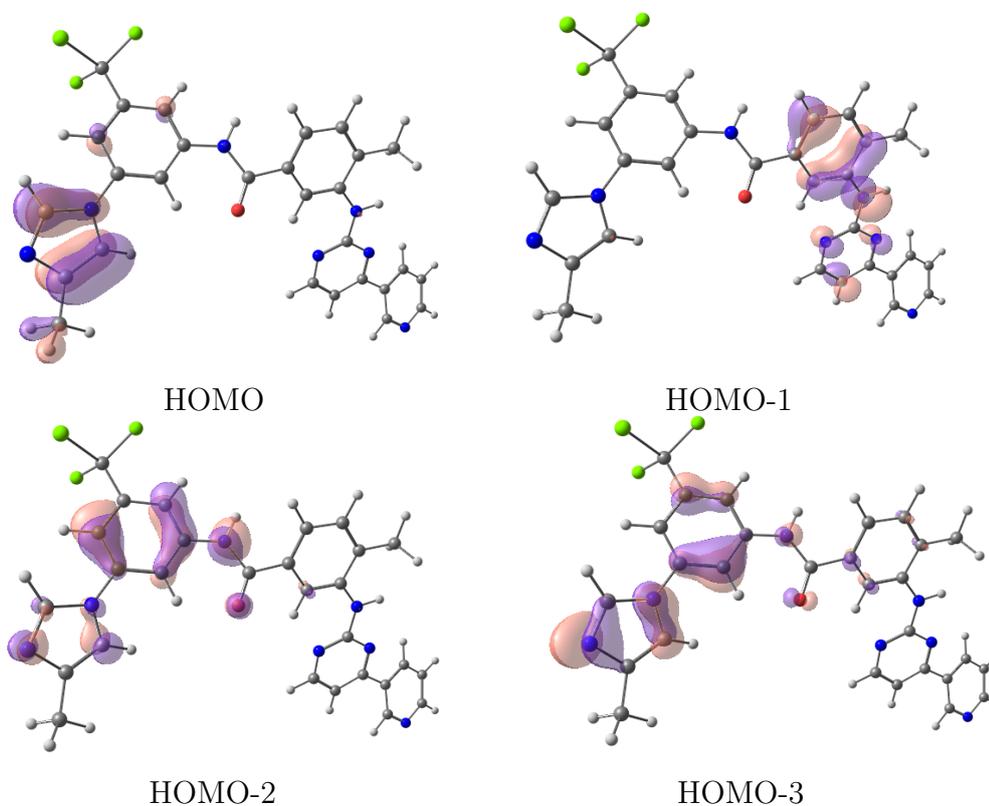


Figura 54 – Orbitais ocupados da molécula de niloCl. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

A análise da PCA (Figura 50), mostra o nilotinibe e niloCl, formando um dos clusters, reafirmando a semelhança energética dos orbitais ocupados de ambos, indicando, assim, que a presença do halogênio nesta posição potencializa os orbitais ocupados, sem mudar a localização dos mesmos. Podendo inferir ainda uma outra tendência: quanto maior o parâmetro de dureza do substituintes, mais os orbitais ocupados podem ser beneficiados, indo para valores mais elevados.

Os orbitais desocupados têm energias com pouca diferença entre o niloCl e o nilotinibe, principalmente os desocupados próximos ao LUMO, demais desocupados (Tabela 6), a medida que o orbital tem maior energia (energias mais altas). A diferença entre o LUMO e o LUMO+1 é pequena. Portanto, estes orbitais LUMO e LUMO+1 possuem mais condições para participar de reações químicas que os demais orbitais analisados (Figura 53).

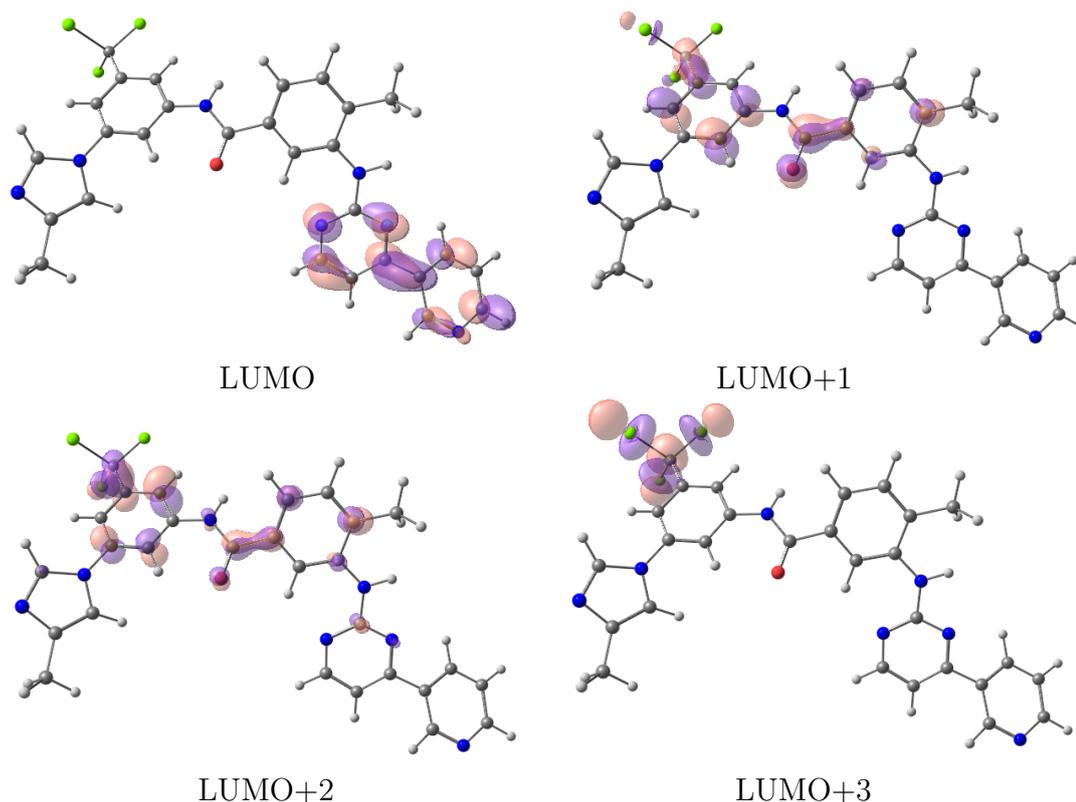


Figura 55 – Orbitais desocupados da molécula de niloCl. Os cálculos foram realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

3.7 Orbitais de fronteira da molécula de ponatinibe

O ponatinibe foi aprovado pelo FDA em 2012, para controle das 3 fases da LMC, principalmente no controle fase blástica, onde predomina a mutação T3151 ([LEUKEMIA, 2013](#)). Apresenta o custo extremamente alto, com média mensal de 16.500,00 dólares, por paciente (valores de 2021). Possui fórmula molecular $C_{29}H_{27}F_3N_6O$, foi desenvolvido através de estudos computacionais, trazendo em sua constituição molecular, assinaturas dos outros "inibidores".

O nitrogênio do grupo metil-piperazina, presente na molécula deste inibidor, pode receber um próton H^+ (como acontece no imatinibe). Este grupo está fixado na extremidade da molécula (Figura 58). A protonação provoca a inversão da localização de posição do orbitais HOMO-LUMO, como pode ser visto na Figura 56 e 62. Sem a protonação, o orbital HOMO está presente no grupo metilpiperazina com a energia de -5,80 eV. Já com a protonação, este orbital está presente no grupo imidazol da pirimidina, com valor energético de -7,12 eV. Assim como acontece no nilotinibe, o orbital HOMO está sobre o grupo imidazol, mas com valor inferior ao seu sucessor ponatinibe. Além do grupo imidazol, pode-se visualizar a presença da pirimidina, formando um grupo heterocíclico único (ver a figura 58). Isto consolida como sítio de interação da molécula, pois abriga várias das

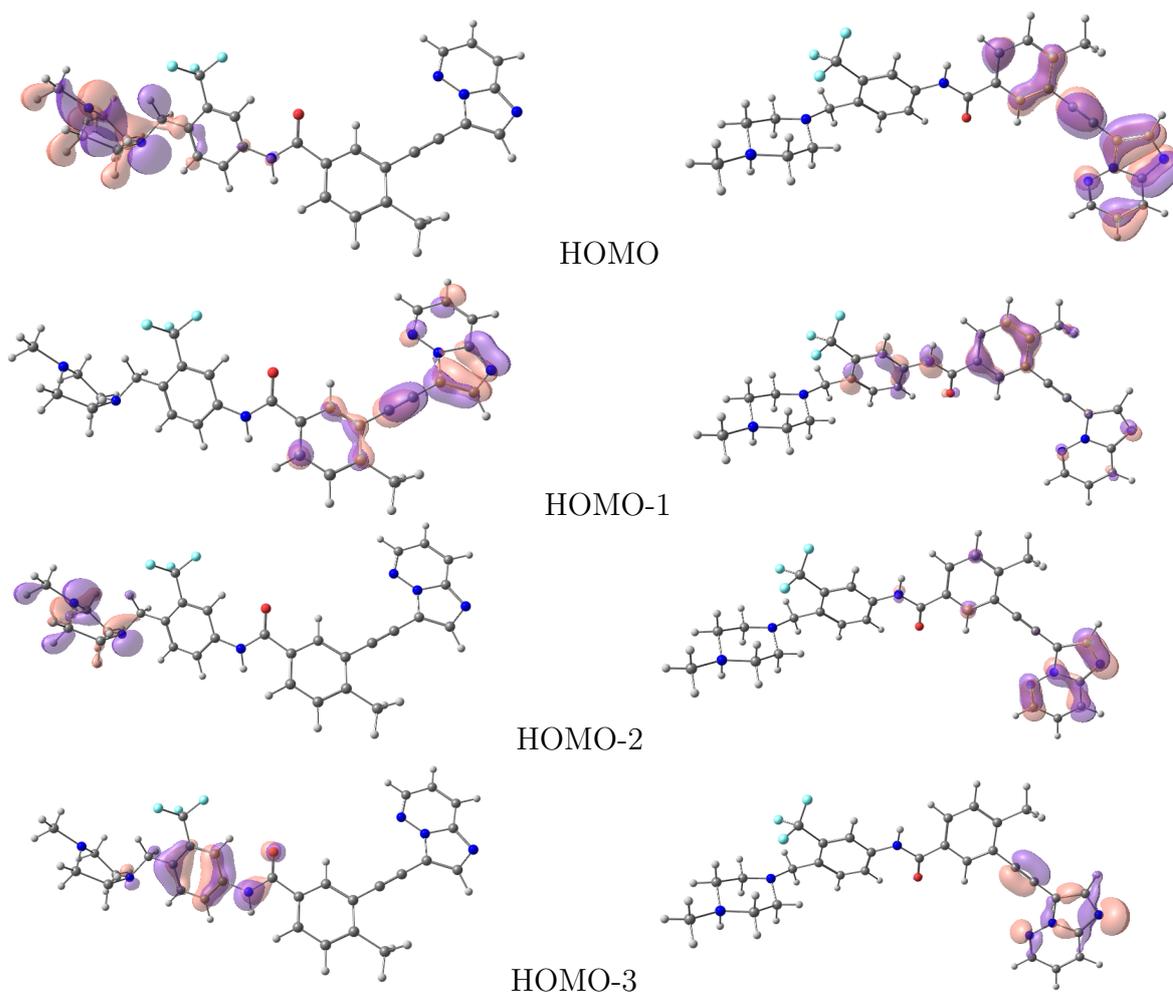


Figura 56 – Orbitais HOMO a HOMO-3 da molécula de ponatinibe, desprotonado à esquerda e protonado à direita. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

interações feitas por este inibidor como, por exemplo, Met318, Leu370, Tyr253, Ala269, na conformação mutada T315I DFG-out.

Na molécula desprotonada, o orbital HOMO está no grupo metilpiperazina e o orbital LUMO está na outra extremidade da molécula onde se encontra a imidazolpirimidina orbital LUMO. A protonação inverte os orbitais, onde estava o orbital HOMO, agora se observa o orbital LUMO. Com reflexo nas energias dos orbitais, o LUMO desprotonado tem valor de energia de -2,20 eV, já o protonado vai para -4,15 eV. O grupo metilpiperazina abriga as seguintes interações Asp381, ILe360, His361, seguindo o imatinibe. Outra característica é a distância das interações. Em grande parte, são interações a curtas distâncias, com a distância máxima de 3,00 Å. A distribuição dos orbitais HOMO e LUMO no ponatinibe está localizada em duas partes importantes da molécula, resgatando o perfil do imatinibe e do nilotinibe.

A análise PCA dos orbitais LUMO, indo do LUMO até o LUMO+14 para todas

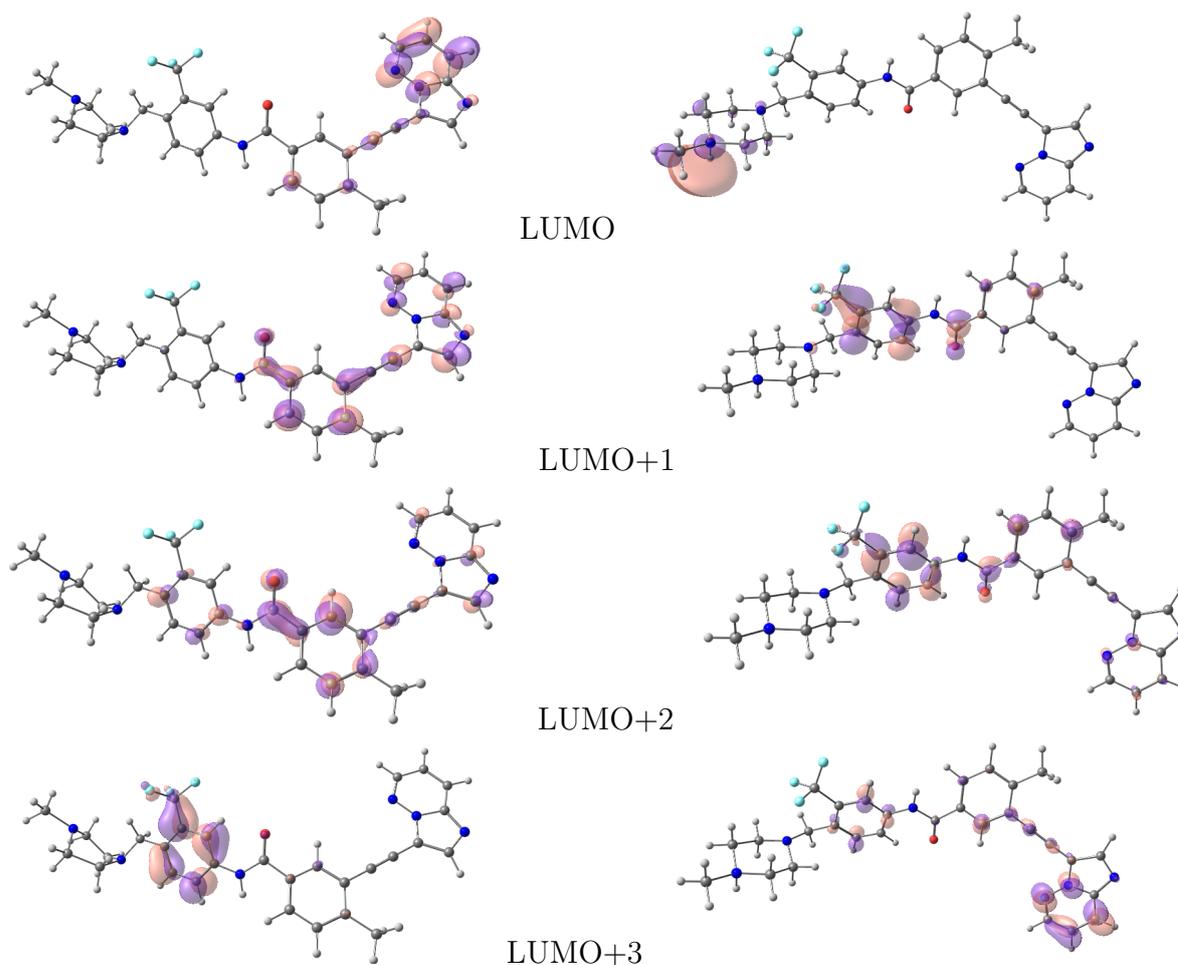


Figura 57 – Orbitais LUMO da molécula de ponatinibe, desprotonado à esquerda e protonado à direita, orbitais LUMO a LUMO+3. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

as moléculas protonadas e desprotonadas, mostra a semelhança dos LUMO do imatinibe protonada e do ponatinibe protonado, ressaltando que os sítios doadores de elétrons das duas moléculas têm similaridade, usando como análise, as energias e localização destes orbitais.

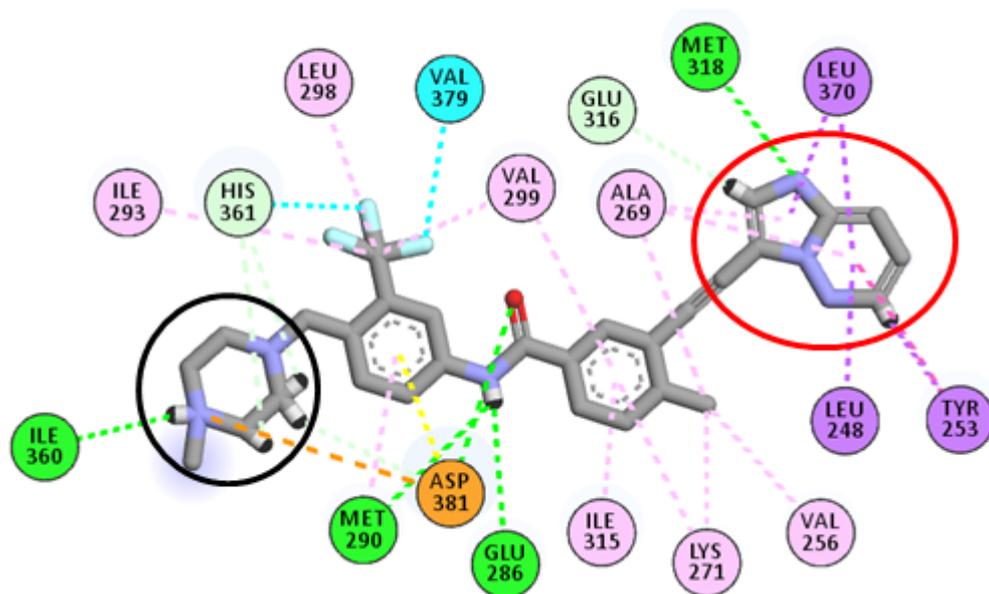


Figura 58 – Interações entre a molécula de ponatinibe+ com a proteína 3IK3.

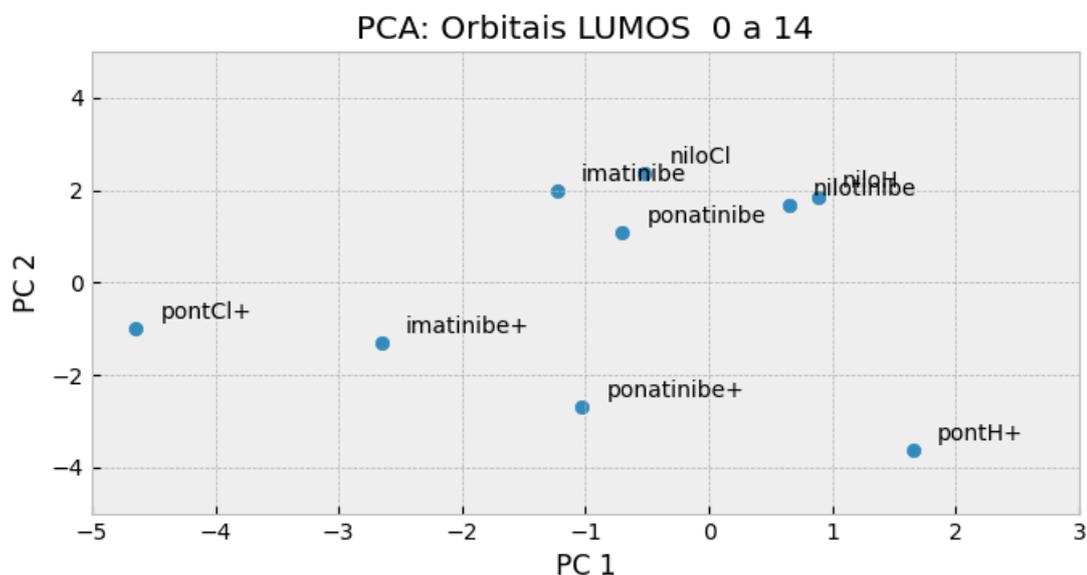


Figura 59 – PCA: Energia dos orbitais LUMO de 0 a 14, para moléculas protonadas e desprotonadas.

A molécula de ponatinibe foi projetada com base em inibidores que a antecederam. A Figura 60, mostra fragmentos presentes em outros inibidores, como o imatinibe, o dasatinibe e o nilotinibe. Os círculos em vermelho mostram as inovações da molécula, na tentativa de levar este fragmento a ter contato com parte do sítio ativo que outros inibidores não conseguem atingir, devido a mutação na posição específica do resíduo 315.

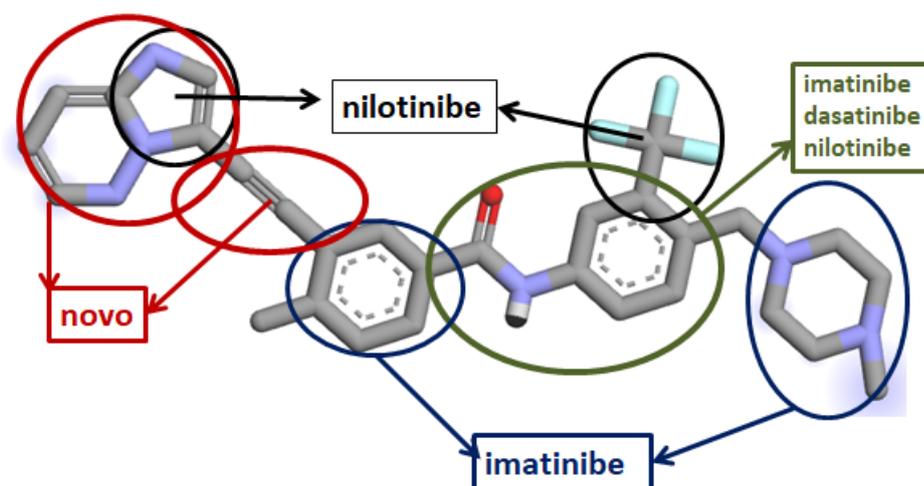


Figura 60 – Fragmentos da molécula de ponatinibe encontrados em outros inibidores. Em verde, presente em todos. Em azul, presente no imatinibe; em preto, presente no nilotinibe.

3.7.1 Orbitais de fronteira da molécula do pontH+

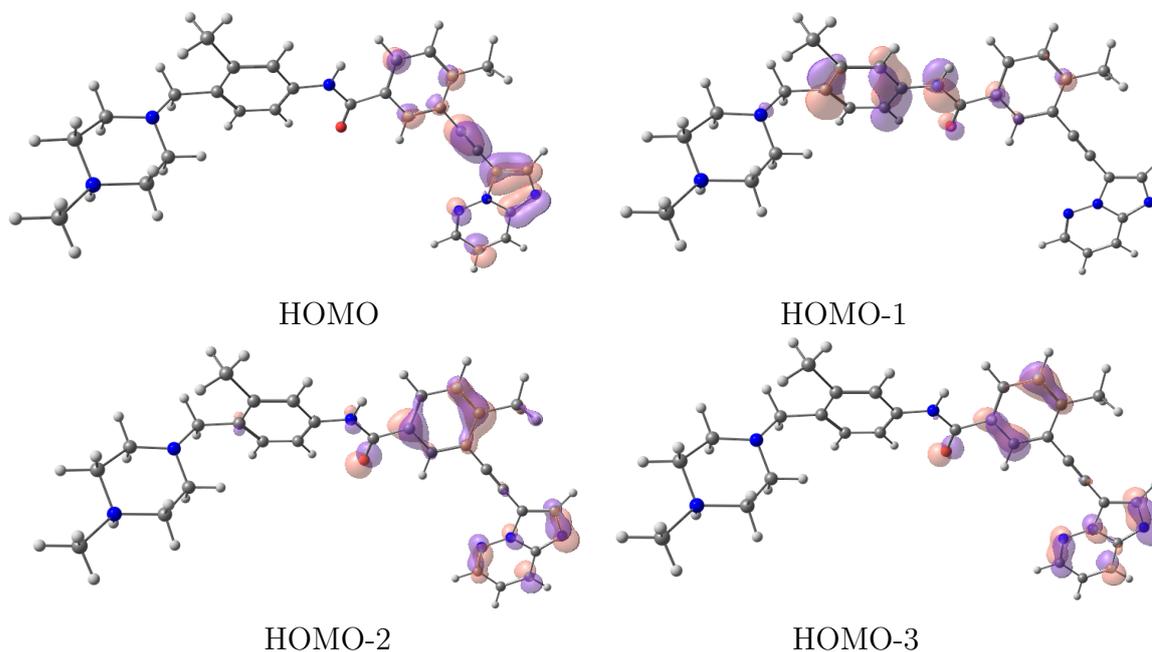


Figura 61 – Orbitais HOMO da molécula de pontH+. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

A análise multivariada de PCA (Figura 50), mostra a proximidade entre pontH e ponatinibe, se diferenciando dos orbitais HOMO do niloH e nilotinibe, onde a modificação molecular do pontH trouxe mais influência sobre as energias dos orbitais HOMO, (ver seção 3.6.0.1). Com a protonação que acontece no grupo metilpiperazina, os orbitais têm

menores energias, assim como acontece com as demais moléculas protonadas. Entretanto, as diferenças energéticas são mais acentuadas, como pode ser visto na Tabela 6. O trifluormetil demonstra ter mais influência nos orbitais ocupados que a molécula protonada com o metil. Como poderia ser esperado, haja visto a maior eletronegatividade apresentada pelo grupamento trifluormetil.

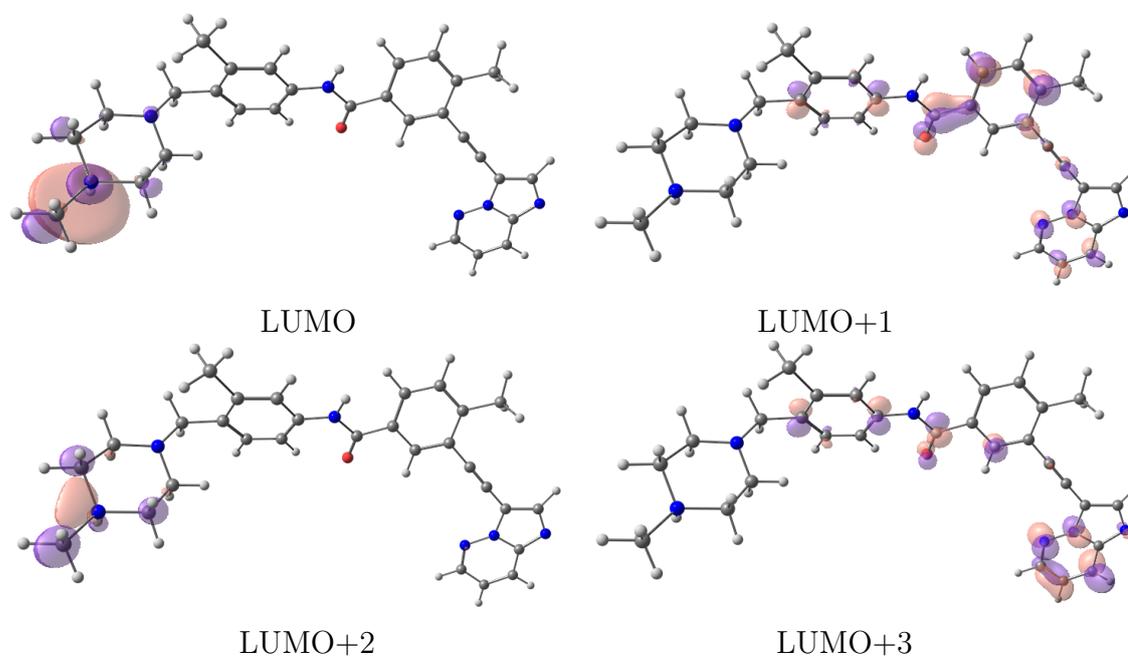


Figura 62 – Orbitais LUMO da molécula de pontH+. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

3.7.2 Orbitais de fronteira da molécula de pontCl+

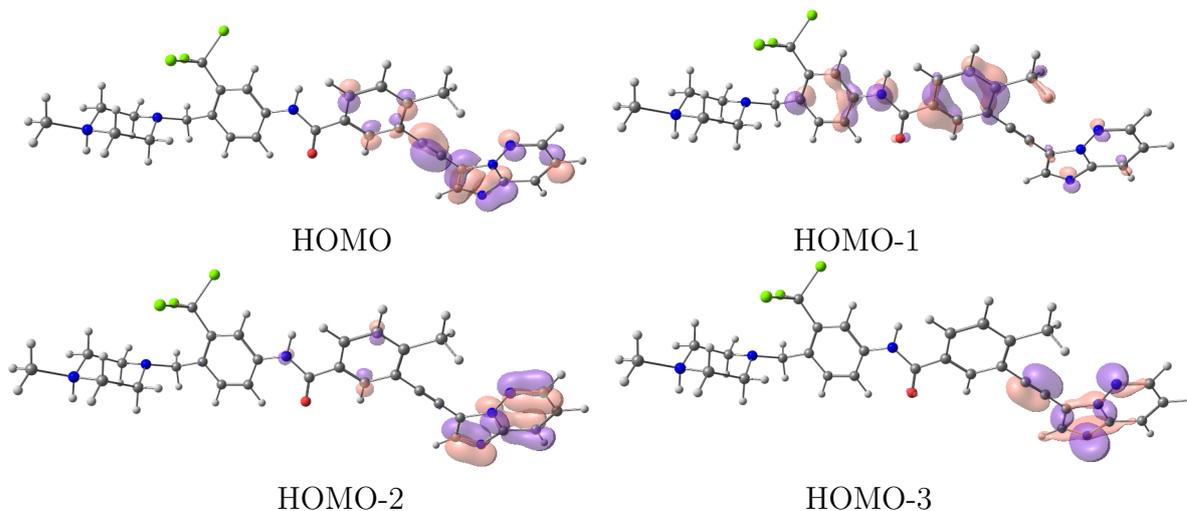


Figura 63 – Orbitais HOMO da molécula de pontCl+. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

O grupo triclorometil e trifluormetil, além de fazer interações com resíduos da proteína selvagem e com mutação, como visto no nilotinibe e ponatinibe, aumenta a reatividade do orbitais ocupados. Os orbitais de fronteira ocupados na molécula de pontCl, se mantém na mesma região que no ponatinibe.

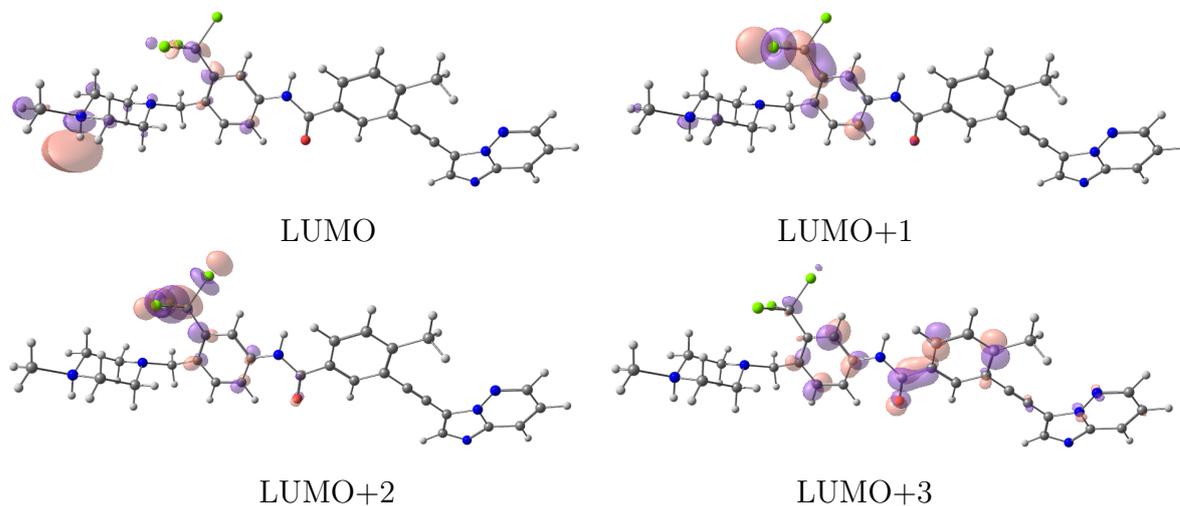


Figura 64 – Orbitais LUMO da molécula de pontCl. Cálculos realizados com o método B3LYP/6-311+G(d,p).

A energia dos orbitais de fronteira desocupados LUMO, tem o mesmo valor para a molécula contendo átomos de cloro e flúor, -2,20 eV, superior à das moléculas contendo átomos de hidrogênio. As mudanças mais significativas acontecem com orbitais desocupados mais externos. As energias dos orbitais com cloro são maiores que com flúor e superiores a

com átomos de hidrogênio. Este fato é possível de ser notado na Figura 64, onde estão desenhados os orbitais. A partir do orbital LUMO+2 podemos ver mudanças na região destes orbitais, o que não foi visto nos orbitais de fronteira ocupados.

3.8 Considerações dos Orbitais de Fronteira

A idéia por trás do estudo de estrutura eletrônica destes inibidores é selecionar as regiões mais importantes e potencializar ao máximo as interações. Neste sentido, cada fármaco traz do seu antecessor suas potencialidades e tenta fortalecer seus pontos mais vulneráveis.

• Imatinibe

- O grupo metilpiperazina presente na extremidade da estrutura molecular protonada influencia as energias e a localização dos orbitais de fronteira.
- O orbital HOMO do imatinibe⁺ é equivalente em localização ao HOMO-1 do imatinibe desprotonado. Esta região é uma região sensível para interação com a proteína tirosina quinase BCR-ABL. Na forma selvagem DFG-out, a região deste orbital está interagindo com o resíduo treonina na posição 315 (porteiro) e outros resíduos importante Glu316, Asp381 (triadade catalítica), estas interações são do tipo ligação de hidrogênio. Por outro lado, estas interações não estão presente na proteína mutada T315I, neste orbital. A interação com resíduo Glu286 inexistente com a proteína mutada T315I, o que diminui a ação deste fármaco.
- A região do orbital LUMO (imatinibe⁺) realiza interações dos tipos: ponte de hidrogênio, com resíduos metionina (Met318), e interações π , com os resíduos Phe317 e Tyr253, com a proteína selvagem e a mutada(T315I).

• Dasatinibe

- Na conformação DFG-in selvagem, o resíduo de treonina na posição 315 interage com a região da molécula do inibidor, onde está localizado o orbital HOMO-3 (-6,76 eV). Na conformação DFG-out, tanto na forma mutada (3IK3) quanto na forma selvagem (1OPJ), o resíduo Asp381 faz ligação de hidrogênio com a amida, uma distância de 2,60 Å.
- A região do LUMO da molécula de dasatinibe está no anel tiazol. Esta região se apresenta como um sítio de interações importantes entre a molécula e a proteína, por abrigar a maioria das interações realizadas.

• Nilotinibe

- O orbital HOMO apresenta maior importância na forma selvagem (1OPJ), pois tem um maior número de interações, tornando-se a principal região de interação da molécula na conformação DGF-out.

- A participação da região do LUMO+2 é ainda mais emblemática, pois concentra um número de interações superior ao LUMO, tanto na forma selvagem e, principalmente, na mutação T315I.
- Os orbitais de fronteira são afetados de forma discreta quando o trifluormetil é substituído por alquil ou triclorometil. O impacto conferido no *score docking* é devido as interações feitas por halogênios não serem aproveitadas pelo alquil, que tenta compensar com aumento de interações no anel, entretanto com interações fracas.

- **Ponatinibe**

- O ponatinibe também foi protonado no grupo metilpiperazina, seguindo a molécula de imatinibe. A protonação provoca a inversão da localização de posição do orbitais HOMO-LUMO.
- HOMO na molécula protonado equivale em localização ao HOMO-1 da molécula desprotonada, localizados em grande parte sobre o grupo imidazol-pirimidina, consolidando como o sítio de interação da molécula, pois abriga várias interações feitas por este inibidor como, por exemplo, Met318, Leu370, Tyr253, Ala269, na conformação mutada T315I DFG-out.
- Os resíduos Asp381 e Ile315 estão interagindo com a região do HOMO-1 da molécula protonada ou orbital HOMO-3 (desprotonada), com exceção do resíduo Il315 interage com a região do HOMO-1 da molécula desprotonada.
- O Ponatinibe resgata a interação do Glu286 na mesma posição que o imatinibe interage com a proteína selvagem, região HOMO-1. Esta interação é perdida quando a molécula ancora na proteína mutada(T315I).

3.9 Orbital natural de ligação, Mapa de potencial eletrostático e Cargas atômicas

Para fins de comparação, o MEP de todas as moléculas estão com o mesmo intervalo (em unidades atômicas), entre $-5,39 \cdot 10^{-2}$ u.a a $5,39 \cdot 10^{-2}$ u.a. As moléculas analisadas foram: imatinibe, dasatinibe, nilotinibe, niloH, niloCl, ponatinibe, pontH e pontCl. Todas estas moléculas foram calculadas no estado neutro, com o funcional B3LYP e com a função de base 6-311+G(d,p).

Outro recurso utilizado em paralelo ao MEP foi a análise do orbital natural de ligação (NBO). Este método fornece várias ferramentas para investigação do comportamento eletrônico da molécula em questão. Dentro desta informações, utilizamos energia de perturbação de segunda ordem $E(2)$. Este conceito de estabilização da molécula se dá pela capacidade da mesma em doar elétrons de átomos ricos para átomos pobres em elétrons. Neste contexto, quanto maior for energia $E(2)$, maior será a energia associada a estabilização da molécula (GLENDENING; LANDIS; WEINHOLD, 2011). As moléculas dos inibidores também foram submetidas ao cálculo com o funcional B3LYP na função de base 6-311+G(d,p).

As maiores energias de segunda ordem das moléculas e as energias de segunda ordem do grupo amida de cada inibidor serão discutidas a seguir. Serão apresentadas as 5 maiores energias de segunda ordem, o número e o tipo dos átomos doadores, número e o tipo dos átomos receptores, tipo de orbital envolvido na doação e recepção. Serão apresentados também os 3 pontos de transferência do grupo amida, pois esta sequência de átomos é conservada nos inibidores analisados, além de ser responsável por interações importantes em todos os inibidores. Na análise NBO, serão apresentadas as possíveis interações (energias de estabilização $E(2)$) entre orbitais do tipo ligante (BD, do inglês "Bonding") e par solitário (LP, do inglês "lone pair").

3.9.1 Imatinibe: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 8 mostra os resultados da análise NBO do imatinibe. Em termos globais, são as transferências energéticas, entre doador e receptor, mais baixas que todos os demais inibidores analisados. O rearranjo eletrônico está concentrando principalmente no centro da molécula.

Tabela 8 – Energia de segunda ordem NBO $E(2)/\text{kcal.mol}^{-1}$. Cálculos para molécula de imatinibe realizados com funcional B3LYP e função de base 6-311+G(d,p).

	Doador NBO		Receptor NBO		$E(2)$
1	BD*	C5-C23	BD*	C2-C24	383,57
2	BD*	C9-C10	BD*	C11-C12	375,70
3	BD*	C9-C10	BD*	C21-C22	349,17
4	BD	C36-H68	BD*	C34-H67	288,70
5	BD*	C26-N37	BD*	N27-C28	191,27
Amida	LP	O8	BD*	N6 -C7	32.28
Amida	BD	N6- H43	BD*	C7 -O 8	4.62
Amida	BD*	C7 - O8	BD*	C7 -O8	4.82

Na molécula de imatinibe, o valor máximo da energia de segunda ordem ficou no grupo tolueno (BD), no centro da molécula (Figura 65). Quando comparamos com a posição dos orbitais de fronteira, esta região tem contribuição do orbital LUMO+1. Todos os demais pontos de transferência de carga ficaram na região do LUMO e HOMO-1 não foi encontrado rearranjo eletrônico na região orbital HOMO. Por esta análise, não há contribuição do orbital HOMO do imatinibe, o que poderia ser relacionado a um pior desempenho inibitório frente a proteína mutada T315I. Outro fato notado é que a metil-piperazina não contribui com rearranjos eletrônicos importantes, do ponto de vista quantitativo.

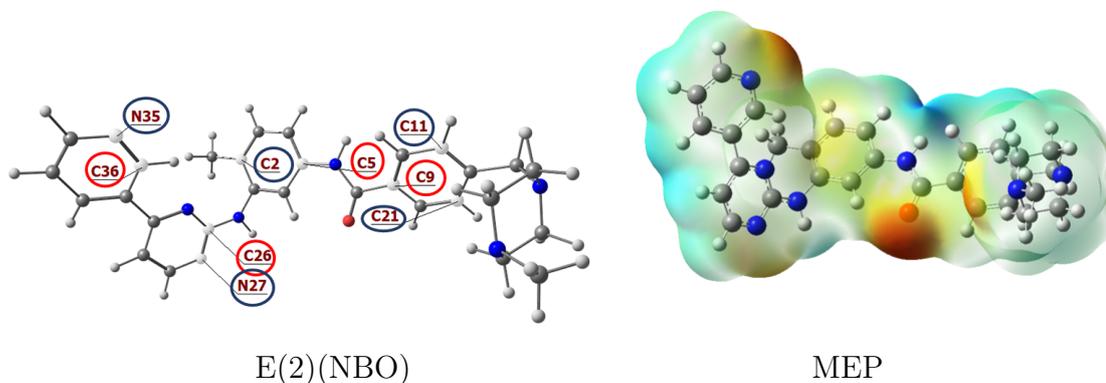


Figura 65 – Molécula de imatinibe. $E(2)(\text{NBO})$ Círculos azuis doadores e em vermelhos receptores. No MEP, em azul baixa densidade, e em vermelho alta eletrônica.

O grupo amida composto pelos átomos de carbono C7, nitrogênio N6, oxigênio O8, e hidrogênio H43 apresenta a maior transferência (E(2)). Esta transferência foi relativa ao par de elétrons solitários (LP) do oxigênio para orbital não ligante, da ligação entre o átomo de nitrogênio e o átomo de carbono deste mesmo grupo, com valor de $32,28 \text{ kcal.mol}^{-1}$. As outras duas transferências são de menor valor, ambas inferiores a 5 kcal.mol^{-1} . O ponto de alta densidade eletrônica do grupo amida pode ser visto no MEP (Figura 65).

O círculo vermelho, na Figura 66, mostra as cargas em ChelpG do imatinibe. Podemos observar a variação destas cargas com relação aos outros átomos da molécula, principalmente do carbono ligado ao anel aromático, e do hidrogênio ácido do nitrogênio do grupo amida, junto com o oxigênio deste mesmo grupo. Este carbono do anel, é o que sofre substituição por halogênios nos inibidores pós imatinibe. Devido a posição deste átomo de carbono, ele pode estabilizar ou desestabilizar as cargas do nitrogênio do grupo amida ligado a ele. O átomo de nitrogênio do imatinibe é menos negativo que os outros inibidores, com exceção do pontCl (Tabela 9), com carga $-0,59 \text{ u.a.}$, que influencia diretamente no hidrogênio ligado a ele, deixando-o menos positivo que os outros inibidores. Por outro lado, o oxigênio deste grupo tem pouca variação na carga frente aos outros inibidores, carga $0,66 \text{ u.a.}$, o que permitiu que o átomo de oxigênio ficasse mais negativo.

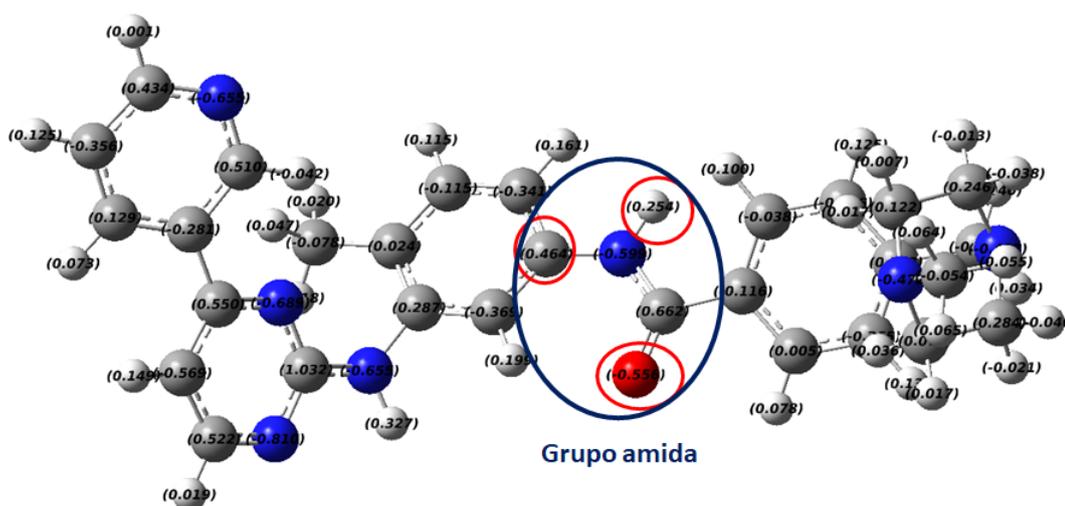


Tabela 9 – Carga ChelpG do grupo amida e do carbono do anel ligado a amida. A numeração segue a dos átomos do imatinibe (Figura 66).

Ligante	N	H	C	O
Imatinibe	-0,59	0,25	0,464	-0,55
Dasatinibe	-0,66	0,30	0,326	-0,54
Nilotinibe	-0,70	0,31	0,517	-0,54
NiloH	-0,67	0,294	0,515	-0,55
NiloCl	-0,63	0,295	0,450	-0,54
Ponatinibe	-0,64	0,28	0,447	-0,55
PontH	-0,66	0,299	0,499	-0,53
PontCl	-0,58	0,266	0,406	-0,55

3.9.2 Dasatinibe: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 10 mostra os resultados da análise NBO para o dasatinibe. A molécula de dasatinibe tem valores maiores de energias $E(2)$ que o imatinibe e estão distribuídos ao longo da estrutura. Assim como visto nos orbitais de fronteira, que também estão mais espalhados, esta molécula difere do padrão encontrado na molécula de imatinibe que concentra em grupos específicos. O MEP da molécula do dasatinibe (Figura 68) mostra a presença de três pólos com maior intensidade negativa, ao contrário do padrão visto no imatinibe.

Tabela 10 – Energia segunda ordem NBO $E(2)/\text{kcal.mol}^{-1}$, no nível B3LYP/6-311+G(d,p) para a molécula de dasatinibe.

	Doador NBO		Receptor NBO		$E(2)$
1	BD	C31 - H59	BD*	C30 - N32	745,17
2	BD	C19 - N29	BD*	C30 - N32	370,65
3	BD*	C19 - N29	BD*	C17 - C18	286,28
4	BD*	C4 - C5	BD*	C2-C3	256,93
5	BD	C31 - H59	BD*	C27-H54	198,54
Amida	LP	O11	BD*	N9-C10	26.92
Amida	LP	N9	BD*	C10-O11	45.11
Amida	BD	C10-O11	BD*	C12-C13	4.24

Desta forma, o dasatinibe apresenta centros/fragmentos que podem agir como nucleófilo e eletrófilo, mais atrativos que os vistos na molécula de imatinibe. O fato de ter mais zonas de alta densidade eletrônica e de baixa densidade eletrônica, permite que o dasatinibe se ligue a uma gama maior de resíduos polares e apolares, como pode ser visto no estudo de *docking*. Isto também está relacionado ao perfil da molécula que busca uma

orientação do sítio ativo que a direcione para regiões onde há mais presença de resíduos com polaridade, sem desprezar possíveis interações com resíduos apolares.

As principais transferências eletrônicas, mostradas no NBO E(2) estão sobre átomos de carbonos, C30, C31 e C19 e C17 do grupo metil-piridina que estão localizados mais ao centro da molécula. Comparando as maiores energias E(2) com o MEP, estes átomos fazem parte de uma área neutra da molécula. Quando comparamos os orbitais de fronteira com as interações, encontramos o orbital LUMO+1, onde os resíduos que fazem interação são leucina e a valina, ambos resíduos apolares.

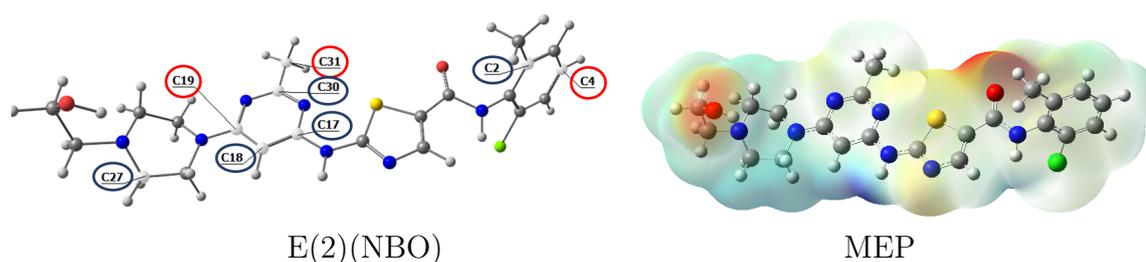


Figura 67 – Molécula de dasatinibe. E(2)(NBO) com círculos azuis doadores e em vermelhos receptores. No MEP, região azul indica baixa densidade eletrônica e região vermelha alta eletrônica.

O carbono vizinho do grupo amida está ligado ao anel substituído, neste caso, pela presença do átomo de cloro como substituinte, o qual diminui a densidade eletrônica deste carbono, deixando-o menos positivo (carga atômica 0,33 u.a.). Podem ser observados dois rearranjo eletrônicos significativos relacionados ao átomo de oxigênio do grupo amida. O primeiro é comum ao imatinibe, o qual desloca o par de elétrons (LP) do oxigênio para o orbital não ligante da ligação entre nitrogênio e carbono, com valor energético de $26,92 \text{ kcal.mol}^{-1}$, menor que o observado no imatinibe. A segunda doação com valor maior que a primeira, $45,11 \text{ kcal.mol}^{-1}$ mas no sentido inverso da primeira, o par de elétrons do átomo de nitrogênio desloca-se para orbital não ligante da ligação do átomo de carbono e oxigênio. Assim, o átomo de nitrogênio deste grupo é mais negativo (-0,66 u.a.) que seu antecessor, imatinibe, deixando seu hidrogênio mais positivo (0,30 u.a.).

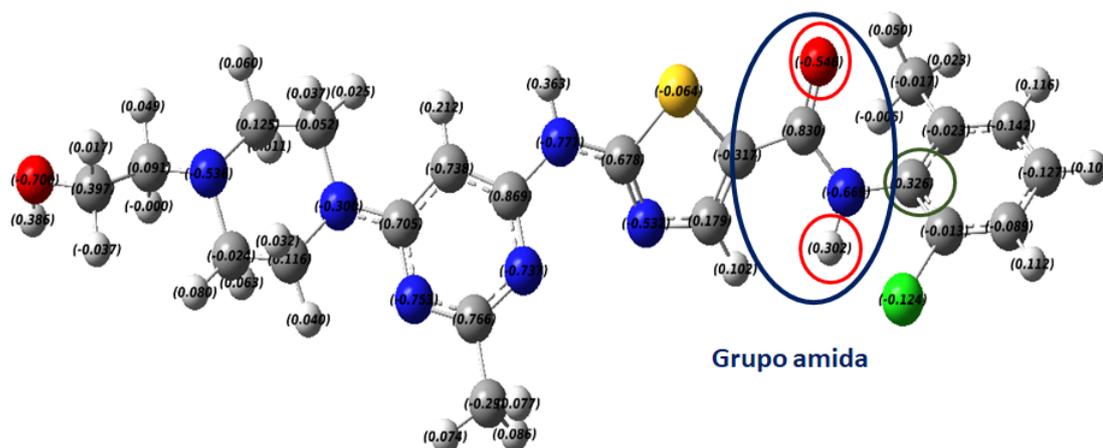


Figura 68 – Cargas em ChelpG da molécula de dasatinibe.

3.9.3 Nilotinibe: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 11 mostra os resultados da análise NBO do nilotinibe. Os valores de energias $E(2)$ são próximos da molécula imatinibe, $385,96 \text{ kcal.mol}^{-1}$, para nilotinibe, sendo superior em aproximadamente $2,40 \text{ kcal.mol}^{-1}$, com maior ponto de deslocalização no anel do trifluormetil. Quando sobrepomos os orbitais de fronteira, a região do HOMO não possui contribuição provenientes de rearranjos importantes da energia $E(2)$. Por outro lado, a região do orbital LUMO está contida em uma região de rearranjo, com valor de energia de $316,05 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Tabela 11 – Energia segunda ordem NBO $E(2)/\text{kcal.mol}^{-1}$, no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de nilotinibe.

	Doador NBO		Receptor NBO		$E(2)$
1	BD*	C7-C31	BD*	C5-C6	385,96
2	BD*	C18-N29	BD*	N19-C20	381,04
3	BD*	C11-C30	BD*	C14-C16	364,6
4	BD*	N27-C28	BD*	C25-C26	316,05
5	BD*	C11-C30	BD*	C12-C13	246,13
Amida	LP	O10	BD*	N8-C9	33,38
Amida	LP	N8	BD*	C9-O10	66,84
Amida	BD	C9-C11	BD*	C7-N8	4,67

A Figura 69 mostra o MEP do nilotinibe. O MEP mostra a região do hidrogênio (ácido) com intensidade de cor azul mais forte, enquanto na região do oxigênio uma tonalidade vermelho, sugerindo acúmulo de densidade eletrônica. O grupo substituinte trifluormetil, ligado ao anel benzênico do nilotinibe, tira densidade eletrônica do anel com mais intensidade do que visto na molécula de dasatinibe, deixando o átomo de carbono

ligado ao grupo amida mais positivo, com carga atômica de 0,51 u.a. Por sua vez, o átomo de nitrogênio do grupo amida doa densidade eletrônica para o carbono deste mesmo grupo. O resultado, no ajuste destas cargas, deixa o hidrogênio do grupo amida mais ácido, com carga atômica de 0,31 u.a., como pode ser visto circulado em vermelho Figura 70.

Um ponto importante sobre a molécula de nilotinibe é que possui 7 diferentes nitrogênios ao longo da molécula. Estes átomos são atratores de elétrons, os quais fluem livremente por anéis aromáticos. Por estarem espalhados, criam uma uniformidade eletrônica, como visto no MEP do dasatinibe. Entretanto, o trifluormetilbenzeno quebra esta uniformidade, criando uma zona de alta densidade com o imidazol e outra de baixa densidade, no carbamida (Figura 69). Isto permitiu que o nilotinibe tenha características semelhantes ao imatinibe e dasatinibe, surgindo como híbrido de ambos. Este fato reflete no estudo de *docking*, no qual o nilotinibe faz interações com resíduos polares e apolares.

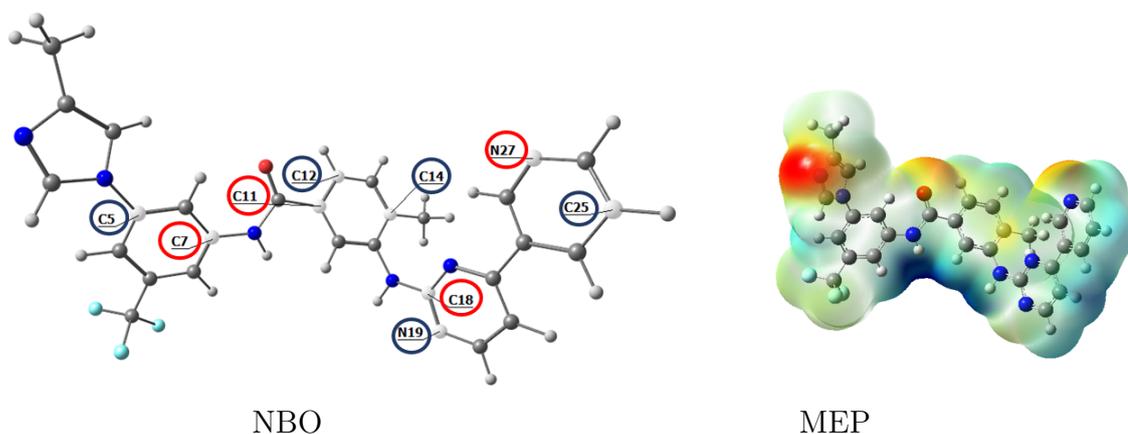


Figura 69 – Molécula de nilotinibe. E(2)(NBO), os átomos em destaque mostram as 5 maiores transferências de carga. No (MEP) a região em azul indica baixa densidade, enquanto a região vermelha indica alta densidade eletrônica

A importância do grupo amida já foi descrito anteriormente, por fazer interações importantes, como do tipo ligação de hidrogênio com resíduo Glu316. Este grupo faz dois rearranjos energéticos, apontados pela energia de segunda ordem, com valores maiores do que os vistos nas molécula de imatinibe e dasatinibe. Na primeira, o par de elétrons do átomo de oxigênio desloca-se para o orbital não ligante da ligação entre o nitrogênio e o carbono (também visto nas duas molécula anteriores), com o valor de 33,38 kcal.mol⁻¹, e a outra doação com valor energético de 66,84 kcal.mol⁻¹, superior à primeira e acontecendo no sentido reverso, como no caso do dasatinibe. O resultado destes rearranjos é que o átomo de nitrogênio do grupo amida tem uma carga mais negativa (-0,69 u.a) o átomo de oxigênio, com carga de -0,54 u.a. Enquanto que o hidrogênio do NH tem uma carga positiva, praticamente sem mudanças com relação ao dasatinibe. Com o MEP é possível observar esta região de hidrogênio mais ácido.

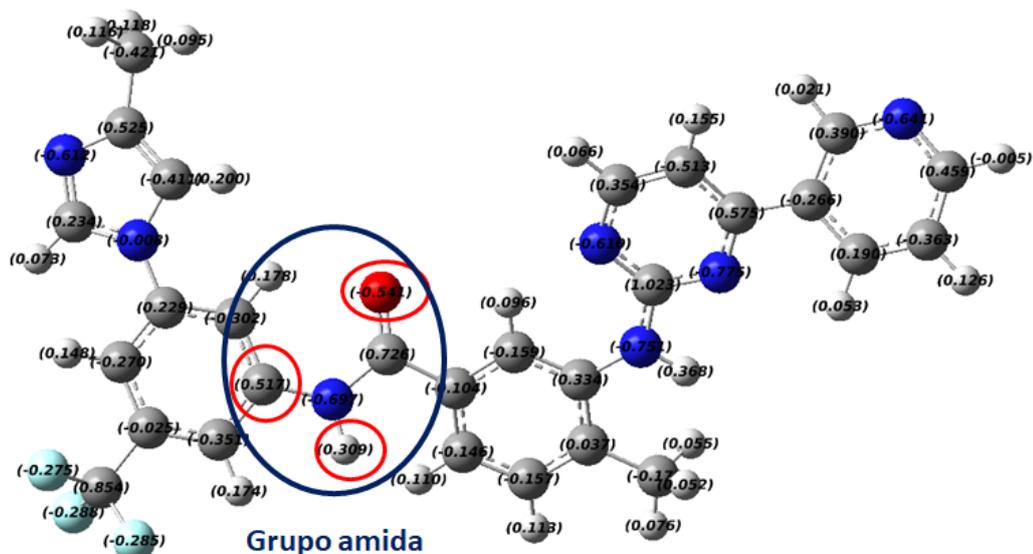


Figura 70 – Cargas ChelpG da molécula de nilotinibe, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.

3.9.3.1 NiloH: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 12 mostra os resultados da análise NBO do niloH. As contribuições estão dispersas ao longo da cadeia da molécula. O niloH possui maiores energias de estabilização que o nilotinibe, mas não mostra contribuição significativa do par solitário do oxigênio do grupo amida.

Tabela 12 – Energia segunda ordem NBO $E(2)/\text{kcal.mol}^{-1}$, no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de niloH.

	Doador NBO		Receptor NBO		E(2)
1	BD*	C 7 - C 31	BD*	C 5 - C 6	454,2
2	BD*	C 11 - C 30	BD*	C 14 - C 16	439,26
3	BD*	C 18 - N 29	BD*	N 19 - C 20	397,77
4	BD*	N 27 - C 28	BD*	C 25 - C 26	323,51
5	BD	C 38 - H 61	BD*	C 37 - H 60	305,65

A presença do metil no lugar do trifluormetil deixa o anel benzênico com a densidade eletrônica maior, portanto, pode permitir transferência de carga entre os átomos, devido à ausência do grupo retirador de elétrons, deixando a transferência mais fluida e como menos distorção, refletindo diretamente na carga do hidrogênio ligado ao nitrogênio (Figura 72), inferior ao nilotinibe. O oxigênio da carbonila ficou com carga mais negativa -0,54 u.a. Fato reforçado no MEP, apresentando hidrogênio com densidade eletrônica maior e no oxigênio, também uma maior densidade eletrônica, se aproximando eletrostaticamente da molécula de imatinibe.

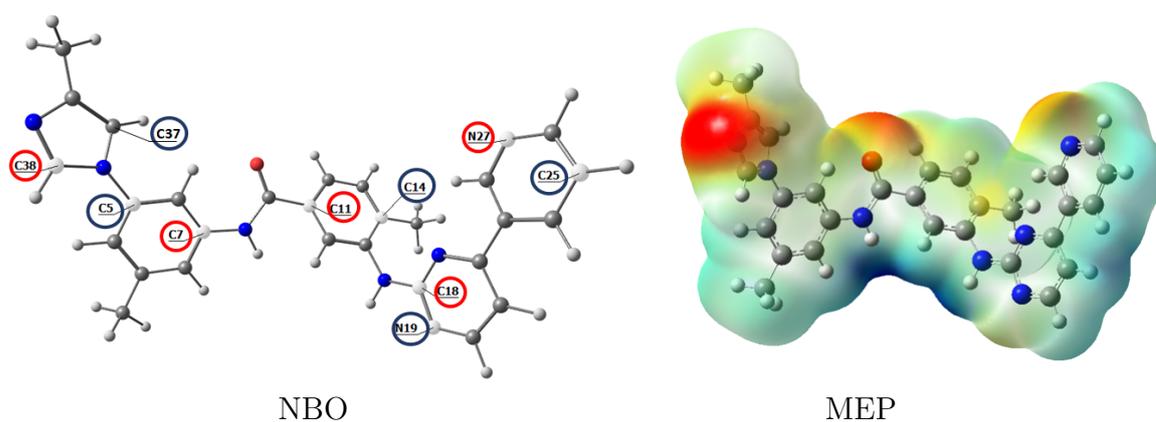


Figura 71 – Molécula de niloH. $E(2)(NBO)$, os átomos em destaque mostra 5 maiores transferências cargas. No MEP a região em azul indica baixa densidade eletrônica e a região em vermelho indica alta eletrônica.

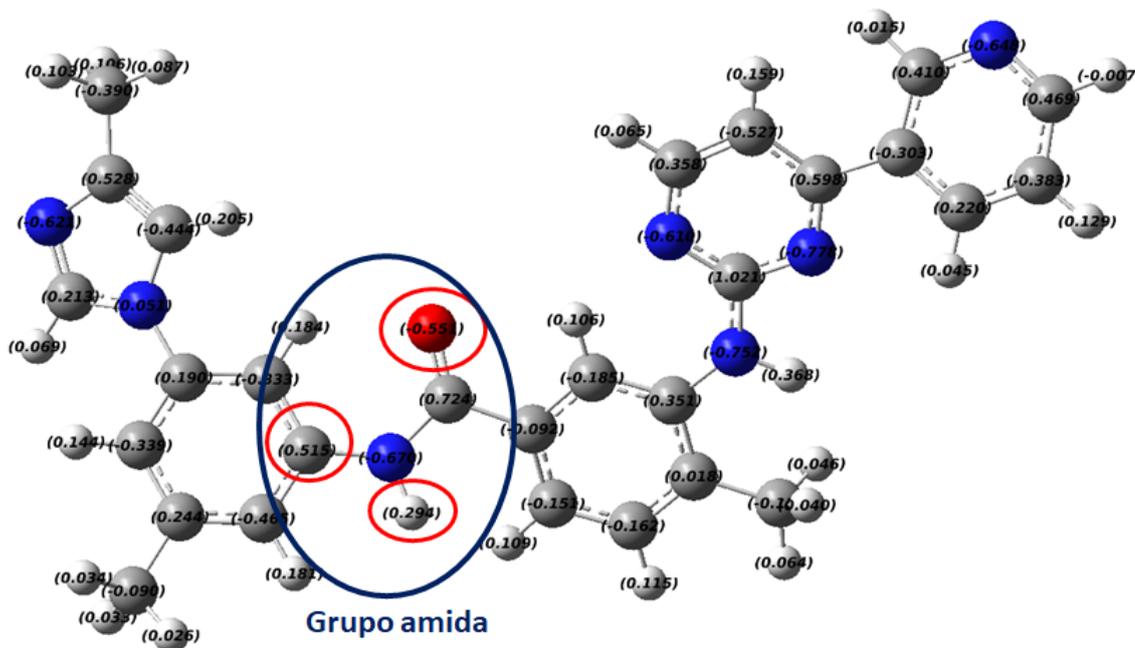


Figura 72 – Cargas em ChelpG da molécula de niloH. Átomos do grupo amida circulado em vermelho.

A ausência do átomo de flúor, na estrutura da molécula de niloH, reforça ainda mais a natureza desta molécula, estruturalmente e eletronicamente. Apresenta semelhança com o MEP do nilotinibe. A diferença com relação ao imatinibe está associada a troca da metil-piperidina por metil-imidazol, que continua apresentando um MEP mais disperso entre regiões mais e menos eletronegativas. Portanto, o imidazol tem influência na molécula, confirmando no valor de *score*, melhor que imatinibe (-10,6 para -9,0 kcal.mol⁻¹). Neste caso, o *docking* é possível observar que o fragmento metil-imidazol é um fragmento importante para interações (Asp381 e Val289 Lys285) e para a distribuição eletrônica na molécula.

3.9.3.2 NiloCl: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 13 mostra os resultados da análise NBO do niloCl. Essa Tabela mostra que as energias mais estáveis da molécula de nilotinibe (trifluormetil) são 394,73 kcal.mol⁻¹, para -CCl₃, contra 385,96 kcal.mol⁻¹ do -CF₃ e 454,20 kcal.mol⁻¹ do -CH₃. A presença dos cloros ou hidrogênios não altera os átomos doadores e receptores, somente os valores, principalmente nos valores mais altos e próximos ao local de substituição.

Tabela 13 – Energia segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol⁻¹, no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de niloCl.

	Doador NBO		Receptor NBO		E(2)
1	BD*	C 7 - C 31	BD*	C 5 - C 6	394,73
2	BD*	C 18 - N 29	BD*	N 19 - C 20	385,32
3	BD*	C 11 - C 30	BD*	C 14 - C 16	373,52
4	BD	C 38 - H 61	BD*	C 33 - Cl 36	359,47
5	BD*	N 27 - C 28	BD*	C 25 - C 26	316,27

O desempenho eletrônico apresentado pelos átomos de triclorometil não difere dos metil nesta posição, ou mesmo do trifluormetil. O MEP (Figura 73) mostra uma característica singular do hidrogênio ácido do grupo amida, com a intensidade do azul diminuindo no niloH, em relação às duas outras moléculas. Ao mesmo tempo, a densidade eletrônica no oxigênio da amida fica mais negativa no niloH. Como mostra a Figura da cargas (74), o hidrogênio ácido vai para 0,29 a.u no niloH e niloCl contra 0,31 (CF₃) a.u. no nilotinibe, tornando este hidrogênio menos ácido e menos propenso a interação com a proteína. O oxigênio segue os mesmos valores entre -0,54 a.u e -0,55 a.u. para o nilotinibe, niloH e niloCl. Portanto, a presença de grupo substituintes (CCl₃) não trouxe uma melhora nas propriedades do niloH e niloCl.

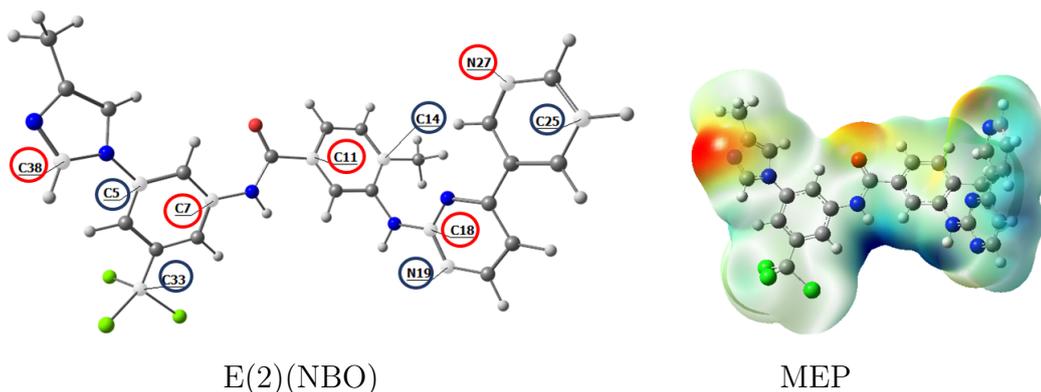


Figura 73 – E(2)(NBO), os átomos em destaque mostra as 5 maiores transferências cargas. (MEP), em Azul baixa densidade, em vermelho alta eletrônica, para molécula de niloCl.

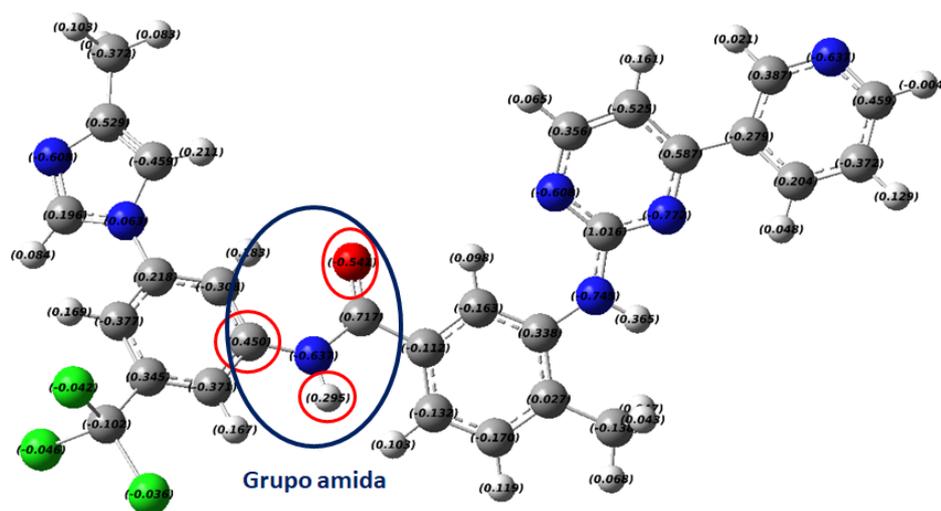


Figura 74 – Cargas em ChelpG da molécula de niloCl, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.

3.9.4 Ponatinibe: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 14 mostra a energia de segunda ordem E(2) da molécula de ponatinibe, sendo superior em 6 vezes o valor encontrado nas moléculas analisadas até momento, o que condiz com o score encontrado no docking. Distancia-se do padrão seguindo por imatinibe e nilotinibe, que apresentaram maior transferência de energia entre carbonos do metilbenzeno no imatinibe e niloH ($-CH_3$), e triclorometil e trifluorometil no niloCl e nilotinibe, respectivamente. Esta região corresponde aos orbitais LUMO e HOMO-1. O orbital HOMO não teve contribuição correspondente as energias de segunda ordem dentro das principais contribuições. A maior energia E(2), dentro da região do HOMO, foi de $81,00 \text{ kcal.mol}^{-1}$, ainda sim superior ao HOMO do nilotinibe e imatinibe, em que sua maior energias de segunda ordem foram inferiores a $40,00 \text{ kcal.mol}^{-1}$.

Uma mudança observada na estrutura do ponatinibe frente aos inibidores ante-

Tabela 14 – Energia segunda ordem, NBO E(2) em kcal.mol⁻¹, no nível B3LYP/6-311+G(d,p) para molécula de ponatinibe.

	Doador NBO		Receptor NBO		E(2)
1	BD	C 37 - H 66	BD*	C 37 - N 38	3.246,43
2	CR	C 37	BD*	C 37 - H 66	712,53
3	BD*	N 33 - C 34	BD*	C 35 - C 36	589,48
4	BD	C 37 - H 66	BD*	C 36 - C 37	463,46
5	BD*	C 35 - C 36	BD*	C 31 - C 32	460,44
Amida	LP	O 7	BD*	C 6 - N 8	32.77
Amida	LP	N 8	BD*	C 6 - O 7	69.14
Amida	BD	C 6 - O 7	BD*	C 4 - C 5	3.65

cessores, é com relação aos átomos de nitrogênio. A molécula de ponatinibe possui 6 átomos de nitrogênio, um a menos que o dasatinibe, o imatinibe e o nilotinibe. Nestes dois últimos inibidores, os átomos de nitrogênio estão ao longo de toda a molécula. O dasatinibe por outro lado, concentrou a maior parte deste átomo na região central de sua molécula. A molécula de ponatinibe, concentrou os átomos de nitrogênio nas extremidades, formando dois grupos, com 3 e 2 átomos de nitrogênio. Dois destes átomos estão no grupo de metil-piperazina, e outros 3 átomos estão grupo no imidazol-piridina, Um desses átomos está no grupo amida, no centro da molécula.

Outros átomos com característica de atrair elétrons são: um átomo de oxigênio e grupo CF₃. O MEP é mais suavizado (Figura 75), não demonstrando alta concentração de densidade eletrônica, podendo intuir que a densidade eletrônica é distribuída quase uniformemente, pelos átomos de carbonos SP₂. O MEP assemelha-se ao visto na molécula de imatinibe e diferencia do MEP do nilotinibe e, principalmente, do dasatinibe.

O rearranjo das cargas intramolecular estão presentes no grupo imidazol-piridina, como pode ser visto na Figura 75. Com valor de 3.246,43 kcal.mol⁻¹, este fragmento é responsável por um número grande de interações com a proteína na forma mutada. O que justifica aumentar o comprimento da molécula de ponatinibe com combinações de carbonos de ligações simples e triplas, levando este importante fragmento até os resíduos alvos, por sua capacidade de doar e receber cargas.

O grupo amida segue a tendência do dasatinibe e do nilotinibe, devido a presença do grupo substituinte trifluormetil. Nesta molécula, o hidrogênio ácido tem carga 0,28 a.u. Este valor é menor do que do nilotinibe (CF₃). O oxigênio se mantém na mesma faixa de -0.55 u.a para ponatinibe e -0.54 u.a para nilotinibe. O MEP mostra os ponto de alta densidade sobre o oxigênio e baixa densidade sobre o hidrogênio, mostrando que a acidez deste hidrogênio não é delimitador do *score*.

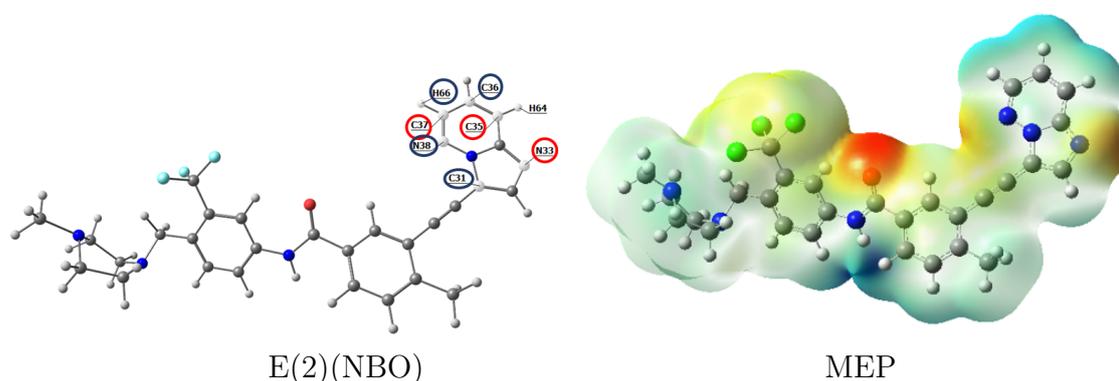


Figura 75 – Molécula de ponatinibe. E(2)(NBO), os átomos em destaque mostram as 5 maiores transferências de cargas. No MEP, a região em azul indica baixa densidade eletrônica e em vermelho indica alta densidade eletrônica.

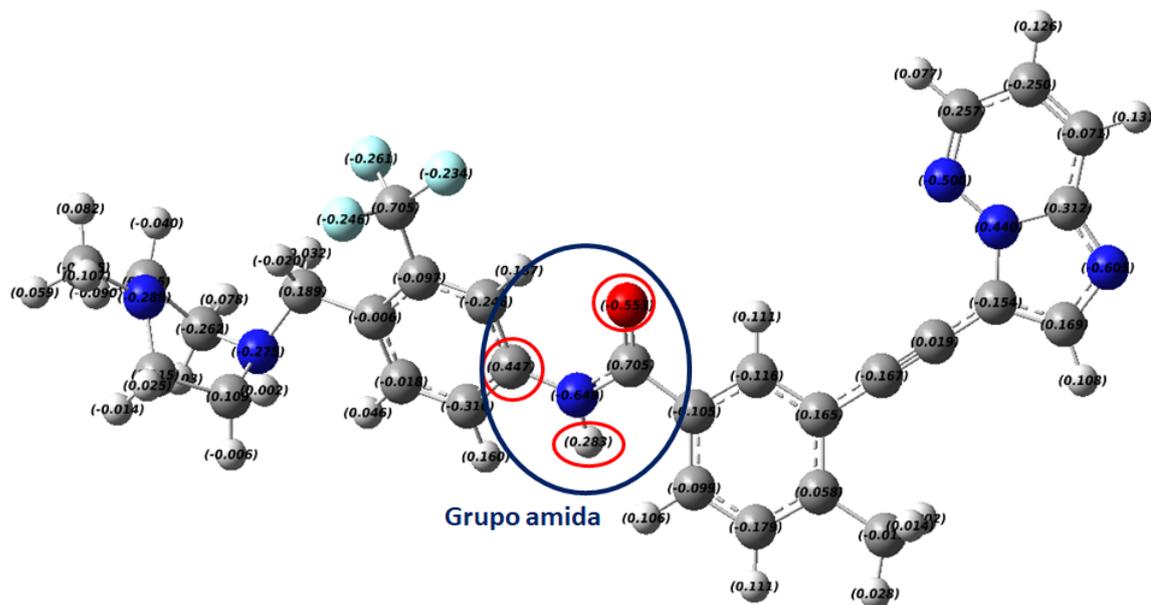


Figura 76 – Cargas em ChelpG da molécula de ponatinibe, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.

3.9.4.1 PontH: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 15 mostra os resultados da análise NBO do pontH. A substituição do grupo CF_3 na molécula de ponatinibe por do CH_3 , que gerou a molécula pontH, apresenta reflexos na energia de estabilização E(2), que é quase 50% menor do que na molécula de ponatinibe (Tabela 15). Quando comparamos com o niloH, seu análogo quanto a substituição, o comportamento é contrário. O niloH aumenta a estabilidade do composto com substituição pelo grupo $-\text{CH}_3$. Este fato, pode ser devido aos principais rearranjos na molécula de nilotinibe, que estão no centro molecular, próximo a substituição. Enquanto que, na molécula do ponatinibe, seus principais rearranjos são na extremidade molecular, longe da substituição.

Tabela 15 – Energia de segunda ordem NBO E(2)/kcal.mol⁻¹, no nível B3LYP/6-311+G(d,p) para a molécula de pontH.

	Doador NBO			Receptor NBO E(2)	
1	BD	C 36 - H 65	BD*	C 30 - C 31	1.632,99
2	BD	C 36 - H 65	BD*	C 34 - C 35	706,17
3	LP	N 38	BD*	N 32 - C 33	449,98
4	BD	C 12-C21	BD*	N 32 - C 33	441,69
5	BD*	C30 - C31	BD*	C 34-C35	404,3

A ausência do halogênio, assim como visto no nilotinibe, tem interferência direta no grupo amida, deixando o hidrogênio ligado ao hidrogênio levemente mais ácido (Figura 78) e o oxigênio do carbonila menos eletronegativo. Como esta mudança nas cargas é pouco significativa, o MEP não apresenta também uma diferença entre o ponatinibe e o pontH (Figura 77) Embora este oxigênio seja o ponto de maior densidade apontado pelo MEP, sugere também uma distribuição mais uniforme. A substituição promovida deixa a molécula, nesta região, mais neutra, como pode ser vista no MEP, podendo desfavorecer esta parte da molécula na interação com a proteína, justificando seu valor menor nas transferências de energias.

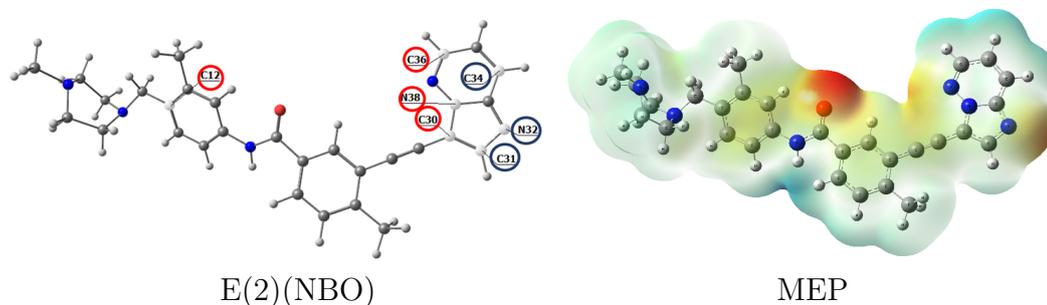


Figura 77 – Molécula de pontH. NBO E(2), os átomos em destaque mostram as 5 maiores transferências de carga. No MEP, a região em azul indica baixa densidade eletrônica e em vermelho indica alta densidade eletrônica.

3.9.4.2 PontCl: NBO, MEP e cargas atômicas

A Tabela 15 mostra os resultados da análise NBO do pontCl. A molécula de pontCl é fruto da substituição -CF₃ por -CCl₃. Como é observado, as modificações propostas interferem na energia de estabilização. Neste caso, a energia E(2), que é associado também a estabilidade molecular do composto, é superior ao ponatinibe(CF₃). É contrário a tendência apontada do niloCl, o qual se comporta próximo ao nilotinibe CF₃. Os cloros são fontes de elétrons que podem ser rearranjados. No entorno dos cloros, estão 4 das maiores energias E(2). O cloro é o halogênio de carga nuclear efetiva alta e, ainda assim, menor que

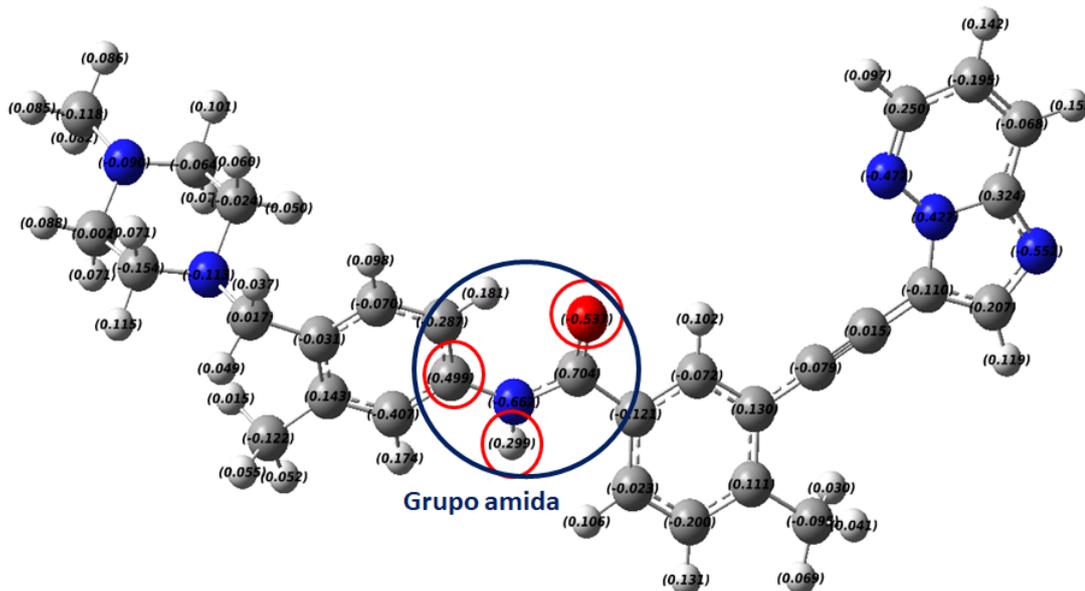


Figura 78 – Cargas em ChelpG da molécula de pontH, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.

flúor que tem raio atômico menor, a assim, nuvem eletrônica está menos presa. Portanto, são mais polarizáveis que os grupos do triclorometil e são grupos ricos em elétrons.

Tabela 16 – Energia segunda ordem NBO $E(2)/\text{kcal.mol}^{-1}$, no nível B3LYP 6-311+G(d,p) para molécula de pontCl.

		Doador NBO		Receptor NBO	$E(2)$
1	LP	Cl 66	BD*	C 30 - C 31	5.803,76
2	LP	Cl 66	BD*	C 35 - C 36	3482,15
3	CR	Cl 66	BD*	C 30 - C 31	2469,18
4	BD	C 22 -Cl 66	BD*	C 30 - C 31	2047,18
5	CR	Cl 66	BD*	C 35 - C 36	1762,53

A presença do halogênio força uma maior distribuição eletrônica, como não foi visto no pontH. O grupo CH_3 é um grupo doador de densidade eletrônica, o efeito esperado é que torne a molécula menos polarizável. Como o grupo CCl_3 é um grupo retirador de densidade eletrônica, torna a molécula mais polarizável, como pode ser visto na MEP em relação pontH. Nesta posição, quase central da molécula de ponatinibe, o CCl_3/CF_3 atrai a nuvem eletrônica, cobrindo esta parte da molécula, tornando toda a molécula mais polarizada. Neste contexto, os halogênio presente na molécula de ponatinibe estão em posição estratégica eletronicamente. O ganho que não foi percebido no nilotinibe e suas modificações, pode ser visto no ponatinibe, também devido a também a presença de grupos metil-piperazina de lado e imidazol-piridina.

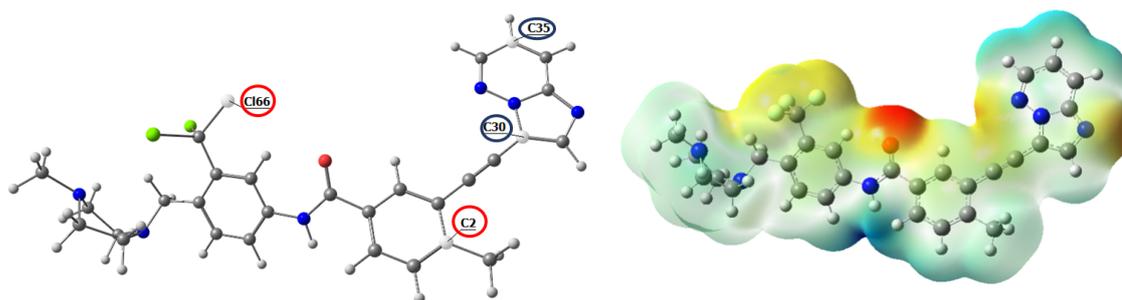


Figura 79 – Molécula de pontCl. NBO E(2), os átomos em destaque mostram 5 maiores transferências de carga. No MEP, a região em azul indica baixa densidade eletrônica e em vermelho indica alta densidade eletrônica

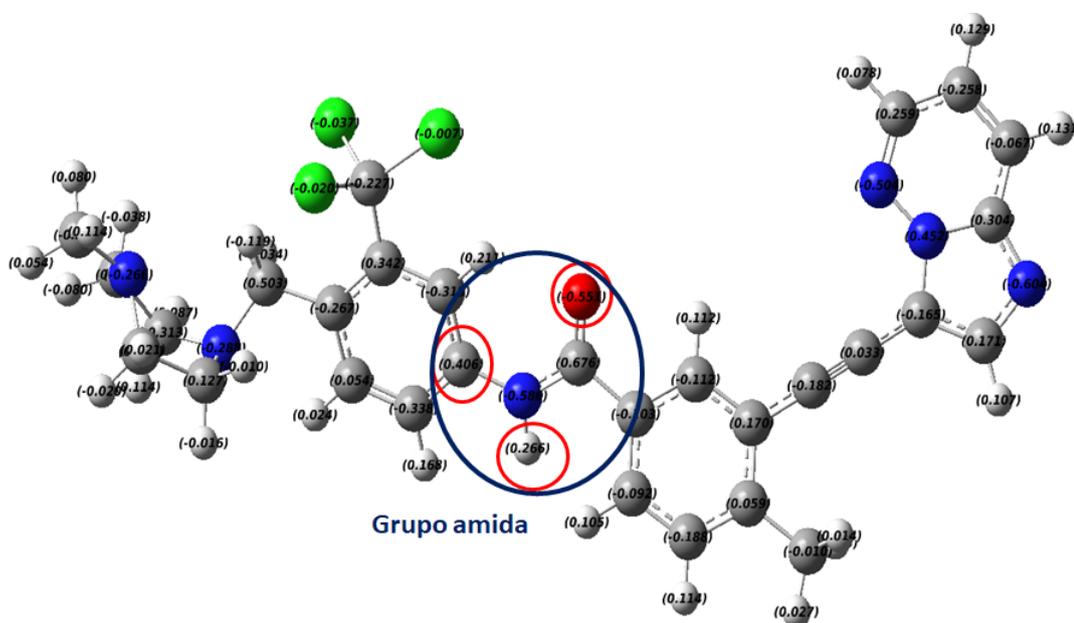


Figura 80 – Cargas ChelpG da molécula de pontCl, circulado em vermelho, átomos do grupo amida.

3.9.5 Cargas atômicas (ChelpG)

As cargas foram extraídas usando o método DFT com funcional B3LYP com a base 6311+G(d,p), método ChelpG. A Tabela com todas as cargas atômicas dos inibidores estão no anexo 1. Afim de comparar as cargas atômicas entre os inibidores, fizemos mapa de calor (*HeatMap*), usando programa python 3.85 com biblioteca seaborn, esta biblioteca padroniza todas amostras e as correlaciona.

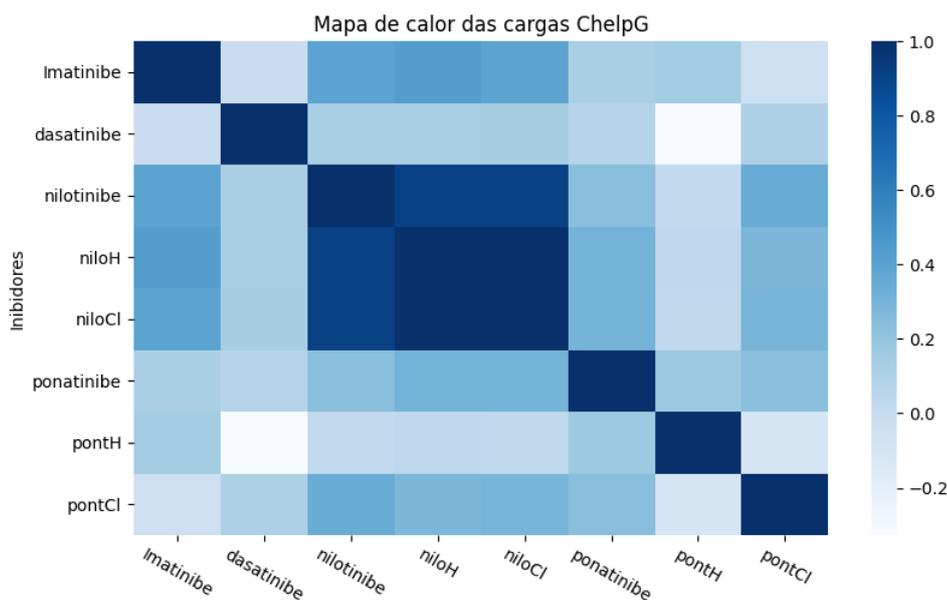


Figura 81 – Correlação entre as cargas ChelpG das moléculas substituídas e não substituídas.

O mapa de calor é um processo que permite, de modo numérico e visual, determinar correlação entre dois ou mais objetos de estudo. Neste sentido, o *HeatMap* pode apontar correlação das cargas atômicas entre os inibidores clássicos mas, principalmente, entre as moléculas substituídas. A Figura 81 mostra uma baixa correlação entre as cargas atômica da molécula imatinibe e dasatinibe. Observando a figura do mapa de calor na primeira linha ou primeira coluna, o imatinibe está com uma coloração azul forte e a molécula de dasatinibe está com uma coloração azul fraca. Quanto maior for a desigualdade em tons de azuis, menor será a correlação entre ambas. Deste modo, as moléculas que mais se aproximam do imatinibe são os inibidores da classe do nilotinibe, principalmente o niloH.

As modificações na estrutura da molécula de nilotinibe não tiveram grandes influências na distribuição das cargas, como pode ser visto pelas tonalidades no centro com azul mais intenso. A presença do cloro (pontCl) faz com que a correlação seja ainda mais distinta entre a molécula com presença do grupo metil (pontH). A presença de halogênios na estrutura do ponatinibe é mais significativa e complexa, pois influencia completamente o comportamento das cargas atômicas influencia as interações feitas pela molécula.

3.10 Descritores dos inibidores clássicos

A Tabela 17, traz descritores dos inibidores clássicos, afim complementar as análises quimiométricas. Os significados das siglas da tabela são: PSA (polar surface area) IC₅₀ (concentração do inibidor que reduz a metade a atividade enzimática); LogP (coeficiente de partição); acc-acceptor; don-doador; n⁰ AR (número de anéis aromáticos). Este descritores forma tirados do banco de dados DrugBank².

Tabela 17 – Descritores das moléculas do inibidores clássicos, fonte: Drugbank([WISHART et al., 2017](#))

Descritores	Imatinibe	Dasatinibe	nilotinibe	ponatinibe
Vol Å ³	461,44	419,10	446,63	464,60
TAMANHO(Å)	23,60	22,30	18,69	20,58
PSA	86,28	134,70	97,11	65,77
IC ₅₀ (nM)(T315I)	10,80	0,30	6,93	8,6
LogP	4,38	3,82	5,11	3,84
n ⁰ H-acc	7	8	7	8
n ⁰ H-don	2	3	2	1
n ⁰ AR	4	3	5	4
MM	493,62	488,02	529,50	532,60

Tabela 18 – Tabela dos valores de descritores gerais: 1-imatinibe, 2-dasatinibe, 3-nilotinibe, 4-niloH, 5-niloCl, 6-ponatinibe, 7-pontCl, 8-pontH.

Descritores/unid	1	2	3	4	5	6	7	8
Charge-(u.a)	-0,79	-0,78	-0,78	-0,77	-0,75	-0,66	-0,64	-0,66
Charge+ (u.a)	0,37	0,34	0,31	0,37	0,37	0,29	0,27	0,29
Dipolo(Db)	6,734	9,23	8,94	8,42	8,80	5,58	12,20	13,53
GAP (eV)	3,14	4,30	3,97	3,76	3,93	3,78	3,56	3,58
HOMO (eV)	-5,08	-6,17	-6,27	-5,98	-6,22	-5,98	-5,77	-5,66
HOMO-1 (eV)	-6,01	-6,39	-6,27	-6,45	-6,78	-6,42	-6,37	-6,00
LUMO (eV)	-1,94	-1,862	-2,30	-2,22	-2,29	-2,20	-2,20	-2,09
LUMO+1 (eV)	-1,58	-0,84	-1,87	-1,60	-1,92	-1,83	-1,83	-1,20
Score (kcal.mol ⁻¹)	-9,00	-8,20	-10,70	-10,60	-10,30	-13,60	-13,80	-12,90

A Tabela 19 mostra a matrix da PCA com os descritores da Tabela 18 e 17. São as coordenadas do eixo X e Y usadas para construir a Figura 82.

A PCA foi calculada com duas componentes principais que explicou 74% da variância dos dados. Dentro da componente 1, os descritores que possuem maiores pesos

² O banco de dados DrugBank é um banco de dados on-line abrangente e de livre acesso, que contém informações sobre fármacos e alvos de fármacos([WISHART, 2006](#))

Tabela 19 – Matriz de resultados PCA em duas coordenadas, dos descritores gerais dos inibidores.

Molécula	PC1	PC2
imatinibe	-4.047.473	0.925834
dasatinibe	0.191880	-2.668.170
nilotinibe	-0.388033	-1.766.934
niloCl	-1.080.723	-1.862.792
niloH	-0.158472	-2.340.950
ponatinibe	-2.852.010	4.398.272
pontCl	4.067.255	2.059.183
pontH	4.267.578	1.255.556

são os orbitais HOMO e LUMO. Juntos eles correspondem a 54% e do peso, e a carga positiva corresponde a 21% do peso. A componente 2 dos descritores com maior peso são: o volume, com 30% e do peso, carga negativa, com 27% do peso.

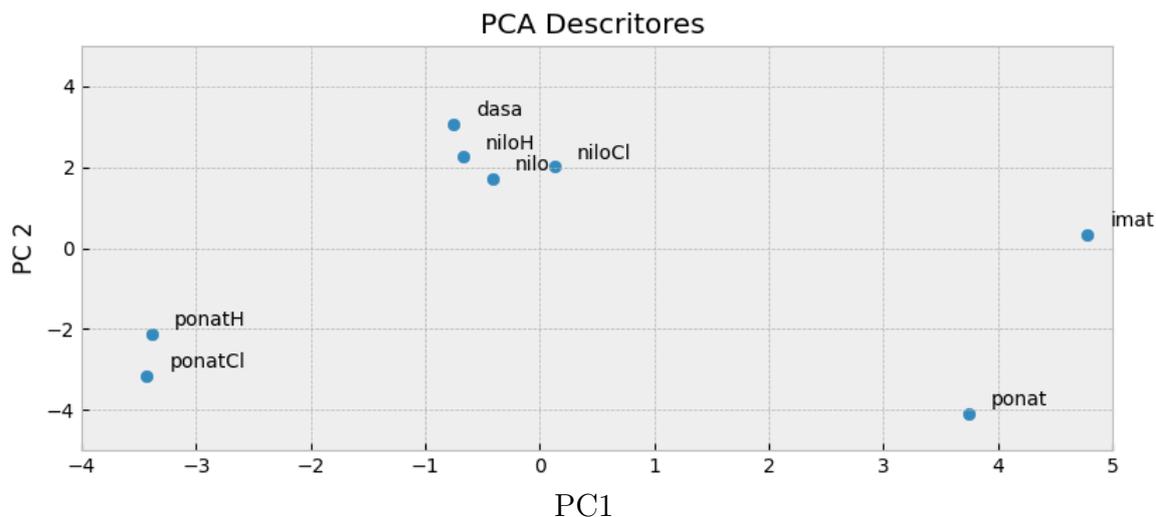


Figura 82 – Análise componente principal dos descritores eletrônicos das moléculas dos inibidores modificados e sem modificações.

A PCA dos descritores, Figura 82, mostra dois grupos, o primeiro da molécula de nilotinibe e seus derivados junto com dasatinibe, mostrando que a molécula de nilotinibe tem suas propriedades mais próxima ao dasatinibe que imatinibe. As substituições modifica mais o comportamento do ponatinibe que nilotinibe. As molécula pontH e pontCl são bem diferente da molécula do ponatinibe, como pode ser visto pela distância entre si na figura da PCA. Outro ponto é que mesmo não possuindo halogênios em sua estrutura, a molécula de imatinibe é mais próxima do ponatinibe, que todas as outras moléculas analisadas.

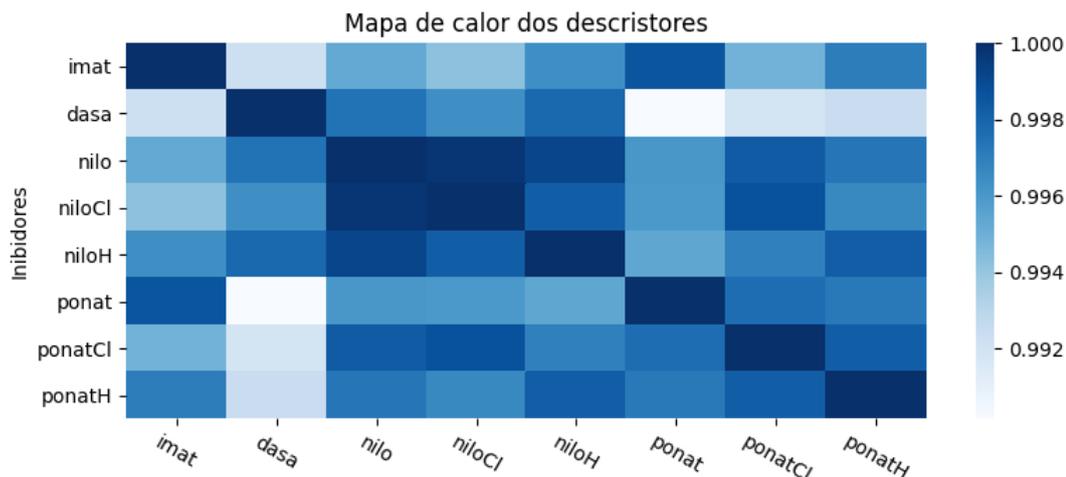


Figura 83 – Mapa de calor, usando os valores do descritores, das moléculas modificadas e sem modificações.

O *HeatMap*, Figura 83, é um processo que permite complementar as informações vinda da PCA. Por exemplo, o imatinibe, coluna 1 e linha 1 cor azul forte, todos inibidores seguindo a linha ou a coluna, que apresentarem coloração próxima a este tom de azul, possuem similaridade com a molécula de imatinibe. Portanto, o ponatinibe tem mais similaridade com imatinibe que os demais. Por outro lado, o ponatinibe tem menor similaridade com o dasatinibe. O grupo formado no Gráfico 82, por nilotinibe, niloH, niloCl e dasatinibe, possui similaridade, com o pode ser visto pela proximidades do tons de azuis no mapa de calor.

3.11 Considerações Gerais do Capítulo

O MEP aponta semelhança entre as moléculas de modo geral, as maiores densidades (em vermelho) aproximam o dasatinibe ao nilotinibe, sugerindo uma maior polaridade destas moléculas, e aproximam o imatinibe com o ponatinibe, sugerindo uma menor polaridade. As moléculas modificadas com cloros (niloCl e pontCl), tiram densidade do anel benzênico, ao contrário das substituições CH_3 (niloH e pontH). O anel benzênico teve mais densidade eletrônica mas, no geral, a influência das modificações foram pontuais, sentidas apenas pelos átomos próximos, não mudando a tendência da molécula.

As Energias $E(2)$ da molécula de ponatinibe são as de maior energia, seguidas por dasatinibe, nilotinibe e, por último, imatinibe. Este último, o único sem a presença de halogênio na sua estrutura. O pontH também não possui halogênios e tem energia superior ao imatinibe. No caso do ponatinibe, não é só a presença de halogênios que muda a energia de segunda ordem. Este fato se deve aos rearranjos eletrônicos darem longe do local da substituição. As cargas atômicas reforçaram a influência dos halogênios, principalmente no ponatinibe e seus derivados. Por fim a análise geral das características moleculares destes inibidores confirmou as semelhanças entre o imatinibe e o ponatinibe.

3.12 ONIOM

Aplicamos o método ONIOM na proteína tirosina quinase BCR-ABL com a mutação T315I, juntamente com as moléculas dos inibidores, imatinibe e ponatinibe. Deste modo, comparamos as energias de interação apontadas no estudo de *docking*, com a energia dos complexos imatinibe-proteína e ponatinibe-proteína, determinamos a distância em que os resíduos influenciam o comportamento energético do sítio ativo.

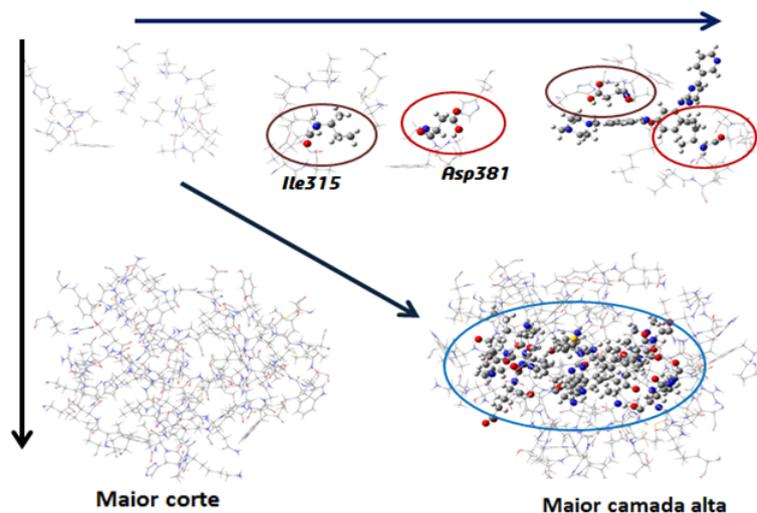


Figura 84 – Esquema geral corte gerados para estudo do ONIOM, no sentido horizontal crescendo apenas a camada alta, sentido vertical crescendo apenas a camada baixa (Figura descrita no capítulo de materiais e métodos).

Assim como dito no capítulo de materiais e métodos dentro da seção 2.6, a estratégia usada foi: cortes no sítio ativo, com aumento progressivo no tamanho dos cortes, adicionando mais resíduos a cada passo. A origem dos cortes ocorreu a partir dos resíduos Ile315 e Asp381. Foram empregados duas estratégias de cálculo com o ONIOM: a primeira com funcional B3LYP com a função de base 6-31g(d) para a camada alta e semiempírico PM6 em camada baixa (B3LYP/6-31g(d):PM6) e a segunda com o método semiempírico PM6 em camada alta e AMBER camada baixa (PM6:AMBER). Sendo assim, o menor corte foi o passo 3 com o total de 7 resíduos, que pode conter ou não o inibidor. O maior corte foi o passo 10, correspondendo a 88 resíduos no total (Figura 84). Dentro de cada corte, a camada alta foi aumentando progressivamente, onde classificamos como níveis 0, 1, 2 e 3. No nível 0, somente o inibidor está em camada alta, no nível 1, apenas 2 resíduos estão em camada alta e poderão ter ou não o inibidor, já no nível 2, 7 resíduos estão presentes, podendo ter o inibidor e no nível 3, 15 resíduos estão presentes, podendo ter ou não inibidor (Figura 85). A proporção seguida entre a camada alta e a baixa foi até de 1/3 (alta/baixa) dos resíduos .

A Tabela 20 traz a divisão da camada alta por nível, começando com apenas o

Tabela 20 – Resíduos presentes em cada nível da camada alta.

Camada Alta (Nível 0)	Camada Alta (Nível 1)	Camada Alta (Nível 2)	Camada Alta (Nível 3)
Inibidor (imatinibe ou ponatinibe)	Ile315 Asp381 e inibidor	Ala269, Ile314, Ile315, Glu316, Ala380, Asp381, Phe382 e inibidor	Val268, Ala269 Met290, Val299 Leu301, Leu302, Ile314, Ile315, Glu316, His361, Asn368, Ala380, Asp381, Phe382, Gly383 e inibidor

inibidor em camada alta (nível 0). Nos níveis seguintes, são adicionados resíduos, cada nível é crescido de resíduos novos, o máximo de resíduos usados foi no nível 3, com 15 resíduos e o inibidor.

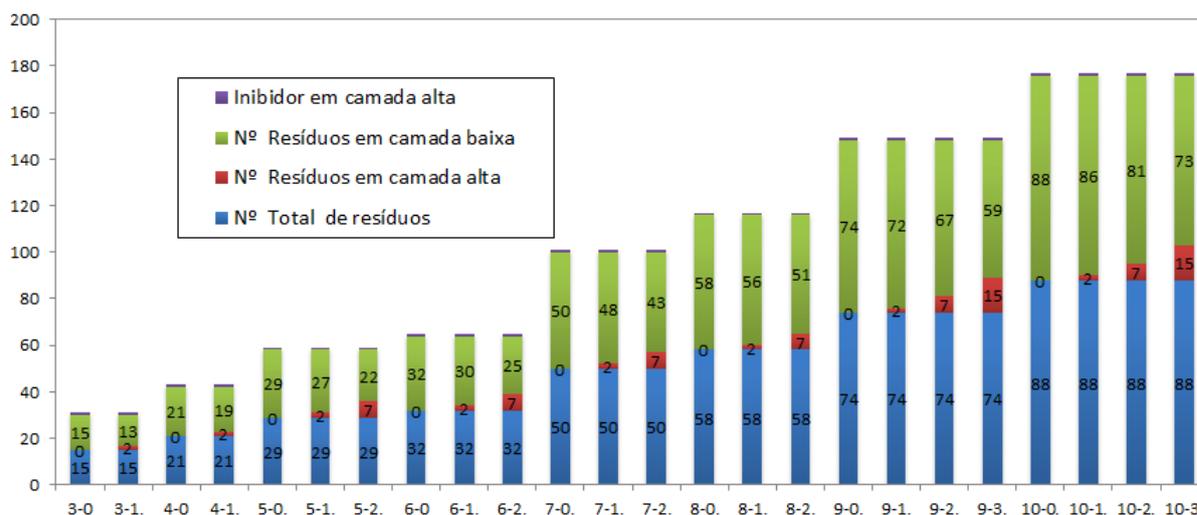


Figura 85 – Apresenta os passos, partindo do passo 3, no nível 0, com 15 resíduos indo até passo 10 no nível 3, com 88 resíduos. A cor azul corresponde a quantidade de resíduos total de resíduos, em vermelho quantidade em camada alta, em verde os resíduos em camada baixa.

3.12.1 Sítio ativo

Usando todos os passos em todos os níveis para cada inibidor, estimamos a energia de interação, usando a equação 3.1. Com apenas a proteína (sem inibidor) em diferentes passos, fizemos um delta entre as energias calculadas com o método ONIOM e a energia extraída deste método com a proteína completa. O menor corte corresponde ao passo 3 e o maior corte corresponde ao passo 10. Todos os passos e proteína estão nos níveis 0 e 1, como pode ser visto na Figura 86. Assim, podemos estimar a variação energética quando um grupo de resíduos são adicionados e a partir de qual corte o sítio ativo pode ser representado.

Uma vez que, a variação de energia entre o corte e a proteína completa for mínima (próxima a zero), os resíduos deste corte teriam como representar o comportamento do sítio ativo, nas mais diversas simulações. A Figura 86 mostra a variação da energia entre o passo 3 até o passo 10 com a proteína completa. O passo 3 possui 15 resíduos (Figura 85) com o aumento no número de resíduos, a energia vai se aproximando da energia da proteína completa, até chegar no passo 7 onde o delta de energia é próximo a zero, como mostra a Figura 86.

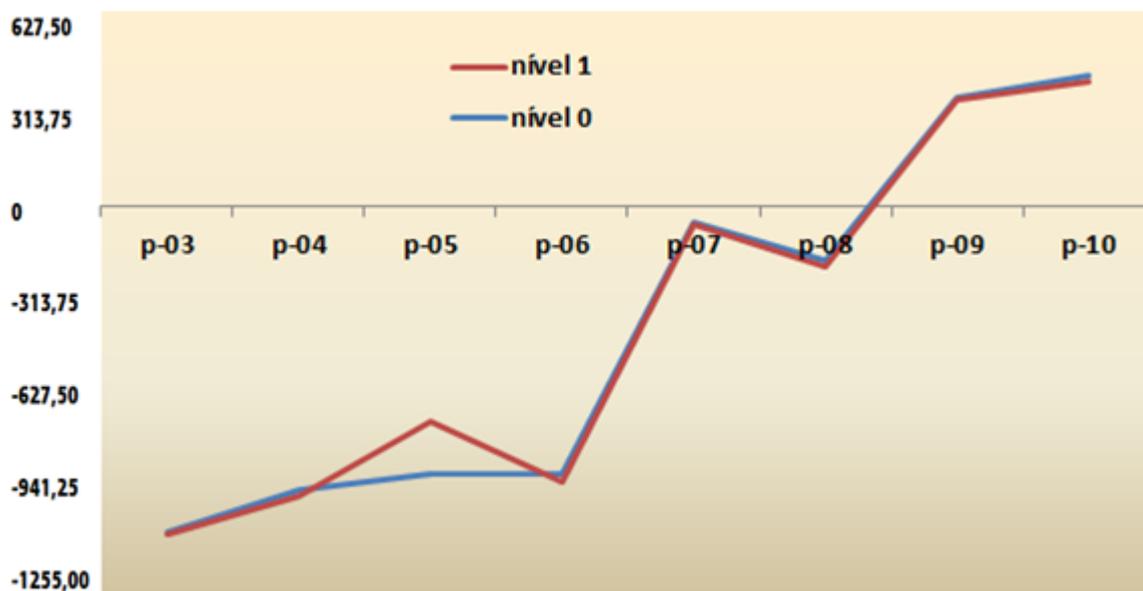


Figura 86 – Diferença de energias entre os passos com nível 1 e 2, para os inibidores: imatinibe+ e ponatinibe+, unidade de energia expressa em kcal.mol⁻¹.

A proteína tirosina quinase BCR-ABL pode sofrer várias mutações ao longo de sua sequência com influência direta na afinidade do sítio ativo, o que pode indicar que, na delimitação do sítio ativo, a quantidade de 50 resíduos pode ser uma estratégia precipitada. No entanto, estes 50 resíduos dispostos no passo 7, podem sugerir algum tipo de representação do sítio de ligação da proteína com a mutação T315I.

A Figura 87 mostra as energias do complexo proteína-inibidor, na linha azul a proteína com a molécula de imatinibe e em roxo a proteína complexada com a molécula de ponatinibe. Nesta representação, a proteína está completa com todos os resíduos e aumentando somente os passos. O passo 1 tem apenas 2 resíduos em camada alta, indo até o passo 10 com 88 resíduos em camada alta. Para realizar estes cálculos, usamos em camada alta o método semiempírico PM6 e a camada baixa o campo de força AMBER. Assim, descrevendo um maior número de resíduos em camada alta para estimar a energia do complexo. Neste contexto, o passo mais próximo da proteína completa com 88 resíduos de camada alta foi o passo 7, com 50 resíduos em camada alta. Portanto, afirmar que estes resíduos delimitam o sítio é prematuro, mas é sugestível, carecendo de mais estudos complementares.

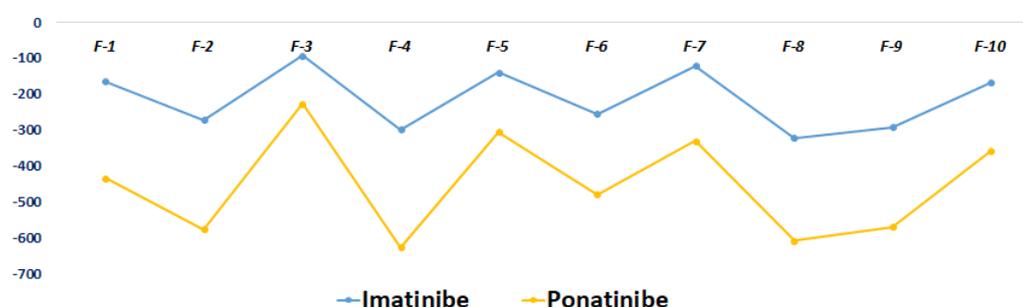


Figura 87 – Energias dos complexos enzima-inibidor, a proteína com a sequência completa e inibidores: em azul a molécula de imatinibe+ e em roxo a molécula de ponatinibe+. Cálculos com método ONIOM, na camada alta o método semiempírico e camada baixa o campo de força AMBER. Energias expressas em kcal.mol⁻¹.

3.12.2 Energias dos complexos com imatinibe+ e ponatinibe+

O resultado das energias está na Figura 88. Deste modo, foi possível visualizar o quanto cada camada de resíduo influência, aumentando ou diminuindo a interação do sítio de ligação com os inibidores e estimar se as energias dispostas no *score* do *docking* destas moléculas representavam as energias encontradas neste estudo de ONIOM.

$$\Delta E_{TOTAL} = E^{ONIOM(PASSO+INIBIDOR)} - E^{ONIOM(PASSO)} - E^{(INIBIDOR)} \quad (3.1)$$

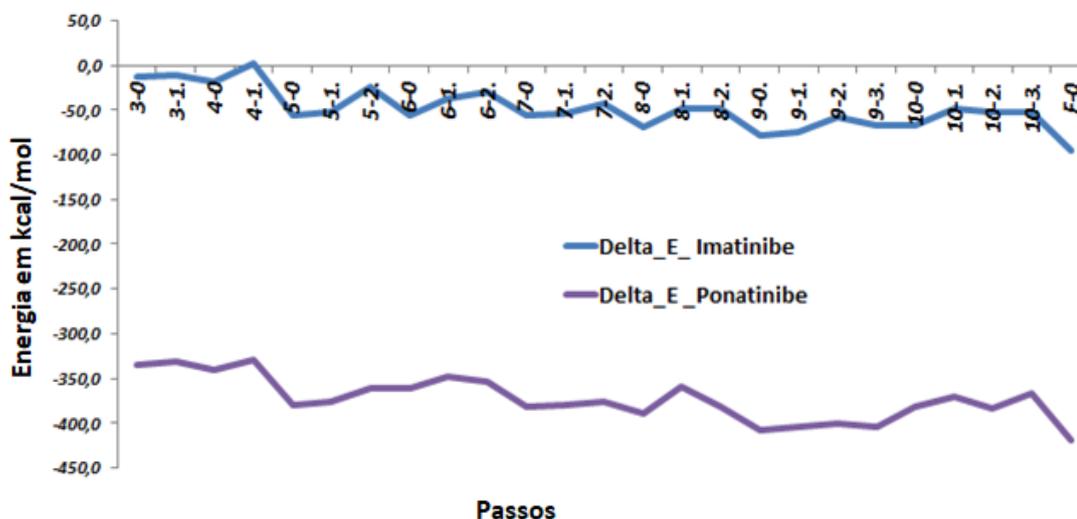


Figura 88 – Energias ONIOM (B3LYP/PM6) em (kcal.mol⁻¹) para os passos de 3 até passo 10 em sequência, onde a toda a proteína está representada por F, com níveis de camadas de 0 até 3.

A Figura 88 reforça a afirmação que o ponatinibe tem maior interação com proteína mutada T315I. A figura mostra a molécula de ponatinibe com afinidade superior ao imatinibe, desde o passo com menor número de resíduos até o de maior número de resíduos. A tendência energética mantém-se quase inalterada.

3.12.3 Cargas Atômicas dos resíduos do sítio ativo Asp381e Ile315

Usamos a população de Mulliken para estimar os valores das cargas atômicas dos resíduos Asp381 e Ile315, no nível 1, o que significa somente estes dois resíduos em camada alta (Funcional B3LYP função de base 6-31g(d)) e o restante em camada baixa (Método semiempírico PM6), sem a presença do inibidor. Os valores das cargas atômicas seguem a tendência esperada, com átomos mais eletronegativos, como o oxigênio e o nitrogênio, com cargas mais negativas e carbonos próximos a estes átomos terem cargas positivas, como mostra a Figura 90.

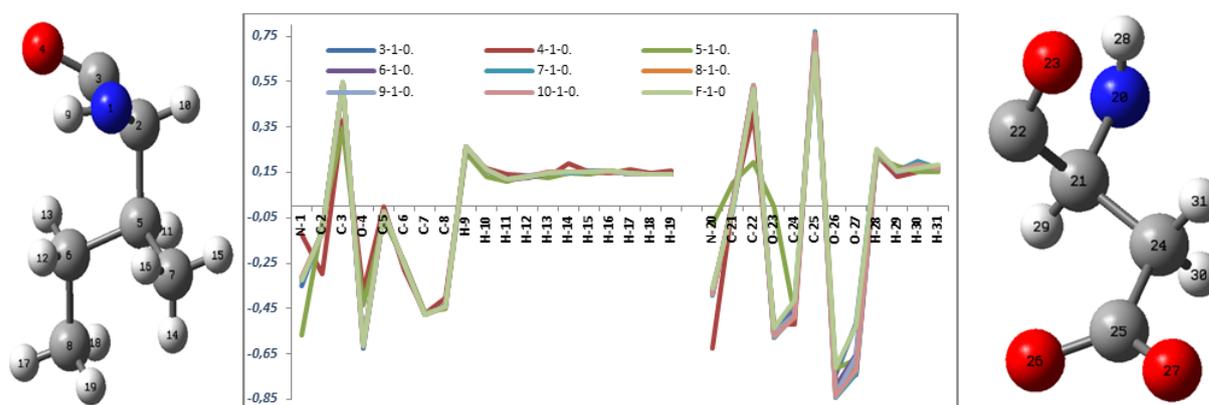


Figura 89 – Cargas de Mulliken para resíduos a esquerda Ile315 e a direita Asp381. Proteína sem a presença do inibidor, cortes começando no passo 3, progressivo até o passo 10 e a proteína completa. Camada alta B3LYP/6-311-G e camada baixa PM6.

Os átomos de carbonos das duas extremidades secbutil da isoleucina (Ile315) apresentam valores negativos em todos os passos, o hidrogênio (H-9) é o mais ácido nestes resíduos está ligando ao nitrogênio. No resíduo Asp381, os dois oxigênios da extremidade (O26 e O27), que caracteriza a função ácida do resíduo, apresentam as carga mais negativa, fazendo que o carbono (C25), em que ambos estejam ligados, tenha a carga mais positiva. Outro fato apresentado por estudo de cargas, mostra que as cargas atômicas destes resíduos, principalmente dos oxigênios do Asp381 que liga ao inibidor, sentem pouca interferência em suas cargas atômicas quando mais resíduos são adicionados ao raio do sítio ativo.

4 Perfil eletrônico molecular dos inibidores tirosina quinase BCR-ABL mutada T315I

Durante este estudo das proteínas tirosina quinases BCR-ABL selvagem e mutada e seus inibidores clássicos, alguns padrões característicos surgiram. No intuito de ajudar a nortear futuras pesquisas destes tipo de inibidor, fizemos uma síntese de quais destas propriedades podem ser aproveitadas para o desenho de um novo inibidor tirosina quinase e, principalmente, com a com mutação T315.

4.1 Sítio de ligação e as características estruturais dos inibidores

O sítio de ligação é longo e estreito, com advento da mutação T315I, permitiu que o inibidor adentrasse mais no sentido de grupos de resíduos hidrofóbicos. Para conseguir interagir com essa área, o inibidor precisa ser longo e sem presença de grupos volumosos ramificados em sua estrutura principal. Todos os inibidores analisados tiveram 7 ângulos de torção. O valor médio do volume dos inibidores ficou em torno de $448,00 \text{ \AA}^3$, tamanho médio ficou em torno de $21,30 \text{ \AA}$, e massa molecular média ficou em torno de $511,00 \text{ g.mol}^{-1}$.

4.2 Importância da interação resíduos Asp381, Glu316, Glu286 com o orbital HOMO

Próximo ao centro da cavidade desta proteína estão os resíduos Asp381, Glu316, Thr315 (selvagem) e Glu286. Estes são os resíduos responsáveis por ancorar a molécula a proteína. Por exemplo, o dasatinibe não consegue entrar no interior do sítio de ligação por completo, devido a interação forte que o grupo amida ligado ao cloro-metil-benzeno e tiazol faz com estes resíduos. A interação do grupo amida com esta região é uma característica que todos os inibidores possuem. Porém, somente o imatinibe e ponatinibe usam orbitais HOMO, nesta região de interação de ambos. Para otimizar estas interações, é importante que o orbital envolvido seja o orbital HOMO. Além disso, o ponatinibe foi o único inibidor a interagir com todos estes resíduos.

4.3 Importância da interação com os resíduos Leu370, Leu248, Tyr253 e o orbital LUMO

O grupo de resíduos que estão localizados mais profundo dentro do sítio de ligação são: Leu370 e Leu248 e Tyr253, Met318. Para interagir com estes resíduos, a molécula de ponatinibe levou o grupo imidazol-piridinina usando um extensor de carbonos. Este grupo tem duas características que o potencializa, primeiro, é a região onde se encontra o orbital LUMO da molécula, segunda, é grupo de maior rearranjo eletrônico de cargas da molécula de ponatinibe, portanto as interações são reforçadas. O fato de se usar um extensor de carbono para levar este grupo fez que a região do grupo amida interagisse fortemente, não permitindo o imidazol-piridinina interagir com estes resíduos. Estes resíduos ancora a extremidade a molécula.

4.4 Importância da interação com os resíduos Ile293, Leu298, Val379 Val299

Outro grupo destacado é bolsão hidrofóbico composto por: Leu 298 Val379 Ile293 e Val299. O ponatinibe e nilotinibe usam o trifluorometil para interagir com eles. Estes estão na região central do sítio de ligação. O fato de usar halogênios (podendo aumentar a toxicidade da molécula (SCHULTZ; RIGGIN, 1985)) para atuar nas interações com estes resíduos, reforça a importância destes resíduos. Embora, sejam resíduos apolares, a densidade de interações que podem fazer, reforça ainda mais sua importância.

4.4.1 Grupos funcionais

Dentro da estrutura do inibidor quinase com melhor perfil inibitório tem quatro grupos, em ordem decrescente: imidazol-pirimidina, metil piperazina, trifluorometilbenzeno grupo amida. Buscar alternativas para estes grupos mantendo o principal perfil eletrônico, como fez o ponatinibe em função do imatinibe é, uma boa estratégia para vencer esta mutação.

4.5 Visão geral do perfil de um provável bom candidato a inibidor

5 Conclusões

Neste trabalho realizamos o estudo de *docking* da proteína tirosina quinase BCR-ABL na forma selvagem e com a mutação T315I, com as moléculas dos inibidores imatinibe, dasatinibe nilotinibe, ponatinibe e quatro moléculas derivadas do nilotinibe e ponatinibe. O estudo de *docking* molecular foi utilizado para o estudo das principais interações, o tipo de interação e a distância de interação de cada resíduo com a proteína. Podendo assim, comparar as interações feitas pelas proteínas na forma selvagem e forma mutada com estas moléculas. Neste sentido, o estudo mostrou que a molécula de imatinibe interage com a proteína na forma selvagem, fazendo duas interações tipo ligação de hidrogênio com os resíduos Glu286 e T315. A primeira encontra-se em uma região importante da proteína, *hinge* (dobradiça), pois é o local de junção dos dois lóbulos da proteína, sendo um local de grande mobilidade dos resíduos. A segunda é o *gatekeep* (porteiro), resíduo chave, que controla a entrada de moléculas nos canais hidrofóbicos da proteína. Estas interações com a molécula de imatinibe não são observadas no caso da proteína mutada (T315I). Do mesmo modo, o estudo mostrou também que a molécula de ponatinibe interage com resíduos semelhante ao imatinibe. Porém, consegue interagir melhor com os mesmos, em termos de distâncias, e usando grupos específicos como a metil-piperazina e imidazol-piridina.

Associando as informações do estudo de *docking* com as de estrutura eletrônica, foi possível observar as contribuições dos grupos funcionais grupamentos presentes nas interações do ligante com a proteína, mostrando sua importância dentro do estrutura do inibidor. Como por exemplo, o grupo trifluormetil que o ponatinibe resgata da molécula do nilotinibe. O metil-piperazina é outro grupo que o ponatinibe resgata da molécula de imatinibe, além do grupo amida presente em todos os inibidores. Estes grupos estão associados com os orbitais de fronteira, acumulando várias interações. Este é o caso do orbital HOMO da molécula de ponatinibe que está posicionado na dobradiça da proteína mutada, fazendo interações com os resíduos Ile315, Asp381 e Glu286.

O estudo dos orbitais de fronteira mostrou a semelhança eletrônica entre o ponatinibe e imatinibe e em contraste a diferença entre o ponatinibe e o dasatinibe, e que a ausência de átomos de halogênios tem maior reflexo na molécula de ponatinibe do que na molécula de nilotinibe.

Foi utilizado o método ONIOM, com a proteína mutada T315I complexada com os inibidores imatinibe e ponatinibe (B3LYP:PM6), com estrutura rígida (single point), incluindo a camada alta. Os valores de energias sugerem que um cinturão 50 resíduos diametral aos resíduos Ile315 e Asp381, teriam maior influência no resultado da interação enzima-inibidor. Portanto, mutações dentro deste perímetro tem impacto maior na redução

da interação desta enzima com os inibidores. O estudo das cargas atômicas destes dois resíduos é pouco afetado quando um maior número de resíduos, é adicionado ao sítio ativo. O estudo com ONIOM mostrou ainda que, na combinação (B3LYP:PM6) e na combinação (PM6:AMBER) a interação da molécula de ponatinibe com a proteína é superior ao imatinibe desde a proteína com menor número de resíduos até a proteína completa. Esse estudo mostrou também que os principais resíduos de interação da proteína mutada T315I com os inibidores estão entre os 15 resíduos do passo 1.

Referências

- ADDICOAT, M. A. et al. Extension of the universal force field to metal–organic frameworks. *Journal of Chemical Theory and Computation*, American Chemical Society (ACS), v. 10, n. 2, p. 880–891, jan 2014. Citado na página 35.
- ADURI, R. et al. AMBER force field parameters for the naturally occurring modified nucleosides in RNA. *Journal of Chemical Theory and Computation*, American Chemical Society (ACS), v. 3, n. 4, p. 1464–1475, jun 2007. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 36.
- AKIF, M. et al. High-resolution crystal structures of drosophila melanogaster angiotensin-converting enzyme in complex with novel inhibitors and antihypertensive drugs. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier BV, v. 400, n. 3, p. 502–517, jul 2010. Citado na página 24.
- ALEKSANDROV, A.; SIMONSON, T. A molecular mechanics model for imatinib and imatinib:kinase binding. *Journal of Computational Chemistry*, Wiley, p. n/a–n/a, 2009. Citado na página 16.
- AN, X. et al. tyrosine kinase inhibitors in the treatment of philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia: A review. *Leukemia Research*, Elsevier BV, v. 34, n. 10, p. 1255–1268, oct 2010. Citado 3 vezes nas páginas 2, 11 e 13.
- ANAND, P. et al. Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharmaceutical Research*, Springer Science and Business Media LLC, v. 25, n. 9, p. 2097–2116, jul 2008. Citado na página 1.
- ANNIBALE, P. et al. High-resolution mapping of the electrostatic potential in organic thin-film transistors by phase electrostatic force microscopy. *The Journal of Physical Chemistry A*, American Chemical Society (ACS), v. 111, n. 49, p. 12854–12858, dec 2007. Citado na página 42.
- APOR. *Leucemia: o que preciso saber sobre ela*. 2021. Bio. Disponível em: <<https://www.biometrix.com.br/leucemia-saber-sobre/>>. Citado na página 10.
- ARIGHI, E.; BORRELLO, M. G.; SARIOLA, H. RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, Elsevier BV, v. 16, n. 4-5, p. 441–467, aug 2005. Citado na página 17.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; SILVA, A. B. F. da. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010. Citado na página 27.
- ARROIO, A. et al. O ensino de química quântica e o computador na perspectiva de projetos. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 28, n. 2, p. 360–363, mar 2005. Citado na página 25.
- ASAKI, T. et al. Design and synthesis of 3-substituted benzamide derivatives as bcr-abl kinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Elsevier BV, v. 16, n. 5, p. 1421–1425, mar 2006. Citado na página 15.

- ASSADI, M. H. N.; HANAOR, D. A. H. Theoretical study on copper's energetics and magnetism in TiO₂ polymorphs. *Journal of Applied Physics*, AIP Publishing, v. 113, n. 23, p. 233913, jun 2013. Citado na página 31.
- AVILA, C. M.; ROMEIRO, N. C. Protein tyrosine kinases: challenges in the development of drugs aimed at cancer therapy. *Revista Virtual de Química*, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), v. 2, n. 1, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 22.
- AVRON, J. E.; ELGART, A. Adiabatic theorem without a gap condition. *Communications in Mathematical Physics*, Springer Science and Business Media LLC, v. 203, n. 2, p. 445–463, jun 1999. Citado na página 28.
- BAER, M. Born-oppenheimer approach: Diabatization and topological matrix. In: *Beyond Born-Oppenheimer*. [S.l.]: John Wiley & Sons, Inc., 2006. p. 26–57. Citado na página 28.
- BAER, R. et al. A study of conical intersection effects on scattering processes: The validity of adiabatic single-surface approximations within a quasi-jahn-teller model. *The Journal of Chemical Physics*, AIP Publishing, v. 105, n. 20, p. 9141–9152, nov 1996. Citado na página 28.
- BANAVATH, H. N. et al. Identification of novel tyrosine kinase inhibitors for drug resistant t315i mutant BCR-ABL: a virtual screening and molecular dynamics simulations study. *Scientific Reports*, Springer Science and Business Media LLC, v. 4, n. 1, nov 2014. Citado na página 17.
- BARREIRO, E. J. et al. A química medicinal de n-acilidrazonas: novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 25, n. 1, p. 129–148, feb 2002. Citado na página 24.
- BARRETO, R. C. *Propriedades eletrônicas de líquidos homogêneos*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 30.
- BARTLETT, G. J. et al. Analysis of catalytic residues in enzyme active sites. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier BV, v. 324, n. 1, p. 105–121, nov 2002. Citado na página 9.
- BATTAGLINI, C. L. et al. The effects of an exercise program in leukemia patients. *Integrative Cancer Therapies*, SAGE Publications, v. 8, n. 2, p. 130–138, jun 2009. Citado 2 vezes nas páginas 12 e 13.
- BERN, H. A. et al. Endocrinology of poikilothermic vertebrates. *The hormones*, p. 199–299, 1964. Citado na página 8.
- BHULLAR, N. K. et al. Unlocking wheat genetic resources for the molecular identification of previously undescribed functional alleles at the pm3 resistance locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 23, p. 9519–9524, may 2009. Citado na página 34.
- BISHNOI, S.; ROCHELLE, G. T. Thermodynamics of piperazine/methyldiethanolamine/water/carbon dioxide. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, American Chemical Society (ACS), v. 41, n. 3, p. 604–612, jan 2002. Citado na página 16.
- BISONG, E. Matplotlib and seaborn. In: *Building Machine Learning and Deep Learning Models on Google Cloud Platform*. [S.l.]: Apress, 2019. p. 151–165. Citado na página 45.

- BOECHAT, N. et al. Sínteses e propriedades de fármacos inibidores da tirosina quinase BCR-ABL, utilizados no tratamento da leucemia mieloide crônica. *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), mar 2017. Citado 3 vezes nas páginas 2, 11 e 12.
- BOLLMANN, P. W.; GIGLIO, A. del. Chronic myeloid leukemia: past, present, future. *Einstein (São Paulo)*, FapUNIFESP (SciELO), v. 9, n. 2, p. 236–243, jun 2011. Citado na página 13.
- BORKIN, M. et al. Evaluation of artery visualizations for heart disease diagnosis. *IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 17, n. 12, p. 2479–2488, dec 2011. Citado na página 43.
- BOZKURT, A. PAA/imidazol-based proton conducting polymer electrolytes. *Journal of Power Sources*, Elsevier BV, v. 123, n. 2, p. 126–131, sep 2003. Citado na página 61.
- BROSNAN, J. T. Interorgan amino acid transport and its regulation. *The Journal of Nutrition*, Oxford University Press (OUP), v. 133, n. 6, p. 2068S–2072S, jun 2003. Citado na página 8.
- BROWN, K. et al. Structural basis for the interaction of TAK1 kinase with its activating protein TAB1. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier BV, v. 354, n. 5, p. 1013–1020, dec 2005. Citado na página 49.
- BRUCKDORFER, T.; MARDER, O.; ALBERICIO, F. From production of peptides in milligram amounts for research to multitons quantities for drugs. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, Bentham Science Publishers Ltd., v. 5, n. 1, p. 29–43, feb 2004. Citado na página 3.
- BRUNK, E.; ROTHLSBERGER, U. Mixed quantum mechanical/molecular mechanical molecular dynamics simulations of biological systems in ground and electronically excited states. *Chemical Reviews*, American Chemical Society (ACS), v. 115, n. 12, p. 6217–6263, apr 2015. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 38.
- BUBLIL, E. M.; YARDEN, Y. The EGF receptor family: spearheading a merger of signaling and therapeutics. *Current Opinion in Cell Biology*, Elsevier BV, v. 19, n. 2, p. 124–134, apr 2007. Citado 3 vezes nas páginas 5, 21 e 22.
- BUFFA, P. et al. BCR-ABL residues interacting with ponatinib are critical to preserve the tumorigenic potential of the oncoprotein. *The FASEB Journal*, Wiley, v. 28, n. 3, p. 1221–1236, dec 2013. Citado na página 18.
- BURLEY, S.; PETSKO, G. Amino-aromatic interactions in proteins. *FEBS Letters*, Wiley, v. 203, n. 2, p. 139–143, jul 1986. Citado na página 41.
- CAKIR, B. Ömür; ADAMSON, P.; CINGI, C. Epidemiology and economic burden of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, Elsevier BV, v. 20, n. 4, p. 419–422, nov 2012. Citado na página 1.
- CASALINO, L. et al. AI-driven multiscale simulations illuminate mechanisms of SARS-CoV-2 spike dynamics. *The International Journal of High Performance Computing Applications*, SAGE Publications, v. 35, n. 5, p. 432–451, apr 2021. Citado na página 44.
- CASE, D. et al. Ambertools. *San Francisco, CA: University of California*, 2008. Citado na página 46.

CASEWIT, C. J.; COLWELL, K. S.; RAPPE, A. K. Application of a universal force field to organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, American Chemical Society (ACS), v. 114, n. 25, p. 10035–10046, dec 1992. Citado na página 35.

CHAUDHARY, K. K.; MISHRA, N. A review on molecular docking: novel tool for drug discovery. *databases*, v. 3, n. 4, 2016. Citado na página 40.

CHEMCRAFTPROG. *graphical software for visualization of quantum chemistry computations*. 2020. Disponível em: <<https://www.chemcraftprog.com>>. Citado na página 44.

CHEN, Z. et al. A clinical and experimental study on all-trans retinoic acid-treated acute promyelocytic leukemia patients. *Blood*, American Society of Hematology, v. 78, n. 6, p. 1413–1419, sep 1991. Citado na página 10.

CHENNA, R. Multiple sequence alignment with the clustal series of programs. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press (OUP), v. 31, n. 13, p. 3497–3500, jul 2003. Citado na página 39.

COHEN, D. US trade rep is pressing indian government to forbid production of generic cancer drug, consortium says. *BMJ*, BMJ, v. 349, n. nov04 1, p. g6593–g6593, nov 2014. Citado na página 18.

COPLAND, J. A. et al. Sex steroid receptors in skeletal differentiation and epithelial neoplasia: is tissue-specific intervention possible? *BioEssays*, Wiley, v. 31, n. 6, p. 629–641, jun 2009. Citado na página 18.

CORNELL, W. D. et al. A second generation force field for the simulation of proteins, nucleic acids, and organic molecules. *Journal of the American Chemical Society*, American Chemical Society (ACS), v. 117, n. 19, p. 5179–5197, may 1995. Citado na página 36.

CORTES, J. Natural history and staging of chronic myelogenous leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, Elsevier BV, v. 18, n. 3, p. 569–584, jun 2004. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 12.

COSTA, R. A. et al. Investigação das propriedades vibracionais, estruturais e eletrônicas através de cálculos dft e estudos de docking molecular de alcaloides isolados de plantas da flora amazônica: uma abordagem teórica para moléculas bioativas. Universidade Federal do Amazonas, 2018. Citado na página 30.

CRAMERI, F.; SHEPHARD, G. E.; HERON, P. J. The misuse of colour in science communication. *Nature Communications*, Springer Science and Business Media LLC, v. 11, n. 1, oct 2020. Citado na página 43.

CROCE, C. M. Oncogenes and cancer. *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, v. 358, n. 5, p. 502–511, jan 2008. Citado na página 1.

CUSTODIO, R. et al. Quatro alternativas para resolver a equação de schrödinger para o átomo de hidrogênio. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 25, n. 1, p. 159–170, feb 2002. Citado na página 27.

DALVIT, C.; INVERNIZZI, C.; VULPETTI, A. Fluorine as a hydrogen-bond acceptor: Experimental evidence and computational calculations. *Chemistry - A European Journal*, Wiley, v. 20, n. 35, p. 11058–11068, jul 2014. Citado na página 19.

DEININGER, M.; BUCHDUNGER, E.; DRUKER, B. J. The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia. *Blood*, American Society of Hematology, v. 105, n. 7, p. 2640–2653, apr 2005. Citado 2 vezes nas páginas 3 e 9.

DEMIZU, Y. et al. Development of BCR-ABL degradation inducers via the conjugation of an imatinib derivative and a cIAP1 ligand. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Elsevier BV, v. 26, n. 20, p. 4865–4869, oct 2016. Citado na página 49.

DENMEADE, S. R.; ISAACS, J. T. A history of prostate cancer treatment. *Nature Reviews Cancer*, Springer Science and Business Media LLC, v. 2, n. 5, p. 389–396, may 2002. Citado na página 1.

DEVITA, V. T.; CHU, E. A history of cancer chemotherapy. *Cancer Research*, American Association for Cancer Research (AACR), v. 68, n. 21, p. 8643–8653, oct 2008. Citado na página 1.

DICKSON, C. J. et al. Lipid14: The amber lipid force field. *Journal of Chemical Theory and Computation*, American Chemical Society (ACS), v. 10, n. 2, p. 865–879, jan 2014. Citado na página 35.

DONG, J.; XU, M. Space–time fractional schrödinger equation with time-independent potentials. *Journal of Mathematical Analysis and Applications*, Elsevier BV, v. 344, n. 2, p. 1005–1017, aug 2008. Citado na página 27.

DUARTE, H. A. Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 24, n. 4, p. 501–508, aug 2001. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 30.

DUARTE, H. A. Índices de reatividade química a partir da teoria do funcional de densidade: formalismo e perspectivas. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 24, p. 501–508, 2001. Citado na página 31.

DUCHESNE, L. et al. N-glycosylation of fibroblast growth factor receptor 1 regulates ligand and heparan sulfate co-receptor binding. *Journal of Biological Chemistry*, American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB), v. 281, n. 37, p. 27178–27189, jul 2006. Citado na página 5.

ECK, M. J.; MANLEY, P. W. The interplay of structural information and functional studies in kinase drug design: insights from BCR-abl. *Current Opinion in Cell Biology*, Elsevier BV, v. 21, n. 2, p. 288–295, apr 2009. Citado na página 13.

ELSAYED, N. M. Y. et al. Design, synthesis and biological evaluation of indazole–pyrimidine based derivatives as anticancer agents with anti-angiogenic and antiproliferative activities. *MedChemComm*, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 7, n. 5, p. 881–899, 2016. Citado na página 3.

EPSTEIN, F. H. et al. The molecular genetics of philadelphia chromosome–positive leukemias. *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, v. 319, n. 15, p. 990–998, oct 1988. Citado na página 11.

FAJER, M.; MENG, Y.; ROUX, B. The activation of c-src tyrosine kinase: conformational transition pathway and free energy landscape. *The Journal of Physical Chemistry B*, ACS Publications, v. 121, n. 15, p. 3352–3363, 2016. Citado 3 vezes nas páginas 2, 12 e 17.

- FILHO, O. A. S.; ALENCASTRO, R. B. de. Modelagem de proteínas por homologia. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 26, n. 2, p. 253–259, mar 2003. Citado na página 2.
- FRAZAO, C. et al. Crystal structure of cardosin a, a glycosylated and arg-gly-asp-containing aspartic proteinase from the flowers of *Cynara cardunculus* l. *Journal of Biological Chemistry*, ASBMB, v. 274, n. 39, p. 27694–27701, 1999. Citado na página 9.
- FREITAS, L. C. G.; OLIVEIRA, G. S. de. *Aplicações de química teórica no estudo de materiais: métodos in silico para nanomateriais*. [S.l.]: EdUFSCar, 2018. Citado na página 29.
- FRISCH, M. J. et al. *Gaussian 03, Revision C.02*. 2009. Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004. Citado na página 44.
- GANGADHARAN, R. P.; KRISHNAN, S. S. Natural bond orbital (nbo) population analysis, first order hyperpolarizabilities and thermodynamic properties of cyclohexanone. *Guang pu xue yu guang pu fen xi= Guang pu*, v. 35, n. 6, p. 1506–1511, 2015. Citado na página 37.
- GARRETA, R.; MONCECCHI, G. *Learning scikit-learn: machine learning in python*. [S.l.]: Packt Publishing Ltd, 2013. Citado na página 45.
- GEORGOULIA, P. S. et al. The catalytic activity of ab11 single and compound mutations: Implications for the mechanism of drug resistance mutations in chronic myeloid leukaemia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Elsevier BV, v. 1863, n. 4, p. 732–741, apr 2019. Citado 2 vezes nas páginas 8 e 15.
- GHIASI, R.; MOKARAM, E. E. Natural bond orbital (nbo) population analysis of iridabenzene (c. *Journal of Applied Chemical Research*, v. 6, n. 1, p. 7–13, 2012. Citado na página 37.
- GLENDENING, E. D.; LANDIS, C. R.; WEINHOLD, F. Natural bond orbital methods. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science*, Wiley, v. 2, n. 1, p. 1–42, jun 2011. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 93.
- GORA-TYBOR, J.; ROBAK, T. Targeted drugs in chronic myeloid leukemia. *Current Medicinal Chemistry*, Bentham Science Publishers Ltd., v. 15, n. 29, p. 3036–3051, dec 2008. Citado 2 vezes nas páginas 20 e 60.
- GRIMME, S. et al. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-d) for the 94 elements h-pu. *The Journal of Chemical Physics*, AIP Publishing, v. 132, n. 15, p. 154104, apr 2010. Citado na página 31.
- GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. de M.; MENDONÇA, G. A. e S. Risco de câncer no brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Revista Brasileira De Cancerologia (RBC), v. 51, n. 3, p. 227–234, sep 2005. Citado na página 1.
- GUTTERIDGE, A.; THORNTON, J. M. Understanding nature catalytic toolkit. *Trends in Biochemical Sciences*, Elsevier BV, v. 30, n. 11, p. 622–629, nov 2005. Citado na página 9.

- HANNINK, M.; DONOGHUE, D. J. Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, Elsevier BV, v. 989, n. 1, p. 1–10, jul 1989. Citado na página 15.
- HANOUNE, J.; DEFER, N. REGULATION AND ROLE OF ADENYLYL CYCLASE ISOMERFORMS. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, Annual Reviews, v. 41, n. 1, p. 145–174, apr 2001. Citado na página 7.
- HANTSCH, O.; SUPERTI-FURGA, G. Regulation of the c-abl and bcr-abl tyrosine kinases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Springer Science and Business Media LLC, v. 5, n. 1, p. 33–44, jan 2004. Citado na página 9.
- HARROWER, M.; BREWER, C. A. ColorBrewer.org: An online tool for selecting colour schemes for maps. *The Cartographic Journal*, Informa UK Limited, v. 40, n. 1, p. 27–37, jun 2003. Citado na página 42.
- HEERDT, G.; MORGON, N. H. Validação computacional de métodos compostos no estudo de propriedades moleculares. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 34, n. 5, p. 868–873, 2011. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 39.
- HUBBARD, S. R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, Elsevier BV, v. 71, n. 3–4, p. 343–358, apr 1999. Citado 2 vezes nas páginas 4 e 8.
- HUGHES, T. Monitoring CML patients responding to treatment with tyrosine kinase inhibitors: review and recommendations for harmonizing current methodology for detecting BCR-ABL transcripts and kinase domain mutations and for expressing results. *Blood*, American Society of Hematology, v. 108, n. 1, p. 28–37, jul 2006. Citado 4 vezes nas páginas 2, 3, 10 e 20.
- INCA. *INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER*. <https://www.inca.gov.br/>: [s.n.], 2021. Citado na página 1.
- ITAHARA, T.; IMAIZUMI, K. Role of nitrogen atom in aromatic stacking. *The Journal of Physical Chemistry B*, American Chemical Society (ACS), v. 111, n. 8, p. 2025–2032, feb 2007. Citado na página 61.
- JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, Wiley, v. 61, n. 2, p. 69–90, feb 2011. Citado na página 1.
- JOAG, M. G. et al. Topical 5-fluorouracil 1% as primary treatment for ocular surface squamous neoplasia. *Ophthalmology*, Elsevier BV, v. 123, n. 7, p. 1442–1448, jul 2016. Citado na página 19.
- JORGENSEN, W. Rusting of the lock and key model for protein-ligand binding. *Science*, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 254, n. 5034, p. 954–955, nov 1991. Citado na página 40.
- JR, C. V.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 29, n. 2, p. 326–337, apr 2006. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25.

- JUNIOR, J. G. R. et al. Desenvolvimento de um modelo empírico de predição da atividade de inibidores da estero14a-desmetilase (cyp51) utilizando o método semiempírico pm6. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009. Citado na página 33.
- KALE, M.; SONWANE, G.; CHOUDHARI, Y. Searching for potential novel BCR-ABL tyrosine kinase inhibitors through g-QSAR and docking studies of some novel 2-phenazinamine derivatives. *Current Computer-Aided Drug Design*, Bentham Science Publishers Ltd., v. 16, n. 5, p. 501–510, nov 2020. Citado na página 49.
- KALINICHENKO, E. et al. Synthesis, biological activities and docking studies of novel 4-(arylaminoethyl)benzamide derivatives as potential tyrosine kinase inhibitors. *Molecules*, MDPI AG, v. 24, n. 19, p. 3543, sep 2019. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 15.
- KAMENETSKY, M. et al. Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: A tale of two systems. *Journal of Molecular Biology*, Elsevier BV, v. 362, n. 4, p. 623–639, sep 2006. Citado na página 7.
- KANTARJIAN, H. et al. Nilotinib in imatinib-resistant CML and philadelphia chromosome-positive ALL. *New England Journal of Medicine*, Massachusetts Medical Society, v. 354, n. 24, p. 2542–2551, jun 2006. Citado na página 20.
- KEATING, G. M. Dasatinib: A review in chronic myeloid leukaemia and acute lymphoblastic leukaemia. *Drugs*, Springer Science and Business Media LLC, v. 77, n. 1, p. 85–96, dec 2016. Citado na página 18.
- KEY, T. J. Fruit and vegetables and cancer risk. *British Journal of Cancer*, Springer Science and Business Media LLC, v. 104, n. 1, p. 6–11, nov 2010. Citado na página 2.
- KHAN, M. O.; PARK, K. K.; LEE, H. J. Antedrug: An approach to safer drugs. *Current Medicinal Chemistry*, Bentham Science Publishers Ltd., v. 12, n. 19, p. 2227–2239, sep 2005. Citado na página 19.
- KLEIN, T. et al. Structural and dynamic insights into the energetics of activation loop rearrangement in fgfr1 kinase. *Nature communications*, Nature Publishing Group, v. 6, p. 7877, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 2 e 8.
- KNOWLES, J. R. Enzyme-catalyzed phosphoryl transfer reactions. *Annual Review of Biochemistry*, Annual Reviews, v. 49, n. 1, p. 877–919, jun 1980. Citado na página 6.
- KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. The process of reversible phosphorylation: the work of edmond h. fischer. *Journal of Biological Chemistry*, American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB), v. 286, n. 3, p. e1–e2, jan 2011. Citado na página 6.
- LAGOJA, I. Pyrimidine as constituent of natural biologically active compounds. *Chemistry & Biodiversity*, Wiley, v. 2, n. 1, p. 1–50, jan 2005. Citado na página 57.
- LAKSHMINARAYANAN, S. et al. Molecular electrostatic potential (MEP) surface analysis of chemo sensors: An extra supporting hand for strength, selectivity & non-traditional interactions. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, Elsevier BV, v. 6, p. 100022, jun 2021. Citado na página 41.

- LAMBERT, G. K. et al. The background, discovery and clinical development of BCR-ABL inhibitors. *Drug Discovery Today*, Elsevier BV, v. 18, n. 19-20, p. 992–1000, oct 2013. Citado na página 13.
- LARKIN, M. A. et al. Clustal w and clustal x version 2.0. *bioinformatics*, Oxford University Press, v. 23, n. 21, p. 2947–2948, 2007. Citado na página 49.
- LEAL, R. C. et al. A química quântica na compreensão de teorias de química orgânica. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 33, n. 5, p. 1211–1215, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 25 e 27.
- LEE, T.-S. et al. Molecular basis explanation for imatinib resistance of BCR-ABL due to t315i and p-loop mutations from molecular dynamics simulations. *Cancer*, Wiley, v. 112, n. 8, p. 1744–1753, 2008. Citado na página 58.
- LEMMON, M. A.; SCHLESSINGER, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*, Elsevier BV, v. 141, n. 7, p. 1117–1134, jun 2010. Citado 4 vezes nas páginas xv, 3, 4 e 14.
- LENGAUER, T.; RAREY, M. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology*, Elsevier BV, v. 6, n. 3, p. 402–406, jun 1996. Citado na página 40.
- LEUKEMIA, E. in C. M. The price of drugs for chronic myeloid leukemia (CML) is a reflection of the unsustainable prices of cancer drugs: from the perspective of a large group of CML experts. *Blood*, American Society of Hematology, v. 121, n. 22, p. 4439–4442, may 2013. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 83.
- LIANG, X. et al. Quantification of change in phosphorylation of BCR-ABL kinase and its substrates in response to imatinib treatment in human chronic myelogenous leukemia cells. *PROTEOMICS*, Wiley, v. 6, n. 16, p. 4554–4564, aug 2006. Citado na página 3.
- LICHTENTHALER, F. W. 100 years “schlüssel-schloss-prinzip”: What made emil fischer use this analogy? *Angewandte Chemie International Edition in English*, Wiley, v. 33, n. 2324, p. 2364–2374, jan 1995. Citado na página 25.
- LIMA, L. M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 30, n. 6, p. 1456–1468, dec 2007. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 25.
- LIU, Y. et al. Effect of pi–pi stacking on the self-assembly of azomethine-type rod–coil liquid crystals. *Liquid Crystals*, Informa UK Limited, v. 38, n. 8, p. 995–1006, aug 2011. Citado na página 41.
- LIU, Z. et al. Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. *Chemosphere*, Elsevier BV, v. 203, p. 139–150, jul 2018. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 39.
- LOPES, N. R.; ABREU, M. T. C. L. Inibidores de tirosino quinase na leucemia mieloide crônica. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, Elsevier BV, v. 31, n. 6, p. 449–453, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 15 e 43.
- MACHADO, V. G.; NOME, F. Compostos fosfatados ricos em energia. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 22, p. 351–357, 1999. Citado na página 6.

- MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. *European Journal of Pharmacology*, Elsevier BV, v. 625, n. 1-3, p. 90–100, dec 2009. Citado na página 15.
- MARTINEZ, C. R.; IVERSON, B. L. Rethinking the term “pi-stacking”. *Chemical Science*, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 3, n. 7, p. 2191, 2012. Citado na página 41.
- MASERAS, F.; MOROKUMA, K. A new integrated ab initio molecular mechanics geometry optimization scheme of equilibrium structures and transition states. *Journal of Computational Chemistry*, Wiley, v. 16, n. 9, p. 1170–1179, sep 1995. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 39.
- MEAGHER, K. L.; REDMAN, L. T.; CARLSON, H. A. Development of polyphosphate parameters for use with the AMBER force field. *Journal of Computational Chemistry*, Wiley, v. 24, n. 9, p. 1016–1025, jul 2003. Citado na página 36.
- MEANWELL, N. A. Fluorine and fluorinated motifs in the design and application of bioisosteres for drug design. *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society (ACS), v. 61, n. 14, p. 5822–5880, feb 2018. Citado na página 22.
- MENG, E. C.; SHOICHET, B. K.; KUNTZ, I. D. Automated docking with grid-based energy evaluation. *Journal of Computational Chemistry*, Wiley, v. 13, n. 4, p. 505–524, may 1992. Citado na página 40.
- MENG, Y.; LIN, Y. lin; ROUX, B. Computational study of the “DFG-flip” conformational transition in c-abl and c-src tyrosine kinases. *The Journal of Physical Chemistry B*, American Chemical Society (ACS), v. 119, n. 4, p. 1443–1456, jan 2015. Citado na página 8.
- MONTE, S. A. do; VENTURA, E. A importância do método de hartree no ensino de química quântica. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 34, n. 3, p. 527–534, 2011. Citado na página 29.
- MOORE, A. Y. Clinical applications for topical 5-fluorouracil in the treatment of dermatological disorders. *Journal of Dermatological Treatment*, Informa UK Limited, v. 20, n. 6, p. 328–335, dec 2009. Citado na página 19.
- MORGON, N. H.; CUSTÓDIO, R. Funções de base: o ajuste variacional. *Revista Chemkeys*, n. 2, p. 1–11, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 33.
- MORZAN, U. N. et al. Spectroscopy in complex environments from QM–MM simulations. *Chemical Reviews*, American Chemical Society (ACS), v. 118, n. 7, p. 4071–4113, mar 2018. Citado na página 38.
- MOURIK, T. van; BüHL, M.; GAIGEOT, M.-P. Density functional theory across chemistry, physics and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, The Royal Society, v. 372, n. 2011, p. 20120488, mar 2014. Citado na página 30.
- MOURIK, T. van; GDANITZ, R. J. A critical note on density functional theory studies on rare-gas dimers. *The Journal of Chemical Physics*, AIP Publishing, v. 116, n. 22, p. 9620–9623, jun 2002. Citado na página 31.

- NAMBA, A. M.; SILVA da. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. *Eclética Química*, SciELO Brasil, v. 33, p. 13–24, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 35.
- NEST, M.; KLAMROTH, T.; SAALFRANK, P. The multiconfiguration time-dependent hartree–fock method for quantum chemical calculations. *The Journal of Chemical Physics*, AIP Publishing, v. 122, n. 12, p. 124102, mar 2005. Citado na página 29.
- NOCEK, B. et al. *Crystal structure of a putative organic hydroperoxide resistance protein with molecule of captopril bound in one of the active sites from Vibrio cholerae O1 biovar eltor str. N16961*. [S.l.]: Worldwide Protein Data Bank, 2010. Citado na página 24.
- NOWELL, P. C. Discovery of the philadelphia chromosome: a personal perspective. *Journal of Clinical Investigation*, American Society for Clinical Investigation, v. 117, n. 8, p. 2033–2035, aug 2007. Citado na página 11.
- O'HARE, T. et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the t315i mutant and overcomes mutation-based resistance. *Cancer Cell*, Elsevier BV, v. 16, n. 5, p. 401–412, nov 2009. Citado na página 22.
- OSTERMANN, F.; PRADO, S. D. Interpretações da mecânica quântica em um interferômetro virtual de mach-zehnder. *Revista brasileira de ensino de física. São Paulo. Vol. 27, n. 2 (abr./jun. 2005), p. 193-203*, SciELO Brasil, 2005. Citado na página 28.
- PAEZ-RIBES, M. et al. Targeting senescent cells in translational medicine. *EMBO Molecular Medicine*, EMBO, v. 11, n. 12, nov 2019. Citado na página 18.
- PAULI, F. P.; BARREIRO, E. J.; BARBOSA, M. L. de C. Características estruturais das proteínas cinases e seus inibidores em uso clínico. *Revista Virtual de Química*, v. 10, n. 5, 2018. Citado na página 22.
- PAULI, F. P.; BARREIRO, E. J.; BARBOSA, M. L. de C. Structural characteristics of protein kinases and their inhibitors in clinical use. *Revista Virtual de Química*, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), v. 10, n. 5, p. 1280–1303, 2018. Citado na página 8.
- PERDEW, J. P. et al. Atoms, molecules, solids, and surfaces: Applications of the generalized gradient approximation for exchange and correlation. *Physical Review B*, American Physical Society (APS), v. 46, n. 11, p. 6671–6687, sep 1992. Citado na página 30.
- PEREIRA, W. A.; NASCIMENTO, É. C. M.; MARTINS, J. B. L. Electronic and structural study of t315i mutated form in DFG-out conformation of BCR-ABL inhibitors. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Informa UK Limited, p. 1–15, jun 2021. Citado na página 14.
- PERONI, N.; MARTINS, P. S.; ANDO, A. Diversidade inter- e intra-específica e uso de análise multivariada para morfologia da mandioca (*manihot esculenta crantz*): um estudo de caso. *FapUNIFESP (SciELO)*, v. 56, n. 3, p. 587–595, jul 1999. Citado na página 73.
- PISCITANI, L. et al. Nephrotoxicity associated with novel anticancer agents (affibercept, dasatinib, nivolumab): Case series and nephrological considerations. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG, v. 21, n. 14, p. 4878, jul 2020. Citado na página 18.

- PITOŇÁK, M. et al. Benzene dimer: High-level wave function and density functional theory calculations. *Journal of Chemical Theory and Computation*, American Chemical Society (ACS), v. 4, n. 11, p. 1829–1834, oct 2008. Citado na página 29.
- POLITO, A. et al. Pharmacokinetics of oral fludrocortisone in septic shock. *British Journal of Clinical Pharmacology*, Wiley, v. 82, n. 6, p. 1509–1516, aug 2016. Citado na página 19.
- RADIVOJAC, P. et al. Gain and loss of phosphorylation sites in human cancer. *Bioinformatics*, Oxford University Press (OUP), v. 24, n. 16, p. i241–i247, aug 2008. Citado na página 3.
- RAJENDRAN, V.; GOPALAKRISHNAN, C.; SETHUMADHAVAN, R. Pathological role of a point mutation (t315i) in BCR-ABL1 protein—a computational insight. *Journal of Cellular Biochemistry*, Wiley, v. 119, n. 1, p. 918–925, aug 2017. Citado na página 49.
- RAMAKRISHNAN, C. et al. Identification of type I and type II inhibitors of c-yes kinase using in silico and experimental techniques. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Informa UK Limited, v. 36, n. 6, p. 1566–1576, jun 2017. Citado na página 15.
- RAPPE, A. K. et al. UFF, a full periodic table force field for molecular mechanics and molecular dynamics simulations. *Journal of the American Chemical Society*, American Chemical Society (ACS), v. 114, n. 25, p. 10024–10035, dec 1992. Citado na página 35.
- RATHI, A. K. et al. Piperazine derivatives for therapeutic use: a patent review (2010–present). *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, Informa UK Limited, v. 26, n. 7, p. 777–797, may 2016. Citado na página 16.
- RECKEL, S. et al. Differential signaling networks of bcr–abl p210 and p190 kinases in leukemia cells defined by functional proteomics. *Leukemia*, Springer Nature, v. 31, n. 7, p. 1502–1512, jan 2017. Citado na página 12.
- REIHER, M. (Ed.). *Atomistic Approaches in Modern Biology*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2007. Citado na página 39.
- REN, S. et al. The conservation pattern of short linear motifs is highly correlated with the function of interacting protein domains. *BMC Genomics*, Springer Nature, v. 9, n. 1, p. 452, 2008. Citado na página 4.
- ŘEZÁČ, J.; HOBZA, P. A halogen-bonding correction for the semiempirical PM6 method. *Chemical Physics Letters*, Elsevier BV, v. 506, n. 4–6, p. 286–289, apr 2011. Citado na página 34.
- ROBINSON, D. R.; WU, Y.-M.; LIN, S.-F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. *Oncogene*, Springer Nature, v. 19, n. 49, p. 5548–5557, nov 2000. Citado na página 4.
- RODRIGUES, R. P. et al. Virtual screening strategies in drug design. *Revista Virtual de Química*, Sociedade Brasileira de Química (SBQ), v. 4, n. 6, 2012. Citado na página 25.
- ROSKOSKI, R. Structure and regulation of kit protein-tyrosine kinase—the stem cell factor receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier BV, v. 338, n. 3, p. 1307–1315, dec 2005. Citado na página 17.

- ROSKOSKI, R. Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacological Research*, Elsevier BV, v. 94, p. 9–25, apr 2015. Citado na página 17.
- ROSSUM, G. V.; JR, F. L. D. *Python tutorial*. [S.l.]: Centrum voor Wiskunde en Informatica Amsterdam, 1995. v. 620. Citado na página 45.
- SABIN, J. G.; FERRÃO, M. F.; FURTADO, J. C. Análise multivariada aplicada na identificação de fármacos antidepressivos. parte ii: Análise por componentes principais (pca) e o método de classificação simca. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, SciELO Brasil, v. 40, p. 387–396, 2004. Citado na página 42.
- SANDEEP, G. et al. AUDocker LE: A GUI for virtual screening with AUTODOCK vina. *BMC Research Notes*, Springer Science and Business Media LLC, v. 4, n. 1, p. 445, 2011. Citado na página 44.
- SAUER, T.; MAJER, U. (Ed.). *David Hilbert's Lectures on the Foundations of Physics 1915-1927*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2009. Citado na página 27.
- SAWYERS, C. L. Chronic myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*, Mass Medical Soc, v. 340, n. 17, p. 1330–1340, 1999. Citado 2 vezes nas páginas 10 e 11.
- SCHEEFF, E. D.; BOURNE, P. E. Structural evolution of the protein kinase-like superfamily. *PLoS Computational Biology*, Public Library of Science (PLoS), v. 1, n. 5, p. e49, 2005. Citado na página 7.
- Schrödinger, LLC. The JyMOL molecular graphics development component, version 1.8. 2015. Citado na página 44.
- SCHULTZ, T.; RIGGIN, G. Predictive correlations for the toxicity of alkyl- and halogen-substituted phenols. *Toxicology Letters*, Elsevier BV, v. 25, n. 1, p. 47–54, apr 1985. Citado na página 121.
- SENA, M. M. d. et al. Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Química Nova*, SciELO Brasil, v. 23, n. 4, p. 547–556, 2000. Citado na página 42.
- SEVER, R.; BRUGGE, J. S. Signal transduction in cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Cold Spring Harbor Laboratory, v. 5, n. 4, p. a006098–a006098, apr 2015. Citado na página 8.
- SHAN, Y. et al. A conserved protonation-dependent switch controls drug binding in the abl kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 106, n. 1, p. 139–144, dec 2008. Citado na página 8.
- SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Química Nova*, FapUNIFESP (SciELO), v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009. Citado 2 vezes nas páginas 5 e 7.
- SONY, S. M. M.; PONNUSWAMY, M. N. Nature of interactions in nitrogen-containing heterocyclic systems: a structural database analysis. *Crystal Growth & Design*, American Chemical Society (ACS), v. 6, n. 3, p. 736–742, jan 2006. Citado na página 41.
- STEINBERG, G. D. et al. Family history and the risk of prostate cancer. *The Prostate*, Wiley, v. 17, n. 4, p. 337–347, 1990. Citado na página 1.

- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods i. method. *Journal of Computational Chemistry*, Wiley, v. 10, n. 2, p. 209–220, mar 1989. Citado na página 34.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods IV: extension of MNDO, AM1, and PM3 to more main group elements. *Journal of Molecular Modeling*, Springer Science and Business Media LLC, v. 10, n. 2, p. 155–164, apr 2004. Citado na página 33.
- STEWART, J. J. P. Optimization of parameters for semiempirical methods VI: more modifications to the NDDO approximations and re-optimization of parameters. *Journal of Molecular Modeling*, Springer Science and Business Media LLC, v. 19, n. 1, p. 1–32, nov 2012. Citado na página 33.
- STRONG, D. F.; FRYER, B. J.; KERRICH, R. Genesis of the st. lawrence fluor spar deposits as indicated by fluid inclusion, rare earth element, and isotopic data. *Economic Geology*, Society of Economic Geologists, v. 79, n. 5, p. 1142–1158, aug 1984. Citado na página 19.
- SUNG, H. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. Wiley, v. 71, n. 3, p. 209–249, feb 2021. Citado na página 1.
- SURESH, A.; GHOSH, S.; CHOPRA, D. Investigation of intermolecular interactions in fluoro/trifluoromethyl derivatives of benzoylferrocene. *Journal of Molecular Structure*, Elsevier BV, v. 1224, p. 129045, jan 2021. Citado na página 20.
- TAO, P. et al. Matrix metalloproteinase 2 inhibition: Combined quantum mechanics and molecular mechanics studies of the inhibition mechanism of (4-phenoxyphenylsulfonyl)methylthiirane and its oxirane analogue. *Biochemistry*, American Chemical Society (ACS), v. 48, n. 41, p. 9839–9847, sep 2009. Citado na página 46.
- TAYLOR, R.; KENNARD, O.; VERSICHEL, W. The geometry of the n-h...o=c hydrogen bond. 3. hydrogen-bond distances and angles. *Acta Crystallographica Section B Structural Science*, International Union of Crystallography (IUCr), v. 40, n. 3, p. 280–288, jun 1984. Citado na página 41.
- TEDASEN, A. et al. Structure-guided cancer blockade between bioactive bursehernin and proteins: Molecular docking and molecular dynamics study. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, Elsevier BV, v. 74, p. 215–224, jun 2017. Citado na página 49.
- TOLAR, J.; NEGLIA, J. P. Transplacental and other routes of cancer transmission between individuals. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health), v. 25, n. 6, p. 430–434, jun 2003. Citado na página 2.
- TONELLI, M. C. Métodos periódicos aplicados à determinação e análise de propriedades eletrônicas e elásticas em perovskitas do tipo bázro. 3 e batio. 3. Universidade Estadual Paulista (UNESP), 2006. Citado na página 30.
- TORNROTH-HORSEFIELD, S.; NEUTZE, R. Opening and closing the metabolite gate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 50, p. 19565–19566, dec 2008. Citado na página 6.

VERBITSKIY, E. V. et al. Novel fluorophores based on imidazopyrazine derivatives: Synthesis and photophysical characterization focusing on solvatochromism and sensitivity towards nitroaromatic compounds. *Dyes and Pigments*, Elsevier BV, v. 168, p. 248–256, sep 2019. Citado na página 65.

VIJAYAN, R. S. K. et al. Conformational analysis of the DFG-out kinase motif and biochemical profiling of structurally validated type II inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, American Chemical Society (ACS), v. 58, n. 1, p. 466–479, dec 2014. Citado na página 8.

VIJAYSRINIVASAN, M.; KANNAN, P.; ROY, A. Dual switchable six-ring bent-core liquid crystals with azo linkages exhibiting b1and b2mesophases. *Liquid Crystals*, Informa UK Limited, v. 39, n. 12, p. 1465–1475, dec 2012. Citado na página 41.

VINȚELER, E. et al. Conformational landscape and low lying excited states of imatinib. *Journal of Molecular Modeling*, Springer Science and Business Media LLC, v. 21, n. 4, mar 2015. Citado na página 20.

VLASTARIDIS, P. et al. Estimating the total number of phosphoproteins and phosphorylation sites in eukaryotic proteomes. *GigaScience*, Oxford University Press (OUP), v. 6, n. 2, jan 2017. Citado na página 4.

VREVEN, T.; MOROKUMA, K. Chapter 3 hybrid methods: ONIOM(QM:MM) and QM/MM. In: *Annual Reports in Computational Chemistry*. [S.l.]: Elsevier, 2006. p. 35–51. Citado na página 39.

WALTER, N. G.; OTYEPKA, M. Theoretical studies of RNA catalysis: Hybrid QM/MM methods and their comparison with MD and QM. *Methods*, Elsevier BV, v. 49, n. 2, p. 202–216, oct 2009. Citado na página 38.

WANG, J. et al. Fluorine in pharmaceutical industry: Fluorine-containing drugs introduced to the market in the last decade (2001–2011). *Chemical Reviews*, American Chemical Society (ACS), v. 114, n. 4, p. 2432–2506, dec 2013. Citado na página 20.

WANG, J. et al. Development and testing of a general amber force field. *Journal of Computational Chemistry*, Wiley, v. 25, n. 9, p. 1157–1174, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 36 e 46.

WANG, L. et al. Molecular dynamics simulations provide insights into the origin of gleevec's selectivity toward human tyrosine kinases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, Informa UK Limited, v. 37, n. 10, p. 2733–2744, nov 2018. Citado na página 8.

WILKINSON, L.; FRIENDLY, M. The history of the cluster heat map. *The American Statistician*, Informa UK Limited, v. 63, n. 2, p. 179–184, may 2009. Citado na página 42.

WISHART, D. S. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. Oxford University Press (OUP), v. 34, n. 90001, p. D668–D672, jan 2006. Citado na página 110.

WISHART, D. S. et al. DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press (OUP), v. 46, n. D1, p. D1074–D1082, nov 2017. Citado 2 vezes nas páginas xvi e 110.

YANG, M. et al. Structure-based analysis and biological characterization of imatinib derivatives reveal insights towards the inhibition of wild-type BCR-ABL and its mutants. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, Elsevier BV, v. 29, n. 24, p. 126758, dec 2019. Citado na página 16.

ZHANG, S. et al. Mycobacterium tuberculosis CRISPR/cas system csm1 holds clues to the evolutionary relationship between DNA polymerase and cyclase activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier BV, v. 170, p. 140–149, feb 2021. Citado na página 6.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. Density functional for spectroscopy: no long-range self-interaction error, good performance for rydberg and charge-transfer states, and better performance on average than b3lyp for ground states. *The Journal of Physical Chemistry A*, American Chemical Society (ACS), v. 110, n. 49, p. 13126–13130, nov 2006. Citado na página 31.

ZHAO, Y.; TRUHLAR, D. G. The m06 suite of density functionals for main group thermochemistry, thermochemical kinetics, noncovalent interactions, excited states, and transition elements: two new functionals and systematic testing of four m06-class functionals and 12 other functionals. *Theoretical Chemistry Accounts*, Springer Science and Business Media LLC, v. 120, n. 1-3, p. 215–241, jul 2007. Citado na página 32.

ZHOU, Y. et al. Next generation of fluorine-containing pharmaceuticals, compounds currently in phase II–III clinical trials of major pharmaceutical companies: New structural trends and therapeutic areas. *Chemical Reviews*, American Chemical Society (ACS), v. 116, n. 2, p. 422–518, jan 2016. Citado na página 20.

A Anexos

A.1 Cargas atômicas ChelpG

Tabela 21 – Anexo A, Cargas atômicas ChelpG para o imatinibe e dasatinibe.

Imatinibe		Dasatinibe	
1 C	0,06	1 Cl	-0,12
2 C	-0,12	2 S	-0,06
3 C	-0,08	3 O	-0,70
4 C	-0,39	4 O	-0,55
5 C	0,54	5 N	-0,54
6 N	-0,66	6 N	-0,30
7 C	0,69	7 N	-0,75
8 O	-0,57	8 N	-0,74
9 C	-0,10	9 N	-0,78
10 C	-0,07	10 N	-0,53
11 C	-0,26	11 N	-0,67
12 C	0,32	12 C	0,12
13 C	-0,11	13 C	-0,02
14 N	-0,46	14 C	0,05
15 C	0,31	15 C	0,12
16 C	0,21	16 C	0,09
17 N	-0,52	17 C	0,71
18 C	-0,05	18 C	0,40
19 C	0,16	19 C	-0,74
20 C	0,31	20 C	0,87
21 C	-0,26	21 C	0,77
22 C	0,00	22 C	-0,29
23 C	-0,48	23 C	0,68
24 C	0,39	24 C	-0,32
25 N	-0,67	25 C	0,33
26 C	0,91	26 C	0,18
27 N	-0,75	27 C	-0,02
28 C	0,43	28 C	0,83
29 C	-0,42	29 C	-0,01
30 C	0,42	30 C	-0,14
31 C	-0,24	31 C	-0,02
32 C	0,17	32 C	-0,09
33 C	-0,38	33 C	-0,13
34 C	0,44	34 H	0,06
35 N	-0,62	35 H	0,01
36 C	0,42	36 H	0,06
37 N	-0,50	37 H	0,08
38 H	-0,01	38 H	0,04
39 H	0,04	39 H	0,03
40 H	-0,01	40 H	0,03
41 H	0,11	41 H	0,04
42 H	0,17	42 H	0,00

Tabela 22 – Anexo A, continuação das Cargas atômicas ChelpG para o imatinibe e dasatinibe.

Imatinibe		Dasatinibe	
43 H	0,27	43 H	0,05
44 H	0,11	44 H	-0,04
45 H	0,12	45 H	0,02
46 H	0,07	46 H	0,21
47 H	0,04	47 H	0,39
48 H	-0,03	48 H	0,36
49 H	-0,06	49 H	0,07
50 H	-0,02	50 H	0,08
51 H	-0,02	51 H	0,09
52 H	0,07	52 H	0,10
53 H	0,05	53 H	0,30
54 H	0,07	54 H	0,12
55 H	0,02	55 H	0,02
56 H	-0,01	56 H	0,05
57 H	-0,02	57 H	0,00
58 H	-0,06	58 H	0,11
59 H	0,12	59 H	0,11
60 H	0,08		
61 H	0,23		
62 H	0,32		
63 H	0,04		
64 H	0,12		
65 H	0,05		
66 H	0,13		
67 H	0,00		
68 H	-0,02		

Tabela 23 – Anexo A, Cargas atômicas ChelpG para o nilotinibe e ponatinibe.

Nilotinibe		Ponatinibe	
1 C	-0,17	1 C	-0,01
2 C	0,04	2 C	0,06
3 C	-0,16	3 C	-0,18
4 C	-0,15	4 C	-0,10
5 C	-0,10	5 C	-0,10
6 C	-0,16	6 C	0,71
7 C	0,33	7 O	-0,55
8 N	-0,75	8 N	-0,65
9 C	1,02	9 C	0,45
10 N	-0,61	10 C	-0,32
11 C	0,35	11 C	-0,02
12 C	-0,51	12 C	-0,01
13 C	0,58	13 C	0,19
14 N	-0,78	14 N	-0,27
15 C	-0,27	15 C	-0,26
16 C	0,19	16 C	0,44
17 C	-0,36	17 N	-0,29
18 C	0,46	18 C	-0,22
19 N	-0,64	19 C	0,11
20 C	0,39	20 C	0,11
21 C	0,73	21 C	-0,10
22 O	-0,54	22 C	0,71
23 N	-0,70	23 F	-0,26
24 C	0,52	24 F	-0,25
25 C	-0,35	25 F	-0,23
26 C	-0,03	26 C	-0,25
27 C	-0,27	27 C	-0,12
28 C	0,23	28 C	0,16
29 C	-0,30	29 C	-0,17
30 N	-0,01	30 C	0,02
31 C	-0,41	31 C	-0,15
32 C	0,53	32 C	0,17
33 N	-0,61	33 N	-0,61
34 C	0,23	34 C	0,31
35 C	-0,42	35 C	-0,07
36 C	0,85	36 C	-0,25
37 F	-0,29	37 C	0,26
38 F	-0,28	38 N	-0,50
39 F	-0,28	39 N	0,44
40 H	0,05	40 H	0,03
41 H	0,08	41 H	0,01
42 H	0,06	42 H	0,00

Tabela 24 – Anexo A, continuação das cargas atômicas ChelpG para o nilotinibe e ponatinibe.

Nilotinibe		Ponatinibe	
43 H	0,11	43 H	0,11
44 H	0,11	44 H	0,11
45 H	0,10	45 H	0,28
46 H	0,37	46 H	0,16
47 H	0,07	47 H	0,05
48 H	0,16	48 H	0,03
49 H	0,05	49 H	-0,02
50 H	0,13	50 H	0,10
51 H	0,00	51 H	0,08
52 H	0,02	52 H	-0,09
53 H	0,31	53 H	-0,04
54 H	0,17	54 H	0,06
55 H	0,15	55 H	0,08
56 H	0,18	56 H	0,11
57 H	0,20	57 H	-0,01
58 H	0,07	58 H	0,02
59 H	0,12	59 H	-0,01
60 H	0,12	60 H	0,00
61 H	0,09	61 H	0,19
		62 H	0,11
		63 H	0,11
		64 H	0,13
		65 H	0,13
		66 H	0,08