

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**WASHINGTON DE ALMEIDA PEREIRA**

***DOCKING* DE FRAGMENTOS APLICADOS NO  
DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES TIROSINA QUINASE EM  
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

**Alfenas - MG**

**2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**WASHINGTON DE ALMEIDA PEREIRA**

***DOCKING* DE FRAGMENTOS APLICADOS NO  
DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES TIROSINA QUINASE EM  
LEUCEMIA MIELOIDE CRÔNICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

**Área de concentração:** Físico-Química.

**Orientador:** Prof. Dr. Ihosvany Camps Rodriguez

**Alfenas - MG**

**2015**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Perreira, Washington de Almeida.

*Docking* de fragmentos aplicados no desenvolvimento de inibidores Tirosina Quinase em Leucemia Mieloide Crônica Perreira. / Washington de Almeida Perreira. -- Alfenas/MG, 2015. 127 f.

Orientador: Ihosvany Camps Rodrigues.  
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2015.  
Bibliografia.

1. Leucemia Mieloide Crônica BCR-ABL Positiva. 2. Proteínas Tirosina Quinase. 3. Proteínas de Ancoragem à Quinase A. I. Rodrigues, Ihosvany Camps. II. Título.

CDD-541.3

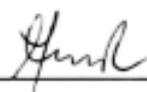
**Washington Almeida Pereira**

**“DOCKING DE FRAGMENTOS APLICADOS NO  
DESENVOLVIMENTO DE INIBIDORES TIROSINA QUÍNASE EM  
LEUCEMIA MIELOÍDE CRÔNICA”**

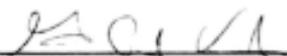
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovado em: 15/05/2015

Prof. Dr. Prof. Ihosvany Camps Rodriguez  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Márcia Paranho Veloso  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –  
UNIFAL-MG

Assinatura:  \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Helen Andrade Arcuri – UNESP  
Instituição: UNESP

Assinatura:  \_\_\_\_\_

*A minha mãe e a irmã.*

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Dr. Ihosvany Camps Rodriguez, o fato de me ter dado a oportunidade de realizar este trabalho. Agradeço-lhe a paciência, confiança, amizade e principalmente as suas preciosas críticas e sugestões durante o processo.

Ao corpo docente, discente, técnico e administrativo do Instituto de Química de Ciências Exatas da UNIFAL-MG.

Ao CNPq e Fapemig pelo suporte financeiro.

E a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho.

*“Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e lança sobre ele toda a sua força de sua alma, todo universo conspira a seu favor”*  
*(Johann Goethe)*

## RESUMO

A Leucemia Mieloide Crônica é uma doença hematopoiética associada a células estaminais que se manifesta principalmente com a expansão mielopoese. O cromossomo Philadelphia positivo  $PH^+$  é gerado por uma translocação recíproca (9, 22) (Q34, Q11) e pela fusão entre o gene Abelson, essa fusão codifica e desregula a proteína Tirosina Quinase, o suficiente para a iniciação e manutenção da doença. Inibidores como o Mesilato de Imatinibe revolucionou o tratamento de pacientes com leucemia mieloide crônica. As mutações no domínio de quinase do Bcr-Abl, constituindo o mecanismo mais frequente de resistência adquirida para a terapia com inibidores da tirosina quinase. A mutação T315I atualmente é maior desafio para manutenção da Leucemia mieloide crônica na fase crônica, uma vez que os inibidores de Tirosina Quinase atualmente encontrados no mercado são incapazes de mantê-la na forma controlada. Métodos computacionais baseados em fragmentos moleculares surgiram como uma nova estratégia para a descoberta de fármacos. Foi usado o programa *LigBuilder* para fazer geração das novas moléculas candidatas a fármacos, usando dois métodos o *Grow* e *Linker*, as moléculas foram selecionadas por meio de *docking* com programa *Glide* da *suite Maestro* em cada mutação selecionadas da tirosina quinase, usando os melhores *Gscores*, para cada mutação, posteriormente foram submetidas ao programa *QikProp*, que tem a função comparar as moléculas com banco de dados de fármacos conhecidos. No último passo, é feito o estudo do *docking* das moléculas selecionadas no sítio usando os protocolos de Induced Fit *docking*, que realiza o *docking* flexível-flexível, ou seja, ligante flexível e sítio de ligação da proteína flexível.

**PALAVRAS-CHAVE:** Leucemia Mieloide Crônica. Tirosina Quinase. *Docking* de Fragmentos.

## ABSTRACT

Chronic myeloid leukemia is associated with hematopoietic stem cell disorder that manifests itself primarily with myelopoiesis the expansion. The Philadelphia chromosome positive PH is generated by a reciprocal translocation (9, 22) (q34, q11), and by the merger of the Abelson gene fusion that encodes and deregulates quinase Tyrosine protein enough for the initiation and maintenance of disease. Tyrosine quinase provides a therapeutic target, which used to inhibition of this protein Known as tyrosine Quinase. Inhibitors such as Imatinibe mesylate has revolutionized the treatment of patients with chronic myeloid leukemia. Mutations in domain quinase Bcr-Abl, constituting the most frequent mechanism acquired resistance to therapy with tyrosine quinase. The T315I mutation and currently biggest challenge for maintenance of chronic myeloid leukemia in chronic phase, since inhibitors of tyrosine Quinase currently found on the market are unable to it maintaining it in a controlled manner, leading the patient achieved. Methods based on fragment docking emerged as a new strategy for drug discovery. evaluating all possible input locations and connecting the inhibitor and protein, and thus may provide a new molecule will be able to make effective inhibition. The docking studies are divided into three parts. At first, the fragments are placed to interact within the possible interaction sites. In the second step, the molecules are created from the best fragments which interacted with a particular website. In the last step, the study of molecules created in the docking site using the protocols of Induced Fit Docking which performs flexible, flexible docking ie flexible linker protein is made flexible. **KEYWORDS:**

**KEYWORDS:**Chronic Myeloid Leukemia. Tyrosine Quinase. *docking* of fragments

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABL	-Abelson
AGs	-Algoritmos Genéticos
Bcr	-Breakpoint Cluster Region
CB	-Crise Blástica
CBL	-Crise Blástica linfoide
CBM	-Crise Blástica Mieloide
DK	-Domínio Quinase
EGF	-Fator Crescimento Epidérmico
EphA	-EphrinA
EphB	-EphrinB
FAC	-Fase Acelerada
FAG	-Fase Aguda
FC	-Fase Crônica
FEP	-Perturbação De Energia Livre
GTP	-Guanina Trifosfato
IGF	-fator De crescimento Semelhante Insulina
JAK	-Janus Quinase
LLA	-Leucemia Linfoide Aguda
LMA	-Leucemias Mieloide Agudas
LMC	-Leucemia Mieloide Crônica
MAPK	-Proteínas Quinases Ativada Por Mitogênica
m-Bcr	-Região Menor Breakpoint Cluster
MoMuLV	-vírus da Leucemia Murina
OMS	-Organização Mundial Da Saúde
PDGF	-Fator De Crescimento Derivado de Plaquetas
Ph <sup>+</sup>	-Cromossomo Filadélfia Positivo
RTKs	-Receptores de Tirosina Quinase
SCF	-Fator De Células Tronco
STAT	-Transdutor De Sinal e Ativador De Transcrição
TCHP	-Transplante De Células Hematopoietical Progenitoras
TK	-Tirosina Quinase
TKI	-Inibidores De Tirosina Quinase
TMO	-Transplante De Medula Óssea
VEGF	-Fator De Crescimento Do Endotélio Vascular

## Lista de Figuras

2.1	- Autopsia de um paciente com sintomas de LMC, realizada no início século XIX. Fonte: (THOMAS, 2013) .....	16
2.2	- Cronograma dos principais fatos históricos da LMC. Fonte:(HUNTER, 2007). ....	17
2.3	- Translocação entre os cromossomos 9 e 22 BCR-ABL. Fonte: (NOWELL, 2007). .	18
2.4	- Principais sintomas atribuídos a LMC. Fonte: (MALONEY, 1987) .....	20
2.5	- Evolução do tratamento da doença. Fonte: (HEHLMA,2007). .....	27
2.6	- Os genes Bcr-Abl e suas proteínas (LAURENT et al., 2001). .....	29
2.7	- Translocação do cromossomo Philadelphia. Fonte: (TRELA, 2014). .....	30
2.8	- Representação cascata quinase MAPK quinase. Fonte: (SILVA et al., 2009). ....	33
2.9	- As possíveis vias metabólicas da leucemia mieloide crônica. Fonte: Banco de dados KEGG. ....	34
2.10	- A proteína Ras recebe o GTP e troca por GDT. Fonte: (DOWNWARD, 2003). ....	35
2.11	- Sinal de transdução proteína STAT. Fonte: (SHUA; LIU, 2003) .....	38
2.12	- Principais mutações encontrada no Bcr-Abl. Fonte: (KAGITA et al., 2014) .....	40
2.13	- Mutações mais frequentes. Fonte:(STOFFREGEN,2005) .....	41
2.14	- ATP no sítio de ligação da quinase. Fonte:(SILVA et al., 2009). .....	43
2.15	- Mecanismo de inibição tirosina, transferência de fosfato. Fonte: (DRUKER, 2008). ..	44
2.16	- Interação entre o IM e Bcr-Abl(3QRI). Fonte: (Do autor). ....	45
2.17	- Interação entre o Dasatinibe o Bcr-Abl(3QRI). Fonte: (Do autor). ....	48
2.18	- Nilotinibe e o Bcr-Abl(código 3QRI). Fonte: (Do autor) .....	50
2.19	- Interação entre o Ponatinibe e o Bcr-Abl(3QRI). Fonte: (Do Autor). ....	51
2.20	- Estrutura da ligação do ponatinibe. Fonte: (ZHOU et al., 2011). .....	52
3.1	- Estrutura de novos candidatos a fármacos fonte: Do autor. ....	55
3.2	- <i>linker</i> e crescimento. Fonte:(WANG; GAO; LAI, 2000). .....	56
3.3	- O método de Linker. Fonte: (WANG; GAO; LAI, 2000). .....	59
3.4	- Método de construção. Fonte: (WANG; GAO; LAI, 2000). ....	61
3.5	- Exemplo do fluxograma do AG. ....	63
3.6	- Alinhamento das sequências das proteína 1OPJ e 3QRI. Fonte: DO AUTOR .....	66
3.7	- Alinhamento estrutural das proteínas 1OPJ e 3QRI. Fonte: DO AUTOR. ....	67
3.8	- Procedimento para realizar as mutações. Fonte: DO AUTOR .....	67
3.9	- Preparando a proteína para a realização do <i>docking</i> . Fonte: DO AUTOR .....	68
3.10	- Delimitação da proteína buscando o melhor encaixe. Fonte: DO AUTOR. ....	69
3.11	- Diversidade das moléculas. Fonte: DO AUTOR .....	71
4.1	- Gráficos dos principais TKI em função GScore. Fonte: DO AUTOR. ....	74
4.2	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 680 e a 1OPJ na forma selvagem, A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a 1OPJ na forma selvagem. Fonte: DO AUTOR .....	76
4.3	- Na figura (a) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação T315I. Na figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação T315I. Fonte: DO AUTOR .....	79
4.4	- Molécula 781 em azul e molécula do ponatinibe em verde, dentro do bolso de ligação da T3151. Fonte: DO AUTOR .....	80

4.5	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 688 e a mutação T315A. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe a mutação T315A. Fonte: DO AUTOR . . . . .	81
4.6	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 723 e a mutação M244V. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe e a mutação M244V. Fonte: DO AUTOR . . . . .	84
4.7	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 732 e a mutação L248R. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação L248R. Fonte: DO AUTOR . . . . .	86
4.8	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 732 e a mutação F359C. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação F359C. Fonte: DO AUTOR . . . . .	88
4.9	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação G250E. - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Imatinibe e a mutação G250E. Fonte: DO AUTOR . . . . .	89
4.10	- Interação entre a molécula 681 e a mutação Y253H. Fonte: DO AUTOR . . . . .	90
4.11	- A figura (a) Interação entre a molécula 732 e a mutação Q252H. - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Imatinibe e a mutação Q252H. Fonte: DO AUTOR . . . . .	91
4.12	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 781 e a mutação E255K. - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Imatinibe e a mutação E255K. Fonte: DO AUTOR . . . . .	93
4.13	- Em (a) Interação entre a molécula 801 e a mutação F317L. - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe e a mutação F317L. Fonte: DO AUTOR . . . . .	95
4.14	- Na figura (a) mostra a Interação entre a molécula 781 e a mutação E355G. - Na figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe e a mutação E355G. Fonte: DO AUTOR . . . . .	97
4.15	- Na figura (a) mostra a Interação entre a molécula 781 e a mutação V299L. - Na figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação V299L. Fonte: DO AUTOR . . . . .	99
4.16	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação H396R. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação H396R. Fonte: DO AUTOR . . . . .	101
4.17	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula Imatinibe e a mutação A356N. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação A356N. Fonte: DO AUTOR . . . . .	102
4.18	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula Imatinibe e a mutação A356N. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação A356N. Fonte: DO AUTOR . . . . .	104
4.19	- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula Imatinibe e a mutação L387M. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação L387M. Fonte: DO AUTOR . . . . .	106
4.20	- Gráfico da melhor molécula <i>GScore</i> de cada mutação e o melhor TKI. Fonte: DO AUTOR . . . . .	110
4.21	- Numero de que cada molécula obteve o melhor <i>GScore</i> . Fonte: DO AUTOR . . . . .	111
4.22	- IFD da molécula 688 comparada com os inibidores TKI. Fonte: DO AUTOR . . . . .	112

## Lista de Tabelas

2.1	Porcentagem de casos de LMC dividida por faixas etárias da população mundial. . . .	23
2.2	Estudo feito no Brasil medindo a eficácia do fármaco Mesilato de Imatinibe, frente às três fases da leucemia Mieloide crônica. Fonte:(AQUINO; GONÇALVES; SILVA, 2009) . . . . .	46
4.1	Resultado de <i>docking</i> molecular feito com programa <i>Glide</i> , entre os principais fármacos encontrados no mercado e as diferentes variações da tirosina quinase. Os valores numéricos representam as energias de interação entre a proteína alvo e ligante, valores expressos em Kcal/mol. Fonte: DO AUTOR. . . . .	73
4.2	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas proteína selvagem 1OPJ. Fonte: DO AUTOR. . . . .	75
4.3	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas proteína mutada T315I. Fonte: DO AUTOR. . . . .	78
4.4	- Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas proteína mutada T315A. Fonte: DO AUTOR. . . . .	80
4.5	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas proteína mutada M244V. Fonte: DO AUTOR. . . . .	83
4.6	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação L248R. Fonte: DO AUTOR . . . . .	85
4.7	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação F359C.Fonte: DO AUTOR	85
4.8	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com a mutação G250E.Fonte: DO AUTOR. . . . .	87
4.9	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação Y253H.Fonte: DO AUTOR. . . . .	87
4.10	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação Q252H.Fonte: DO AUTOR. . . . .	92
4.11	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação E255K.Fonte: DO AUTOR. . . . .	92
4.12	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação F317L.Fonte: DO AUTOR	94
4.13	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação E355G.Fonte: DO AUTOR. . . . .	96
4.14	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação E355G.Fonte: DO AUTOR. . . . .	98
4.15	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com a mutação H396R.Fonte: DO AUTOR. . . . .	98
4.16	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação A356N.Fonte: DO AUTOR. . . . .	100
4.17	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com mutação M351T.Fonte: DO AUTOR. . . . .	103
4.18	Valores do <i>GScore</i> do <i>docking</i> das moléculas com a mutação L387M.Fonte: DO AUTOR. . . . .	105
4.19	Resultado da primeira parte do teste QikProp com as principais moléculas geradas.Fonte: DO AUTOR. . . . .	107

4.20	Resultado da segunda e última parte do teste QikProp com as principais moléculas geradas.Fonte: DO AUTOR .....	108
4.21	.....	109
A.1	Mutações induzidas na 1OPJ referente a 3QRI código do PDB Fonte: Do autor .....	123
A.2	Simbologia e nomenclatura dos aminoácidos. ....	124

## Sumário

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
2	Revisão da Literatura .....	15
2.1	CONTEXTO HISTÓRICO .....	15
2.2	FASES DA DOENÇA .....	18
2.2.1	Fase crônica .....	19
2.2.2	Fase acelerada .....	19
2.2.3	Crise blástica .....	20
2.3	MEDULA ÓSSEA .....	21
2.4	NO MUNDO .....	22
2.5	ACHADOS LABORATORIAIS .....	23
2.6	CAUSAS .....	24
2.7	TRATAMENTO .....	24
2.8	ABL .....	27
2.9	BCR .....	28
2.10	BCR-ABL .....	28
2.11	TIROSINA QUINASE .....	29
2.12	VIAS DE SINALIZAÇÃO .....	33
2.12.1	Via de Sinalização Ras .....	35
2.12.2	MAP Quinase .....	36
2.12.3	JAK Quinases .....	36
2.13	DOMÍNIO QUINASE .....	38
2.14	MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES NO DOMÍNIO QUINASE .....	39
2.15	T315I .....	40
2.16	INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE .....	43
2.16.1	Mesilato de Imatinibe .....	44
2.16.2	Dasatinibe .....	47
2.16.3	Nilotinibe .....	48
2.16.4	Ponatinibe .....	51
3	<b>MÉTODOS E MATERIAIS</b> .....	53
3.1	MÉTODOS .....	53
3.2	<i>DOCKING</i> .....	55
3.2.1	<i>Docking</i> de fragmentos .....	57
3.2.2	<i>Builder</i> (Linker) .....	58
3.2.3	<i>Builder</i> (Construção) .....	60
3.3	ALGORÍTIMO GENÉTICO .....	62
3.4	FUNÇÃO DE PONTUAÇÃO (GScore) .....	63
3.5	Propriedades ADME - QIKPROP .....	64
3.6	MATERIAL .....	65
3.6.1	Busca das estruturas cristalográfica da tirosina quinase .....	65
3.7	ARQUITETANDO AS MUTAÇÕES NA TIROSINA QUINASE .....	66
3.8	PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA .....	68
3.9	<i>GRID BOX</i> .....	68

3.10	GERANDO MOLÉCULAS USANDO O <i>DOCKING</i> DE FRAGMENTOS . . . . .	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO . . . . .	72
4.1	<i>DOCKING</i> ENTRE A PROTEÍNA SELVAGEM E MUTADA COM OS PRINCIPAIS FÁRMACOS . . . . .	72
4.2	<i>DOCKING</i> DAS MOLÉCULAS COM PROTEÍNA NA FORMA SELVAGEM E AS 16 MUTAÇÕES MAIS CITADAS NA LITERATURA. . . . .	75
5	CONCLUSÕES . . . . .	114
	Referências Bibliográficas . . . . .	115
	Anexo A – SIMBOLOGIA E NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS . . . . .	123

## 1 INTRODUÇÃO

As primeiras descrições conhecidas de cânceres apareceram em sete papiros, descobertos e decifrados no final do século XIX. O documento se refere aos povos Egípcios, escrito por volta de 1600 aC. Os documento relatam que os egípcios já diferenciavam o câncer benigno do câncer maligno. Os tratamentos eram baseados na farmacologia conhecida da época: cirurgias e algum tipo curandeirismo. A denominação da palavra "câncer" foi atribuída ao grego Hipócrates, a palavra deriva do grego "karkinoma" (carcinoma) por causa de um tumor que se parecia com um caranguejo (karkinoma" é a palavra grega para "caranguejo) <sup>1</sup>.

O câncer é uma das principais causas de óbitos na história da humanidade. Atualmente, é responsável por 13% das mortes, por ano, em todo o mundo. Nas últimas décadas, o câncer tornou-se um problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, terá 27 milhões de pessoas com câncer, com mortalidade de pessoas na casa dos 17 milhões, sendo a maior ocorrência em países de renda baixa e média. No Brasil, as previsões para os próximos anos, são de 257.870 novos casos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino (BOECHAT et al., 2013).

Dentre os diversos tipos de cânceres encontrados na literatura, alguns têm papel destaque devido à sua complexidade e sua alta incidência, entres eles, a Leucemia. A Leucemia é uma doença maligna dos glóbulos brancos (leucócitos), geralmente de origem desconhecida. Tem como principal característica o acúmulo de células jovens anormais na medula ossea, que substituem as células sanguíneas normais. No Brasil, as estimativas de novos casos são de: 11.370, sendo 5.050 homens e 4.320 mulheres e o número de mortes: 6.187, sendo 3.277 homens e 2.910 mulheres. <sup>2</sup>

A leucemia Mieloide crônica (LMC) é uma doença proliferativa do sistema hemato-poiético, caracterizada pela expansão clonal de uma célula tronco primitiva e pluripotente que tem a capacidade de se diferenciar em células mieloides (BARBOZA et al., 2000). É uma das

---

<sup>1</sup><http://training.seer.cancer.gov/disease/history/>. Acesso em: 24, out.2014

<sup>2</sup><http://www.inca.gov.br>. Acessado em novembro/2014

raras neoplasias humanas onde há lesão genética específica (SOVERINI et al., 2011). A doença é causada pela fusão oncogênese Bcr-abl resultante recíproca da translocação cromossômica (9; 22). a ponta desses genes se altera entre eles criando um novo gene quimérico que codifica proteína tirosina quinase Bcr-Abl responsável pela LMC, estando presente em mais de 90% dos adultos diagnosticados com essa malignidade, esse gene híbrido recebe o nome de cromossomo Filadélfia positivo( $\text{Ph}^+$ )(BAGG, 2002). Constitucionalmente, esses genes Bcr e Abl tem o papel regular atividade da tirosina quinase, entretanto a fosforilação desregulada proteína tirosina quinase influi nas atividades intracelulares como fator de crescimento, diferenciação celular, aumentando tempo de sobrevivência das células hematopoéticas (RAY et al., 2007).

O Bcr-Abl tirosina-quinase é uma quinase constitutivamente ativa que funciona por ligação a ATP e a transferência de um grupo fosfato do ATP para resíduos de tirosina em vários substratos, que ativa varias proteínas quinases formando uma cascata induzindo a divisão celular. Esta atividade faz com que o excesso de proliferação de células Mieloide, que é característica da LMC (ZHU; QIAN, 2014).

A LMC pode ser dividida em três fases: crônica, acelerada e blástica. Atualmente, o principal tratamento e o mais utilizado por pacientes do mundo inteiro com LMC é Mesilato de Imatinibe. O fármaco é um inibidor seletivo de tirosina quinase Bcr-Abl sendo que a função do Imatinibe é bloquear ligação da ATP tirosina quinase Bcr-Abl, inibindo assim, a atividade da quinase. (ZHU; QIAN, 2014). Devido a alguns fatores como a intolerância ao medicamento e mutações envolvendo a tirosina quinase foi lançados no mercado a segunda linha de inibidores de tirosina quinase (TKI), os principais inibidores são: Dasatinibe, Nilotinibe e Ponatinibe. Esses fármacos têm demonstrado eficácia no controle de algumas mutações resistente ao tratamento de primeira linha (HAMERSCHLAK et al., 2014).

## 2 Revisão da Literatura

Embora a história da Leucemia inicialmente tivesse poucos personagens principais, a sua descoberta não podia ser atribuída a um único personagem.

### 2.1 CONTEXTO HISTÓRICO

Em 1825, a literatura francesa descreve um caso de uma mulher de 63 anos de idade, que em sua autópsia foi encontrado um grande aumento no tamanho do baço e do fígado; o baço era vinte vezes maior que o normal e seu sangue era grosso, descrito como mingau mais parecido com pus e até esse momento nenhum nome foi atribuído a doença. John Hughes Bennett que estudou em Paris com Paulo Donnea, o fundador da microscopia clínica francesa, observou, em 1839, outro caso de uma mulher de 44 anos que morreu com abrupto aumento no baço e fígado e seu sangue contendo mais da metade das células que pareceram ser "glóbulos brancos". Em Novembro de 1844, um segundo paciente, um homem de 28 anos, com características semelhantes foi admitido no hospital sob os cuidados do Sir Robert Christison, convencido de que o estado patológico interno era semelhante nos dois pacientes. Ele previu um desfecho fatal, como provou ser o caso em algumas semanas depois. Bennett, que havia se interessado pelo caso, pediu permissão para realizar uma autópsia, e seu relatório foi publicado no dia 19 de março, no Jornal Médico de Edinburgh. O título de seu artigo era "caso de hipertrofia do baço e do fígado em que a morte decorreu de supuração de sangue" no ano de 1847, (GEARY, 2000).

Em 1870, Ernst Neumann suspeita que a medula óssea seja um importante local para formação das células sanguíneas, quando observou uma autópsia em um paciente que morreu de leucemia, constatou que medula óssea desse paciente apresentava uma cor muito diferente da medula óssea de um indivíduo saudável. A aparência da medula do leucêmico era de cor verde

indo para amarelo "sujo"(MAELE, 2011).



Figura 2.1 – Autopsia de um paciente com sintomas de LMC, realizada no início século XIX.  
Fonte: (THOMAS, 2013)

No mesmo ano de 1847, Robert Virchow, um graduado com 24 anos de idade da Faculdade de Medicina do Exército de Berlim, estudando a patologia de flebite, encontrou seu primeiro caso de leucemia Mieloide crônica (LMC). Uma mulher de 50 anos foi admitida no Hospital em Berlim queixando-se de fadiga, hemorragias nasais e inchaço das pernas e abdômen. Após sua morte cerca de quatro meses depois, Virchow realizou a autópsia e observou que houve alargamento do baço. Em todos os lugares nos vasos sanguíneos uma massa muito parecida com pus foi encontrada”. Seu relato acerca desse caso foi publicado apenas cinco semanas depois Bennett. Virchow, entretanto, descreveu os núcleos das células predominantes no seu caso como tendo várias formas”. Virchow percebeu que poderia ter vários tipos de leucemia; ele usou o termo *”Weisses Blut”* para descrever a aparência incomum do sangue de seus pacientes e a inversão de proporção habitual de vermelho de células brancas ou incolores. Virchow relatou o seu segundo caso e pela primeira vez usou o nome *”leukämie”*(leucemia) (o nome leucemia é uma combinação das palavras gregas *”leukos”*e *”Heima”*, que significa

”sangue branco”) (THOMAS, 2013; CLARKSON et al., 2003)

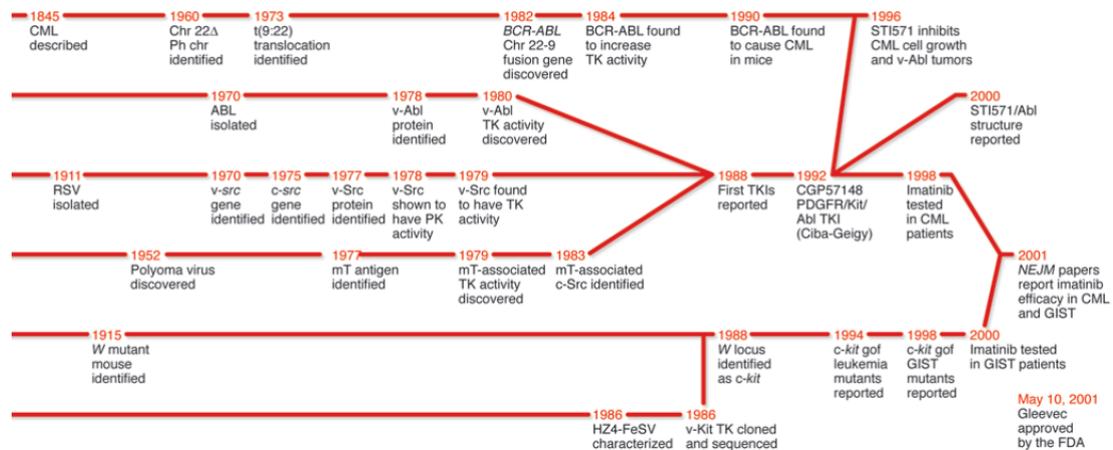


Figura 2.2 – - Cronograma dos principais fatos históricos da LMC.

Fonte:(HUNTER, 2007).

No entanto, em 1868, Ernst Christian Neumann (1834-1918), um patologista alemão, propôs o conceito de que as células do sangue são formadas na medula óssea e que alguns casos de leucemia se originavam originado na medula óssea, e não no baço. Subsequentemente, Neumann publicou um extenso artigo sobre a diferença celular e os componentes da medula óssea, O que ele considerava ser o local ”célula ancestral”, o que dá origem as células sanguíneas. Paul Ehrlich mais tarde (1880), classificou como leucemias em subtipos Mieloide e linfoide e endossando a noção de uma célula-tronco comum que deu origem as linhagens celulares (TEFFERI, 2008).

Nos anos de 1970 a 1980, a investigação de retrovírus levou a grandes avanços na compreensão das malignidades humanas. Estes estudos revelaram que as mutações em genes celulares normais podem ser oncogena<sup>1</sup>. Por exemplo, o Vírus da leucemia murina do Abelson (Abl), inicialmente descrito no ano de 1970, levou a identificação do gene v-Abl, c-abl. Reconheceu-se que c-Abl, que normalmente reside no braço longo do cromossomo 9, e se transloca para o braço do cromossomo 22 nos pacientes com leucemia mieloide crônica. Como os pontos de quebra no cromossomo são agrupados em um região relativamente pequena, esta

<sup>1</sup>**Oncogene** é a denominação dada aos genes relacionados com o surgimento de tumores, sejam malignos ou benignos, bem como genes que quando deixam de funcionar normalmente, transformam uma célula normal numa célula cancerosa

região recebe o nome de região *Breakpoint Cluster Region* (Bcr) (DRUKER, 2008; HUNTER, 2007).

Houve Pouco progresso na compreensão LMC até o advento do cariótipo de alta resolução o que permitiu que Peter Nowell e David Hungerford, em 1960, identificassem uma anormalidade cromossômica consistente nas explosões Mieloide, isto é, uma pequena troca nas extremidades dos cromossomos, que ficou conhecido como o cromossomo Philadelphia. Dez anos depois, Janet Rowley, usando uma técnica recém-desenvolvida, cromossomo de bandagem, deduziu que de fato é devido a uma translocação recíproca (9; 22) (q34; q11), em que a extremidade do braço longo do cromossomo 9 está se transferindo para a ponta do braço longo do cromossomo 22 (HUNTER, 2007) (VERFAILLIE et al., 2011).

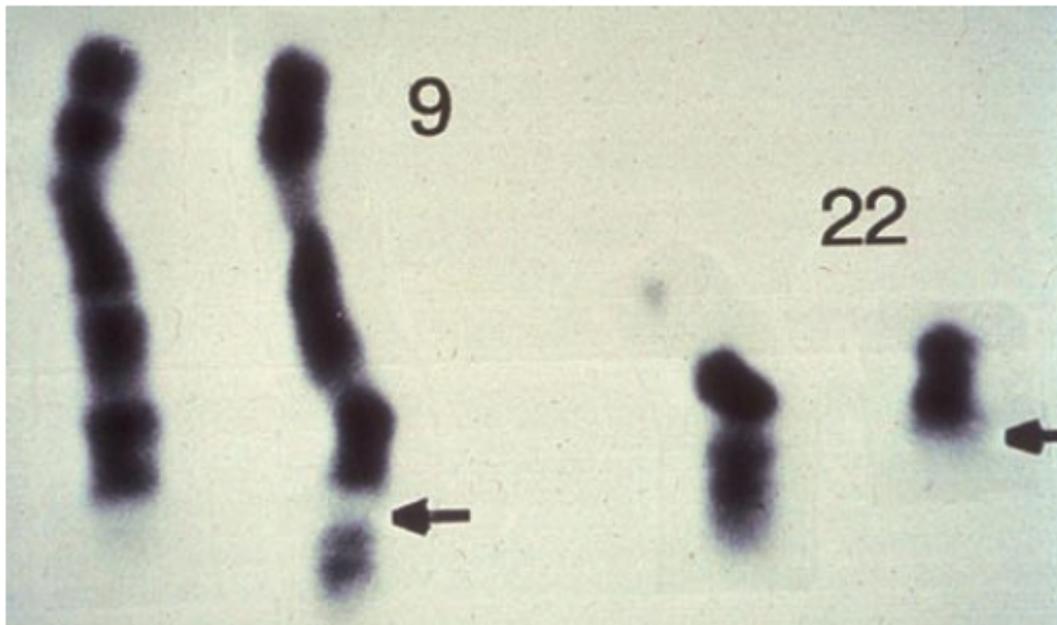


Figura 2.3 – - Translocação entre os cromossomos 9 e 22 BCR-ABL.

Fonte: (NOWELL, 2007).

## 2.2 FASES DA DOENÇA

A doença é comumente diagnosticada por acidente e muitos pacientes procuram atendimento médico por outros motivos ou até mesmo em exames de rotinas como hemogramas ou *checkup*, evidenciando o caráter silencioso da primeira fase da neoplasia a fase crônica (HAMERSCHLAK et al., 2014).

### 2.2.1 Fase crônica

No início da doença, a primeira fase, é conhecida como a fase crônica (FC), caracterizada por uma excessiva proliferação da linhagem mieloide aparentemente “benigna”, de 20% a 40% dos pacientes são assintomáticos, principalmente no início da fase crônica. Com o passar dos meses ou até de anos começam a aparecer sintomas como fadiga, fraqueza, dores de cabeça, irritabilidade, febre, suor noturno e perda de peso, como mostrado na figura 2.4 os principais sintomas associados a esta fase (BAGG, 2002).

A doença é comumente diagnosticada por acidente e muitos pacientes procuram atendimento médico por outros motivos ou até mesmo em exames de rotinas como hemogramas ou *checkup*, evidenciando o caráter silencioso da primeira fase da neoplasia a fase crônica (HAMERSCHLAK et al., 2014).

Clinicamente a FC é muito bem definida, suas características são de esplenomegalia<sup>2</sup> volumosa, hepatomegalia e leucocitose havendo aparecimento de células granulocíticas imaturas como mieloblasto, promielócito, mielócito e metamielócito. A maioria dos pacientes têm basofilia e eosinofilia. Pode haver discreto aumento de monócitos, ocasionalmente, mesmo com esses fatores bem definidos ainda é comum o diagnóstico errado na fase inicial, podendo ser confundida com outro tipo de leucemia ou até mesmo com uma infecção desconhecida (BRECCIA; ALIMENA, 2010).

### 2.2.2 Fase acelerada

A segunda fase, seguindo o roteiro traçado pela doença, é seguida por uma perda progressiva da diferenciação celular, sendo conhecida como fase acelerada (FAC). Mesmo nos dias atuais, a definição e os critérios para definir exatamente essa fase são variados. O critério mais usado em todo mundo é da Organização Mundial de Saúde e seus parâmetros são: entre 10 e 19% mieloblastos no sangue ou na medula óssea, >20% basófilos no sangue ou na medula óssea, contagem de plaquetas menor que 100.000, sem relação com à terapia, contagem de

---

<sup>2</sup>A esplenomegalia, também denominada megalosplenia, consiste no aumento do volume do baço; que normalmente pesa 150 g e tem até 13 cm de comprimento em seu maior eixo. A esplenomegalia pode ser causada por diversos motivos

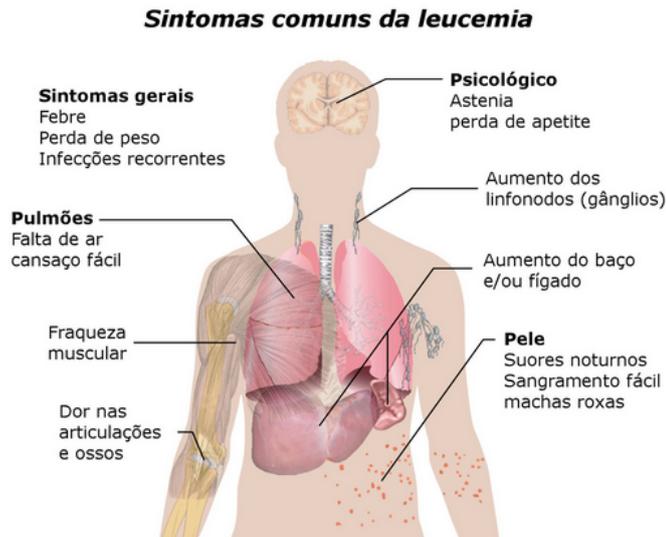


Figura 2.4 -- Principais sintomas atribuídos a LMC.  
Fonte: (MALONEY, 1987)

plaquetas acima de 1.000.000, não respondendo a terapia, evolução citogenética com novas anormalidades em adição ao  $PH^+$ , aumento da esplenomegalia ou da contagem de leucócitos, não respondendo à terapia, O paciente é considerado na fase de aceleração se algum destes critérios acima estiver presente. A fase de aceleração é significativa, porque seus sinais representam que a doença está evoluindo para uma transformação para crise blástica (TEFFERI et al., 2007) (ESFAHANI et al., 2007).

### 2.2.3 Crise blástica

Seguindo a trajetória da LMC, a terceira e última etapa fechando seu ciclo, é conhecida como crise blástica (CB). A crise blástica possui todos os sintomas e características da leucemia Mieloide aguda ou da leucemia linfóide aguda. Reconheceu-se, há algumas décadas, que uma melhor definição das características clínicas e hematológicas da fase terminal desta doença era necessária, porque a avaliação dos quimioterápicos<sup>3</sup> para o tratamento exigiu uma melhor definição das suas características. Dos pacientes que entravam nessa fase 75% morreram no prazo de seis meses (SILVER, 2009).

A mudança de estágio é provavelmente devido ao acúmulo de anormalidades molecu-

<sup>3</sup>O termo quimioterapia refere-se ao tratamento de doenças por substâncias químicas que afetam o funcionamento celular

lares, que levam a uma perda progressiva da capacidade de diferenciação celular, esse fato é devido a um residual da doença, mesmo que paciente em fase crônica entre no estágio de remissão completa<sup>4</sup> da doença, ainda fica uma porção mínima de células leucêmicas (DRUKER, 2008).

A Crise Blástica é o quadro mais fácil de identificar, a OMS determina que se considere CB quando o número de blastos estiver acima de 20%. Pacientes com blastos entre 20% e 29% têm resposta citogenética e sobrevivência significativamente melhores que pacientes com número de blastos 30%. As classificações geralmente não distinguem entre CB linfoide ou Mieloide, mas esta certamente é uma variável importante do ponto de vista da biologia da doença. Em 70% dos casos de CB, a transformação é mieloide, e em 20% a 30%, linfoide, raramente bi-fenotípica ou bi-linhagem, embora esse tipo de leucemia seja mais frequente nas CB de LMC do que nas Leucemias Mieloide agudas (LMA). Na crise blástica Mieloide (CBM). A transformação pode ocorrer em múltiplas linhagens ou predominar em uma linhagem: mieloblástica, eosinofílica, basofílica, monocítica, megacarioblástica, eritroblástica ou combinação destas. Crise blástica linfoide (CBL) pode surgir subitamente, sem ser precedida pela fase aguda (FA), e nela geralmente não ocorre displasia e nem basofilia. A CBL é mais frequentemente de célula B precursora (ESFAHANI et al., 2007; VARDIMAN; HARRIS; BRUNNING, 2002).

### 2.3 MEDULA ÓSSEA

A medula óssea tem um papel muito importante na LMC, sendo responsável pela formação das células sanguíneas e corresponde a um tecido esponjoso que preenche a cavidade dos ossos longos, bem como os alvéolos da substância esponjosa dos diversos ossos. A medula varia de cor segundo a idade e o estado patológico do indivíduo. Na infância, a medula produz ativamente os glóbulos sanguíneos em todos os ossos. No adulto, os ossos longos cessa sua atividade, exceto a medula proximal do fêmur (LEVY, 2000).

A medula vermelha é a medula celular ativa e a medula amarela é inativa e infiltrada por gordura. A medula óssea é um dos maiores e mais ativos órgãos do corpo, 75% de suas

---

<sup>4</sup>Remissão completa é o termo utilizado em Medicina para designar a fase da doença em que não há sinais de atividade dela, mas não é possível concluir como cura

células são mieloide produtoras de leucócitos e 25% são hemácias maduras. Como a vida das hemácias é longa, cerca de 120 dias, e a dos leucócitos é curta, com uma média de 6 horas, existem muito mais hemácias que leucócitos na circulação (OLIVEIRA, 1988).

Nos indivíduos sadios, a produção de hemácias e leucócitos é regulada com grande precisão, e a produção de granulócitos é aumentada e acelerada nas infecções. As células Mieloide são produzidas no embrião pelo fígado, baço e medula, mas após o nascimento apenas a medula é normalmente mielopoética (OLIVEIRA, 1988).

O sangue é constituído por células de três categorias: os glóbulos vermelhos (hemácias), que transportam o oxigênio do pulmão aos tecidos; os glóbulos brancos (leucócitos), que têm função de defesa do organismo e as plaquetas (trombócitos) que têm participação ativa no mecanismo de coagulação sanguínea (LEVY, 2000).

O tecido linfoide é constituído morfológicamente de linfócitos e plasmócitos, células que são suporte das reações imunes específicas. Estão presentes na medula, nos gânglios linfáticos e no baço. Os linfócitos devem seu nome, ao fato de se encontrarem tanto na linfa quanto no sangue. Nas doenças do tecido linfoide, normalmente, o volume desses órgãos é modificado. No decorrer das hemopatias Mieloide, essencialmente as malignas, o fígado, o baço e até mesmo os gânglios também se tornam o sítio de uma produção ectópica de células Mieloide. Fisiologicamente, as células Mieloide e linfoides são renovadas por células denominadas células-tronco. Essas células-tronco asseguram duas funções: a sua própria renovação e a produção de células diferenciadas (LEVY, 2000).

A medula óssea contém células-tronco pluripotentes. Essas células podem dar origem a qualquer célula Mieloide, podendo até restabelecer a medula óssea no caso de um transplante, atualmente o único tratamento curativo para esse tipo de doença. Como as células-tronco são comuns a todas as células Mieloide, é comum a frequência dos acometimentos globais do tecido Mieloide em patologias (OLIVEIRA, 1988).

## 2.4 NO MUNDO

De acordo com a vigilância epidemiologia dos Estados Unidos, a incidência da leucemia mieloide crônica (LMC) foi 1,1 a 2 casos por 100.000 habitantes entre homens e mulheres.

Numa pesquisa realizada entre os anos de 2003 a 2007, a média de idade de pacientes com LMC ficou em torno dos 65 anos. A percentagem de casos aumenta à medida que a população vai envelhecendo como mostra a Tabela 2.1 (BUYUKASIK; HAZNEDAROGLU; ILHAN, 2010).

Tabela 2.1 – Percentagem de casos de LMC dividida por faixas etárias da população mundial.

Faixas etárias	Porcentagem
00 a 20	2,5 %
20 a 34	7,4 %
35 a 44	10,1 %
45 a 54	13,3 %
55 a 64	15,1 %
65 a 74	19 %
75 a 84	22,7 %
acima de 85	9,9 %

Fonte: Yahya e colaboradores (BUYUKASIK; HAZNEDAROGLU; ILHAN, 2010)

## 2.5 ACHADOS LABORATORIAIS

Hemograma: Os glóbulos brancos variam de número entre 100.000 e 300.000 por  $\text{mm}^3$ . Seu número pode, às vezes, ser bem mais elevado, podendo chegar a casa dos milhões. Nestes casos, durante a sedimentação do sangue em ocorre uma espessa camada leucocitária. Do ponto de vista quantitativo, estes glóbulos brancos são representados principalmente por neutrófilos (50-70%). Os eosinófilos e basófilos são igualmente numerosos. O resto da população branca é representada por precursores imediatos dos granulócitos: metamielócitos, mielócitos e promielócitos sobretudo dos neutrófilos. Os mieloblastos são pouco numerosos (1-5%) e seu aumento pode ser um sinal da transformação aguda. Os glóbulos vermelhos: a anemia pode ser nula ou moderada, podendo-se encontrar achados eritroblastos. Plaquetas: seu número é frequentemente aumentado e com a transformação para leucemia aguda ocorre sua diminuição (trombocitopenia) (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

Atualmente LMC é diagnosticada pela detecção do cromossomo Filadélfia (cromossomo Ph). Esta anormalidade cromossômica característica pode ser detectada pela citogenética, pela técnica de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) ou pela reação em cadeia de polimerase

(PCR) (GOLDMAN et al., 2009).

Outros exames: a taxa de ácido úrico do sangue e sua excreção urinária são geralmente aumentadas em decorrência do hipermetabolismo dos ácidos nucleicos do tecido em proliferação. O exame de fosfatase alcalina do sangue tem sua atividade diminuída (BUYUKASIK; HAZNEDAROGLU; ILHAN, 2010).

## 2.6 CAUSAS

A causa real da doença ainda é desconhecida mas a radiação ionizante em altas doses por exemplo, a bomba atômica de Hiroshima e Nagasaki, teve um aumento de pessoas com LMC, enquanto a participação de agentes químicos, biológicos e a predisposição genética, embora sugestivos, não parecem exercer grande influência no aparecimento da doença (BERGANTINI et al., 2005; MALONEY, 1987).

## 2.7 TRATAMENTO

O tratamento até os anos 80 era insatisfatório. No início tratava-se com arsênico e radioterapia, que tinham um certo controle sobre os sintomas. Nos anos 50, o tratamento de escolha era o bussulfano, com melhora da qualidade de vida, porém sem impacto na sobrevida global dos pacientes, e havia uma suspeita que os agentes alquilantes poderiam predispor a progressão para uma fase avançada da doença. Então foi substituído pela hidroxycarbamida (HydreaR) (DOBBIN; GADELHA, 2002).

O bussulfano era um dos agentes iniciais para tratar LMC. Tem eficácia no controle na elevada taxa de glóbulos brancos, ao longo do tratamento que durava vários anos, no entanto, a terapia de bussulfano era altamente tóxica. Um dos efeitos mais evidente de sua toxicidade foi constatada nos pulmões, uma fibrose pulmonar comumente conhecida como pulmão de Bussulfano. A toxidade parece estar relacionada à evolução da doença para próximas fases FB e FA sendo que os pacientes com esse tratamento tinha em média uma sobrevida 45 meses (ESFAHANI et al., 2007; BOLUDA; CERVANTES, 2009).

O hidroxiureia, é um agente específico da fase crônica, foi desenvolvido como uma al-

ternativa mais segura para tratamento da LMC. Ele fornece controle de curto prazo na diminuição do número de glóbulos brancos e consequentemente, reduz o tamanho do baço. As toxicidades associadas a essa terapia incluem náusea, vômito, estomatite e erupção cutânea; entretanto, assim como o bussulfano ele não impede que a doença avance para as fases avançadas. Esse medicamento em fases mais avançadas não exerce nenhum controle da doença portanto não apresenta nenhum impacto no aumento da sobrevida dos pacientes. A expectativa de vida com essa opção de tratamento é de 58 meses; contudo o bussulfano e o hidroxiureia não tem nenhum efeito sobre o cromossomo  $Ph^+$ . Por não terem nenhum efeito sobre esse cromossomo não impactava na sobrevida, mas dava ao paciente uma melhor qualidade de vida na fase crônica (FAUSEL, 2007).

Entre 1980 e 2000, para os pacientes que não eram elegíveis ao Transplante de Células Hematopoietical Progenitoras (TCHP), o interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) era o tratamento de escolha, e com o TCHP a meta era a cura da LMC, com remissão molecular. Com o interferon- $\alpha$ , em torno de 60% dos pacientes alcançava uma resposta citogenética, dentre os quais menos que 35% das células eram  $Ph^+$ , em 18 meses 89% dos pacientes permaneciam vivos na fase crônica (ARANHA, 2008). A sobrevida global dos doentes tratados com IFN- $\alpha$  é de 63% aos 5 anos e de 40% aos 10 anos, demonstrando-se, que os seus resultados terapêuticos são quantificados, em termos de resposta e de duração permanência do paciente na fase crônica por maior tempo, até então sendo o primeiro medicamento capaz prolongar a vida do paciente (DOBBIN; GADELHA, 2002; GOLDMAN et al., 2009; TEFFERI, 2008).

Atualmente o transplante de medula óssea alogênico é considerado o único tratamento curativo da LMC; entretanto, alguns fatores, como a idade avançada, combinados com a ausência de doador compatível, limita a indicação do transplante a uma minoria de pacientes. Isto faz com que menos de 20% dos pacientes de LMC sejam curados com esta modalidade terapêutica (DOBBIN; GADELHA, 2002). Elegibilidade do paciente para o procedimento se baseia na identificação de um doador adequado, idade do paciente e controle da doença. o paciente deve ter preferencialmente idade inferior a 60 anos; o que é um obstáculo natural da doença, pois a média de idade pacientes diagnosticados, como mostra a tabela 2.1 na página 11, é próximo dos 60 anos. Muitos pacientes com idade avançada tornam o TMO, um proce-

dimento arriscado para submeter o paciente, tornando esse procedimento arriscado e inviável nestes casos (HEHLMANN; HOCHHAUS; BACCARANI, 2007).

Se o procedimento é realizado usando um membro próximo da família como, por exemplo, um irmão, a possibilidade de que o transplante seja um sucesso aumenta 50% a 75% sem a reincidência da doença; porém se o doador não está relacionado entre os parentes próximos a chance de sobrevida sem reincidência é de 40% a 50%, aumentando a taxa de mortalidade da precoce doença (FAUSEL, 2007).

O TMO alogênico é uma técnica com alto grau de toxicidade para os pacientes. O procedimento possui alto risco de complicações hemorrágicas e infecciosas, complicações durante o período mais complicado que é no pos-transplante. Essa janela de tempo é de 2 a 3 semanas, nesta fase as células de defesa do indivíduo está com número muito baixo, permitindo ataque de doenças oportunistas. Após o enxerto, os transplantados estão em risco da medula óssea do doador produz alorreativo as células T, que atacam os tecidos do transplantado (RAY et al., 2007; GOLDMAN et al., 2009).

Outra método testado é TMO autólogo, é um procedimento feito usando células saudáveis do próprio paciente, estas células que são recuperadas após quimioterapia. Infelizmente, estas populações contêm células progenitores remanescentes da CML que, irremediavelmente vão provocar a volta da doença, caracterizando uma recaída. Assim, TMO autólogo não é uma estratégia viável (ARANHA, 2008; GOLDMAN et al., 2009).

Antes da introdução dos inibidores da tirosina quinase (TKI), o transplante de células-tronco hematopóéticas alogênico era o único capaz de aumentar a sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer (RAY et al., 2007).

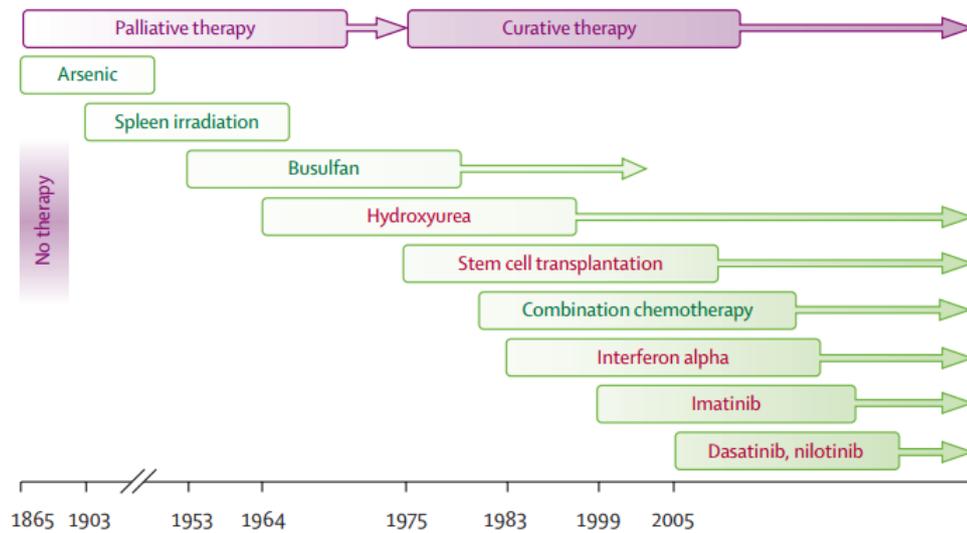


Figura 2.5 – - Evolução do tratamento da doença.  
Fonte: (HEHLMA,2007).

## 2.8 ABL

O gene Abl no cromossomo 9 é o homólogo humano de um gene originalmente identificado em um vírus oncogênico murina, a murina de Abelson vírus da leucemia. Este retrovírus foi isolado a partir de um rato que desenvolveu linfoma após a inoculação com *Moloney* vírus da leucemia murina (MoMuLV). A Caracterização molecular do vírus demonstrou o resultado da fusão da poliproteína viral e um gene do rato que foi chamado homólogo viral ativo é refere ao v-abl (ALLEN et al., 1992; SZCZYLIK et al., 1991).

O Abl1 proto-oncogene que codifica uma proteína citoplasmática e nuclear tirosina quinase que tem sido implicada em processos de diferenciação celular, divisão celular, adesão celular, e a resposta a estímulos externos, proliferação, sobrevivência, migração e invasão. Atividade da proteína Abl1 é regulada negativamente pelo seu domínio SH3 e exclusão do domínio SH3 transforma Abl1 em um oncogene. O (9; 22) resulta na translocação cabeça-com-cauda de fusão dos genes Bcr e Abl1, levando a um gene de fusão presente em muitos casos de leucemia (REN, 2005; SUZUKI et al., 2014).

Abl que compartilha um centro de domínio SH2-quinase, têm uma cauda C-terminal longa no citoplasma, denominada última região de exão, que transporta numerosos sítios de interação proteína-proteína. A atividade das quinase Abl. é regulada por um conjunto complexo

de intramolecular de interações que atingem o Abl. O domínio quinase é capaz de fazer inibição eficaz da atividade da tirosina quinase em ambos *in vitro* e *in vivo* (HANTSCHHEL, 2012a).

## 2.9 BCR

O gene Bcr se localiza no cromossomo humano 22, sendo constituído por 4 genes chamados de Bcr<sub>1</sub>, Bcr<sub>2</sub>, Bcr<sub>3</sub>, Bcr<sub>4</sub>. Esse é o local dos pontos de interrupção utilizado na geração da translocação dos cromossomos, formando o cromossoma Filadélfia encontrado na leucemia mieloide crônica e leucemia linfóide aguda (MARU'S; WITTE', 1991).

A fusão envolve quebra da região de grupos dentro dos principais pontos de interrupção ( $\mu$ -Bcr) do Bcr, que inclui introns 13 e leva as três principais formas distintas que surgem a partir dos pontos de interrupção do gene Bcr no cromossomo 22: p210, p190, p230; à produção de uma transcrição codificação 8,5 kb para uma 210- proteína (p210) kDa; o outro gene da fusão é o resultado de quebras no primeiro intron do Bcr, região menor *breakpoint cluster* ( $\mu$ -Bcr) e outro para a expressão de uma transcrição de 7,5 kb, que codifica uma proteína de 190 kDa (p190); raramente, um ponto de interrupção na região  $\mu$ -Bcr conduz à expressão de uma transcrição da proteína 230-kDa (p230), como em 30% dos adultos leucemia linfóide aguda (LLA), e 20% de infância cromossoma Ph positivo LLA, o ponto de interrupção no gene Bcr são encontrados dentro do região  $\mu$ -Bcr (LAURENT et al., 2001; MARU'S; WITTE', 1991; ZHU; QIAN, 2014).

## 2.10 BCR-ABL

O gene quimérico Bcr-Abl é a razão do início da LMC e o principal alvo terapêutico como mostra a figura 2.9. Ele codifica a proteína tirosina quinase responsável pela proliferação celular. Três diferentes proteínas podem ser produzidas dependendo do ponto de quebra desse gene, como: P210, P190 e a P230, como já mencionado anteriormente. Uma das formas mais agressiva da leucemia está associada a proteína formada P190, a leucemia linfóide aguda (LLA). Contudo proteína P210 é a marca molecular da leucemia mieloide crônica (BUYUKASIK; HAZNEDAROGLU; ILHAN, 2010; HANTSCHHEL, 2012b; CLARKSON et al., 2003).

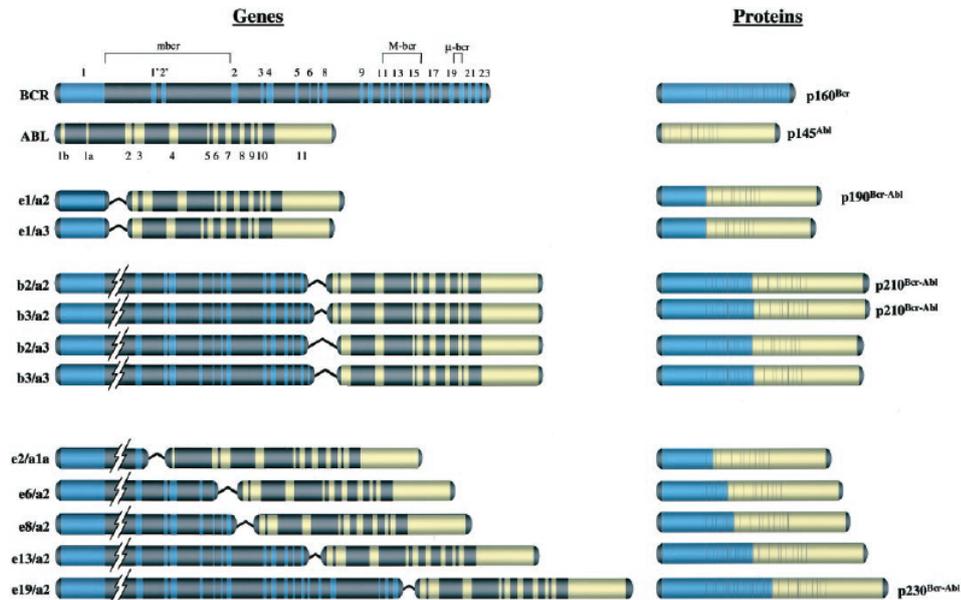


Figura 2.6 -- Os genes Bcr-Abl e suas proteínas (LAURENT et al., 2001).

Bcr-Abl demonstrou ser capaz de ativar numerosas vias de transdução, que são normalmente reguladores de fatores de crescimento em células hematopoiéticas. A ativação destas vias pode levar ao fator de crescimento independente, aumento da proliferação, a diferenciação, aumentando a resistência a apoptose (COPPO et al., 2003).

Esse gene quimérico possui constitutivamente ativo o domínio tirosina quinase, trabalhos recentes sugerem que pode-se iniciar a sinalização através da ativação do receptor, e não receptores quinase, particularmente membros da família Src. Além disso, várias regiões da porção de Abl (YOUNG et al., 2006).

O Bcr-Abl da tirosina quinase que, constitucionalmente funciona através da ligação do ATP (adenosina tri-fosfato), transfere um grupo fosfato do ATP para os resíduos da tirosina em vários substratos. Esta atividade faz com que haja um excesso de proliferação de células Mieloides, que é característica da LMC (ZHU; QIAN, 2014).

## 2.11 TIROSINA QUINASE

As proteínas quinase são a maior família de proteínas em eucariotos, são a chave central da comunicação para o controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador inclui vários fenômenos que vão desde alterações químicas e estruturais da proteína

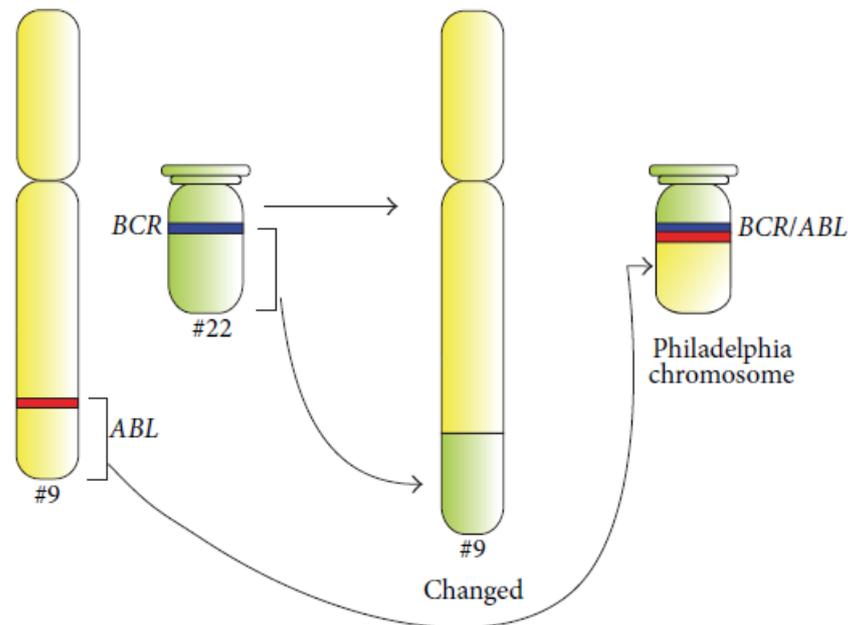


Figura 2.7 – - Translocação do cromossomo Philadelphia.  
Fonte: (TRELA, 2014).

até o controle transcricional. Por isto, o entendimento do mecanismo de controle das proteínas quinase é foco de interesse de muitas pesquisas (SILVA et al., 2009).

As proteínas tirosinas quinases (PTKs, do inglês Protein Tyrosine Kinases) são responsáveis pela transferência do grupo fosfato do (ATP) fosforilando, o fosfato recebido por um resíduos de tirosina pertencente ao substrato, que da início a cadeia de sinalização envolvida com essas proteínas (AVILA et al., 2010).

Na LMC, a tirosina quinase (TK) é indevidamente ativada pela fusão acidental do gene Bcr com o gene intracelular que codifica tirosina-quinase, c-Abl selvagem, c-Abl possui, TK possui 1150 resíduos de aminoácidos (NAGAR et al., 2002). A Fusão desses dois genes pode estimular inúmeras vias de sinalização incluindo JAK-STAT, PI3K / AKT, Ras / MAPK e NF-kappaB, levando a desregulação: proliferação celular e a apoptose. Os principais fármacos que tem impacto real no controle da doença abordam essa proteína em específico, usando-a como alvo terapêutico, fazendo a tirosina quinase Bcr-Abl até então o principal alvo para o desenho de novas fármacos, não só para o controle da doença, mas também para possível mecanismo de cura (XU et al., 2014).

A TK é um alvo terapêutico, estruturalmente ela tem uma organização que a favoreça se tornar alvo, pois ela é composta de domínios com funções de ligação ou catalíticas, intercaladas com as regiões que servem como locais de ancoragem do substrato ou para outras moléculas, podendo assim, ser inibida. Essa é a forma mais usadas pelos inibidores competitivos. Atualmente, cerca de 100 módulos de interação proteína-especializados foram identificados que reconhecem uma infinidade de sinais químicos (SCOTT; PAWSON, 2009).

Hoje, existem vários inibidores da quinase ATP-competitivos, disponíveis no mercado que inibem quinases mutantes ou sobre expressos responsáveis pela condução de sinais oncogênicos (LEVINSON; BOXER, 2013; LAFLEUR et al., 2013). Essas são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio de transferência de um ATP, e em casos excepcionais, de GTP (guanosina trifosfato) para treonina, serina (quinase específica para Ser/Thr) ou resíduos de tirosina (quinase específica para Tyr). A fosforilação destes resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle da atividade desta proteína (SILVA et al., 2009).

Estas são enzimas que fosforilam (adicionam um radical fosfato) ao aminoácido tirosina em cadeias laterais das proteínas. Curiosamente, seu primeiro substrato é uma molécula igual a ela: os receptores tirosina quinase formam dímeros em que uma molécula fosforiliza a proteínas-alvo. Depois que um receptor fosforiliza o outro, várias proteínas são recrutadas do citoplasma pelas fosfotirosinas dos receptores como mostra a figura 2.8. Após a ativação do receptor do fator de crescimento (proteína transmembrana), este ativa a proteína Ras através da molécula adaptadora GRB2 e um fator de troca do nucleotídeo guanina, induzindo Ras a trocar seu GDP por um GTP. Esse fenômeno dura apenas alguns segundos, já que a fosforilação pela tirosina quinase é logo revertida por proteínas tirosina fosfatases. As proteínas recrutadas passam a estar ativas e vão, assim, passar o sinal adiante (WEISBERG et al., 2007).

A auto fosforilação do receptor de fator de crescimento, induzido a tirosina-quinase sobre a face interna da membrana plasmática, cria fosfotirosina. Este recruta as proteínas adaptadoras, tais como Grb2 fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) ou fosfolipase-Cy (PLC-Cy) para iniciarem importantes vias de sinalização, que contribuem para a oncogêneses e proliferação de células cancerígenas. Por conseguinte, se a auto fosforilação da tirosinas quinases receptoras

são suprimidas pela ação dos fármacos, o conjunto de sinalizações complexas pode ser interrompido, proporcionando a oportunidade de reduzir a progressão de determinados cânceres (SCOTT; PAWSON, 2009; PFIRRMANN et al., 2014)

Ao se ligar ao ligante SH2-quinase, que adota uma estrutura helicoidal, o domínio SH3 estabiliza o N-lobo do domínio quinase no estado inativo. Os receptores de domínio SH2, na parte de trás do domínio quinase, C-lobo através de uma rede de ligações de hidrogênio estabiliza ainda mais a conformação reguladora da quinase (PFIRRMANN et al., 2014).

A importância geral do *gatekeeper* é ressaltada pelo fato de que pacientes submetidos à terapia com inibidores quinases frequentemente desenvolvem resistência clínica, causada por mutações específicas. Afirma-se frequentemente que o *gatekeeper* exerce controle sobre a ligação restringindo o acesso a um bolso dentro do sítio de ligação do inibidor do ATP (LEVINSON; BOXER, 2013).

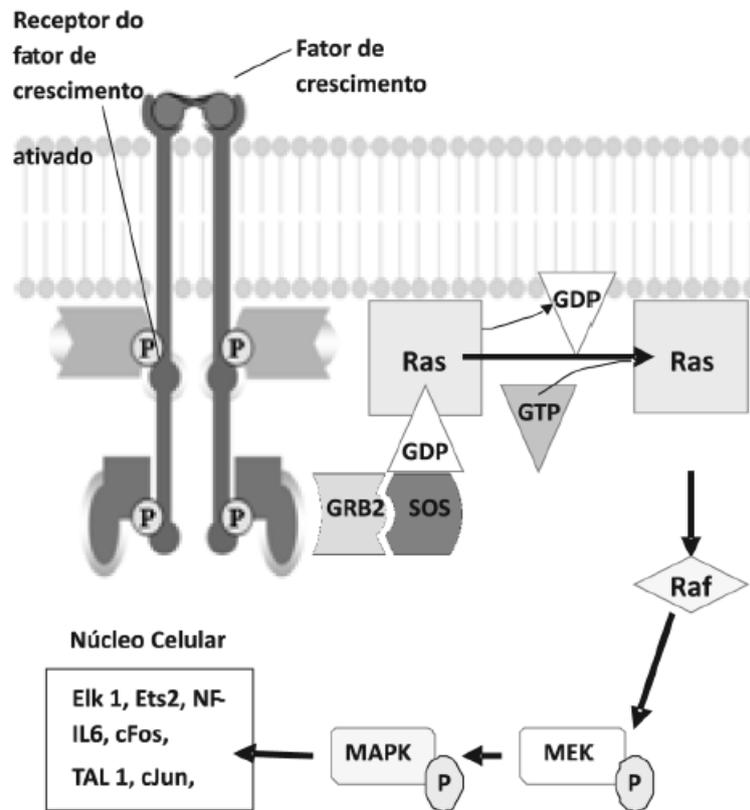


Figura 2.8 -- Representação cascata quinase MAPK quinase.  
Fonte: (SILVA et al., 2009).

## 2.12 VIAS DE SINALIZAÇÃO

Células comunicam continuamente com os seus vizinhos, decidindo juntos quando se dividir, quando se diferenciar e quando morrer (DOWNWARD, 2003). Os receptores de tirosina quinase (RTKs) são proteínas transmembrânicas que são submetidos a dimerização e auto fosforilação; subsequentemente, a fosforilação das proteínas citoplasmáticas por um receptor ativado desencadeia uma cascata de sinalização que induz a transcrição de genes específicos. Eles são divididos em duas famílias, ephrinA (EphA) e ephrinB (EphB), que interagem com seus receptores respectivamente (LAFLEUR et al., 2013).

As vias TK interagem entre si para regular o crescimento, em alguns casos de cancres como já foi dito e os componentes dessas vias podem ser mutados ou super expressos em diversas patologias. Os principais fatores de crescimento envolvidos com o câncer, os quais re-

presentam alvos terapêuticos importantes são: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de células tronco (SCF), fator de crescimento semelhante a insulina (IGF), dentre outros (LEITE et al., 2012).

O fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) consiste em quatro proteínas codificadas por 9 genes distintos. A síntese de PDGF aumentada a resposta dos estímulos externos, tais como estímulo de outros fatores de crescimento e citocinas, promovendo a indução do crescimento, da sobrevivência, da transformação, da migração celular e da permeabilidade vascular. O PDGF exerce efeito no alvo celular por meio da ativação de dois receptores tirosina-quinase e por meio da dimerização e fotofosforilação dos resíduos de tirosina no domínio intracelular e consequentemente transdução do sinal intracelular de forma semelhante ao EGF. O receptor se liga ao PDGF-A, Be C e o receptor se liga ao PDGF-B com alta afinidade. Os dois PDGFRs media processos similares, mas não idênticos, por exemplo, o PDGFR mediam quimiotaxia, transformação, e mobilização intracelular de  $Ca^{2+}$  mais eficientemente do que PDGFR. A ativação do PDGFR no câncer ocorre como consequência da amplificação do gene, de rearranjos cromossômicos, ou mutações (LEITE et al., 2012; TEFFERI, 2008).

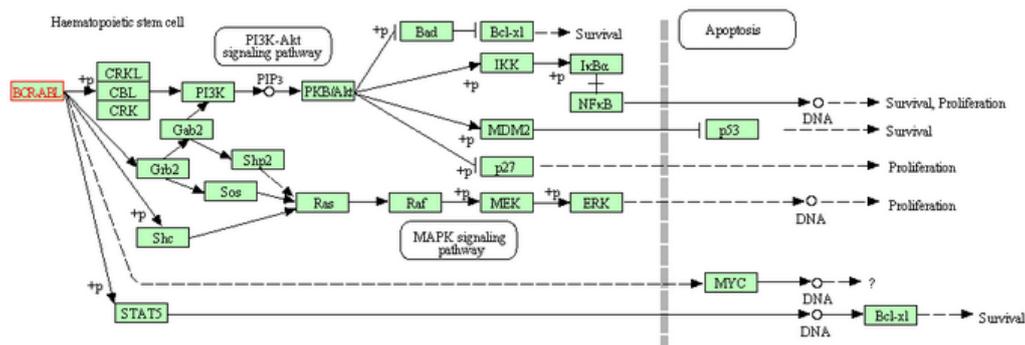


Figura 2.9 – As possíveis vias metabólicas da leucemia mieloide crônica.  
Fonte: Banco de dados KEGG.

O banco de dados KEGG<sup>5</sup> é banco de alto nível para a compreensão de funções do sistema biológico como o celular, organismo e o ecossistema, a partir de informações em nível molecular, especialmente conjuntos de dados moleculares, em larga escala gerados pelo sequen-

<sup>5</sup>[http://www.genome.jp/kegg-bin/show\\_pathway?hsa05220+25](http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa05220+25). Acessado em julho/2014

ciamento do genoma.

### 2.12.1 Via de Sinalização Ras

Muitas vezes, as células conversam umas com as outras por meio das proteínas. As proteínas Ras emitem sinais a partir do receptores da superfície celular tais como receptores de fator de crescimento, acoplados à proteína G de receptores que reconhecem moléculas. Estes sinais passam de proteína para proteína ao longo de diversas vias diferentes, em última análise afetam funções mitogênicas. A Ras está envolvida em muitos tipos de tumores, incluindo cerca de metade de todos os cânceros do colo de útero e 90% dos carcinomas pancreáticos (GOODSELL, 1999; MALUMBRES; BARBACID, 2003).

A proteína Ras fica no centro de uma cascata quinase. A maioria das proteínas ao longo desta cascata é ativada por fosforilação, ma Ras usa um nucleotídeo guanina para alternar entre o seu estados de "on" ou "off". A mensagem transmitida a partir do receptor da Ras de nucleotídeo de guanina, provoca um rearranjo sutil na proteína, que então desencadeia uma cascata de proteína-quinase. Estas quinases fosforilam e estimulam as outras proteínas ate a mensagem no seu destino final (DOWNWARD, 2003)

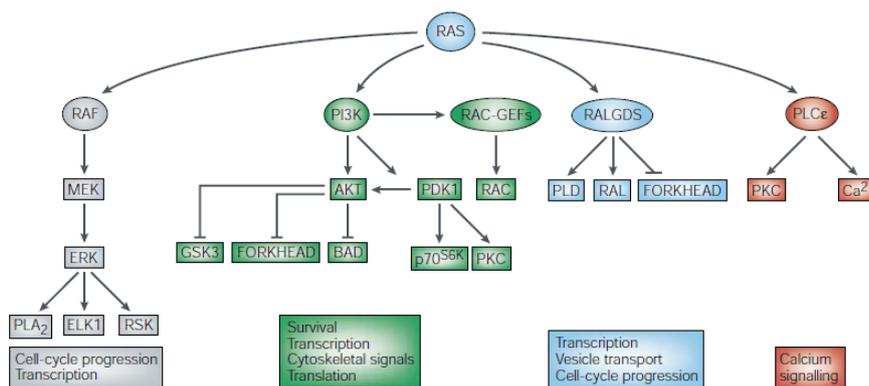


Figura 2.10 -- A proteína Ras recebe o GTP e troca por GDT.  
Fonte: (DOWNWARD, 2003).

### 2.12.2 MAP Quinase

Mediadores potenciais de regulação de resistência dependente da citocina<sup>6</sup> são membros da família das proteínas quinases ativadas por mitogênio (MAPK) que são (MAPK1 e MAPK2). As MAPKs transduzem em estímulos de sinalização que inibem a apoptose e a proliferação de estímulos (PFIRRMANN et al., 2014).

Um número crescente de evidências confirma as interações anormais entre a Bcr-Abl e moléculas oncoproteicas, incluindo RAS-MAP quinase conduzindo a um aumento na proliferação, via JAK-STAT levando ao aumento da atividade de transcrição na via PI3K /Akt, o que gera um aumento da apoptose. A atividade de TK P210 mantém p21 Ras em um estado ativo, ligado a GTP. Resultados da ativação de Ras de interação de P210 com outras proteínas citoplasmáticas, funcionam como moléculas adaptadoras, para criar complexos de sinalização multi-proteína. As sequências codificadas Bcr-amino-terminais de Bcr-Abl contem um local fosforilização na tirosina, que se liga ao domínio SH2 da proteína adaptadora Grb2 (CILLONI; SAGLIO, 2009)

A configuração das enzimas desta maneira não só melhora a precisão do fluxo de informações, mas também melhora a confiabilidade nos eventos de sinalização através da combinação de enzimas sucessivas em uma via de transdução. Comumente, as enzimas intermediárias nestas vias apresentam especificidades de substrato e restringem as esferas de ação da cascata quinase. Ou seja, seu único substrato pode ser a próxima enzima na cascata quinase. Este é o caso para a proteína ativada por mitógeno (MAP) (SCOTT; PAWSON, 2009)..

### 2.12.3 JAK Quinases

Janus quinase (JAK) é uma família intracelular, nonoreceptores tirosina-quinases que transduzem sinais citosinas mediados através da via JAK-STAT. Elas foram inicialmente denominada "apenas outra quinase"(uma vez que elas foram apenas duas de um grande número de descobertas em uma pesquisa baseada em PCR de quinases (XIE et al., 2001). As JAKs

---

<sup>6</sup>Citocina são pequenas proteínas ou peptídeos, é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes.

possuem dois domínios de transferência de fosfato quase idênticas. Um domínio exibe a atividade de quinase, enquanto o outro regula a atividade da primeira quinase (SHUA; LIU, 2003). Os receptores existem como polipéptidos emparelhados, apresentando, assim dois domínios de transdução de sinal intracelulares. JAKs associado com uma região rica em prolinas, em cada domínio intracelular, que é adjacente à membrana celular (KISSELEVA et al., 2002).

A Jak2 é um membro da família Janus quinases, envolvida na transdução do sinal de fatores de crescimento da citocina Jak2. É conhecido por ser ativada por auto fosforilação. As citocinas têm papéis essenciais no controle das respostas imunológicas. As funções biológicas das citocinas dependem da ativação do gene mediada por citocinas ou repressão (STAERK et al., 2007). Os estudos feitos pela indução gene por interferons levaram à descoberta da Janus quinase (JAK) transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) via, demonstrando ser uma via de sinalização comum usada por muitas citocinas (HUANG; CONSTANTINESCU; LODISH, 2001). A ligação de um citocinas aos seus resultados do receptor da superfície celular em receptores de dimerização e conseqüentemente a ativação de JAK tirosina quinases. Resíduos de tirosina específicos sobre o receptor são então fosforiladas pelas JAKs, ativando e servindo como locais de ancoragem para transcrição citoplásmica. fosforiladas pelas JAK, depois dimerizam e subsequentemente deixam o receptor, translocando-se para o núcleo, onde elas ativam o gene de transcrição (BROOKS et al., 2014).

O transdutor e ativador de transcrição Janus quinase-sinal via (JAK-STAT) transmite a informação recebida a partir de sinais de polipeptídios extracelulares, através de receptores transmembranares, diretamente nos promotores de genes alvo do núcleo, proporcionando um mecanismo de regulação de transcrição, sem a necessidade de envolvimento de outros mensageiros; sinalização parece ser uma adaptação antecipada para facilitar a comunicação intercelular que evoluíram com eventos das inúmeras sinalizações celulares. Vias de sinalização são específicas por ligantes que controlam o gene expressão. Além disso, as vias de sinalização JAK-STAT são reguladas por uma grande variedade de estímulos ambientais intrínsecas e, que pode adicionar à plasticidade resposta de uma célula ou tecido (AARONSON; HORVATH, 2002).

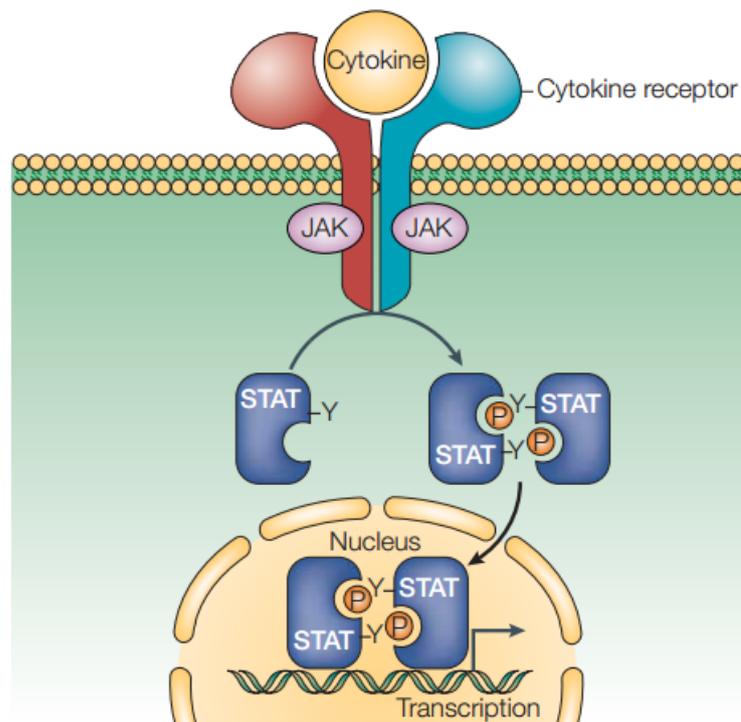


Figura 2.11 -- Sinal de transdução proteína STAT.  
 Fonte: (SHUA; LIU, 2003)

### 2.13 DOMÍNIO QUINASE

Estudos sobre a estrutura do co-cristal do domínio da quinase, no complexo com Imatinibe e outros inibidores da tirosina quinase, revelaram informações importantes, sobre a regulação da catálise e reconhecimento do modo de ligação da molécula e a proteína, mudanças conformacionais do domínio quinase (DUARTE et al., 2014). Importante ressaltar que estas estruturas são ferramentas indispensáveis para racionalizar o mecanismo de ação das mutações pontuais que causam resistência a interações dos inibidores quinase ABL. Alguns trabalhos mostram que o resíduo Tyr-412 é um importante local de auto fosforilação, constituindo um interruptor entre a conformação quinase inativo e ativo (HANTSCHHEL, 2012a).

O núcleo catalítico permite que a molécula (ligante) forme ligações internas como domínio SH3. Conseqüentemente, esta unidade SH2-SH3 estabiliza uma conformação inativa da enzima. Além disso, a orientação de cada unidade de SH2-SH3, mas distintamente, molda a topologia do substrato e o ATP na ligações nos bolsos cada de enzima. Esta última característica

pode ajudar a explicar a seletividade de certos inibidores ATP, tais como Imatinibe (SCOTT; PAWSON, 2009).

## 2.14 MUTAÇÕES MAIS FREQUENTES NO DOMÍNIO QUINASE

Uma das questões principais a ser resolvida para manutenção da doença na fase crônica, é o residual que permanece em taxa muito pequena, mas suficiente para a reincidência da doença em um momento futuro. Esse é uns dos principais fatores de fracasso do tratamento, caracterizando o mecanismo de resistência (PFIRRMANN et al., 2014; HARTEL et al., 2012). As mutações no domínio de quinase (DK) do Bcr-Abl foram descritas em 40-90% dos doentes que tiveram uma recaída depois de iniciarem o tratamento, constituindo o mecanismo mais frequente de resistência adquirida para a terapia com inibidores da tirosina quinase (TKI) (ARECHAVALETA et al., 2011)

Existem mais de 90 mutações em 57 resíduos relatados, conferindo diferentes níveis de resistência em função da sua localização e do efeito na conformação do DK do Abl. A resistência desenvolve-se em uma pequena percentagem de pacientes, principalmente devido à missense das mutações no domínio Bcr-Abl (ARECHAVALETA et al., 2011).

A maioria das mutações identificadas em pacientes resistentes ao Mesilato de Imatinibe ocorre usualmente dentro das 13 posições de aminoácidos do DK incluindo G250E, Y253H/F, E255K/V, T315I, M351T, F359V, H396C<sup>7</sup> já descrita em associação com resistência ao Imatinibe, embora 15 (T315I, Y253F / H, E255K / V, M351T, G250E, F359C / V, H396R / P, M244V, E355G, F317L, M237I, Q252H / R, D276G, L248V, F486S) conta para 85% dos casos mutados. Mutações foram relatadas, por várias autores, como recém-adquirida concomitantemente com uma perda de resposta ao Dasatinibe ou Nilotinibe. Além disso, o V299L e mutações T315A de fato, demonstrado que ocasionalmente emergem em pacientes reincidentes em Dasatinibe (SOVERINI et al., 2011) (BUYUKASIK; HAZNEDAROGLU; ILHAN, 2010), com diferentes sensibilidades aos TKI. Uma das mutações mais comum é a T315I, que é forma mais agressiva das mutações e com maior resistência aos inibidores da tirosina quinase, não

<sup>7</sup>Detalhes da nomenclatura utilizada podem ser vistos na tabela A.2 no anexo A.

só para a primeira geração de TKI como o Mesilato de Imatinibe, mas também para os TKI de 2<sup>a</sup> geração como o Nilotinibe e o Dasatinibe (WONGBOONMA; THONGNOPPAKHUN; AUEWARAKUL, 2011).

A segunda geração está conseguindo êxito com a maioria das mutações que ocorre no DK que são resistentes ao Mesilato de Imatinibe; no entanto, a mutação T315I confere resistência completa para todos os inibidores competitivos de ATP na tirosina quinase Bcr-Abl. Atualmente, essa mutação é o obstáculo principal e crítico para o sucesso da terapia (CHOME et al., 2011).

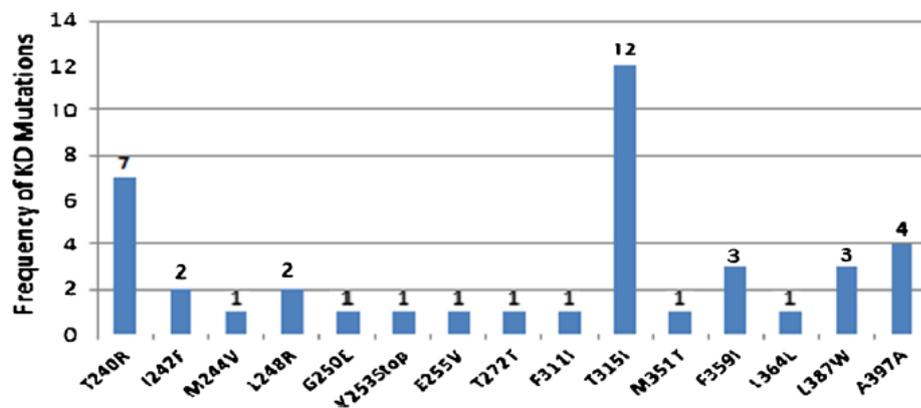


Figura 2.12 -- Principais mutações encontrada no Bcr-Abl.  
Fonte: (KAGITA et al., 2014)

Na pesquisa por novos inibidores, as mutações são consideradas um desafio complicado de se superar. Estudos pre-clínicos dos principais fármacos encontrados no mercado como Dasatinibe, Nilotinibe e outros TKIs para as principais formas mutantes do Bcr-Abl, apontaram para uma total ineficiência no controle da mutação T315I (SOVERINI et al., 2011).

## 2.15 T315I

Os mecanismos de resistência ao Imatinibe em geral, são aqueles que levam a proteína tirosina quinase a ter dificuldade em manter as interações com inibidor, podendo ser de forma direta, trocando aminoácidos que interagem diretamente com o fármaco reduzindo assim contatos lipofílicos ou indiretamente diminuindo a interação do fármaco com sitio ativo da proteína como resultado na mudança de topográfica do sitio ativo levando ao impedimento estereoquímico,

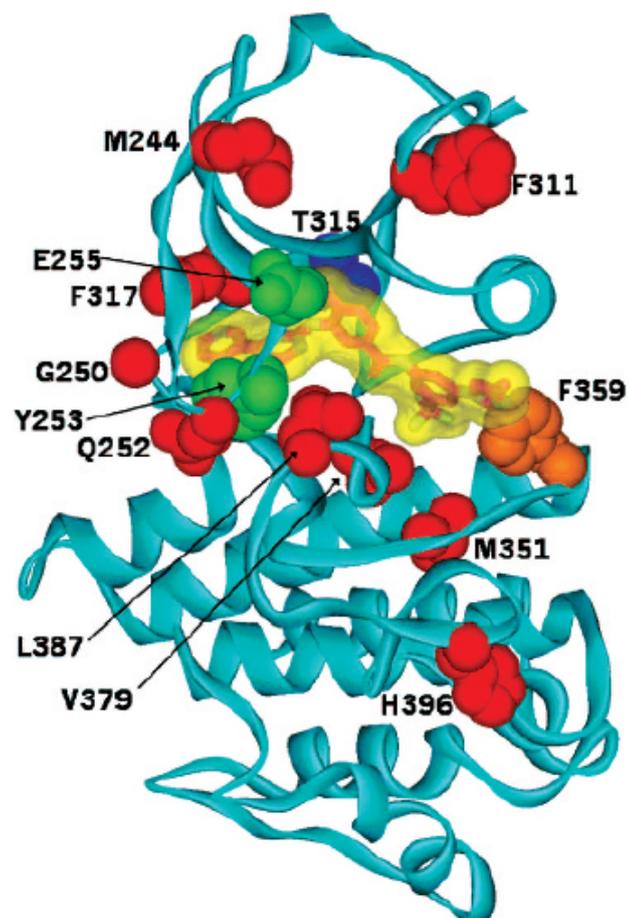


Figura 2.13 – - Mutações mais frequentes.  
Fonte:(STOFFREGEN,2005)

exemplos de resíduos que inibem a interação de forma direta do Imatinibe com o sitio ativo é Thr315 (WEISBERG et al., 2007).

A mutação T315I é uma das mutações mais encontradas em pacientes submetidos à terapia com Imatinibe, sendo responsável por 15% dos casos de mutações. Thr315 está localizado no centro do local de ligação ao Imatinibe com proteína. Este resíduo está em posição privilegiada, chamado de *gatekeeper*, o local de ligação é uma cavidade interna de tamanho variado dependendo da tirosina, isso contribui para especificidade do inibidor, o receptor quinase Abl tem resíduo nessa posição do *gatekeeper* que foi trocada por isoleucina(Ile) ou Alanina(A)<sup>8</sup> (YOUNG et al., 2006)

Segunda geração dos TKI como Dasatinibe, Nilotinibe mostram uma melhor eficiência no controle da LMC, inibem a maioria das mutações da tirosina Abl que são resistentes ao Imatinibe, exceto o T315I, como já afirmado acima; Thr315 é um resíduo chave que interage com TKI via interações de hidrogênio. Quando ele é substituído por Ile a interação entre TKI e Abl é destruída e este resulta na redução da eficiência do inibidor. A incapacidade do modelo estérico para explicar a preferência da Treonina, sugere que este resíduo pode estar mediando seus efeitos por meio de um mecanismo que ainda não foi totalmente esclarecido (XU et al., 2014; LEVINSON; BOXER, 2013).

Estudos avaliaram o grau de sensibilidade dos principais fármacos de primeira e segunda linha com as formas mais recorrentes mutações do Bcr-Abl. O uso de IC50 para medir a eficácia na inibição do Bcr-Abl logo se estendeu, a partir do Imatinibe, a todos de segunda geração inibidores da tirosina quinase (TKI) que foram desenvolvidos racionalmente para oferecer opções farmacológicas clínicas adicionais para ser utilizado em pacientes resistentes ao Imatinibe IC50 Estes estudos previu que o Dasatinibe e o Nilotinibe e que os outros sejam todos igualmente ineficazes contra a mutação T315I. Fato é que as mutações são os principais mecanismos de resistência aos TKIs, sendo altamente recomendado a inclusão de um procedimento padrão mutacional de análise molecular para o acompanhamento de pacientes com LMC, tratados com TKI (ARECHAVALTA et al., 2011; SOVERINI et al., 2011).

---

<sup>8</sup>consultar a simbologia no anexo A

## 2.16 INIBIDORES DE TIROSINA QUINASE

Todas as proteínas quinases têm um domínio catalítico que contém uma fenda onde se liga uma molécula de ATP (vide figura 2.14). A inibição alostérica, que altera a conformação espacial destas enzimas e conseqüentemente, bloqueia os sítios de ligação do ATP (vide figura 2.15), sendo bastante promissora no planejamento de fármacos, principalmente moléculas de baixa massa molecular (SILVA et al., 2009; AVILA et al., 2010).

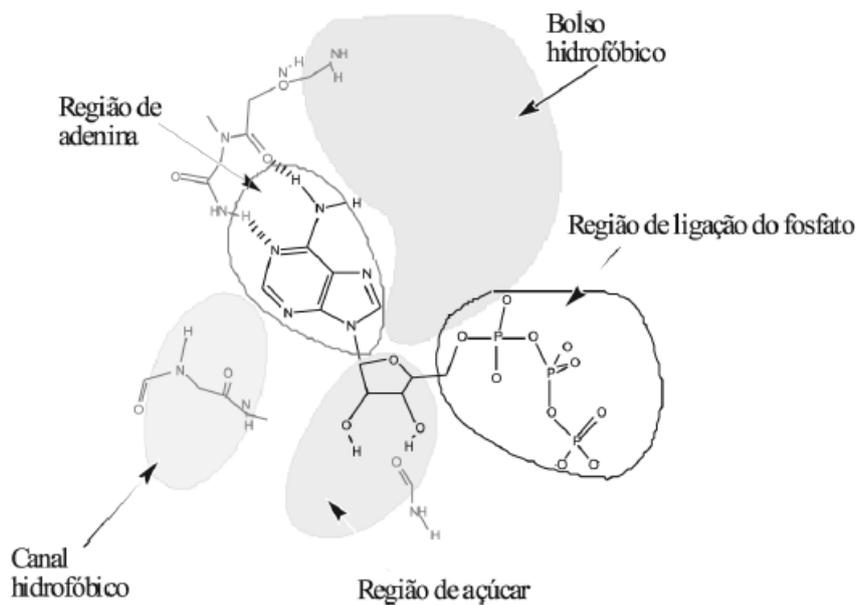


Figura 2.14 – - ATP no sítio de ligação da quinase.  
Fonte:(SILVA et al., 2009).

Além de ligações de hidrogênio tipo doador e receptor, existem interações de natureza lipofílica da quinase com o ATP. Embora dos sítios de ligação do ATP sejam muito conservados entre as proteínas quinases, a arquitetura de regiões próximas a esses sítios pode variar (SILVA et al., 2009).

Os sítios de ligação em proteínas quinase podem ser divididos nas seguintes regiões: região da adenina, região em que se posiciona o núcleo purínico (ou o resíduo de purina, ou adenina), que faz duas ligações de hidrogênio com o receptor; região do açúcar, como mostrado na figura 2.14, na maioria das proteínas quinases é uma região hidrofílica; bolso hidrofóbico, este bolso não é usado pelo ATP, mas é explorado pela maior parte dos inibidores; canal hi-

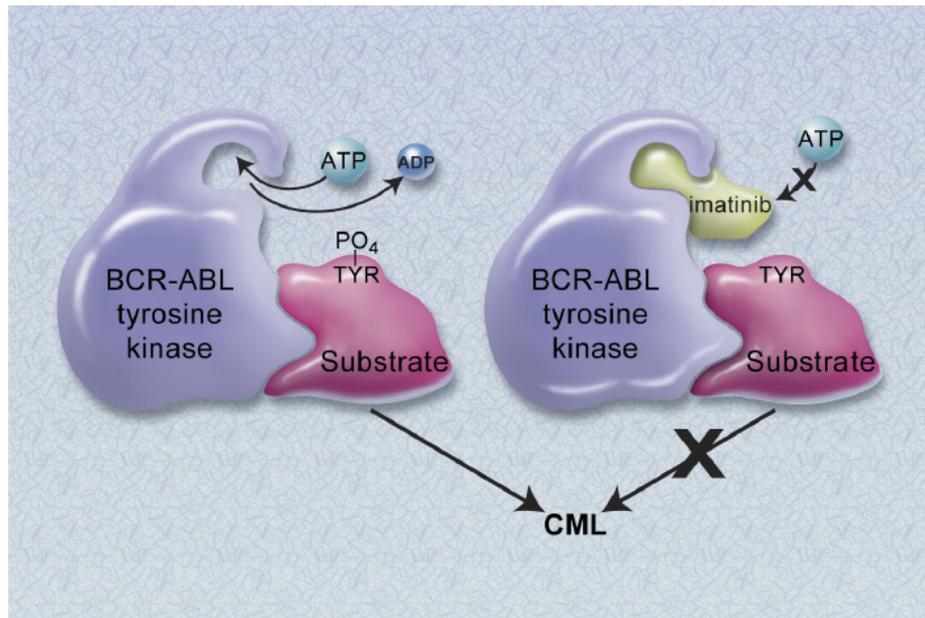


Figura 2.15 – - Mecanismo de inibição tirosina, transferência de fosfato.  
Fonte: (DRUKER, 2008).

drofóbico, é uma fenda aberta para a água. Como não é usada pelo ATP, pode ser explorada para o aumento da afinidade entre o fármaco e o receptor. A região de ligação do fosfato é a menos importante em termos de afinidade devido à forte exposição à água. Porém, pode ser útil para melhorar a seletividade ou provocar ganho adicional de afinidade na otimização de um novo inibidor (SILVA et al., 2009; GILES; CORTES; KANTARJIAN, 2005).

Um dos principais desafios no desenvolvimento de inibidores das proteínas tirosinas quinases é a seletividade, já que há cerca de 90 tirosinas quinases codificadas no genoma humano, sendo que todas geralmente utilizam o ATP como substrato para a transferência do fosfato (AVILA et al., 2010).

### 2.16.1 Mesilato de Imatinibe

O tratamento com Imatinibe revolucionou drasticamente tratamento da LMC. O uso deste medicamento tem sido associado a uma boa qualidade de vida, desde a sua síntese na década de 90 (BRECCIA; ALIMENA, 2010). Atualmente, é o principal tratamento para a maioria dos pacientes com LMC é derivado de fenil-2-amino-pirimidina agindo como inibidor seletivo da tirosina quinase Bcr-Abl, induzindo a remissão hematológica e citogenética (HA-

MERSCHLAK et al., 2014).

O Imatinibe (Glivec, STI-571; Novartis, ) foi introduzido como terapia para a LMC, com base na respectiva capacidade para bloquear a proliferação celular por meio da inibição da tirosina quinase atividade de Bcr-Abl. Imatinibe também é útil no tratamento de formas de leucemia linfoides aguda que são marcadas pela presença do cromossomo Filadélfia, embora as respostas são apenas transitória. Em adição à sua capacidade de bloquear a Bcr-Abl. Imatinibe também inibe o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) do receptor e o receptor de c-Kit. A figura 2.16 mostra um diagrama 2D das interações do Mesilato de Imatinibe com a tirosina quinase selvagem (PDB:3QRI). Esta especificidade alargada do Imatinibe subjaz a sua eficácia no tratamento das doenças crônicas mieloproliferativas que envolvem a ativação do PDGF tumores do receptor e do estroma gastrointestinal (YOUNG et al., 2006; GILES; CORTES; KANTARJIAN, 2005).

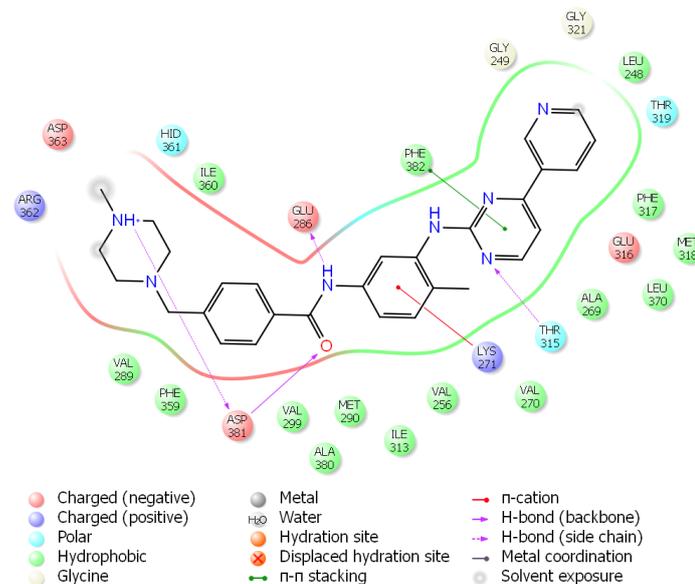


Figura 2.16 – - Interação entre o IM e Bcr-Abl(3QRI).

Fonte: (Do autor).

O Mesilato de Imatinibe é altamente eficaz no tratamento da LMC, dando origem à completa remissão citogenética (CCR). Hoje o Mesilato de Imatinibe desempenha um papel importante no tratamento da LMC como o fármaco de primeira linha para a prevenção da morbidade e mortalidade. No entanto, uma proporção significativa de pacientes não obtém a eficácia esperada, se comparados aos demais pacientes em tratamento; entretanto alguns fatores como

adaptação ao fármaco e mutações já mencionadas são as principais causas de falha do medicamento (LI et al., 2014; NAIR et al., 2014).

O fármaco entrou no mercado em 2001 a um preço de cerca de US 30.000 por ano nos Estados Unidos. Desde então, o preço triplicou, embora Gleevec tenha enfrentado a concorrência de cinco medicamentos mais recente, esse é um dos fármacos mais caros encontrados no mercado <sup>9</sup>.

O Mesilato de Imatinibe foi sintetizado pela primeira vez, em 1993, por Zimmermann. A rota sintética original desenvolvida por este pesquisador apresenta uma série de problemas, como a manipulação de reagentes tóxicos e etapas de reação sem a descrição dos rendimentos. A figura 2.16 mostra umas das novas rotas de sintetizar o fármaco (BOECHAT et al., 2013).

Este fármaco tem atividade significativa em todas as três fases de (LMC): crônica, acelerada e blástica. No entanto, as respostas ao Mesilato de Imatinibe em doentes num estágio avançado da doença são geralmente transitórias, como mostra a tabela 2.2. Na fase crônica, obtém-se taxas elevadas de resposta citogenética e molecular. Com aparecimento de evidências que a neoplasia está se evoluindo, o primeiro passo é aumentar a dose do medicamento; entretanto um dos fatores do aumento das doses é a intolerância dos pacientes (GOLEMOVIC et al., 2014; XU et al., 2014).

Tabela 2.2 – Estudo feito no Brasil medindo a eficácia do fármaco Mesilato de Imatinibe, frente às três fases da leucemia Mieloide crônica. Fonte:(AQUINO; GONÇALVES; SILVA, 2009)

	Fase crônica	Fase acelerada	Fase blástica	Total
Número de casos	9	6	11	26
Resposta hematológica completa	5	1	1	7
Porcentagem	78%	16%	9%	27%
Resposta citológica completa	4	0,00	0,00	4
Porcentagem	44%	0,%	0%	15%

<sup>9</sup>[http://http://www.nytimes.com/2009/04/15/business/15pill.html?\\_r=0](http://http://www.nytimes.com/2009/04/15/business/15pill.html?_r=0). Acessado em novembro /2014

## 2.16.2 Dasatinibe

O Dasatinibe é um novo agente aprovado para o tratamento de adultos com LMC na fases crônica, aguda ou crise blástica resistentes ou intolerantes ao tratamento prévio com Mesilato de Imatinibe. O Dasatinibe (Sprycel, Bristol-Myers Squibb, NY, USA) é um inibidor de tirosina quinase Bcr-Abl disponível na forma oral, sendo, *in vitro*, 300 vezes mais ativo do que o Mesilato de Imatinibe. O Dasatinibe também inibe outras quinases, como a família Src. O Dasatinibe, diferentemente do Mesilato de Imatinibe, inibe as formas ativa e inativa da molécula Bcr-Abl (DELAMAIN; CONCHON, 2008).

A resposta hematológica completa foi observada em 37 dos 40 pacientes com LMC na fase crônica. As principais respostas hematológicas foram observadas em 31 de 44 pacientes com LMC em fase acelerada, LMC em crise blástica ou LLA. As respostas foram mantidas em 95% dos pacientes com LMC em fase crônica, com uma média de acompanhamento tempo de maior que 12 meses. Em pacientes com LMC em fase acelerada, 82% permaneceram em remissão, embora com um período de acompanhamento médio de apenas 5 meses. Quase todos os pacientes com LMC em crise blástica ou LLA recaída no prazo de 6 meses (MANLEY; COWAN-JACOB; MESTAN, 2005; DAS \* PING CHEN et al., 2006).

Em 11 de outubro de 2011, a Food and Drug Administration (FDA) anunciou que o Dasatinibe pode aumentar o risco de uma doença rara, aumento anormal da pressão sanguínea nas artérias dos pulmões ( hipertensão pulmonar). Os sintomas dessa doença podem incluir falta de ar, fadiga e inchaço do corpo (como os tornozelos e pernas). Nos casos relatados, os pacientes desenvolveram hipertensão após o início do uso do Dasatinibe, inclusive depois de mais de um ano de tratamento (TOKARSKI et al., 2006; TALPAZ et al., 2006)

Contrastando com o Imatinibe, que penetra profundamente no domínio quinase, o Dasatinibe não é totalmente enterrado dentro dele, tomando a forma de Y, ancorando-se a ele por ligações de hidrogênio como mostra a figura 2.17. Observando as estruturas da quinase, revela-se que o ponto essencial de contatos entre o Dasatinibe e a proteína envolve regiões altamente conservadas, explicando a ampla especificidade deste inibidor (YOUNG et al., 2006). A experiência clínica também forneceu evidência clara que os pacientes com mutações resistente

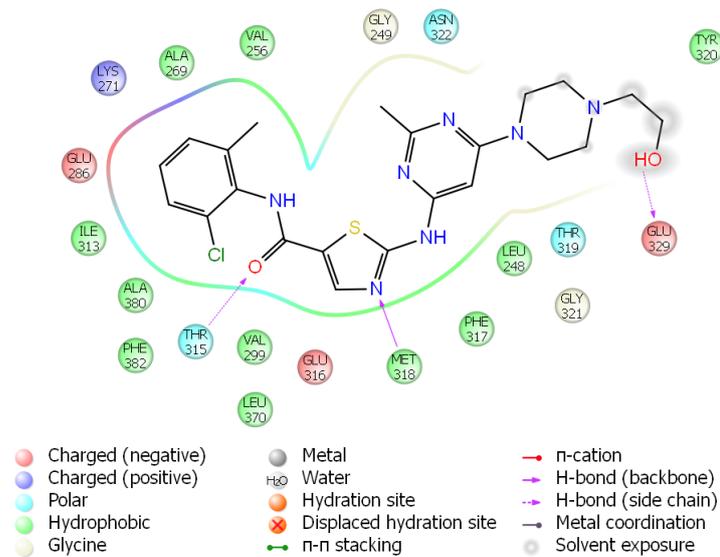


Figura 2.17 -- Interação entre o Dasatinibe o Bcr-Abl(3QRI).  
Fonte: (Do autor).

ao Imatinibe como F317L / V / I / C e nuações Q252H são pouco sensíveis às Dasatinibe (SOVERINI et al., 2011) (BUYUKASIK; HAZNEDAROGLU; ILHAN, 2010).

Atualmente, encontra-se em fase clínica demonstrando eficácia contra a maioria das formas resistentes de Bcr-Abl. Infelizmente, o Dasatinibe não é eficaz contra um forma mutante de Bcr-Abl nas quais o resíduo treonina na posição 315 é substituída por isoleucina (T315I) (HANTSCHHEL, 2012b).

### 2.16.3 Nilotinibe

É um inibidor tirosina quinase com alvo melhorado e específico baseado na compreensão dos mecanismos moleculares do Mesilato de Imatinibe; modificações estruturais levaram ao desenvolvimento desse novo fármaco (Nilotinibe). Tendo como base o Imatinibe, Nilotinibe inibe Bcr-Abl pela ligação a uma forma inativa, DFG-a conformação do ABL domínio quinase, impedindo assim a enzima de adaptar a conformação cataliticamente ativa e bloqueando a fosforilação da tirosina e de proteínas envolvidas no sinal transdução (ZHOU et al., 2009).

Dados de estudos pré-clínicos demonstram que o Nilotinibe atinge concentrações intracelulares mais elevadas do que o Mesilato de Imatinibe e inibe a atividade da tirosina quinase do Bcr-Abl induzindo a apoptose em concentrações mais baixas do que o Mesilato de Imatinibe

(DELAMAIN; CONCHON, 2008)

A ligação melhorada de resultados Nilotinibe em maior potência e seletividade sobre as quinases receptoras KIT e PDGF não tem atividade contra alvos como a Src-família de quinases. A tirosina em modelos pré-clínicos, Nilotinibe foi 30 vezes mais potente do que o Imatinibe (KANTARJIAN et al., 2007).

Este fármaco mais potente e seletivo, é projetado através da incorporação de novos grupos de ligação, mantendo interações com os resíduos Glu286 e Asp381 conforme se vê na 2.18. Em comparação com Mesilato de Imatinibe, o Nilotinibe faz ligações de hidrogênio e tem interações  $\pi$ - $\pi$  e  $\pi$ -cátion com o domínio quinase Abl oferecendo maior estabilidade. O Nilotinibe é capaz de bloquear a proliferação de Bcr-Abl em linhas celulares derivadas de pacientes e a autofosforilação de Bcr-Abl em Tyr177 com mais eficiência em comparação com o Mesilato de Imatinibe mas incapaz de controlar a mutação T315I (BRECCIA; ALIMENA, 2010). Os pacientes com o Y253H resistentes ao Imatinibe, E255K / V, e F359V / C / I mutações são pouco sensíveis às Nilotinibe (SOVERINI et al., 2011).

Na fase 1 dos estudos, as respostas foram conseguidas em pacientes que possuem ou possuíam mutações como G250E, M351T, E35G, Y253F, F311L, F317L, F359V, H396P, H396R, e E459Q. No entanto, previu que poderiam surgir mutações no DK, e também poderiam ser resistente ao Nilotinibe. A identificação de todas essas possíveis mutações é importante para a análise de dados e ensaios clínicos, que podem contribuir para uma futura concepção de inibidores tirosino quinase (RAY et al., 2007; HAMERSCHLAK et al., 2014).

Nilotinibe tem um número de efeitos adversos típicos dos fármacos anticânceres. Estes incluindo dor de cabeça, fadiga, problemas gastrointestinais, como náuseas, vômitos, diarreia e constipação, dores musculares e articulares, erupções cutâneas e outras doenças da pele, sintomas semelhantes aos da gripe, e reduziu a contagem de células do sangue. Menos efeitos secundários típicos são as do sistema cardiovascular, tais como a hipertensão (pressão arterial elevada) vários tipos de arritmia. O Nilotinibe também pode afetar o corpo de eletrólitos e glicose equilíbrio (KANTARJIAN et al., 2006). Embora os efeitos pulmonares relacionadas com adverso sejam raros quando compara dos com Imatinibe e Dasatinibe. Há um relato de caso de insuficiência respiratória aguda de hemorragia alveolar difusa em paciente tomando Nilotinibe

(CHONGNARUNGSIN; ASHTON, 2014).

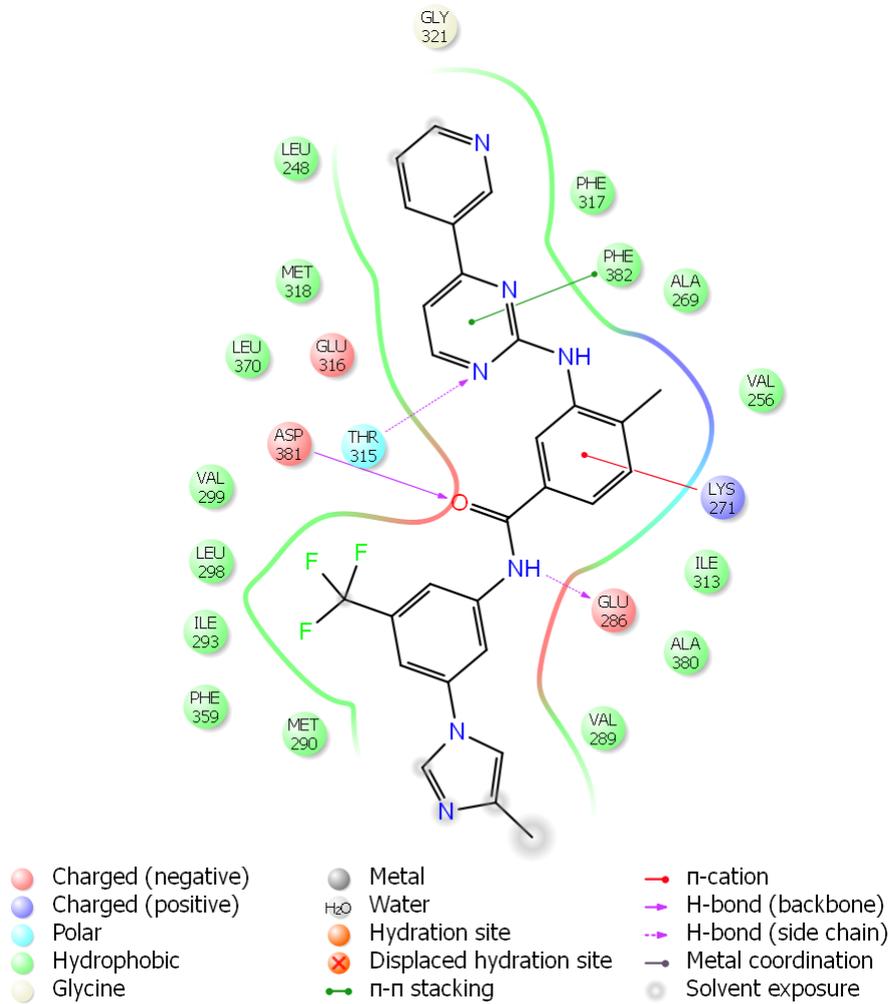


Figura 2.18 -- Nilotinibe e o Bcr-Abl(código 3QRI).  
Fonte: (Do autor)

## 2.16.4 Ponatinibe

Ponatinibe (nome comercial Iclusig, anteriormente AP24534) é um medicamento oral desenvolvido pela Ariad Pharmaceuticals para o tratamento da leucemia mielóide crônica (LMC) e para o cromossoma Filadélfia positivo, leucemia linfoblástica aguda (ALL) (HUANG \* CHESTER A. METCALF, 2010). A estrutura química e modo de ligação esquemática desse fármaco demonstram serem inibidor constituído por vários módulos designados como o molde, como mostrado na figura 2.20. 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* e bolso associado ao modo de ligação DFG-out. (ZHOU et al., 2011).

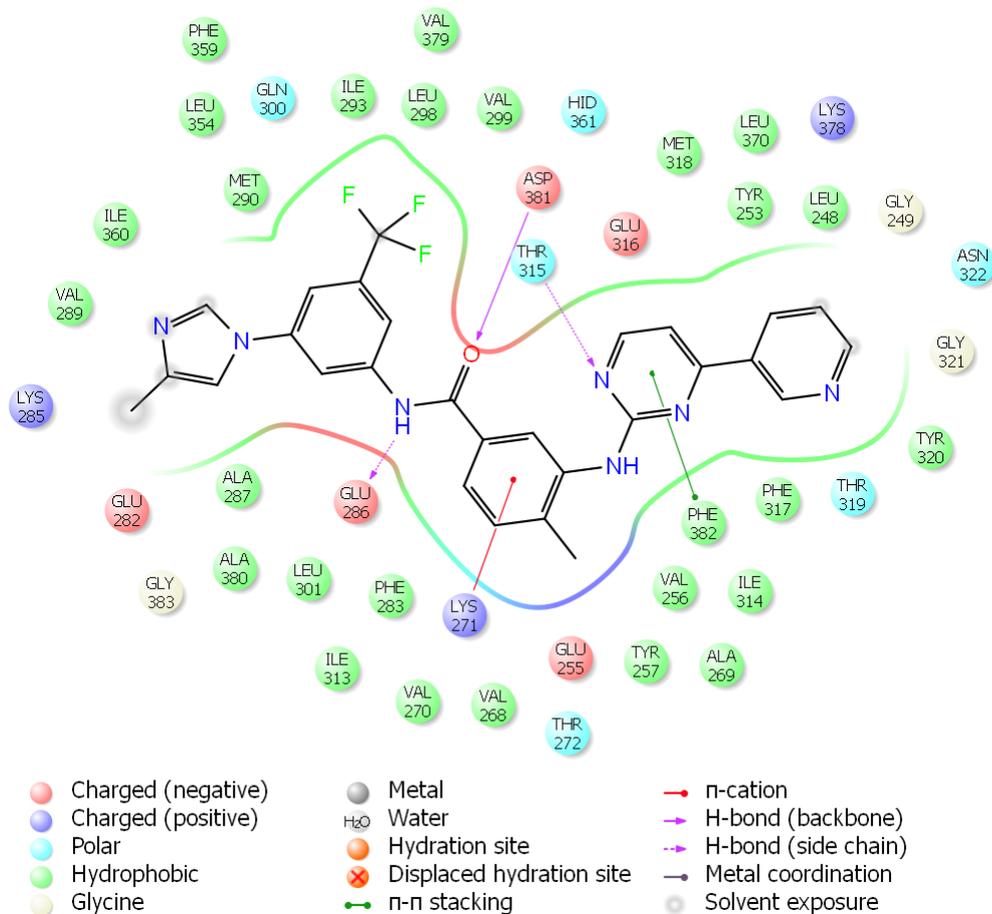


Figura 2.19 – - Interação entre o Ponatinibe e o Bcr-Abl(3QRI).

Fonte: (Do Autor)

Estudos apontam que o Ponatinibe foi capaz de inibir a mutação T315I e também as outras mutações da quinase Bcr-Abl *in vitro*. Em uma fase recente do estudo incluindo 81 pacientes, dos quais 60 com LMC e cinco com LLA Ph<sup>+</sup>, o Ponatinibe mostrou ser um inibidor de alta qualidade (MOLOGNI et al., 2013; DUFIES et al., 2013).

Ainda é muito cedo para concluir se o ponatinibe poderia ser ou não ser usado como tratamento de primeira linha. Uma análise realizada recentemente mostrou uma taxa de 54% CCR em 10 meses, em 267 pacientes com doenças crônicas, resultado próximo ao efeito relatado anteriormente para o mesilato de imatinibe (DUFIES et al., 2013). A figura 2.19 mostramos um diagrama 2D das interações do Mesilato de Imatinibe com a tirosina quinase selvagem (PDB:3QRI).

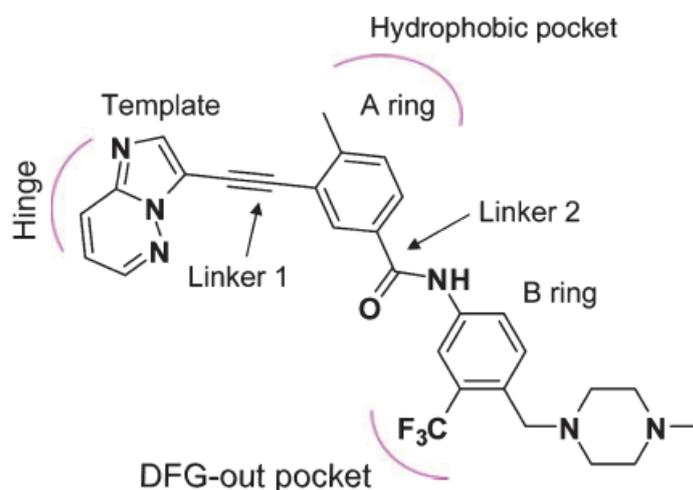


Figura 2.20 – - Estrutura da ligação do ponatinibe.  
Fonte: (ZHOU et al., 2011).

Nos Estados Unidos a *Food and Drug Administration* aprovou o Ponatinibe como candidato a fármaco em 2012, mas suspendeu temporariamente as vendas em 31 de outubro de 2013 em virtude de "o risco de coágulos de sangue com risco de vida e estreitamento grave dos vasos sanguíneos". A suspensão foi parcialmente, retirada em 20 de dezembro de 2013.<sup>1011</sup>

<sup>10</sup>[www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm373040.htm&usg=ALkJrh0WB0KjT3y2IScucWmtIpzQ-rkQA](http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm373040.htm&usg=ALkJrh0WB0KjT3y2IScucWmtIpzQ-rkQA).  
Acessado em novembro 2014

<sup>11</sup><http://www.nytimes.com/2013/11/01/business/serious-danger-of-blood-clots-halt>.  
Acessado em novembro 2014

### 3 MÉTODOS E MATERIAIS

Desde os anos 1980, o processo de descoberta e planejamento de fármacos foi profundamente afetado pelo surgimento de novos métodos e tecnologias. Com as melhorias nas técnicas experimentais de cristalografia de raios-X e RMN, a quantidade de informações a respeito de estruturas 3D de alvos biomoleculares aumentou dramaticamente (WANG; GAO; LAI, 2000).

#### 3.1 MÉTODOS

Os métodos atuais para desenho de fármacos podem ser divididos basicamente em duas categorias. A primeira categoria é de ligantes "descoberta" de um determinado receptor, que é normalmente referida como a pesquisa de banco de dados. Neste caso, um grande número de moléculas é selecionado para encontrar aquelas que melhor fazem a interação com receptor. Alguns pesquisadores chamam esse método de "Rastreamento virtual". A vantagem da pesquisa de banco de dados é que são moléculas conhecidas, com maior facilidade de se obter meio de compra ou de síntese (WANG; GAO; LAI, 2000; WANG et al., 1998; KITCHEN et al., 2004).

A busca de moléculas candidatas a novos fármacos usando os métodos computacionais é muitas vezes realizada por *high throughput* de encaixe. Enquanto triagem virtual depende de compostos pré-existentes, desenho de novo candidato a fármaco, tem como objetivo em sua abordagem gerar novas moléculas usando analogia baseada na construção civil, os blocos de construção, que neste caso consiste em átomos individuais ou fragmentos que se juntarão para construção da molécula (DEY; CAFLISCH, 2008).

A função de pontuação tem grau de importância bastante importante, portanto deve ser precisa o suficiente para reconhecer em um tempo razoável as interações entre alvo e ligante de forma corretas de todos os modos putativos (DEY; CAFLISCH, 2008).

A identificação das cavidades da proteína é de essencial importância para uma variedade de aplicações, incluindo *docking* molecular. Esse procedimento deve ser feito examinando a proteína inteira podendo ser a superfície ou uma determinada parte específica da área da proteína alvo, Quanto mais detalhada for a descrição da cavidade, melhor será o resultado da interação proteína ligante. O *software* utiliza uma esfera sonda que navega na superfície da proteína para simular os processos cinéticos utilizados por pequenas moléculas durante a sua tentativa de se ligar a proteína (YUAN et al., 2011).

Contudo, estas abordagens estão limitadas pela precisão com a qual se pode medir a afinidade dos ligantes com a proteína. A classificação correta dos ligantes para a síntese é um pré-requisito para uma estratégia útil para a concepção de fármacos. Há uma clara necessidade de um método objetivo capaz de prever a afinidade de ligação de um complexo proteína-ligante de uma forma quantitativa. Prevendo a afinidade de ligação de um ligante a sua proteína alvo é um desafio científico no presente (VERDONK et al., 2011).

No que diz respeito ao cálculo das relações rigorosas de energias de ligação, o progresso substancial foi feito com perturbação de energia livre (FEP). O método de SCORE, usa uma função de pontuação empírica para descrever a energia livre de ligação, que inclui interações de Van der Waals, interações iônica e interações de hidrogênio entre outras entretanto usando formas de penalidade, quando as mesma não são favoráveis (DEY; CAFLISCH, 2008).

Dentro das limitações estruturais da proteína alvo, o LigBuilder 3.2 constrói passo a passo os ligantes usando uma biblioteca de fragmentos orgânicos. Várias operações, tais como crescimento, vinculação e mutação, têm sido implementadas para manipular estruturas moleculares. O usuário pode escolher entre crescer ou ligando estratégias para a construção ligando e um algoritmo genético é adotado para controlar toda a construção do processo. As afinidades de ligação dos ligantes são estimadas por uma função de pontuação empírica (WANG; GAO; LAI, 2000).

O fragmento é testado em milhares de posições diferentes com múltiplas orientações, cálculo de energia de ligação. A energia de ligação é a soma das interações Van Der Waals e a energia eletrostática entre outras. O tamanho do fragmento é fator primordial para o tempo

de cálculo. Quanto maior forem mais interações com proteínas e possivelmente mais ângulos de rotação deveram ser explorados, aumentando drasticamente o tempo de cálculo, modo geral o procedimento envolvendo o docking de fragmento pode ser visto na figura 3.1 (MAJEUX; SCARSI; CAFLISCH, 2001).

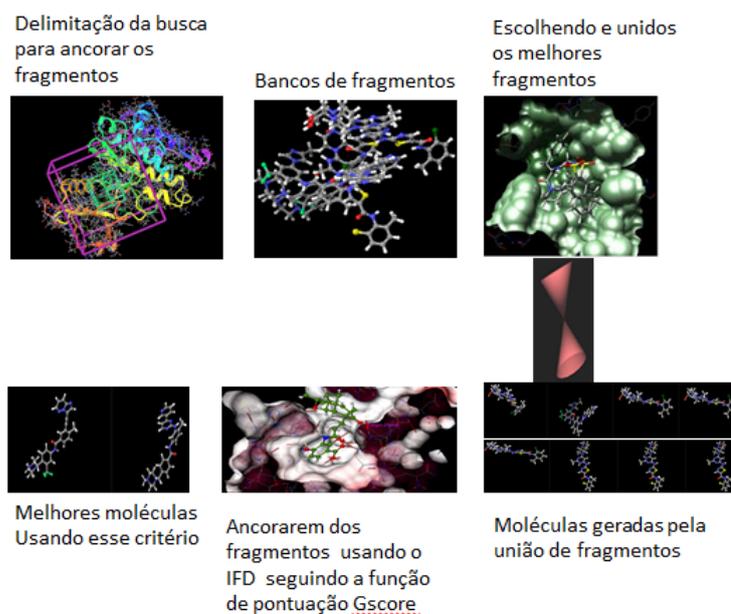


Figura 3.1 – - Estrutura de novos candidatos a fármacos  
fonte: Do autor.

Uma das principais razões para o fracasso de HTD em apontar resultados significativos, é que na maioria dos métodos de aproximação, os receptores são rígidos, ou seja não leva em conta a flexibilidade da proteína, como existe no modo natural. O cálculos levando em conta a flexibilidade da proteína era impraticável devido a limitações dos computadores; entretanto com avanço da tecnologia, esses cálculos já podem ser considerados, mas não no receptor em geral mas, pelos menos, na parte onde o ligante irá se acoplar, conferindo nessa região uma semi- flexibilidade (KITCHEN et al., 2004; VASS; KESER, 2013).

### 3.2 DOCKING

O *docking* é um procedimento automático capaz de pesquisar o espaço conformacional do ligante e a sua posição e orientação no local da ligação através de uma função de pontuação.

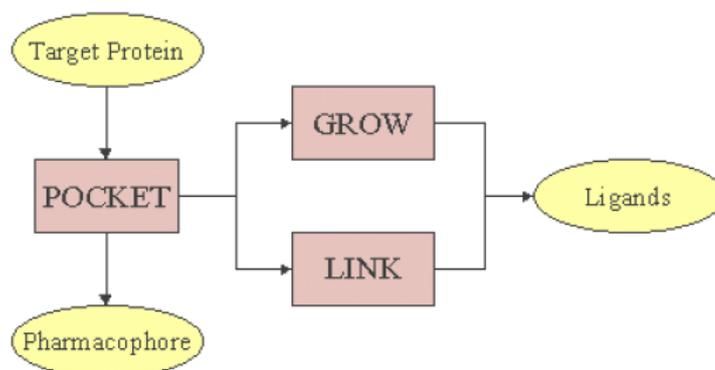


Figura 3.2 – - *linker* e crescimento.  
 Fonte:(WANG; GAO; LAI, 2000).

Esta última deve ser precisa o suficiente para reconhecer, em um tempo razoável, o modo correto de ligação entre todos os modos putativos (HAIDER; BERTRAND; HUBBARD, 2010).

No campo da modelagem molecular, o *docking* é um método que prevê a orientação preferida de uma molécula de forma rápida quando ligados um ao outro formando um complexo estável (KITCHEN et al., 2004). O conhecimento da orientação preferida por sua vez pode ser utilizado para prever a afinidade de ligação entre duas moléculas, *docking* é um termo usado para esquemas computacionais que tentam encontrar a "melhor" correspondência entre duas moléculas: um receptor e um ligante (HALPERIN et al., 2002).

Nesta era pós-genômica, a investigação concentra-se cada vez mais na proteômica. Esforços experimentais e computacionais são dedicados à geração e análise de grande escala de informações derivadas de estruturas 3D e dinâmica de proteínas, com o objetivo do avanço científico e comercial na descoberta de novos fármacos (YUAN et al., 2011).

O primeiro programa computacional desenvolvido para análise da superfície da proteína tinha como base as interações Van der Waals. Este parâmetro é usado atualmente entretanto com complemento de vários que se possível mensurar computacionalmente. O programa pioneiro a ser utilizado em ancoragem molecular foi o DOCA (HALPERIN et al., 2002).

O reconhecimento molecular da proteína e do ligante estão baseados na complementaridade das características físico-químicas e estruturais das moléculas que se interagem. As características físico-químicas definem o grau de afinidade e de especificidade do ligante pela

proteína, e estão relacionadas com as interações intermoleculares existentes no complexo (RODRIGUES et al., 2012).

Um dos maiores problemas enfrentados pelo *docking* molecular é dar flexibilidade a proteína é um número grande de graus de liberdade a serem explorados, resultando 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 (VERLI, 2014).

### 3.2.1 *Docking* de fragmentos

Os métodos baseados em fragmento surgiram como uma nova estratégia para a descoberta de fármacos (SCHULZ; HUBBARD, 2009). O crescente número de estruturas tridimensionais de enzimas e receptores farmacologicamente relevantes está estimulando um forte interesse em abordagens computacionais para o desenho de fármacos utilizando a informação estrutural (HAIDER; BERTRAND; HUBBARD, 2010).

Fragmentos são compostos de baixo peso molecular (100 – 250 Da) e de baixa complexidade, que são capazes de fazer melhores interações com o alvo. Tal estratégia tem vantagens sobre os métodos tradicionais na busca de novos ligantes com eficiências superiores (VASS; KESER, 2013).

O termo "fragmento" tem uma analogia como os blocos de construção utilizados no processo de construção civil. A lógica deste algoritmo reside no fato das estruturas orgânicas podem ser desmontadas em fragmentos químicos básicos (YUAN et al., 2011).

A proteína tirosina quinase tem um sítio de ligação bastante alongado para dentro da proteína em forma de L, o *docking* de fragmentos vem como uma boa opção para esses casos pois o cálculo é feito com fragmentos em cada parte do sítio, possibilitando encontrar a melhor molécula.

A base do *docking* de fragmento formam interações altamente favoráveis com a proteína; em outras palavras estes fragmentos fazem ligações mais fortes com o receptor e cada fragmento

se liga em várias posições até encontrar a orientação correta dentro da proteína com melhor interação, não se prendendo a algumas restrições químicas, como estereoquímica dos ligantes. Os fragmentos com pontuação mais baixa que o parâmetro de corte são descartados (KOLB; CAFLISCH, 2006).

Nesse caso, as moléculas dos ligantes são construídas dentro dos limites da cavidade de ligação, a montagem é de forma gradual com pequenos pedaços. Estas peças podem ser tanto átomos ou fragmentos maiores (WANG; GAO; LAI, 2000).

Alguns fragmentos por característica química como: interações de hidrogênios entre outras podem agir como ácido e base de Lewis, podendo se ligar mais facilmente com o sitio de ligação, essas propriedades são cruciais para o atracamento molecular, portanto indispensáveis em qualquer biblioteca de fragmentos, compostos como por exemplo: -OH, -CH<sub>3</sub>, -CX<sub>3</sub><sup>1</sup>, -SO<sub>3</sub>H, CHO, NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, e SH) são mesclados entre outros tendo obrigatoriamente na molécula a ser gerada (KOLB; CAFLISCH, 2006).

O *docking* de fragmento enfrenta algumas dificuldades importantes como: a promiscuidade de alguns fragmentos na suas interações, o fragmento pode se ligar a lugares onde ele não foi projetado para estar, mesmo com o aumento da molécula o atracamento pode ocorrer de várias formas distintas, podendo ser muito diferentes das quais a molécula foi arquitetada (CHEN; SHOICHET, 2009).

### 3.2.2 *Builder (Linker)*

Este método consiste, em primeiro lugar em colocar um único fragmento no local da ancoragem e medir sua interação com a proteína alvo; em seguida é adicionado os demais, identificando e pontuando cada fragmento e testado em toda cavidade, os de menores interações são descartados. O programa pontua e identifica os fragmentos para que os mesmos não possam ser usados indefinidamente (VASS; KESER, 2013).

Um das desvantagens da utilização desse método é que, mesmo uma pequena biblioteca de fragmentos, para que todos os fragmentos sejam testado em todas as posições envolveria um esforço computacional exacerbado. Esse problema agrava com aumento da cavidade

---

<sup>1</sup>X pode ser qualquer halogênio

aumentaria exponencialmente os cálculos. Os fragmentos são escolhidos estatisticamente pelo método de monte carlo<sup>2</sup>. Para minimizar o problema e suma importância o qualificar a biblioteca e diminui-la, mas com fragmentos mais relevantes, dessa forma tornando os resultados melhores que uma biblioteca com grande números de fragmento, na composição de bom candidato a fármaco, como mostra a figura3.3 (TEOTICO et al., 2009; CHEN; SHOICHET, 2009).

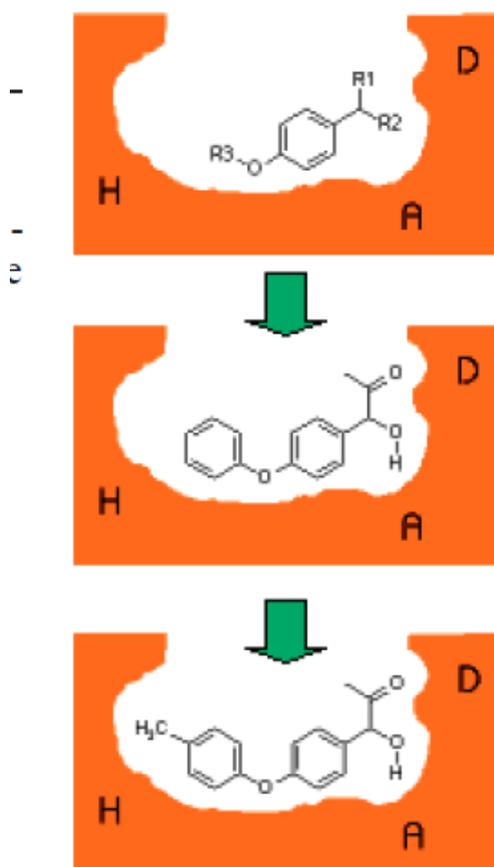


Figura 3.3 -- O método de Linker.  
Fonte: (WANG; GAO; LAI, 2000).

<sup>2</sup>Designa-se por método de Monte Carlo (MMC) qualquer método de uma classe de métodos estatísticos que se baseiam em amostragens aleatórias massivas para obter resultados numéricos, isto é, repetindo sucessivas simulações um elevado número de vezes, para calcular probabilidades heurísticamente, tal como se, de facto, se registassem os resultados reais em jogos de casino (daí o nome). Este tipo de método é utilizado em simulações estocásticas com diversas aplicações em áreas como a física, matemática, biologia Química.

### 3.2.3 *Builder* (Construção)

Este método pode ser classificado de acordo com diferentes critérios, tais como blocos de construção molecular, espaço químico, busca estratégia (por exemplo, algoritmo evolutivo ou simulação de Monte Carlo). A pontuação do método utilizado para avaliação das moléculas desenhadas (por exemplo, campo de força, função empírica de pontuação, ou similaridade molecular (YUAN et al., 2011). Como o método anterior, o método de construção também é feito na cavidade ou local do atracamento molecular (YURIEVA; AGOSTINOVA; RAMSLANDB, 2010).

A recém estrutura formada irá servir como estrutura de sementes para o próximo ciclo de crescimento. Como acontece na estratégia de ligação, o processo de construção também começa a partir de uma estrutura de semente pré-colocada. No entanto, neste caso, a estrutura de sementes consiste em várias peças separadas que foram posicionadas para maximizar as interações com a proteína alvo (WANG; GAO; LAI, 2000).

Embora a diversidade de estruturas orgânicas seja infinita, o número de fragmentos de base é bastante limitado. Os fragmentos utilizados por LigBuilder estão listados e marcados para que sejam reutilizado na mesma posição. Todos eles podem ser classificados em duas categorias: os grupos químicos e anéis. Nesta biblioteca, há também alguns fragmentos complexos, tais como acetona, que pode ser decomposto em mais fragmentos elementares. O usuário tem permissão para editar a biblioteca de blocos de construção para determinar quais são os fragmentos irão ser utilizados na construção do ligante; é também permitido adicionar novos fragmentos a esta biblioteca como mostra a figura 3.4 (TEOTICO et al., 2009).

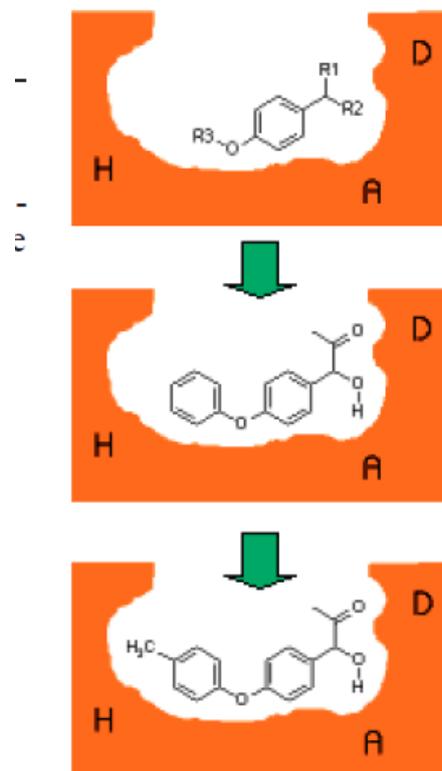


Figura 3.4 -- Método de construção.  
Fonte: (WANG; GAO; LAI, 2000).

### 3.3 ALGORÍTIMO GENÉTICO

Os algoritmos genéticos (AGs) é um algoritmo genético (AG) é uma técnica de busca utilizada na ciência da computação para achar soluções aproximadas em problemas de otimização e busca, fundamentada, principalmente pelo americano John Henry Holland. Algoritmos genéticos são uma classe particular de algoritmos evolutivos que usam técnicas inspiradas pela biologia evolutiva como hereditariedade, mutação, seleção natural e recombinação (ou *crossing over*) (MAULIK; BANDYOPADHYAY, 2000) como mostra a figura 3.5. Algoritmos genéticos são implementados como uma simulação de computador em que uma população de representações abstratas de solução é selecionada em busca de soluções melhores. A evolução geralmente se inicia a partir de um conjunto de soluções criado aleatoriamente sendo realizada por meio de gerações. A cada geração, a adaptação de cada solução na população é avaliada, alguns indivíduos são selecionados para a próxima geração, e recombinados ou mutados para formar uma nova população. A nova população então é utilizada como entrada para a próxima iteração do algoritmo (JONE et al., 1997)

Em geral, usa-se o algoritmo de seleção por "roleta", onde os indivíduos são ordenados de acordo com a função-objetivo e lhes são atribuídas probabilidades decrescentes de serem escolhidos probabilidades essas proporcionais à razão entre a adequação do indivíduo e a soma das adequações de todos os indivíduos da população. A escolha é feita então aleatoriamente de acordo com essas probabilidades. Dessa forma conseguimos escolher como pais os mais bem adaptados, sem deixar de lado a diversidade dos menos adaptados. Outras formas de seleção podem, ainda, ser aplicadas dependendo do problema a ser tratado. Como exemplos pode-se citar a seleção por "torneio" (onde são selecionados diversos pequenos subconjuntos da população, sendo selecionado o indivíduo de maior adequação de cada um desses grupos), a seleção por "classificação" ou "ranking" (semelhante à seleção por "roleta", com a diferença de que a probabilidade de seleção é relacionada à sua posição na ordenação dos indivíduos da população e não à sua adequação em si) e a seleção por "truncamento" (onde são selecionados os melhores indivíduos da população, descartando-se os outros (RAREY et al., 1996).

Em um programa de *Docking*, são geradas poses, as que são favoráveis evoluem e pas-

sada para a próxima geração. As desfavoráveis são eliminadas. Dessa forma tenta-se minimizar o custo operacional diminuindo o tempo de procura por fragmentos ou molécula que possam se ligar com eficiência à proteína alvo, sem que os melhores fragmentos sejam desperdiçados em bibliotecas maiores de fragmentos (YURIEVA; AGOSTINO; RAMSLAND, 2010).

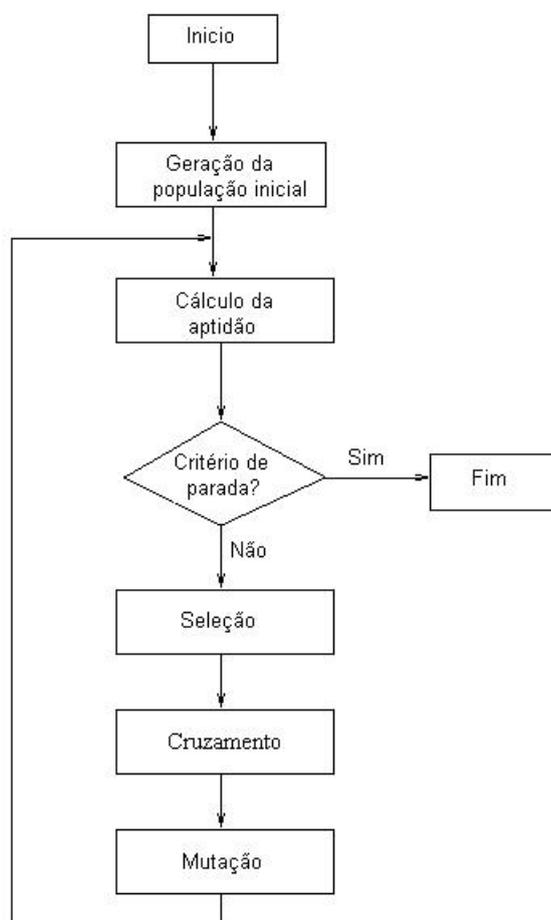


Figura 3.5 -- Exemplo do fluxograma do AG.

### 3.4 FUNÇÃO DE PONTUAÇÃO (GScore)

Nos campos da química computacional e modelagem molecular, funções de pontuação são métodos rápidos, aproximados, utilizados para prever a resistência da não covalente interação (também referido como ligação de afinidade) entre duas moléculas, depois de terem sido encaixadas. Mais comumente uma das moléculas é um composto orgânico pequeno, tal como um fármaco e a segunda é alvo biológico do fármaco tal como uma proteína do receptor. Funções

de pontuação também foram desenvolvidas para prever a resistência de outros tipos de intermoleculares interações, por exemplo, entre duas proteínas (LENSINK; MENDEZ; WODAK, 2007; ROBERTSON; VARANI, 2007).

A função de pontuação deve ser suficientemente rápida para permitir sua aplicação a um grande número de procedimentos envolvidos no atracamento. A função de pontuação deve incluir de forma adequada penalidades quando o atracamento não for favorecido. A função de pontuação busca situações onde o mínimo de energia foi encontrado, tornando o complexo mais estável, este fato é semelhante a topografia de terreno, onde pode ter vários mínimos locais (HALPERIN et al., 2002).

### 3.5 Propriedades ADME - QIKPROP

Propor novos fármacos não é um processo simples, porque é preciso cerca de 15 anos e o investimento chega aproximadamente até US 800 milhões. A cada ano, apenas cerca de 20-30 medicamentos recebem aprovação FDA. Como relatado, os fármacos podem ter mais do que um alvo, e esta é uma das razões pelas quais ocorrem efeitos colaterais (XU et al., 2014). Um fenômeno comum no projeto de candidato a fármaco, é a geração de moléculas grandes com maior tamanho molecular afim de alcançar toda a cavidade do receptor e fazer o máximo de interações possíveis. No entanto esse procedimento tende fornecer resultados enganosos chamando de falso positivos e interações chave entre proteína e ligante podem ser negligenciadas (YUAN et al., 2011).

Quase 40% dos candidatos a fármacos falham em ensaios clínicos devido às propriedades ADME (**A**bsorção, **D**istribuição, **M**etabolismo e **E**xcreção). A capacidade de detectar os candidatos problemáticos de forma precoce pode reduzir drasticamente a quantidade de tempo e recursos desperdiçados, e agilizar o processo de desenvolvimento global<sup>3</sup>.

O aumento dos custos de descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos, em parte devido à taxa elevada de candidatos a fármacos em desenvolvimento<sup>3</sup>, levou a uma nova estratégia de avaliação paralela da eficácia e das propriedades biofarmacêuticas dos candidatos. A análise de alguns projetos revelou que a principal causa para o fracasso do fármaco

---

<sup>3</sup><http://www.schrodinger.com/QikProp>. Acessado em julho/2014

na fase de desenvolvimento foi a farmacocinética inadequada das propriedades como ADME insatisfatórias (LIPINSKI et al., 2001).

O programa QikProp (da suite Schrodinger) calcula os valores das propriedades ADME e permite a sua comparação com as propriedades de 95% das fármacos conhecidas.

Nos últimos anos, grande ênfase tem sido direcionada à caracterização de propriedades *drug-like*, incluindo a Regra dos Cinco de Lipinski (WILLETT, 2006b), com o intuito de minimizar o risco de seleção de moléculas com a atividade biológica desejada, mas que são inadequadas do ponto de vista de propriedades muito importantes em farmacoterapia, tais como: biodisponibilidade, permeabilidade, absorção, metabolismo, excreção e toxicidade. A escolha de uma biblioteca virtual de compostos com propriedades consistentes com o conceito *drug-like* pode reduzir o tempo do ciclo de desenvolvimento e minimizar a inviabilidade de aplicação terapêutica de moléculas bioativas por inadequação de propriedades farmacocinéticas e/ou toxicidade acentuada, propriedades estas que representam o principal gargalo no insucesso de candidatos a fármacos (RODRIGUES et al., 2012).

### 3.6 MATERIAL

A estrutura foi baixada do PDB usando recursos de busca e filtragem do PDB, as estruturas encontradas da tirosina quinase Bcr-Abl na forma selvagem (código PDB: 3QRI; resolução de 2,1 Å) e com a mutação T315L (código PDB: 3QRJ, resolução de 1,82 Å).

#### 3.6.1 Busca das estruturas cristalográfica da tirosina quinase

A posição dos aminoácidos da proteína 3QRI condizia com a posição descrita na literatura. Uma nova estrutura da tirosina quinase foi encontrada com melhor resolução igual a 1,75 Å (código do PDB: 1OPJ), porém as numerações dos aminoácidos não condiziam com a numeração descrita na literatura, devido ao fato da 1OPJ ser uma proteína murina. Nessa última estrutura foram usados para fazer as mutações encontradas na literatura e posterior *docking* de fragmentos. Usando o programa *Multiple Sequence Viewer* realizou-se o alinhamento das seqüências das estruturas 3QRI e 1QRJ, verificando-se que são homologas como mostrado

na figura 3.6. Entretanto, para validar a escolha da 1OPJ foi realizado um alinhamento estrutural como mostra a figura 3.7, o que confirmou a sobreposição visual das proteínas, e calculado o RMSD entre as proteínas, obtendo o valor de 1.5769 Å. Apenas uma pequena região inicial das enzimas não se alinharam bem, mas as demais regiões estão bem alinhadas. Todos os resíduos de ambos os sítios ativos são idênticos, portanto os dados de *docking* obtidos para a 1OPJ podem ser extrapolados para a 3QRI. Porém, quando se abre o arquivo fornecido pelo PDB nota-se que os aminoácidos estão com uma pequena alteração na sua numeração. Na figura 3.6 apresentamos o alinhamento das duas estruturas mostrando a similaridade entre ambas.

```

1OPJ_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      GAMDPSSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKI 50
1OPJ_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      GAMDPSSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKI 50
3QRI_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      TSM DPSSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKI 50
3QRI_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      TSM DPSSPNYDKWEMERTDITMKHKLGGGQYGEVYEGVWKKYSLTVAVKI 50
:*****

1OPJ_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGN 100
1OPJ_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGN 100
3QRI_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGN 100
3QRI_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKEDTMEVEEFLKEAAVMKEIKHPNLVQLLGVCTREPPFYIITEFMTYGN 100
*****

1OPJ_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LLDYLFECNRQEVSAVVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVG 150
1OPJ_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LLDYLFECNRQEVSAVVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVG 150
3QRI_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LLDYLFECNRQEVNAVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVG 150
3QRI_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LLDYLFECNRQEVNAVLLYMATQISSAMEYLEKKNFIHRDLAARNCLVG 150
*****

1OPJ_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDV 200
1OPJ_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDV 200
3QRI_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDV 200
3QRI_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      ENHLVKVADFGLSRLMTGDTYTAHAGAKFPIKWTAPESLAYNKFSIKSDV 200
*****

1OPJ_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      WAFGVLLWEIATYGMSPYFGIDLSQVYELLEKDYRMERFEGCPEKVEYELM 250
1OPJ_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      WAFGVLLWEIATYGMSPYFGIDLSQVYELLEKDYRMERFEGCPEKVEYELM 250
3QRI_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      WAFGVLLWEIATYGMSPYFGIDLSQVYELLEKDYRMERFEGCPEKVEYELM 250
3QRI_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      WAFGVLLWEIATYGMSPYFGIDLSQVYELLEKDYRMERFEGCPEKVEYELM 250
*****

1OPJ_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      PACWQNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGKRGT 293
1OPJ_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      PACWQNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQESSISDEVEKELGKRGT 293
3QRI_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      PACWQNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQE----- 277
3QRI_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      PACWQNPSPDRPSFAEIHQAFETMFQE----- 277
*****

```

Figura 3.6 – Alinhamento das sequências das proteínas 1OPJ e 3QRI.

Fonte: DO AUTOR

### 3.7 ARQUITETANDO AS MUTAÇÕES NA TIROSINA QUINASE

Para fazer as mutações na estrutura escolhida, 1OPJ, foi preciso saber qual os números dos aminoácidos comparados com os referidos na literatura. A equivalência da numeração dos aminoácidos foi feita manualmente, na proteína 1OPJ, cuja sua enumeração começou exatamente 19 aminoácidos antes que 3QRI. A figura 3.8 mostra esquema do procedimento de mutação. Este procedimento foi feito com as 16 mutações mais frequente apontada pelo litera-

Alinhamento das Proteínas  
1OPJ E 3QRI

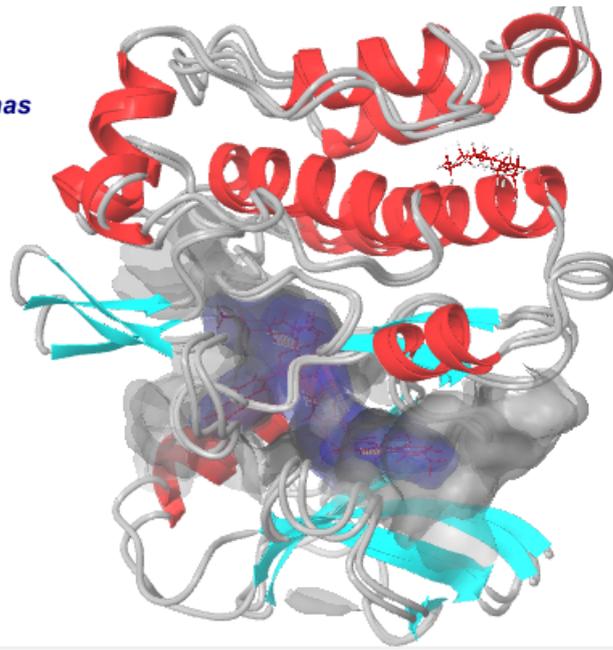


Figura 3.7 – - Alinhamento estrutural das proteínas 1OPJ e 3QRI.  
Fonte: DO AUTOR

tura.

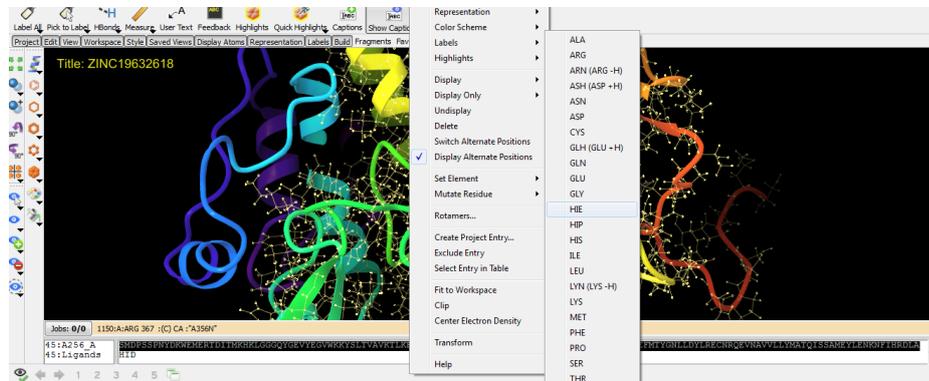


Figura 3.8 – - Procedimento para realizar as mutações. Fonte: DO AUTOR

A nomenclatura das mutações segue um padrão. Por exemplo o código M263V, representa uma mutação na qual a vanila entrou no lugar da metionina. Ainda que substituído na IOPJ foi utilizada a nomenclatura usada na literatura para a estrutura 3QRI. No anexo 6.3 A apresentamos na tabela A.2 os códigos das mutações.

### 3.8 PREPARAÇÃO DA PROTEÍNA

Para fazermos o *docking* é necessário que a estrutura da proteína esteja correta. Isto nem sempre acontece com os arquivos obtidos a partir do PDB. Para corrigir a estrutura da proteína é usado então o protocolo *Protein Preparation Wizard* implementado na suite Schrodinger versão 9.3 a traves da interface Maestro. Este protocolo adiciona átomos de hidrogênio, corrige as cargas elétricas dos átomos, completa as cadeias, etc. Na figura 3.9 mostramos a parte da configuração deste protocolo.

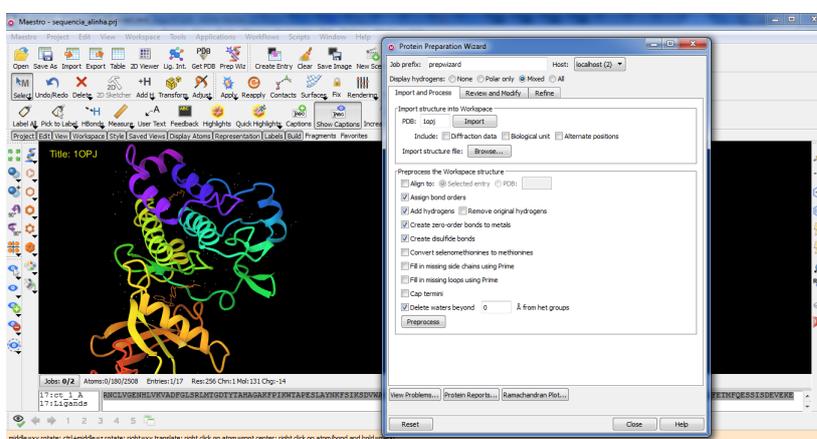


Figura 3.9 – Preparando a proteína para a realização do *docking*.  
Fonte: DO AUTOR

### 3.9 GRID BOX

Para definirmos o sítio onde será realizado o *docking*, é necessário definir o *grid box*. O *grid box* consiste numa grade tridimensional usada para o cálculo da energia de encaixe e interação. Esta grade delimita o local de busca, permite poupar tempo para que o programa não tenha que fazer a procura em toda a proteína. Geralmente a grade fica no sítio ativo da estrutura alvo. O volume de grade deve ser grande o suficiente para permitir que o ligante para rodar livremente (MUKHERJEE et al., 2005). O ligante que está presente na estrutura da proteína baixada do PDB, pode ser usado como referência para a criação da grade de trabalho atual (vide figura 3.10).

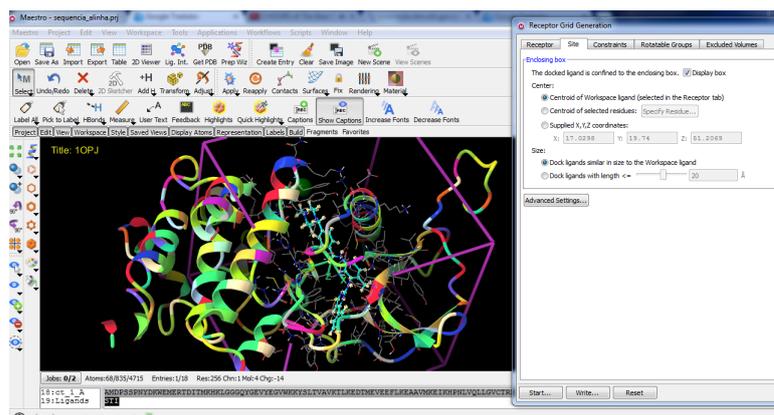


Figura 3.10 – - Delimitação da proteína buscando o melhor encaixe.  
Fonte: DO AUTOR

### 3.10 GERANDO MOLÉCULAS USANDO O *DOCKING* DE FRAGMENTOS

Os elementos essenciais dessa abordagem *in silico* são a preparação da proteína (apresentada na seção 3.8), a definição da grade onde os fragmentos serão colocados (seção 3.9) o procedimento de acoplamento dos fragmentos e a pontuação baseado em energia e campo de força.

O programa *LigBuilder* construe moléculas dentro das limitações da proteína alvo. *LigBuilder* ofereceu um suporte para estratégias como Crescimento e linker. Para aplicar a estratégia de crescimento, foi fornecida uma estrutura "semente" que foi pré-colocada no interior da bolsa de ligação. Para tal processo o programa usa uma ferramenta chamada *CAVITY*; O *CAVITY* é programa para detecção local de ligação da proteína. A identificação da localização dos sítios de ligação. Ele usa o método puramente geométrico para encontrar sítio de ligação do ligante e a proteína. *LigBuilder* posteriormente adicionou os fragmentos para que ele possa construir as moléculas. Esta estratégia é útil porque já recortada a molécula de Imatinibe e Ponatinibe. O programa já possuía inicialmente uma biblioteca de fragmentos. *LigBuilder* gerou mais 6000 moléculas utilizando os métodos de Crescimento e Ligação, tanto para as sementes do Imatinibe e Ponatinibe. Entretanto, houve a geração de quase 2900 moléculas iguais, ou seja um método chegou a mesma molécula do outro método, esse resultado mostra que os métodos tendem caminhos diferentes com resultados parecidos. Arquivos usados para execução

da tarefa: .

1. *POCKET-ATOM-FILE*: O arquivo correspondente base de dados do *CAVITY*.
2. *POCKET-GRID-FILE*: O arquivo correspondente base de dados do *CAVITY*.
3. *SEED-LIGAND-LIST*: A lista de arquivos Mol2 que apresentam as estruturas de "semente". Já mencionado acima. Isso é absolutamente necessário para o modo de cultivo e modo de vinculação porque a "semente" é a mãe de todas as moléculas resultantes
4. *ADD-HSPC*: *YES*: Corrigir todos os átomos de hidrogênio da estrutura descendência como o local de cultivo.. *NO*: Utilize apenas sites de crescimento definidos pelo usuário.
5. *CONTINUE-MODE*: *YES*: continuar com as sementes e os resultados anteriores. *No*: Substituir resultados e sementes regeneradas.
6. *MOLECULE-NUMBER*:. O objetivo da tarefa de design 100K, pelo menos, o padrão 1M.

Entretanto, o programa *LigBuilder* usa algum tipo de pontuação para ranquear as moléculas, esse critério foi dispensado, e as moléculas geradas foram submetidas *docking* usando outro programa o *Glide*, afim de quantificar as interações entre a proteína e as moléculas geradas. Esse processo se estendeu por todas as mutações citadas neste trabalho.

A quantificação da interação dos fragmentos com a proteína é feita usando-se a função de avaliação implementada no *Glide*, o *GlideScore*. Esta função de avaliação pontua a interação usando uma combinação linear de diferentes elementos como energia de Van der Waals (vdW), energia Coulombiana (Coul), contribuição lipofílica (Lipo), interação de hidrogênio (HBond), entre outras. A expressão 3.1 define o *GScore*<sup>4</sup>:

$$GScore = 0,05 * vdW + 0,15 * Coul + Lipo + HBond + Metal + Rewards + RotB + Site \quad (3.1)$$

Do ponto de vista prático, para efetuar a comparação entre duas moléculas é necessário empregar um padrão de medida, também conhecido como coeficiente de similaridade, o qual

---

<sup>4</sup>Manual do *Glide*

quantificará o grau de semelhança entre as entidades químicas avaliadas. Existem inúmeros coeficientes de medida, sendo que o mais empregado em triagens virtuais é o coeficiente de Tanimoto (WILLETT, 2006a).

O termo "a" representa o número de características presentes em uma molécula A e ausente em uma molécula B, o termo "c" representa o número de características presentes em B; mas ausentes em A, o termo "d" representa o número de características comuns às moléculas A e B. Outro termo aparece nas fórmulas de medidas de similaridade que o o termo "d". Este termo representa o número de características que está ausente em ambas as moléculas (RODRIGUES et al., 2012).

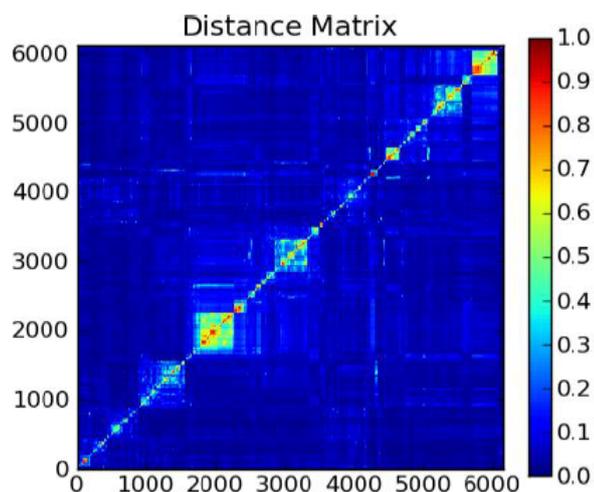


Figura 3.11 – - Diversidade das moléculas.  
Fonte: DO AUTOR

Expressão matemática para o coeficiente Rogers/Tanimoto

$$(C + D) / (2A + 2B + C + D) \quad (3.2)$$

O coeficiente de Tanimoto, por exemplo, fornece valores de comparação na faixa de 0 (zero) a 1. O valor de 0 (zero) significa que não há similaridade entre as moléculas comparadas, já o valor de 1 denota 100% de similaridade, ou seja, como as características moleculares mapeadas representam uma marca única (P, 2010;50)

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

*docking* molecular feito com *Glide* confirmou algumas situações que a literatura já descrevia.

### 4.1 DOCKING ENTRE A PROTEÍNA SELVAGEM E MUTADA COM OS PRINCIPAIS FÁRMACOS

No intuito de comparar os *Gscores* dos fármacos mais citadas na literatura para controle e manutenção da LMC com as moléculas geradas pelo *docking* de fragmentos, realizou-se o *docking* com esses principais fármacos e as estruturas selvagem e mutadas da tirosina quinase. O *GScore* (em kcal/mol) é apresentado na tabela 4.1.

O *docking* molecular feito com *Glide* confirmou algumas situações que a literatura já descrevia. A primeira é a proteína na forma selvagem. Todos os quatro fármacos tem bom resultado, principalmente o Imatinibe, confirmando como medicamento de primeira linha a segunda observação, o Nilotinibe tem em muitas proteínas mutadas melhor resultado que Ponatinibe, como mostra a tabela 4.1; Entretanto existe uma contradição interessante nesta tabela e relação a literatura, o Dasatinibe é um composto descrito na literatura como potente inibidor, com ação de 300 vezes mais potente que o Imatinibe, teste *in vitro* (DELAMAIN; CONCHON, 2008), neste caso apresenta um *GScore* bem inferior ao mesmo, como pode ser visto com maior nitidez representado na figura 4.1 ; Ainda assim, outra questão foi confirmada, a debilidade dos inibidores tirosina quinase frente à mutação T315I, com exceção do Ponatinibe.

Tabela 4.1 – Resultado de *docking* molecular feito com programa *Glide*, entre os principais fármacos encontrados no mercado e as diferentes variações da tirosina quinase. Os valores numéricos representam as energias de interação entre a proteína alvo e ligante, valores expressos em Kcal/mol. Fonte: DO AUTOR.

Proteína	Imatinibe	Dasatinibe	Nilotinibe	Ponatinibe
IOPJ	-13.955	-9.079	-13.631	-12.961
T315I	-11.922	-7.223	-4.892	-13.313
T315A	-13.054	-9.901	-13.487	-13.086
L248R	-12.223	-9.897	-12.155	-12.915
Y253H	-12.237	-10.594	-11.510	-12.428
F359C	-7.016	-8.440	-11.794	-9.829
G250E	-13.701	-12.881	-13.882	-13.474
Q252H	-12.026	-11.038	-13.658	-13.252
E255K	-13.021	-9.273	-13.561	-13.645
V299L	-12.120	-13.908	-11.032	-13.908
F317L	-11.179	-8.616	-12.901	-12.877
H396R	-13.016	-9.689	-14.120	-13.681
A356N	-13.844	-10.006	-13.590	-13.012
F359V	-11.613	-10.208	-11.815	-13.449
L387M	-13.747	-10.527	-13.629	-13.001
M244V	-13.156	-10.397	-13.511	-13.187
M351T	-13.967	-9.721	-13.477	-13.380

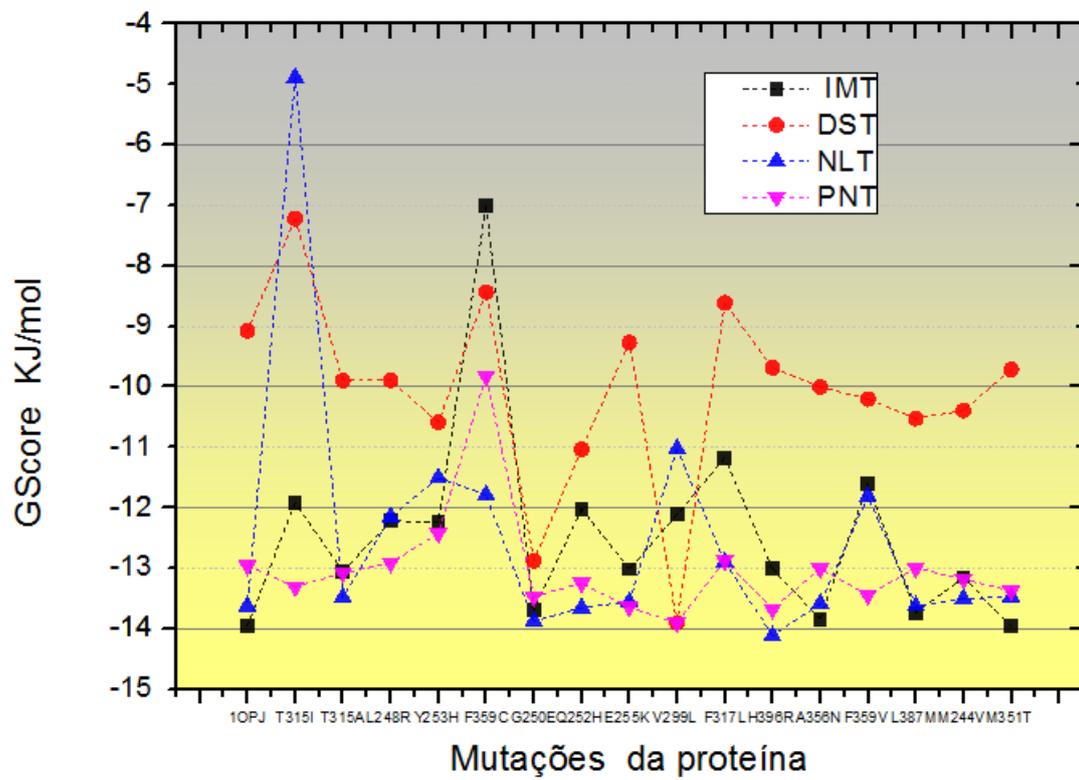


Figura 4.1 – - Gráficos dos principais TKI em função GScore. Fonte: DO AUTOR

#### 4.2 DOCKING DAS MOLÉCULAS COM PROTEÍNA NA FORMA SELVAGEM E AS 16 MUTAÇÕES MAIS CITADAS NA LITERATURA.

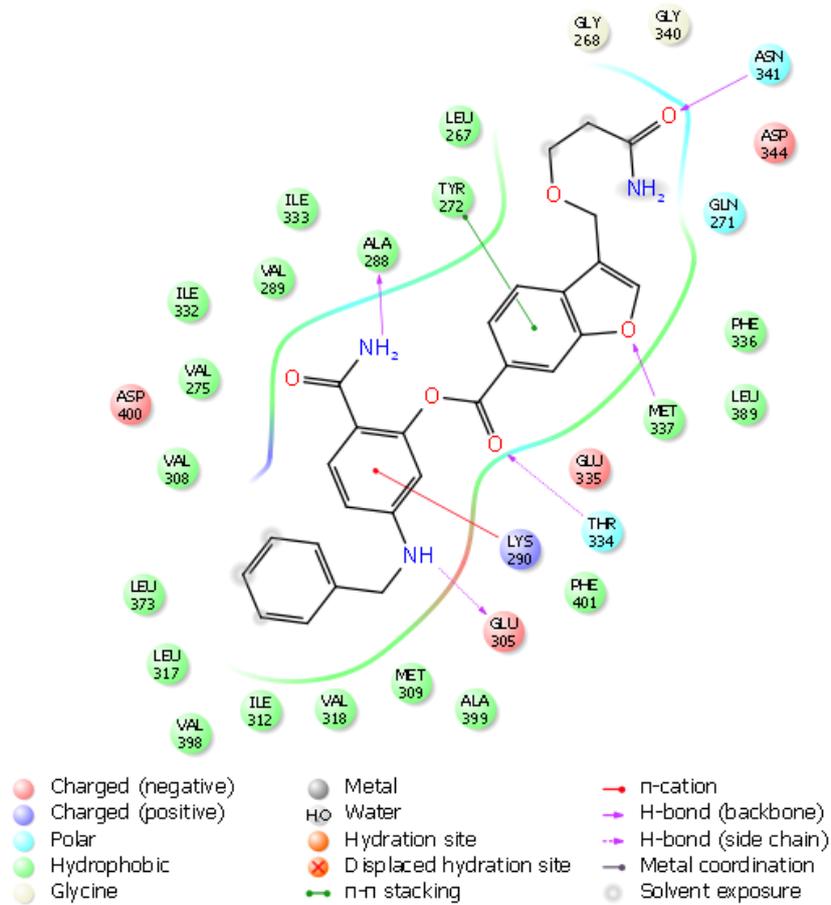
Usando os dois métodos obteve-se um total de mais de 6000 moléculas nos quadro abaixo estão o resultado de cada proteína selvagem e as principais mutações sugeridas pela literatura com esse universo de moléculas, para que não perca a referência foi colocado também os principais fármacos, os *docking* feito pelo *Glide* usando como critério o *GScore* em KJ/mol.

Essa primeira tabela é referente à proteína tirosina quinase Bcr-Abl 1OPJ. Para compor o quadro, foi escolhido 30 moléculas escolhidas pela sua melhor pontuação(*GScore*). Podendo comparar diretamente com moléculas: Imatinibe Dasatinibe Nilotinibe e Ponatinibe todas retirada do banco de dados *Zinc*. Os valor do *docking* feito com Imatinibe foi de  $-13.955$  KJ/mol, Nilotinibe foi de  $-13.631$  KJ/mol e o Ponatinibe foi  $-12.961$  KJ/mol. Na forma selvagem todos os fármacos testado tiveram um bom resultado.

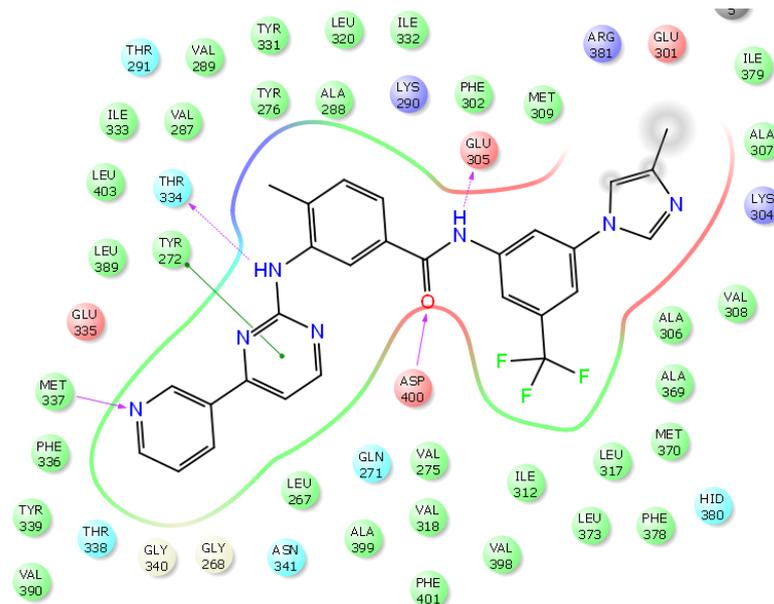
Tabela 4.2 – Valores do *GScore* do docking das moléculas proteína selvagem 1OPJ. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
680	-15.340	559	-14.363	730	-13.913
632	-15.332	702	-14.267	662	-13.906
681	-15.148	703	-14.166	791	-13.903
781	-15.132	688	-13.977	687	-13.875
782	-14.649	711	-13.977	715	-13.875
723	-14.601	764	-13.958	715	-13.844
721	-14.445	661	-13.949	766	-13.844
670	-14.394	647	-13.923	701	-13.801
700	-14.369	748	-13.922	732	-13.690
558	-14.367	773	-13.916	646	-13.688

O *docking* foi feito pelo *Glide* na proteína tirosina quinase Bcr-Abl, os valores de *GScore* apontam uma maior eficiência das moléculas geradas em relação aos principais fármacos, como mostra a Tabela 4.2. A molécula de número 680 foi a de melhor resultado; a figura 4.2 mostra a interações da molécula com a proteína como: 5 interações de hidrogênio, 1 interação  $\pi$ - $\pi$  e uma interação  $\pi$ -cátion. As interações feitas pelo melhor inibidor tirosina quinase Abl apontado foi o Ponatinibe, as interações demonstradas por esse inibidor estão presente na figura



(a)



(b)

Figura 4.2 – - A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 680 e a 1OPJ na forma selvagem, A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a 1OPJ na forma selvagem. Fonte: DO AUTOR

4.2, que são: 4 interações de hidrogênio e uma interação  $\pi$ - $\pi$ ; neste critério de observação comprova que a molécula 680 está mais firmemente ancorada no sítio de ligação da proteína. Entretanto, a molécula do Ponatinibe confirmando a tendência dos inibidores de segunda geração, interage diretamente com um resíduo 400 (aspartato) (AVILA et al., 2010).

Tabela 4.3 – Valores do *GScore* do docking das moléculas proteína mutada T315I. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
782	-13.571	676	-12.869	681	-12.502
687	-13.419	624	-12.852	791	-12.307
715	-13.419	647	-12.832	625	-12.293
688	-13.402	680	-12.803	632	-12.201
711	-13.402	764	-12.734	730	-12.130
781	-13.280	702	-12.728	670	-12.077
703	-12.960	558	-12.689	748	-12.061
674	-12.943	773	-12.673	634	-12.031
701	-12.916	700	-12.670	742	-11.962
675	-12.871	646	-12.575	559	-11.893

Os resultados do *docking* dessa mutação com Imatinibe confirmou pouca interação. O valor encontrado foi -11.922 KJ/MOL, seguido por pelo *GScore* de -7.223 KJ/MOL, do Dasatinibe, Contudo o Ponatinibe demonstrou um *GScore* de- 13.313 KJ/MOL, bem superior aos demais testados. Contudo, pelo menos 4 moléculas encontradas tiveram o resultado melhor que Ponatinibe, sendo essa mutação a mais agressiva, principal causa de óbitos.

A mutação T315I é hoje o principal alvo terapêutico, Essa modalidade da tirosina quinase Bcr-Abl não tem um fármaco que induz a sua inibição com segurança para o paciente. Usando os critérios já mencionados foram selecionados 30 moléculas dentre o universo de moléculas usadas. Estão foram selecionadas pelo seus *GScore*. Para que se tenha uma comparação foi realizado o *docking* dos principais fármacos. Neste caso, foi selecionada a molécula de número 782KJ/mol, com valor de *GScore* na ordem de -13.571KJ/mol, e o *GScore* do Ponatinibe -13.313KJ/mol, apesar de parecidos pelo valor de seus scores há diferenças sutis se comparados com cada uma das moléculas que estão dentro da proteína alvo. Como mostrado na figura 4.3 há mais interações de hidrogênio que na figura do fármaco Ponatinibe como mostra a figura 4.3, e mais interações  $\pi$ - $\pi$ , de modo geral a molécula 782KJ/mol possui maior interação que o Ponatinibe. Esta molécula está na tabela da proteína selvagem ficou ranqueada em 5<sup>o</sup> lugar com *GScore* de -14.649KJ/mol demonstrando ter condições de inibir, também na forma selvagem da proteína em questão.



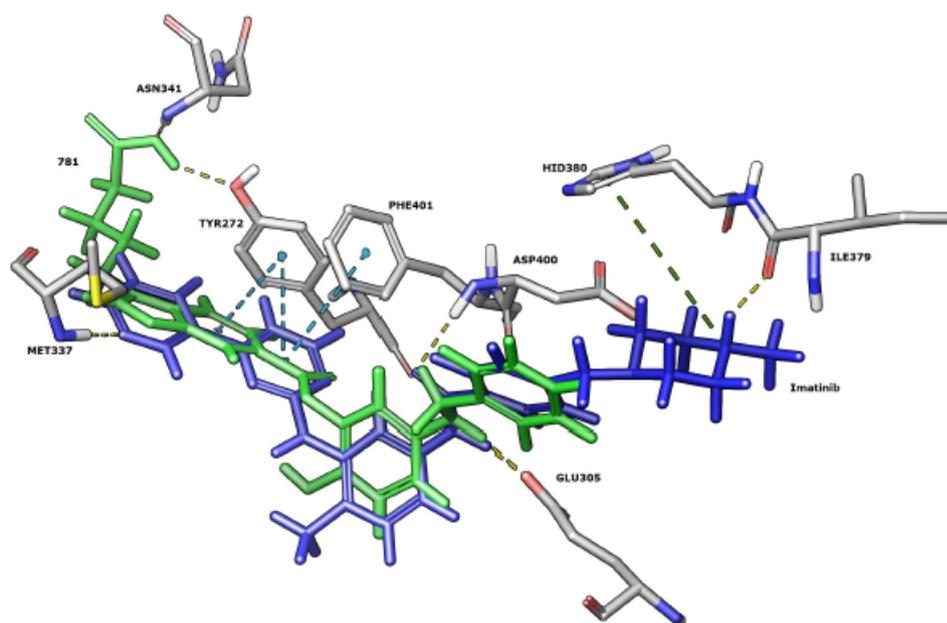


Figura 4.4 – - Molécula 781 em azul e molécula do ponatinibe em verde, dentro do bolso de ligação da T3151. Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.4 – - Valores do *GScore* do *docking* das moléculas proteína mutada T315A. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
688	-14.160	674	-13.654	755	-13.257
781	-14.093	675	-13.645	703	-13.238
711	-14.093	676	-13.641	558	-13.229
721	-14.038	734	-13.605	634	-13.046
687	-13.920	709	-13.572	730	-12.974
715	-13.920	684	-13.572	624	-12.896
751	-13.884	700	-13.348	766	-12.873
559	-13.764	773	-13.284	748	-12.858
782	-13.692	646	-13.282	670	-12.842
680	-13.671	701	-13.263	801	-12.837

Para referenciar realizando *docking* com Imatinibe o resultado foi de  $-13.054$  KJ/MOL, para o Dasatinibe foi de  $-9.901$  KJ/MOL, para O Nilotinibe é  $-13.487$  KJ/MOL e finalmente o encontrado para Ponatinibe foi  $-13.086$  KJ/MOL.

As moléculas geradas também nessa mutação tiveram um resultado melhor que os fármacos, demonstrando a força do universo de moléculas geradas.

A mutação T315A é um alvo importante, mas de menor importância quando compa-

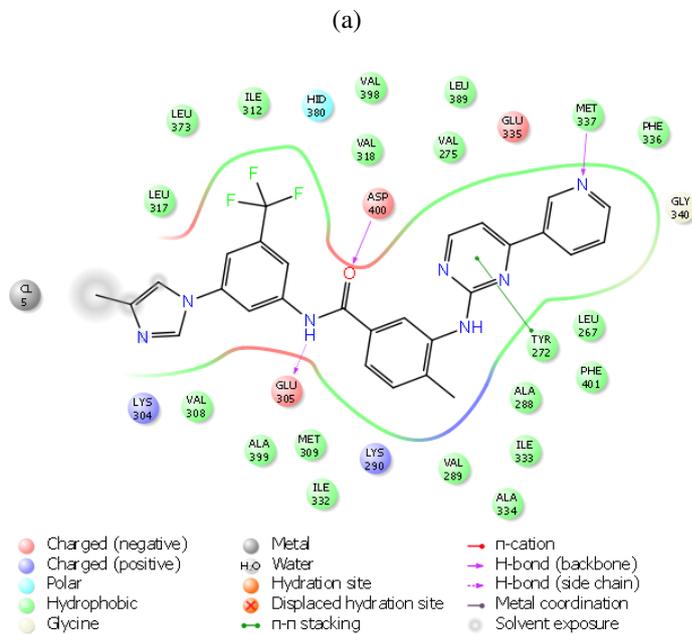
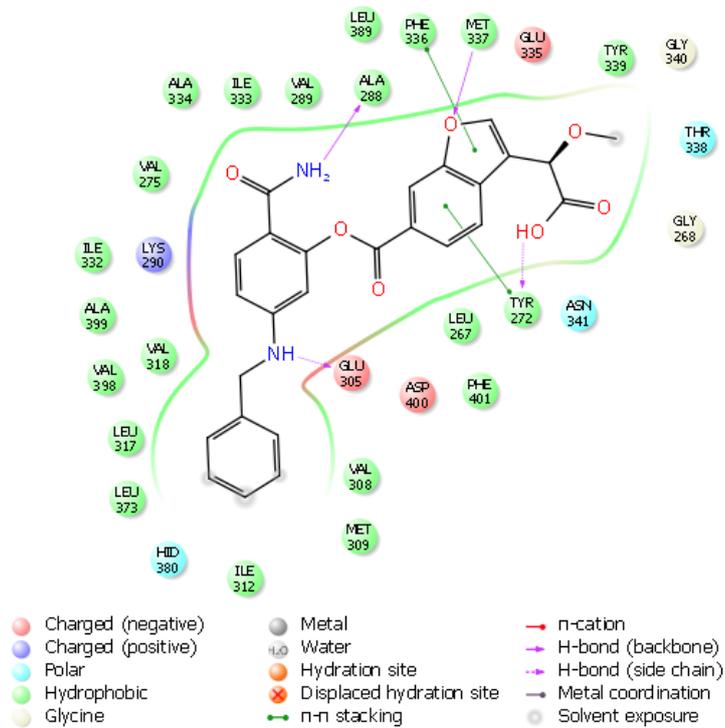


Figura 4.5 – A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 688 e a mutação T315A. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe a mutação T315A. Fonte: DO AUTOR

rado com a T315I. Dentro do universo já mencionado das moléculas geradas pelos métodos em questão, a molécula de melhor *GScore* é a 688 como mostra a tabela 4.4, o valor do *GScore* dessa molécula é  $-14.160\text{KJ/mol}$ . Esta molécula demonstrou estar firmemente ancorada na proteína mutada como mostra a figura 4.5, apresentando mais interações com proteína que o melhor fármaco. O Ponatinibe como mostra a figura 4.5, este apresentou um *GScore* de  $-13.086$ . A molécula 782 por exemplo ocupou o 9<sup>o</sup> com *GScore* de  $-13.692\text{KJ/mol}$ , um valor bem próximo ao do Ponatinibe.

Tabela 4.5 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas proteína mutada M244V. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
723	-14.954	687	-13.979	675	-13.619
681	-14.804	715	-13.979	625	-13.614
559	-14.470	680	-13.824	674	-13.596
558	-14.442	661	-13.737	760	-13.556
782	-14.355	801	-13.708	755	-13.523
781	-14.333	764	-13.681	696	-13.509
700	-14.196	676	-13.663	701	-13.506
646	-14.108	534	-13.659	710	-13.501
647	-14.097	464	-13.659	607	-13.501
773	-13.997	624	-13.619	588	-13.501

Os valores do *docking* desta mutação em que valina entra no lugar da metionina com o Imatinibe foi de  $-13.156\text{KJ/MOL}$  e o valor encontrado para Dasatinibe foi de  $-10.397\text{KJ/mol}$ . O valor encontrado para o Nilotinibe foi  $-13.511\text{KJ/mol}$  e o valor encontrado para o Ponatinibe  $-13.187\text{KJ/mol}$ . Quanto mais negativo for o valor melhor, mais favorável será a formação do complexo.

A mutação M244V tem incidência de pouca a moderada cuja causa provável e o aumento da entropia da proteína desfavorecendo o Imatinibe, dentro do universo de moléculas a que teve melhor *GScore* foi a 723 com valor de  $-14.954\text{KJ/mol}$ , essa molécula faz interação com proteína como mostra a figura 4.6. que molécula de Nilotinibe que tem o melhor *GScore*, nesse caso específico, o resultado do fármaco Nilotinibe foi superior ao Ponatinibe, o *GScore* do Nilotinibe é  $-13.511\text{KJ/mol}$ , enquanto o Ponatinibe é  $-13.187\text{KJ/mol}$ .

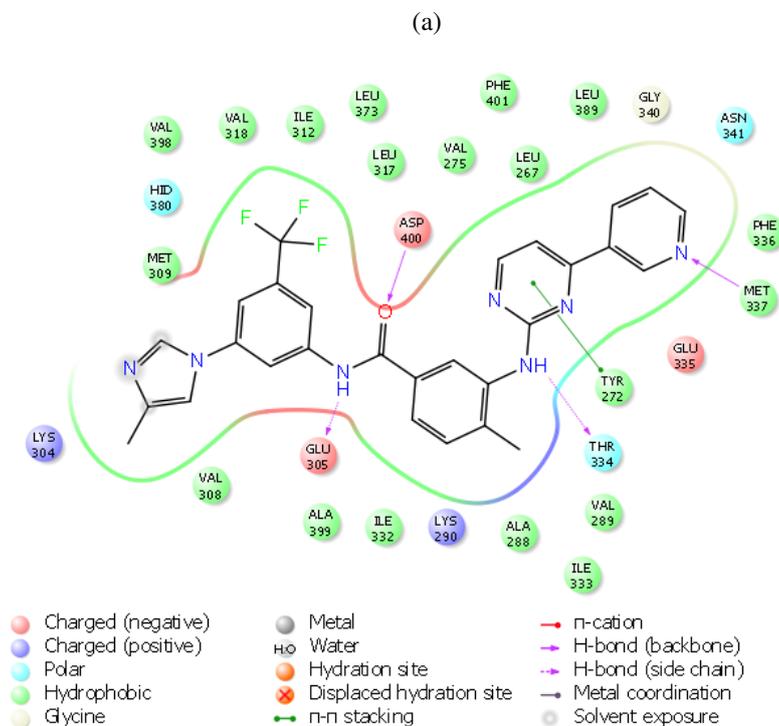
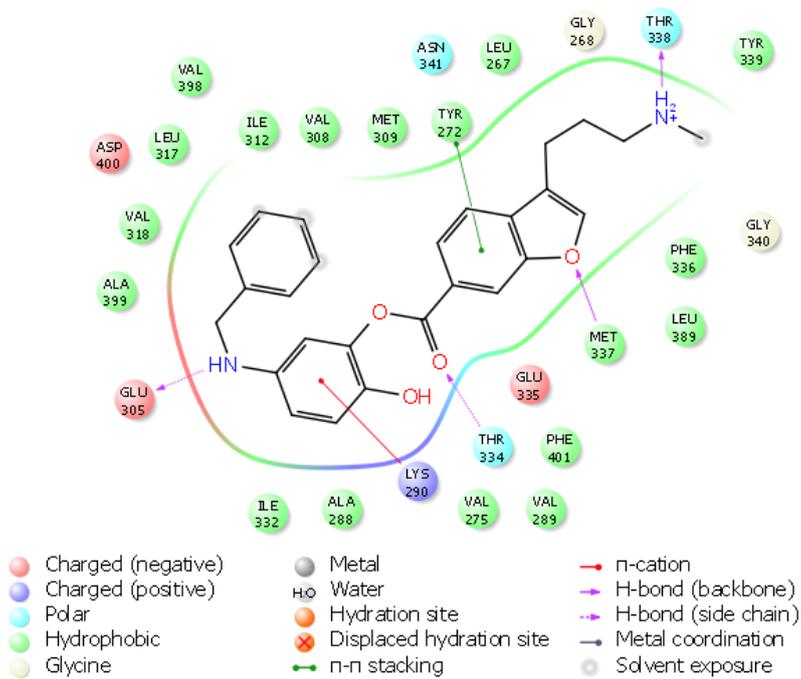


Figura 4.6 – A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 723 e a mutação M244V. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe e a mutação M244V. Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.6 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação L248R. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
732	-14,506	715	-13,090	624	-12,719
782	-14,302	646	-13,009	670	-12,686
680	-14,003	688	-12,979	661	-12,685
681	-13,594	711	-12,979	647	-12,640
781	-13,556	748	-12,879	764	-12,610
742	-13,506	674	-12,846	791	-12,555
730	-13,390	684	-12,812	755	-12,460
702	-13,287	709	-12,812	701	-12,338
703	-13,179	773	-12,803	676	-12,301
687	-13,090	675	-12,784	588	-12,246

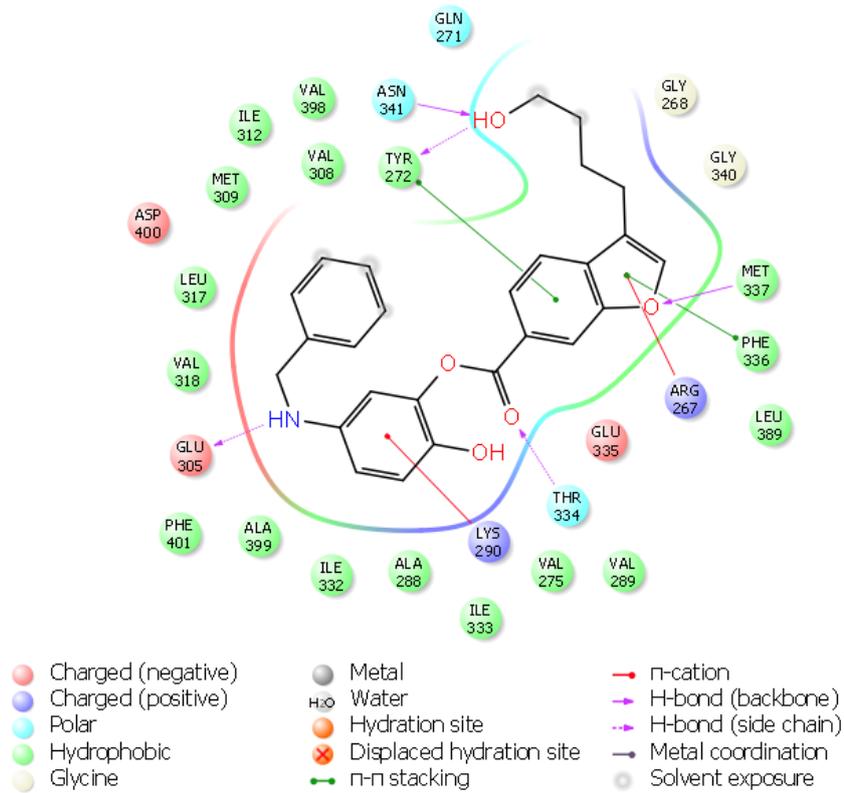
Nesta tabela 4.6, pode se notar que os valores das primeiras moléculas são bem mais negativo que valores dos principais fármacos.

Na tabela 4.6 estão presentes 30 moléculas selecionadas pelo seus *GScores* expresso quilo Joule por mol, foi realizado *docking* com moléculas do Imatinibe e essa mutação o valor encontrado foi de  $-12,223\text{KJ/mol}$ , realizado com molécula de Ponatinibe que gerou um resultado de  $-12,915\text{KJ/mol}$ .

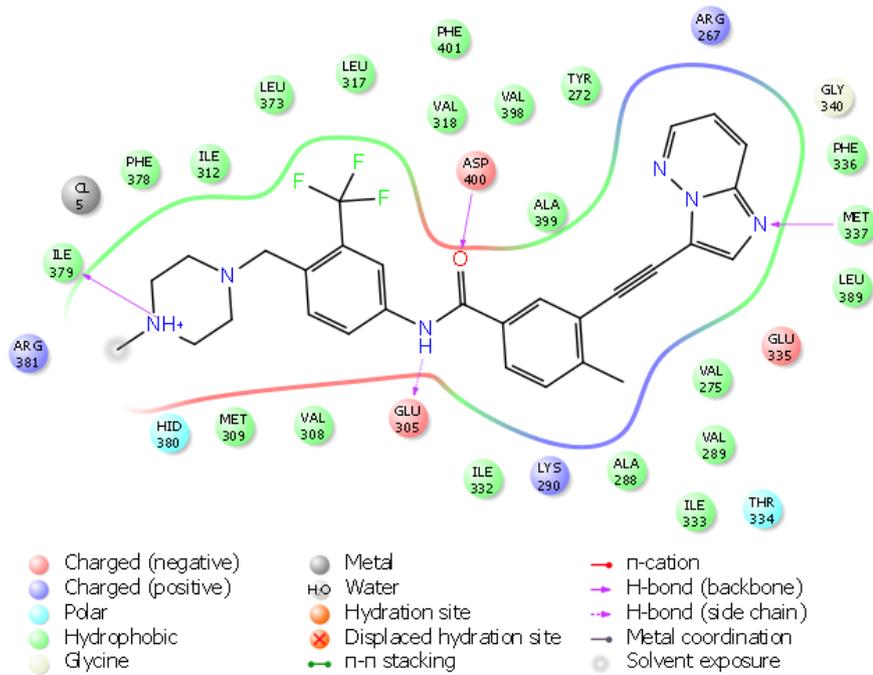
Tabela 4.7 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação F359C. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
732	-12,605	730	-11,808	464	-11,640
680	-12,486	681	-11,807	534	-11,640
801	-12,283	734	-11,800	634	-11,616
647	-12,206	688	-11,800	791	-11,561
700	-11,959	711	-11,800	766	-11,511
661	-11,938	646	-11,735	588	-11,507
773	-11,914	702	-11,796	607	-11,507
764	-11,832	760	-11,692	710	-11,507
742	-11,816	701	-11,688	684	-11,461
748	-11,811	662	-11,669	709	-11,461

Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação F359C. foram selecionadas 30 melhores moléculas pelo seus *GScores*. Foi realizado *docking* com os principais fármacos,



(a)



(b)

Figura 4.7 -- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 732 e a mutação L248R. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação L248R. Fonte: DO AUTOR

o valor encontrado para o Imatinibe foi de  $-11,613\text{KJ/mol}$ , enquanto que para o Ponatinibe foi de  $-13,449\text{KJ/mol}$ , mostrando que Ponatinibe é melhor inibidor que Imatinibe nesta mutação.

Tabela 4.8 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com a mutação G250E.Fonte: DO AUTOR

Molécula	<i>GScore</i>	Molécula	<i>GScore</i>	Molécula	<i>GScore</i>
782	-16,133	742	-13,874	674	-13,644
781	-14,740	647	-13,788	634	-13,633
558	-14,556	662	-13,777	675	-13,628
755	-14,045	646	-13,773	676	-13,625
680	-14,032	670	-13,758	760	-13,594
625	-13,972	701	-13,714	734	-13,513
764	-13,971	751	-13,708	700	-13,492
730	-13,957	464	-13,692	681	-13,376
773	-13,937	534	-13,692	588	-13,369
721	-13,882	624	-13,667	607	-13,369

Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com a mutação G250E. Foram selecionadas 30 moléculas com melhores *GScore* para compor a tabela, foi realizou-se o *docking* desta mutação com as principais moléculas dos fármacos. O resultado com a molécula de Imatinibe foi de  $-13,701\text{KJ/mol}$  e com molécula do Ponatinibe foi de  $-13,474\text{KJ/mol}$ .

Tabela 4.9 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação Y253H.Fonte: DO AUTOR

Molécula	<i>GScore</i>	Molécula	<i>GScore</i>	Molécula	<i>GScore</i>
681	-13,456	688	-12,350	634	-12,039
559	-13,281	711	-12,350	730	-11,909
680	-12,906	751	-12,344	670	-11,881
687	-12,694	766	-12,329	764	-11,852
715	-12,694	647	-12,205	773	-11,845
625	-12,604	661	-12,200	742	-11,843
796	-12,588	791	-12,191	558	-11,733
646	-12,579	675	-12,154	702	-11,728
782	-12,488	781	-12,141	588	-11,624
624	-12,361	748	-12,116	607	-11,624

Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação Y253H. Foram selecionadas 30 moléculas com melhores *GScores* em  $\text{KJ/MOL}$ , para compor tabela abaixo, foi realizado

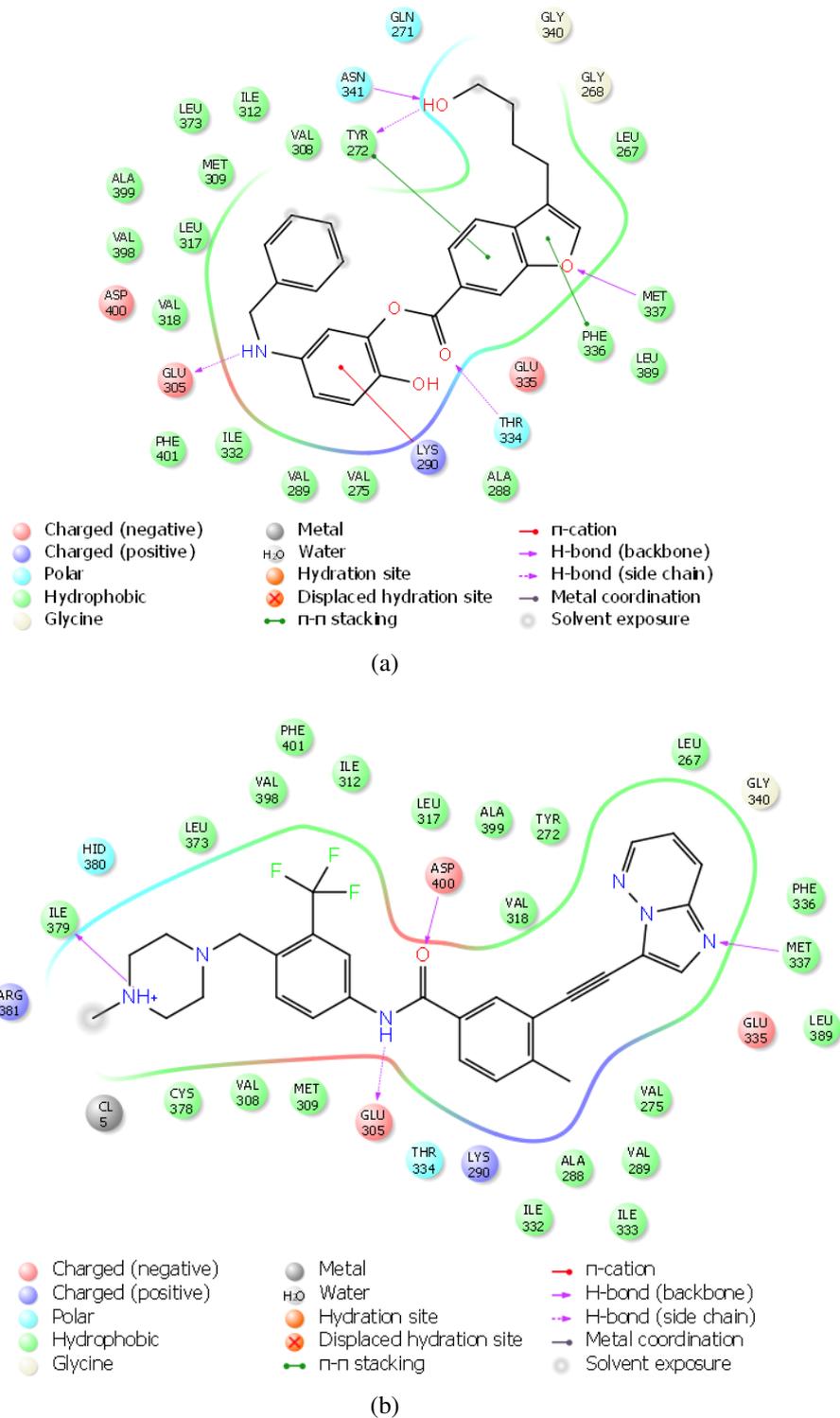
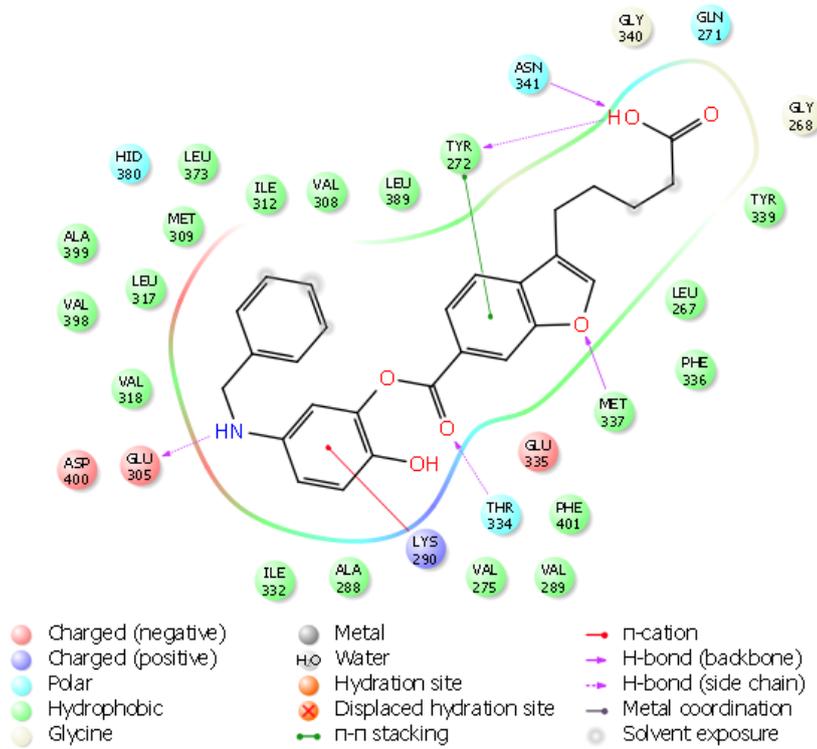
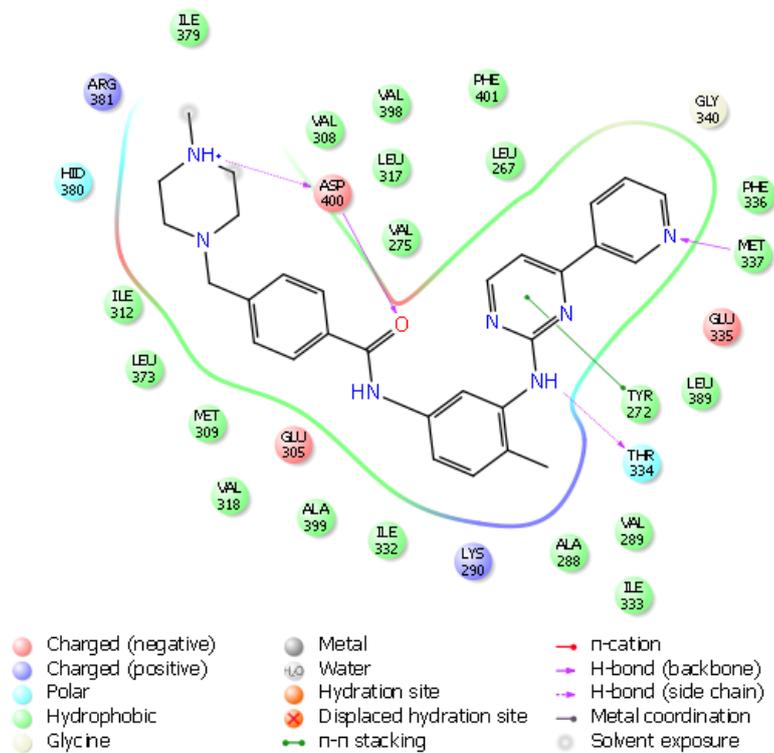


Figura 4.8 – - A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 732 e a mutação F359C. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação F359C. Fonte: DO AUTOR



(a)



(b)

Figura 4.9 – - A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação G250E.  
 - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Imatinibe e a mutação G250E. Fonte: DO AUTOR

o *docking* com molécula de Imatinibe. O valor encontrado foi de  $-12,237\text{KJ/mol}$  e a molécula de Ponatinibe  $-12,428\text{KJ/mol}$ . A tabela 4.9, mostra que pelo menos 9 moléculas geradas possui a capacidade inibitória melhor que os fármacos analisados, usando estes critérios.

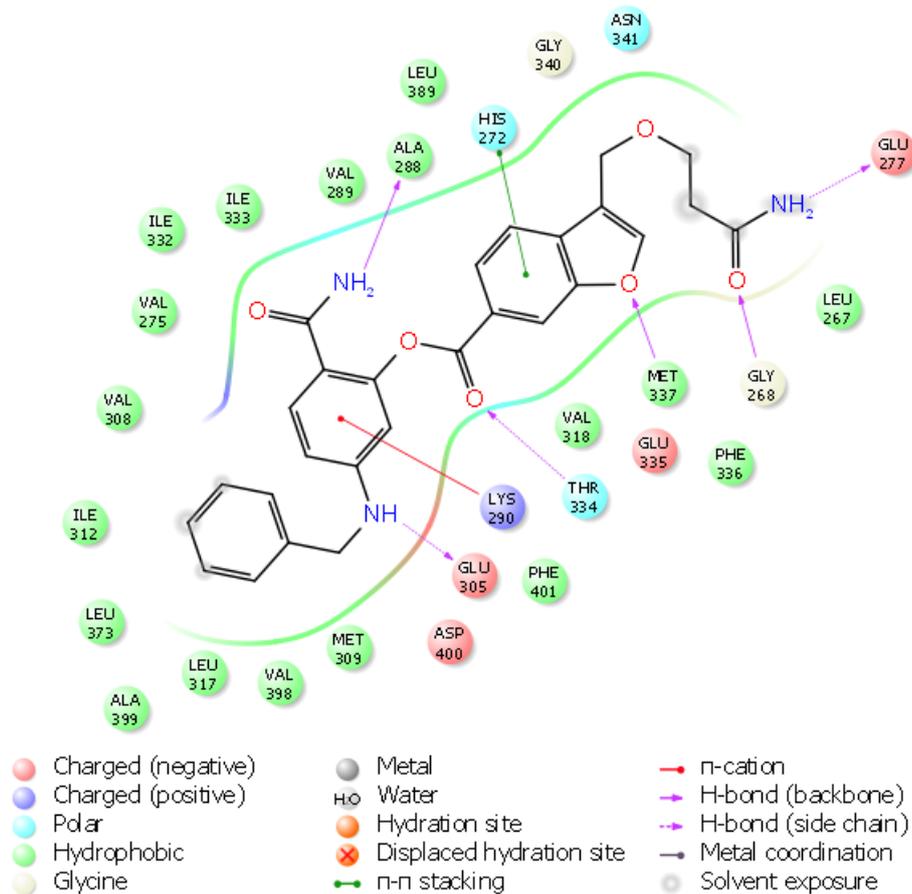
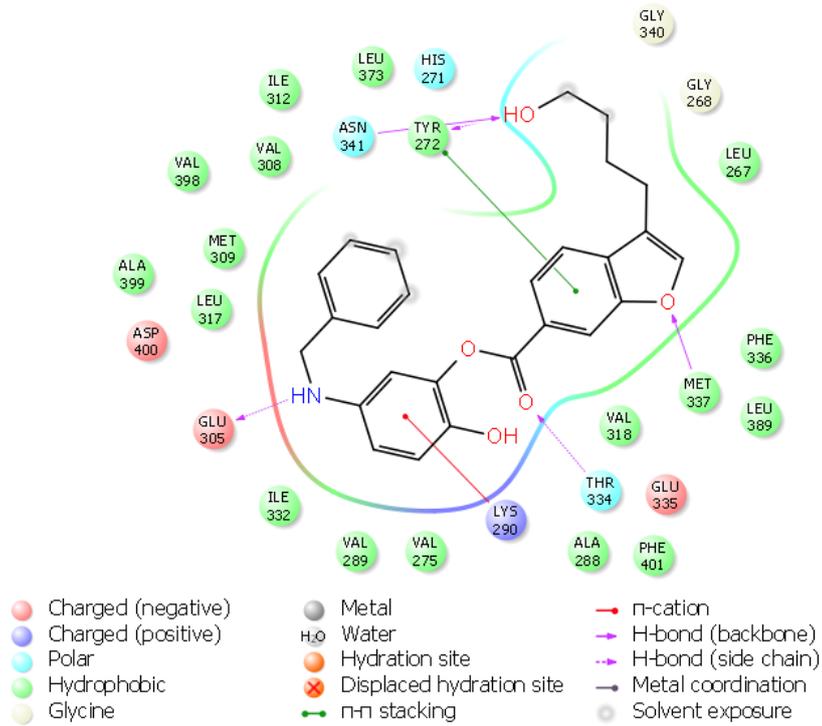
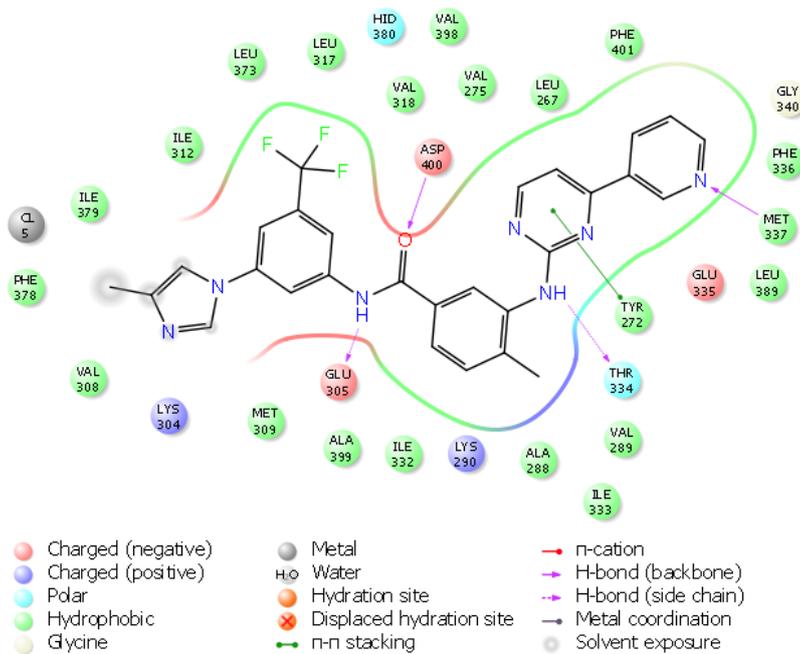


Figura 4.10 – - Interação entre a molécula 681 e a mutação Y253H. Fonte: DO AUTOR

Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação Q252H. Usando o mesmo critério foram selecionadas 30 moléculas com seus melhores *GScores* em  $\text{KJ/MOL}$ , foi realizado o *docking* com a molécula de Imatinibe  $-12,026\text{KJ/mol}$  e com molécula do Nilotinibe  $-13,658\text{KJ/mol}$  e Ponatinibe  $-13,252\text{KJ/mol}$ .



(a)



(b)

Figura 4.11 -- A figura (a) Interação entre a molécula 732 e a mutação Q252H.  
 - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Imatinibe e a mutação Q252H. Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.10 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação Q252H.Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
732	-15,587	773	-13,993	701	-13,714
559	-14,818	625	-13,930	674	-13,710
751	-14,652	647	-13,889	676	-13,695
702	-14,478	646	-13,884	734	-13,644
632	-14,283	661	-13,805	723	-13,640
782	-14,261	703	-13,770	766	-13,621
681	-14,129	730	-13,768	675	-13,621
662	-14,002	687	-13,758	742	-13,604
764	-13,996	715	-13,758	684	-13,555
680	-13,995	781	-13,733	709	-13,555

Tabela 4.11 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação E255K.Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
781	-15,912	688	-13,803	755	-13,565
680	-15,346	711	-13,803	676	-13,555
782	-14,811	646	-13,787	675	-13,541
681	-14,804	701	-13,698	760	-13,513
558	-14,326	534	-13,661	734	-13,496
773	-13,923	464	-13,661	742	-13,487
647	-13,912	624	-13,623	634	-13,461
730	-13,874	674	-13,604	766	-13,437
748	-13,842	670	-13,593	732	-13,401
661	-13,839	791	-13,582	696	-13,364

Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação E255K. Realizou-se o *docking* usando o programa Glide com os principais fármacos. O valor do *GScore* encontrado para molécula de Imatinibe foi de  $-11.179\text{KJ/mol}$  e para molécula de Dasatinibe foi de  $-8.616\text{KJ/mol}$ , para Nilotinibe foi de  $-12.901\text{KJ/mol}$  e ultimo fármaco analisado foi o Ponatinibe cujo o resultado foi de  $-12.877\text{KJ/mol}$ .

Na mutação E255K, seu mecanismo de resistência não está muito bem compreendido, mas acredita-se que a mutação causa um desarranjo geométrico na proteína, diminuindo a interação com fármaco. A melhor molécula escolhida pelo função de pontuação o *GScore* é

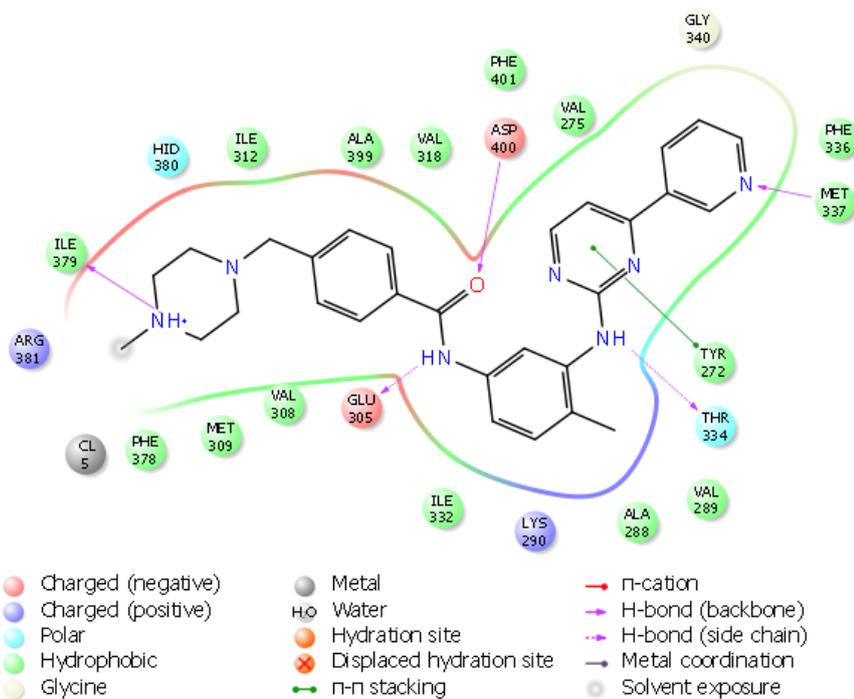
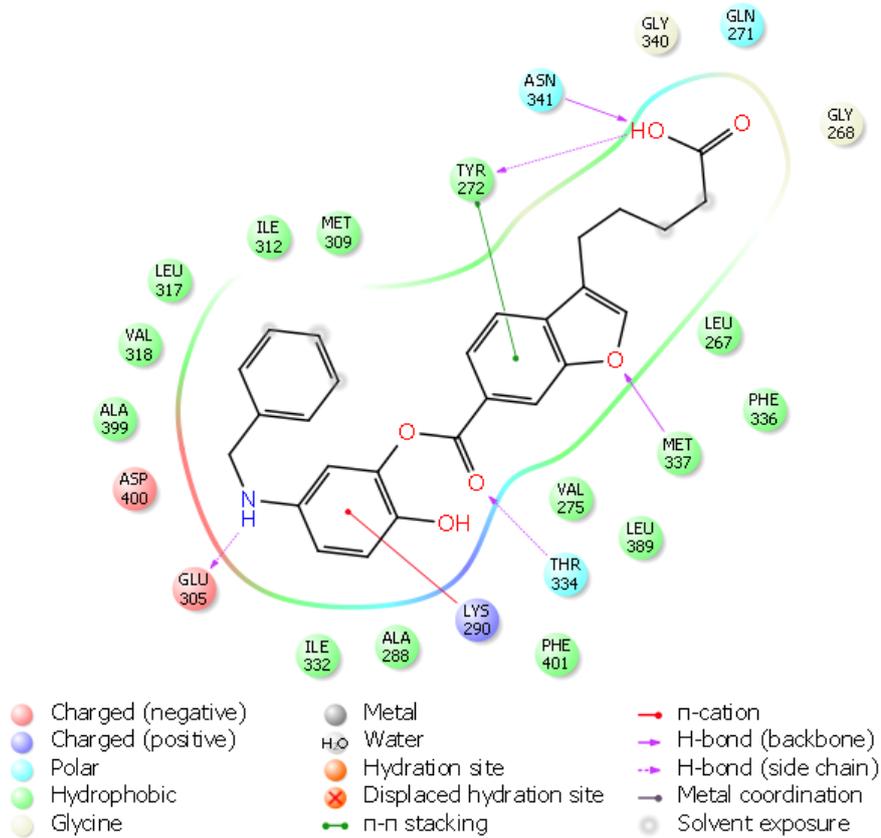


Figura 4.12 -- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula 781 e a mutação E255K.  
 - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Imatinibe e a mutação E255K. Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.12 – Valores do GScore do *docking* das moléculas com mutação F317L. Fonte: DO AUTOR

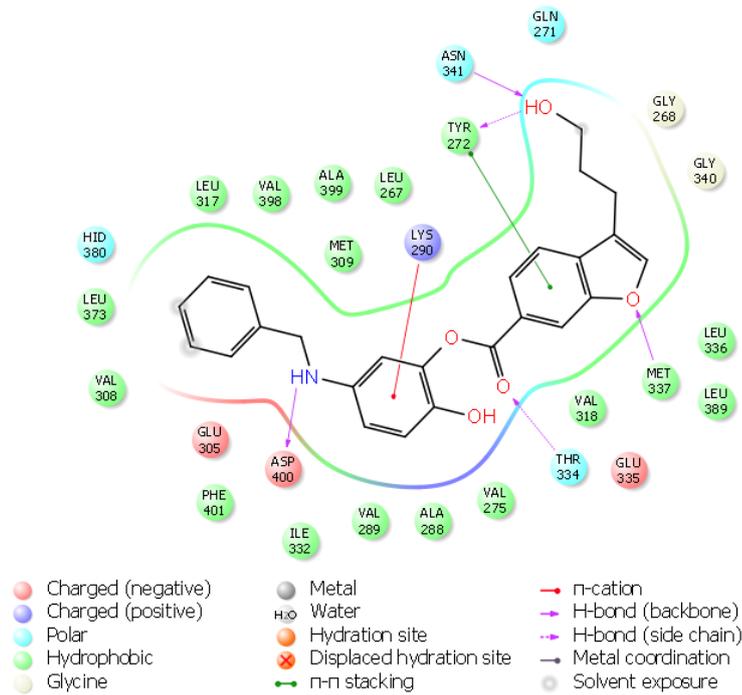
Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
801	-12.765	684	-11.483	696	-11.284
646	-12.313	709	-11.483	748	-11.276
681	-11.771	764	-11.469	791	-11.268
634	-11.674	701	-11.455	732	-11.160
624	-11.659	625	-11.386	588	-11.140
662	-11.651	688	-11.383	607	-11.140
661	-11.619	711	-11.383	710	-11.140
700	-11.585	687	-11.349	730	-11.044
464	-11.578	715	-11.349	647	-11.020
534	-11.578	773	-11.321	680	-11.015

a 781 com valor de  $-15.912\text{KJ/mol}$ . A figura 4.12 mostra as interações feitas pela molécula e a figura 4.12, mostra a interação da proteína mutada e fármaco Ponatinibe. O Ponatinibe possui menos interação com mutação (interações de hidrogênio e interações  $\pi$ - $\pi$ ) o que resulta diretamente na função de pontuação do fármaco:  $-13.645\text{KJ/mol}$ .

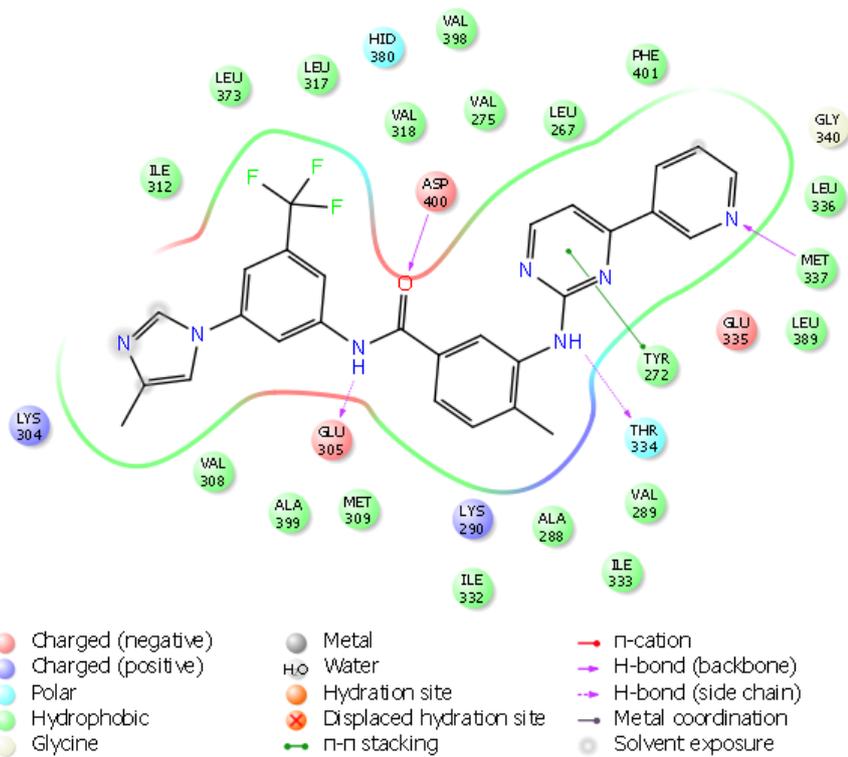
Valores do GScore do *docking* das moléculas com mutação F317L. A tabela foi construída com 30 moléculas selecionadas pelo seu GScore, realizando o *docking* desta mutação com os principais fármacos. O valor do GScore encontrado para o Imatinibe  $-11.179\text{ KJ/mol}$ , o valor encontrado para o Dasatinibe foi de  $-8.616\text{KJ/mol}$ , para o Nilotinibe foi de  $-12.901\text{KL/mol}$   $-12.877\text{ KJ/mol}$ .

Os resultados encontrados nesta mutação mostram valores dos fármacos levemente superior ao encontrados pelo universo das moléculas. A mutação F317L tem incidência alta segundo (WEISBERG et al., 2007). O mecanismo de reação é de forma direta, diminuindo as interações com Imatinibe, a figura 4.13, mostra as interações entre a proteína tirosina quinase Bcr-Abl com a molécula 801. As interações mostradas são: 5 interações de Hidrogênio 1  $\pi$ -cátion 1  $\pi$ - $\pi$ , o GScore e  $-12.765\text{KJ/mol}$  como é mostrado na tabela 4.12. O melhor fármaco e Nilotinibe com GScore de  $-12.901\text{KJ/mol}$ .

Valores do GScore do *docking* das moléculas com mutação E355G. A tabela foi construída com 30 moléculas selecionadas pelo seu GScore, realizando o *docking* desta mutação com os principais fármacos, o valor do GScore encontrado para o Imatinibe foi  $-10.223\text{ KJ/mol}$ , o



(a)



(b)

Figura 4.13 -- Em (a) Interação entre a molécula 801 e a mutação F317L.  
 - A figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe e a mutação F317L. Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.13 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação E355G. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
781	-16.127	764	-13.946	701	-13.622
782	-16.112	661	-13.907	676	-13.610
559	-14.737	688	-13.889	732	-13.597
558	-14.469	711	-13.889	625	-13.593
700	-14.130	670	-13.814	624	-13.591
680	-14.059	674	-13.794	766	-13.583
646	-13.993	703	-13.781	760	-13.539
681	-13.991	647	-13.778	734	-13.500
773	-13.956	687	-13.735	710	-13.490
730	-13.947	715	-13.735	607	-13.490

valor encontrado para o Dasatinibe foi de  $-11.005\text{KJ/mol}$ , para o Nilotinibe foi de  $-13.582\text{KL/mol}$  a molécula do Ponatinibe foi de  $-12.982\text{ KJ/mol}$ .

Na mutação E355G, seu mecanismo de resistência não está muito bem compreendido, a incidência dessa mutação é alta segundo (WEISBERG et al., 2007), a melhor molécula escolhida pelo função de pontuação *GScore* é a 781 com valor de  $-16,127\text{KJ/mol}$  como mostra a tabela 4.13. A figura 4.14 mostra as interações feitas pela molécula como: 5 interações de Hidrogênio 1 ligação  $\pi$ - $\pi$  1 interação  $\pi$ -cátion. A figura 4.14, as interações do fármaco com a proteína mutada como: 4 interações de Hidrogênio 1 ligação  $\pi$ - $\pi$  1 interação. O Ponatinibe possui menos interação com mutação (interações de hidrogênio e interações  $\pi$ - $\pi$ ) o que resulta diretamente na função de pontuação do fármaco é  $-13,582\text{KJ/mol}$ .

Os valores encontrados no *GScores* do *docking* das moléculas com mutação E355G. A tabela foi construída com 30 moléculas selecionadas pelo seu *GScore*, realizando o *docking* desta mutação com os principais fármacos, o valor do *GScore* encontrado para o Imatinibe  $-10.223\text{ KJ/mol}$ , o valor encontrado para o Dasatinibe foi de  $-11.005\text{KJ/mol}$ , para o Nilotinibe foi de  $-13.582\text{KL/mol}$  a molécula do Ponatinibe foi de  $-12.982\text{ KJ/mol}$ .

os Valores dos *GScores* do *docking* das moléculas com a mutação H396R. A tabela foi construída com 30 moléculas selecionadas pelo seu *GScore*, realizando o *docking* desta mutação com os principais fármacos, o valor do *GScore* encontrado para o Imatinibe  $-13,016\text{KJ/mol}$ , o valor encontrado para o Dasatinibe foi de  $-9,689\text{KJ/mol}$ , para o Nilotinibe foi de  $-13,681\text{KJ/mol}$

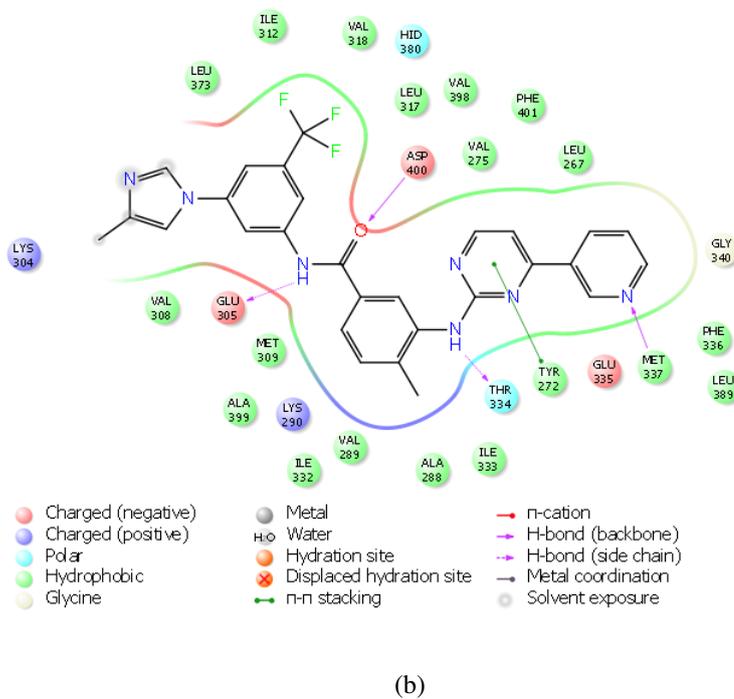
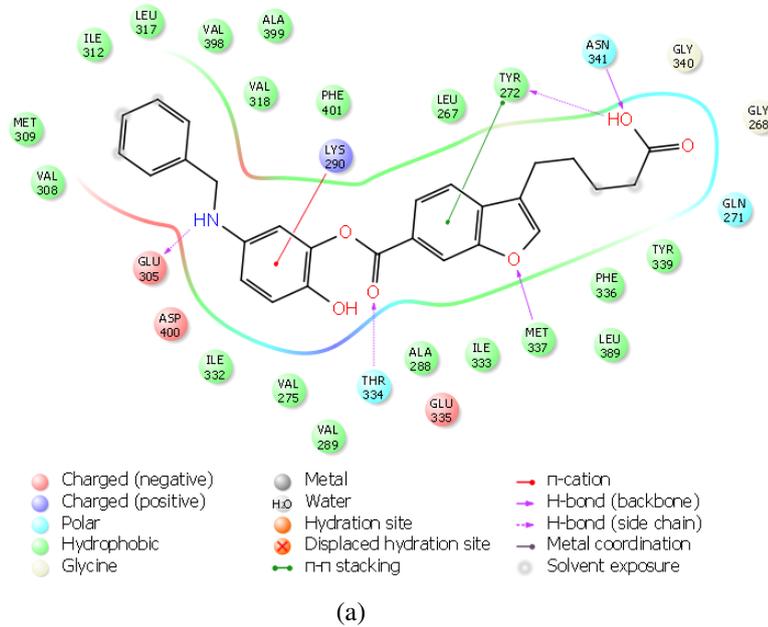


Figura 4.14 -- Na figura (a) mostra a Interação entre a molécula 781 e a mutação E355G.  
 - Na figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Nilotinibe e a mutação E355G. Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.14 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação E355G.Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
781	-16.059	773	-14.282	755	-14.024
782	-15.112	730	-14.251	674	-13.992
559	-14.940	687	-14.237	675	-13.971
721	-14.879	715	-14.204	676	-13.970
558	-14.836	764	-14.200	732	-13.944
647	-14.536	734	-14.191	766	-13.911
646	-14.477	700	-14.171	624	-13.894
681	-14.408	670	-14.116	661	-13.888
680	-14.372	791	-14.057	702	-13.837
748	-14.372	625	-14.049	634	-13.833

Tabela 4.15 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com a mutação H396R.Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
782	-15.823	766	-13.982	662	-13.968
751	-14.924	647	-13.944	710	-13.720
681	-14.874	730	-13.922	607	-13.720
781	-14.807	687	-13.898	588	-13.720
558	-14.433	715	-13.898	764	-13.719
559	-14.398	680	-13.855	676	-13.624
702	-14.225	646	-13.797	675	-13.603
734	-14.013	661	-13.795	625	-13.576

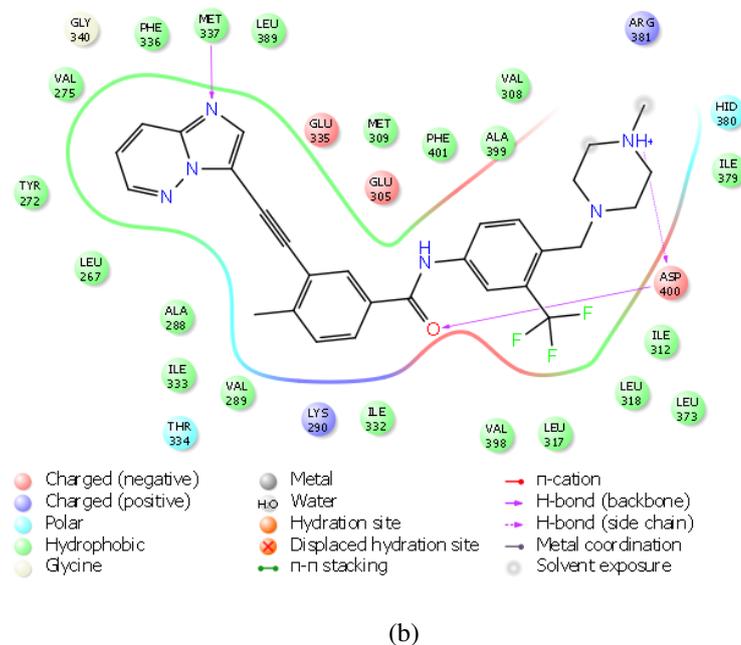
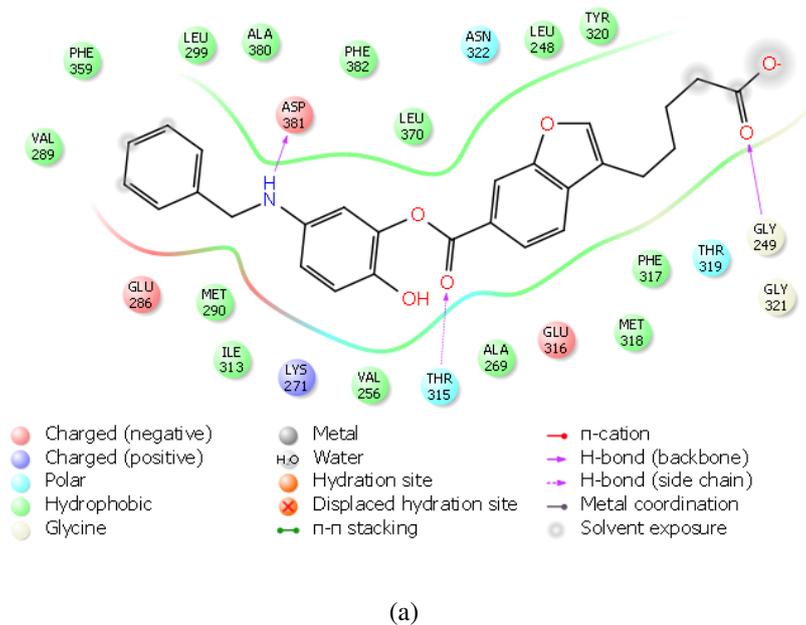


Figura 4.15 -- Na figura (a) mostra a Interação entre a molécula 781 e a mutação V299L.  
 - Na figura (b) mostra a Interação entre a molécula do Ponatinibe e a mutação V299L. Fonte: DO AUTOR

a molécula do Ponatinibe foi de  $-13,908$  KJ/mol.

A mutação H396R, não interage diretamente com fármaco, mas de forma indireta, modificando geometricamente a proteína. Essa mutação tem incidência moderada, dentro do universo de moléculas geradas a de melhor *GScore* é a molécula 782. Tornando a repetir um bom resultado também nessa mutação. A figura 4.16 mostra a molécula no sitio ativo da proteína realizando mais interações do tipo: Hidrogênio,  $\pi$ -cátion  $\pi$ - $\pi$ , na figura 4.16 mostra as mesmas interações, mas em grau menor. Este fato reflete diretamente no *GScore* a molécula 782 é  $-15.823$ KJ/mol enquanto a Nilotinibe é  $-14.120$ KJ/mol. Este estudo aponta uma maior eficiência do Nilotinibe em relação ao Ponatinibe.

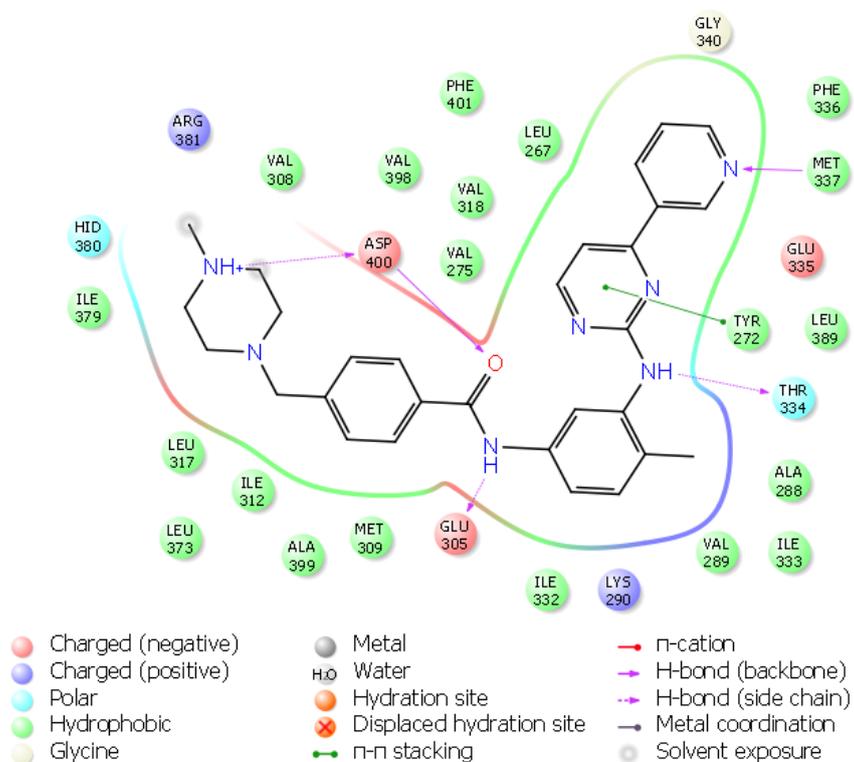
Tabela 4.16 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação A356N. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
782	-16.030	687	-13.862	674	-13.659
781	-15.251	715	-13.862	675	-13.628
680	-15.135	670	-13.859	676	-13.622
681	-15.076	764	-13.837	676	-13.622
558	-14.713	688	-13.833	796	-13.607
559	-14.471	711	-13.833	634	-13.606
661	-13.966	625	-13.806	534	-13.567
624	-13.955	730	-13.804	464	-13.567
647	-13.883	646	-13.787	755	-13.553
701	-13.871	791	-13.690	700	-13.535

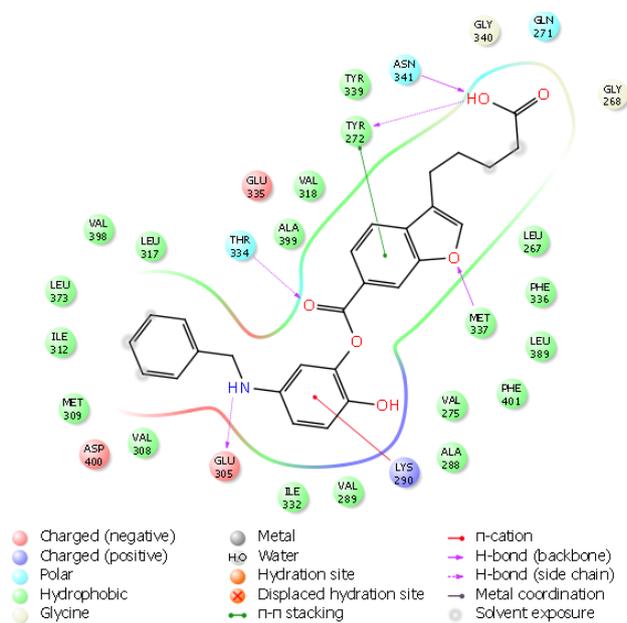
Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação A356N. A tabela foi construída com 30 moléculas selecionadas pelo seu *GScore*, realizando o *docking* desta mutação com os principais fármacos, o valor do *GScore* encontrado para o Imatinibe  $-13.844$ KJ/mol, o valor encontrado para o Dasatinibe foi de  $-13.590$ KJ/mol, para o Nilotinibe foi de  $-13.012$ KJ/mol a molécula do Ponatinibe foi de  $-13,908$  KJ/mol.

A mutação A356N, tem incidência moderada, dentro do universo de moléculas geradas a de melhor *GScore* é a 782, tornando a repetir um bom resultado também nessa mutação. A figura 4.17 mostra a molécula no sitio ativo da proteína realizando mais interações do tipo: Hidrogênio,  $\pi$ -cátion  $\pi$ - $\pi$ , na figura 4.17 mostra as mesmas interações mas em grau menor. Este fato reflete diretamente no *GScore*, a molécula 782 é  $-16.030$ KJ/mol enquanto a Niloti-





(a)



(b)

Figura 4.17 -- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula Imatinibe e a mutação A356N. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação A356N. Fonte: DO AUTOR

nibe é  $-13.590\text{KJ/mol}$ , neste estudo aponta uma maior eficiência do Nilotinibe em relação ao Ponatinibe.

Tabela 4.17 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação M351T. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
781	-16.105	773	-13.947	742	-13.687
782	-15.069	730	-13.942	734	-13.655
680	-14.856	748	-13.857	625	-13.636
751	-14.509	688	-13.846	674	-13.632
558	-14.455	711	-13.846	670	-13.632
559	-14.323	700	-13.803	676	-13.615
703	-14.128	764	-13.796	675	-13.614
702	-14.108	647	-13.792	760	-13.551
681	-14.057	687	-13.715	634	-13.496
646	-13.980	715	-13.715	632	-13.460

Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com mutação M351T. A tabela foi construída com 30 moléculas selecionadas pelo seu *GScore*, realizando o *docking* desta mutação com os principais fármacos, o valor do *GScore* encontrado para o Imatinibe  $-13.844\text{KJ/mol}$ , o valor encontrado para o Dasatinibe foi de  $-13.590\text{KJ/mol}$ , para o Nilotinibe foi de  $-13.012\text{KJ/mol}$  a molécula do Ponatinibe foi de  $-13,908\text{ KJ/mol}$ .

A mutação M351T é considerada de alta incidência. Seus mecanismos de resistência supostamente de forma indireta, aumentando a entropia da tirosina quinase Bcr-Abl e diminuindo a interação com inibidor, A melhor molécula com melhor *GScore* é a 781 seguida da molécula 782. A figura 4.18 mostra a interação da molécula com sitio ativo da tirosina quinase, 5 interações de hidrogênio: uma interação  $\pi-\pi$ , e uma interação  $\pi$ -cation, comparando com o fármaco Imatinibe como mostra na figura 4.18, que possui cinco interações de hidrogênio, uma interação  $\pi-\pi$ . Comparativo entre as figura mostra que a molécula 781 possui maior interação com proteína alvo que o fármaco influin do diretamente no resultado do *GScore*, enquanto *GScore* da molécula 781 é  $-16.105\text{KJ/mol}$  do Imatinibe é de  $-13.967\text{KJ/mol}$ , neste caso o IM teve um resultado melhor que fármacos de segunda geração.

Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com a mutação L387M. A tabela foi cons-

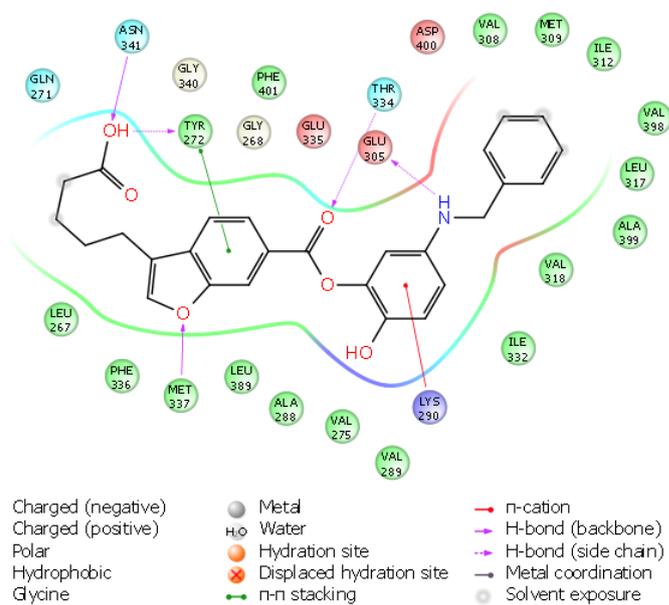
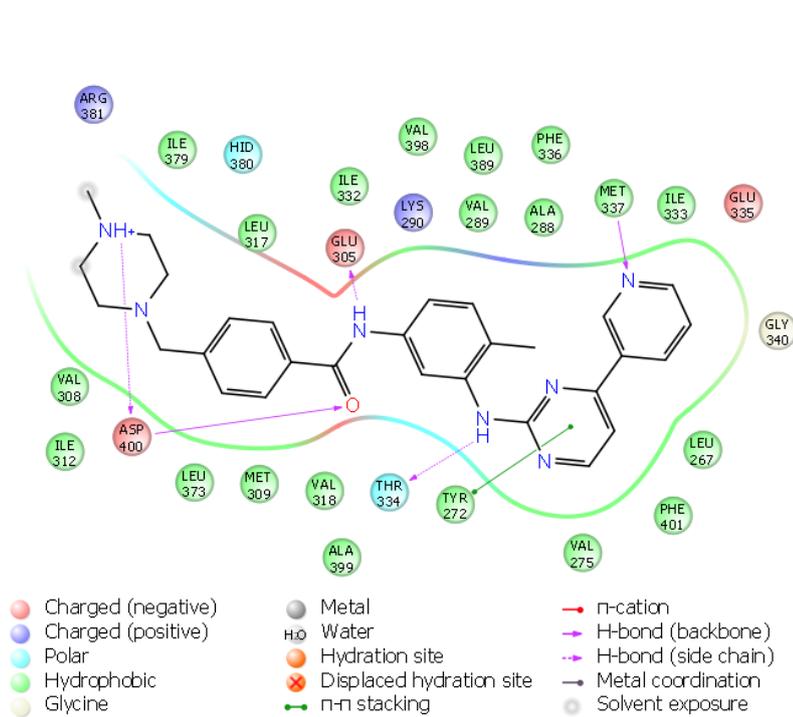


Figura 4.18 -- A figura (a) mostra a Interação entre a molécula Imatinibe e a mutação A356N. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação A356N. Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.18 – Valores do *GScore* do *docking* das moléculas com a mutação L387M. Fonte: DO AUTOR

Molécula	GScore	Molécula	GScore	Molécula	GScore
782	-15.849	773	-13.959	464	-13.689
781	-15.559	766	-13.945	674	-13.633
681	-14.987	687	-13.869	734	-13.587
723	-14.682	715	-13.869	675	-13.555
558	-14.531	688	-13.841	676	-13.545
559	-14.462	711	-13.793	755	-13.540
702	-14.088	647	-13.785	751	-13.533
764	-14.056	661	-13.728	710	-13.508
680	-14.054	801	-13.721	607	-13.508
703	-13.994	534	-13.689	588	-13.508

truída com 30 moléculas selecionadas pelo seu *GScore*, realizando o *docking* desta mutação com os principais fármacos. O valor do *GScore* encontrado para o Imatinibe foi de  $-13.747\text{KJ/mol}$ , o valor encontrado para o Dasatinibe foi de  $-10.527\text{KJ/mol}$ , para o Nilotinibe foi de  $-13.629\text{KJ/mol}$  a molécula do Ponatinibe foi de  $-13.001\text{KJ/mol}$ .

A mutação L387M possui uma incidência de baixa a moderada. Seu mecanismo de resistência é de forma indireta, não tendo contato direto com inibidor, mas ainda não bem clara seu papel, mas acredita-se que aumenta a entropia da molécula, desfavorecendo a ligação do inibidor com a proteína tirosina quinase. A molécula de melhor resultado é 782 como mostra a tabela 4.18. A figura 4.19 mostra a interações contendo: cinco interações de Hidrogênio, duas interação  $\pi$ - $\pi$  uma interação  $\pi$ -cation, entre as molécula e tirosina quinase, o *GScore* de  $-15.849\text{KJ/mol}$ . A figura 4.20 mostra a interação do Imatinibe tirosina quinase contendo: quatro interações de Hidrogênio, uma interação tipo  $\pi$ - $\pi$ , e valor do *GScore* de  $-13.747\text{KJ/mol}$ , ligeiramente superior ao inibidores de segunda geração.

Na tabela 4.21, podemos ver que todas as moléculas estudadas (incluindo os fármacos de referência ) formam mais do que três ligações de hidrogênio (coluna HBond) com o receptor das proteínas e estas ligações são fortes (distâncias de ligação são apresentados na coluna HBondD). Em todos os casos, as moléculas geradas têm mais energias de interação com os seus receptores mais baixos do que os fármacos de referência. Isto indica que os complexos

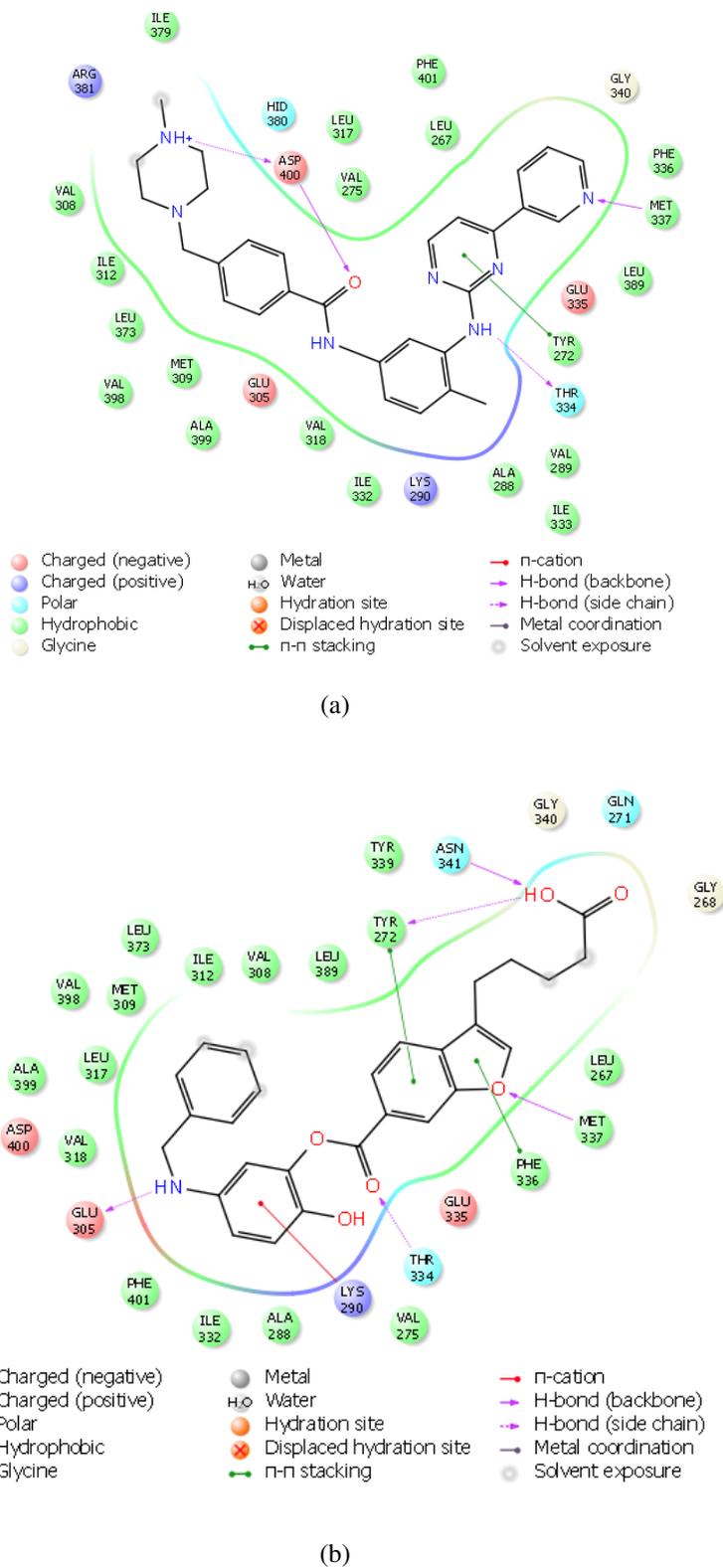


Figura 4.19 – A figura (a) mostra a Interação entre a molécula Imatinibe e a mutação L387M. A figura (b) mostra a Interação entre a molécula 782 e a mutação L387M.Fonte: DO AUTOR

Tabela 4.19 – Resultado da primeira parte do teste QikProp com as principais moléculas geradas. Fonte: DO AUTOR

Molécula	stars	QPlogPoct	QPlogPw	QPlogPo/w	QPlogS	QPlogHERG
000000558.1	3	23,073	14,423	3,948	-4,518	-8,325
000000559.1	3	23,15	14,46	3,936	-4,539	-8,329
000000674.1	1	23,448	16,122	3,575	-5,022	-5,431
000000675.1	2	23,521	16,231	3,634	-5,212	-5,618
000000676.1	1	23,895	16,23	3,635	-5,199	-5,588
000000680.1	3	31,479	24,563	1,854	-4,36	-6,411
000000684.1	1	30,462	24,43	1,625	-3,965	-6,003
000000687.1	1	28,079	19,927	3,099	-5,221	-5,563
000000688.1	1	28,261	19,939	3,106	-5,254	-5,569
000000700.1	5	24,227	15,27	4,777	-7,164	-7,076
000000701.1	5	24,141	15,442	4,776	-7,081	-7,072
000000703.1	4	22,794	11,88	5,637	-7,914	-8,305
000000624.1	3	22,401	13,336	4,762	-6,078	-7,561
000000634.1	1	25,316	16,115	4,014	-5,98	-7,564
000000646.1	3	25,615	18,349	3,647	-5,136	-6,233
000000715.1	1	28,079	19,927	3,099	-5,221	-5,563
000000721.1	2	23,821	13,896	4,482	-5,409	-8,443
000000730.1	2	23,44	16,023	3,543	-5,077	-5,343
000000734.1	2	21,257	13,081	4,552	-5,918	-5,384
000000709.1	1	30,462	24,43	1,625	-3,965	-6,003
000000751.1	3	24,364	15,104	3,727	-4,725	-8,263
000000755.1	2	27,944	23,046	1,51	-3,473	-5,926
000000711.1	1	28,261	19,939	3,106	-5,254	-5,569
000000766.1	2	22,844	15,428	3,591	-5,213	-5,425
000000773.1	2	21,664	12,813	4,938	-6,245	-5,466
000000781.1	3	24,868	14,824	4,941	-6,617	-5,96
000000782.1	2	24,674	14,692	4,973	-6,444	-5,879
Nilotinibe.1	3	28,741	15,752	6,15	-9,733	-8,422
IMATINIBE.1	2	27,532	17,33	3,413	-4,718	-9,304
PONATINIB.1	0	27,981	17,457	2,906	-5,242	-7,284
Dasatinibe	1	26,416	14,76	4,385	-5,704	-8,984

Tabela 4.20 – Resultado da segunda e última parte do teste QikProp com as principais moléculas geradas. Fonte: DO AUTOR

Molécula	QPlogKp	OralAbsor	PercOralAbsor	PSA	RuleOfFive	RuleOfThree
000000558.1	-2,532	1	95,082	87,534	0	1
000000559.1	-2,613	1	94,243	89,226	0	1
000000674.1	-2,157	2	79,924	119,925	0	1
000000675.1	-2,139	2	80,082	120,635	0	1
000000676.1	-2,166	2	79,877	121,453	0	1
000000680.1	-3,091	2	64,82	158,837	0	1
000000684.1	-2,759	2	69,128	151,076	0	1
000000687.1	-2,628	2	73,033	147,458	0	1
000000688.1	-2,666	2	72,759	148,167	0	1
000000700.1	-1,626	1	95,887	118,388	0	2
000000701.1	-1,63	1	95,516	118,542	0	2
000000703.1	-1,312	1	94,29	101,084	1	2
000000624.1	-0,227	3	100	78,309	0	2
000000634.1	-1,201	3	100	105,087	0	2
000000646.1	-1,25	1	93,655	108,551	0	1
000000715.1	-2,628	2	73,033	147,458	0	1
000000721.1	-2,732	3	100	88,156	0	1
000000730.1	-2,35	3	78,673	120,352	0	0
000000734.1	-1,778	3	91,409	101,548	0	1
000000709.1	-2,759	2	69,128	151,076	0	1
000000751.1	-3,61	2	84,912	101,951	0	1
000000755.1	-2,99	2	65,339	144,628	0	1
000000711.1	-2,666	2	72,759	148,167	0	1
000000766.1	-2,51	3	77,808	124,5	0	0
000000773.1	-1,572	1	94,98	99,95	0	2
000000781.1	-2,234	1	84,929	124,769	0	2
000000782.1	-1,949	1	87,756	120,316	0	2
Nilotinibe.1	-1,333	1	90,04	87,565	2	2
IMATINIBE.1	-5,181	2	80,188	83,511	0	1
PONATINIB.1	-4,316	3	84,427	98,748	0	0
Dasatinibe	-5,468	2	72,993	72,492	1	1

são mais estáveis. As interações lipofílicas são mediadas pelas forças de dispersão de London. Estas forças fazem parte das forças de Van Der Waals e têm em conta a interação intermolecular, podendo ser classificadas como bons ou maus contatos, dependendo das distâncias atômicas. Portanto, ele pode ser usado para estimar a qualidade da interação entre ligante-receptor. Na tabela 4.21 a energia de interação lipofílica (LipoE).

Tabela 4.21

Complex	HBondE	LipoE	ElectE	HBond	Good	Bad	HBondDc
IOPJ+680	-3,226	-7,705	-1,061	6	486	9	1,796;1,890;1,975
IOPJ+Imatinib	-2,499	-7,27	-1,55	4	516	12	1,900;2,097;2,135
T315I+781	-3,407	-7,54	-0,47	3	482	15	1,900;2,097;2,135
T315I+Imatinib	-1,545	-6,835	-1,651	4	563	20	1,548;1,832;2,029
T315A+781	-3,447	-7,759	-0,79	3	447	11	1,754;2,005;2,129
T315A+Nilotinib	-1,455	-7,175	-0,829	3	455	7	2,020;2,031;2,071
M244V+723	-1,988	-7,737	-2,312	4	448	13	1,793;2,029;2,096
M244V+Nilotinib	-1,61	-7,561	-0,831	3	529	8	1,781;1,911;2,225
E355G+781	-4,282	-7,545	-1,151	5	462	14	1,662;1,756;2,005
E355G+Nilotinib	-1,653	-7,703	-0,789	3	531	10	1,872;2,018;2,108
H396A+781	-3,957	-7,593	-1,145	5	457	9	1,675;1,813;1,983
H396A+Nilotinib	-1,795	-7,516	-1,003	3	521	11	1,648;1,948;1,970

As moléculas geradas foram ancoradas usando-se um protocolo onde o encaixe é rápido e com menor esforço computacional. Para isso a flexibilidade da proteína não é incentivada, neste ambiente onde alvo é rígido. No universo de moléculas foi feita a primeira triagem para identificar quais são as melhores moléculas, de todas as mutações referida neste trabalho, foi feita essa pesquisa, na qual foi eleita a melhor de cada modalidade. A figura 4.20 mostra a eleição de cada molécula e de cada mutação em comparação com os principais TKI. Nesta figura, quanto mais negativo for, melhor será inibidor, seguindo preceitos da energia livre de Gibbs. O que se pode comprovar que nesta modalidade, as moléculas geradas são bem superiores aos fármacos.

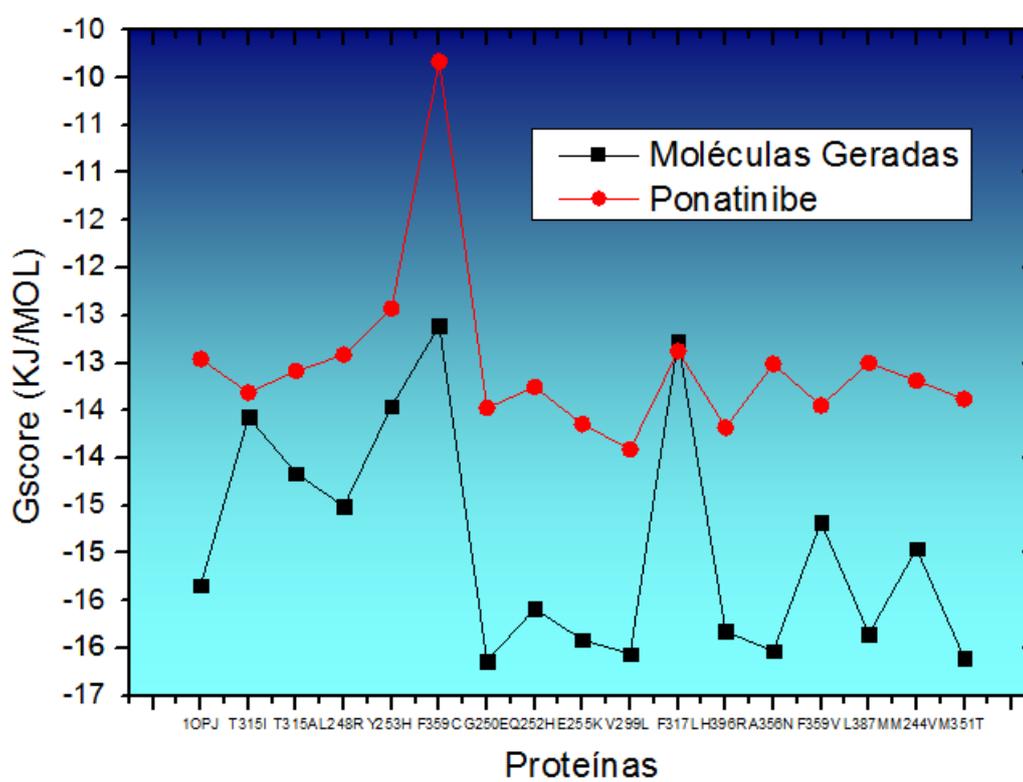


Figura 4.20 -- Gráfico da melhor molécula *GScore* de cada mutação e o melhor TKI.  
Fonte: DO AUTOR

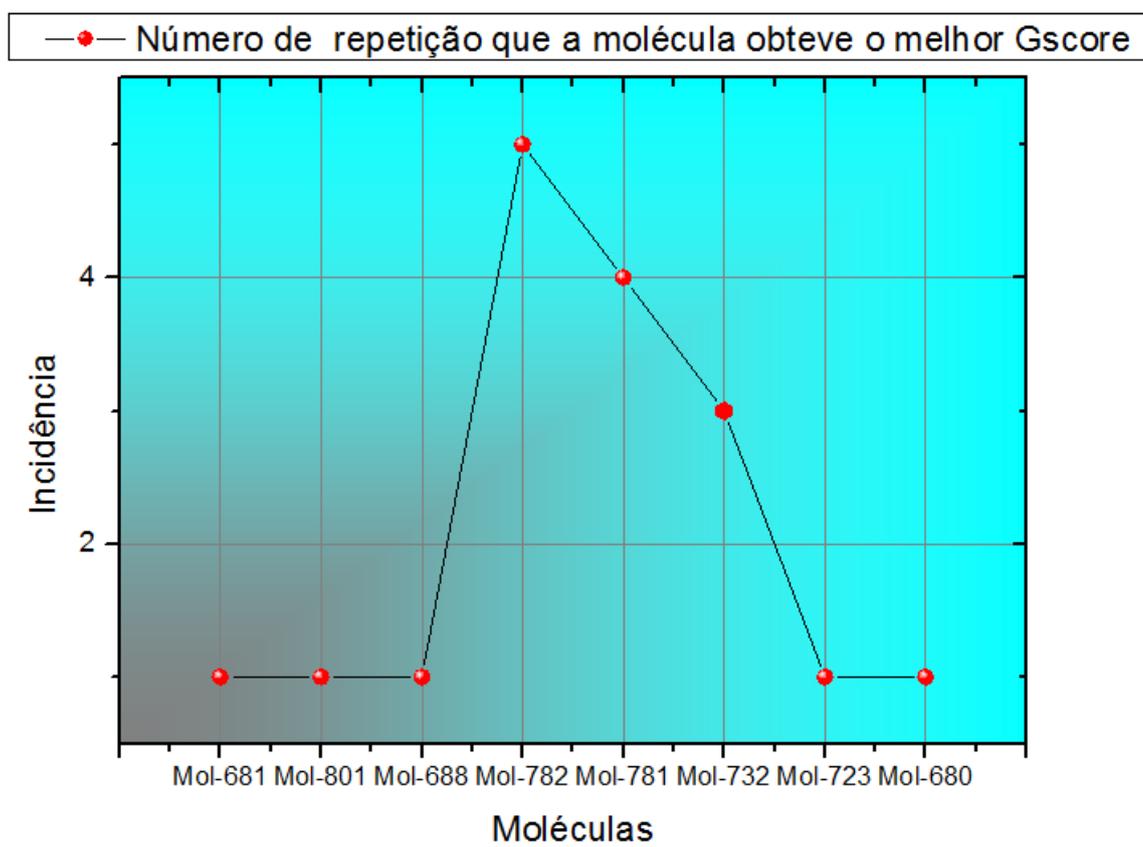


Figura 4.21 – - Numero de que cada molécula obteve o melhor *GS*core.

Fonte: DO AUTOR

No intuito de tentar eleger uma molécula que tenha um bom resultado para todas as mutações, foram observadas as repetições. Neste caso, tivemos uma molécula 782 que se repetiu 5 vezes, 781 4 vezes e a 732 2 vezes como mostra a figura 4.21. Fisicamente a molécula 782 e 781 tem pouca diferença, que elegem essas moléculas terem um bom resultado usando um critério com maior rigor e levando em conta certa flexibilidade da proteína. O protocolo usado foi o IFD.

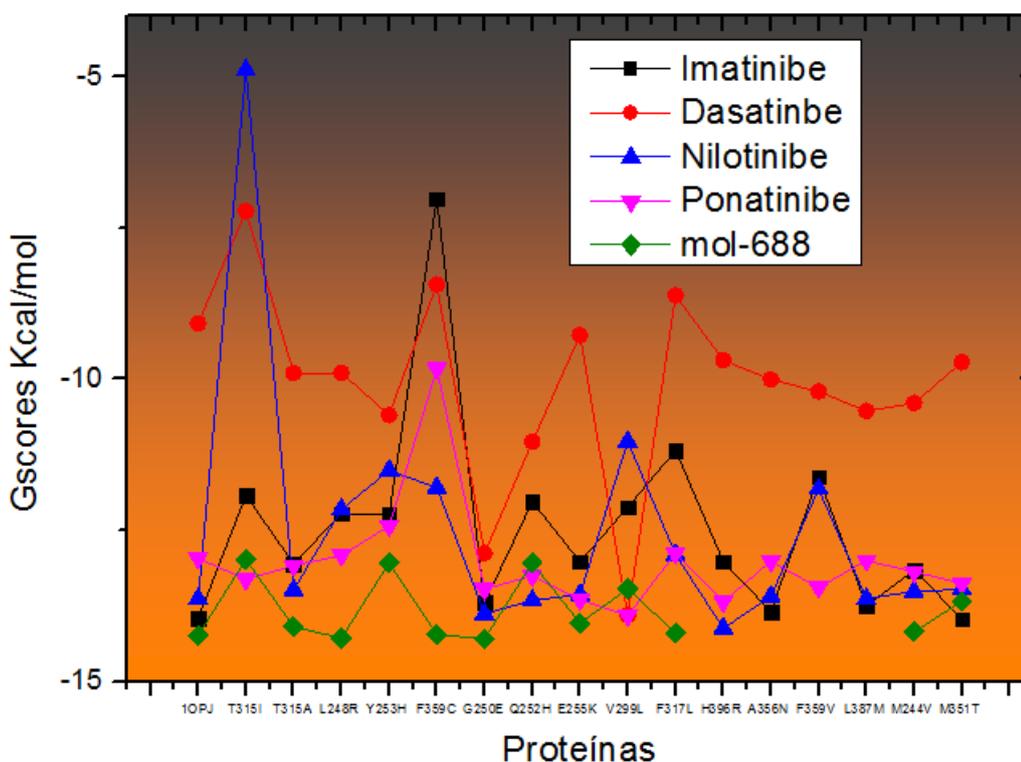


Figura 4.22 -- IFD da molécula 688 comparada com os inibidores TKI.  
Fonte: DO AUTOR

Concluiu-se que o IFD de cada molécula líder com sua respectiva proteína não foi o que se esperava. O *GScore* ficou bem inferior chegando até 4 unidades. Noto-se que as moléculas que possuíam menor capacidade de rotação de grupos, o tempo de cálculo que em media era de 6 horas. É redução 3 seguindo de *GScores* ruins, não confirmou o que apontava o protocolo rápido, acreditando que o universo de moléculas encontrado, tinham ligantes, capaz de inibir eficazmente a proteína em suas várias facetas mutadas. Foram feitos vários testes e uma molécula chamou atenção: a 688 teve um bom resultado em todas as mutações testadas

como mostra a figura 4.22. No teste do QikProp tem bom resultado como mostra a tabela 4.19, seu *GScore* graficamente é linear, podendo ser comparada sim com os TKI, em quase todos os casos sendo superior aos mesmos.

## 5 CONCLUSÕES

Os fármacos encontrados no mercado são capazes de controlar a atividade da tirosina quinase na forma selvagem, mas as mutações que ocorrem no sitio ativo, diminuem a atividade deles. O Mesilato de Imatinibe tem pouca ou nenhuma influência no controle das atividades dessas enzimas, já os inibidores de segunda linha como Dasatinibe tem uma melhora em alguns casos de mutações, mas é incapaz de controlar todas as mutações mantendo-a doença na forma controlada (crônica). O terceiro fármaco, o Nilotinibe, apresenta, uma melhor resposta em relação aos fármacos já apresentados, porém, incapaz de controlar a mutação mais agressiva T515I (vide tabela 4.1). A molécula ponatinibe apresenta a melhor resposta na mutação T315I, mas o fármaco ainda se encontra em fase de teste.

As moléculas sugeridas pelos os métodos usados demonstram um grande potencial para se tornar um fármaco. Em todas as mutações os *GScores* foram superiores aos fármacos encontrados no mercado, demonstrando possuírem mais interações enzima receptor que TKI mais citados na literatura.

No entanto, fica claro que apenas o Glide e o ADME não são suficientes para determinar a potencialidade das moléculas a se tornarem candidatos a fármacos. Os cálculos mais elaborados são precisos. Neste caso, foi usado o IFD, que desmascarou possíveis falsos resultados, e apontou novos candidatos, como por exemplo a molécula 688 que obteve um excelente resultado frente a proteína selvagem e a principal mutação T315I. Seguindo seu bom resultado em todas as mutações descrita neste trabalho, elegendo-se assim, nesta parte da pesquisa (*in silico*), a passagem para próximas fases que candidato a fármaco tem que percorrer.

### Referências Bibliográficas

- AARONSON, D. S.; HORVATH, C. M. A road map for those who don't know JAK-STAT. *Scie*, v. 256, p. 1653–1656, 2002.
- ALLEN, P. B. et al. Philadelphia chromosome-positive leukaemia: the translocated genes and their gene products. *Baillitrt Clinical Haematolog*, v. 5, p. 897–930, 1992.
- AQUINO, S. S.; GONÇALVES, R. P.; SILVA, L. B. Acompanhamento farmacoterapêutico dos pacientes com leucemia mieloide crônica em uso de mesilato de imatinibe na universidade federal do ceara. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 31, p. 137–142, 2009.
- ARANHA, F. J. P. Leucemia mielóide crônica. Transplante de medula óssea. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 30, p. 41–46, 2008.
- ARECHAVALETA, M. et al. Rapid and sensitive allele-specific (as)-rt-pcr assay for detection of t315i mutation in chronic myeloid leukemia patients treated with tyrosine-kinase inhibitors. *Clin. Exp. Med.*, v. 11, p. 55–59, 2011.
- AVILA et al. Proteínas tirosinas quinases: Desafios do desenvolvimento de fármacos para a terapia do câncer. *Rev. Virtual Quim*, v. 2, p. 59–82, 2010.
- BAGG, A. Chronic myeloid leukemia. *Journal of Molecular Diagnostics*, v. 4, p. xxx, 2002.
- BARBOZA, L. P. et al. Análise dos transcritos da translocação t(9;22) em leucemia mielóide crônica. *Rev.Bras.Hematol.Hemoter*, v. 22, p. 89–98, 2000.
- BERGANTINI, A. P. F. et al. Leucemia mielóide crônica e o sistema Fas-FasL. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter*, v. 27, p. 120–125, 2005.
- BOECHAT et al. Mesilato de imatinibe: Uma otimização em sua síntese. *Rev. Virtual Quim*, v. 5, p. 222–234, 2013.
- BOLUDA, J. C. H.; CERVANTES, F. Prognostic factors in chronic myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 22, p. 343–353, 2009.
- BRECCIA, M.; ALIMENA, G. Nilotinib: A second-generation tyrosine kinase inhibitor for chronic myeloid leukemia. *Leukemia Research*, v. 34, p. 129–134, 2010.
- BROOKS, A. J. et al. Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science*, v. 344, p. 703–704, 2014.
- BUYUKASIK, Y.; HAZNEDAROGLU, I. C.; ILHAN, O. Chronic myeloid leukemia: Practical issues in diagnosis and treatment and follow-up. *International Journal of Hematology and Oncology*, v. 20, p. 1–12, 2010.
- CHEN, Y.; SHOICHET, B. K. Molecular docking and ligand specificity in fragment-based inhibitor discovery. *NATURE CHEMICAL BIOLOGY*, v. 5, p. 358–365, 2009.

- CHOME, J. et al. Quantitative monitoring of the T315I mutation in patients with chronic myeloid leukemia (CML). *Leuk Res*, v. 9, p. 713–727, 2011.
- CHONGNARUNGSIN, C. D. and D.; ASHTON, R. Acute respiratory failure from nilotinib-associated diffuse alveolar hemorrhage. *Leukemia Lymphoma*, v. 55, p. 2408–2409, 2014.
- CILLONI, D.; SAGLIO, G. CML: a model for targeted therapy. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 22, p. 285–294, 2009.
- CLARKSON, B. et al. Chronic myelogenous leukemia as a paradigm of early cancer and possible curative strategies. *Leukemia*, v. 17, p. 1211–1262, 2003.
- COPPO, P. et al. Constitutive and specific activation of stat3 by bcr-abl in embryonic stem cells. *Oncogene*, v. 22, p. 4102–4110, 2003.
- DAS \* PING CHEN, . D. N. R. P. . J. L. R. V. M. Z. S. L. S. C. J. et al. 2-aminothiazole as a novel kinase inhibitor template. structure-activity relationship studies toward the discovery of n-(2-chloro-6-methylphenyl)-2-[[6-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]]-2-methyl-4-pyrimidinyl]amino]-1,3-thiazole-5-carboxamide (dasatinib, bms-354825) as a potent pan-src kinase inhibitor. *J. Med. Chem*, v. 49, p. 6819–6832, 2006.
- DELAMAIN, M. T.; CONCHON, M. Os inibidores de tirosino quinase de segunda geração. *Rev. bras. hematol. hemoter.*, v. 30, p. 37 – 40, 2008.
- DEY, F.; CAFLISCH, A. Fragment-based de novo ligand design by multiobjective evolutionary optimization. *J. Chem. Inf. Model*, v. 48, p. 679–690, 2008.
- DOBBIN, J. de A.; GADELHA, M. I. P. Mesilato de imatinibe para tratamento da leucemia mielóide crônica. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 48, p. 429–438, 2002.
- DOWNWARD, J. Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nature Re*, v. 3, p. 11–21, 2003.
- DRUKER, B. J. Translation of the philadelphia chromosome into therapy for cml. *Blood*, v. 112, p. 4808–4817, 2008.
- DUARTE, M. L. et al. Protein folding creates structure-based and noncontiguous consensus phosphorylation motifs recognized by kinases. *Science Signaling*, v. 7, p. 1–9, 2014.
- DUFIES, M. et al. Ponatinib circumvents all types of imatinib resistance in chronic myelogenous leukemia cell lines. *Cell Cycle*, v. 11, p. 1645–1646, 2013.
- ESFAHANI, M. K. et al. Blastic phase of chronic myelogenous leukemia. *Current Treatment Options in Oncology*, v. 7, p. 189–199, 2007.
- FAUSEL christopher. Targeted chronic myeloid leukemia therapy: Seeking a cure. *JMCP*, p. 1–5, 2007.
- GEARY, C. G. The story of chronic myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2000.
- GILES, F. J.; CORTES, J. E.; KANTARJIAN, H. M. Targeting the kinase activity of the bcr-abl fusion protein in patients with chronic myeloid leukemia. *Current Molecular Medicine*, v. 5, p. 615–623, 2005.

- GOLDMAN, J. M. et al. Treatment strategies for cml. *Best Practice Research Clinical Haematology*, v. 22, p. 303–313, 2009.
- GOLEMOVIC, M. et al. AMN107 and a Novel Aminopyrimidine Inhibitor of Bcr-Abl and has in vitro activity against imatinib-resistant chronic myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.*, v. 11, p. 4940–4947, 2014.
- GOODSELL, D. S. The molecular perspective: The ras oncogene. *The Oncologist*, v. 4, p. 263–264, 1999.
- HAIDER, M. K.; BERTRAND, H.-O.; HUBBARD, R. E. Predicting fragment binding poses using a combined mcss mm-gbsa approach. *J. Chem. Inf. Model*, v. 2, p. 1–14, 2010.
- HALPERIN, I. et al. Principles of docking: An overview of search algorithms and a guide to scoring functions. *PROTEINS: Structure and Function and Genetics*, v. 47, p. 409–443, 2002.
- HAMERSCHLAK, N. et al. Quality of life of chronic myeloid leukemia patients in brazil ability to work as a key factor. *Support Care Cancer*, v. 23, p. 464–450, 2014.
- HANTSCHHEL, O. Structure and regulation and signaling and and targeting of abl kinases in cancer. *Genes & Cancer*, v. 3, p. 436–446, 2012.
- HANTSCHHEL, O. Structure and Regulation and Signaling and and Targeting of Abl Kinases in Cancer. *Genes Cancer*, v. 3, p. 436–446, 2012.
- HARTEL, N. et al. Enhanced abl-inhibitor-induced mapk-activation in T315I-BCR-ABL-expressing cells: a potential mechanism of altered leukemogenicity. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 138, p. 203–212, 2012.
- HEHLMANN, R.; HOCHHAUS, A.; BACCARANI, M. Chronic myeloid leukaemia. *Seminar*, v. 370, p. 342–350, 2007.
- HUANG \* CHESTER A. METCALF, R. S. Y. W. D. Z. R. M. T. W.-S. Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-n-4-[(4-methylpiperazin-1-yl)-methyl]-3-(trifluoromethyl)phenylbenzamide (ap24534), a potent, orally active pan-inhib. *J. Med. Chem.*, v. 53, p. 4701–4719, 2010.
- HUANG, L. J. shen; CONSTANTINESCU, S. N.; LODISH, H. F. The n-terminal domain of janus kinase 2 is required for golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Molecular Cell*, v. 8, p. 1327 – 1338, 2001.
- HUNTER, T. Treatment for chronic myelogenous leukemia: the long road to imatinib. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 117, p. 2036–2043, 2007.
- JONE, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J. Mol. Biol*, v. 267, p. 727–748, 1997.
- KAGITA, S. et al. Incidence of bcr-abl kinase domain mutations in imatinib refractory chronic myeloid leukemia patients from south india. *Tumor Biol*, v. 4, p. 1–7, 2014.
- KANTARJIAN agop et al. Nilotinib in imatinib-resistant cml and philadelphia chromosome positive all. *n engl j*, v. 354, p. 2542–2551, 2006.

- KANTARJIAN, H. et al. A highly selective bcr-abl tyrosine kinase inhibitor and is effective in patients with philadelphia chromosome–positive chronic myelogenous leukemia in chronic phase following imatinib resistance and intolerance. *Blood*, v. 110, p. 3540–3546, 2007.
- KISSELEVA, T. et al. Signaling through the jak/stat pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, v. 285, p. 1 – 24, 2002.
- KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: Methods and applications. *NATURE REVIEWS*, v. 3, p. 935–949, 2004.
- KOLB, P.; CAFLISCH, A. Automatic and efficient decomposition of two-dimensional structures of small molecules for fragment-based high-throughput docking. *J. Med. Chem.*, v. 49, p. 7384–7392, 2006.
- LAFLEUR, K. et al. Optimization of inhibitors of the tyrosine kinase ephb4. 2. cellular potency improvement and binding mode validation by xray crystallography. *J. Med. Chem.*, v. 56, p. 84?96, 2013.
- LAURENT, E. et al. The bcr gene and philadelphia chromosome-positive leukemogenesis. *CANCER RESEARCH*, v. 15, p. 2343–2355, 2001.
- LEITE, C. A. V. G. et al. Receptores tirosina quinase implicacoes terapeuticas no cancer. *Revista Brasileira de Oncologia Clinica*, v. 8, p. 130–143, 2012.
- LENSINK, M. F.; MENDEZ, R.; WODAK, S. J. Docking and scoring protein complexes CAPRI 3rd Edition. *PROTEINS*, v. 3, p. 705–715, 2007.
- LEVINSON, N. M.; BOXER, S. G. A conserved water-mediated hydrogen bond network defines bosutinib’s kinase selectivity. *nature CHEMICAL BIOLOGY*, v. 45, p. 1–8, 2013.
- LEVY, J. P. Hematologia. *Medsa*, v. 9, p. 268–271, 2000.
- LI, X. et al. Bone marrow microenvironment confers imatinib resistance to chronic myelogenous leukemia and oroxylin a reverses the resistance by suppressing stat3 pathway. *Archives of Toxicology*, v. 2, p. 1–16, 2014.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 46, p. 3 – 26, 2001.
- MAELE, A. H. concept in the nineteenth and twentieth centuries ambiguous cells: the emergence of the stem cell. *Notes Rec. R. Soc*, v. 45, p. 1–21, 2011.
- MAJEUX, N.; SCARSI, M.; CAFLISCH, A. Efficient electrostatic solvation model for protein-fragment docking. *PROTEINS Structure Function and Genetics*, v. 42, p. 256–268, 2001.
- MALONEY, W. C. Radiogenic leukemia revisited. *blood*, v. 70, p. 905–908, 1987.
- MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Ras oncogenes: the first 30 years. *Nature Rev*, v. 3, p. 1–13, 2003.

- MANLEY, P. W.; COWAN-JACOB, S. W.; MESTAN, J. Advances in the structural biology and design and clinical development of bcr-abl kinase inhibitors for the treatment of chronic myeloid leukaemia. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 174, p. 3–13, 2005.
- MARU'S, Y.; WITTE', O. N. The bcr gene encodes a novel serine/threonine kinase activity within a single exon. *Cell*, v. 67, p. 459–468, 1991.
- MAULIK, U.; BANDYOPADHYAY, S. Genetic algorithm-based clustering technique. *Pattern Recognition*, v. 33, p. 1455–1465, 2000.
- MOLOGNI, L. et al. Ponatinib is a potent inhibitor of wild-type and drug-resistant gatekeeper mutant ret kinase. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 377, p. 1–6, 2013.
- MUKHERJEE, S. et al. A docking interaction study of the effect of critical mutations in ribonuclease a on protein-ligand binding. *Biochem. Mol. Biol. Educ.*, v. 33, p. 335–343, 2005.
- NAGAR, B. et al. Crystal structures of the kinase domain of c-abl in complex with the small molecule inhibitors PD173955 and imatinib (sti-571). *Cancer Res*, v. 62, p. 4236–4243, 2002.
- NAIR, M. G. V. et al. Monitoring of response to therapy with imatinib esylate in chronic myeloid leukemia in chronic phase (CML-CP). *medical journal armed forces india*, v. 70, p. 315–320, 2014.
- NOWELL, P. C. Discovery of the philadelphia chromosome: a personal perspective. *J. Clin. Invest*, v. 117, p. 2033–2035, 2007.
- OLIVEIRA, H. P. As leucemias crônicas. *Hematologia clínica*, v. 3, p. 315–323, 1988.
- P, N. R. W. B. When is chemical similarity significant the statistical distribution of chemical similarity scores and its extreme values. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 50, p. 1205–1222, 2010;50.
- PFIRRMANN, M. et al. Explaining survival differences between two consecutive studies with allogeneic stem cell transplantation in patients with chronic myeloid leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 43, p. 1234–1249, 2014.
- RAREY, M. et al. A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm. *J. Mol. Biol*, v. 261, p. 470–489, 1196.
- RAY, A. et al. Identification of bcr-abl point mutations conferring resistance to the abl kinase inhibitor imatinib (nilotinib) by a random mutagenesis study. *Blood*, v. 109, p. 5011–5015, 2007.
- REN, R. Mechanisms of bcr-abl in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *NATURE REVIEWS*, v. 5, p. 172–183, 2005.
- ROBERTSON, T. A.; VARANI, G. An all-atom and distance-dependent scoring function for the prediction of protein-dna interactions from structure. *PROTEINS: Structure and Function and Bioinformatics*, v. 66, p. 359–374, 2007.
- RODRIGUES, R. P. et al. Estratégias de triagem virtual no planejamento de fármacos. *Rev. Virtual Quim.*, v. 4, p. 739–776, 2012.
- SCHULZ, M.; HUBBARD, R. Recent progress in fragment-based lead discovery. *ACS Chem. Biol.*, v. 16, p. 615–621, 2009.

- SCOTT, J. D.; PAWSON, T. Cell signaling in space and time: Where proteins come together and when they're apart. *Science.*, v. 326, p. 1220–1224., 2009.
- SHUA, K.; LIU, B. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nature*, v. 3, p. 900–911, 2003.
- SILVA, B. V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. *Quim. Nova*, v. 32, p. 453–462, 2009.
- SILVER, R. T. The blast phase of chronic myeloid leukaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 22, p. 387–394, 2009.
- SOVERINI, S. et al. Choosing the best second-line tyrosine kinase inhibitor in imatinib-resistant chronic myeloid leukemia patients harboring bcr-abl kinase domain mutations: How reliable is the ic50. *The Oncologist*, v. 16, p. 868–876, 2011.
- STAERK, J. et al. Jak2, the jak2 {V617F} mutant and cytokine receptors. *Pathologie Biologie*, v. 55, p. 88 – 91, 2007.
- SUZUKI, R. et al. Identification of a novel SEPT9-ABL1 fusion gene in a patient with t-cell prolymphocytic leukemia. *Leukemia Research Reports*, v. 3, p. 54–57, 2014.
- SZCZYLIK, C. et al. Selective inhibition of leukemia cell proliferation by bcr-abl antisense oligodeoxynucleotides. *SCIENCE*, v. 253, p. 562–565, 1991.
- TALPAZ, M. et al. Dasatinib in imatinib-resistant philadelphia chromosome positive leukemias. *n engl j med*, v. 354, p. 2531– 2541, 2006.
- TEFFERI, A. The history of myeloproliferative disorders: before and after dameshek. *Leukemia*, v. 22, p. 3–13, 2008.
- TEFFERI, A. et al. Proposals and rationale for revision of the world health organization diagnostic criteria for polycythemia vera and essential thrombocythemia and primary myelofibrosis recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*, v. 110, p. 1092–1097, 2007.
- TEOTICO, D. G. et al. Docking for fragment inhibitors of ampc beta -lactamase. *PNAS*, v. 106, p. 7455–7460, 2009.
- THOMAS, X. First contributors in the history of leukemia. *World J Hematol*, v. 6, p. 62–70, 2013.
- TOKARSKI, J. S. et al. The structure of dasatinib BMS-354825 bound to activated abl kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib resistant abl mutants. *Cancer Res*, v. 11, p. 5790–5797, 2006.
- VARDIMAN, J. W.; HARRIS, N. L.; BRUNNING, R. D. The world health organization WHO classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, v. 100, p. 2292–2302, 2002.
- VASS, M.; KESER, G. M. Fragments to link. a multiple docking strategy for second site binders. *Med. Chem. Commun*, v. 4, p. 510–514, 2013.
- VERDONK, M. L. et al. Docking performance of fragments and druglike compounds. *J. Med. Chem.*, v. 54, p. 5422–5431, 2011.

- VERFAILLIE, C. M. et al. Comparative analysis of autografting in chronic myelogenous leukemia effects of priming regimen and marrow or blood origin of stem cells. *American Society of Hematology*, v. 98, p. 1820–1831, 2011.
- VERLI, H. *Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular*. [S.l.]: Atracamento, 2014.
- WANG, R.; GAO, Y.; LAI, L. Ligbuilder: A multi-purpose program for structure-based drug design. *J. Mol. Model.*, v. 6, p. 498 – 516, 2000.
- WANG, R. et al. Score: A new empirical method for estimating the binding affinity of a protein-ligand complex. *J. Mol. Model.*, v. 4, p. 379 – 394, 1998.
- WEISBERG, E. et al. Second generation inhibitors of BCRABL for the treatment of imatinibresistant chronic myeloid leukaemia. *NATURE REVIEWS*, v. 7, p. 345–356, 2007.
- WILLETT et al. Similarity-based virtual screening using 2d fingerprints. *Drug Discovery Today*, p. 1046 – 1053, 2006.
- WILLETT, P. Similarity-based virtual screening using 2d fingerprints. *Drug Discovery Today*, v. 11, p. 1046 – 1053, 2006.
- WONGBOONMA, W.; THONGNOPPAKHUN, W.; AUEWARAKUL, C. U. A single-tube allele specific-polymerase chain reaction to detect t315i resistant mutation in chronic myeloid leukemia patients. *Journal of Hematology Oncology*, v. 4, p. 1–7, 2011.
- XIE, S. et al. Involvement of jak2 tyrosine phosphorylation in bcr- abl transformation. *Oncogene*, v. 20, p. 6188–6195, 2001.
- XU, H. long et al. In silico identification of novel kinase inhibitors targeting wild-type and T315I mutant ABL from FDA-approved drugs. *Mol. BioSyst. and*, v. 10, p. 1524–1537, 2014.
- YOUNG, M. A. et al. Structure of the kinase domain of an imatinib-resistant abl mutant in complex with the aurora kinase inhibitor vx-680. *Cancer Res*, v. 66, p. 1007–1014, 2006.
- YUAN, Y. et al. Ligbuilder 2: A practical de novo drug design approach. *J. Chem. Inf. Model.*, v. 51, p. 1083–1091, 2011.
- YURIEVA, E.; AGOSTINO, M.; RAMSLANDB, P. A. Challenges and advances in computational docking: 2009 in review. *J. Mol. Recognit*, v. 24, p. 149–164, 2010.
- ZHOU, L. et al. Nilotinib for imatinib-resistant or -intolerant chronic myeloid leukemia in chronic phase and accelerated phase and or blast crisis: A single- and multiple-dose and open-label pharmacokinetic study in chinese patients. *Clinical Therapeutics*, v. 31, p. 1568–1575, 2009.
- ZHOU, T. et al. Structural mechanism of the pan-bcr-abl inhibitor ponatinib (ap24534): Lessons for overcoming kinase inhibitor resistance. *Chem Biol Drug Des*, v. 77, p. 1–11, 2011.
- ZHU, Y.; QIAN, S.-X. Clinical efficacy and safety of imatinib in the management of ph+ chronic myeloid or acute lymphoblastic leukemia in chinese patients. *OncoTargets and Therapy*, v. 7, p. 395–404, 2014.

Anexo

**ANEXO A – SIMBOLOGIA E NOMENCLATURA DOS AMINOÁCIDOS**

Tabela A.1 – Mutações induzidas na 1OPJ referente a 3QRI código do PDB  
Fonte: Do autor

Proteína 3QRI	Proteína 1OPJ
T315I	T334L
T315A	T334A
L248R	L267R
Y253H	Y272H
F359C	F378C
G250E	G269E
Q252H	Q271H
Y235F	Y254F
E255K	E274K
V299L	V318L
F317L	F336L
M351T	M378T
A356N	A375N
F359V	F378V
L387M	L406M
M244V	M263V

Tabela A.2 – Simbologia e nomenclatura dos aminoácidos.

Nome	Símbolo	Abreviação	Nomenclatura
Glicina	Gly, Gli	G	Ácido 2-aminoacético
Alanina	Ala	A	Ácido 2-aminopropiônico
Leucina	Leu	L	Ácido 2-aminoisocapróico
Valina	Val	V	Ácido 2-aminovalérico
Isoleucina	Ile	I	Ácido 2-amino-3-metil-n-valérico
Prolina	Pro	P	Ácido pirrolidino-2-carboxílico
Fenilalanina	Phe ou Fen	F	Ácido 2-amino-3-fenil-propionico
Serina	Ser	S	Ácido 2-amino-3-hidroxi-propionico
Treonina	Thr, The	T	Ácido 2-amino-3-hidroxi-n-butírico
Cisteína	Cys, Cis	C	Ácido 2-bis-(2-amino-propionico)-3-dissulfeto
Tirosina	Tyr, Tir	Y	Ácido 2-amino-3-(p-hidroxifenil)propionico
Asparagina	Asn	N	Ácido 2-aminossuccinâmico
Glutamina	Gln	Q	Ácido 2-aminoglutarâmico
Aspartato	Asp	D	Ácido 2-aminossuccínico
Glutamato	Glu	E	Ácido 2-aminoglutárico
Arginina	Arg	R	Ácido 2-amino-4-guanidina-n-valérico
Lisina	Lys, Lis	K	Ácido 2,6-diaminocapróico
Histidina	His	H	Ácido 2-amino-3-imidazolpropionico
Triptofano	Trp, Tri	W	Ácido 2-amino-3-indolpropionico
Metionina	Met	M	Ácido 2-amino-3-metiltio-n-butírico