

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

Planejamento *in silico* de cumarinas potencialmente inibidoras da  
cinesina Eg5

**CAROLINA MONTEIRO RIBEIRO RITTER**

PORTO ALEGRE, 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE FARMÁCIA

**Carolina Monteiro Ribeiro Ritter**

Planejamento *in silico* de cumarinas potencialmente inibidoras da  
cinesina Eg5

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Farmácia da Universidade Federal do  
Rio grande do Sul como requisito à obtenção do  
título de grau de Farmacêutico.

Orientador: Prof. Dr. Vera Lucia Eifler-Lima

Coorientador: Dr. Gustavo Machado das Neves

Porto Alegre, 2023

Para minhas filhas: Maria Antônia, Maria Catarina e Alice.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, por me conceder chegar até este momento.

Às minhas filhas, pois nada seria feito se não fosse por elas.

Aos meus pais Manuela e Roberto Mansur e a minha irmã, por me ensinarem a ter força, nunca desistir e me apoiarem de todas as formas possíveis, para que eu possa atingir o meu máximo potencial.

Ao meu esposo pelo apoio incansável.

À Professora Vera Lucia Eifler-Lima pela oportunidade, colaboração e muitos ensinamentos.

Ao mestre e mentor Gustavo por todos os ensinamentos, apoios e direcionamentos.

Aos colegas do LaSOM sempre dispostos a ajudar.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
1.1	CÂNCER .....	12
1.2	GLIOMA .....	12
	1.2.1 <i>PROTOCOLO E DIRETRIZES VIGENTES PARA O TRATAMENTO DO GLIOMA</i> .....	12
1.3	CINESINA EG5 .....	14
1.4	CADD .....	15
	1.4.1 <i>DOCKING MOLECULAR</i> .....	15
	1.4.2 <i>PROTOSCOLOS DE DOCKING MOLECULAR</i> .....	16
	1.4.3 <i>ALGORITMOS DE BUSCA</i> .....	17
	1.4.4 <i>FUNÇÃO DE ESCORE</i> .....	18
	1.4.5 <i>PROGRAMA GOLD</i> .....	18
	1.4.6 <i>O ALGORITMO GENÉTICO DO GOLD</i> .....	19
	1.4.7 <i>FUNÇÕES DE ESCORE DO GOLD (SCORING FUNCTION)</i> .....	20
1.5	CUMARINAS.....	21
2	OBJETIVOS.....	23
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	24
3.1	ELUCIDAÇÃO DO RACIONAL DE TRIAGEM .....	24
	3.1.1 <i>CONSTRUÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO DE MODELOS MONASTROL-LIKE</i> .....	25
	3.1.2 <i>CONSTRUÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO DE MODELOS ISPINESIBELIKE</i> .....	27
3.2	TRIAGEM VIRTUAL POR <i>DOCKING MOLECULAR</i> .....	28
	3.2.1 <i>VALIDAÇÃO POR REDOCKING</i> .....	28
	3.2.2 <i>OTIMIZAÇÃO E CRIAÇÃO DA SEGUNDA GERAÇÃO DE COMPOSTOS</i> .....	30
	3.2.3 <i>DOCKING MOLECULAR DAS PROPOSTAS OTIMIZADAS</i> .....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
4.1	PRIMEIRA ETAPA: ELUCIDAÇÃO DO RACIONAL DE TRIAGEM .....	33
4.2	TRIAGEM VIRTUAL POR <i>DOCKING MOLECULAR</i> .....	33
	4.2.1 <i>VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO</i> .....	33
	4.2.2 <i>DOCKING MOLECULAR DO NÚCLEO CUMARINA</i> .....	34
	4.2.3 <i>SEGUNDA ETAPA: OTIMIZAÇÃO DOS MODELOS</i> .....	34

5	CONCLUSÕES .....	35
6	REFERÊNCIAS.....	36
	ANEXOS .....	39

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Estrutura química e mecanismo de ação do tratamento vigente.....	13
<b>Figura 2</b> - Estruturas do monastrol ( <b>7</b> ) e ispinesibe ( <b>8</b> ).....	14
<b>Figura 3</b> - Fórmula estrutural da cumarina.....	21
<b>Figura 4</b> - Resíduos de aminoácidos mais frequentes mapeados nas estruturas monastrol e Eg5 (PDB ID: 1X88) e ispinesibe e Eg5.....	24
<b>Figura 5</b> - Farmacóforo gerado no servidor Pharmit <sup>48</sup> para o complexo monastrol.....	25
<b>Figura 6</b> - Primeira geração de modelos <i>monastrol-like</i> .....	26
<b>Figura 7</b> - Farmacóforo gerado no servidor Pharmit <sup>48</sup> ispinesibe e Eg5.....	27
<b>Figura 8</b> - Primeira geração de modelos <i>ispinesibe-like</i> .....	28
<b>Figura 9</b> - Relação das poses obtidas por <i>redocking</i> em relação ao ligante cristalográfico .....	29
<b>Figura 10</b> - 1,2-benzopirona ( <b>9</b> ) em pose obtida por <i>Docking Molecular</i> .....	29
<b>Figura 11</b> - Estruturas dos compostos 50 e 66.....	30
<b>Figura 12</b> - A) <i>Docking Molecular</i> do composto 66. B) <i>Docking Molecular</i> do composto 66.....	31
<b>Figura 13</b> - Composto 66 em superfície hidrofóbica.....	31
<b>Figura 14</b> - Composto 50 em superfície hidrofóbica.....	32
<b>Figura 15</b> - A) <i>Docking Molecular</i> do composto 50. B) <i>Docking Molecular</i> do composto 50 .....	32
<b>Figura 16</b> - Segunda geração de compostos <i>ispinesibe-like</i> .....	44
<b>Figura 17</b> - Segunda geração de compostos <i>monastrol-like</i> .....	48

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Algoritmos de busca empregados nos programas de <i>Docking Molecular</i> .....	17
<b>Tabela 2</b> - Relação entre os resíduos aminoácidos frequentes.....	24
<b>Tabela 3</b> - Classificação e mapeamento de interações entre resíduos aminoácidos e ligante NAT .....	39
<b>Tabela 4</b> - Classificação e mapeamento de interações entre resíduos aminoácidos e o ligante G7X .....	40
<b>Tabela 5</b> - Resultados obtidos para o <i>redocking</i> relativo ao co-cristal monastrol .....	42
<b>Tabela 6</b> - Resultados obtidos para o <i>redocking</i> relativo ao co-cristal ispinesibe .....	42
<b>Tabela 7</b> - Resultados obtidos para o primeiro <i>docking molecular</i> .....	42
<b>Tabela 8</b> - Resultados obtidos para o <i>docking</i> da segunda geração de ligantes.....	43

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASP: *Astex Statistical Potential*

BHE: Barreira hematoencefálica

CADD: *Computer-Aided Drug Design/Discovery*

CCDC: *Cambridge Crystallographic Data Centre*

$\Delta G$ : Energia livre de Gibbs.

DSV: *Discovery Studio Visualizer*.

Fase M: Fase mitótica do ciclo celular.

GOLD: *Genetic Optimization for Ligand Docking*.

Ki: Constante de Inibição.

LBDD: *Ligand-Based Drug Design/Discovery*.

OPAS/OMS: Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde.

PCV: procarbazina, lomustina e vincristina.

PDB: *Protein Data Base*.

SBDD: *Structure-Based Drug Design/Discovery*.

SNC: Sistema Nervoso Central.

TMZ: temozolomida.

## RESUMO

O planejamento racional de compostos bioativos desempenha um papel crucial na descoberta de novos agentes terapêuticos. A cinesina Eg5, uma proteína essencial no processo de divisão celular, é um alvo promissor para intervenção farmacológica no tratamento do câncer. Este estudo explora o potencial de cumarinas como inibidores da cinesina Eg5 através de abordagens *in silico*. Utilizando técnicas de modelagem molecular, é feita uma triagem virtual de uma quimioteca de cumarinas, investigando a sua viabilidade inibidora. Considerando a estrutura tridimensional da cinesina Eg5, as interações ligante-proteína foram analisadas para elucidar os principais resíduos envolvidos com prováveis ligantes, em uma estratégia de complementaridade. Além disso, a análise de características estruturais proporcionou uma compreensão sobre regiões que favorecem a afinidade e interação com a proteína. Neste contexto, são reveladas informações para o desenvolvimento subsequente de cumarinas como inibidores da cinesina Eg5, destacando a importância da prática computacional na busca eficiente de novos agentes terapêuticos.

**Palavras-chaves:** planejamento fármacos; cumarinas; cinesina Eg5; modelagem molecular; interações ligante-proteína; descoberta de fármacos; câncer; triagem virtual; docagem molecular.

## ABSTRACT

Rational design of bioactive compounds plays a pivotal role in discovering novel therapeutic agents. Eg5 kinesin, a vital protein in the process of cell division, stands as a promising target for pharmacological intervention in cancer treatment. This study delves into the potential of coumarin compounds as inhibitors of Eg5 kinesin using *in silico* approaches. Employing molecular modeling techniques, a virtual screening of a coumarin chemical library is conducted, assessing their feasibility as inhibitors. Through the lens of the three-dimensional structure of Eg5 kinesin, ligand-protein interactions are scrutinized, shedding light on key residues involved with potential ligands in a complementary strategical manner. Furthermore, analysis of structural characteristics yields insights into regions conducive to favorable affinity and protein interaction. In this context, pivotal information is unveiled for subsequent coumarin development as Eg5 kinesin inhibitors, underscoring the significance of computational practices in efficiently searching for new therapeutic agents.

**Keywords:** Computer-aided drug design; Molecular docking; Eg5 kinesin; Cancer therapy; *In silico* approaches; Molecular modeling; Virtual screening; Coumarins; Protein-ligand interactions; Structural analysis; Drug discovery; Drug design; SBDD.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER

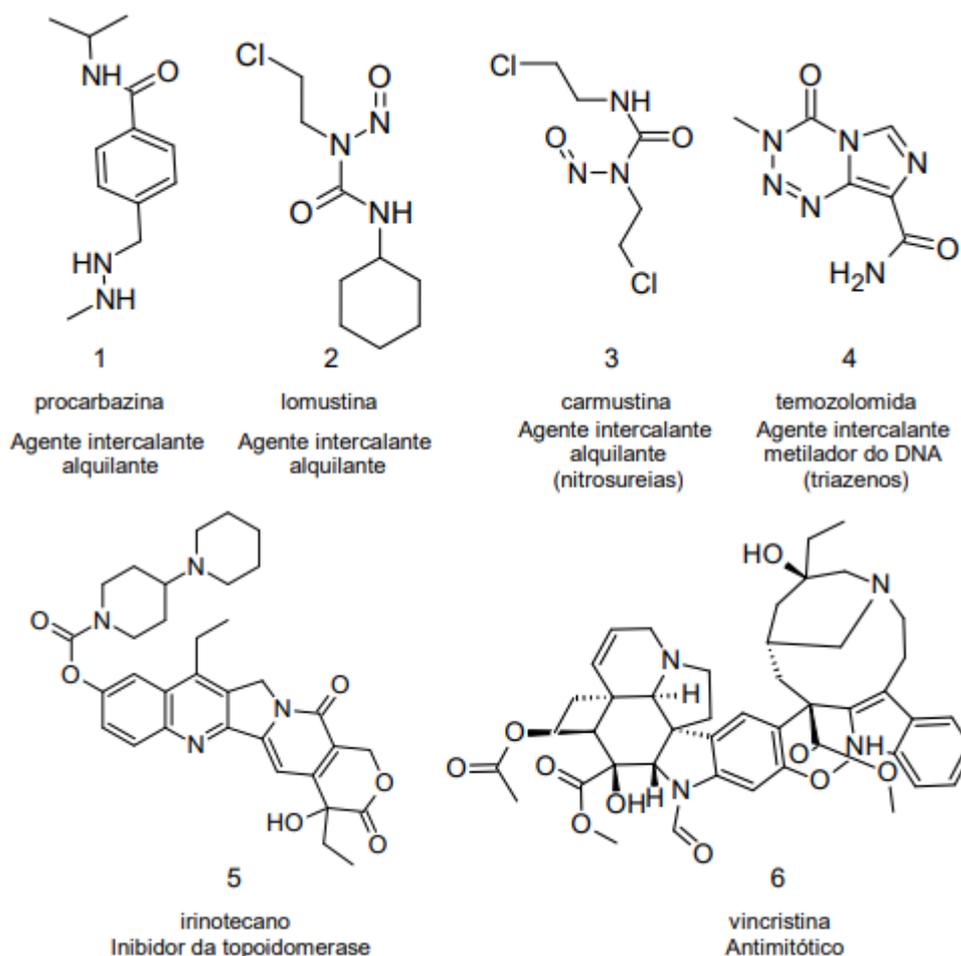
O câncer é uma doença complexa que se caracteriza pelo crescimento desordenado de células no corpo. Essas células anômalas podem se multiplicar rapidamente e invadir os tecidos e órgãos adjacentes, podendo também se espalhar para outras partes do corpo, em um processo conhecido como metástase. A formação de tumor pode não ser considerado câncer, mas se apresentar critérios de malignidade, pode estar localizado no tecido em que se originou (câncer *in situ*) ou pode começar a invadir tecidos próximos (câncer invasivo)<sup>1,2</sup>. Apontamentos mais recentes da Organização Pan-Americana da Saúde e Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS) demonstram que as diferentes manifestações do câncer ocupam um posto ainda mais alto nas causas de morte a nível mundial. Estima-se que é a segunda principal causa de morte no mundo, além de 9,6 milhões de mortes em 2018, momento em que o câncer ainda era a terceira causa mais comum de óbitos mundiais. Proporcionalmente, uma em cada seis mortes são relacionadas à esta doença atualmente. Tão preocupante quanto este fato, aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda<sup>3</sup>.

## 1.2 GLIOMA

O glioma é um tipo de tumor que se origina a partir das células gliais do cérebro ou da medula espinhal e são fundamentais como suporte para o funcionamento adequado do sistema nervoso central. Os gliomas representam a forma mais comum de tumores com critérios de malignidade localizados intracranialmente com uma frequência de 80%<sup>3-8</sup>

### 1.2.1 PROTOCOLO E DIRETRIZES VIGENTES PARA O TRATAMENTO DO GLIOMA

O tratamento dos gliomas pode ocorrer de forma isolada ou em combinação entre ressecção tumoral (cirúrgica), radioterapia e quimioterapia. A quimioterapia recomendada no período pós cirúrgico é constituída pela associação de procarbazina **(1)**, lomustina **(2)** e vincristina **(6)** (PCV)<sup>6,8</sup>. Todos estes fármacos, à exceção da vincristina **(6)**, atuam como agentes intercalantes do DNA (Figura 1)<sup>4-9</sup>, que torna muito importante a associação com



**Figura 1** - Estrutura química e mecanismo de ação do tratamento vigente.

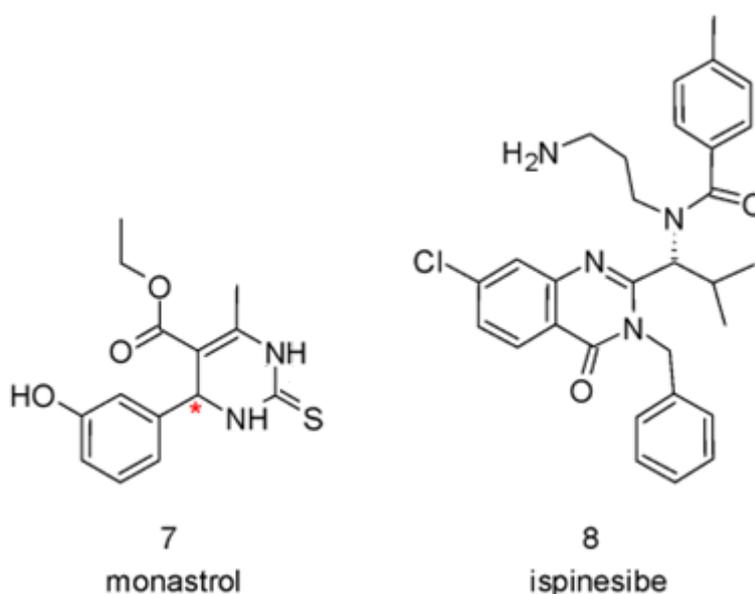
outros antineoplásicos. A quimioterapia paliativa envolvida no tratamento do glioma de alto grau, envolve outras classes como o inibidor da topoisomerase e derivado da camptotecina, o irinotecano (**5**), e os agentes intercalantes do tipo nitrosureia carmustina (**3**) e o triazeno temozolomida (**4**)<sup>9</sup>.

Portanto, o tratamento ainda é bastante desafiador, em função das muitas complicações que podem ocorrer concomitantemente de acordo com a evolução individual. Não é incomum que indivíduos portadores de tumores com características do glioblastoma multiforme enfrentem dificuldades com a remoção cirúrgica, em função da indefinição de dos limites entre tecido saudável, facilitando a ocorrência de infiltração de mais células neoplásicas<sup>9</sup>. Com tantos impeditivos, tem-se ainda o obstáculo primário, a barreira hematoencefálica (BHE), que exige propriedades farmacocinéticas, próprias, tudo isso, torna a busca por novos agentes antiglioblastomas, um esforço de proporções hercúleas<sup>4,9</sup>.

### 1.3 CINESINA EG5

Cinesinas são proteínas motoras que utilizam energia do ATP para moverem-se ao longo dos microtúbulos, envolvidas na mitose e em processos de transporte celular<sup>10,11</sup>. Seu papel é essencial para formação e funcionamento do fuso mitótico, segregação e transporte dos cromossomos, controle de *checkpoint* mitótico e citocinese<sup>12</sup>. A inibição da Eg5 produz interrupção do ciclo celular na fase G<sub>2</sub>/M e ativação de vias de sinalização celular que tem como produto a morte celular por apoptose<sup>13</sup>. Devido ao seu papel específico na divisão celular, a inibição da cinesina Eg5 afeta apenas células em processo de mitose ignorando as que não estão em processo de proliferação<sup>14</sup>. Desta maneira a inibição da Eg5 não deve apresentar os efeitos adversos associados com os agentes antimitóticos mencionados. Além disso, a Eg5 não é expressa no sistema nervoso periférico evitando a ocorrência de efeitos neuropáticos, comuns com a utilização de taxanos<sup>15,16</sup>.

O primeiro inibidor *seletivo* desta proteína foi o monastrol (**7**) (*BindingDB* PDB ID 1X88 IC<sub>50</sub>: min: 1.00e+4, max: 2.07e+4 nM), tornando-se um *template* para a síntese de novos derivados visando este novo alvo antitumoral. Atualmente o principal inibidor da cinesina Eg5 é o ispinesibe (**8**) (*BindingDB* PDB ID 4AP0 IC<sub>50</sub>: min: 1.2, max: 47 nM) com atividade relativamente potente e seletiva, ainda que ambos se encontrem em fase pre-clínica<sup>17,18</sup>.



**Figura 2** - Estruturas do monastrol (**7**) e ispinesibe (**8**).

Eles têm como alvo o sítio alostérico específico no domínio motor Eg5 composto por hélice  $\alpha 2$ /loop L5 e hélice  $\alpha 3$ , que está a aproximadamente 10 Å de distância do sítio de ligação do ATP. A fim de melhor compreender o sítio de ligação, é importante conhecer a região flexível que conecta suas cabeças motoras, permitindo a coordenação do movimento ao longo dos microtúbulos regulado pela hidrólise de ATP, denominado *neck-linker*, para o alvo deste estudo, pois esta é uma região crítica para a modulação direta da processabilidade em diferentes famílias de cinesina. Para a Eg5 este mecanismo tipo catraca é consistente com a sua atividade biológica. A indicação é que o L5 pode ser um importante elemento na via de ligação ao *neck-linker* da Eg5. A transformação que é produto desta movimentação é a passagem da condição flexível nos estados ligado a ADP e livre de nucleotídeos para ancorado ao longo do domínio motor central no estado ligado ao ATP, o qual o mantém preso, impedindo captação de ADP<sup>13,15-19</sup>.

#### 1.4 CADD

O surgimento do planejamento de fármacos, auxiliado por computador (*Computer Aided Drug Design/Discovery*, CADD), auxilia a estruturar métodos em torno do planejamento racional de fármacos<sup>20,21</sup>. As ferramentas de CADD são normalmente divididas em dois grandes grupos, que dependem da quantidade de informação necessária para construção de um modelo. Quando o estudo é baseado na estrutura biológica do alvo pretendido, é seguida a abordagem de *Structure-Based Drug Design Discovery* (SBDD). Por outro lado, quando a estrutura do alvo não é conhecida a condução do estudo ocorre a partir dos requisitos estruturais do ligante, *Ligand Based Drug Design Discovery* (LBDD)<sup>20-24</sup>.

##### 1.4.1 DOCKING MOLECULAR

É um método que possibilita a triagem em quimiotecas virtuais, de modo a auxiliar na identificação de novos compostos de interesse terapêutico. Originalmente foi desenvolvido para ajudar no entendimento de mecanismos de reconhecimento molecular, incluindo estudos de Relação Estrutura e Atividade (REA) realizando inferências de ligações em complexos alvo-ligante<sup>21-27</sup>.

No âmbito do *docking molecular*, o seu principal objetivo é realizar previsões de grande importância, incluindo:

- Predição da pose: se trata da formação de diferentes conformações, que são geradas para otimizar as interações prováveis através de ligações e torções moleculares, resultando na formação do complexo de menor energia, que está relacionada aos graus de liberdade envolvendo translação, rotação e torção, onde os ângulos guardam uma proporção com as ligações que podem se mover<sup>20-26,33</sup>.
- Avaliação da afinidade das interações intermoleculares: a estabilidade energética é estimada através da energia livre de Gibbs ( $\Delta G$ ), que abrange a contribuição energética das interações intermoleculares de uma natureza específica, relacionada com a distância de ligação e a constante de inibição ( $K_i$ )<sup>20-26</sup>.
- Processo de seleção: a avaliação é conduzida por uma pontuação capaz de classificar e separar os compostos ativos dos inativos, estabelecendo uma correlação dos resultados com dados experimentais<sup>27-28</sup>.

As ferramentas disponíveis de docagem molecular possuem diferentes metodologias para condução do estudo<sup>20,27-29</sup>. Atualmente os programas mais utilizados são: FlexX, DOCK, GOLD, GLIDE, AutoDock, FLAP *docking program*<sup>27</sup>.

#### 1.4.2 PROTOCOLOS DE *DOCKING MOLECULAR*

Ao iniciar um estudo de *docking molecular* as seguintes etapas devem ser definidas:

- Preparação do ligante e do receptor: as estruturas do ligante (composto em estudo) e do receptor (geralmente uma proteína) são preparadas usando ferramentas computacionais. Esta etapa envolve adicionar átomos de hidrogênio, atribuir cargas parciais e otimizar a geometria 3D para garantir que as moléculas estejam em um formato adequado para o encaixe<sup>25,29-31</sup>.
- Definição do sítio ligação (*grid*): local onde se espera que o ligante se ligue. Normalmente delimitado por uma cavidade ou bolsa na superfície da proteína que está envolvida no reconhecimento molecular e nas interações<sup>22,27,29-31</sup>.
- *Ensemble docking*: obtém um pareamento entre as estruturas cristalográficas de interesse (monastrol 1X88 e ispinesibe 4AP0), assim o programa de *docking* pode abordar a questão da flexibilidade da proteína, adicionando mais de uma estrutura de proteína em uma única execução do algoritmo genético. A triagem virtual fica mais rica, uma vez que duas classes de ligantes foram desenhadas baseadas em afinidade estrutural ditada por cada complexo<sup>22,27,29-31</sup>.

- Amostragem de conformações de ligantes: o ligante é submetido à amostragem conformacional, que envolve a geração de diferentes arranjos 3D ou confôrmeros. Esse processo explora como o ligante pode girar e flexionar em torno de suas ligações, criando um conjunto de diversas conformações de ligantes.<sup>24,25,29-31</sup>. Este tema será aprofundado no item seguinte.

### 1.4.3 ALGORITMOS DE BUSCA

Um algoritmo de busca é um conjunto de instruções/procedimentos bem definidos que são utilizados para encontrar informações ou solucionar problemas em um determinado conjunto de dados<sup>33,35-37</sup>. Cada tipo de algoritmo explora de maneira característica o espaço de busca, que é o conjunto de todas as configurações ou estados possíveis, até que localizem o alvo desejado ou uma solução para um problema. O objetivo de um algoritmo de busca é localizar um determinado item, valor ou padrão dentro da estrutura de dados, ou determinar se esse item está presente na estrutura<sup>32,34-37</sup>. Dependendo do contexto, um algoritmo de busca pode procurar por um único ou vários valores correspondentes a um critério específico. Existem diferentes tipos de algoritmos de busca, e a escolha do algoritmo apropriado depende da estrutura de dados, da natureza do problema a ser resolvido e das condições atreladas ao experimento<sup>32-33</sup>. A Tabela 1 resume a relação entre estes pontos<sup>28</sup>.

**Tabela 1** - Algoritmos de busca empregados nos programas de *docking molecular*.

<b>Algoritmos de Busca</b>	<b>Estratégia atribuída</b>	<b>Software de escolha</b>
Randômicos (estocásticos)	Algoritmo Genético	AutoDock GOLD DARWIN
	Monte Carlo	MOE-Dock ICM MC DOCK DOCK VISION AFFINITY QXP GLIDE

Busca sistemática	Incremental	DOCK FlexX Glide Surflex-Dock Hammerhead HOOK
	Base de dados de confôrmeros	Flexibase/FLOG
	Não-estocástico	FRED
Simulação	Dinâmica molecular	DynaDock
	Minimização de energia	DOCK

Fonte: Adaptado de Rodrigues, R. P e colaboradores, 2012<sup>27</sup>.

#### 1.4.4 FUNÇÃO DE ESCORE

A função de escore é fundamentada por:

- Campos de forças clássicos: energia do sistema calculada pela energia intramolecular e energia intermolecular<sup>26-27,36</sup>.
- Funções empíricas: soma de energias empíricas que variam de acordo com a natureza da ligação existentes entre os resíduos de aminoácidos e o sítio receptor, ponderada pelo observado experimentalmente<sup>26,29,36</sup>.
- Funções baseadas em conhecimento prévio: interações favoráveis subsidiada por frequência de interações interatômicas convertidas em componente energético<sup>22-24</sup>.
- Consenso: combinações de diferentes funções de escore a fim de determinar uma pontuação consensual para obtenção do melhor confôrmero<sup>35</sup>.

#### 1.4.5 PROGRAMA GOLD

O sistema computadorizado GOLD (*Genetic Optimization for Ligand Docking*) é amplamente utilizado em estudos de *docking molecular*, pois pode prever a ligação de compostos, dentro do sítio ativo de proteínas alvo, simulando suas interações. As suas principais características são<sup>30,37</sup>:

- Algoritmo Genético: para encontrar poses de ligação favoráveis através da exploração do espaço conformacional dos ligantes<sup>30,37</sup>.
- Flexibilidade: permite acoplamento flexível, ajustando as conformações do ligante e receptor para encontrar interações realistas e favoráveis<sup>30,37</sup>.

- Funções de escore: para avaliar interações entre ligante e proteína e classificar poses relevantes do ponto de vista biológico<sup>30,37</sup>.
- Preparação da estrutura: possui ferramentas para preparar as estruturas moleculares a fim de devolver uma representação adequada<sup>30,37</sup>.
- Opções de parâmetros personalizáveis: permite ajuste de parâmetros para obter resultados mais precisos<sup>30,37</sup>.
- Validação Experimental: Previsões do GOLD podem ser validadas experimentalmente em ensaios e estudos biológicos<sup>30,37</sup>.

#### 1.4.6 O ALGORITMO GENÉTICO DO GOLD

São algoritmos de otimização inspirados no processo de seleção natural proposto por Charles Darwin, na qual se entende que os organismos mudam ao longo do tempo e que o meio promove uma pressão seletiva selecionando os organismos mais adaptados (seleção natural), os quais apresentam maior chance de gerar bons descendentes. De forma análoga, esta lógica é usada no *docking molecular* para explorar eficientemente o vasto espaço conformacional dos ligantes e encontrar as poses de ligação mais favoráveis dentro do sítio ativo do receptor<sup>25-26,34</sup>. Os algoritmos genéticos aplicam esse conceito da seguinte forma:

- População Inicial: inicialmente é criada uma população inicial de conformações individuais do ligante. Elas representam diferentes orientações e ângulos de torção possíveis do ligante dentro do sítio de ligação<sup>25,27,34-38</sup>.
- Função de Escore: o ChemPLP ou outras funções de escore apropriadas, avalia a aptidão de cada conformação do ligante na população inicial. A função de escore calcula a energia de interação entre o ligante e o receptor, levando em consideração fatores como natureza das ligações químicas<sup>25,27,34-38</sup>.
- Seleção: as conformações obtidas passam por ranqueamento e as melhores pontuações (confôrmeros mais aptos) da população inicial são escolhidos como pais para a geração seguinte<sup>25,27,34-38</sup>.
- Cruzamento: funciona como um operador genético que combina as informações genéticas de duas conformações de pais para criar conformações de filhos. No

contexto do *docking molecular*, a etapa de cruzamento mistura os ângulos de torção das conformações de pais selecionados para produzir novas poses de ligantes “filhos”<sup>25,27,34-38</sup>.

- **Mutação:** também funciona como um operador genético, mas introduzindo mudanças aleatórias em conformações individuais. A mutação pode alterar ligeiramente os ângulos de torção de uma conformação de ligante, permitindo uma exploração adicional do espaço conformacional<sup>25,27,34-38</sup>.
- **Próxima Geração:** os confôrmeros filhos gerados formarão a próxima geração de conformações do ligante<sup>25,27,34-38</sup>.
- **Elitismo:** as conformações mais promissoras durante a evolução não são perdidas, mas mantidas para a próxima geração sem passar pelos operadores genéticos<sup>25,27,34-38</sup>.
- **Terminação:** o processo é repetido ao longo de várias gerações até que um critério de terminação seja alcançado. Este critério pode ser uma quantidade pré-definida de gerações<sup>25,27,34-38</sup>.
- **Seleção Final de Poses:** os melhores confôrmeros considerados pelo algoritmo, são ranqueados para prosseguirem para análise e interpretação<sup>25,27,34-38</sup>.

#### 1.4.7 FUNÇÕES DE ESCORE DO GOLD (*SCORING FUNCTION*)

São utilizadas para avaliar as poses de ligação durante o processo de docagem. São capazes de calcular a afinidade do ligante com o alvo e ranquear as poses mais relevantes. Através do algoritmo genético, busca identificar as melhores interações no sítio de ligação<sup>29,39</sup>.

- **GoldScore:** combina dados de energia intermolecular com geométricos para avaliar a complementaridade entre o ligante e a proteína<sup>29,35,37,39</sup>.
- **GoldScore Fitness:** combina o GoldScore com informações adicionais sobre a estabilidade da pose, incluindo considerações energéticas<sup>29,35,37,39</sup>.
- **ChemScore:** baseada em termos da natureza da ligação. A exemplo: ligações de hidrogênio, interações iônicas, interações de Van der Waals e efeitos de solvatação<sup>29,35,37,39</sup>.
- **Astex Statistical Potential (ASP):** Uma função de escore baseada na abordagem de frequência de interação entre ligante e resíduos de aminoácidos a partir da estrutura

de cristalografia do PDB (Protein Data Base) a fim de gerar potenciais estatísticos<sup>29,35,37,39</sup>.

- ChemPLP: se concentra em termos de encaixe e complementaridade de forma entre o ligante e o sítio de ligação<sup>29,35,37,39</sup>.

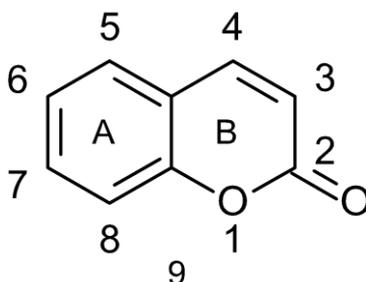
A escolha da função de escore adequada depende das características específicas do objeto de estudo. O programa permite que os usuários personalizem os parâmetros e ajustem a função de escore para melhorar a precisão das previsões e obter resultados mais relevantes para suas aplicações específicas de descoberta de medicamentos e estudos de interações moleculares.

A função de escore ChemPLP calcula a energia potencial associada ao complexo ligante-receptor, considerando várias interações não covalentes, como forças de Van der Waals (também empilhamento  $\pi$ ), interações eletrostáticas (também ligações de hidrogênio), além de outras interações. O escore ChemPLP reflete a afinidade de ligação entre o ligante e o receptor, indicando o quão bem eles provavelmente formarão um complexo estável e energeticamente favorável, durante o processo de evolução empregado no Algoritmo Genético<sup>27,37</sup>.

## 1.5 CUMARINAS

Cumarinas são metabólitos secundários amplamente difundidos na natureza, sendo encontrados em vegetais, fungos, bactérias, em algumas espécies animais<sup>40-44</sup>. Passíveis de obtenção sintética, as cumarinas são uma grande classe de compostos com um esqueleto comum formado pela fusão de um anel de benzeno e um anel  $\alpha$ -pirona, cuja denominação da sua estrutura geral é 1,2-benzopirona (**9**) (Figura 3)<sup>40</sup>.

Estudos demonstram que a presença da cumarina está relacionada a diversas propriedades farmacológicas como: anticoagulante, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana.



**Figura 3** - Fórmula estrutural da cumarina.

As cumarinas são um dos principais heterociclos pesquisados e sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM). A atividade antitumoral das cumarinas já é reconhecida na literatura, com várias publicações que suportam essa propriedade.<sup>26-29</sup>. Nosso laboratório sintetizou cumarinas com atividades antioxidante<sup>39-40,42</sup> antichagásica<sup>44</sup> e antitumoral<sup>43,45</sup>. Em produções recentes, o desenvolvimento de novos ligantes para cinesina Eg5 tem sido explorado, além de propostas no contexto da viabilidade sintética e ensaios para avaliação de citotoxicidade em modelos *in vitro*<sup>46</sup>.

## 2 OBJETIVOS

Esta monografia teve como objetivo utilizar ferramentas *in silico* para o planejamento e a triagem virtual de duas famílias denominadas *ispinesibe-like* e *monastrol-like*. Mantendo um núcleo de cumarina e com auxílio de *Docking Molecular*, almeja-se a otimização das famílias levando a obtenção de uma geração secundária e melhorada para cada família de potenciais inibidores da enzima cinesina Eg5 humana.

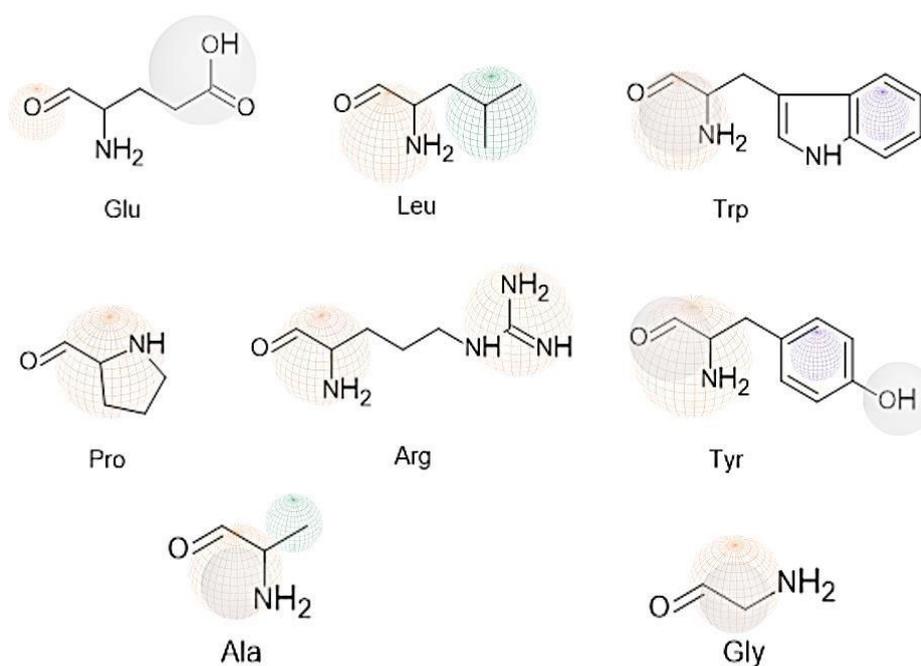
### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 ELUCIDAÇÃO DO RACIONAL DE TRIAGEM

As interações disponibilizadas pelos complexos monastrol (**7**) e Eg5 (PDB ID: 1X88) e ispinesibe (**8**) e Eg5 (PDB ID: 4AP0) foram visualizadas e tabeladas (Tabelas 3 e 4 em anexo) com auxílio do programa DSV (*Discovery Studio Visualizer*) com a finalidade de obter e entender os resíduos mais frequentes que recebem o sítio alostérico da Eg5. Estes resíduos foram computados conforme disposto na Tabela 2, onde para cada complexo cristalográfico foram atribuídas frequências de resíduos aminoácidos. A partir disso, foi possível estabelecer uma relação, que norteou os primeiros passos para elucidação da complementariedade necessária para adequação dos ligantes frente à natureza das ligações químicas possíveis para os resíduos identificados. Na Figura 4, as esferas coloridas indicam a provável afinidade pelos seus grupamentos químicos. Essas interações foram levadas em consideração no processo de projeção de compostos que possuam grupos funcionais que sejam complementares aos resíduos de aminoácidos.

**Tabela 2** - Relação entre os resíduos frequentes computados para o monastrol e Eg5 (PDB ID: 1X88) e ispinesibe e Eg5 (PDB ID: 4AP0)

Resíduo Estrutura	Glu 116	Glu 118	Leu 214	Trp 127	Pro 137	Arg 119	Tyr 211	Leu 160	Arg 221	Ala 218	Ala 133	Gly 117
<b>4AP0</b>	3	0	3	3	2	2	2	1	1	1	0	0
<b>1X88</b>	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1



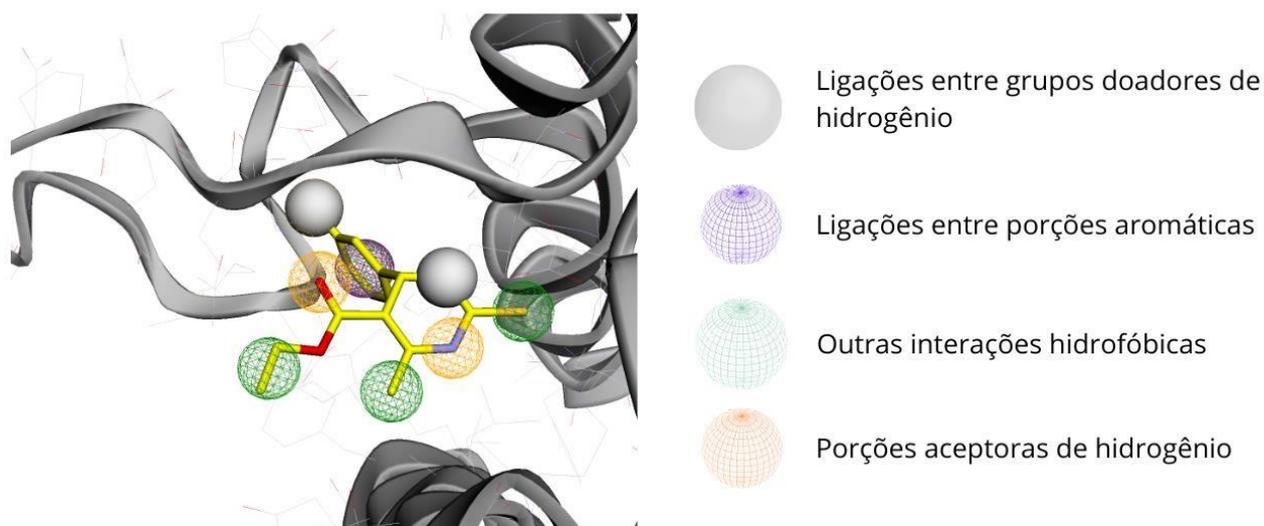
**Figura 4** - Resíduos de aminoácidos mais frequentes mapeados nas estruturas monastrol e Eg5 (PDB ID: 1X88) e ispinesibe e Eg5 (PDB ID: 4AP0). Laranja: porções acceptoras de hidrogênio. Verde: interações hidrofóbicas. Roxo: empilhamento  $\pi$ . Cinza: porções doadoras de hidrogênio.

A partir dessas informações, foi possível propor duas séries de ligantes para Eg5: *monastrol-like* (Figura 6) e *ispinesibe-like* (Figura 8), como será abordado a seguir.

### 3.1.1 CONSTRUÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO DE MODELOS *MONASTROL-LIKE*

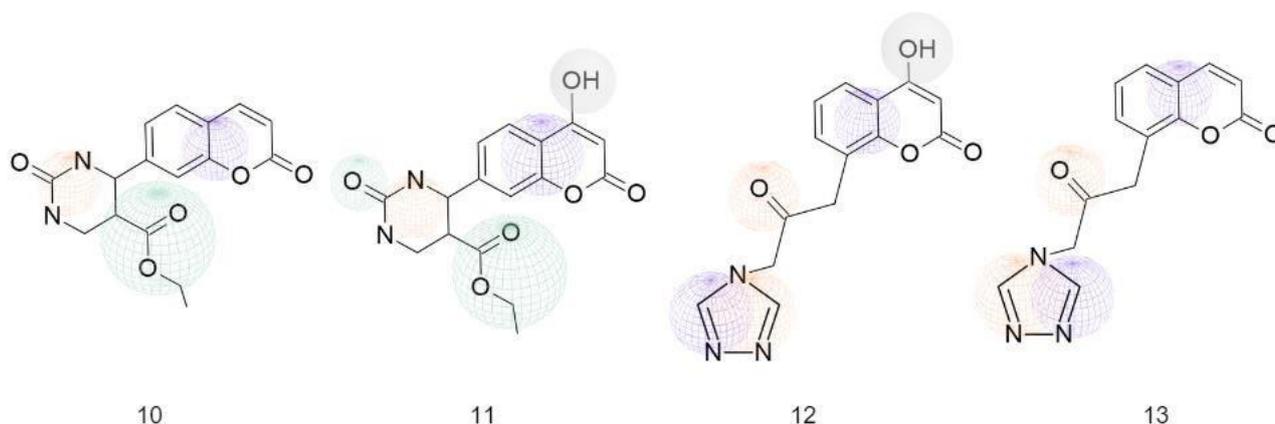
A primeira geração de compostos *monastrol-like* foi construída analisando os resíduos obtidos pelo complexo cristalográfico do monastrol (7) com a Eg5, que gerou as informações acerca de resíduos mais relevantes (Tabela 3 em anexo) Ala218, Ala133, Pro137, Arg119, Leu214, Glu116, Glu118 e Gly117. Possíveis porções farmacofóricas de interação no sítio alostérico da Eg5, estão representadas na Figura 5. A partir do conhecimento destas propriedades para o grupo *monastrol-like*, foram favorecidas interações de natureza hidrofílica, principalmente envolvendo grupos que podem formar ligações de hidrogênio, além disso, foram mantidos grupos funcionais que sejam favoráveis à manutenção de alguma interação hidrofóbica e substituintes com características acceptora e doadora de hidrogênio. Traçando um paralelo entre as Figuras 4 e Figura 5, a mesma analogia gráfica foi empregada, representando a relação estrutural entre o monastrol (7) e a primeira geração de ligantes.

## Mapa de interações monastrol e Eg5 (PDB ID: 1x88)



**Figura 5** – Farmacóforo gerado no servidor Pharmit<sup>48</sup> para o complexo monastrol e Eg5 (PDB ID: 1X88).

A partir destes dados, foi possível estabelecer um padrão de ligação, trazendo à luz passos iniciais em direção ao entendimento de substituições necessárias na cumarina. Observam-se substituições na 1,2-benzopirona (**9**) (Figura 3) na posição C4 com OH, que em ambiente aquoso (fisiológico) pode interagir com as porçõesceptoras de hidrogênio. Em C8 o heterociclo do tipo 1,2,4-triazol que pode ser interessante para atividade biológica, uma vez que pode interagir atuando como doador ou receptor de ligações de hidrogênio, bem como em interações de empilhamento  $\pi$ . Na posição C7, foi testado bioisosterismo com o monastrol (**7**), com substituição do enxofre por oxigênio. Os compostos propostos (**10** – **13**) constam na figura abaixo.

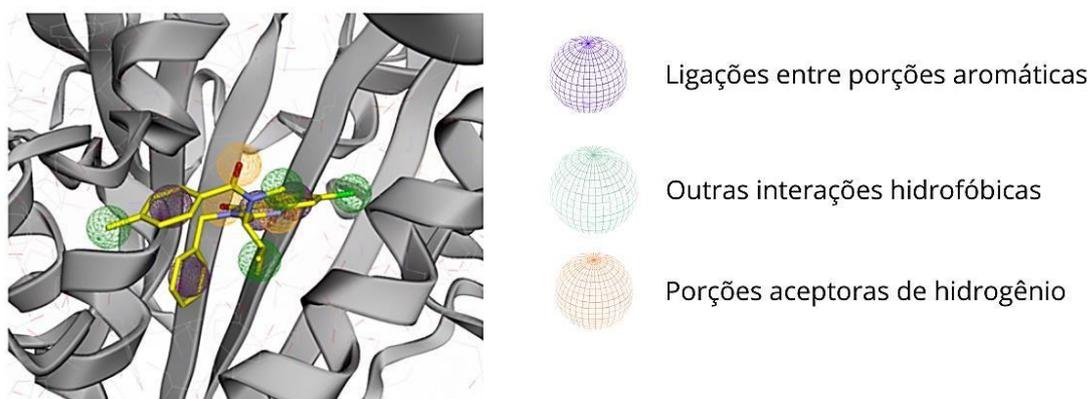


**Figura 6** - Primeira geração de modelos *monastrol-like*. Laranja: porçõesceptoras de hidrogênio. Verde: interações hidrofóbicas. Roxo: empilhamento  $\pi$ . Cinza: porções doadoras de hidrogênio.

### 3.1.2 CONSTRUÇÃO DA PRIMEIRA GERAÇÃO DE MODELOS *ISPINESIBE-LIKE*

Assim como foi feita a construção da família anterior, o fluxo de produção da primeira geração de ligantes da família *ispinesibe-like*, teve como primeira etapa a compreensão da estrutura-alvo que foi realizada tabelando as interações entre o *ispinesibe* (**8**) e a Eg5 (Tabela 4 em anexo). Nesta tabela, estão descritos os tipos de interações existentes com resíduos mais relevantes no complexo *ispinesibe* e Eg5 (PDB ID: 4AP0), visualizados e listados com auxílio do programa DSV. As interações mais frequentes são de natureza hidrofóbica e os resíduos são Glu116, Leu 214, Trp127, Pro137, Arg119 e Tyr211. A fim de incorporar informações estruturais para elaboração da primeira geração de compostos *ispinesibe-like*, foi gerado no servidor web Pharmit<sup>48</sup> possíveis porções farmacofóricas de interação no sítio alostérico da Eg5, (Figura 7). A partir do conhecimento destas propriedades, foram propostos os primeiros ligantes, cuja premissa é explorar a teoria de que numerosas substituições que favoreçam interações hidrofóbicas, principalmente envolvendo grupamentos aromáticos, podem ser suficientes para ancorar o ligante no alvo.

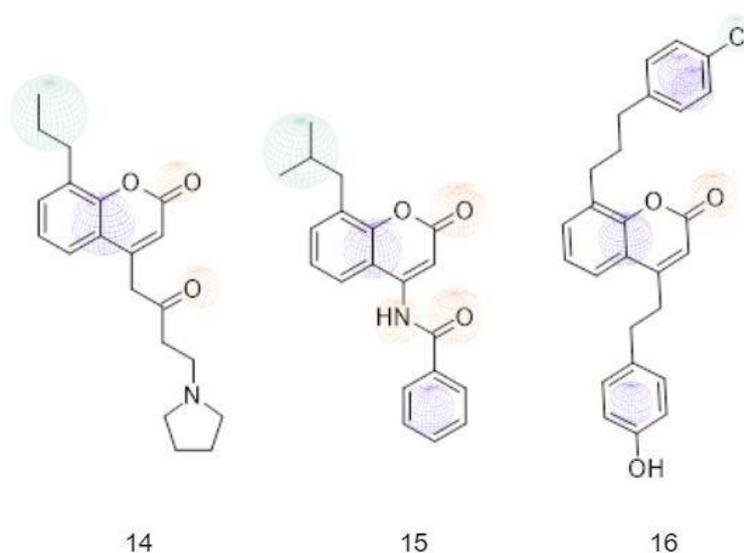
#### Mapa de interações *ispinesibe* e Eg5 (PDB ID: 4AP0)



**Figura 7** - Farmacóforo gerado no servidor Pharmit<sup>48</sup> *ispinesibe* e Eg5 (PDB ID: 4AP0).

Na Figura 8, algumas substituições possuem grupamentos com característica aceptora de hidrogênio em atendimento a complementariedade baseada no mapa de interações da Figura 7. A proposta pretende confirmar se a presença de um *linker* pode auxiliar no processo de ancoragem dos ligante aos bolsões lipofílicos, trazendo seletividade porque pode aumentar a proximidade dos substituintes com os resíduos presentes no sítio alostérico do alvo. Este *linker*, foi integrado à cumarina (**9**) (Figura 3) nas posições C4 e C8 (Figura 8), possibilitando o preenchimento da molécula nos três

bolsões lipofílicos que compõem o sítio alostérico da Eg5. A cumarina (9) é estruturalmente similar a quinazolinona presente no ispinesibe (8) e por isso, foi explorado substituintes com alguma semelhança estrutural em posições próximas a este núcleo. Com o objetivo de compreender a importância de cada contribuição, foram selecionados grupamentos semelhantes como o clorobenzeno e as alquilas alifáticas em C8 e a amida em C4. A pirrolidina em C4, pode contribuir para a estabilização conformacional da molécula, neste cenário, interagindo mais intensamente de forma hidrofóbica, uma vez que o nitrogênio faz apenas ligações  $\sigma$  (ligações simples) e está conectado diretamente ao *linker*. A primeira linhagem de ligantes desta classe está na Figura 8 abaixo.

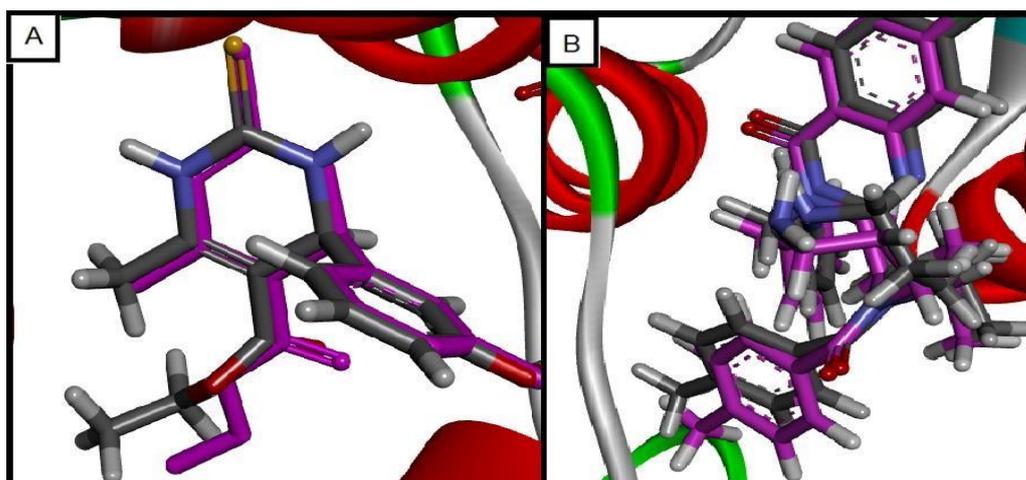


**Figura 8** - Primeira geração de modelos *ispinesibe-like*. Laranja: porções aceptoras de hidrogênio. Verde: interações hidrofóbicas. Roxo: empilhamento  $\pi$ .

## 3.2 TRIAGEM VIRTUAL POR *DOCKING MOLECULAR*

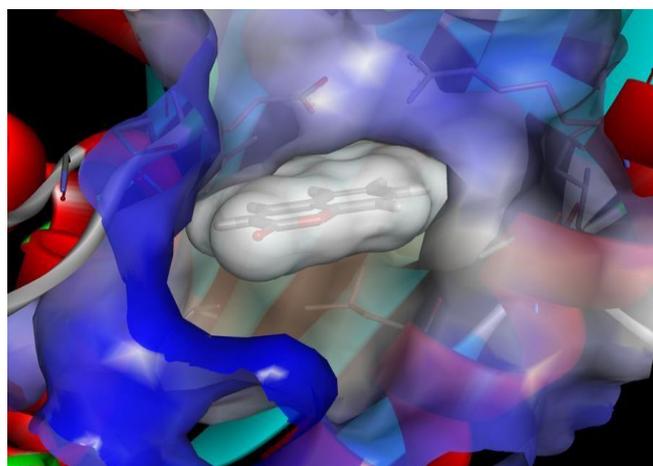
### 3.2.1 VALIDAÇÃO POR *REDOCKING*

O *redocking* dos ligantes cristalográficos (monastrol 1X88 e ispinesibe 4AP0) gerou resultados satisfatórios. Com os dados das Tabelas 5 e 6 (em anexo), foi possível observar que as posições ordenadas por melhor pontuação de escore mantiveram um RMSD calculado inferior a 2 Å<sup>39</sup>. A Figura 9 ilustra o estado validado do protocolo utilizado no *Ensemble Docking*, utilizando as estruturas monastrol e Eg5 (PDB ID: 1X88) e ispinesibe e Eg5 (PDB ID: 4AP0).



**Figura 9** - Relação das poses obtidas por *redocking* em relação ao ligante cristalográfico (magenta). A) *Redocking* do monastrol (**7**). B) *Redocking* do ispinesibe (**8**).

A docagem molecular do anel cumarina foi um grande direcionador para o desenvolvimento dos ligantes. Conforme exposto, o sítio alostérico da Eg5 possui três bolsões lipofílicos. com o objetivo de otimizar o ancoramento dos ligantes aos bolsões, foi levado em consideração que, além do núcleo ser substituído de forma a favorecer as interações em ambos os grupos, foi cogitada a presença de um *linker* constituído de cadeia alifática para alcançar as ramificações nos bolsões. o primeiro ensaio foi explorado para encontrar uma pose onde o anel cumarina penetrasse um desses bolsões, uma vez que ele possui as características que propiciam as interações mapeadas. A Figura 10 demonstra que é factível que o anel cumarina alcance um destes bolsões, dando sequência ao segundo passo de otimização dos ligantes, onde tal atribuição será contemplada na segunda geração de ligantes.



**Figura 10** – 1,2-benzopirone (**9**) em pose obtida por *Docking Molecular*, com visualização em superfície hidrofóbica, demonstrando que é possível alcançar um dos bolsões lipofílicos.

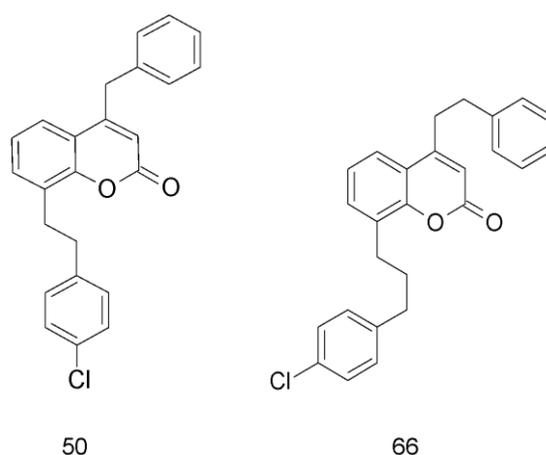
### 3.2.2 OTIMIZAÇÃO E CRIAÇÃO DA SEGUNDA GERAÇÃO DE COMPOSTOS

Ainda em questionamento a respeito da melhor abordagem para desenvolvimento dos ligantes, foram propostas para *ispinesibe-like* três frentes, com cadeias alquílicas. Foram construídas séries *ispinesibe-like*: compostos 17 – 72 (Figura 16) que exploram a substituição do anel cumarina nas posições C4 e C8 (Figura 3) com diversos substituintes.

Foram construídas séries *monastrol-like*: compostos 73 - 82, (Figura 17) que exploram a possibilidade de aumento das ligações hidrofílicas, com intuito de aumentar a afinidade com aminoácidos presentes em apreciação a essa característica. Possuem substituição da cumarina (**9**) nas posições C4, C7 e C8.

### 3.2.3 DOCKING MOLECULAR DAS PROPOSTAS OTIMIZADAS

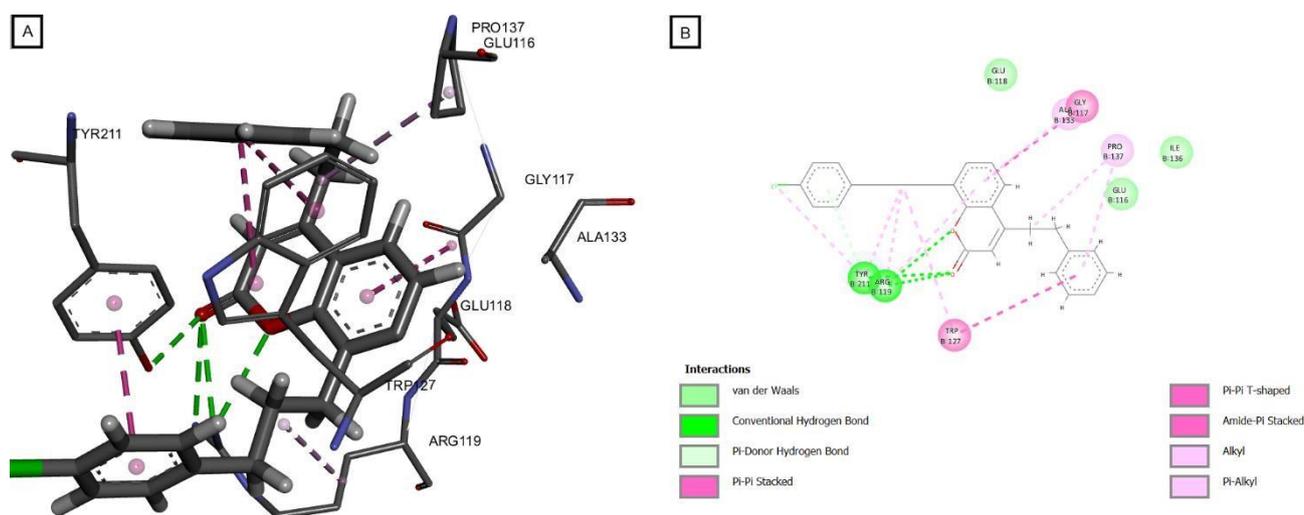
A otimização das estruturas e a adição de critérios de comparação gerou um total de 65 compostos posteriormente docados e inspecionados (Figuras 16 e 17 em anexo). Os compostos 50 e 66 (Figura 11) ficaram no top 2 do ranqueamento obtido, disposto na Tabela 8 (anexo). Estes foram selecionados para análises adicionais, pois não apenas obtiveram os melhores escores, mas exploram duas abordagens de ancoramento ao sítio alostérico.



**Figura 11** - Estruturas dos compostos 50 e 66.

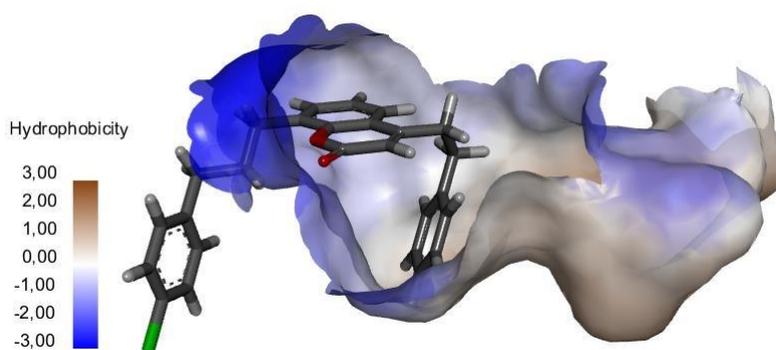
O composto 66 (Figura 12A e B) obteve primeiro lugar no ranqueamento obtido pela docagem final. Entretanto, o alongamento das extremidades possibilitou a interação intramolecular entre as faces aromáticas dos substituintes, pareando as porções também de forma intermolecular entre resíduos aminoácidos próximos, formando uma rede e

melhorando a sua estabilidade enquanto ancorado ao sítio alostérico. A Figura 12A, apresenta a interação intramolecular citada e a Figura 12B apresenta também os resíduos de aminoácidos próximos. Conforme exposto, o resíduo Pro137 é um dos protagonistas dessa ancoragem, pois auxilia na estabilidade da conformação que é reafirmada pela interação destes resíduos periféricos às ligações do tipo  $\pi$  *stacking* intramolecular.



**Figura 12** - A) *Docking Molecular* do composto 66. B) *Docking Molecular* do composto 66.

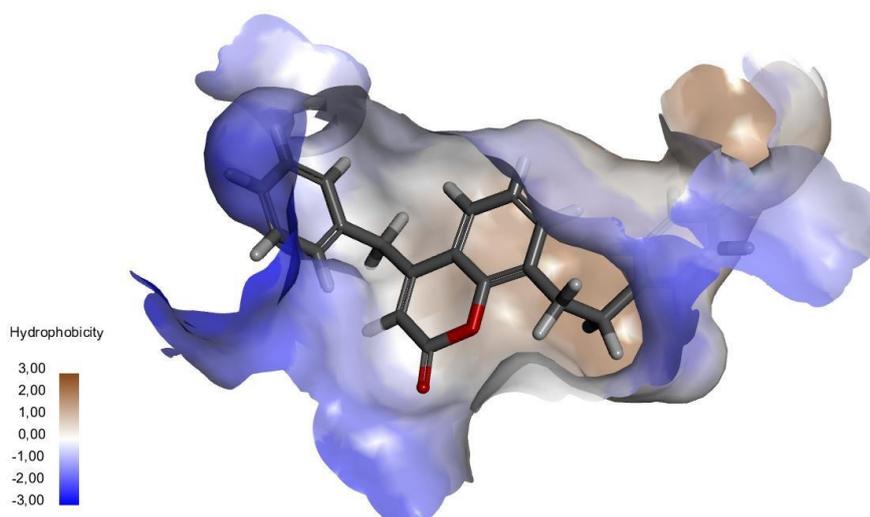
A Figura 13 ilustra em superfície hidrofóbica que não é visualizado o aterramento completo aos três bolsões.



**Figura 13** - Composto 66 em superfície hidrofóbica.

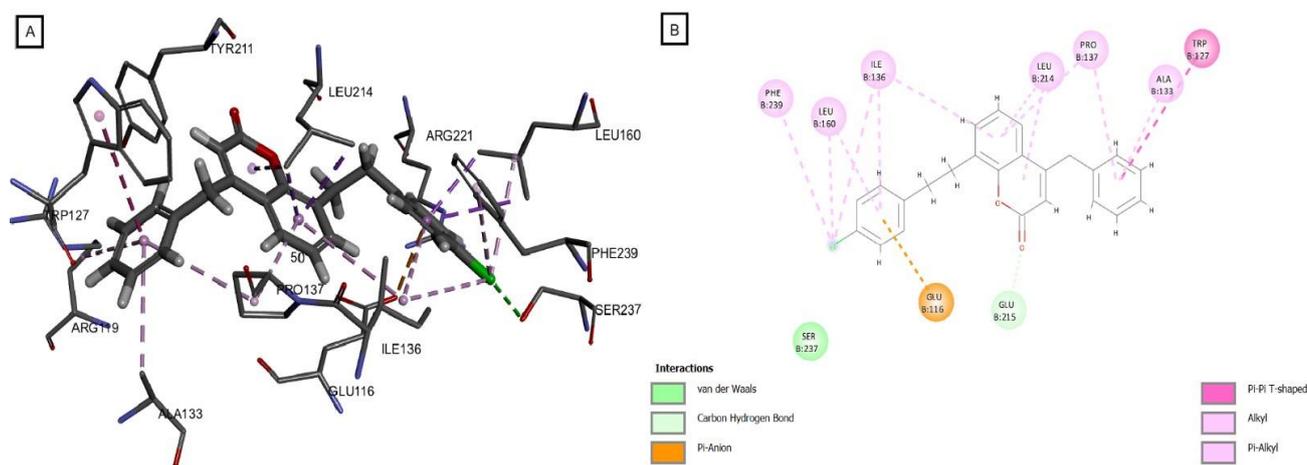
Já o composto 50, segundo lugar do ranqueamento, foi o primeiro colocado entre os outros confôrmeros que seguiram comportamento semelhante a ele. Neste cenário, o conector de tamanho intermediário estrategicamente formado por carbonos hibridizados em  $sp^3$ , cujo ângulo que corresponde a  $109^\circ$  e que dá forma a sua geometria tetraédrica, realiza a orientação esperada para as ligações subsequentes em escadas que

condicionam os substituintes a adentrar aos bolsões lipofílicos. Conseguindo, portanto, viabilizar o racional teórico, com escore satisfatório de acordo com a Tabela 8, que relaciona os melhores escores obtidos pela presente triagem virtual, com os escores dos ligantes cristalográficos visualizados pelo DSV. Na Figura 14, é possível visualizar a ocorrência do aterramento desejado durante o planejamento.



**Figura 14** - Composto 50 em superfície hidrofóbica.

A Figura 15 demonstra a ocorrência das interações, sendo assim, ambos compostos foram considerados aptos e compatíveis com o seguimento de triagem virtual para determinação da sua qualidade de hits em potencial.



**Figura 15** - A) *Docking Molecular* do composto 50. B) *Docking Molecular* do composto 50. Ilustrações em duas dimensões das ligações visualizadas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 PRIMEIRA ETAPA: ELUCIDAÇÃO DO RACIONAL DE TRIAGEM

No banco de dados PDB, extrair dois arquivos PDB *format* para os complexos cristalográficos do ispinesibe (4AP0) e monastrol (1X88). Estes arquivos devem ser abertos no programa DSV e as interações disponibilizadas por ambos os complexos. Cada arquivo quando aberto no DSV vai gerar uma tabela, copiar para uma planilha e computada a frequência de aparecimento de resíduos.

Aos resíduos mais frequentes, estabelecer um padrão de interação que poderia ocorrer levando em consideração as afinidades químicas em cada estrutura de aminoácidos, característica ácido-base/polar-apolar, ligada por cadeia alquílica de comprimento variável.

- Construção da primeira geração de modelos *monastrol-like*: em aplicação ChemSketch, desenhar a partir da estrutura do monastrol (**7**) substituir o núcleo cumarina (**9**) com grupamentos químicos que favoreçam mais as interações hidrofílicas, direcionada pela frequência de resíduos aminoácidos que a etapa anterior indicar.
- Construção da primeira geração de modelos *ispinesibe-like*: em aplicação ChemSketch, desenhar a partir da estrutura do ispinesibe (**8**) substituir o núcleo cumarina (**9**) com grupamentos químicos que favoreçam mais as interações hidrofóbicas, direcionada pela frequência de resíduos aminoácidos que a etapa anterior indicar.

### 4.2 TRIAGEM VIRTUAL POR *DOCKING MOLECULAR*

#### 4.2.1 VALIDAÇÃO DO PROTOCOLO

##### 4.2.1.1 *REDOCKING*

- Preparar as estruturas no programa Chimera<sup>48</sup> com os arquivos que o PDB fornecer em extensão .pdb. No DVS, selecionar apenas a cadeia B em ambas as estruturas.
- Preparar os ligantes com as estruturas em minimização prévia e agregar informações experimentais na simplificação molecular (PM6 semiempírico) e estado de protonação em pH 7,4 no servidor PDB2PQR.<sup>49</sup>

- Utilizar o escore ChemPLP, para sobreposição das estruturas no Gold 5.0.
- Caracterizar o tamanho de raio do *grid* em 10 Å com as seguintes coordenadas de centroide: X:41.492 Y:-1.575 Z:10.806 (4AP0) e X:17,465422 Y:24,962267 Z:48,745117 (1X88).
- Modo *ensemble docking*, onde Ensemble.ID 1 = complexo cristalográfico relativo ao PDB ID: 4AP0 e Ensemble.ID 2 = complexo cristalográfico relativo ao PDB ID:1X88.

#### 4.2.1.2 INSPEÇÃO VISUAL

- Critérios de inspeção: considerar como uma boa predição os valores de RMSD menores que 2 Å<sup>39</sup>;
- Verificar as poses obtidas pelo ranqueamento do escore;
- Analisar as interações entre resíduos considerados chave.

#### 4.2.2 DOCKING MOLECULAR DO NÚCLEO CUMARINA

Preparar o alvo (4AP0 e 1X88), o sítio de ligação e o ligante 1,2-benzopirona pelo método validado no item anterior.

#### 4.2.3 SEGUNDA ETAPA: OTIMIZAÇÃO DOS MODELOS

- Otimização das estruturas a partir dos resultados da primeira docagem.
- Novo *docking* para os compostos da segunda geração e posterior discussão dos resultados para o melhor confômero.

## 5 CONCLUSÕES

Utilizando a abordagem de planejamento de fármaco com base na estrutura do alvo (SBDD), foi possível a identificação de dois compostos potencialmente promissores. Com diferentes possibilidades de encaixe, estes foram analisados a quanto às suas afinidades de ligação com a enzima humana cinesina Eg5 em *Ensemble Docking* (PDB ID: 1X88 e 4AP0). O resultado obtido, possibilitou a identificação dos compostos 50 e 66 que apresentaram valores próximos às afinidades dos ligantes cristalográficos referidos, sugerindo a possibilidade de um grau de inibição possivelmente semelhante.

As etapas de triagem realizadas, indicam que os ligantes podem servir como ponto de partida para prosseguimento em triagem molecular. Objetivando tornar os resultados obtidos mais robustos, é importante prosseguir com a avaliação englobando outras propriedades importantes como as físico-químicas, farmacocinéticas, a predição de toxicidade, posterior síntese e testagem *in vitro*.

## 6 REFERÊNCIAS

1. Almeida, VL. de; Leitão, A.; Reina, del C. B.; Donnici, A. M.; Lopes, A. M. C. M.; Montanari, A.; Donnici, C. L.; Lopes, T. P. M. *Quim. Nova* **2005**, 28, 118-129. doi: 10.1590/S0100-40422005000100021
2. Weinberg, R. A. *Scientific American* **1996**, 275(3), 62-70. doi:10.2307/24993349
3. OPAS/OMS – Organização Pan-Americana da Saúde. Acesso em 6 de julho de 2023. Disponível em: <https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>.
4. Valadares, A. D.; Souza-Kaneshima, A. M.; Kaneshima, E. N.; Fernandes, I. L.; Jordão, I. P.; Souza, P. da C.; Maftoum, T. R. C. *Revista Brasileira de Cancerologia* **2021**, 67(3), 56-65. doi:10.32635/2176-9745.rbc.2021v67n3.1287.
5. Ostrom, Q. T.; Bauchet, L.; Davis, F. G.; Deltour, I.; Fisher, J. L.; Langer, C. E.; Pekmezci, M.; Schwartzbaum, J. A.; Turner, M. C.; Walsh, K. M.; Wrensch, M. R.; Barnholtz-Sloan, J. S. *Neuro Oncol* **2014**, 16(7), 896–913. doi:10.1093/neuonc/nou087.
6. Wick, W.; Hartmann, C.; Engel, C.; Stoffels, M.; Felsberg, J.; Stockhammer, F.; Sabel, M. C.; Koepfen, S.; Ketter, R.; Meyermann, R.; Rapp, M.; Meisner, C.; Kortmann, R. D.; Pietsch, T.; Wiestler, O. D.; Ernemann, U.; Bamberg, M.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Weller, M. *J Clin Oncol.* **2009**, 27(35):5874–5880. doi:10.1038/nrdp.2015.17.
7. Ohgaki, H.; Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *American Journal of Pathology* **2007**, 170(5), 1445–1453. doi:10.2353/ajpath.2007.070011
8. Louis, D.N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W.K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O.D.; Kleihues, P.; Ellison, D.W. **2016**, 131(6), 803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
9. BRASIL. Saúde m da. Diretrizes diagnósticas e terapêuticas de tumor cerebral no adulto. Acesso em 6 de julho de 2023. Disponível em: <https://conitec.gov.br/>.
10. Yildiz, A.; Selvin, P.R.. *Trends in cell biology* **2005**, 15(2), 112-120. doi: 10.1016/j.tcb.2004.12.007
11. Hirokawa, N.; Takemura., R. *Exp. Cell Res.* **2004**, 301(1), 50-59. doi: 10.1016/j.yexcr.2004.08.010.
12. Wittmann, T.; Hyman, A.; Desai, A. *Nat. Cell. Biol.* **2001**, 3(1), 28-34. doi: 10.1038/35050669.
13. Rath, O.; Kozielski, F. *Nat Rev Cancer* **2012**, 12, 527-539. doi: 10.1038/nrc3310
14. El-Nassan, H. B. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, 62, 614-631. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.01.031
15. Sakowicz, R.; Finer, J. T.; Beraud, C.; Crompton, A.; Lewis, E.; Fritsch, A.; Lee, Y.; Mak, J.; Moody, R.; Turincio, R.; Chabala, J. C.; Gonzales, P.; Roth, S.; Weitman, S.; Wood, K. W. *Cancer Res.* **2004**, 64(9), 3276-3280. doi: 10.1158/0008-5472.can03-3839.
16. Jackson, J.R.; Patrick, D.R.; Dar, M.M.; Huang, P.S.; *Nat. Rev. Cancer* **2007**, 7(2), 107-117. doi: 10.1038/nrc2049.
17. Garcia-Saez, I.; DeBonis, S.; Lopez, R.; Trucco, F.; Rousseau, B.; Thuéry, P.; Kozielski, F. *Journal of Biological Chemistry* **2007**, 282(13), 9740-9747. doi: 10.1074/jbc.M608883200.
18. Talapatra, S. K.; Schüttelkopf, A. W.; Kozielski, F. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **2012**, 68(10), 1311-1319. doi:10.1107/S0907444912027965.
19. Turner J; Anderson R; Guo J; Beraud C; Fletterick R; Sakowicz R; *J Biol Chem.* **2001**; 276(27), 25496-25502. doi:10.1074/jbc.M100395200.

20. Leelananda, S. P.; Lindert, S. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*. **2016**, 12, 2694–2718. doi: 10.3762/bjoc.12.267.
21. Carvalho, I.; Pupo, M. T.; Borges, Á. D. L.; Bernardes, L. S. C. **2003**, 26(3), 428-438. doi: 10.1590/S0100-40422003000300023.
22. Macalino, S. J. Y.; Gosu, V.; Hong, S.; Choi, S. *Arch Pharm Res*. **2015**, 38(9), 16861701. doi:10.1007/s12272-015-0640-5.
23. Pinzi, L.; Rastelli, G.. *Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery*. I Int J Mol Sci. **2019**, 20(18). doi:10.3390/ijms20184331.
24. Meng, X. Y.; Zhang, H. X.; Mezei, M.; Cui, M. *Curr Comput Aided Drug Des*. **2011**, 7(2), 146-157. doi: 10.2174/157340911795677602.
25. Zhao, J.; Cao, Y.; Zhang, L. *Computational and Structural Biotechnology Journal* **2020**, 18, 417–426. doi: 10.1016/j.csbj.2020.02.008.
26. Salmaso, V.; Moro, S. *Front Pharmacol*. **2018**, 9, 900-923. doi:10.3389/fphar.2018.00923.
27. Rodrigues, R. P.; Mantoani, S. P.; De Almeida, J. R.; Pinsetta, F. R.; Semighini, E. P.; Da Silva, V. B.; Da Silva, C. H. P. *Revista Virtual de Quimica* **2012**, 4(6), 739-776. doi:10.5935/1984-6835.20120055.
28. Morris GM, Lim-Wilby M. *Molecular Docking*. In: Kukol A, ed. *Molecular Modeling of Proteins*. Humana Press **2008**, 365-382. doi:10.1007/978-1-59745-177-2\_19.
29. Liu, J.; Wang, R. *J Chem Inf Model*. **2015**, 55(3), 475-482. doi:10.1021/ci500731a.
30. Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M. J.; Murray, C. W.; Taylor, R. D. *Proteins* **2003**, 52(4), 609–623. doi: 10.1002/prot.10465.
31. Lohning, A. E.; Levonis, S. M.; Williams-Noonan, B.; Schweiker, S. S. *Current topics in medicinal chemistry* **2017**, 17(18), 2023–2040. doi: 10.2174/1568026617666170130110827.
32. Zabinsky, Z. B. Department of Industrial and Systems Engineering, University of Washington, USA. **2009**. doi: 10.1002/9780470400531.eorms0704.
33. Ding, F.; Yin, S.; Dokholyan, N. V. *J Chem Inf Model* **2010**, 50(9), 1623–1632. doi: 10.1021/ci100218t.
34. Magalhães, C. S. de; Barbosa, H. J. C.; Dardenne, L. E. *Genetics and Molecular Biology*, **2004**, 27(4), 605–610. doi: 10.1590/S1415-47572004000400022
35. Luciano Porto Kagami. *Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul*, **2017**.
36. Shareef, H.; Ibrahim, A. A.; Mutlag, A. H. *Applied Soft Computing Journal* **2015**, 36, 315-333. doi:10.1016/j.asoc.2015.07.028.
37. Cambridge Crystallographic Data Centre/Astex Therapeutics Ltd. *GOLD User Guide:A Component of the CSD-Discovery Suite*. Cambridge, United Kingdom, **2022**, 3, 305. Disponível em: [https://www.ccdc.cam.ac.uk/media/Documentation/0C5D99BC-7CC3-49B6-831906BEA8CA342D/GOLD\\_User\\_Guide\\_2020\\_1.pdf](https://www.ccdc.cam.ac.uk/media/Documentation/0C5D99BC-7CC3-49B6-831906BEA8CA342D/GOLD_User_Guide_2020_1.pdf). Acesso: 20/07/2023.
38. Forrest, S. *ACM Computing Surveys* **1996**, 28(1), 77-80. doi: 10.1145/234313.234350.
39. Vieth, M.; Hirst, J. D.; Kolinski, A.; Iij, C. L. B. *J Comput Chem*. **1998**, 19(14), 1612-1622. doi: 10.1002/(SICI)1096-987X(19981115)19:14<1612::AID-JCC7>3.0.CO;2-M

40. Bubols, G. B.; Vianna, D. da R.; Medina-Remon, A.; von Poser, G.; Lamuela-Raventos, R. M.; Eifler-Lima, V. L.; Garcia, S. C. Mini reviews in medicinal chemistry. **2013**, 13(3), 318–334. doi: 10.2174/138955713804999775
41. Torres, F. C.; Brucker, N.; Andrade, S. F.; Kawano, D. F.; Garcia, S. C.; Poser, G. L.; Eifler-Lima, V. L. Current topics in medicinal chemistry **2014**, 14(22), 2600–2623. doi: 10.2174/1568026614666141203144551
42. Lin, H. C.; Tsai, S. H.; Chen, C. S.; Chang, Y. C.; Lee, C. M.; Lai, Z. Y.; Lin, C. M. *Biochem Pharmacol.* **2008**, 75(6), 1416-1425. doi:10.1016/j.bcp.2007.11.023
43. Vianna, D. R.; Bubols, G.; Meirelles, G.; Silva, B. V.; da Rocha, A.; Lanznaster, M.; Monserrat, J. M.; Garcia, S. C.; von Poser, G.; Eifler-Lima, V. L. *Int J Mol Sci.* **2012**, 13(6), 7260-7270. doi:10.3390/ijms13067260
44. Gonçalves, I. L.; Rockenbach, L.; Göethel, G.; Säuer, E.; Kagami, L. P.; Das Neves, G. M. H.; Munhoz, T.; Figueiró, F.; Garcia, S. C.; Oliveira Batasttini, A. M.; Eifler-Lima, V. L. *Future Med Chem.* **2020**, 12(12), 1137-1154. doi:10.4155/fmc-2019-0256
45. Soares, F. G. N.; Goëthel, G.; Kagami, L. P.; Das Neves, G. M. H.; Sauer, E.; Birriel, E.; Varela, J.; Gonçalves, I. L.; Von Poser, G.; González, M.; Kawano, D. F.; Paula, F. R.; De Melo, E. B.; Garcia, S. C.; Cerecetto, H.; Eifler-Lima, V. L. *BMC Pharmacol Toxicol.* **2019**, 20. doi:10.1186/s40360-019-0357-z
46. Souza, JPS. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa De Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **2021**.
47. Gonçalves, I. L.; Rockenbach, L.; Das Neves, G. M.; Göethel, G.; Nascimento, F.; Porto Kagami, L.; Figueiró, F.; Oliveira De Azambuja, G.; De Fraga Dias, A.; Amaro, A.; De Souza, L. M.; Da Rocha Pitta, I.; Avila, D. S.; Kawano, D. F.; Garcia, S. C.; Battastini, A. M. O.; Eifler-Lima, V. L. *Medchemcomm.* **2018**, 9(6), 995-1010. doi:10.1039/c8md00095f
48. Sunseri, J.; Koes, D. R. *Nucleic Acids Research* **2016** 44, 442–448. doi: 10.1093/NAR/GKW287
49. Pettersen, E. F.; Goddard, T. D.; Huang, C. C.; Couch, G. S.; Greenblatt, D. M.; Meng, E. C.; Ferrin, T. E. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p.16051612, **2004**. doi: 10.1002/jcc.20084.
50. Dolinsky, T. J., Nielsen, J. E., McCammon, J. A., & Baker, N. A. *Nucleic acids research* **2004** 32(Web Server issue), W665–W667. doi: 10.1093/nar/gkh381

## ANEXOS

**Tabela 3** - Classificação e mapeamento de interações entre resíduos aminoácidos e ligante NAT monastrol e Eg5 (PDB ID: 1X88).

Interações resíduos + porção NAT	Classificação da interação	Tipo de ligação	De onde a ligação vem	Classificação química	Para onde a ligação vai	Classificação química
A:NAT801:C16 - A:HOH910:O	Hydrogen Bond	Water Hydrogen Bond; Carbon Hydrogen Bond	A:NAT801:C16	H-Donor	A:HOH910:O	H-Acceptor
A:NAT801:C16 - A:HOH984:O	Hydrogen Bond	Water Hydrogen Bond; Carbon Hydrogen Bond	A:NAT801:C16	H-Donor	A:HOH984:O	H-Acceptor
A:NAT801:S20 - A:HOH985:O	Hydrogen Bond	Water Hydrogen Bond; Conventional Hydrogen Bond	A:NAT801:S20	H-Donor	A:HOH985:O	H-Acceptor
A:HOH808:O - A:NAT801:N10	Hydrogen Bond	Water Hydrogen Bond; Conventional Hydrogen Bond	A:HOH808:O	H-Donor	A:NAT801:N10	H-Acceptor
A:HOH910:O - A:NAT801:O19	Hydrogen Bond	Water Hydrogen Bond; Conventional Hydrogen Bond	A:HOH910:O	H-Donor	A:NAT801:O19	H-Acceptor
A:NAT801:N8 - A:GLU116:O	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	A:NAT801:N8	H-Donor	A:GLU116:O	H-Acceptor
A:NAT801:O13 - A:GLU118:O	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	A:NAT801:O13	H-Donor	A:GLU118:O	H-Acceptor
A:NAT801:C7 - A:GLY117:O	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	A:NAT801:C7	H-Donor	A:GLY117:O	H-Acceptor
A:ALA218 - A:NAT801:C18	Hydrophobic	Alkyl	A:ALA218	Alkyl	A:NAT801:C18	Alkyl
A:NAT801:C16 - A:ARG119	Hydrophobic	Alkyl	A:NAT801:C16	Alkyl	A:ARG119	Alkyl

A:NAT801:C18 - A:LEU214	Hydrophobic	Alkyl	A:NAT801:C18	Alkyl	A:LEU214	Alkyl
A:NAT801 - A:ALA133	Hydrophobic	Pi-Alkyl	A:NAT801	Pi-Orbitals	A:ALA133	Alkyl
A:NAT801 - A:PRO137	Hydrophobic	Pi-Alkyl	A:NAT801	Pi-Orbitals	A:PRO137	Alkyl

**Tabela 4** - Classificação e mapeamento de interações entre resíduos aminoácidos e ligante G7X ispinisibe e Eg5 (PDB ID: 4AP0).

<b>Interações resíduos + porção da G7X</b>	<b>Classificação da interação</b>	<b>Tipo de ligação</b>	<b>De onde a ligação vem</b>	<b>Classificação química</b>	<b>Para onde a ligação vai</b>	<b>Classificação química</b>
B:G7X2001:NBE - B:GLU116:OE1	Hydrogen Bond	Conventional Hydrogen Bond	B:G7X2001:NBE	H-Donor	B:GLU116:OE1	H-Acceptor
B:PRO137:CD - B:G7X2001:OBA	Hydrogen Bond	Carbon Hydrogen Bond	B:PRO137:CD	H-Donor	B:G7X2001:OBA	H-Acceptor
B:ARG221:NH1 - B:G7X2001	Electrostatic	Pi-Cation	B:ARG221:NH1	Positive	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:GLU116:OE1 - B:G7X2001	Electrostatic	Pi-Anion	B:GLU116:OE1	Negative	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:GLU116:OE1 - B:G7X2001	Electrostatic	Pi-Anion	B:GLU116:OE1	Negative	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:PRO137:CB - B:G7X2001	Hydrophobic	Pi-Sigma	B:PRO137:CB	C-H	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:LEU214:CD2 - B:G7X2001	Hydrophobic	Pi-Sigma	B:LEU214:CD2	C-H	B:G7X2001	Pi-Orbitals

B:G7X2001:C AA - B:TYR211	Hydrophobic	Pi-Sigma	B:G7X20 01:CAA	C-H	B:TYR211	Pi-Orbitals
B:G7X2001:C AC - B:G7X2001	Hydrophobic	Pi-Sigma	B:G7X20 01:CAC	C-H	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:TRP127 - B:G7X2001	Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped	B:TRP12 7	Pi-Orbitals	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:TRP127 - B:G7X2001	Hydrophobic	Pi-Pi T-shaped	B:TRP12 7	Pi-Orbitals	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:GLY117:C, O;GLU118:N - B:G7X2001	Hydrophobic	Amide-Pi Stacked	B:GLY11 7:C,O;GL U118:N	Amide	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:GLU118:C, O;ARG119:N - B:G7X2001	Hydrophobic	Amide-Pi Stacked	B:GLU11 8:C,O;AR G119:N	Amide	B:G7X2001	Pi-Orbitals
B:ALA133 - B:G7X2001:C AZ	Hydrophobic	Alkyl	B:ALA133	Alkyl	B:G7X2001 :CAZ	Alkyl
B:G7X2001:C LD - B:LEU160	Hydrophobic	Alkyl	B:G7X20 01:CLD	Alkyl	B:LEU160	Alkyl
B:TRP127 - B:G7X2001:C AZ	Hydrophobic	Pi-Alkyl	B:TRP12 7	Pi-Orbitals	B:G7X2001 :CAZ	Alkyl
B:TYR211 - B:G7X2001:C AB	Hydrophobic	Pi-Alkyl	B:TYR21 1	Pi-Orbitals	B:G7X2001 :CAB	Alkyl
B:G7X2001 - B:ARG119	Hydrophobic	Pi-Alkyl	B:G7X20 01	Pi-Orbitals	B:ARG119	Alkyl
B:G7X2001 - B:LEU214	Hydrophobic	Pi-Alkyl	B:G7X20 01	Pi-Orbitals	B:LEU214	Alkyl
B:G7X2001 - B:ALA218	Hydrophobic	Pi-Alkyl	B:G7X20 01	Pi-Orbitals	B:ALA218	Alkyl
B:G7X2001 - B:LEU214	Hydrophobic	Pi-Alkyl	B:G7X20 01	Pi-Orbitals	B:LEU214	Alkyl

**Tabela 5** - Resultados obtidos para o *redocking* relativo ao co-cristal monastrol e Eg5 (PDB ID: 1X88)

Corrida n°	Ensemble.ID	Gold.PLP.Fitness	RMSD
10	1X88	72,500	1,310
9	1X88	72,449	1,313
3	1X88	72,073	1,453
1	1X88	71,936	1,435
5	1X88	71,414	1,257
2	1X88	68,848	1,407
4	1X88	68,814	0,582
6	4AP0	65,064	4,511
7	4AP0	59,390	5,201
8	1X88	59,158	2,272

**Tabela 6** – Resultados obtidos para o *redocking* relativo ao co-cristal ispinesibe e Eg5 (PDB ID: 4AP0)

Corrida n°	Ensemble.ID	Gold.PLP.Fitness	RMSD
2	4AP0	110,302	0,725
8	4AP0	110,074	1,993
7	4AP0	109,287	0,855
6	4AP0	109,273	0,672
1	4AP0	104,318	0,966
9	4AP0	100,491	2,548
3	4AP0	96,976	2,629
5	4AP0	81,463	5,535
10	4AP0	73,677	5,075
4	4AP0	73,096	4,929

**Tabela 7** - Resultados obtidos para o primeiro *docking molecular* (*scaffold* cumarina).

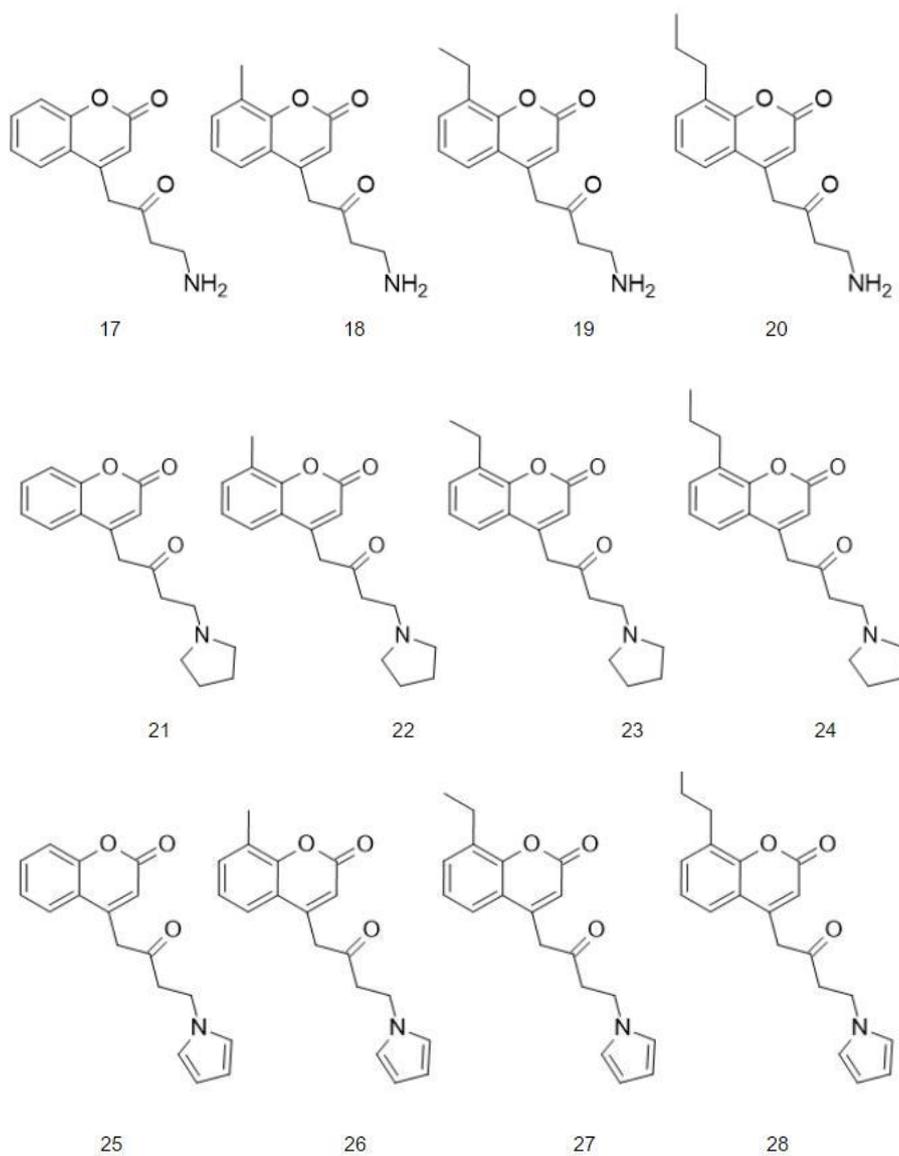
Corrida n°	Ensemble.ID	Gold.PLP.Fitness
10	1X88	46,490
9	1X88	46,588
3	1X88	46,607
1	1X88	46,720
8	1X88	46,720
2	1X88	46,753
5	1X88	46,775
4	1X88	46,865
6	1X88	46,865
7	1X88	46,865

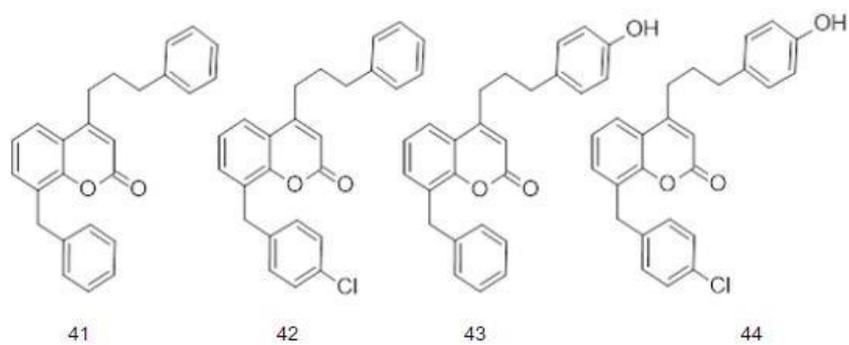
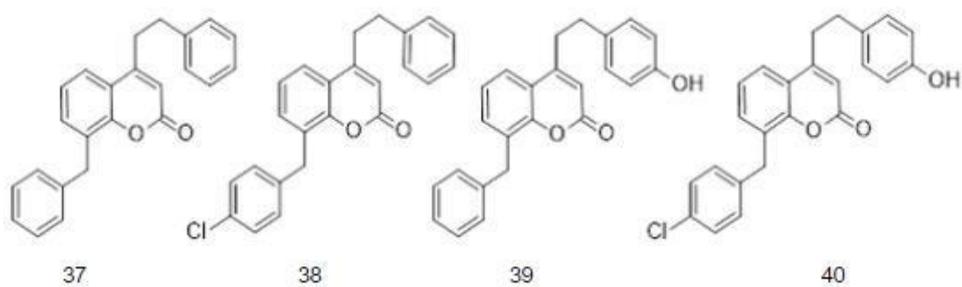
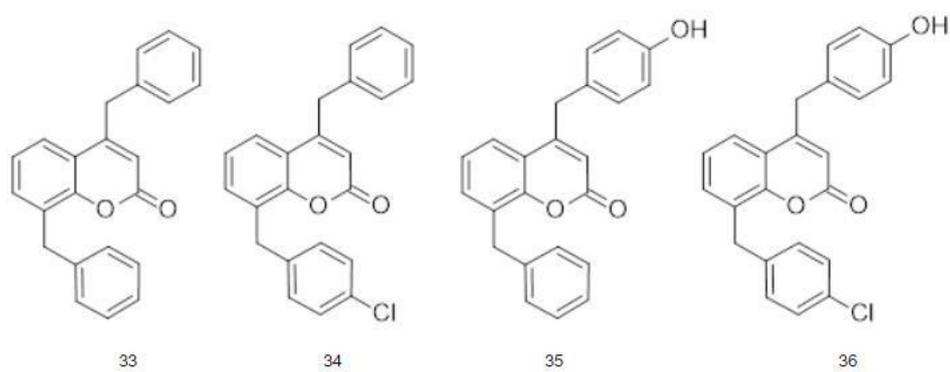
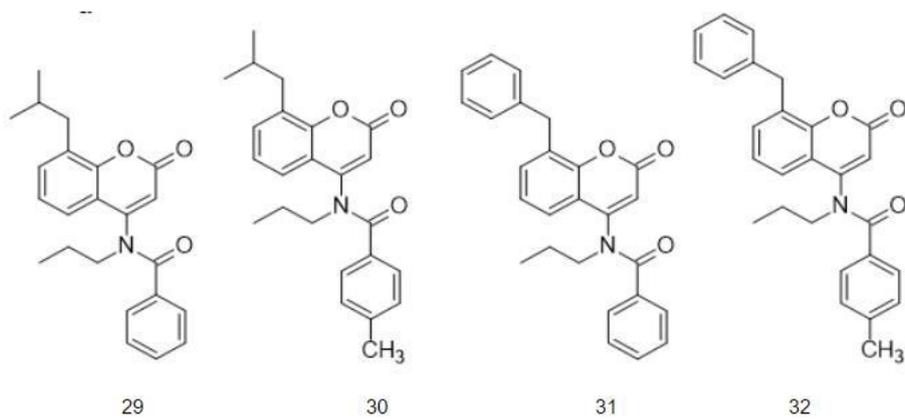
**Tabela 8** - Resultados obtidos para o *docking* da segunda geração de ligantes.

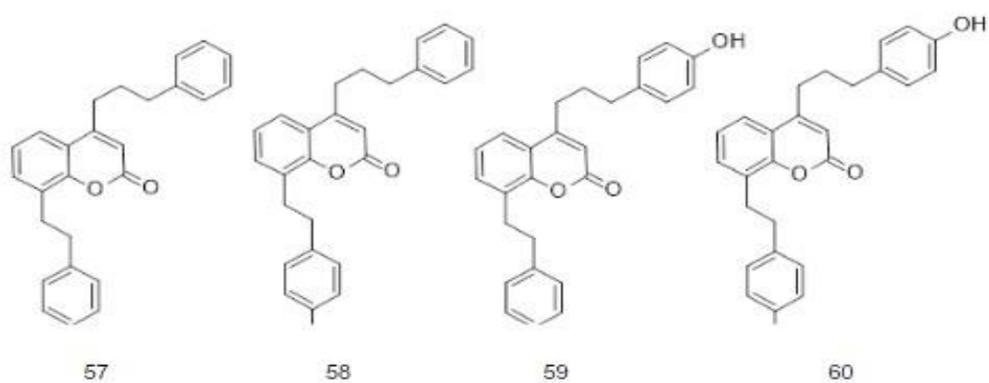
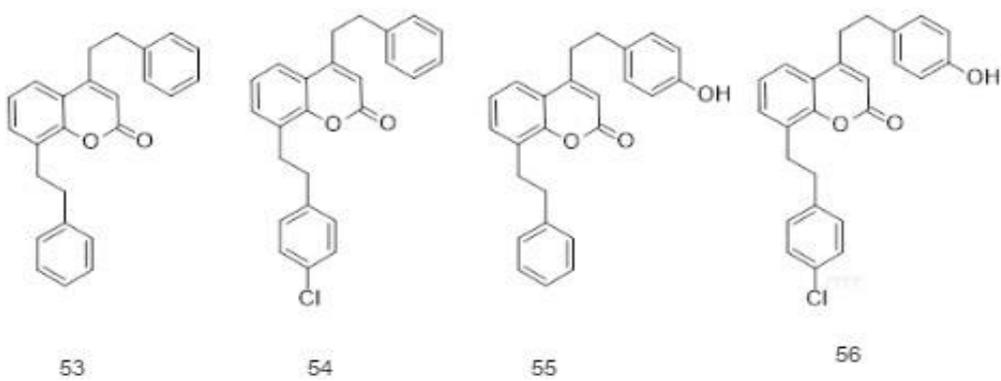
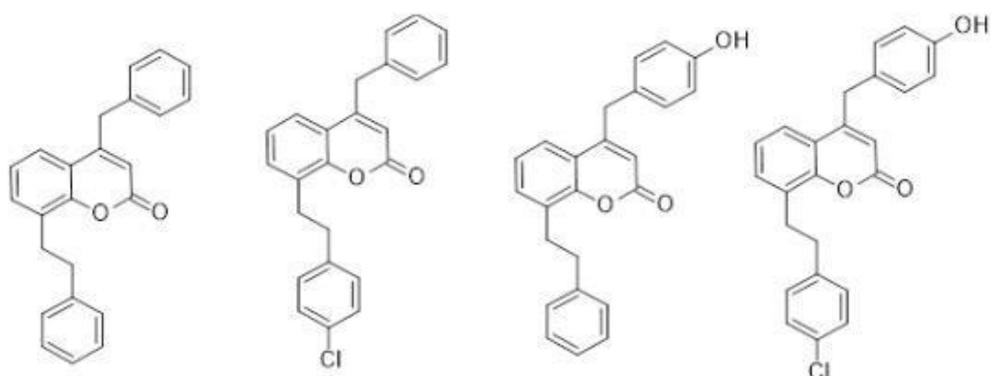
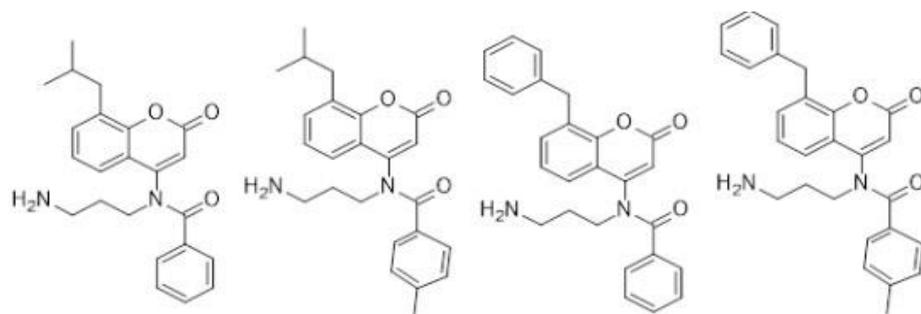
<b>Confôrmero/Composto</b>	<b>Ensemble.ID</b>	<b>Gold.PLP.Fitness</b>
ispinesibe	4AP0	99,4150
449/composto 66	4AP0	92,930
304/composto 50	4AP0	89,869
Confôrmero 503	4AP0	89,330
Confôrmero 639	4AP0	89,269
Confôrmero 488	4AP0	89,174
Confôrmero 243	4AP0	88,268
Confôrmero 506	4AP0	86,877
Confôrmero 489	4AP0	86,092
Confôrmero 372	4AP0	85,665
Confôrmero 271	4AP0	85,619
Confôrmero 185	4AP0	85,256
Confôrmero 505	1X88	85,023
Confôrmero 492	4AP0	85,020
Confôrmero 361	4AP0	84,986
Confôrmero 441	4AP0	84,964
Confôrmero 204	4AP0	84,888
Confôrmero 296	4AP0	84,886
Confôrmero 497	4AP0	84,870
Confôrmero 477	4AP0	84,709
Confôrmero 507	4AP0	84,698
Confôrmero 124	4AP0	84,310
Confôrmero 469	1X88	84,309
Confôrmero 391	1X88	84,265
Confôrmero 456	1X88	84,132
Confôrmero 496	4AP0	84,097
Confôrmero 371	4AP0	84,024
Confôrmero 291	4AP0	84,017
Confôrmero 448	4AP0	83,981
Confôrmero 458	4AP0	83,953
Confôrmero 280	4AP0	83,943
Confôrmero 293	4AP0	83,617
Confôrmero 395	1X88	83,605
Confôrmero 274	4AP0	83,547
Confôrmero 334	4AP0	83,298

Confômero 643	4AP0	83,194
Confômero 252	4AP0	83,107
Confômero 231	4AP0	83,077
Confômero 485	4AP0	82,929
Confômero 478	4AP0	82,802

**Figura 16** - Segunda geração de compostos *ispinesibe-like*







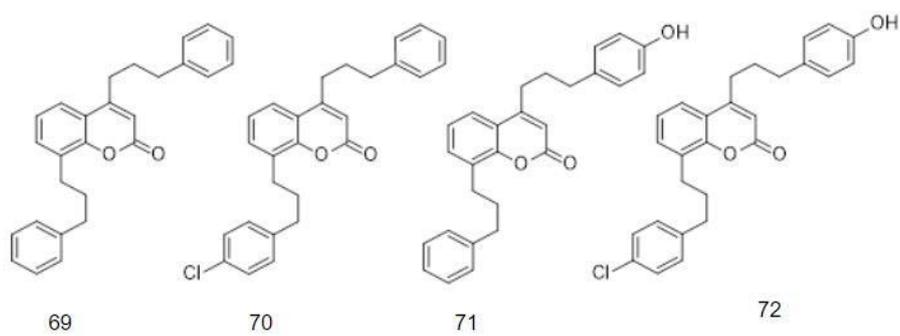
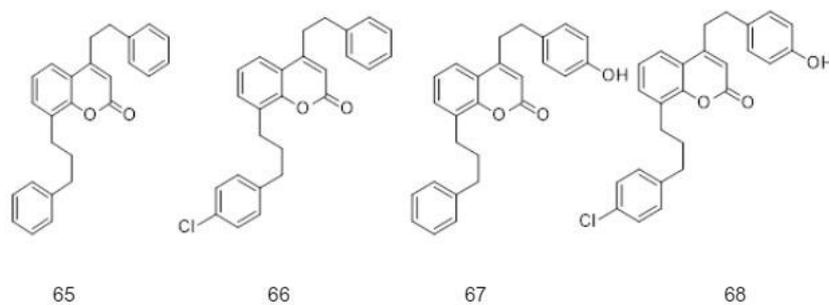
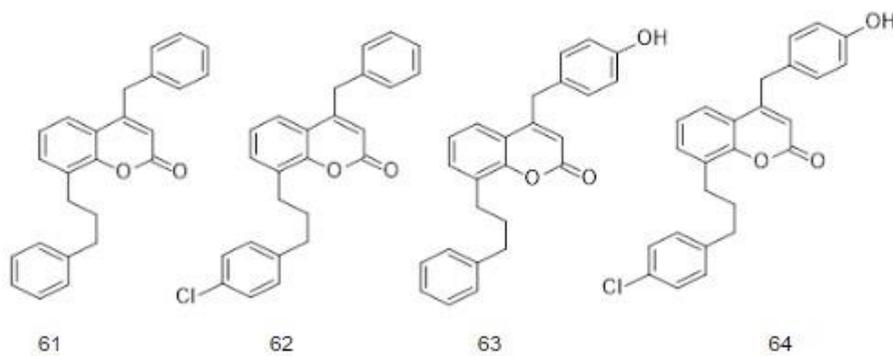


Figura 17 - Segunda geração de compostos *monastrol-like*