**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

# Modelagem molecular aplicada à elucidação dos mecanismos envolvidos na ação antiproliferativa e hemolítica das alquilfosfocolinas

**Matheus Malta de Sá**

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:
Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel-Yagui

São Paulo
2014

Matheus Malta de Sá

# Modelagem molecular aplicada à elucidação dos mecanismos envolvidos na ação antiproliferativa e hemolítica das alquilfosfocolinas

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas

Área de Concentração: Insumos Farmacêuticos

Orientadora: Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel-Yagui

São Paulo
2014

**Ficha Catalográfica**
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Sá, Matheus Malta de
S111m Modelagem molecular aplicada à elucidação dos mecanismos envolvidos na ação antiproliferativa e hemolítica das alquifosfocolinas / Matheus Malta de Sá. -- São Paulo, 2014.
150p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira

1. Modelagem molecular 2. Neoplasias 3. Planejamento de fármacos I. T. II. Rangel-Yagui, Carlota de Oliveira, orientador.

615.19 CDD

Matheus Malta de Sá

# Modelagem molecular aplicada à elucidação dos mecanismos envolvidos na ação antiproliferativa e hemolítica das alquilfosfocolinas

Comissão Julgadora

da

Tese para obtenção do grau de Doutor

Profa. Dra. Carlota de Oliveira Rangel Yagui
orientadora/presidente

Professor_____Assinatura_____
1° examinador

Professor_____Assinatura_____
2° examinador

Professor_____Assinatura_____
3° examinador

Professor_____Assinatura_____
4°examinador

São Paulo, Abril, 2014

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus que me deu forças e inteligência para a conclusão desse projeto. Sem Ele, nada disso seria possível.

À minha família, Gerson Malta de Sá, Maria das Graças Malta de Sá e Pérola Malta de Sá, que estiveram sempre ao meu lado em todos os momentos, fáceis e difíceis. Eles são meus exemplos de honestidade, companheirismo e amor.

À Professora Carlota de Oliveira Rangel Yagui, que foi muito mais que uma orientadora, tornando-se uma amiga. Agradeço pela paciência, ensinamentos e experiência transmitida.

Ao Professor Daniel Blankschtein, do Massachusetts Institute of Technology, pela oportunidade e orientação durante meu estágio no exterior. Agradeço pela amizade, proteção e conselhos que serão extremamente valorosos em minha vida profissional.

Ao Kevin Shapiro, pelo carinho e apoio incondicionais, pelas orientações e encorajamento, sobretudo nos momentos mais difíceis. Você é meu maior exemplo de profissionalismo, dedicação e humildade.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pela formação e oportunidade de concluir meu doutorado.

Às agências de fomento CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro.

A toda secretaria do Departamento de Farmácia pela atenção e auxílio, que foram imprescindíveis durante meu doutorado.

Aos professores da FCF que, desde a graduação, apoiaram e me estimularam a seguir este caminho.

À Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto que, com seu conhecimento, ajudou na minha formação e conclusão deste trabalho de doutorado.

Ao Vishnu Sresht, meu colega de laboratório do Massachusetts Institute of Technology, que me auxiliou grandemente nas simulações de dinâmica molecular.

A todos os meus amigos por sua dedicação e carinho, que estiveram ao meu lado durante essa jornada. Agradeço em especial ao Victor Leo pelo seu enorme companheirismo e apoio, ao Thiago Didone pelas inúmeras risadas e parceria, e à Roberta Polak pelos conselhos valorosos.

*“Panta rei”*

*(Heráclito de Éfeso)*

## RESUMO

**SÁ, M. M. Modelagem Molecular Aplicada À Elucidação Dos Mecanismos Envolvidos Nas Ações Antiproliferativa E Hemolítica Das Alquilfosfocolinas.** 2014. Número de folhas f. 150. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

As alquilfosfocolinas (APC) são uma classe de fármacos derivados de fosfolipídios endógenos que apresentam potencial antitumoral. Diferentemente de outros fármacos antitumorais que agem no DNA da célula, as APCs têm como primeiro local de ação a membrana plasmática e proteínas de sinalização, como a PKC. O objetivo desse trabalho é elucidar, através de metodologias computacionais, os possíveis mecanismos de ação das APCs que provocam hemólise, inibição da PKC e interação com membranas celulares. Inicialmente, a toxicidade de um conjunto de 34 APCs foi estudada pelos métodos quimiométricos de Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e Componentes Principais (PCA). As moléculas foram simuladas com dinâmica molecular (DM) e propriedades físico-químicas e estruturais foram calculadas para os confôrmeros de menor energia. Após aplicação de HCA e PCA, as APCs foram divididas em 3 grupos, de acordo com suas características estruturais. Os resultados sugerem que a presença de grupos catiônicos volumosos, ou anéis como adamantila e ciclohexila, aumentam a hemólise de compostos de cadeia alquílica longa. Anéis macrocíclicos como ciclopentadecila parecem ser importantes para o potencial hemolítico de compostos com cadeia alquílica curta. Com relação a compostos sem anéis e de cadeia linear, grupos catiônicos menos volumosos parecem favorecer a hemólise. Na próxima etapa do estudo, 7 derivados de APC, com diferentes grupos catiônicos, foram selecionados e ancorados no domínio C2 da PKCα. O intuito foi mapear resíduos de aminoácidos importantes para a interação dos ligantes com a enzima, e comparar com o modo de ligação do ativador endógeno fosfatidilserina (PS). Mais uma vez, HCA e PCA foram aplicados para extrair informação relevante do mapeamento. Os resultados mostraram que as cadeias laterais de Pro188, Asn189, Arg216, Trp247, Asp249 e Thr250 não permitem a aproximação adequada do ligante, o que impede que a porção fosforila se coordene com um dos átomos de cálcio. A porção catiônica da PS, em contrapartida, consegue estabelecer ligação-hidrogênio com Asn189 de forma a posicionar os oxigênios da fosforila para interagir, ao mesmo tempo, com o átomo de cálcio. Com menos pontos de coordenação, a afinidade de ligação do cálcio pela PKCα diminui e a ativação da enzima fica comprometida, interrompendo toda a cascata de sinalização que depende dela. A parte final desse trabalho se dedicou ao estudo da interação da miltefosina com diferentes bicamadas lipídicas sob o ponto de vista termodinâmico. Oito bicamadas de diferentes fosfolipídios foram simuladas por DM e a interação energética da miltefosina foi calculada por *Umbrella Sampling*. Os resultados mostraram que a miltefosina apresenta maior partição em bicamadas contendo colesterol, sendo a miscibilidade nesses sistemas cerca de 76 vezes maior que os valores encontrados para bicamadas sem colesterol. Além disso, verificou-se que a internalização da miltefosina é mais fácil em regiões contendo lipídeos poli-insaturados, provavelmente devido ao empacotamento mais frouxo da bicamada. Os dados sugerem que a miltefosina age principalmente em *rafts* lipídicos e que células contendo mais lipídicos poli-insaturados podem incorporar maior quantidade do fármaco.



**Palavras-chaves:** câncer, modelagem molecular, alquilfosfocolinas, dinâmica molecular, proteína quinase C, membrana celular.

## ABSTRACT

**SÁ, M. M. Molecular modeling applied to the elucidation of the antiproliferative and hemolytic mechanisms of action of alkylphosphocholines.** 2014. Número de folhas f. 150. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Alquilfosfocolines (APCs) comprise a class of drugs with antitumor activity derived from endogenous phospholipids. Differently from other drugs whose primary site of action is the DNA, APCs act firstly in the plasma membrane and signaling proteins, such as PKC. The main objective of this work is to elucidate, via computational approaches, the possible mechanisms of actions that cause hemolysis, PKC inhibition and interaction with cellular membranes. Initially, a set of 34 APCs was studied by means of Hierarchical Cluster Analysis (HCA) and Principal Component Analysis (PCA). The molecules were simulated by means of molecular dynamics simulations (MD) and molecular and structural properties were calculated for the lowest-energy conformer. After HCA and PCA methodologies, the set was divided into 3 groups according to their structural features. The findings suggest that the presence of bulky cationic moieties, or the adamantyl and cyclohexil rings, increase the hemolytic potential of compounds with long alkyl chains. Macrocyclic rings, such as cyclopentadecyl, seem to be important to elevate the hemolysis of compounds with short alkyl chains. Regarding linear carbon chain derivatives with no ring substitution, less bulky cationic head groups seem to favor hemolysis. In the next step of this work, 7 APC derivatives were selected and docked in the C2 domain of PKCα. The aim now was to map the residues relevant for ligands interaction compared to the binding mode of the endogenous activator, phosphatidylserine (PS). HCA and PCA were again applied in order to extract relevant information from the mapping. The results showed that the lateral chains of Pro188, Asn189, Arg216, Trp247, Asp249 and Thr250 do not allow the proper approximation of the ligands, impeding the phosphoryl moiety from coordinating with one of the calcium atoms. On the other hand, the cationic moiety of PS forms hydrogen-bonding with Asn189 in order to position the oxygens to interact, at the same time, with a calcium atom. With less coordination sites, calcium binding affinity diminishes and the enzyme activation is compromised, interrupting the signaling cascade. The final part of this work was dedicated to the study of miltefosine interaction with different lipid bilayers from the thermodynamics standpoint. Eight bilayers were simulated with MD and the energetic interaction was calculated via Umbrella Sampling simulations. The findings showed that miltefosine has higher partition in bilayers containing cholesterol, with miscibility of about 76 times higher than the values referring to bilayers without cholesterol. Moreover, it was observed that the internalization of miltefosine is facilitated in regions containing polyunsaturated lipids, probably due to the looser packing. The data suggest that miltefosine acts primarily in lipid rafts, and that cells containing more polyunsaturated lipids in their membranes can incorporate higher quantities of this drug.



**Keywords:** câncer, molecular modeling, alkylphosphocholines, molecular dynamics simulation, protein kinase C, cellular membrane.

# SUMÁRIO

**INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA** ..... **13**

**REFERÊNCIAS** ..... **14**

**CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA** ..... **15**

PARTE I. CÂNCER: EPIDEMIOLOGIA, TRATAMENTOS E ALVOS MOLECULARES ..... **16**

1. Câncer ..... **16**

2. Terapia antineoplásica ..... **17**

*2.1 Alquilfosfocolinas: estrutura química, considerações gerais sobre mecanismo de ação e resistência e aplicações terapêuticas* ..... **19**

PARTE II. METODOLOGIAS COMPUTACIONAIS NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS ..... **26**

1. Planejamento de fármacos auxiliado por computador ..... **26**

2. Simulações de Dinâmica Molecular ..... **28**

*2.1 Minimização de energia ou otimização de geometria* ..... **30**

*2.2. Simulações de dinâmica molecular em sistemas solvatados* ..... **31**

III. OBJETIVOS GERAIS E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO ..... **32**

IV. REFERÊNCIAS ..... **33**

**CAPÍTULO 2: ALQUILFOSFOCOLINAS: EXPLORANDO O PAPEL DE CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS NO POTENCIAL HEMOLÍTICO** ..... **43**

1. INTRODUÇÃO ..... 44

1.1 Alquilfosfocolinas e hemólise ..... **44**

2. OBJETIVO ..... **46**

3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... **46**

3.1 Conjunto de dados ..... **46**

3.2 Construção dos modelos tridimensionais ..... **50**

3.3 Simulações de dinâmica molecular e cálculo de descritores ..... **50**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... **54**

5. CONCLUSÃO ..... **62**

6. REFERÊNCIAS ..... **64**

7. ANEXOS ..... **69**

**CAPÍTULO 3: INTERAÇÃO DE DERIVADOS DE ALQUILFOSFOCOLINA E DOMÍNIO C2 DA PKCα** ..... **91**

1. INTRODUÇÃO ..... 92

1.1 Ancoramento molecular no planejamento de fármacos ..... 92

1.2 Proteína quinase C (PKC) e sua participação no câncer ..... 93

2. OBJETIVO ..... 99

3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... 100

3.1 Construção dos modelos tridimensionais ..... 100

3.2 Ancoramento molecular e simulações de DM ..... 102

3.3 Análise exploratória (HCA e PCA) ..... 104

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... 106

5. CONCLUSÃO ..... 116

6. REREFÊNCIAS ..... 117

7. ANEXOS ..... **125**

**CAPÍTULO 4: INTERAÇÃO DA MILTEFOSINA COM BICAMADAS LIPÍDICAS** ..... **128**

1. INTRODUÇÃO ..... **129**

1.1 Interação de alquilfosfocolinas com a membrana celular ..... 129

1.2 Mecânica estatística – conceitos gerais e cálculo de quantidades físicas em simulações de Dinâmica Molecular ..... 131

*1.2.1 Cálculo de energia livre em simulações de DM* ..... 134

*1.2.2 Potencial de Força Média e Simulações de DM do tipo* Umbrella Sampling ..... 134

2. OBJETIVOS ..... **137**

3. MATERIAIS E MÉTODOS ..... **137**

3.1 Auto-associação de bicamadas lipídicas e campo de força. ..... 137

3.2 Parametrização da miltefosina ..... 139

3.3 Simulações e DM do tipo *Umbrella Sampling* e calculo do PMF ..... 140

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO ..... **141**

4.1 Estabilização das bicamadas ..... 141

4.2 PMF e cálculo de energia livre (ΔG) ..... 143

5. CONCLUSÃO ..... **148**

6. REFERÊNCIAS ..... **149**

**CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS** ..... **155**

## INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O câncer é uma das principais causas de morte no Brasil e no mundo. Antigamente uma preocupação principalmente de países desenvolvidos, as neoplasias passam agora a preocupar os países em desenvolvimento. No Brasil, em específico, observa-se um aumento entre os tipos de câncer normalmente associados ao alto status socioeconômico - câncer de mama, próstata e cólon e reto - e, simultaneamente, presença de taxas de incidência persistentemente elevadas de tumores geralmente associados com a pobreza – câncer de colo de útero, pênis, estômago, fígado, esôfago e cavidade oral. Esta distribuição é resultado da exposição a diferentes fatores de risco ambiental decorrentes do processo de industrialização (agentes químicos, físicos e biológicos) e da exposição a outros fatores relacionados a disparidades sociais (agentes infecciosos, falta de saneamento básico etc). (GUERRA et al., 2005; INCA, 2014).

O arsenal terapêutico atualmente disponível para o tratamento do câncer mostra-se muitas vezes ineficaz no controle dessa doença, sobretudo nos tipos mais agressivos e propensos a desenvolver metástase. Os agentes quimioterápicos usualmente empregados agem no maquinário genético da célula e não raramente tornam-se obsoletos devido à resistência desenvolvida pelos tumores. Associa-se a isso alta incidência de eventos adversos decorrente da inespecificidade desses fármacos (ROCHE, 2008). Tendo em vista esses problemas e o crescente número de casos de neoplasias no Brasil e no mundo, faz-se extremamente necessária a descoberta de novos alvos celulares terapêuticos e novos fármacos para combater o câncer.

Nesse cenário, as alquilfosfocolinas surgem como uma alternativa aos compostos atuais no tratamento das neoplasias. Embora não totalmente elucidada, a proposta de mecanismo de ação desses compostos baseia-se na interação com a membrana celular e inibição de proteínas sinalizadoras, como as proteínas quinases (JENDROSSEK et al., 2002; OBERLE et al., 2005). Ao surgimento da classe, muitas expectativas foram criadas sobre a miltefosina, protótipo da classe que se mostrou eficaz frente a diferentes linhagens celulares *in vitro* e em modelos experimentais animais. Entretanto, a toxicidade gastrointestinal e o potencial hemolítico das alquilfosfocolinas vêm limitando o desenvolvimento mais amplo da classe terapêutica (PACHIONI et al., 2013). Nesse sentido, evidencia-se a necessidade de novos estudos na tentativa de obtenção de análogos mais potentes e que apresentem menos efeitos adversos que as alquilfosfocolinas disponíveis.

O mecanismo de ação dessas moléculas pode ser estudado através de técnicas computacionais de modelagem molecular, uma vez que elas fornecem resolução atômica dos sistemas, muitas vezes difícil de ser obtida com experimentos convencionais. Portanto, o estudo aprofundado do mecanismo de ação, bem como efeito em alvos biológicos e interação com bicamadas lipídicas das alquilfosfocolinas ajudam a elucidar o papel desses compostos no tratamento contra o câncer além de facilitar o planejamento de fármacos mais eficazes contra o câncer e com reduzida toxicidade para células saudáveis.

## REFERÊNCIAS

GUERRA, M.R.; GALLO, C.V.M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014 de Incidência de Câncer no Brasil. **Ministério da Saúde: Rio de Janeiro**. 2014. p. 1-126.

JENDROSSEK, V.; HAMMERSEN, K.; ERDLENBRUCH, B.; KUGLER, W.; KRÜGENER, R.; EIBL, H.; LAKOMEK, M. Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 50, n. 1, p. 71-79, 2002.

OBERLE, C.; MASSING, U.; KRUG, H.F. On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells. **Biol Chem**. v. 386, n. 3, p. 237-245, 2005.

PACHIONI, J. A. et al., Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. **J Pharm Pharm Sci**, v. 16, n. 5, p. 742-759, 2013.

ROCHE, V.F. Cancer and Chemotherapy. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.. ZITO, S.W. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry 6th ed.** Filadélfia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. 2008. cap. 42. p. 1147-1192.

# CAPÍTULO 1

## Revisão da literatura

# PARTE I. CÂNCER: EPIDEMIOLOGIA, TRATAMENTOS E ALVOS MOLECULARES

## 1. Câncer

O câncer é um importante problema de saúde pública em países desenvolvidos e subdesenvolvidos, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo. Embora as maiores taxas de incidência de câncer sejam encontradas em países desenvolvidos, dos 10 milhões de novos casos identificados a cada ano, 5,5 milhões são diagnosticados em países em desenvolvimento, devido aos processos de globalização e mudanças de hábitos de vida (ACHUTTI; AZAMBUJA, 2004; GUERRA et al., 2005). Dados coletados pelo Centro Nacional de Pesquisas em Saúde (do inglês *National Center for Health Statistics*) dos Estados Unidos estimam o surgimento de 1.665.540 novos casos diagnosticados de câncer em 2014 neste país, e 585.720 mortes no ano de 2014, fazendo com que o câncer seja responsável por cerca de 1 a cada 4 mortes nos Estados Unidos (SIEGEL et al., 2014).

O câncer corresponde a uma neoplasia na qual o crescimento excessivo e descontrolado leva à formação de uma massa de tecido anormal e com funções alteradas, conhecida como tumor. Esse crescimento descontrolado é resultado de uma série de alterações nos mecanismos de controle do ciclo celular, gerando o desequilíbrio homeostático que leva a célula à evasão dos mecanismos de morte celular programada. Embora a etiologia de diversos tipos de cânceres ainda seja desconhecida, alterações genéticas (hereditárias ou adquiridas) desencadeiam os processos de imortalização das células, resultando em seu crescimento desordenado (EVANS, 1991; ROBINS et al., 2001).

Os tumores podem ser descritos como benignos ou malignos. Tumores malignos podem se espalhar por invasão e metástase, ao passo que tumores benignos se mantêm localizados. À medida que a massa tumoral cresce oxigênio, nutrientes e espaço se tornam fatores limitantes como resultado do aporte vascular insuficiente. As células cancerosas se adaptam a esses fatores limitantes e buscam por novos locais aonde nem espaço, nem nutrientes, sejam (inicialmente) limitados. A aquisição da capacidade de metástase pelas células tumorais é significativamente influenciada por mudanças na expressão gênica e também por fatores relacionados ao microambiente celular. Essa capacidade de se espalhar para outros órgãos ou tecidos faz do câncer uma doença ameaçadora, na qual a metástase é responsável por 90% das mortes (GIACCIA; ERLER, 2008; KUMAR; ABBAS; FAUSTO,

2005; MENON; TEICHER, 2002; SILVA et al., 2002). Aproximadamente 30% dos pacientes com câncer têm metástases clinicamente detectáveis na diagnose inicial e 30–40%, metástases ocultas. Dessa forma, há necessidade iminente de prognosticar o potencial metastático do tumor característico, para identificar o foco metastático oculto, impedir a disseminação e a transformação de tumores em fenótipos mais invasivos (EVANS, 1991; MENON; TEICHER, 2002).

De acordo com estimativas mundiais do projeto Globocan 2012, da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde (OMS), houve 14,1 milhões de casos novos de câncer e um total de 8,2 milhões de mortes por câncer, em todo o mundo, em 2012. A carga do câncer continuará aumentando nos países em desenvolvimento e crescerá ainda mais em países desenvolvidos se medidas preventivas não forem amplamente aplicadas. Nesses, os tipos de câncer mais frequentes na população masculina foram próstata, pulmão e cólon e reto; e mama, cólon e reto e pulmão entre as mulheres. Nos países em desenvolvimento, os três cânceres mais frequentes em homens foram pulmão, estômago e fígado; e mama, colo do útero e pulmão nas mulheres (INCA, 2014).

De acordo com dados recentes do Ministério da Saúde, são esperados 394.450 novos casos de câncer, excetuando-se o melanoma, para 2014. Desses, 52% atingirão homens e 48% atingirão mulheres. Em localidades como Porto Alegre, Goiânia, São Paulo e Belo Horizonte, as taxas de incidência são semelhantes às dos países desenvolvidos. Os cânceres mais comuns serão o de pele não melanoma (182 mil casos), próstata (69 mil casos em homens), mama (57 mil casos em mulheres), cólon e reto (33 mil casos), pulmão (27 mil casos) e estômago (20 mil casos). Tratando-se especificamente do câncer de mama, ele é o tipo mais frequente nas regiões Sul (71 casos/100 mil), Sudeste (71 casos/100 mil), Centro-Oeste (51 casos/100 mil) e Nordeste (37 casos/100 mil). Na região Norte é o segundo mais incidente (21 casos/100 mil). A idade é o principal fator de risco e, o número de casos aumenta de forma acelerada após os 50 anos. Sua ocorrência está relacionada ao processo de urbanização da sociedade, evidenciando maior risco de adoecimento nas mulheres com elevado nível socioeconômico (INCA, 2014).

## 2. Terapia antineoplásica

A terapia antineoplásica está em processo de constantes transformações, uma vez que

novas estratégias de tratamento têm sido identificadas com o passar dos anos. Novos fármacos foram introduzidos no mercado para doenças até então intratáveis ou amenizadas apenas com irradiação ou remoção cirúrgica. Atualmente, a quimioterapia convencional e adjuvante são amplamente empregadas em conjunto com tratamentos locais para cânceres como o de mama, colorretal e de pulmão. Os procedimentos quimioterápicos estão em constante crescimento, chegando, no Brasil, a quase 1,8 milhões em 2007 (figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009).

O arsenal quimioterápico tem se mostrado eficaz para diversos tumores e em diversos estágios do seu desenvolvimento. Os agentes quimioterápicos atualmente adotados na prática clínica incluem fármacos que alteram o ciclo celular em diversos pontos, modificando as funções de crescimento descontrolado característico dessas células. Dentre eles, podem-se citar os agentes alquilantes, cujo mecanismo principal é a alquilação do DNA; os antimetabólitos, que interferem com o metabolismo do DNA, impedindo sua replicação; os compostos antimitóticos, fármacos ciclo-específicos que se ligam às cadeias de β-tubulina, interferindo com a formação do fuso mitótico; os análogos da camptotecina, responsáveis pela ligação e estabilização da topoisomerase-I, inibindo a religação do DNA à enzima e acúmulo de fitas simples de DNA; e os antibióticos, com variados mecanismos de ação. Podemos ainda citar na terapia antineolpásica as enzimas e os agentes imunológicos (CHABNER et al., 2006; ROCHE, 2008).

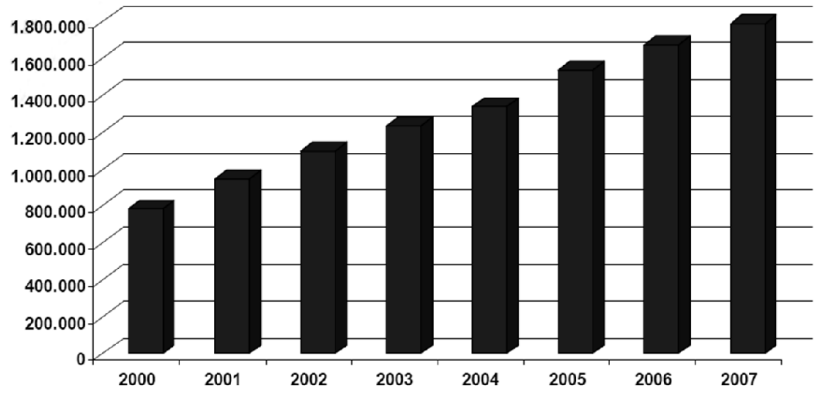



Figura 1 - Procedimentos quimioterápicos realizados no SUS, Brasil, entre 2000-2007 (fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2009).

Muitos tratamentos para o câncer, embora eficazes, estão associados à alta toxicidade devido à inespecificidade, colocando órgãos não afetados pelo tumor em risco, limitando o emprego dos agentes quimioterápicos e, não raro, reduzindo as chances de sucesso dos

tratamentos (MEYERS, 2008; JACOBSON et al., 2009). Além disso, a aquisição de resistência pelas células tumorais aos agentes quimioterápicos é um dos grandes impedimentos na eficácia da terapia antitumoral. Embora vários mecanismos de resistência tenham sido identificados, a resistência à quimioterapia continua sendo uma das maiores causas de morte em pacientes com câncer (DE VISSER; JONKERS, 2009). Em vista das limitações das opções terapêuticas apresentadas, é evidente a necessidade de novos agentes antitumorais que apresentem melhor espectro de ação, eficácia contra tumores resistentes aos fármacos disponíveis e, ainda, que melhorem a tolerabilidade ao tratamento (LEIGHL et al., 2008).

Como abordado, muitos agentes citostáticos usados na terapia antineoplásica atuam no DNA, no citoesqueleto ou no fuso mitótico, inibindo diretamente o desenvolvimento do ciclo celular. Em estudos recentes, tornou-se evidente que a membrana plasmática é um compartimento celular envolvido na transdução de sinal e o rompimento dos caminhos de sinalização pelos ativadores de membrana foi descrito como uma nova alternativa para a quimioterapia. Neste sentido, análogos sintéticos de fosfolipídios com elevada estabilidade metabólica, são rapidamente incorporados à membrana celular devido à similaridade com os fosfolipídios naturais, dando origem âs alquilfosfocolinas (CLIVE; GARDINER; LEONARD,1999; WIEDER et al., 1999).

## *2.1 Alquilfosfocolinas: estrutura química, considerações gerais sobre mecanismo de ação e resistência e aplicações terapêuticas*

As alquilfosfocolinas (APC, *alkylphosphocholines*) são compostos derivados dos alquil-lisofosfolipídios (ALP, *alkyllysophospholipids*) que, por sua vez, são análogos das lisolecitinas endógenas (2-lisofosfatidilcolina) (JENDROSSEK et al., 2002) (figura 2) e foram originalmente desenvolvidos como agentes antineoplásicos, com promissora atividade *in vitro* e *in vivo*.

Resultados de estudos de estrutura atividade mostram que a atividade antiproliferativa não depende fortemente da posição e características químicas dos substituintes no esqueleto glicerol dos ALP (BRACHWITZ; VOLLGRAF, 1995/ FOS et al., 1995). Dessa forma, a hexadecilfosfocolina (HePC, do inglês *hexadecylphosphocholine*), também conhecida como miltefosina foi sintetizada de acordo com os requisitos estruturais mínimos dos ALPs para que a atividade antineoplásica fosse mantida: uma cadeia alquílica longa e a porção fosfocolina, sendo, portanto, o protótipo das APCs (JENDROSSEK et al.,

2002/ UNGER et al., 1989) (figura 3). Esse composto se difere dos ALPs por não possuir um esqueleto glicerol, o que prolonga sua meia-vida uma vez que ele não é metabolizada pelas fosfolipases. Dessa forma, a miltefosina se acumula em órgãos e tecidos *in vivo* e demonstra alta biodisponibilidade em modelos animais experimentais (ERDLENBRUCH et al., 1999).

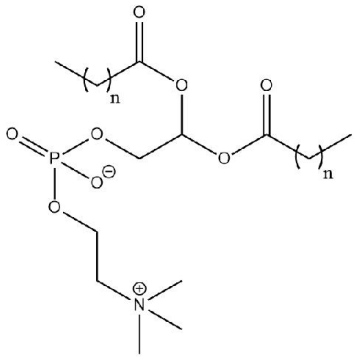


Figura 2 - Estrutura geral das 2-lisolecitinas.

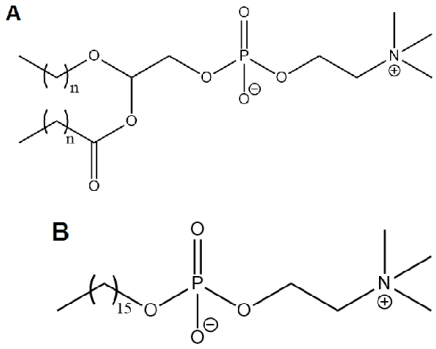



Figura 3 - A) Estrutura geral das alquilglicerofosfocolinas. B) Estrutura química do fármaco miltefosina (hexadecilfosfocolina).

Diferentemente de outros agentes antineoplásicos cujo mecanismo de ação se baseia na interação com o DNA e/ou interferência nos mecanismos de replicação celular, o primeiro local de ação cogitado para as APCs é a membrana celular, devido à sua semelhança com fosfolipídios de membrana (JENDROSSEK et al., 2002; OBERLE; MASSING, KRUG, 2005). O mecanismo de ação desses compostos ainda não está totalmente elucidado. O efeito citostático da miltefosina foi demonstrado em uma variedade de tumores, por meio de estudos bioquímicos que revelaram uma quantidade considerável de efeitos em enzimas celulares. Essas estão associadas à renovação dos fosfolipídios e à transdução de sinal das membranas celulares, incluindo a inibição da proteína quinase C (PKC), fosfolipase C e fosfoinositida

(VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013). Uma vez ativada, a PKC fosforila outras proteínas, incluindo proteínas quinases, desencadeando uma cascata anormal da modulação de informação celular, proliferação, diferenciação e morte das células (HUBIEKI; GANDOUR; ASHENDEL et al., 1996). Uma das hipóteses mais recentes se baseia na inibição da síntese de fosfatidilcolina, elemento essencial para a síntese e integridade das membranas celulares, causando um aumento da transcrição dos fatores pró-apoptóticos CHOP/GADD 153 (WRIGHT; HOWE; ZAREMBERG, 2004; NIETO-MIGUEL et al., 2007). A redução da síntese de fosfatidilcolina reduz a formação de ácido fosfatídico e sua degradação para diacilglicerol. Ambas as moléculas são segundos mensageiros envolvidos nas vias de sinalização envolvidas na proliferação celular MAPK e Ras/Raf/MEK/Erk (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013). Estudos demonstram que a miltefosina também inibe a atividade da (Na+/K+)-ATPase em linhagem de células tumorais HL60 e a fosfolipase C (PLC) em células renais caninas de Madin-Darby (MDCK) (SARAIVA et al., 2009; ÜBERALL et al., 1991; COURAGE; BUDWORTH; GERSCHER, 1995).

Os éteres lipídicos podem ainda reduzir a formação de 1,4,5-trifosfato de inositol e liberação de cálcio mediada por fosfolipase C e, portanto, a via PI3K-Akt (PKB) (VAN BLITTERSWIJK; VERHEIJ, 2013). A indução de apoptose é provavelmente resultado de inúmeros efeitos em cascata que se seguem: inibição da ativação de MAPK combinada à estimulação da via SAPK/JNK, indução da expressão de *myc*, ativação do receptor apoptótico CD95 e aumento dos níveis citosólicos de cálcio. Além disso, as APCs atuam como radiossensibilizantes em diferentes linhagens de tumores sólidos (CRUL et al., 2002; VINK et al., 2005; MATZKE; MASSING; KRUG, 2001). Os efeitos das APCs na membrana plasmática serão discutidos em detalhes no Capítulo 4 desta tese.

Os derivados de fosfolipídios, como a miltefosina, transpõem as membranas por meio de translocação para o interior (mecanismo de *flip-flop*), um processo dependente de energia mediado por proteínas chamadas flipases. Resistência às APCs tem sido observada em células de carcinoma escamoso e células RAW 264.7 (macrófago leucêmico de camundongo) e relacionada com disfunção das flipases envolvidas na translocação de lipídeos, além da alta expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (REN et al., 2011; FU; SHI; WANG, 1999). Para que ocorra a interação entre fármaco e membrana, a composição fosfolipídica da membrana celular parece ser relevante. Cepas de *L. donovani* resistentes à miltefosina, por exemplo, apresentam diferenças na composição de ácidos graxos (alterações nos processos de insaturação e alongamento de cadeia) e esteróis (alteração na acilação do C24) da membrana (SUNDAR; OLLIARO, 2007). Estudos recentes apontam que células S49 e S49AR de

linfoma de rato resistentes a APCs possuem menor quantidade de esfingomielinas na membrana plasmática devido à menor expressão da enzima esfingomielina sintetase (SMS1). As esfingomielinas são essenciais para a composição da membrana plasmática e para o tráfico vesicular. Sem elas, a internalização via endocitose fica impossibilitada (VAN BLITTERSWIJK et al., 2009).

Apesar do efeito antitumoral da miltefosina, seu uso é limitado devido aos severos efeitos colaterais. Em solução aquosa, a miltefosina forma estruturas micelares, sendo sua concentração micelar crítica próxima à das lisolecitinas (~3 μM) (UNGER et al., 1989) . Após injeção intravenosa, hemólise severa é observada. Além disso, necrose e tromboflebite ocorrem no local da injeção; toxicidade gastrintestinal é um fator dose-limitante para a administração oral e pode ocorrer até mesmo em doses não eficazes. Por essas limitações terapêuticas, a miltefosina é apenas aprovada para o tratamento tópico de metástase cutânea de câncer de mama (ERDLENBRUCH et al., 1999; PACHIONI et al., 2013). Portanto, novos análogos baseados em modificações moleculares surgiram com o intuito de melhorar o perfil de toxicidade dessa classe (figura 4).

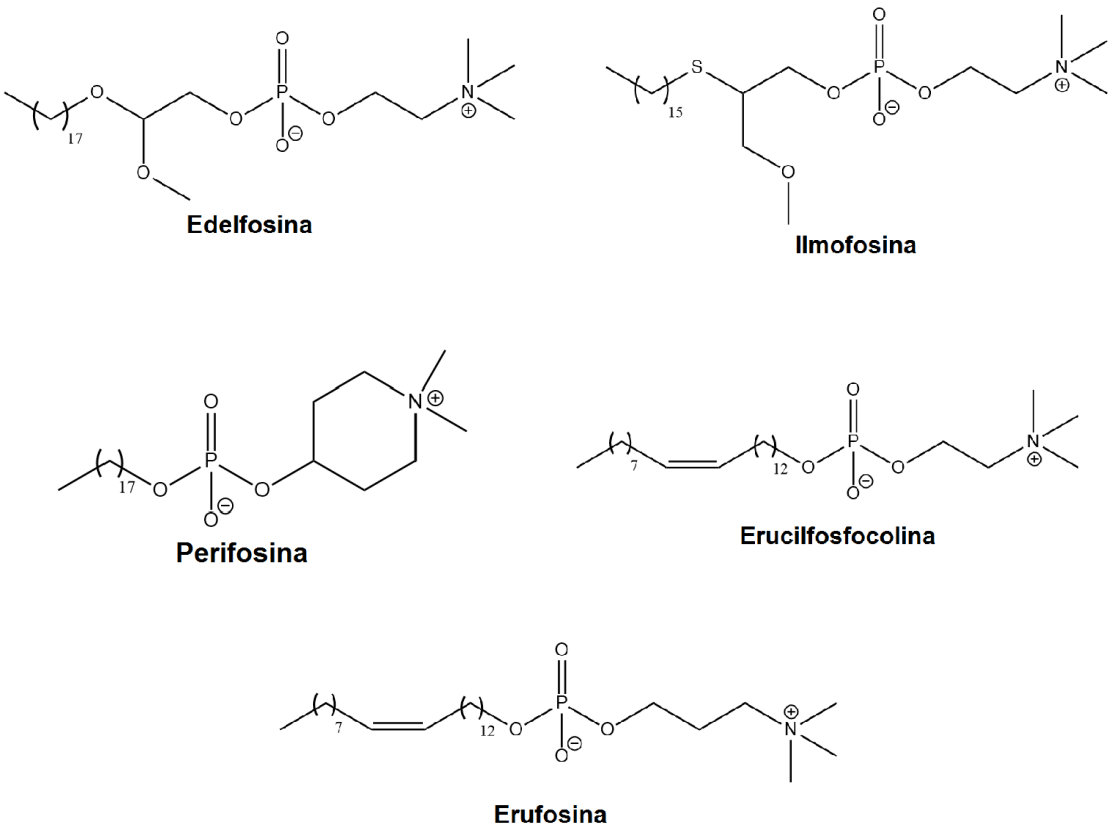



Figura 4 - Estrutura dos compostos perifosina, edelfosina, ilmofosina, erucilfosfocolina e erufosina.

A edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) é um fármaco análogo das 2-lisofosfatidilcolinas e, portanto, estruturalmente relacionado às alquilfosfocolinas. O mecanismo de ação desse composto é semelhante ao de outro análogo, a perifosina, com inibição do domínio de homologia da plecstrina da Akt. Além disso, estudos têm demonstrado que o fármaco aumenta a apoptose através de acúmulo na membrana celular, em particular em *rafts* lipídicos, causando perda do potencial de membrana das mitocondrias e ativação intracelular do receptor de morte celular Fas/CD95 (MOLLINEDO et al., 2011; MOLLINEDO et al., 2004; MEUILLET, 2011).

A ilmofosina é um análogo tio-éter da edelfosina (1-*S*-hexadecil-2-metóxi-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina), cuja maior parte dos estudos está relacionada à sua atividade leishmanicida. Sua ação é semelhante aos outros alquilfosfolipídios, ou seja, relacionada à alteração de vias de sinalização intracelular dependentes de lipídios membranares, inibição da PKC e interação com a membrana celular (GROSMAN, 1999; AZZOUZ et al., 2007; AZZOUZ et al., 2005; GIANTONIO et al., 2004). Em câncer, a ilmofosina atingiu estudos clínicos de fase I e II. Entretanto, apesar dos seus resultados iniciais promissores, alguns estudos de fase I foram limitados por efeitos tóxicos gastrointestinais tanto nas vias oral e intravenosa (HERMANN et al., 1987; GIANTONIO et al., 2004), e os estudos de fase II foram terminados por falta de resultados conclusivos (WINKELMANN et al., 1992; WOOLEY et al., 1996).

A perifosina é um derivado alquilfosfolipídico que está em estudo clínico para uso como agente antineoplásico. Sua ação relatada é como inibidor da Akt (PKB) na via PI3/Akt/mTOR. Diferentemente de outros inibidores de quinase, cujo alvo de inibição é a região de ligação do trifosfato de adenosina (ATP), a atividade da perifosina é parcialmente explicada pela inibição do domínio de homologia da plecstrina da Akt, prevenindo a translocação da enzima para a membrana celular. Com isso, a perifosina induz autofagia e aumenta a apoptose celular. Atividade da perifosina em monoterapia tem sido relatada em sarcomas e na macroglobulinemia de Waldenstrom. Entretanto, os baixos índices de resposta em pacientes com tumores sólidos têm levado os pesquisadores a testarem o fármaco em terapia combinada (SUN, 2010; KASTRITIS; TERPOS; DIMOPOULOS, 2011; GILLS; DENNIS, 2009). De fato, a perifosina tem sido testada em combinação com a lenalidomida e dexametasona para tratamento de mieloma múltiplo e apresentou bons resultados em estudos clínicos de fase I (JAKUBOWIAK et al., 2012). O fármaco também tem sido combinado com o bortezomibe, um inibidor irreversível do proteassoma celular, com ou sem dexametasona para mieloma múltiplo, e a combinação também tem mostrado resultados promissores

(WAYNE et al., 2014). Recentemente a agência reguladora de fármacos e alimentos FDA (*Food and Drug Administration*) dos Estados Unidos aprovou a entrada da perifosina em estudos clínicos de fase III. Os melhores resultados foram observados com a combinação perifosina e temsirolimo em pacientes com neuroblastoma (SUN; MODAK, 2012).

A nova geração de alquilfosfocolinas é composta pela erucilfosfocolina (ErPC) e erufosina (ErPC3). Rübel e colaboradores estudaram os efeitos *in vitro* da ErPC e ErPC3 combinadas com radioterapia em linhagens de célula de astrocitoma e glioblastoma humanos (T98G, A172, U87MG). O tratamento combinado aumentou o dano causado às mitocôndrias e a ativação das caspases, além de aumentar a eficácia da radiação contra células T98G (RÜBEL et al., 2006). Diversos estudos têm sido conduzidos com as alquilfosfocolinas mais recentes, perifosina, ErPC e ErPC3 e alguns deles estão resumidos na tabela a seguir, adaptada de Pachioni e colaboradores (2013).

Tabela 1 - Estudos clínicos conduzidos com as alquilfosfocolinas mais recentes (perifosina, ErPC e ErPC3, adaptado de Pachioni e colaboradores, 2013).

| Tipo de câncer | Fase do estudo clínico |
|---|---|
| **Perifosina** | |
| Mieloma múltiplo refratário | Fase III |
| Câncer de ovário refratário ou resistente a taxanos e compostos de platina | Fase I |
| Carcinoma renal avançado | Fase II |
| Câncer colorretal metastático | Fase II |
| Macroglobulinemia de Waldestrom refratária ou resistente | Fase II |
| Tumores sólidos | Fase I |
| Tumor de próstata recorrente | Fase II |
| Adenocarcinoma pancreático metastático | Fase II |
| Tumores de cabeça e pescoço | Fase II |
| Carcinoma de tecido mole avançado | Fase II |
| Melanoma metastático | Fase II |
| Câncer de próstata independente de andrógenos | Fase II |
| **Erucilfosfocolina** | |
| Coriocarcinoma | *In vitro* |
| Carcinoma de mama, carcinoma pancreático e mieloma | *In vitro* |
| Câncer de prostate | *In vitro* |
| Câncer de endométrio e ovário | *In vitro* |

| | |
|---|---|
| Astrocitoma e glioblastoma | *In vitro* |
| **Erufosina** | |
| Câncer de mama | Pré-clínico |
| Carcinoma escamoso oral | *In vitro* |
| Multiple myeloma | *In vitro* |
| Leucemia mieloide aguda | *In vitro* |
| Astrocitoma e glioblastoma | *In vitro* |
| Carcinoma de mama e leucemia | *In vitro* |

Além do uso em câncer, as alquilfosfocolinas têm sido testadas como quimioterápicos em diversas outras doenças. Os representantes dessa classe apresentaram atividade promissora contra leishmaníase (CROFT et al., 1987); doença de Chagas e tripanossomíase africana (doença do sono) (CROFT; SNOWDON; YARDLEY, 1996); amebíase causada por *Enthamoeba histolytica* e *Acanthamoeba spp*. (SEIFERT et al., 2001; WALOCHNIK et al., 2002); *Trichomonas vaginalis* (BLAHA et al., 2006); esquistossomíase (FAGHIRI; SKELLY, 2009); infecções fúngicas causadas por *Scedosporium prolificans*, *Cryptococcus spp*., *Candida albicans* e fungos dermatófitos (WIDMER et al., 2006; OBANDO et al, 2007; LUKAC et al., 2012); e infecções bacterianas causadas por *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (OBANDO et al, 2007; LUKAC et al., 2012). Além desses usos, aplicações não quimioterápicas têm sido estudadas, como o revestimento de lentes intraoculares (EIBL et al., 2013) e em urticária crônica espontânea (GROSMAN, 1991). A figura a seguir resume os potenciais usos e aplicações das alquilfosfocolinas, adaptado de Pachioni e colaboradores (2013).

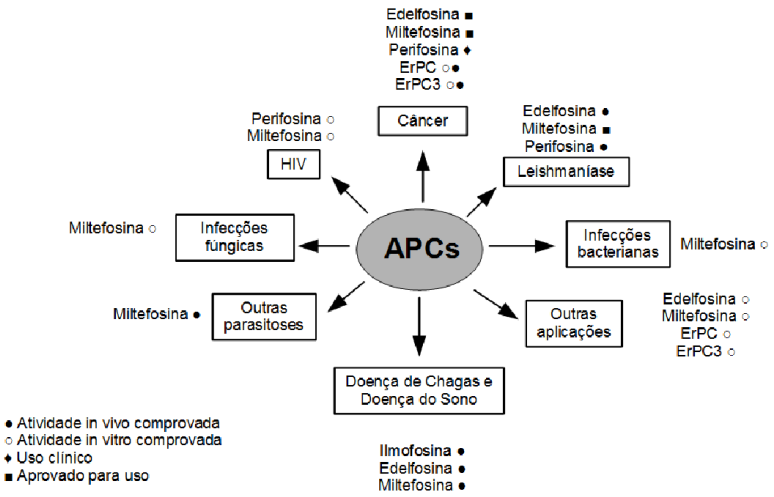



Figura 5 - Usos e aplicações das alquilfosfocolinas (APCs). Adaptador de Pachioni e colaboradores, 2013.

## PARTE II. METODOLOGIAS COMPUTACIONAIS NO PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS

Os métodos teóricos específicos e metodologias computacionais aplicadas em cada estudo serão abordados em detalhes nos capítulos subsequentes. Esta parte se destina a estabelecer uma visão geral do uso de métodos computacionais no desenvolvimento de fármacos.

### 1. Planejamento de fármacos auxiliado por computador

A informação principal que permite o planejamento racional de novas moléculas é o conhecimento da etiologia de determinada doença que se deseja combater, ou, pelo menos, dos processos bioquímicos que são alterados e comprometem a resposta biológica ao nível molecular (COHEN, 1996; WERMUTH, 2007).

O emprego de metodologias de planejamento auxiliado por computador (*Computer-Assisted Drug Design*, CADD) e de modelagem molecular no planejamento racional é alternativa viável e econômica no organograma de introdução de um novo fármaco no mercado (KATRITZKY et al., 2006).

A modelagem molecular é ferramenta importante no processo de desenvolvimento de novos fármacos (SINGH; MALIK; SHARMA, 2006; EKINS; MESTRES; TESTA, 2007) e é

definida, de acordo com recomendações da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) de 1997, como a investigação das estruturas e das propriedades moleculares, utilizando a química computacional e técnicas de visualização gráfica, para fornecer uma representação tridimensional do sistema em estudo, sob um dado conjunto de circunstâncias definidos pelo investigador (WERMUTH, 2007; SANT'ANNA, 2002).

A aplicação de metodologias de modelagem molecular e do CADD viabiliza a construção de modelos moleculares tridimensionais e de modelos matemáticos relacionados a conjuntos de moléculas que, quando submetidos a programas computacionais específicos, permitem visualizar, simular e interpretar sistemas inter-relacionados, como os envolvidos nos processos de reconhecimento molecular entre fármaco-biomacromolécula alvo (receptor, enzima, ácido nucleico, canais de íons) (HENCKEL; BILLINGS, 1995), além de prever o comportamento de outras moléculas, não consideradas na construção dos modelos.

Cabe ressaltar, no entanto, que a contribuição do CADD na descoberta de novos protótipos possui valor limitado devido ao fato de que os estudos de modelagem molecular permitem somente a identificação de novos ligantes provenientes de sistemas biológicos já conhecidos. Do mesmo modo, métodos de relações quantitativas entre estrutura química e atividade biológica (QSAR, *Quantitative Structure-Activity Relationships*) possibilitam a otimização de conjuntos de compostos já descobertos (WERMUTH, 2007). O CADD não é, entretanto, uma rota direta para a descoberta de novos fármacos, mas fornece informações mais detalhadas para alcançar este objetivo (OOMS, 2000).

O avanço nas áreas de ciência computacional, de caracterização de biomacromoléculas e de biologia celular, bem como o conhecimento dos processos bioquímicos envolvidos nas bases moleculares das doenças têm tornado factível a aplicação de metodologias do CADD e, particularmente, de modelagem molecular no processo de descoberta de novos compostos potencialmente ativos (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007; HENCKEL; BILLINGS, 1995; SINGH; MALIK; SHARMA, 2006).

O CADD pode ser aplicado a qualquer molécula ativa cuja interação com um alvo molecular específico (receptor, enzima, canais de íons, DNA, membrana celular) seja postulada (COHEN, 1996; WERMUTH, 2007). Assim, a modelagem molecular utiliza duas principais estratégias do CADD: o planejamento direto ou dependente do receptor e o planejamento indireto ou independente do receptor, observando a disponibilidade ou não da estrutura tridimensional da biomacromolécula alvo (EKINS; MESTRES; TESTA, 2007; HENCKEL; BILLINGS, 1995; SINGH; MALIK; SHARMA, 2006; OOMS, 2000; COHEN,

1996).

A disponibilidade da estrutura tridimensional da biomacromolécula alvo em complexo com o substrato, inibidor ou fármaco protótipo, por exemplo, permite a aplicação da estratégia de planejamento baseado na estrutura (*structure-based drug design*, SBDD), situação ideal para o planejamento de novas moléculas potencialmente ativas (OOMS, 2000; WERMUTH, 2007).

Em se tratando de modelagem molecular, uma maneira de considerar e quantificar a flexibilidade dos compostos ou do sítio de interação é via simulações de dinâmica molecular (DM) dos ligantes isolados ou de complexos ligante-biomacromolécula alvo. Na aplicação do método de DM sucessivas configurações do sistema são geradas integrando-se as leis newtonianas de movimento. O resultado é uma trajetória que especifica como as posições (energia potencial) e as velocidades (energia cinética) das partículas do sistema variam em função do tempo. Esta trajetória corresponde ao perfil de amostragem conformacional (PAC) do sistema investigado (LEACH, 2001).

Geralmente, as simulações de DM de complexos envolvem alto custo computacional e não exploram, de forma efetiva, vários modos de interação a não ser para ligantes muito pequenos, que apresentam maior mobilidade. Além disso, para muitos sistemas as barreiras de energia, que separam um modo de interação do outro, são difíceis de serem superadas quando as simulações são realizadas sob a mesma temperatura, por exemplo. Por isso, frequentemente, esquemas de aquecimento/resfriamento são utilizado para transpor as barreiras energéticas do sistema (TOKARSKI; HOPFINGER, 1997; LEACH, 2001; MORGON; COUTINHO, 2007). Além da varredura por conformações energeticamente estáveis, simulações de DM de complexos são indicadas para refinar estruturas provenientes de outras metodologias, como ancoramento molecular ou *docking* (LEACH, 2001).

## 2. Simulações de Dinâmica Molecular

As simulações de DM correspondem a uma técnica versátil e poderosa para o estudo do comportamento do movimento de partículas e tem se tornado ferramenta indispensável no estudo estrutural de modelos de biomoléculas para complementar os dados experimentais. Este método de modelagem molecular considera a flexibilidade do sistema ao longo do tempo e permite explorar variações conformacionais registradas em um arquivo trajetória (HANSSON; OOSTENBRINK; VAN GUNSTEREN, 2002).

A metodologia de DM é fundamentada nos princípios da mecânica clássica e fornece informações sobre o comportamento dinâmico, dependente do tempo, dos átomos individuais que compõem o sistema (HÖLTJE et al., 2008). Com base na mecânica molecular, as moléculas são consideradas como uma coleção de átomos unidos por forças harmônicas. Estas interações podem ser medidas através de energias potenciais, cujo conjunto completo dos potenciais é conhecido como campo de força (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990). O campo de força permite que a energia potencial total do sistema seja calculada como a soma de diversos termos de contribuição de energia. Considerando $E_{tot}$ como a energia potencial total do sistema, um campo de força típico pode ser expresso por meio das seguintes contribuições de energia, indicadas na eq. 1:

$$E_{tot} = \sum E_{est} + \sum E_{ang} + \sum E_{vdW} + \sum E_{1,4} + \sum E_{el} + \sum E_{tors} \qquad \text{(eq. 1)}$$

Cada valor de contribuição de energia é calculado de acordo com a deformação em relação ao valor de equilíbrio (ou ideal), sendo que $E_{est}$ representa a energia de deformação axial ou de estiramento de ligação, $E_{ang}$ representa a energia de deformação angular, $E_{vdW}$ representa a energia de van der Waals, $E_{1,4}$ corresponde à energia de interações não ligadas do tipo 1-4 ou de Lennard-Jones, $E_{el}$ é a energia de atração ou repulsão de Coulomb entre duas cargas (eletrostática) e $E_{tors}$ corresponde à deformação torsional ou de diedros próprios (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008; DOHERTY, 2002).

Os campos de força são parametrizados de acordo com dados experimentais e sua escolha depende do sistema a ser estudado, uma vez que são desenvolvidos para determinados tipos de moléculas, como moléculas orgânicas pequenas, proteínas, açúcares ou ácidos nucléicos. Exemplos de campos de força disponíveis: MM+ (derivado do MM2 de Allinger, 1977), OPLS (*Optimized Potentials for Liquid Simulations*, JORGENSEN; TIRADO-RIVES, 1988), AMBER (WEINER et al., 1984), CHARMM (*Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics*, BROOKS et al., 1983) e GROMOS96 (*GROningen MOlecular Simulation*, VAN GUNSTEREN et al., 1996).

A simulação de DM consiste em evolução numérica, passo a passo, da equação newtoniana do movimento, conforme eq. 2:

$$F_i(\mathrm{t}) = m_i\, a_i \qquad \text{(eq. 2)}$$

Na eq. 2, $F_i$ é a força que atua sobre cada partícula do sistema em um instante de

tempo $t$, e $a_i$ é a aceleração do átomo $i$ de massa $m_i$. Uma vez definido o campo de força, é possível calcular as forças que atuam sobre cada átomo, calculando-se a primeira derivada da energia potencial ($V$) obtida do campo de força escolhido, em relação às posições desses átomos ($r$), como indicado na eq. 3.

$$F_i(t) = -\frac{\partial V(r_i)}{\partial \vec{r}_i} \qquad \text{(eq. 3)}$$

Esta equação gera a aceleração das partículas e, a partir desta, integrando-se as equações, podem-se obter as velocidades cuja integral proporciona a mudança de posição dos átomos. Para as novas posições atômicas, pode-se calcular a energia potencial e cinética do sistema. Ao conjunto de modificações das posições atômicas dá-se o nome de trajetória (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008).

## *2.1 Minimização de energia ou otimização de geometria*

As simulações de DM devem ser iniciadas com um sistema com um mínimo de energia. A minimização de energia, ou otimização de geometria, corresponde ao ajuste das coordenadas atômicas no sentido de reduzir o valor da energia potencial do sistema. Com o processo de minimização de energia, pequenos ajustes nas posições atômicas proporcionam o relaxamento de distorções nas ligações, ângulos atômicos, e de contatos de van der Waals (NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). Dessa forma, minimizar a energia de um sistema envolve a construção de uma superfície de energia potencial ou hipersuperfície de acordo com as modificações das coordenadas atômicas (diferentes estados conformacionais). Os pontos de menor energia são denominados mínimos locais e correspondem às conformações mais estáveis, ao passo que os de maior energia são os estados de transição (mais instáveis). O ponto de menor energia entre os mínimos locais é chamado de mínimo global. Após a minimização de energia, o sistema encontra-se preparado para ser submetido a outros processos, como por exemplo, a simulações de DM (LEACH, 2001).

*2.2. Simulações de dinâmica molecular em sistemas solvatados*

As simulações de DM podem ser conduzidas em ambientes diferentes do vácuo, numa tentativa mais realista de mimetizar o sistema biológico. Existem dois modelos de solvatação: modelo de solvatação explícito e implícito. Na primeira abordagem, moléculas do solvente são explicitamente incorporadas ao sistema, sendo um componente adicional na simulação. Os modelos de 3 pontos de interação são os mais comumente usados em DM devido a sua simplicidade e eficiência computacional. Muitos modelos usam uma geometria rígida igual à da água, com exceção de SPC (*simple point charge*), que assume geometria tetraédrica ideal (ângulo de 109,47°) ao invés do ângulo observado de 104,5°. Outros modelos incluem TIP (*Transferable Intermolecular Potentials,* como TIPS e TIP3P), o modelo de carga pontual SPC/E, e o modelo ST2 (BIZZARI; CANNISTRARO, 2002; JORGENSEN et al., 1983; BERENDSEN et al., 1987; STILLINGER; RAHMAN,1974).

Os modelos implícitos de solvatação reduzem o custo computacional das simulações e normalmente consideram a influência média do solvente através da estimativa direta da energia livre de solvatação, definida como o trabalho reversível necessário para transferir o soluto em uma configuração fixa do vácuo para a solução. Esta abordagem desconsidera os graus de liberdade do solvente e o considera como um meio contínuo. Dessa forma, a solvatação implícita considera o soluto como uma cavidade embebida em um meio dielétrico e alguns métodos que utilizam esta abordagem são os modelos PCM (*Polarizable Continuum Model*), como D-PCM e C-PCM (TOMASI; MENNUCCI; CAMMI, 2005; COSSI et al., 2003)

Outro modelo é o de camada de solvatação proposto por Hopfinger (1973). Ao adotar esse modelo, assume-se que uma esfera do solvente está centrada em cada grupo da molécula do soluto. O tamanho da esfera dependerá do tipo de solvente adotado e do tipo de soluto em questão. Uma mudança particular de energia livre é associada à remoção de uma molécula do solvente da camada de hidratação. O número de moléculas participantes da camada é ditado pelo tamanho da camada de hidratação e o formato de moléculas componentes. A soma das intersecções dos volumes de van der Waals dos átomos da molécula do soluto com a camada de hidratação resulta num volume excluído que determina quantas moléculas de solvente são removidas da camada quando o soluto está numa determinada conformação. Dessa forma, a energia livre da camada de hidratação é sensível às mudanças

conformacionais por exclusão de volumes das camadas de hidratação.

## III. OBJETIVOS GERAIS E APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O entendimento do mecanismo de ação das alquilfosfocolinas em diversos substratos biológicos compõe o objetivo principal desse trabalho. Para isso, diversas técnicas computacionais e de modelagem molecular foram aplicadas, como o ancoramento molecular (*docking*), simulações de dinâmica molecular, análise multivariada de dados com ferramentas quimiométricas, e cálculo de energia livre.

O estudo do potencial hemolítico dessa classe de fármacos faz parte do Capítulo 2 e foi investigado com aplicação de análise exploratória de dados, empregando os métodos de agrupamentos hierárquicos (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*) e de componentes principais (PCA, *Principal Component Analysis*). Dessa forma, foram exploradas as propriedades moleculares mais influentes e determinantes para o potencial hemolítico de alquilfosfocolinas.

O modo de interação de análogos de alquilfosfocolinas no domínio C2 da PKCα compõe assunto do Capítulo 3. Nele, a ligação das moléculas foi estudada com aplicação de *docking*, simulações de dinâmica molecular com solvente implícito, HCA e PCA. O estudo permitiu ressaltar diferenças e semelhanças na interação de APCs e do ativador endógeno fosfatidilserina com a enzima.

A interação da miltefosina com bicamadas lipídicas é tema do Capítulo 4. A associação foi estudada com simulações de dinâmica molecular e cálculo de energia livre usando metodologia de *Umbrella Sampling*. Diversas bicamadas com diferentes composições lipídicas foram simuladas e os sistemas foram modelados com o campo de força *coarse-grained* MARTINI.

Cabe ressaltar que a aplicação dos métodos teóricos contou com a colaboração da Dra. Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, pesquisadora associada do Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, e do professor Daniel Blankchstein, professor titular do Departamento de Engenharia Química do Massachusetts Institute of Technology (MIT), nos Estados Unidos.

## IV. REFERÊNCIAS

ACHUTTI, A.; AZAMBUJA, M. I. R. Doenças crônicas não-transmissíveis no Brasil: repercussões do modelo de atenção à saúde sobre a seguridade social. **Ciência e Saúde Coletiva**. v. 9, n. 4, p.833-840, 2004.

ALLINGER, N. L. Conformational Analysis 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. **J Am Chem Soc,** v. 99, n. 25, p. 8127-8137, 1977.

AZZOUZ, S.; MAACHE, M.; GARCIA, R.G.; OSUNA, A. Leishmanicidal activity of edelfosine, miltefosine and ilmofosine. **Basic Clin Pharmacol Toxicol,** v. 96, n. 1, p. 60-65, 2005.

AZZOUZ, S.; MAACHE, M.; SÁNCHEZ-MORENO, M.; PETAVY, A.F.; OSUNA A. Effect of alkyl-lysophospholipids on some aspects of the metabolism of Leishmania donovani. **J Parasitol,** v. 93, n. 5, p. 1202-1207, 2007.

BERENDSEN, H.J.C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK. J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **J Chem Phys**, v. 81, n. 8, p. 3684-3691, 1987.

BLAHA, C. et al. In vitro activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and -susceptible strains of Trichomonas vaginalis. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 2, p. 273-278, 2006.

BRACHWITZ, H.; VOLLGRAF, C. Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. **Pharmacol Ther,** v. 66, n. 1, p. 39-82, 1995.

BROOKS, B. R.; BRUCCOLERI, R. E.; OLAFSON, B. D.; STATES, D. J.; SWAMINATHAN, S.; KARPLUS M. CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. **J Comp Chem,** v. 4, n. 2, p. 187-217, 1983.

CHABNER, B. A.; AMREIN, P. C.; DRUKER, B. J.; MICHAELSON, M. D.; MITSIADES, C. S.; GOSS, P. E.; RYAN, D. P.; RAMACHANDRA, S.; RICHARDSON, P. G.; SUPKO, J. G.; WILSON, W. H. Chemotherapy of Neoplasic Diseases. In: BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L., eds. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 11.ed. Nova Iorque: McGraw-Hill, 2006, cap. 51, n.p., CD-ROM.

CLIVE, S.; GARDINER, J.; LEONARD, R. C. F. Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. **Cancer Chemother and Pharmacol**, v. 44, p. S29-S30, 1999.

COHEN, N. C. **Guidebook on molecular modeling in drug design**. San Diego: Academic Press, 1996. 361p.

COSSI, M.; REGA, N.; SCALMANI, G.; BARONE, V. Energies, structures, and electronic properties of molecules in solution with the C-PCM solvation model. **J Comput Chem**, v. 24, n. 6, p. 669-681, 2003.

COURAGE, C.; BUDWORTH, J.; GESCHER, A. Comparison of ability of protein kinase C inhibitors to arrest cell growth and to alter cellular protein kinase C localisation. **Br J Cancer,** v. 71, n. 4, p. 697-704, 1995.

CROFT, S. L. et al., The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against Leishmania donovani. **Biochem Pharmacol**, v. 36, n.16, p. 2633-2636, 1987.

CROFT, S. L.; SNOWDON, D.; YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against Leishmania donovani, Trypanosoma cruzi and Trypanosoma brucei. **J Antimicrob Chemother**, v. 38, n.6, p. 1041-1047, 1996.

CRUL, M.; ROSING, H.; DE KLERK, G. J.; DUBBELMAN, R.; TRAISER, M.; REICHERT, S.; KNEBEL, N. G.; SCHELLENS, J. H.; BEIJNEN, J. H.; TEN BOKKEL HUININK, W.W. Phase I and pharmacological study of daily oral administration of perifosine (D-21266) in patients with advanced solid tumours. **Eur J Cancer,** v. 38, n. 12, p. 1615-1621, 2002.

DE VISSER, K. E.; JONKERS, J. Towards understanding the role of cancer-associated inflammation in chemoresistance. **Curr Pharm Des**, v. 15, n. 16, p. 1844-1853, 2009.

DOHERTY, D. **MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software, User's Guide**; versão: 3.2; Chem21 Group: Lake Forest, IL, 2002.

EIBL, K. H. et al. Alkylphosphocholines for intraocular lens coating. **J Cataract Refract Surg,** v. 39, n. 3, p. 438-445, 2013.

EKINS, S.; MESTRES, J.; TESTA, B.B. In silico pharmacology for drug discovery:

applications to targets and beyond. **Br J Pharmacol**, v. 152, n. 1, p. 21-37, 2007.

ERDLENBRUCH, B.; JENDROSSEK, V.; GERRIETS, A.; VETTERLEIN, F.; EIBL, H.; LAKOMEK, M. Erucylphosphocholine: pharmacokinetics, biodistribution and CNS-accumulation in the rat after intravenous administration. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 44, n. 6, p. 484-490, 1999.

EVANS, C. W. The tumor cell phenotype. **In: The Metastatic Cell: Behaviour and biochemistry**. 1ed. London: Champman and Hall, 1991.

FAGHIRI, Z.; SKELLY, P. J. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, Schistosoma mansoni, in osmoregulation and drug uptake. **FASEB J**, v. 23, n. 8, p. 2780-2789, 2009.

FOS, E.; SUESA, N.; BORRAS, L.; LOBATO, C.; BANFI, P.; GAMBETTA, R.A.; ZUNINO, F. MAULEÓN, D.; CARGANICO, G. Synthesis of alkyl chain-modified ether lipids and evaluation of their in vitro cytotoxicity. **J Med Chem**. v. 38, n. 7, p. 1216-1228, 1995.

FU, D.; SHI, Z.; WANG, Y. Bcl-2 plays a key role instead of mdr1 in the resistance to hexadecylphosphocholine in human epidermoid tumor cell line KB. **Cancer Lett**, v. 142, n. 2, p. 147-153, 1999.

GIACCIA, A. J.; ERLER, J. T. The Cellular Microenvironment and Metastases In: ABELOFF, M. D.; ARMITAGE, J. O.; NIEDERHUBER, J. E.; KASTAN, M. B.; MCKENNA, W. G., eds. **Abeloff's Clinical Oncology**. 4.ed. Philadelphia, PA Churchill Livingstone Elsevier, 2008, cap. 3, n.p.

GIANTONIO, B. J.; DERRY, C.; MCALEER, C.; MCPHILLIPS, J. J.; O'DWYER P. J. Phase I and pharmacokinetic study of the cytotoxic ether lipid ilmofosine administered by weekly two-hour infusion in patients with advanced solid tumors. **Clin Cancer Res,** v.1 5, n. 10, p. 1282-1288, 2004.

GILLS, J. J.; DENNIS, P. A. Perifosine: update on a novel Akt inhibitor. **Curr Oncol Rep,** v. 11, n. 2, p. 102-110, 2009.

GROSMAN, N. Effect of the anti-neoplastic agents edelfosine (ET-18-OCH3), ilmofosine (BM 41.440) and the hexadecylphosphocholine analogues D-20133 and D-21266 on histamine release from isolated rat mast cells. **Immunopharmacology**, v. 44, n. 3, p. 211-221, 1999.

GROSMAN, N. Effects of the ether phospholipid AMG-PC on mast cells are similar to that of the ether lipid AMG but different from that of the analogue hexadecylphosphocholine. **Immunopharmacology**, v. 22, n. 1, p. 36-47, 1991.

GUERRA, M. R.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.

HANSSON, T.; OOSTENBRINK, C.; VAN GUNSTEREN, W. Molecular dynamics simulations. **Curr Opin Struct Biol,** v. 12, n. 2, p. 190-196, 2002.

HENCKEL, J. G.; BILLINGS, E. M. Molecular modeling. In: FOYE, W. O.; LEMKE, T.L.; WILLIAMNS, D. A. eds. **Principles of medicinal chemistry**. 4.ed., Media: Williams & Wilkins, 1995. p. 57-58.

HERMANN, D. B. et al. Phase I trial of the thioether phospholipid analogue BM 41.440 in cancer patients. **Lipids**, v. 22, n. 11, p. 962-966, 1987.

HÖLTJE, H.-D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. **Molecular Modeling – Basic Principles and Applications**. 3ª ed. Wiley-VCH: Darmstadt, 2008. 320p.

HOPFINGER, A. J. **Conformational Properties of Macromolecules**. Academic Press, New York, 1973, p. 71.

HUBIEKI, M. P.; GANDOUR, R. D.; ASHENDEL, C. L. Synthesis of optically pure cyclic lipoidal ammonium salts and evaluation of inhibition of protein kinase C. **J Org Chem**, v. 61, n. 26, p. 9379-9384, 1996.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2014 de Incidência de Câncer no Brasil**. Ministério da Saúde: Rio de Janeiro. 2014. p.1-126.

JACOBSON, J. O.; POLOVICH, M.; MCNIFF, K. K.; CUMMINGS, C.; GALIOTO, M.; BONELLI, K. R.; MCCORKLE, M. R. American Society of Clinical Oncology/Oncology Nursing Society Chemotherapy Administration Safety Standards. **J Clin Oncol**, v. 99, p. 1-7, 2009.

JAKUBOWIAK, A. J. et al. Perifosine plus lenalidomide and dexamethasone in relapsed and relapsed/refractory multiple myeloma: a Phase I Multiple Myeloma Research Consortium

study. **Br J Haematol**, v. 158, n. 4, p. 472-480, 2012.

JENDROSSEK, V.; HAMMERSEN, K.; ERDLENBRUCH, B.; KUGLER, W.; KRÜGENER, R.; EIBL, H.; LAKOMEK, M. Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 50, n.1, p.71-79, 2002.

JORGENSEN, W.L.; TIRADO-RIVES, J. The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin. **J Am Chem Soc,** v. 110, n. 6. p. 1657-1666, 1988.

KASTRITIS, E.; TERPOS, E.; DIMOPOULOS, M. A. Emerging drugs for Waldenström's macroglobulinemia. **Expert Opin Emerg Drugs**. v. 16, n. 1, p. 45-57, 2011.

KATRITZKY, A.R., KUANAR, M.; SLAVOV, S.; DOBCHEV, D. A.; FARA, D. C.; KARELSON, M.; ACREE, W. E. Jr.; SOLOV'EV, V. P.; VARNEK, A. Correlation of blood-brain penetration using structural descriptors. **Bioorg Med Chem**. v. 14, n. 14, p. 4888-4917, 2006.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Neoplasia. In: **Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease***,* 7.ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 270, 2005.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications***,* 2.ed. Londres: Prentice Hall, 2001. 744p.

LEIGHL, N. B.; DENT, S.; CLEMONS, M.; VANDENBERG, T. A.; TOZER, R.; WARR, D. G.; CRUMP, R. M.; HEDLEY, D.; POND, G. R.; DANCEY, J. E.; MOORE, M. A Phase 2 study of perifosine in advanced or metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 108, n. 1, p. 87-92, 2008.

LUKAC, M. et al. Relationship between aggregation properties and antimicrobial activities of alkylphosphocholines with branched alkyl chains. **Int J Pharm**, v. 423, n. 2, p. 247-256, 2012.

MATZKE, A.; MASSING, U.; KRUG, H. F. Killing tumour cells by alkylphosphocholines: evidence for involvement of CD95. **Eur J Cell Biol,** v. 80, n. 1, p. 1-10, 2001.

MENON, K.; TEICHER, B. A. Metasis models. **In: TEICHER, B. A. Tumor models in cancer research**, Totowa: Human Press Inc., p. 277-278, 2002.

MEUILLET, E.J. Novel inhibitors of AKT: assessment of a different approach targeting the pleckstrin homology domain. **Curr Med Chem,** v. 18, n. 18, p. 2727-2742, 2011.

MEYERS, C. A. How chemotherapy damages the central nervous system. **J Biol.** v. 7, n. 11, p. 1-3, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. **O Câncer de Mama no Brasil: Situação Epidemiológica e Rastreamento**. (Apresentação no Encontro Anual sobre Rastreamento do Câncer de Mama, 17 de Abril de 2009).

MOLLINEDO, F.; FERNÁNDEZ, M.; HORNILLOS, V.; DELGADO, J.; AMAT-GUERRI, F.; ACUÑA, A. U.; NIETO-MIGUEL, T.; VILLA-PULGARÍN, J. A.; GONZÁLEZ-GARCÍA, C.; CEÑA, V.; GAJATE, C. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. **Cell Death Dis**. v. 19, n. 2, p. 158, 2011.

MOLLINEDO, F.; GAJATE, C.; MARTÍN-SANTAMARÍA, S.; GAGO, F. ET-18-OCH3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. **Curr Med Chem,** v. 11, n. 24, p. 3163-3184, 2004.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, 1ª ed., São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. 539p.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecl Quim**. v. 34, n. 4, p. 13-24, 2008.

NIETO-MIGUEL, T.; FONTERIZ, R. I.; VAY, L.; GAJATE, C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, S.; MOLINEDO, F. Endomplasmatic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. **Cancer Res**, v. 67, n. 21, p. 10368-10378, 2007.

NOSÉ, S. An extension of the canonical ensemble molecular dynamics method. **Mol Phys**, v. 57, n. 1, p. 187-191, 1986.

OBANDO et al., Synthesis, antifungal and antimicrobial activity of alkylphospholipids. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n.15, p. 5158-5165, 2007.

OBERLE, C.; MASSING, U.; KRUG, H.F. On the mechanism of alkylphosphocholine (APC)-induced apoptosis in tumour cells. **Biol Chem,** v. 386, n. 3, p. 237-245, 2005.

OOMS, F. Molecular modeling and computer aided drug design. Examples of their applications in medicinal chemistry. **Curr Med Chem**, v. 7, n. 2, p. 141-158, 2000.

PACHIONI, J. A. et al., Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. **J Pharm Pharm Sci**, v. 16, n. 5, p. 742-759, 2013.

REN, W. J. et al. Peripheral nerve injury leads to working memory deficits and dysfunction of the hippocampus by upregulation of TNF-α in rodents. **Neuropsychopharmacology**, v. 36, n. 5, p. 979-992, 2011.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**, 6ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, p. 146-149, 2001.

ROCHE, V.F. Cancer and Chemotherapy. In: LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A.; ROCHE, V. F.. ZITO, S.W. **Foye's Principles of Medicinal Chemistry 6th ed.** Filadélfia: Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins. 2008. cap. 42. p.1147-1192.

RÜBEL, A. et al. The membrane targeted apoptosis modulators erucylphosphocholine and erucylphosphohomocholine increase the radiation response of human glioblastoma cell lines in vitro. **Radiat Oncol**, v. 1, n. 6, p. 1-17, 2006.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de Termos Usados no Planejamento de Fármacos (Recomendações da IUPAC para 1997). **Química Nova**. v. 25, n. 3, p. 505-512, 2002.

SARAIVA, V.B.; WENGERT, M.; GOMES-QUINTANA, E.; HEISE, N.; CARUSO-NEVES, C. Na(+)-ATPase and protein kinase C are targets to 1-O-hexadecylphosphocoline (miltefosine) in Trypanosoma cruzi. **Arch Biochem Biophys.** v.481, n.1, p.65-71, 2009.

SEIFERT, K. et al. Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite Entamoeba histolytica. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1505-1510, 2001.

SHOJI, M.; RAYNOR, R. L.; FLEER, E. A.; EIBL, H.; VOGLER, W. R.; KUO, J. F. Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL60 cells. **Lipids**, v.26, n.2, p.145-149, 1991.

SIEGEL, R.; MA, J.; ZOU, Z.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 1, p. 9-29, 2014.

SILVA, A. S.; ROPELATTO, C.; FILIPPINI, C. A. F.; BIANCHINI, E.; BAGATINI, F.; BROCARDO, G. A.; THIESEN, K.; HAAS, P. Ocorrência de câncer de mama no Brasil e no estado de Santa Catarina. **Newslab**. v.52, p.98-110, 2002.

SINGH, S.; MALIK, B. K.; SHARMA, D. K. Molecular drug targets and structure based drug design: a holistic approach. **Bioinformation**, v. 1, n. 8 p. 314-320, 2006.

SUN, S. Y. Enhancing perifosine's anticancer efficacy by preventing autophagy. **Autophagy,** v. 6, n. 1, p. 184-185, 2010.

SUN, W.; MODAK, S. Emerging treatment options for the treatment of neuroblastoma: potential role of perifosine. **Onco Targets Ther**, v. 5, p. 21-29, 2012.

SUNDAR, S.; OLLIARO, L. P. Miltefosine in treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. **Ther Clin Risk Manag**, v. 3, n. 5, p. 733-740, 2007.

TOKARSKI, J.S.; HOPFINGER, A.J. Constructing protein models for ligand- receptor binding thermodynamic simulations: An application to a set of peptidometic rennin inhibitors. **J. Chem. Inf. Comput. Sci,** v. 37, p. 779-791, 1997.

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum Mechanical Continuum Solvation Models. **Chem Rev,** v. 105, n. 8, p. 2999-3094, 2005.

ÜBERALL, F.; OBERHUBER, H.; MALY, K.; ZAKNUN, J.; DEMUTH, L.; GRUNICKE, H. H. Hexadecylphosphocholine Inhibits Inositol Phosphate Formation and Protein Kinase C Activity. **Cancer Res**, v.51, n.3, p.807-812, 1991.

UNGER, C.; DAMENZ, W.; FLEER, E.A.M.; KIM D.J.; BREISER, A.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; NAGEL, G.; EIBL, H. (1989) Hexadecylphosphocholine, a new ether lipid. **Acta Oncol,** v.28, n.2, p.213–217, 1989.

VAN BLITTERSWIJK, W. J. et al. Fas/CD95 down-regulation in lymphoma cells through acquired alkyllysophospholipid resistance: partial role of associated sphingomyelin deficiency. **Biochem J**, v. 425, n. 1, p. 225-234, 2009.

VAN BLITTERSWIJK, W. L.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 3, p. 663-674, 2013.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer Simulation of Molecular

Dynamics: Methodology, Applications and Perspectives in Chemistry. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl,** v. 29, p. 992-1023, 1990.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BILLETER, S. R.; EISING, A. A.; HUNENBERGER P. H.; KRUGER. P.; MARK, A. E.; SCOTT, W. R. P.; TIRONI, I. G. **Biomolecular Simulation: The GROMOS96 Manual and User Guide**. VdF: Hochschulverlag AG an der ETH Zurich and BIOMOS b.v, Zurich, Groningen, 1996.

VINK, S.R.; SCHELLENS, J. H.; VAN BLITTERSWIJK, W. J.; VERHEIJ, M. Tumor and normal tissue pharmacokinetics of perifosine, an oral anti-cancer alkylphospholipid. **Invest New Drugs**. v. 23, n. 4, p. 279-286, 2005.

WALOCHNIK, J. et al. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of Acanthamoeba spp. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 3, p. 695-701, 2002.

WAYNE, A. S. et al. Immunotoxins for leukemia. **Blood**, v. 27, In press, 2014.

WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S. JR.; WEINER, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J Am Chem Soc,** v. 106, n. 3, p. 765-784, 1984.

WERMUTH, C. G. **The Pratice of Medicinal Chemistry**. 2.ed. San Diego: Academic Press, 2007, n.p

WIDMER, F. et al. Hexadecylphosphocholine (miltefosine) has broad-spectrum fungicidal activity and is efficacious in a mouse model of cryptococcosis. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 2, p. 414-421, 2006.

WIEDER, T.; REUTTER, W.; ORFANOS, C. E.; GEILEN, C. C. Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. **Prog Lipid Res**, v. 38, n. 3, p. 249-259, 1999.

WINKELMANN, M. et al. Treatment results of the thioether lipid ilmofosine in patients with malignant tumours. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 118, n. 8, p. 405-407, 1992.

WOOLEY, P. V. et al. A phase II trial of ilmofosine in non-small cell bronchogenic carcinoma. **Invest New Drugs**, v. 14, n. 2, p. 219-222, 1996.

WRIGHT, M. M.; HOWE, A. G.; ZAREMBERG, V. Cell membranes and apoptosis: role of cardiolipin, phosphatidylcholine, and anticancer lipid analogues. **Biochem Cell Biol**, v. 82, n. 1, p. 18-26, 2004.

# CAPÍTULO 2

## Alquilfosfocolinas: explorando o papel de características estruturais no potencial hemolítico*

*Os resultados desse capítulo estão publicados no periódico **Molecular Informatics**, v. 33, n. 1, p. 53-64, 2013.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Alquilfosfocolinas e hemólise

Como abordado no Capítulo 1, o fármaco miltefosina é aprovado no tratamento cutâneo de metástase de câncer de mama, com potencial para uso como quimioterápico contra o câncer em monoterapia ou terapia combinada, uma vez que não apresenta mielotoxicidade (UNGER et al., 1992; CLIVE; GARDINER; LEONARD, et al., 1999; GEORGIEVA et al., 2002; PAPAZAFIRI et al., 2005; STEKAR; HILGARD; KLENNER, 1995). Entretanto, tanto a miltefosina quanto as demais alquilfosfocolinas (APCs) têm uso limitado devido aos graves efeitos colaterais, sobretudo toxicidade gastrintestinal, quando administrados por via oral, e hemólise e tromboflebite, quando administrados por via intravenosa. As APCs são compostos anfifílicos e, portanto, passíveis de interagirem com as membranas celulares, ocasionando diversos fenômenos, como formação de fases que não são bicamadas, formação de vesículas, solubilização de membranas, hemólise, etc. Em concentrações acima da concentração micelar crítica (cmc), compostos anfifílicos podem formar micelas e se fundirem para formarem agregados cilíndricos num arranjo hexagonal que se prolonga por muitos nanometros, conhecido como fase hexagonal I (HI), ou topologia normal. Nesta topologia, a cabeça polar está em contato com a solução aquosa, ao passo que a porção hidrofóbica (cadeia alquílica) encontra-se no núcleo micelar (LAUGHLIN, 1996). A topologia inversa, conhecida como fase hexagonal II (HII), é formada em princípio quando a concentração de tensoativo é aumentada além do ponto onde fases lamelares são formadas, ou quando micelas estão em um ambiente hidrofóbico, como no interior de bicamadas lipídicas. Nessa topologia, as cadeias alquílicas estão direcionadas para o ambiente hidrofóbico e as cabeças polares estão no núcleo micelar (LAUGHLIN, 1996). Em concentrações hemolíticas, a formação de fases não lamelares, como fases hexagonal II em uma membrana, pode criar uma região de desestabilização que resulta na ruptura celular (SCHEIRER et al., 2000). Em baixas concentrações, entretanto, alguns tensoativos podem proteger as células contra a hemólise hipotônica, mecanismo ainda não totalmente esclarecido. Supõe-se que a intercalação de tensoativos na membrana celular possa expandir a bicamada lipídica permitindo que a célula se expanda por um volume maior antes da lise (SÁNCHEZ et al., 2007; ISOMAA et al., 1986).

Com o intuito de melhorar a tolerabilidade e segurança das APCs, diversos análogos da miltefosina foram sintetizados, com sua estrutura ocupando papel importante no

que diz respeito à hemólise (AGRESTA et al., 2003; PAPAZAFIRI et al., 2005; CALOGEROPOULOU et al., 2008; JENDROSSEK et al., 2002). Papazafiri e colaboradores estudaram a influência de anéis ciclocalcanos (especificamente a presença de grupos 4-alquilideno-ciclohexila e cicloalquilideno em lipídios alcóxi-etila e alcóxi-fosfodiester) em análogos de APC, testando a atividade antiproliferativa em 8 linhagens de células animais e humanas: PC3 (adenocarcinoma de câncer de próstata humano), MCF7 (adenocarcinoma de câncer de mama humano), A431 (carcinoma epidermoide humano), HeLa (adenocarcinoma cervical humano), PC12 (feocromocitoma de adrenal de rato), U937 (leucemia pro-monocítica humana), K562 (leucemia mielogênica crônica humana), CHO (câncer de ovário de hamster chinês) (PAPAZAFIRI et al., 2005). Além disso, a atividade hemolítica dos compostos sintetizados foi também avaliada (CALOGEROPOULOU et al., 2008). A maioria dos compostos exibiu significante atividade citotóxica que dependeu do tamanho e posição do anel com relação ao grupo fosfato, assim como características da cabeça polar. Esse efeito, entretanto, variou nas diversas linhagens estudadas. Os compostos mais ativos mostraram amplo espectro citotóxico comparável com a miltefosina contra as linhagens MCF7 e U937. Além disso, grande parte dos compostos apresentaram atividade superior à miltefosina contra as linhagens PC3, A431, HeLa e CHO, além de não serem consideravelmente hemolíticos (PAPAZAFIRI et al., 2005; CALOGEROPOULOU et al., 2008). Esses resultados sugerem que as modificações moleculares estudadas desempenharam papel importante no potencial hemolítico das moléculas.

As diferenças estruturais, provenientes de modificações moleculares em regiões distintas da molécula, podem ser investigadas por métodos quimiométricos de análise exploratória para elucidar quais propriedades moleculares relacionadas à estrutura são relevantes e como se correlacionam com determinada resposta biológica. Os métodos Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA, *Hierarchical Cluster Analysis*) e Componentes Principais (PCA, *Principal Component Analysis*), são comumente aplicados nesse sentido (FERREIRA et al., 1999). HCA é uma técnica multivariada que calcula e compara distâncias entre pares de amostras ou variáveis, agrupando os dados em *clusters* de atributos comuns. O objetivo primário é enfatizar agrupamentos e padrões observados nos dados originais, dispondo os resultados em um gráfico bidimensional conhecido como dendrograma (FERREIRA et al., 1999). O PCA é um método de compressão de dados baseado nas correlações entre as variáveis ou descritores. O objetivo dessa técnica é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, agrupando variáveis correlacionadas e substituindo-as por novos descritores, chamados de componentes principais (PC, *Principal Components*),

nas quais os dados são projetados. As PCs são variáveis completamente não correlacionadas, obtidas por combinação linear simples dos dados originais. Além disso, as PCs contém a maior parte da variabilidade dos dados originais em um espaço dimensional reduzido (FERREIRA et al., 1999).

Então, a partir da aplicação de análise exploratória ao conjunto de análogos de miltefosina torna-se possível maximizar as informações de difícil visualização, investigar quais variáveis são mais importantes no processo de classificação das amostras e detectar comportamentos anômalos ou atípicos no conjunto de dados.

## 2. OBJETIVO

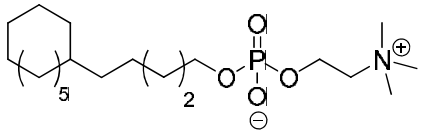
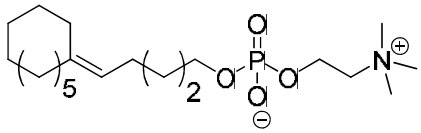
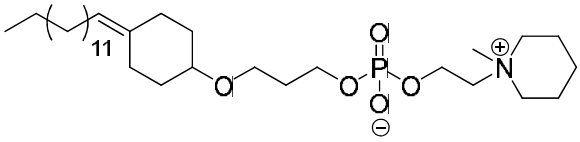
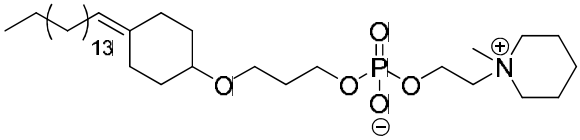
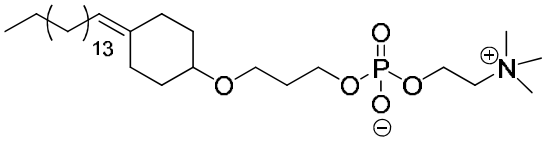
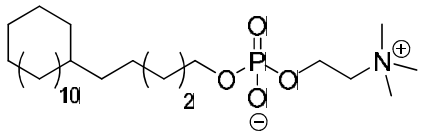
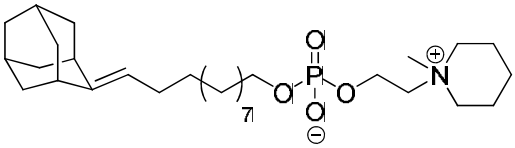
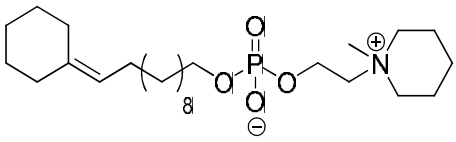
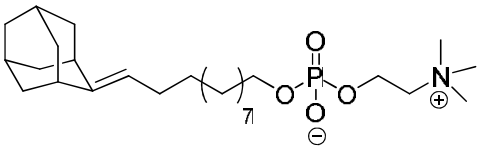
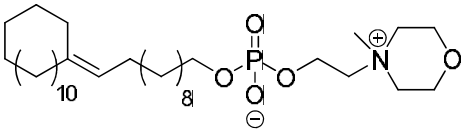
Esta parte do estudo consistiu na aplicação das técnicas quimiométricas HCA e PCA a um conjunto de APCs, análogas ao fármaco miltefosina, com o objetivo de explorar padrões e tendências de classificação a partir de características ou propriedades moleculares calculadas (variáveis ou descritores), de diversas naturezas (termodinâmicas, eletrônicas, hidrofóbicas, estéricas, topológicas e estruturais), e a subsequente relação das propriedades mais relevantes com dados de toxicidade (% hemólise) do conjunto investigado. Além de fornecer informações sobre o mecanismo hemolítico, esta abordagem permitiu a identificação de fatores estruturais relevantes para a hemólise, auxiliando o planejamento de compostos mais potentes e menos tóxicos.

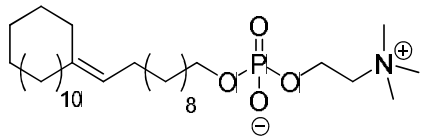
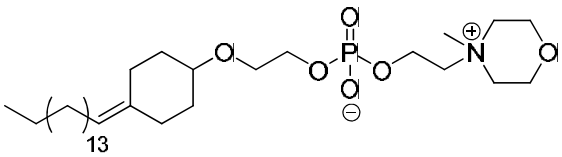
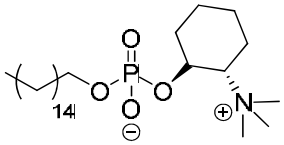
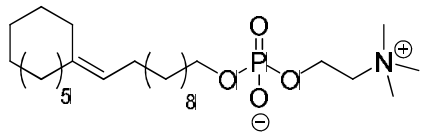
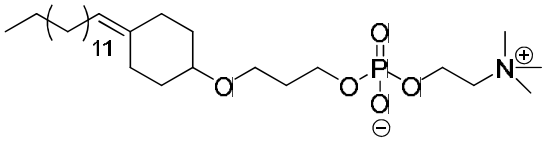
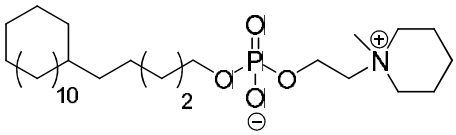
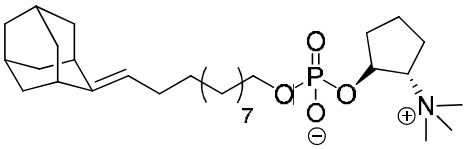
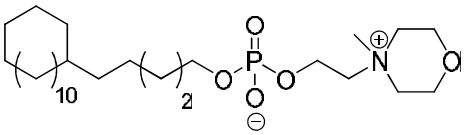
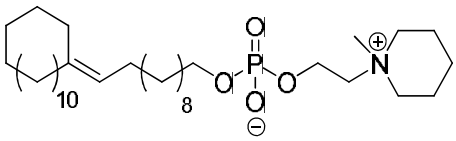
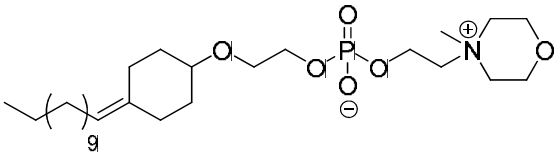
## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

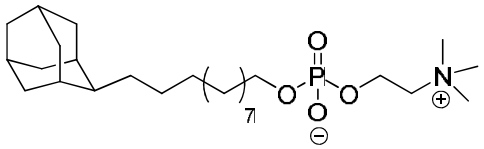
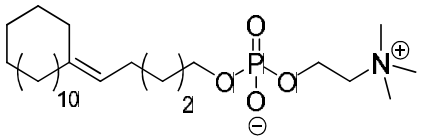
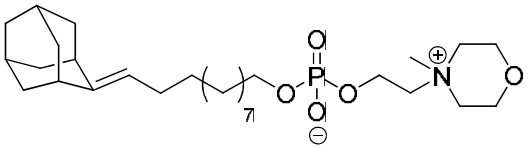
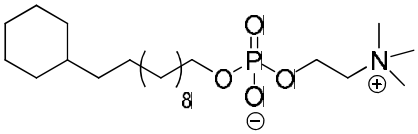
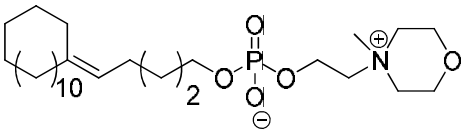
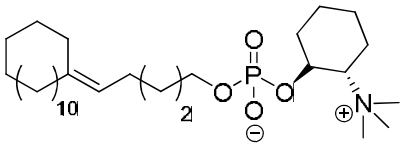
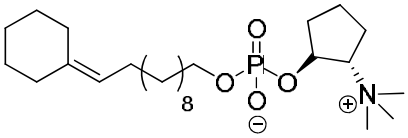
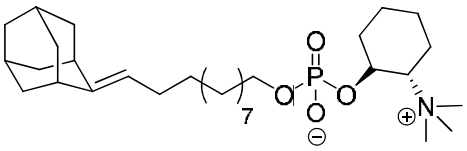
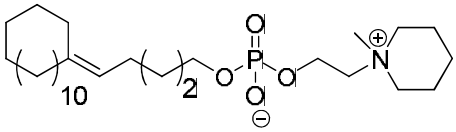
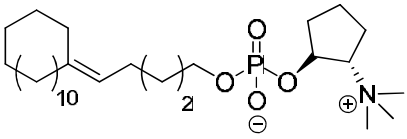
### 3.1 Conjunto de dados

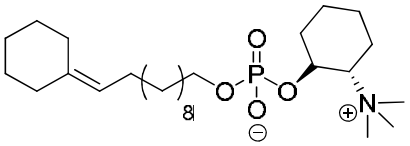
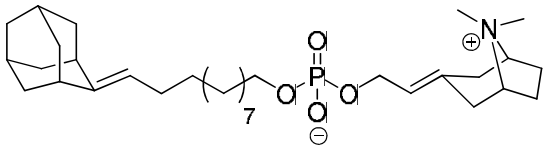
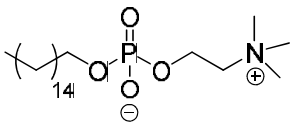
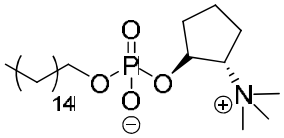
Investigou-se um conjunto de 34 APCs, incluindo a miltefosina (tabela 1). O conjunto de compostos é formado por 12 moléculas previamente sintetizadas por Papazafiri e colaboradores (2005) e 22 moléculas previamente sintetizados por Calogeropoulou e colaboradores (2008). O potencial hemolítico foi medido como percentual de hemólise (%Hem) à concentração de 100 μM. Em ambos os estudos, os compostos foram incubados a 37ºC por uma hora em contato com eritrócitos de voluntários sadios (PAPAZAFIRI et al., 2005; CALOGEROPOULOU et al., 2008).

Tabela 1 - Estrutura 2D dos análogos alquilfosfocolínicos e suas respectivas taxas de hemólise (%Hem) a 100 μM. Selecionado de Papazafiri et al. (2005) e Calogeropoulou et al. (2008).

| Código | Estrutura | % Hem |
|---|---|---|
| **1** |  | **1,7** |
| **2** |  | **2,1** |
| **3** |  | **3,8** |
| **4** |  | **7,9** |
| **5** |  | **8,3** |
| **6** |  | **8,7** |
| **7** |  | **10,6** |
| **8** |  | **12,4** |
| **9** |  | **13,2** |
| **10** |  | **16,9** |

| | | |
|---|---|---|
| **11** |  | **17,7** |
| **12** |  | **20,1** |
| **13** |  | **20,4** |
| **14** |  | **25,5** |
| **15** |  | **26,2** |
| **16** |  | **28,7** |
| **17** |  | **30,8** |
| **18** |  | **34,8** |
| **19** |  | **36,0** |
| **20** |  | **37,5** |

| | | |
|---|---|---|
| **21** |  | **37,8** |
| **22** |  | **38,0** |
| **23** |  | **38,8** |
| **24** |  | **42,8** |
| **25** |  | **45,4** |
| **26** |  | **60,7** |
| **27** |  | **66,4** |
| **28** |  | **66,8** |
| **29** |  | **71,6** |
| **30** |  | **80,5** |

| | | |
|---|---|---|
| **31** |  | **81,6** |
| **32** |  | **82,3** |
| **33 (miltefosina)** |  | **96,1** |
| **34** |  | **100,0** |

### 3.2 Construção dos modelos tridimensionais

A estrutura utilizada como ponto de partida para a construção dos modelos moleculares tridimensionais do conjunto investigado foi a edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*sn*-glicero-3-fosforilcolina), com código de entrada DONZAH (PASCHER et al*.,* 2006). O modelo molecular 3D de cada ligante foi construído em campo de força empírico MM+ (ALLINGER, 1977), sem quaisquer restrições, e a geometria foi otimizada com o método Polak-Ribière (gradientes conjugados). As cargas atômicas parciais foram calculadas com método semi-empírico PM3 (*Parameterized Model number 3*) (STEWART, 1989) implementado no programa HyperChem 7.5 (HYPERCUBE, INC., 2003).

### 3.3 Simulações de Dinâmica Molecular e Cálculo de descritores

O programa MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 2002) foi utilizado para procedimentos de minimização de energia e simulações de DM. A minimização de energia foi desenvolvida com os métodos de declive máximo (500 iterações) e gradientes conjugados (20.000 iterações) e critério de convergência de energia de 0,1 kcal/mol. Os modelos moleculares resultantes deste processo foram considerados os modelos moleculares iniciais para as simulações de DM.

Simulações de DM de 1 ns (1.000.000 passos; cada passo de 0,001 ps ou 1 fs) foram desenvolvidas a temperatura constante de 310 K (temperatura corporal) com termostato

de Berendsen (banho térmico de 0,1 ps) e constante dielétrica (ε) de 3,5, que simula o ambiente de membranas biológicas. Arquivos trajetória foram salvos a cada 20 passos de simulação, gerando um PAC (perfil de amostragem conformacional) de 50.000 confôrmeros para cada ligante do conjunto investigado.

A conformação de energia mais baixa de cada ligante foi selecionada do PAC, a partir da equilibração do sistema. As contribuições de energia de solvatação e ligação hidrogênio foram com modelo implícito de camada de hidratação desenvolvido por Hopfinger (1973).

A energia potencial total ($E_{tot}$) corresponde à soma das seguintes contribuições de energia intramolecular do sistema: deformação axial ou estiramento ($E_{est}$), deformação angular ($E_{ang}$), deformação torsional ($E_{tors}$), interações do tipo 1-4 ou Lennard-Jones ($E_{1,4}$), eletrostática ($E_{el}$), van der Waals ($E_{vdW}$), solvatação ($E_{solv}$) e ligação-hidrogênio ($E_{Hb}$). Nesta fase, geraram-se descritores termodinâmicos para o sistema investigado. O confôrmero selecionado do PAC de cada ligante foi novamente minimizado em campo de força empírico MM+ e com o método semi-empírico PM3. Este modelo foi utilizado para o cálculo de propriedades moleculares de diversas naturezas (ver tabela 2). Descritores moleculares de natureza termodinâmica, estérica, eletrônica, hidrofóbica, topológica e estrutural foram calculados empregando os distintos métodos e programas computacionais [HyperChem 7.51, Marvin 5.4.1 (CHEMAXON, 2011), Gaussian 03W/GaussView 3.0 (FRISCH et al., 2004)], conforme listado na tabela 2 e figura 1. A figura 7A (Anexos desse capítulo) apresenta uma porção do PAC (100 ps de 1 ns) de cada ligante em que se pode observar o equilíbrio do sistema molecular (região de platô).

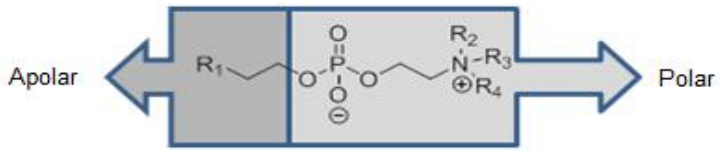
Tabela 2 - Descritores moleculares ou variáveis independentes calculados para o conjunto de compostos investigado e respectivos métodos e programas computacionais.

| Descritor | Natureza | Descrição | Método | Programa |
|---|---|---|---|---|
| **ChelpGN** | Eletrônica | Carga de potencial eletrostático do $N_2$ | HF/6-31G* (d,p) ChelpG (FOCK, 1930; BRENEMAN; WIBERG, 1990; PETERSSON et al., 1988; PETERSSON; AL-LAHAM, 1990) | Gaussian 03W para Windows |
| **ChelpGP** | Eletrônica | Carga de potencial eletrostático do $P_1$ | | |
| **$E_{HOMO}$** | Eletrônica | Energia do orbital de fronteira HOMO | | |
| **$E_{LUMO}$** | Eletrônica | Energia do orbital de fronteira LUMO | | |
| **$\mu_x$** | Eletrônica | Componente X do momento dipolar | | |
| **$\mu_y$** | Eletrônica | Componente Y do momento dipolar | | |
| **$\mu_z$** | Eletrônica | Componente Y do momento dipolar | | |
| **$\mu_{tot}$** | Eletrônica | Momento dipolar total | | |
| **$E_{str}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia de deformação axial | Simulações de DM | MOLSIM 3.2 |
| **$E_{bend}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia de deformação angular | | |
| **$E_{tors}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia de deformação torsional | | |
| **$E_{1-4}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia de Lennard-Jones ou interações tipo 1-4 | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| **$E_{vdW}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia de van der Waals | (seção Materiais e Métodos) | |
| **$E_{el}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia eletrostática | | |
| **$E_{Hb}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia de ligação hidrogênio | | |
| **$E_{solv}$** | Termodinâmica | Contribuição de energia de solvatação | | |
| **$E_{tot}$** | Termodinâmica | Energia potencial | | |
| **SAaprox** | Estérica | Área superficial aproximada | HASEL; HENDRICKSON; STILL, 1988. | |
| **SAgrid** | Estérica | Área superficial obtida pelo método GRID, com raio atômico de Gavezotti | | |
| **$V_{sol}$** | Estérica | Volume de acessibilidade ao solvente | | |
| **V_vdW** | Estérica | Volume de van der Waals | BODOR; GABAYANI; WONG, 1989; GAVEZOTTI, 1983 | |
| **$V_{NPsol}$** | Estérica | Volume da porção apolar de acessibilidade ao solvente | | |
| **$V_{NPvdW}$** | Estérica | Volume de van der Waals da porção apolar | | |
| **$V_{Psol}$** | Estérica | Volume da porção polar de acessibilidade ao solvente | | HyperChem 7.51 para Windows |
| **$V_{PvdW}$** | Estérica | Volume de van der Waals da porção polar | | |
| **$\theta_{N2}$** | Estrutural | Diedro entre os átomos $N_2$-$C_{12}$-$C_{11}$-$O_4$ | | |
| **$\theta_{O4}$** | Estrutural | Diedro entre os átomos $O_4$-$P_1$-$O_3$-$C_8$ | | |
| **$\theta_{P1}$** | Estrutural | Diedro entre os átomos $P_1$-$O_3$-$C_8$-$C_9$ | | |
| **Dist_P1** | Topológica | Distância entre os átomos $P_1$ e $N_2$ | | |
| **$C_{num}$** | Topológica | Número de carbonos na porção apolar | | |
| **ClogP** | Hidrofóbica | Coeficiente de partição calculado *n*-octanol/água | GHOSE; PRITCHETT; CRIPPEN, 1988; VISWANADHAN et al., 1989 | |
| **MR** | Estérica/ Hidrofóbica | Refratividade molar | | |
| **Massa** | Propriedade intrínseca | Massa atômica | | |
| **$ClogP_{ion}$** | Hidrofóbica | Coeficiente de partição calculado *n*-octanol/água das espécies iônicas | | |
| **$ClogP_{nion}$** | Hidrofóbica | Coeficiente de partição calculado *n*-octanol/água das espécies não-iônicas | GHOSE; PRITCHETT; CRIPPEN, 1988; VISWANADHAN et al., 1989 | |
| **$ClogD_{7,4}$** | Hidrofóbica/ eletrônica | Coeficiente de partição aparente em diferentes pHs: 7,4, 6,5, 5,0 e 1,5 | | |
| **$ClogD_{6,5}$** | Hidrofóbica/ eletrônica | | | |
| **$ClogD_{5,0}$** | Hidrofóbica/ eletrônica | Coeficiente de partição aparente em diferentes pHs: 7,4, 6,5, 5,0 e 1,5 | | |
| **$ClogD_{1,5}$** | Hidrofóbica/ eletrônica | | | |
| **$\alpha_{3D}$** | Eletrônica | Polarizabilidade 3D calculada com método de Thole | MILLER; SAVCHIK, 1979 | Marvin 5.4.1 |
| **PSA** | Eletrônica | Área de Superfície Polar (*Polar Surface Area*) | ERTL; ROHDE; SELZER, 2000 | |
| **MMFF94** | Termodinâmica | Energia conformacional com o campo de força *Merck Molecular Force Field* | HALGREN, 1998 | |
| **Dre** | Geométrica | Energia de Dreiding (estabilidade conformocional) | MAYO et al., 1990 | |
| **$SA_{sol}$** | Estérica | Área superficial por acessibilidade do solvente | HASEL; HENDRICKSON; STILL, 1988. | |
| **$A_{min}$** | Geométrica | Área de projeção mínima do confôrmero com base no raio de van der Waals | BODOR; GABAYANI; WONG, 1989; GAVEZOTTI, 1983 | |
| **$A_{max}$** | Geométrica | Área de projeção máxima do confôrmero com base no raio de van der Waals | | |

| | | | |
|---|---|---|---|
| **$R_{min}$** | Geométrica | Raio mínimo do confôrmero com base no raio de van der Waals | |
| **$R_{max}$** | Geométrica | Raio máximo do confôrmero com base no raio de van der Waals | |
| **Platt** | Topológica | Índice de Platt: soma dos graus das arestas de um diagrama molecular | PLATT, 1952 |
| **Randic** | Topológica | Índice de Randic: soma harmônica das médias geométricas dos graus dos nós para cada aresta de um diagrama molecular | RANDIC, 1975; RANDIC, 1993 |
| **Balaban** | Topológica | Índice de Balaban: distância de conectividade da molécula, que é a soma da distância média de conectividade | BALABAN, 1982 |
| **Harary** | Topológica | Índice de Harary: semi-soma dos elementos não diagonais da matriz recíproca de distância molecular | PLAVŠIĆ et al., 1993 |
| **Wiener** | Topológica | Índice de Wiener: distância topológica média dos átomos (semi-soma de todas as distâncias atômicas) | WIENER, 1947 |
| **Szeged** | Topológica | Índice de Szeged: extensão do índice de Wiener para diagramas cíclicos que opera pela contagem do número de átomos em ambos os lados de cada ligação (apenas os átomos que são mais próximos de um dado lado da ligação do que o outro), e soma essas contagens | GUTMAN, 1994 |
| **PWiener** | Topológica | Índice de Polaridade de Wiener: quantidade de distâncias correspondentes ao comprimento de 3 ligações na molécula | WIENER, 1947; TRATCH; STANKECITCH; ZEFIROV, 1990 |

Porções polares e apolares das alquilfosfocolinas para determinação de volume:




Numeração atômica considerada para determinação de diedros (**θ**):

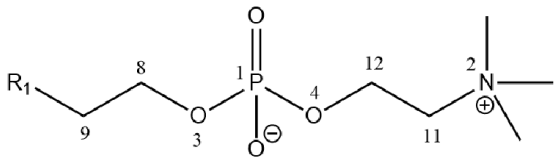


Figura 1 - Representação das porções polares e apolares, bem como números atômicos dos análogos de APC usados como referência para cálculos de propriedades físico-químicas e estruturais.

Com isso, uma matriz **X** foi gerada contendo 34 linhas (número de amostras ou compostos) e 55 colunas (variáveis independentes ou descritores moleculares calculados – Anexo 7B). Os compostos foram previamente embaralhados antes de proceder à análise

exploratória de dados e os valores de %Hem foram expressos em unidades logarítmicas (variável dependente).

Inicialmente, calculou-se a correlação linear (coeficiente de correlação de Pearson, *R*) entre cada variável independente (ou descritor) e o dado biológico (%Hem). A tendência dos dados foi visualizada em gráficos de dispersão [%Hem (eixo y) *versus* cada descritor calculado (eixo x)] (os dados estão apresentados na seção 7C de Anexos deste capítulo). Estes procedimentos foram utilizados como filtros iniciais para detectar ruídos ou variáveis com pouca importância para o conjunto de compostos investigado. Consideraram-se descritores mais relevantes aqueles com boa dispersão e tendência linear (direta ou inversa) em relação ao %Hem. Descritores com boa dispersão, mas sem tendência linear, em princípio, não foram eliminados. No entanto, descritores com valores altos de correlação linear (*R*), mas com pouca, ou nenhuma, dispersão de dados (variabilidade) foram prontamente removidos. Cabe ressaltar que no programa Pirouette 3.11, utilizado para desenvolver a análise exploratória de dados (HCA e PCA), apenas funções lineares são consideradas.

Os dados foram previamente auto escalados de forma a apresentarem média igual a zero e desvio-padrão unitário. Estudos preliminares indicaram o método de agrupamento completo e a distância Euclideana como as condições mais adequadas para desenvolvimento do HCA. Os resultados foram expressos com o gráfico bidimensional dendrograma, para amostras e variáveis. O método PCA foi processado com até 9 fatores (PCs). O programa Pirouette 3.11 apresenta diversos resultados que ajudam a explorar as relações entre as amostras, encontrar amostras anômalas (*outliers*) e escolher o número ideal de fatores. O diagnóstico de *outliers*, por exemplo, é feito através da distância de Mahalanobis (eq. 1):

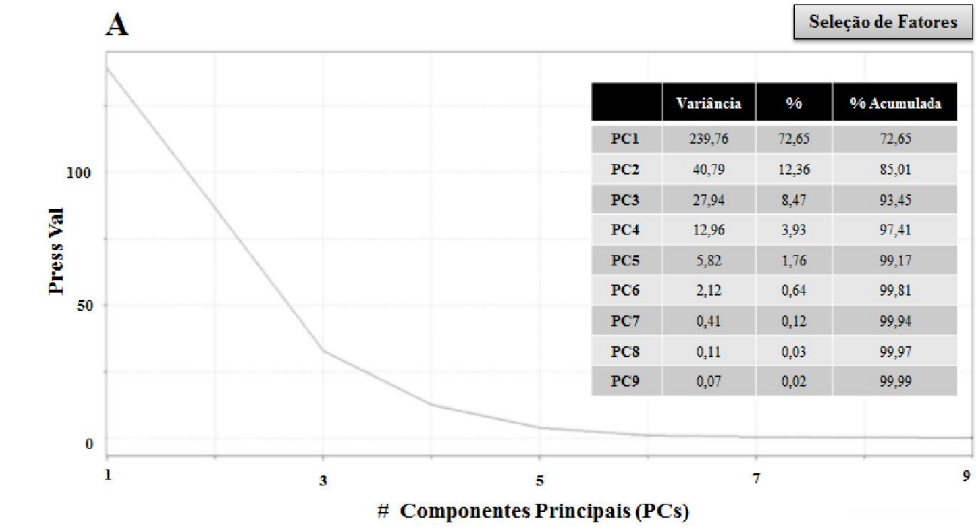
$$MD_i = (t_i - t)^{\mathrm{T}} S_k^{-1} (t_i - t) \qquad \text{(eq. 1)}$$

onde $\boldsymbol{S}$ é o escore da matriz de covariância e $\boldsymbol{t}$ é o vetor de escore médio. Considerando que a distância de Mahalanobis assume distribuição normal, um valor crítico ($MD_{crit}$) pode ser determinado a partir da distribuição qui quadrada com *k* graus de liberdade. Se a distância de Mahalanobis de uma amostra excede o valor crítico, a amostra pode ser um outlier (MAHALANOBIS, 1930).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados de PCA estão apresentados na Figura 2. De acordo com a seleção de

fatores, as duas primeiras componentes principais são responsáveis por explicar 85% da variância total do sistema (figura 2A). O gráfico de escores revela que as duas primeiras PCs dividem as amostras em três grupos principais, apresentados como **A** (compostos **3**, **4**, **10**, **11**, **12** e **19**), **B** (compostos **5**, **7**, **9**, **15**, **16**, **17**, **18**, **20**, **21**, **23**, **25**, **26**, **28**, **29** e **30**) e **C** (compostos **1**, **2**, **6**, **8**, **13**, **14**, **22**, **24**, **27**, **31**, **33** e **34**) (figura 2B). O composto **32** foi o mais distante do restante das outras amostras e, portanto, não foi incluído em nenhum grupo. Os gráficos e tabela de pesos (*loadings* – figura 2C) fornece informação sobre a distribuição dos descritores nas diferentes PCs, assim como quais propriedades mais influenciam a separação das amostras. Na PC1, propriedades estéricas ($V_{sol}$, V_vdW), estéricas/hidrofóbicas (MR), eletrônica (α) e topológica (Randic e Harary) apresentaram maiores pesos. Em contrapartida, na PC2, propriedades topológicas (Dist_P1, Platt) e hidrofóbica (ClogP) foram as que mais influenciaram a separação dos compostos. Os parâmetros estéricos e topológicos estão relacionados com o formato da molécula e desempenham função importante no processo de interação molecular.



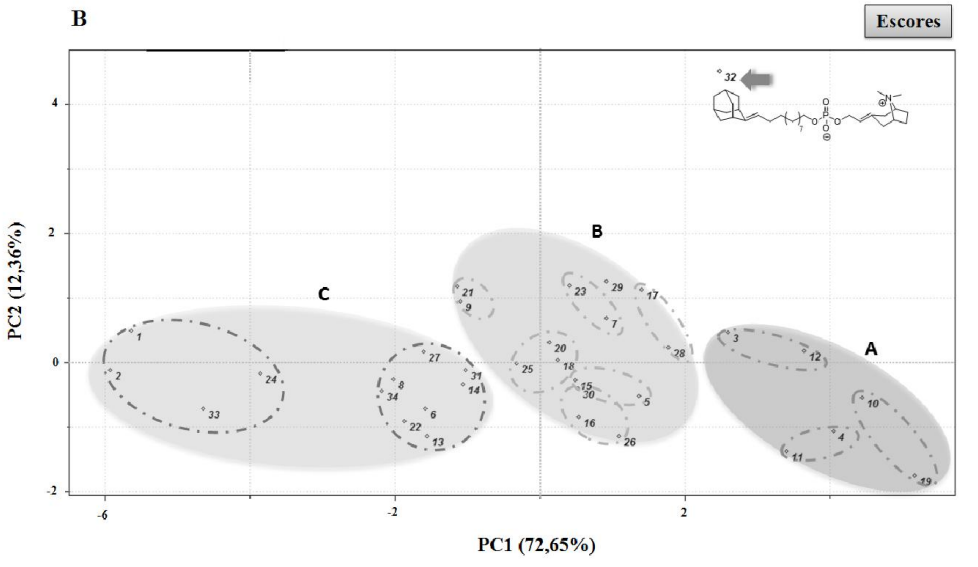
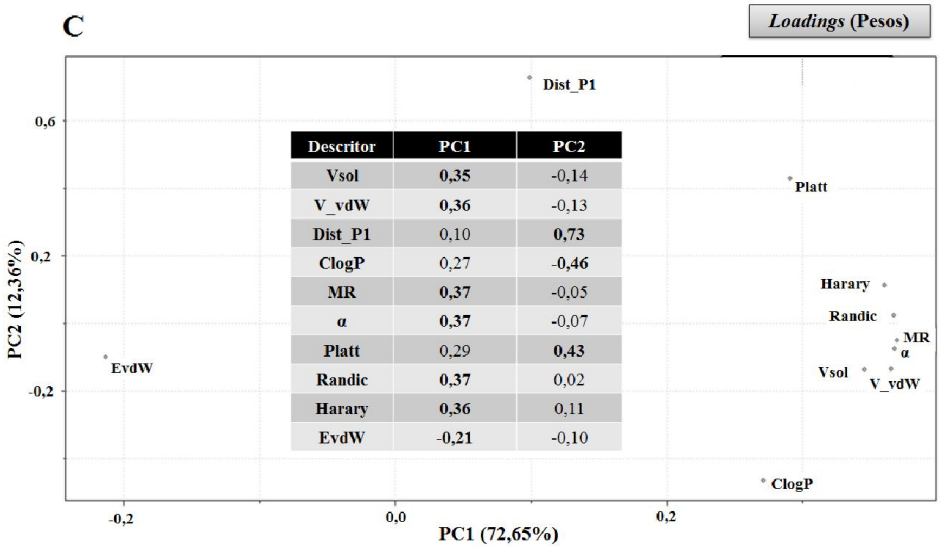



Fig 2. Continuação




| Descritor | PC1 | PC2 |
|---|---|---|
| Vsol | **0,35** | -0,14 |
| V_vdW | **0,36** | -0,13 |
| Dist_P1 | 0,10 | **0,73** |
| ClogP | 0,27 | **-0,46** |
| MR | **0,37** | -0,05 |
| α | **0,37** | -0,07 |
| Platt | 0,29 | **0,43** |
| Randic | **0,37** | 0,02 |
| Harary | **0,36** | 0,11 |
| EvdW | **-0,21** | -0,10 |

Figura 2 - Resultados do método de PCA. (A) Seleção de fatores (gráfico e tabela). (B) Escores. (C). *Loadings* ou pesos (gráfico e tabela).

Com relação à formação de agregados supramoleculares de tensoativos, é importante mencionar que a hemólise ocorre devido à solubilização/ruptura da membrana causada por tensoativos. A presença de micelas nesse processo é importante, e envolve dissolução micelar e partição na membrana, transição de fase entre lamela e micelas, e diminuição do tamanho das micelas (HEERKLOTZ, 2008). A agregação micelar depende do espaço ocupado pelas porções hidrofílica e hidrofóbica da molécula. O volume e comprimento da cadeia alquílica no centro micelar, a secção transversal e área ocupada pela cabeça polar na interface micela-água são parâmetros importantes que influenciam a agregação, formato e tamanho das micelas (LAUGHLIN, 1996; ISRAELACHIVILI, 2011). Dessa forma, a quantidade de tensoativo necessária para solubilizar uma membrana aumenta conforme a facilidade de formação de micelas (PRETÉ et al., 2002).

O gráfico de diagnóstico de *outliers*, que considera os resíduos das amostras *versus* distância de Mahalanobis, mostra que, com exceção dos compostos **32** e **33** (ambos altamente hemolíticos), todas as amostras ficaram dentro dos limites do gráfico (figura 3). Este limite é baseado num intervalo de 95% de confiança ajustado internamente no programa Pirouette 3.11. Entretanto, apenas as análises exploratórias de HCA e PCA não são totalmente suficientes para considerar as moléculas **32** e **33** como amostras anômalas. Dessa forma, de acordo com as propriedades moleculares calculadas, que são diretamente dependentes da

estrutura química dos compostos, **32** e **33** podem ser considerados diferentes do resto do conjunto de dados. O éter fosfolipídico **32** possui um grupo tropânico rígido. Essa característica foi considerada responsável pelo seu baixo potencial citotóxico (CALOGEROPOULOU et al., 2008). A miltefosina (**33**) não possui nenhum anel em sua estrutura, o que a torna mais flexível que os outros compostos da série.

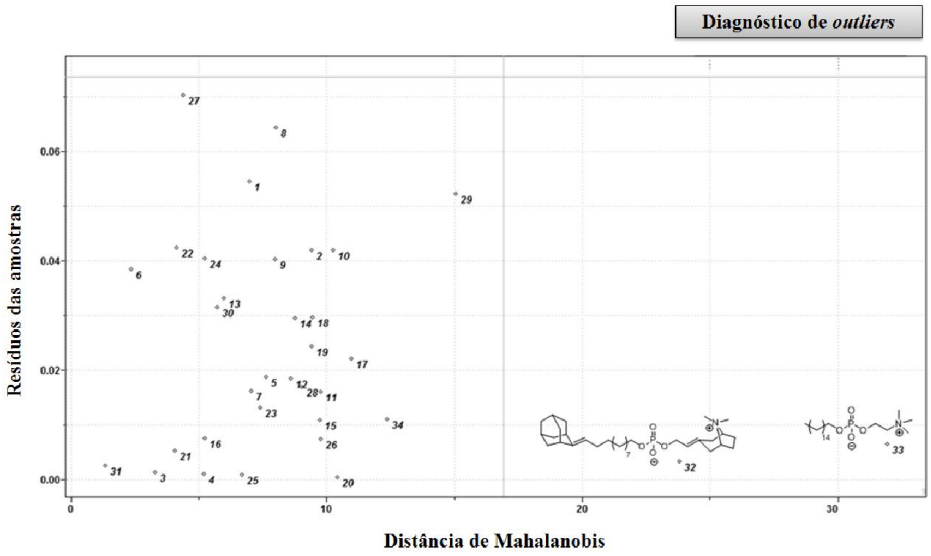



Figura 3 - Gráfico da distância de Mahalanobis *versus* Resíduos das amostras. As linhas no meio e na borda superior do gráfico representam o limite de confiança de 95%.

Resultados complementares ao PCA foram obtidos com o HCA, reforçando o padrão de separação dos compostos, dispostos como dendrograma das amostras (figura 4A). As propriedades topológicas Platt e Dist_P1 foram agrupadas no mesmo cluster que o percentual hemolítico (Hem) (figura 4B, dendrograma das variáveis). Essas duas propriedades também apresentam alto peso no PCA.

Considerando o dendrograma de amostras, usando o índice de similaridade de 0,5, os mesmos três grupos foram formados, correspondendo aos *clusteres* **A** (68% de similaridade), **B** (65% de similaridade) e **C** (55% de similaridade). Mais uma vez o composto **32** não foi inserido em nenhum grupo no índice de similaridade considerado. Entretanto, esse composto apresenta 44% de similaridade com as moléculas agrupadas no *cluster* **B**. O *cluster* **A** é composto por derivados da *N*-metilpiperidina e *N*-metilmorfolina com cadeia alquílica longa ou anel ciclopentadecilideno flexíveis. Com relação ao potencial hemolítico desse grupo, a média foi de 17% ± 11%. O *cluster* **B** é inclui compostos com grande variedade estrutural, muitos dos quais possuem substituintes volumosos na porção apolar, como

adamantila ou ciclopentadecila. Este *cluster* agrupou todos os derivados 11-adamantila. Os compostos **7**, **18**, **20**, **23** e **25** formam um subgrupo com 81% de similaridade, e possuem semelhantes cabeças polares (composta por *N*-metilpiperidina ou *N*-metilmorfolina). Além disso, essas moléculas possuem moderado potencial hemolítico. Nesse caso, a porção catiônica parece desempenhar função importante para a formação desse subgrupo, uma vez que essas moléculas possuem diferentes cadeias apolares (os compostos **18** e **25** possuem um anel ciclopentadecila, ao passo que os compostos **7** e **23** possuem uma porção adamantila). Este grupo apresenta 74% de similaridade com os compostos **16**, **26** e **30**. O composto **29** apresenta 69% de similaridade com as demais moléculas agrupadas. Com exceção de **26** e **30**, o restante das moléculas possui porção catiônica derivada da *N*-metilpiperidina. Este subgrupo inclui ainda as moléculas com cadeia alquílica curta com um anel ciclopentadecila (**16**, **18**, **25**, **26**, **29** e **30**).

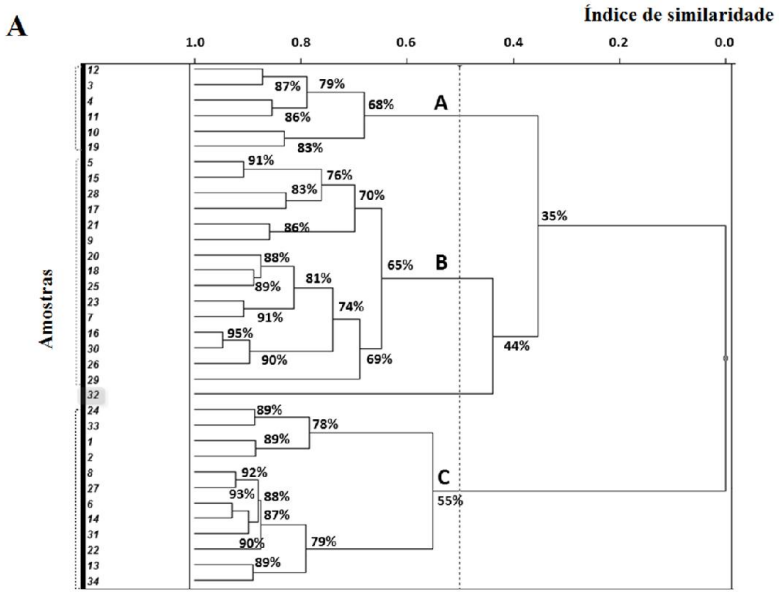


Fig. 4. Continuação

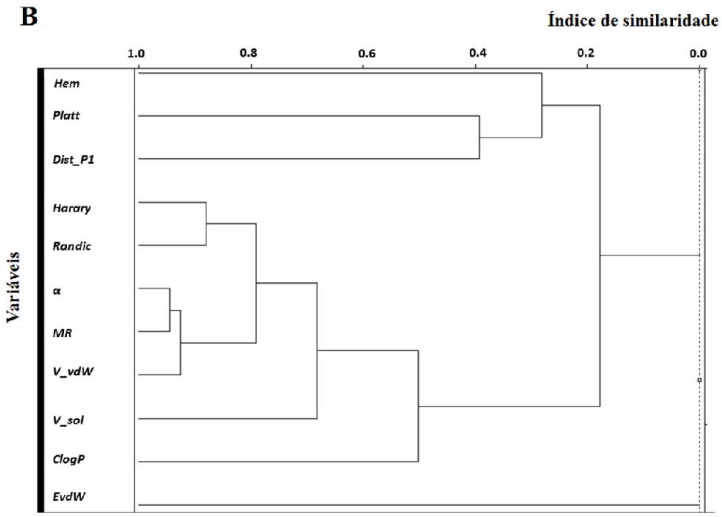



Figura 4 - Resultados do método de HCA. (A) Dendrograma de amostras. (B) Dendrograma de variáveis.

Ainda no *cluster* **B**, as moléculas **5**, **9**, **15**, **17**, **21** e **28** possuem similaridade de 70%. Este subgrupo não inclui nenhum derivado da *N*-metilpiperidina ou da *N*-metilmorfolina, mas sim os derivados da *N*,*N*,*N*-trimetilamina, *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina e *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetilciclopentanamina. Corroborando os resultados observados no *cluster* **A** (moléculas **7**, **18**, **20**, **23** e **25**), a cabeça catiônica parece desempenhar papel importante no agrupamento dessas moléculas. Este grupo de compostos apresenta 65% de similaridade com o subgrupo anterior. Com relação à hemólise, o *cluster* **B** é essencialmente compostos por moléculas cuja taxa hemolítica é moderada, sendo que a média é de 39% ± 22%.

O *cluster* **C** foi formado com 55% de similaridade e é composto por derivados *N*,*N*,*N*-trimetilamina, *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina e *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina, e apenas um derivado da *N*-metil-piperidina (molécula **8**). Os compostos **6**, **8**, **13**, **14**, **22**, **27**, **31** e **34** compartilham alto índice de similaridade (79%). As moléculas **1**, **2**, **24** e **33**, também apresentaram similaridade alta (78%), sendo que todas apresentam porção catiônica com *N*,*N*,*N*-trimetilamina. Miltefosina (**33**) e o composto **24** compartilham similaridade de 89%. Considerando o número de carbonos do sistema anelar, o composto 24 possui 17 átomos de carbono (11 átomos na cadeia alquílica, mais 6 átomos do anel, ao passo que a miltefosina tem 16). O mesmo índice de similaridade é compartilhado entre as moléculas **1** e **2** (89%). Esses dois compostos se diferenciam um do outro apenas pela presença de uma insaturação adjacente ao anel (composto **2**). Com relação à hemólise, o

*cluster* **C** agrupa moléculas de alto potencial hemolítico (hemólise média 41% ± 36%), especialmente as amostras **27**, **31**, **33** e **34**. O alto desvio padrão desse grupo em relação aos **A** e **B**, denota a presença de compostos com alta taxa de hemólise. A diferença entre esse grupo de compostos e outros altamente hemolíticos encontrados no *cluster* **B**, é a presença de substituintes volumosos na cadeia alquílica do *cluster* **B** (**26**, **28**, **29** e **30**), em vez de uma cadeia linear (**33** e **34**) ou com anéis de 6 membros (**27** e **31**).

Em relação à taxa de hemólise, pode-se considerar que compostos altamente hemolíticos (hemólise > 60%) estão essencialmente distribuídos nos grupos principais **B** e **C**, sendo que diferentes características estruturais são observadas (tabela 3). No *cluster* **B**, compostos altamente hemolíticos possuem anéis adamantila ou ciclopentadecila numa cadeia alquílica com 11 carbonos, com exceção das moléculas **26**, **29** e **30**. Levando em consideração a porção catiônica das moléculas, os compostos em **B** são derivados da *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina (**26** e **28**), *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina (**30**) e *N*-metil-piperina (**29**). Os compostos que apresentam maior hemólise no *cluster* **C** também possuem, pelo menos, 11 carbonos na cadeia alquílica (**27**, **31**, **33** e **34**), sem nenhum anel (**33** e **34**) ou com pequenos anéis de seis membros (**27** e **31**) ao final da cadeia alquílica. As moléculas anteriormente mencionadas apresentam grupo catiônico composto por *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina (**31**), *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina (**27** e **34**) *N*,*N*,*N*-trimetilamina (**33**). Além disso, a presença de uma insaturação no carbono próximo ao anel (**26**, **27**, **28**, **29**, **30** e **31**) parece ser importante para o potencial hemolítico.

Em adição ao que foi mencionado na seção anterior, quando cadeias alquílicas com 11 carbonos com anéis volumosos ou de 6 membros estão associados à porção catiônica *N*,*N*,*N*-trimetilamina, o potencial hemolítico é reduzido (**9**, **11**, **14**, **21**, **24**). Neste sentido, para que a molécula se torne altamente hemolítica, parece ser necessário que uma cadeia linear saturada esteja combinada com essa porção catiônica (**33**), ou que moléculas com 11 carbonos na cadeia alquílica e anel tenham grupos catiônicos grandes (*trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina, *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina ou *N*-metil-piperina). As porções *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina e *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina parecem ser necessárias para elevar o potencial hemolítico de moléculas com 11 carbonos na cadeia alquílica, uma vez que os compostos **7**, **8**, **9**, **10**, **19**, **23** e **24** são considerados moderadamente hemolíticos e possuem a *N*-metil-piperidina, *N*-metil-morfolina ou *N*,*N*,*N*-trimetilamina como cabeças catiônicas. A exceção é o composto **17** e, nesse caso, a porção *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina parece exercer efeito negativo sobre a hemólise (de maneira contrária à observada no composto **28**). É importante também ressaltar que os derivados da *N*-

metilmorfolina possuem hemólise < 60%, indicando que essa substituição reduz o dano aos eritrócitos.

Um novo padrão é observado nas moléculas **26**, **29** e **30**. Esses compostos foram agrupados no *cluster* **B** com outras moléculas de cadeia alquílica curta, com cabeça catiônica composta por um anel e anel ciclopentacila na cauda apolar (**18** e **25**), ao invés da porção *N*,*N*,*N*-trimetilamina e anel ciclodecila na porção hidrofóbica (**1**, **2**, **6** e **22** – *cluster* **C**). Para essas estruturas com cadeia alquílica curta (5 átomos de carbono), parece ser importante a presença de um grupo catiônico mais volumoso que a *N*,*N*,*N*-trimetilamina (observe que o composto **22** é apenas moderadamente hemolítico). O anel ciclopentadecila, em combinação com grupos catiônicos volumosos, também parece criar compostos mais hemolíticos, uma vez que as moléculas **1** e **2** (que não possuem grupo catiônico volumoso) são pouco hemolíticas. Como mencionado anteriormente, a porção *N*-metil-morfolina tem um efeito negativo na taxa hemolítica, e o composto **25** (que possui semelhança estrutural com o **29**), tem taxa de hemólise de aproximadamente 45%.

Os métodos de reconhecimento de padrão aplicados nesse trabalho permitiram a identificação de características estruturais relacionadas com o potencial hemolítico do conjunto investigado, uma vez que propriedades biológicas estão diretamente relacionadas com a estrutura química (tabela 3). Através dos dados obtidos, pode-se postular que compostos altamente hemolíticos devem apresentar grupos catiônicos volumosos. Para as moléculas com cadeia alquílica de 11 carbonos, grupos macrocíclicos (ciclodecila ou ciclopentadecila) reduzem a hemólise. Em contrapartida, os grupos adamantila e ciclohexila menos volumosos parecem ser responsáveis por aumentar o potencial hemolítico, como observado nos compostos **27**, **28** e **31**. O composto **32**, que não foi agrupado em nenhum *cluster*, combina uma cadeia alquílica de 11 carbonos, um anel adamantila e grupo catiônico composto por *N*,*N*-dimetil-tropano, o que resulta em 82% de hemólise. Além disso, para compostos com 5 carbonos na cadeia alquílica, o anel volumoso ciclopentacecila parece ser importante para elevar a taxa de hemólise (como observado em **26**, **29** e **30**). Outro aspecto importante é a presenta de uma insaturação adjacente ao anel no final da cadeia carbônica. Considerando os compostos com cadeia alquílica linear sem nenhuma ramificação ou substituição, grupos catiônicos menos volumosos parecem favorecer a hemólise (**33** e **34**). Isso é observado no composto **13**, um análogo menos hemolítico que **34**, que possui porção *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina (mais volumosa que *trans*-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina).

## 5. CONCLUSÃO

Considerando os resultados mencionados, este estudo forneceu informações importantes sobre quais características estruturais das APCs influenciam a hemólise e, de maneira geral, a interação com membranas biológicas. O fato de grupos catiônicos volumosos produzirem compostos altamente hemolíticos é fundamental no planejamento de derivados menos tóxicos. Nesse sentido, compostos menos hemolíticos devem possuir porção catiônica pouco volumosa, como a *N*,*N*,*N*-trimetilamina, e anéis grandes ao final da cadeia alquílica (figura 5). Uma alternativa seria o planejamento de compostos de cadeia alquílica curta possuindo grupos catiônicos pequenos e porções macrocíclicas na cadeia alquílica (tabela 3). Em ambos os casos, a combinação de grupos catiônicos pequenos e substituintes volumosos parece ser necessária para reduzir a hemólise.

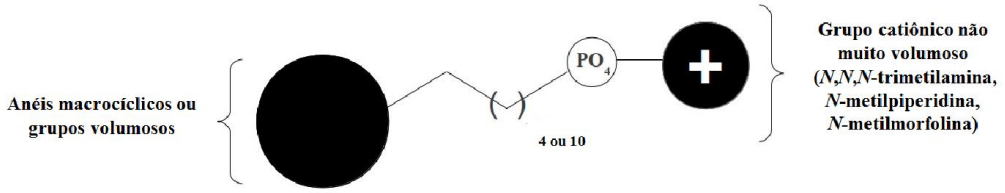



Figura 5 - Proposição de uma estrutura química genérica para derivados alquilfosfocolínicos menos hemolíticos.

Tabela 3 - Resumo das principais características estruturais e seus efeitos sobre o potencial hemolítico, aumentando (↑) ou diminuindo (↓) a hemólise. (—) indica que a substituição não se aplica a determinado grupo.

| | **Substituição ao final da cadeia alquílica** | | **Insaturação** | **Grupo catiônico** | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | **Anéis volumosos (ciclodecila ou ciclopentadecila)** | **Anéis menos volumosos (adamantila ou ciclohexila)** | **Instauração no carbono adjacente ao anel** | **Grupo catiônico volumoso (trans-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina, trans-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina, *N*,*N*-dimetil-tropano)** | ***N*,*N*,N-trimetilamina** | ***N*-metilpiperidina** | ***N*-metilmorfolina** |
| **Compostos com 11 carbonos na cadeia alquílica + anel** | ↓ Hemólise (**10**, **11**, **14**, **19**) | ↑ Hemólise (**27**, **28**, **31**, **32**) Exceção: **17** | ↑ Hemólise (**27**, **28**, **31**, **32**) | ↑ Hemólise (**27**, **28**, **31**, **32**) Exceção: **17** | ↓ Hemólise (**9**, **11**, **14**, **21**, **24**) | ↓ Hemólise (**7**, **9**, **19**) | ↓ Hemólise (**10**, **23**) |
| **Cadeia linear saturada** | — | — | — | ↓ Hemólise (**13** - trans-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclohexanamina) ↑ Hemólise (**34** - trans-*N*,*N*,*N*-trimetil-ciclopentanamina) | ↑ Hemólise (**33**) | Não observado | Não observado |
| **Compostos com 5 carbonos na cadeia alquílica + anel** | ↑ Hemólise (quando combinado grupos catiônicos volumosos (**26**, **30**) | Não observado | ↑ Hemólise (**26**, **29**, **30**) | ↑ Hemólise (quando combinado a anéis volumosos (**26**, **30**) | ↓ Hemólise (quando combinado a anéis volumosos) (**1**, **2**, **6**, **22**) | ↑ Hemólise (**29** – análogo insaturado de **16**) | ↓ Hemólise (**18**, **25**) |
| **Compostos com porção ciclo-alcoxila no meio da cadeia alquílica** | Compostos com baixo potencial hemolítico, independentemente das substituições. (**3**, **4**, **5**, **12**, **15**, **20**) | | | | | | |

## 6. REFERÊNCIAS


AGRESTA, M.; D'ARRIGO, P.; FASOLI, E.; LOSI, D.; PEDROCCHI-FANTONI, G.; RIVA, S.; SERVI, S.; TESSARO, D. Synthesis and antiproliferative activity of alkylphosphocholines. **Chem Phys Lipids,** v. 126, n. 2, p. 201-210, 2003.

ALLINGER, N.L. Conformational Analysis 130. MM2. A Hydrocarbon Force Field Utilizing V1 and V2 Torsional Terms. **J Am Chem Soc,** v. 99, n. 25, p. 8127-8137, 1977.

BALABAN, A. T. Distance Connectivity Index. **Chem Phys Lett,** v. 89, p. 399-404, 1982.

BODOR, N.; GABANYI, C.; WONG, C. A new method for the estimation of partition coefficient. **J Am Chem Soc,** v. 111, n. 11, p. 3783-3786, 1989.

BRENEMAN, C. M.; WIBERG, K. B.; Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potencials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. **J Comput Chem**. v. 11, n. 3, p. 361-379, 1990.

CALOGEROPOULOU, T.; ANGELOU, P.; DETSI, A.; FRAGIADAKI, I.; SCOULICA, E.; Design and synthesis of potent antileishmanial cycloalkylidene-substituted ether phospholipid derivatives. **J Med Chem,** v. 51, n. 4, p. 897-908, 2008.

CHEMAXON. **MarvinBeans**. Versão 5.4.1. Budapeste, Ldt. 1998-2011. CD-Rom.

CLIVE, S.; GARDINER, J.; LEONARD, R.C. Miltefosine as a topical treatment for cutaneous metastases in breast carcinoma. **Cancer Chemother Pharmacol**. v. 44, suppl. S29-S30, 1999.

DOHERTY, D. **MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software, User's Guide**; versão: 3.2; Chem21 Group: Lake Forest, IL, 2002.

ERTL, P.; ROHDE, B.; SELZER, P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **J Med Chem**, v. 43, n. 20, p. 3714-3717, 2000.

FERREIRA, M.M.C.; ANTUNES, A.M.; MELGO, M.S.; VOLPE, P.L.O. Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial. **Quim Nova,** v. 22, n.5, p. 724-731, 1999.

FOCK, V. Näaherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörper-problems. **Z phys**, v. 61, p. 126-148, 1930.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 03, Revision B.02**, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.

GAVEZZOTTI, A. The calculation of molecular volumes and the use of volume analysis in the investigation of structured media and of solid-state organic reactivity. **J Am Chem Soc** v. 105, n. 16, p. 5220-5225, 1983.

GEORGIEVA, M.C.; KONSTANTINOV, S.M.; TOPASHKA-ANCHEVA M.; BERGER, M.R. Combination effects of alkylphosphocholines and gemcitabine in malignant and normal hematopoietic cells. Cancer Lett. v. 182, n. 2, p. 163-174, 2002.

GHOSE, A. K.; PRITCHETT, A.; CRIPPEN, G. M. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships III: modeling hydrophobic interactions. **J Comput Chem,** v. 9, n. 1, p. 80-90, 1988.

GUTMAN, I. A formula for the Wiener number of trees and its extension to graphs containing cycles. **Graph Theory Notes,** v. 27, p. 9-15, 1994.

HALGREN, T.A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. **J Comp Chem,** v. 17, n. 5-6, p. 490-519, 1996.

HASEL, W.; HENDRICKSON, T. F.; STILL, W. C. A rapid approximation to the solvent accessible surface areas of atoms. **Tet Comput Meth**, v. 1, n. 2, p. 103-116, 1988.

HEERKLOTZ, H. Interactions of surfactants with lipid membranes. **Q Rev Biophys**. v. 41, n. 3-4, p.205-264, 2008.

HOPFINGER, A. J. **Conformational Properties of Macromolecules**. Academic Press, New York, 1973, p. 71.

HYPERCUBE INC. **Hyperchem Program Release 7.51 para Windows**, Gainesville, FL, 2003. (Conjunto de dados. Ambiente operacional).

INFOMETRIX, INC. Pirouette. **Multivariate Data Analysis: User's Guide**. Versão: 3.11. Woodinville, WA, 1985- 2003. CD-ROM.

ISOMAA, B.; HÄGERSTRAND, H.; PAATERO, G.; ENGBLOM, A.C. Permeability alterations and antihaemolysis induced by amphiphiles in human erythrocytes. **Biochim Biophys Acta,** v. 860, n. 3, p. 510-524, 1986.

ISRAELACHIVILI, J. N. **Aggregation of Amphiphilic Molecules into Micelles, Bilayers, Vesicles, and Biological Membranes**. Academic Press: Londres, 2011, pp. 246-264.

JENDROSSEK, V.; HAMMERSEN, K.; ERDLENBRUCH, B.; KUGLER, W.; KRÜGENER, R.; EIBL, H.; LAKOMEK, M. Structure-activity relationships of alkylphosphocholine derivatives: antineoplastic action on brain tumor cell lines in vitro. **Cancer Chemother Pharmacol.** v. 50, n. 1, p. 71-79, 2002.

LAUGHLIN, R. G. **The aqueous behaviour of surfactants**. Academic Press: Londres, 1996.

MAHALANOBIS, P. C. On tests and measures of group divergence. **J Asiat Soc Bengal**, v. 26, p. 541-588.

MAYO, S. L.; OLAFSON, B. D.; GODDARD, W. A. DREIDING: a generic force field for molecular simulations. **J Phys Chem,** v. 94, n. 26, p. 8897-8909, 1990.

MILLER, K.J.; SAVCHIK, J. A new empirical method to calculate average molecular polarizabilities. **J Am Chem Soc,** v. 101, n. 24, p. 7206-7213, 1979.

PAPAZAFIRI, P.; AVLONITIS, N.; ANGELOU, P.; CALOGEROPOULOU, T.; KOUFAKI, M.; SCOULICA, E.; FRAGIADAKI, I. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. **Cancer Chemother Pharmacol,** v. 56, n. 3, p. 261-270, 2005.

PASCHER, I.; SUNDELL, S; EIBL, H.; HARLOS, K. The single crystal structure of octadecyl-2-methyl-glycero-phosphocholine monohydrate. A multilamellar structure with interdigitating head groups and hydrocarbon chains. **Chem Phys Lipids,** v. 39, n. 1-2, p. 53-64, 1986.

PETERSSON, G. A.; AL-LAHAM, M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms.. **J Chem Phys***,* v. 94, n. 9, p. 6081-6091, 1990.

PETERSSON, G. A.; BENNETT, T. G.; TENSFELDT, M. A.; AL-LAHAM, W. A.; SHIRLEY, J. M.; MANTZARIS, J. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. **J Chem Phys**, v. 89, n.

4, p. 2193-2219, 1988.

PLATT, J. R. Prediction of Isomeric Differences in Paraffin Properties. **J Phys Chem,** v. 56, n. 3, p. 328-336, 1952.

PLAVŠIĆ, D.; NIKOLIĆ, S.; TRINAJSTIĆ, N.; MIHALIĆ, Z. On the Harary Index for the Characterization of Chemical Graphs. **J Math Chem,** v. 12, p. 235-250, 1993.

PRETÉ, P. S.; GOMES, K.; MALHEIROS, S. V.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series. **Biophys Chem.** v. 97, n. 1, p. 45-54, 2002.

RANDIC, M. Characterization of Molecular Branching. **J Am Chem Soc,** v. 97, p. 6609-6615, 1975.

RANDIC, M. Novel molecular descriptor for structure—property studies. **Chem Phys Lett,** v. 211, n. 4-5, p. 478-483, 1993.

SÁNCHEZ, L., MARTÍNEZ, V.; INFANTE, M. R.; MITJANS, M.; VINARDELL, M. P. Hemolysis and antihemolysis induced by amino acid-based surfactants. **Toxicoll Lett.** v. 169, n. 2, p. 177-184, 2007.

SCHEIRER, S.; MALHEIROS, S. V. P.; PAULA, E. Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochim Biophys Acta,** v. 1508, n. 1-2, p. 210-234, 2000.

STEKAR, J.; HILGARD, P.; KLENNER, T. Opposite effect of miltefosine on the antineoplastic activity and haematological toxicity of cyclophosphamide. **Eur J Cancer,** v. 31A, n. 3, p. 372-374, 1995.

STEWART, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods II. Aplications. **J Compu Chem**, v. 10, p. 221-264, 1989.

TRATCH, S. S.; STANKECITCH, M. I.; ZEFIROV, N. S. Combinatorial models and algorithms in chemistry. The expanded Wiener number – a novel topological index. **J Comp Chem,** v. 11, n. 8, p. 899-908, 1990.

UNGER, C.; SINDERMANN, H.; PEUKERT, M.; HILGARD, P.; ENGEL, J.; EIBL, H. Hexadecylphosphocholine in the topical treatment of skin metastases in breast cancer patients.

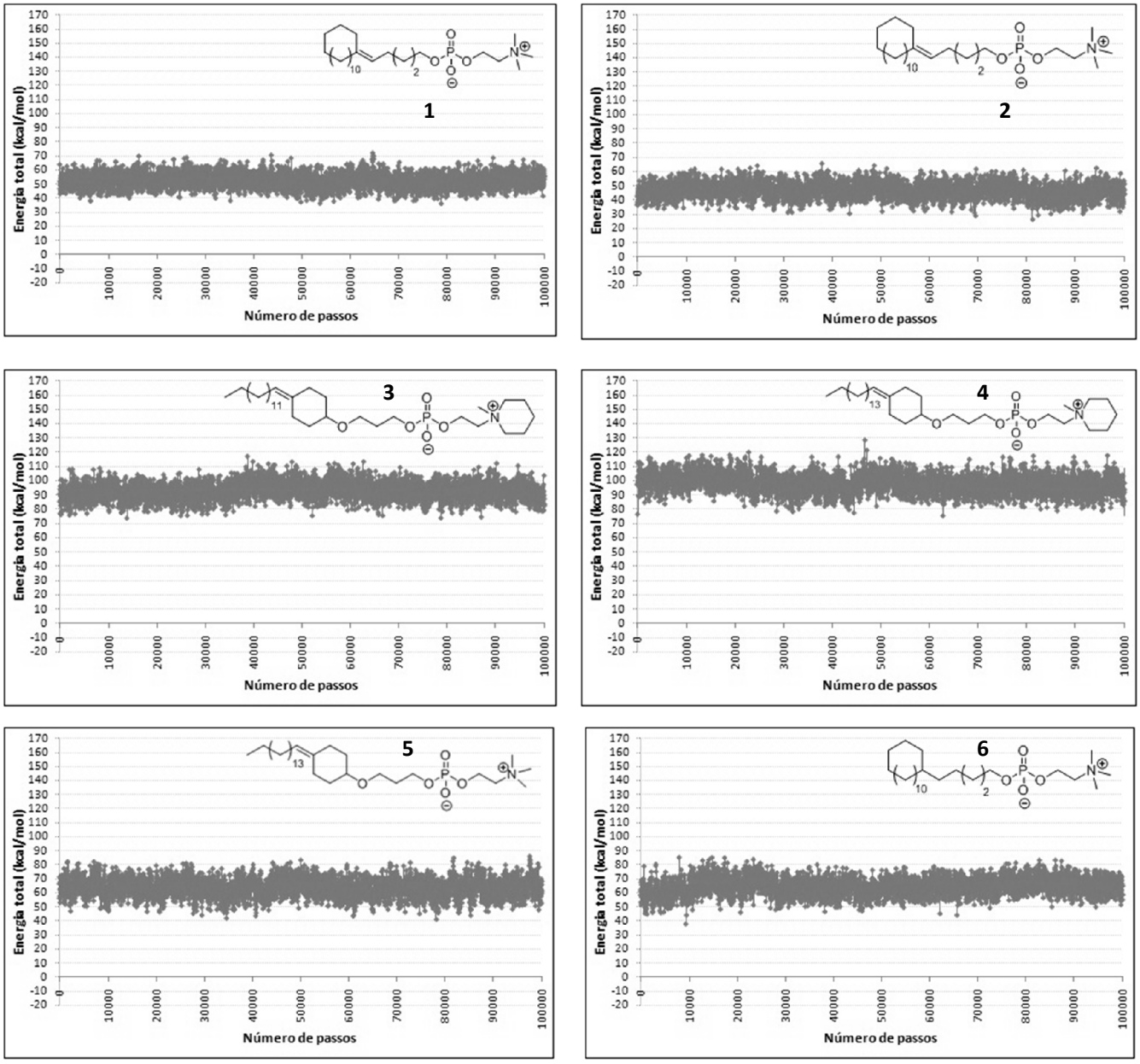
Prog Exp Tumor Res. v. 34, p. 153-159, 1992.

VISWANADHAN, V.N.; GHOSE, A.K.; REVANKAR, G.R.; ROBINS, R.K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. **J Chem Inf Comput Sci,** v. 29, n. 3, p. 163-172, 1989.

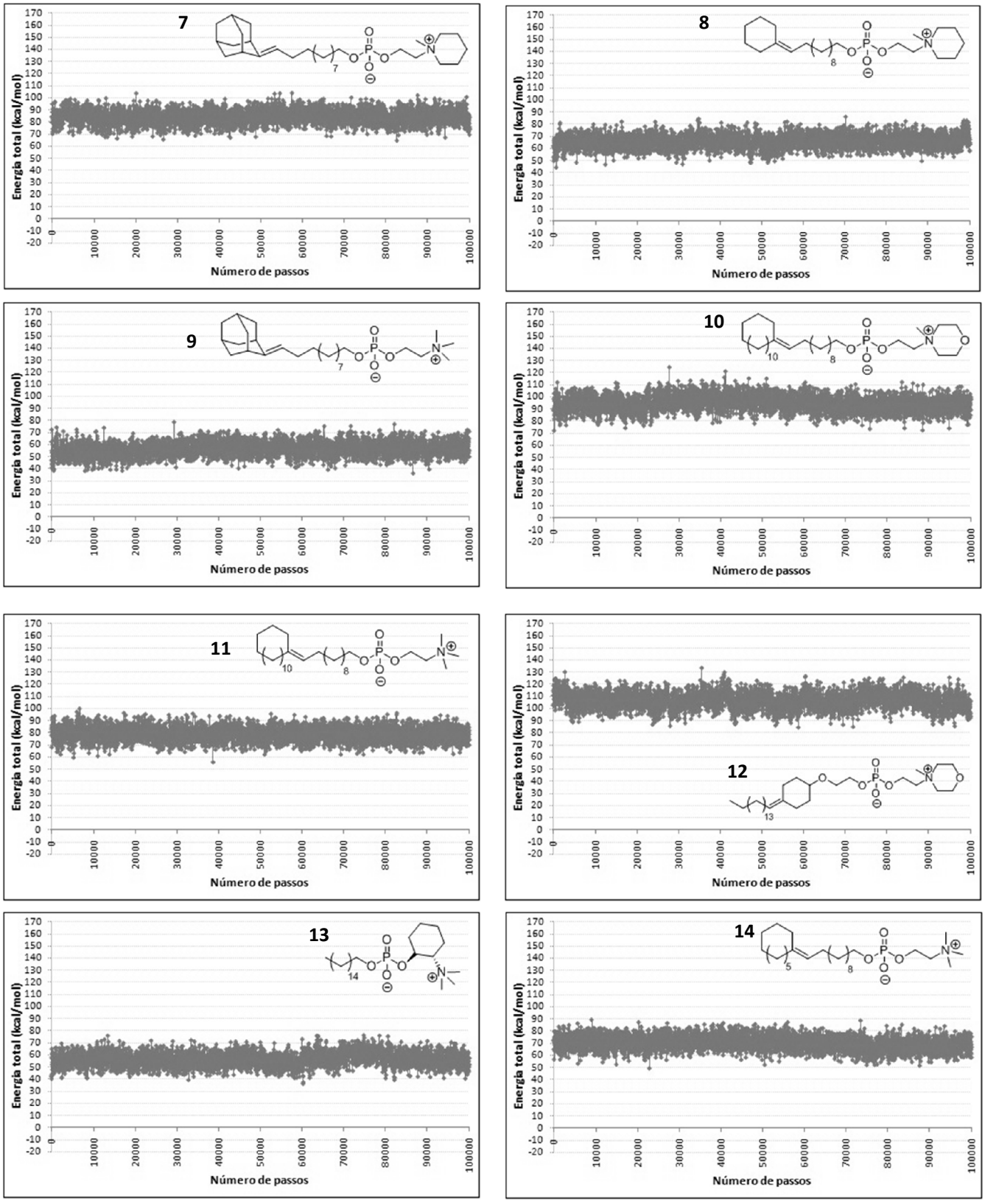
WIENER, H. Structural Determination of Paraffin Boiling Points. **J Am Chem Soc***,* v. 69, n. 1, p. 17-20, 1947.

## 7. ANEXOS

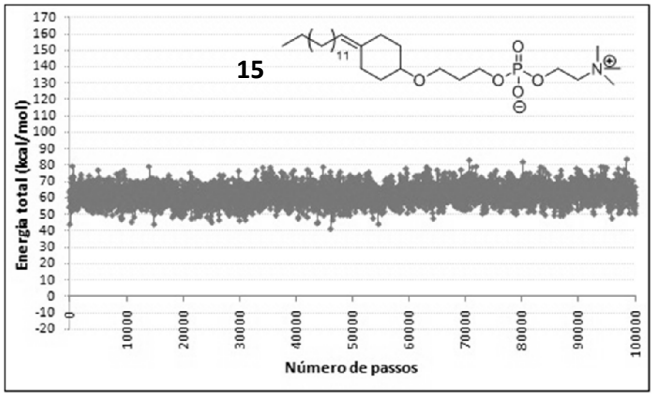
**Anexo 7A.** Gráficos de energia (kcal/mol) *versus* número de passos de uma região do PAC (100 ps de 1 ns) de cada ligante, onde o confôrmero de energia mais baixa foi selecionado. As contribuições de energia de solvatação e de ligação H não estão consideradas no valor de energia.

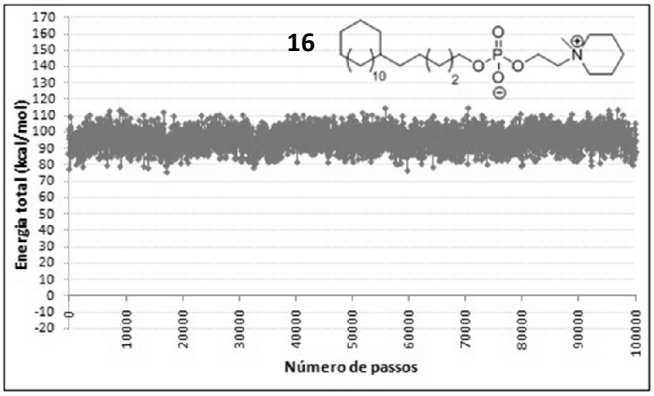


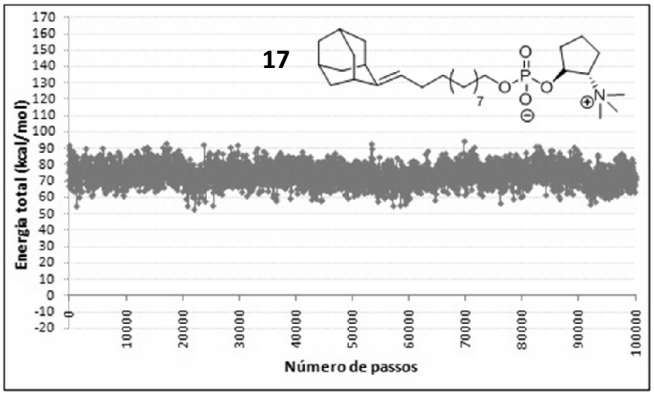
Anexo 7A. (cont.)

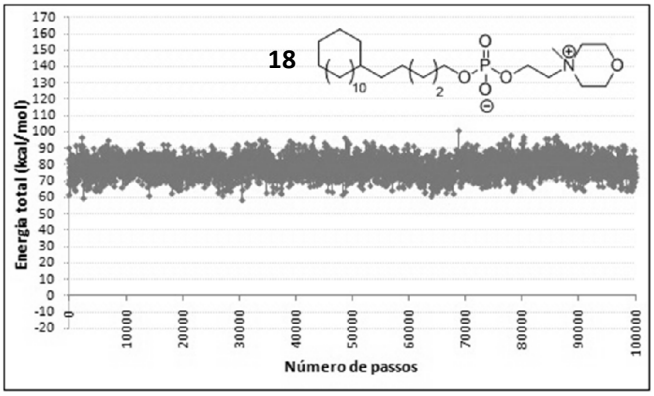


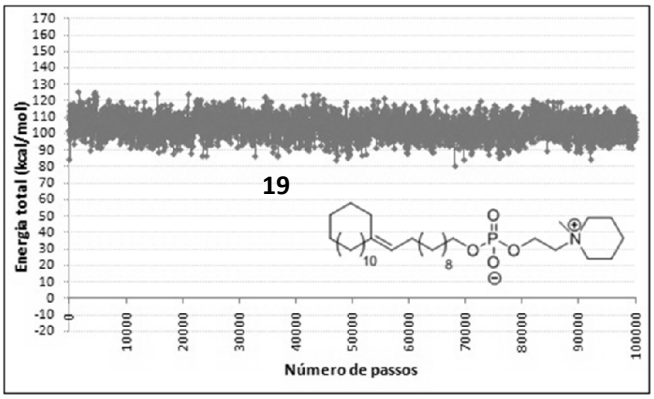
Anexo 7A. (cont)

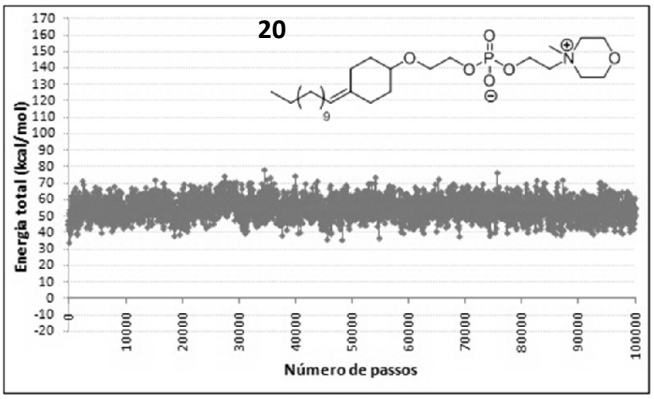


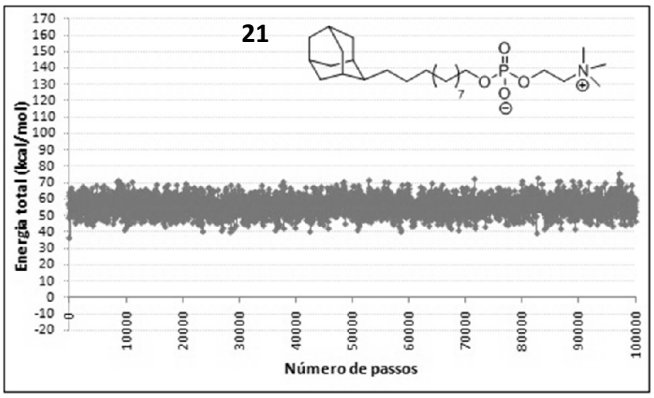



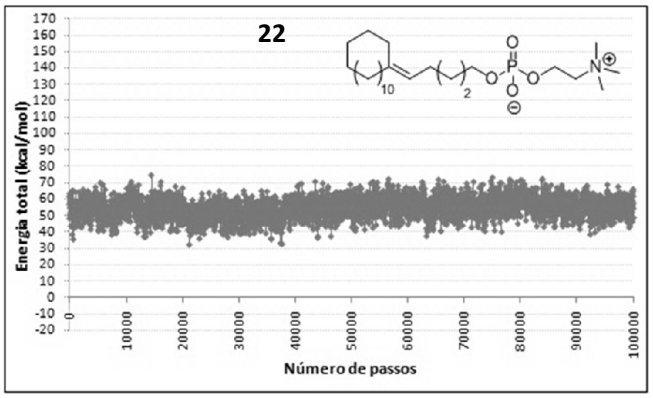



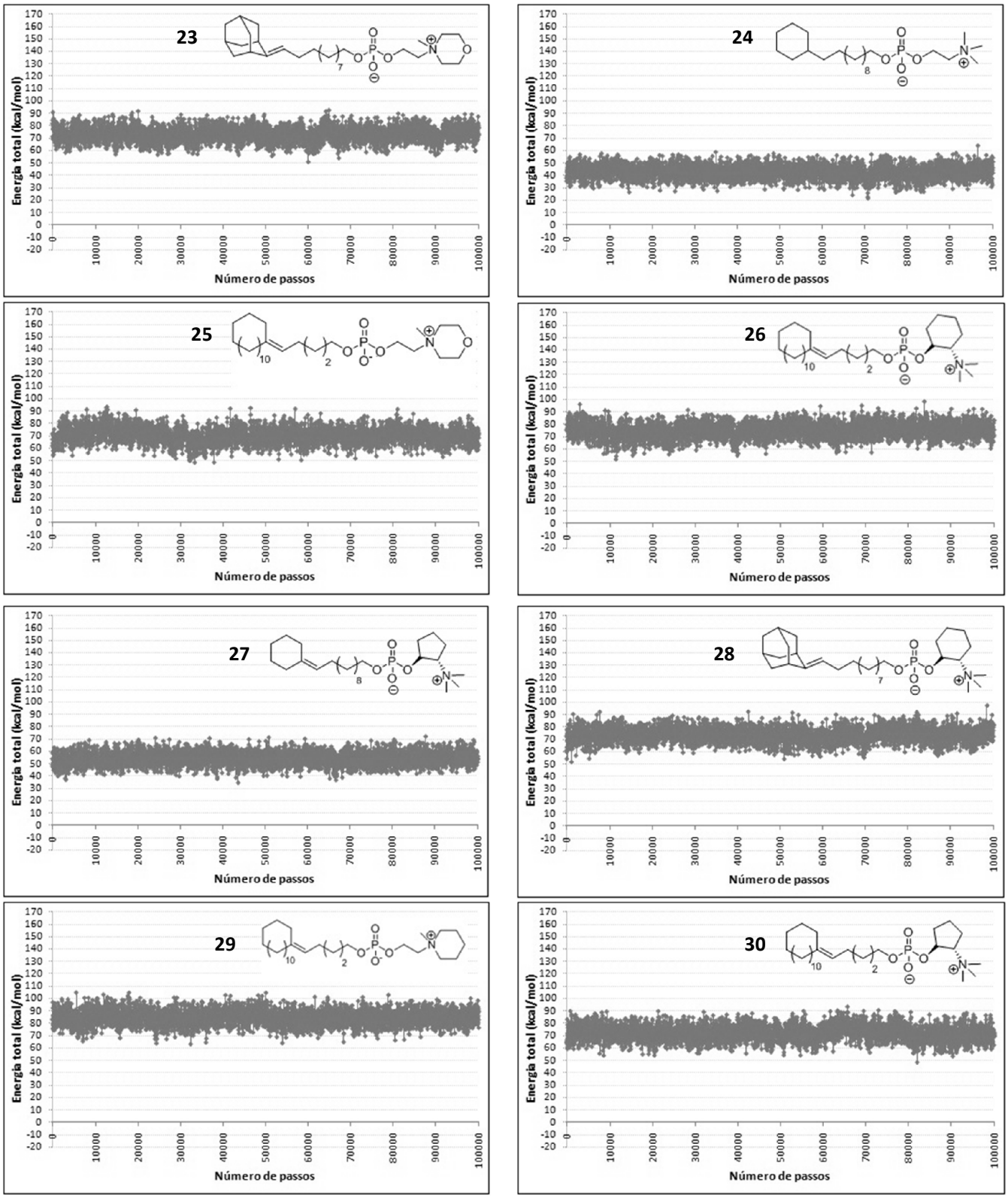



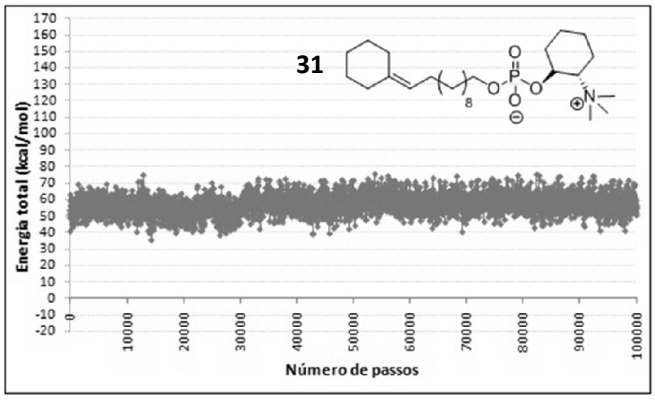



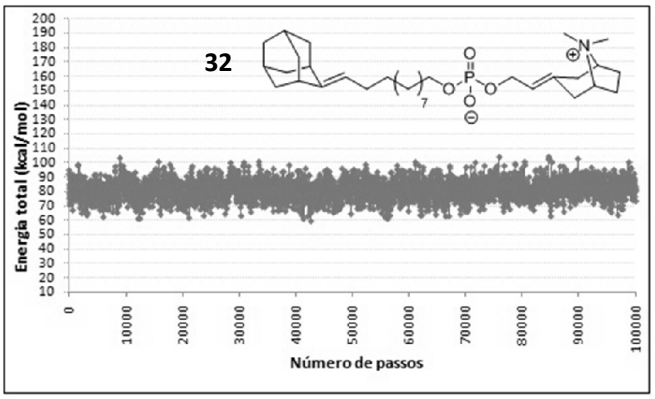



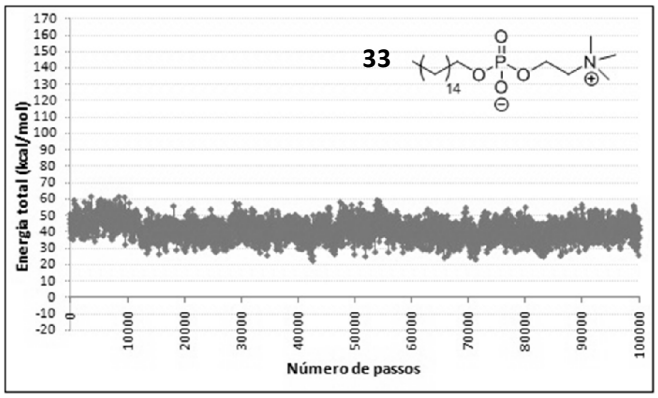
Anexo 7A. (cont)

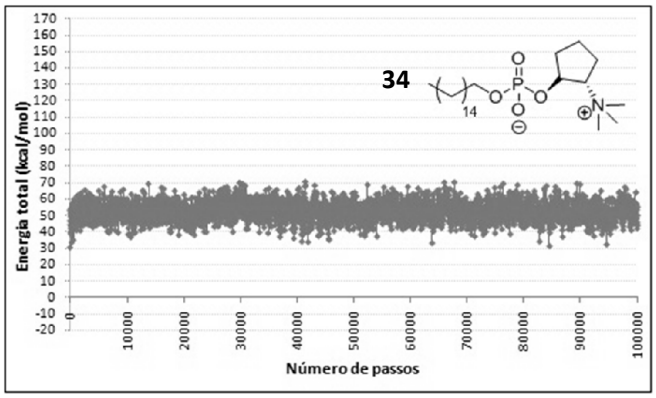


Anexo 7A (cont.)



**Anexo 7B.** Tabelas dos descritores calculados para o conjunto investigado

Tabela I - Descritores calculados com o programa Gaussian 03W (FRISCH et al., 2004).

| Compostos | ChelpGN | ChelpGP | $E_{HOMO}$ (kcal/mol) | $E_{LUMO}$ (kcal/mol) | $\mu_x$ (Db) | $\mu_y$ (Db) | $\mu_z$ (Db) | $\mu_{tot}$ (Db) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0,13 | 1,41 | -236,98 | 93,56 | 13,80 | -5,23 | -8,26 | 16,91 |
| **2** | 0,27 | 1,48 | -200,89 | 102,20 | 2,35 | -12,15 | -3,64 | 12,90 |
| **3** | -0,10 | 1,51 | -209,03 | 104,99 | -1,40 | 13,21 | 6,46 | 14,77 |
| **4** | 0,19 | 1,42 | -211,18 | 90,78 | -10,63 | 13,08 | 4,43 | 17,43 |
| **5** | 0,16 | 1,50 | -213,54 | 96,96 | -8,59 | -7,08 | 7,76 | 13,57 |
| **6** | 0,29 | 1,48 | -239,50 | 98,21 | -12,52 | 7,05 | 2,81 | 14,64 |
| **7** | 0,42 | 1,50 | -213,26 | 99,63 | -7,34 | 1,70 | 13,15 | 15,16 |
| **8** | 0,38 | 1,51 | -210,64 | 101,97 | 7,55 | -5,81 | 7,64 | 12,21 |
| **9** | 0,29 | 1,37 | -205,65 | 92,14 | -9,74 | 13,42 | -0,86 | 16,60 |
| **10** | 0,59 | 1,40 | -214,23 | 91,52 | -15,81 | 5,00 | -3,06 | 16,87 |
| **11** | 0,23 | 1,53 | -209,68 | 100,49 | -8,23 | -5,25 | 11,32 | 14,95 |
| **12** | 0,35 | 1,41 | -204,88 | 101,54 | 1,68 | 10,95 | 6,71 | 12,95 |
| **13** | 0,06 | 1,46 | -239,20 | 109,52 | -0,76 | -11,77 | -6,32 | 13,39 |
| **14** | 0,29 | 1,38 | -210,98 | 88,82 | 8,77 | 8,47 | 11,35 | 16,66 |
| **15** | 0,13 | 1,55 | -213,11 | 101,52 | 7,04 | 11,78 | 6,21 | 15,07 |
| **16** | 0,48 | 1,34 | -233,67 | 105,11 | 15,34 | 6,27 | 3,94 | 17,03 |
| **17** | 0,16 | 1,50 | -196,98 | 100,67 | -2,12 | -6,46 | 11,33 | 13,21 |
| **18** | 0,36 | 1,36 | -232,16 | 95,02 | 9,96 | -9,96 | 8,25 | 16,33 |
| **19** | 0,40 | 1,32 | -219,45 | 93,43 | 15,61 | 7,57 | -0,86 | 17,37 |
| **20** | 0,40 | 1,36 | -209,90 | 93,61 | 2,54 | 11,01 | 8,34 | 14,04 |
| **21** | 0,24 | 1,49 | -217,29 | 93,65 | 14,31 | 2,59 | -2,40 | 14,74 |
| **22** | 0,36 | 1,49 | -199,20 | 109,35 | -8,71 | -9,10 | 1,33 | 12,67 |
| **23** | 0,46 | 1,46 | -209,25 | 101,67 | -4,89 | 3,56 | 10,40 | 12,03 |
| **24** | 0,40 | 1,40 | -238,49 | 89,32 | 15,66 | 8,01 | -4,11 | 18,06 |
| **25** | 0,36 | 1,48 | -200,97 | 106,44 | -8,68 | -8,00 | -2,62 | 12,09 |
| **26** | 0,07 | 1,43 | -198,24 | 111,51 | 7,00 | -7,38 | 6,82 | 12,25 |
| **27** | 0,27 | 1,47 | -214,80 | 98,48 | -15,11 | 1,40 | 6,28 | 16,42 |
| **28** | 0,10 | 1,43 | -211,99 | 100,09 | 12,38 | 3,48 | 2,82 | 13,17 |
| **29** | -0,06 | 1,40 | -207,17 | 94,16 | -10,95 | 13,07 | -0,65 | 17,06 |
| **30** | -0,05 | 1,40 | -197,31 | 109,65 | 0,67 | -10,85 | -0,53 | 10,88 |
| **31** | 0,29 | 1,48 | -219,38 | 98,38 | 15,74 | 2,86 | 1,60 | 16,08 |
| **32** | 0,41 | 1,40 | -180,50 | 87,31 | -21,86 | 6,27 | 8,32 | 24,22 |
| **33** | 0,29 | 1,47 | -240,72 | 98,93 | 0,26 | 11,70 | -5,83 | 13,07 |
| **34** | 0,22 | 1,45 | -233,00 | 106,35 | -7,83 | 10,58 | 4,67 | 13,96 |

Tabela II - Descritores calculados com o programa MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 2002)

| Compostos | $E_{est}$ (kcal/mol) | $E_{ang}$ (kcal/mol) | $E_{tors}$ (kcal/mol) | $E_{1-4}$ (kcal/mol) | $E_{vdW}$ (kcal/mol) | $E_{el}$ (kcal/mol) | $E_{Hb}$ (kcal/mol) | $E_{solv}$ (kcal/mol) | $E_{tot}$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 27,93 | 32,87 | 16,71 | -66,79 | -3,84 | 25,91 | 0,00 | 1,72 | 34,51 |
| **2** | 16,09 | 36,79 | 17,13 | -72,54 | -4,37 | 24,93 | 0,00 | 2,13 | 20,16 |
| **3** | 39,64 | 42,38 | 18,98 | -35,09 | -9,71 | 8,11 | 0,00 | -13,60 | 50,71 |
| **4** | 39,08 | 51,58 | 16,50 | -36,13 | -11,33 | 8,20 | 0,00 | -13,90 | 54,00 |
| **5** | 29,71 | 47,96 | 12,17 | -48,94 | -11,61 | 7,65 | 0,00 | 2,90 | 39,84 |
| **6** | 25,31 | 41,49 | 16,76 | -63,53 | -6,11 | 26,25 | 0,00 | 2,25 | 42,42 |
| **7** | 35,78 | 36,82 | 22,09 | -40,12 | -8,73 | 16,52 | 0,00 | -15,06 | 47,30 |
| **8** | 31,16 | 33,32 | 14,75 | -49,49 | -5,49 | 15,22 | 0,00 | -17,58 | 21,89 |
| **9** | 29,23 | 35,91 | 17,05 | -63,76 | -11,88 | 23,25 | 0,00 | 1,26 | 31,06 |
| **10** | 35,28 | 53,24 | 16,62 | -54,90 | -5,39 | 25,16 | 0,00 | -23,51 | 46,50 |
| **11** | 37,31 | 47,28 | 19,81 | -62,31 | -12,69 | 23,11 | 0,00 | 2,70 | 55,21 |
| **12** | 39,38 | 52,05 | 20,36 | -19,65 | -10,71 | -7,66 | 0,00 | -11,33 | 62,44 |
| **13** | 24,31 | 41,69 | 10,82 | -74,46 | -4,17 | 35,17 | 0,00 | 4,38 | 37,74 |
| **14** | 26,79 | 45,61 | 17,27 | -62,79 | -5,93 | 23,50 | 0,00 | 2,43 | 46,88 |
| **15** | 31,73 | 39,43 | 13,54 | -52,44 | -11,60 | 16,33 | 0,00 | 3,58 | 40,57 |
| **16** | 25,65 | 51,43 | 21,23 | -47,09 | -5,02 | 20,94 | 0,00 | -17,76 | 49,38 |
| **17** | 36,22 | 40,50 | 23,47 | -70,01 | -13,80 | 30,36 | 0,00 | 2,34 | 49,08 |

Tabela II (cont.)

| Compostos | $E_{est}$ (kcal/mol) | $E_{ang}$ (kcal/mol) | $E_{tors}$ (kcal/mol) | $E_{1-4}$ (kcal/mol) | $E_{vdW}$ (kcal/mol) | $E_{el}$ (kcal/mol) | $E_{Hb}$ (kcal/mol) | $E_{solv}$ (kcal/mol) | $E_{tot}$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **18** | 33,13 | 56,18 | 15,99 | -60,28 | -7,53 | 15,92 | 0,00 | -25,11 | 28,30 |
| **19** | 37,62 | 56,89 | 16,95 | -43,65 | -8,63 | 18,62 | 0,00 | -15,92 | 61,88 |
| **20** | 28,86 | 43,21 | 13,77 | -78,43 | -6,49 | 27,35 | 0,00 | -22,92 | 5,35 |
| **21** | 24,75 | 34,39 | 18,19 | -60,03 | -8,00 | 24,40 | 0,00 | 2,44 | 36,14 |
| **22** | 28,63 | 38,61 | 15,98 | -64,70 | -6,44 | 16,85 | 0,00 | 1,94 | 30,87 |
| **23** | 29,68 | 36,93 | 22,17 | -55,68 | -8,37 | 23,68 | 0,00 | -24,55 | 23,86 |
| **24** | 24,62 | 29,31 | 10,83 | -68,35 | -5,49 | 30,99 | 0,00 | 3,42 | 25,33 |
| **25** | 26,65 | 44,61 | 19,97 | -64,01 | -4,68 | 21,37 | 0,00 | -25,52 | 18,39 |
| **26** | 33,49 | 46,99 | 17,85 | -74,87 | -5,65 | 30,77 | 0,00 | 1,72 | 50,30 |
| **27** | 27,02 | 38,70 | 15,43 | -77,00 | -6,76 | 35,40 | 0,00 | 2,71 | 35,50 |
| **28** | 27,87 | 43,42 | 22,20 | -67,91 | -9,30 | 32,80 | 0,00 | 1,72 | 50,80 |
| **29** | 26,00 | 48,35 | 18,89 | -47,06 | -9,54 | 19,87 | 0,00 | -20,66 | 35,85 |
| **30** | 29,04 | 42,90 | 22,23 | -70,66 | -5,82 | 28,92 | 0,00 | 2,49 | 49,10 |
| **31** | 30,84 | 39,42 | 11,90 | -76,33 | -7,73 | 33,56 | 0,00 | 2,07 | 33,73 |
| **32** | 29,11 | 40,92 | 26,24 | -71,68 | -6,16 | 38,26 | 0,00 | -13,88 | 42,81 |
| **33** | 23,10 | 35,58 | 10,43 | -60,79 | -4,38 | 11,16 | 0,00 | 4,07 | 19,17 |
| **34** | 19,91 | 37,11 | 13,57 | -77,29 | -2,97 | 40,36 | 0,00 | 5,07 | 35,76 |

Tabela III - Descritores calculados com o programa HyperChem 7.51 (HYPERCUBE, INC., 2003)

| Compostos | SAaprox (Å²) | SAgrid (Å²) | $V_{sol}$ (Å³) | V_vdW (Å³) | $V_{NPsol}$ (Å³) | $V_{NPvdw}$ (Å³) | $V_{Psol}$ (Å³) | $V_{Pvdw}$ (Å³) | $\theta_{N2}$ (graus) | $\theta_{O4}$ (graus) | $\theta_{P1}$ (graus) | Dist_P1 (Å) | $C_{num}$ | ClogP | MR (Å³) | Massa (u.m.a) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 698,58 | 645,33 | 1209,46 | 425,93 | 826,73 | 306,33 | 1422,84 | 486,96 | -69,17 | 93,20 | -170,00 | 4,63 | 16 | 4,51 | 105,94 | 391,53 |
| **2** | 660,89 | 642,53 | 1180,42 | 398,42 | 700,46 | 299,94 | 1452,01 | 484,62 | 54,93 | 3,74 | -121,47 | 4,26 | 15 | 4,08 | 106,79 | 389,52 |
| **3** | 941,45 | 863,21 | 1678,40 | 501,03 | 1296,28 | 450,76 | 1751,25 | 561,35 | 154,61 | -155,44 | 86,62 | 4,90 | 21 | 6,70 | 152,72 | 543,77 |
| **4** | 951,22 | 875,40 | 1748,63 | 483,02 | 1192,44 | 449,23 | 1687,56 | 353,57 | -62,61 | 99,49 | -82,42 | 4,38 | 20 | 7,50 | 161,92 | 571,82 |
| **5** | 933,07 | 796,45 | 1601,93 | 523,82 | 1132,55 | 419,60 | 1517,92 | 370,00 | -69,00 | -77,25 | 111,14 | 4,42 | 20 | 6,38 | 145,18 | 517,53 |
| **6** | 828,46 | 763,57 | 1445,77 | 515,18 | 1067,23 | 391,57 | 1042,28 | 574,46 | 70,92 | 71,73 | -156,85 | 4,49 | 20 | 6,49 | 128,95 | 461,67 |
| **7** | 718,69 | 772,03 | 1494,21 | 586,88 | 1157,06 | 433,38 | 1980,40 | 568,38 | -84,76 | 96,23 | -164,40 | 4,57 | 26 | 5,90 | 142,73 | 509,71 |
| **8** | 778,76 | 772,71 | 1431,81 | 626,04 | 1010,77 | 363,11 | 1442,23 | 496,92 | 62,27 | -136,75 | 167,74 | 4,45 | 26 | 5,59 | 128,14 | 457,63 |
| **9** | 677,52 | 687,24 | 1357,40 | 616,68 | 876,65 | 380,02 | 1608,91 | 581,87 | -44,31 | -178,10 | 136,97 | 4,56 | 26 | 5,18 | 130,58 | 469,64 |
| **10** | 895,62 | 863,33 | 1729,91 | 524,09 | 1332,86 | 528,28 | 1603,22 | 586,18 | 83,60 | 152,18 | -96,80 | 4,80 | 20 | 8,09 | 166,48 | 585,85 |
| **11** | 952,31 | 867,07 | 1705,61 | 540,79 | 1325,44 | 488,41 | 1493,54 | 678,90 | -80,16 | 35,82 | 78,13 | 4,52 | 20 | 8,43 | 157,40 | 543,81 |
| **12** | 978,47 | 885,72 | 1755,44 | 473,11 | 1237,98 | 444,14 | 1158,33 | 379,32 | -69,05 | 136,04 | 168,34 | 4,70 | 17 | 6,38 | 159,00 | 573,79 |
| **13** | 917,74 | 835,22 | 1507,94 | 489,52 | 1227,56 | 399,22 | 1457,91 | 508,92 | 59,75 | -54,91 | 166,06 | 4,38 | 17 | 6,74 | 128,48 | 461,67 |
| **14** | 822,98 | 745,84 | 1455,84 | 518,06 | 1079,78 | 403,87 | 1027,37 | 588,88 | 74,12 | 29,37 | -167,37 | 4,65 | 21 | 6,45 | 134,40 | 473,68 |
| **15** | 948,45 | 854,60 | 1596,63 | 534,65 | 1140,55 | 402,50 | 1564,99 | 568,65 | 79,34 | -75,79 | 140,10 | 4,50 | 21 | 5,98 | 140,58 | 503,70 |
| **16** | 830,22 | 818,25 | 1556,02 | 534,65 | 1098,01 | 435,08 | 1170,86 | 552,15 | 51,25 | -101,48 | 73,61 | 4,52 | 21 | 7,22 | 141,09 | 501,73 |
| **17** | 717,35 | 749,97 | 1480,18 | 534,63 | 1154,39 | 423,02 | 1407,85 | 510,77 | -69,58 | 173,55 | 161,87 | 4,64 | 16 | 6,04 | 142,07 | 509,71 |
| **18** | 836,47 | 799,76 | 1537,67 | 472,65 | 1033,97 | 416,75 | 1435,32 | 563,15 | 66,90 | 81,95 | -162,53 | 4,64 | 16 | 6,15 | 138,02 | 503,70 |

Tabela III (cont,)

| Compostos | SAaprox (Å²) | SAgrid (Å²) | $V_{sol}$ (Å³) | V_vdW (Å³) | $V_{NPsol}$ (Å³) | $V_{NPvdw}$ (Å³) | $V_{Psol}$ (Å³) | $V_{Pvdw}$ (Å³) | $\theta_{N2}$ (graus) | $\theta_{O4}$ (graus) | $\theta_{P1}$ (graus) | $D_{P1}$ (Å) | $C_{num}$ | ClogP | RM (Å³) | Massa (u,m,a) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **19** | 921,92 | 874,84 | 1776,36 | 488,60 | 1445,15 | 532,31 | 1476,41 | 565,03 | -44,51 | 169,32 | -174,94 | 4,47 | 15 | 9,16 | 169,54 | 583,88 |
| **20** | 888,04 | 814,50 | 1560,81 | 403,73 | 1175,95 | 412,98 | 1673,31 | 535,93 | -70,55 | -169,73 | -145,82 | 4,49 | 20 | 4,85 | 140,45 | 517,69 |
| **21** | 779,46 | 760,34 | 1434,47 | 488,93 | 1052,30 | 380,63 | 1465,63 | 584,84 | 62,71 | -179,00 | 168,83 | 4,75 | 20 | 5,18 | 130,58 | 469,64 |
| **22** | 796,65 | 714,14 | 1400,59 | 529,11 | 940,32 | 385,03 | 1604,50 | 573,05 | 54,08 | -122,71 | 178,48 | 4,30 | 20 | 6,06 | 129,80 | 459,65 |
| **23** | 746,77 | 765,45 | 1491,28 | 520,61 | 1127,12 | 420,79 | 1415,90 | 520,56 | 57,86 | 66,14 | -119,40 | 4,58 | 17 | 4,84 | 139,66 | 511,68 |
| **24** | 849,44 | 790,78 | 1383,27 | 472,29 | 987,77 | 341,72 | 1731,14 | 458,45 | 66,54 | 141,31 | 172,10 | 4,53 | 21 | 5,31 | 115,14 | 419,58 |
| **25** | 756,38 | 733,25 | 1462,24 | 477,94 | 1134,26 | 427,16 | 1599,50 | 482,13 | -68,26 | 126,37 | -79,70 | 4,54 | 21 | 5,71 | 138,87 | 501,69 |
| **26** | 769,09 | 739,90 | 1511,50 | 517,44 | 1162,16 | 448,93 | 1395,83 | 573,19 | 49,54 | 155,86 | -147,02 | 4,30 | 21 | 7,32 | 145,88 | 513,74 |
| **27** | 799,43 | 772,67 | 1492,32 | 508,23 | 1065,55 | 378,58 | 1207,32 | 474,31 | 84,67 | 144,70 | 171,32 | 4,60 | 17 | 5,73 | 127,48 | 457,63 |
| **28** | 724,25 | 765,80 | 1517,53 | 439,14 | 1069,18 | 419,32 | 1650,53 | 584,81 | 65,79 | 97,68 | -125,52 | 4,40 | 21 | 6,44 | 146,67 | 523,74 |
| **29** | 833,68 | 807,61 | 1534,21 | 477,86 | 1089,21 | 414,68 | 1404,92 | 557,73 | -174,96 | -43,51 | 86,55 | 5,26 | 18 | 6,78 | 141,94 | 499,71 |
| **30** | 825,40 | 789,92 | 1525,15 | 522,39 | 1078,51 | 460,47 | 1681,11 | 541,89 | -70,87 | -163,04 | 160,05 | 4,56 | 20 | 6,92 | 141,28 | 499,71 |
| **31** | 755,36 | 737,37 | 1426,55 | 525,83 | 955,96 | 374,08 | 1595,81 | 520,69 | 48,93 | 131,72 | 175,21 | 4,50 | 20 | 6,13 | 132,08 | 471,66 |
| **32** | 762,90 | 823,90 | 1576,70 | 565,87 | 1180,55 | 431,16 | 1159,21 | 605,26 | -55,11 | -175,14 | 170,26 | 6,01 | 22 | 5,49 | 149,65 | 533,73 |
| **33** | 805,21 | 682,41 | 1278,30 | 543,16 | 932,08 | 334,43 | 1189,26 | 469,31 | -55,89 | -169,14 | 86,50 | 4,43 | 22 | 5,48 | 112,40 | 407,57 |
| **34** | 992,93 | 905,61 | 1534,08 | 600,15 | 1183,90 | 382,31 | 1077,61 | 495,99 | 67,56 | 171,50 | 177,83 | 4,65 | 22 | 6,34 | 123,88 | 447,64 |

.

Tabela IV - Descritores calculados com o programa Marvin 5.4.1 (CHEMAXON, 2011). Parte 1

| Compostos | $ClogP_{ion}$ | $ClogP_{nion}$ | $ClogD_{7,4}$ | $ClogD_{6,5}$ | $ClogD_{5,0}$ | $ClogD_{1,5}$ | $\alpha_{3D}$ (Å³) | PSA (Å²) | MMFF94 (kcal/mol) | Dre (kcal/mol) | $SA_{sol}$ (Å²) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 2,70 | 0,23 | 2,70 | 2,70 | 2,70 | 2,17 | 45,59 | 68,40 | -47,52 | 140,22 | 684,47 |
| **2** | 2,26 | -0,21 | 2,26 | 2,26 | 2,26 | 1,73 | 44,58 | 68,40 | -35,37 | 150,52 | 681,29 |
| **3** | 4,89 | 2,42 | 4,89 | 4,89 | 4,89 | 4,37 | 66,47 | 77,63 | -111,05 | 135,33 | 1059,78 |
| **4** | 5,68 | 3,21 | 5,68 | 5,68 | 5,68 | 5,17 | 70,90 | 77,63 | -93,67 | 176,71 | 1127,05 |
| **5** | 4,96 | 2,49 | 4,96 | 4,96 | 4,96 | 4,44 | 60,32 | 66,21 | -110,07 | 144,67 | 1112,59 |
| **6** | 4,68 | 2,21 | 4,68 | 4,68 | 4,68 | 4,15 | 55,64 | 68,40 | -34,90 | 155,03 | 800,40 |
| **7** | 4,09 | 1,62 | 4,09 | 4,09 | 4,09 | 3,56 | 60,75 | 68,40 | -43,15 | 148,76 | 827,63 |
| **8** | 3,77 | 1,30 | 3,77 | 3,77 | 3,77 | 3,24 | 54,94 | 68,40 | -60,02 | 138,79 | 830,34 |
| **9** | 3,36 | 0,90 | 3,36 | 3,36 | 3,36 | 2,84 | 55,82 | 68,40 | -42,57 | 139,46 | 826,47 |
| **10** | 6,27 | 3,81 | 6,27 | 6,27 | 6,27 | 5,75 | 71,57 | 77,63 | 25,42 | 178,29 | 1006,46 |
| **11** | 6,62 | 6,62 | 6,62 | 6,62 | 6,62 | 6,09 | 68,17 | 68,40 | -33,80 | 175,70 | 999,61 |
| **12** | 4,61 | 2,15 | 4,61 | 4,61 | 4,61 | 4,10 | 70,00 | 86,86 | -41,12 | 149,16 | 1120,60 |
| **13** | 4,92 | 2,45 | 4,92 | 4,92 | 4,92 | 4,42 | 57,20 | 68,40 | -85,82 | 142,84 | 929,92 |
| **14** | 4,64 | 2,17 | 4,64 | 4,64 | 4,64 | 4,11 | 57,23 | 68,40 | -43,12 | 149,04 | 863,88 |
| **15** | 4,16 | 1,70 | 4,16 | 4,16 | 4,16 | 3,65 | 61,91 | 77,63 | -109,68 | 147,26 | 1053,20 |
| **16** | 5,40 | 2,93 | 5,40 | 5,40 | 5,40 | 4,87 | 60,44 | 68,40 | -30,24 | 168,09 | 802,71 |
| **17** | 4,23 | 1,76 | 4,23 | 4,23 | 4,23 | 3,72 | 60,81 | 68,40 | -24,68 | 170,27 | 824,02 |

Tabela IV parte 1 (cont.)

| Compostos | $ClogP_{ion}$ | $ClogP_{nion}$ | $ClogD_{7,4}$ | $ClogD_{6,5}$ | $ClogD_{5,0}$ | $ClogD_{1,5}$ | $\alpha_{3D}$ (Å³) | PSA (Å²) | MMFF94 (kcal/mol) | Dre (kcal/mol) | $SA_{sol}$ (Å²) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **18** | 4,33 | 1,87 | 4,33 | 4,33 | 4,33 | 3,81 | 59,36 | 77,63 | 43,57 | 173,79 | 806,92 |
| **19** | 7,34 | 4,87 | 7,34 | 7,34 | 7,34 | 6,81 | 72,79 | 68,40 | -45,90 | 177,82 | 1006,01 |
| **20** | 3,03 | 0,56 | 3,03 | 3,03 | 3,03 | 2,52 | 61,45 | 86,86 | -40,27 | 156,52 | 990,12 |
| **21** | 3,80 | 1,33 | 3,80 | 3,80 | 3,80 | 3,27 | 56,26 | 68,40 | -48,62 | 136,61 | 817,59 |
| **22** | 4,24 | 1,77 | 4,24 | 4,24 | 4,24 | 3,71 | 55,22 | 68,40 | -40,12 | 146,73 | 809,04 |
| **23** | 3,02 | 0,55 | 3,02 | 3,02 | 3,02 | 2,49 | 59,57 | 77,63 | 30,49 | 151,24 | 826,29 |
| **24** | 3,49 | 1,02 | 3,49 | 3,49 | 3,49 | 2,96 | 50,77 | 68,40 | -70,59 | 143,82 | 837,50 |
| **25** | 3,90 | 1,43 | 3,90 | 3,90 | 3,90 | 3,37 | 58,92 | 77,63 | 36,01 | 160,30 | 815,26 |
| **26** | 5,50 | 3,03 | 5,50 | 5,50 | 5,50 | 5,00 | 61,63 | 68,40 | -23,73 | 175,16 | 805,84 |
| **27** | 3,91 | 1,45 | 3,91 | 3,91 | 3,91 | 3,41 | 54,90 | 68,40 | -49,78 | 134,99 | 829,24 |
| **28** | 4,62 | 2,16 | 4,62 | 4,62 | 4,62 | 4,12 | 62,41 | 68,40 | -12,54 | 186,91 | 823,84 |
| **29** | 4,96 | 2,49 | 4,96 | 4,96 | 4,96 | 4,43 | 59,92 | 68,40 | -36,18 | 160,15 | 805,32 |
| **30** | 5,10 | 2,63 | 5,10 | 5,10 | 5,10 | 4,60 | 59,89 | 68,40 | -23,41 | 165,66 | 802,79 |
| **31** | 4,31 | 1,84 | 4,31 | 4,31 | 4,31 | 3,81 | 56,57 | 68,40 | -47,04 | 146,86 | 828,76 |
| **32** | 3,60 | 1,67 | 3,60 | 3,60 | 3,60 | 3,30 | 62,55 | 68,40 | 68,97 | 184,27 | 785,23 |
| **33** | 4,12 | 1,99 | 4,12 | 4,12 | 4,12 | 3,60 | 50,63 | 68,40 | -95,53 | 108,95 | 922,33 |
| **34** | 4,52 | 2,06 | 4,52 | 4,52 | 4,52 | 4,02 | 55,33 | 68,40 | -85,68 | 115,65 | 911,51 |

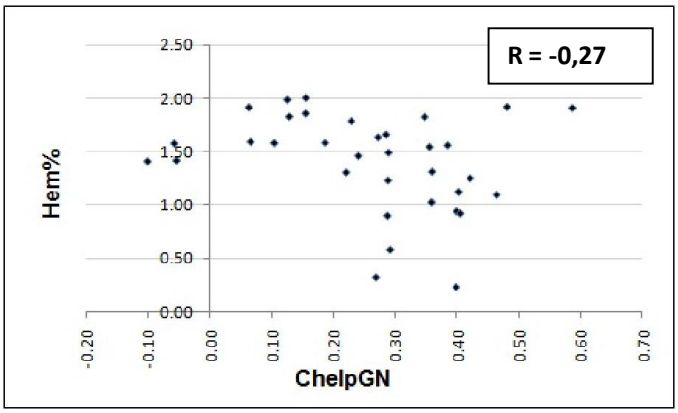
Tabela IV - Parte 2

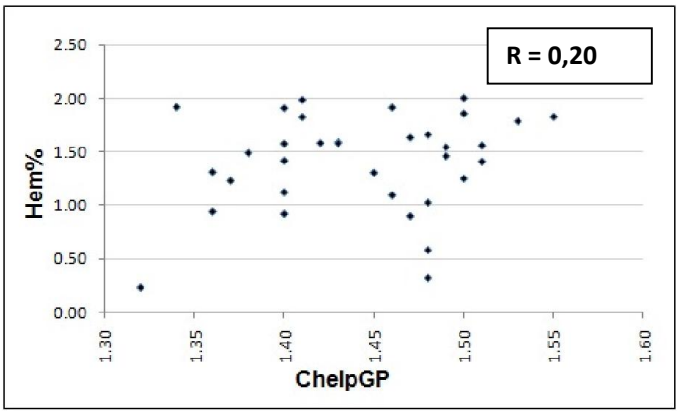
| Compostos | $A_{min}$ (Å²) | $A_{max}$ (Å²) | $R_{min}$ (Å²) | $R_{max}$ (Å²) | Platt | Randic | Balaban | Harary | Wiener | HyWiener | Szeged | PWiener |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 63,13 | 125,30 | 5,57 | 9,17 | 66,00 | 12,29 | 2,06 | 84,89 | 2251 | 11972 | 2776 | 30 |
| **2** | 66,08 | 113,91 | 5,54 | 8,66 | 66,00 | 12,29 | 2,06 | 84,89 | 2251 | 11972 | 2776 | 30 |
| **3** | 92,14 | 172,13 | 8,42 | 13,59 | 94,00 | 17,92 | 1,30 | 133,84 | 6908 | 55472 | 8234 | 44 |
| **4** | 97,60 | 184,01 | 8,74 | 15,17 | 98,00 | 18,92 | 1,31 | 142,47 | 8208 | 70333 | 9672 | 46 |
| **5** | 79,32 | 177,24 | 5,58 | 17,14 | 88,00 | 17,22 | 1,88 | 125,58 | 6640 | 54198 | 7609 | 39 |
| **6** | 71,98 | 134,64 | 5,54 | 10,03 | 76,00 | 14,79 | 2,09 | 108,36 | 3632 | 21383 | 4619 | 35 |
| **7** | 71,82 | 154,43 | 6,21 | 12,29 | 104,00 | 16,93 | 0,84 | 130,29 | 5652 | 41482 | 7132 | 47 |
| **8** | 60,02 | 148,63 | 6,29 | 11,72 | 80,00 | 14,99 | 1,25 | 105,52 | 4136 | 28455 | 4640 | 36 |
| **9** | 59,61 | 143,95 | 5,64 | 12,25 | 94,00 | 15,22 | 1,02 | 113,94 | 4415 | 30479 | 5487 | 40 |
| **10** | 89,85 | 175,22 | 6,49 | 14,47 | 98,00 | 19,49 | 1,32 | 150,26 | 8341 | 67832 | 10039 | 48 |
| **11** | 79,18 | 178,74 | 7,14 | 13,84 | 88,00 | 17,79 | 1,92 | 133,35 | 6706 | 51395 | 7945 | 41 |
| **12** | 80,84 | 182,26 | 6,18 | 17,81 | 98,00 | 18,92 | 1,31 | 142,47 | 8208 | 70333 | 9672 | 46 |
| **13** | 71,96 | 146,26 | 5,50 | 14,53 | 78,00 | 14,76 | 1,93 | 106,72 | 3982 | 26582 | 4318 | 37 |
| **14** | 70,50 | 144,06 | 5,55 | 11,55 | 78,00 | 15,29 | 1,88 | 108,83 | 4554 | 32179 | 5229 | 36 |
| **15** | 77,63 | 167,14 | 5,46 | 15,92 | 84,00 | 16,22 | 1,91 | 117,15 | 5519 | 42098 | 6386 | 37 |
| **16** | 67,05 | 152,92 | 5,87 | 10,06 | 86,00 | 16,49 | 1,45 | 124,84 | 4712 | 29840 | 6104 | 42 |
| **17** | 64,41 | 142,00 | 5,26 | 12,08 | 108,00 | 16,71 | 0,88 | 133,10 | 5443 | 38502 | 6700 | 48 |
| **18** | 76,65 | 142,88 | 5,84 | 9,96 | 86,00 | 16,49 | 1,45 | 124,84 | 4712 | 29840 | 6104 | 42 |

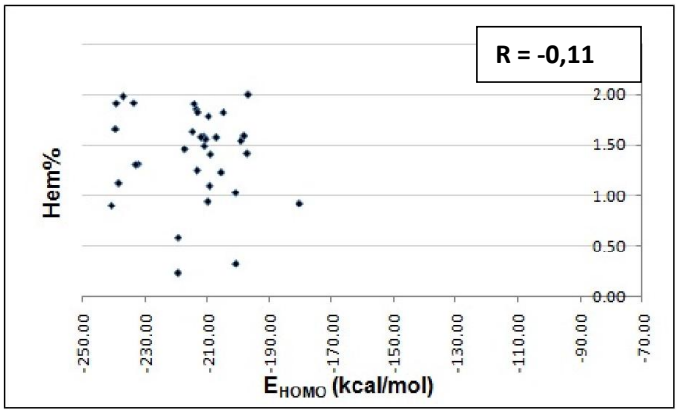
Tabela IV parte 2 (cont.)

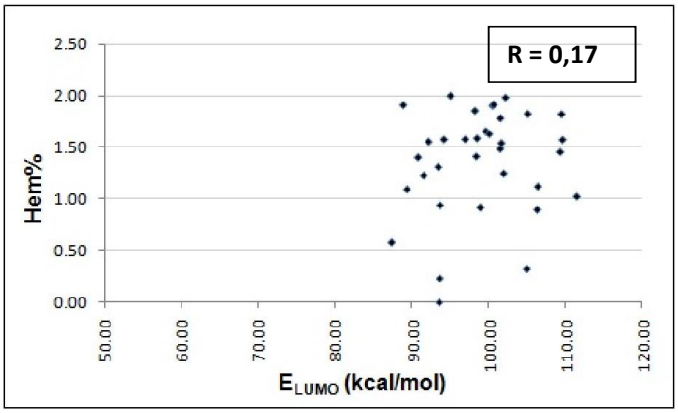
| Compostos | $A_{min}$ (Å²) | $A_{max}$ (Å²) | $R_{min}$ (Å²) | $R_{max}$ (Å²) | Platt | Randic | Balaban | Harary | Wiener | HyWiener | Szeged | PWiener |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **19** | 83,79 | 178,73 | 6,49 | 14,72 | 98,00 | 19,49 | 1,32 | 150,26 | 8341 | 67832 | 10039 | 48 |
| **20** | 80,02 | 161,10 | 6,13 | 15,30 | 90,00 | 16,92 | 1,40 | 125,28 | 5756 | 43136 | 6944 | 42 |
| **21** | 56,96 | 143,82 | 5,50 | 11,97 | 94,00 | 15,22 | 1,02 | 113,94 | 4415 | 30479 | 5487 | 40 |
| **22** | 66,24 | 147,29 | 6,08 | 10,63 | 76,00 | 14,79 | 2,09 | 108,36 | 3632 | 21383 | 4619 | 35 |
| **23** | 70,41 | 149,44 | 5,69 | 12,32 | 104,00 | 16,93 | 0,84 | 130,29 | 5652 | 41482 | 7132 | 47 |
| **24** | 58,94 | 142,29 | 6,04 | 12,05 | 70,00 | 13,29 | 1,82 | 89,71 | 3164 | 20516 | 3389 | 29 |
| **25** | 68,92 | 153,85 | 6,12 | 10,54 | 86,00 | 16,49 | 1,45 | 124,84 | 4712 | 29840 | 6104 | 42 |
| **26** | 72,08 | 142,99 | 5,20 | 10,37 | 92,00 | 16,78 | 1,63 | 133,56 | 4850 | 29677 | 6393 | 46 |
| **27** | 68,09 | 135,02 | 5,56 | 11,48 | 84,00 | 14,78 | 1,31 | 108,25 | 3959 | 26155 | 4268 | 37 |
| **28** | 69,11 | 142,81 | 5,32 | 11,89 | 110,00 | 17,21 | 0,86 | 138,89 | 5833 | 41686 | 7466 | 51 |
| **29** | 74,09 | 152,90 | 5,80 | 10,14 | 86,00 | 16,49 | 1,45 | 124,84 | 4712 | 29840 | 6104 | 42 |
| **30** | 67,95 | 140,35 | 5,24 | 10,53 | 90,00 | 16,28 | 1,51 | 127,72 | 4511 | 27272 | 5687 | 43 |
| **31** | 72,37 | 138,25 | 5,48 | 11,10 | 86,00 | 15,28 | 1,42 | 113,85 | 4266 | 28435 | 4876 | 40 |
| **32** | 65,94 | 150,32 | 5,80 | 12,29 | 118,00 | 17,80 | 0,72 | 144,09 | 6469 | 48609 | 8325 | 55 |
| **33** | 60,25 | 142,97 | 5,95 | 14,87 | 62,00 | 12,77 | 3,30 | 82,83 | 2944 | 19184 | 2944 | 26 |
| **34** | 61,57 | 153,65 | 6,02 | 14,76 | 76,00 | 14,26 | 1,94 | 101,18 | 3692 | 24449 | 3747 | 34 |

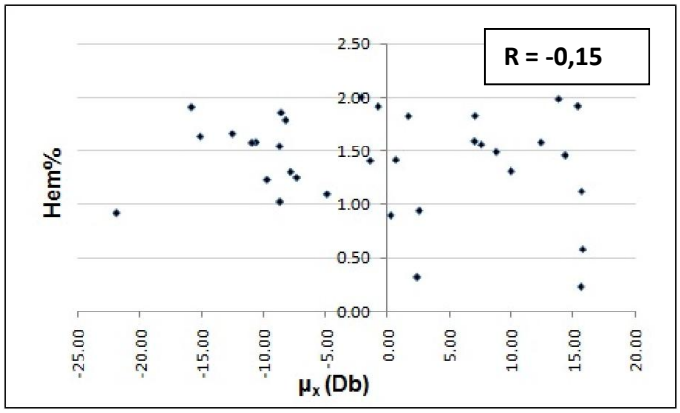
**Anexo 7C.** Gráficos de dispersão % hemólise *versus* descritores e respectivos valores de coeficiente de Pearson (*R*).

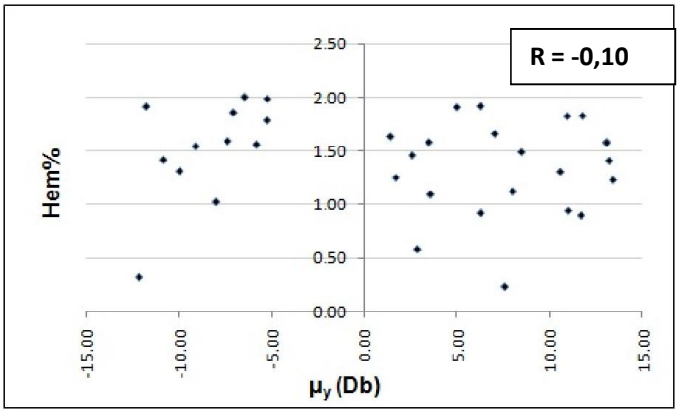


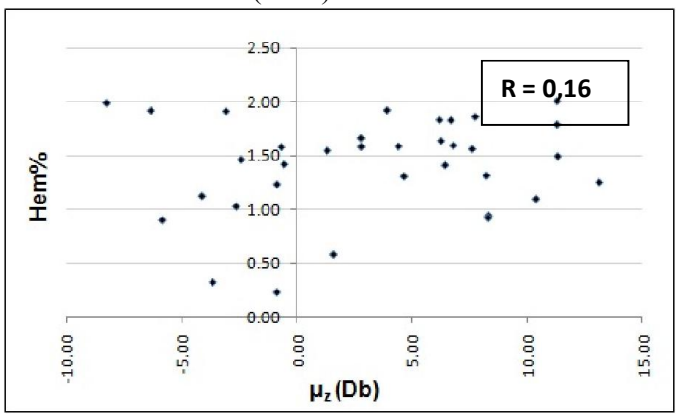



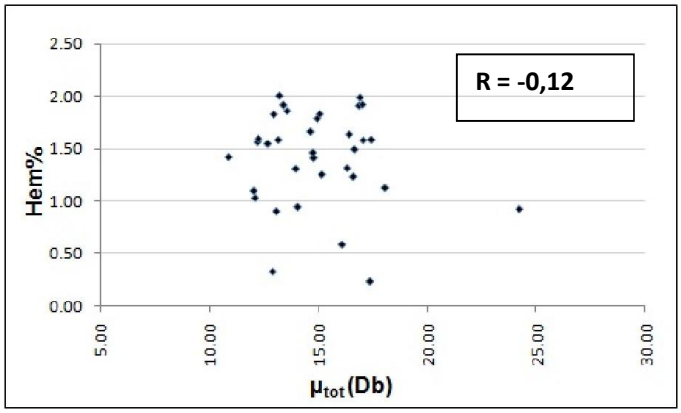



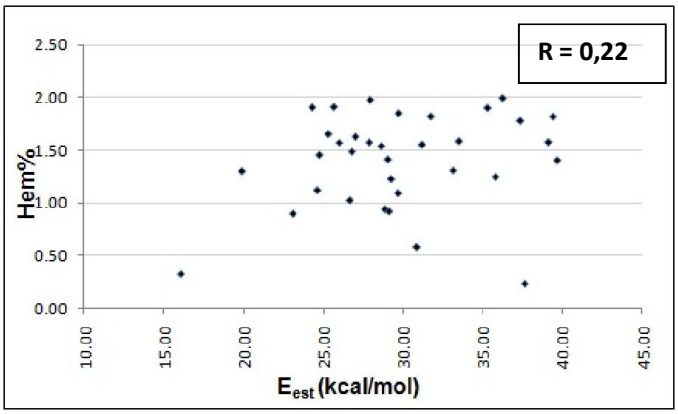



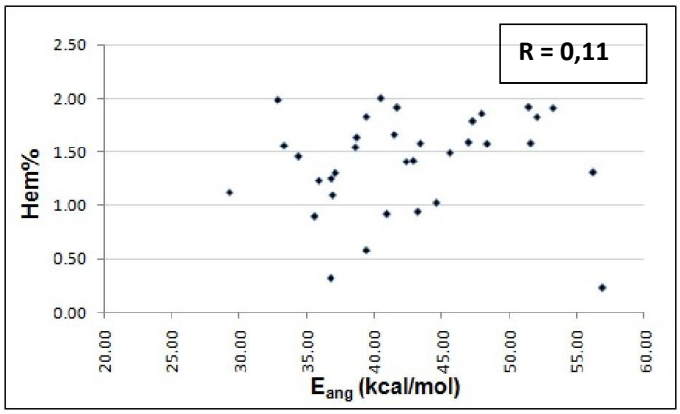



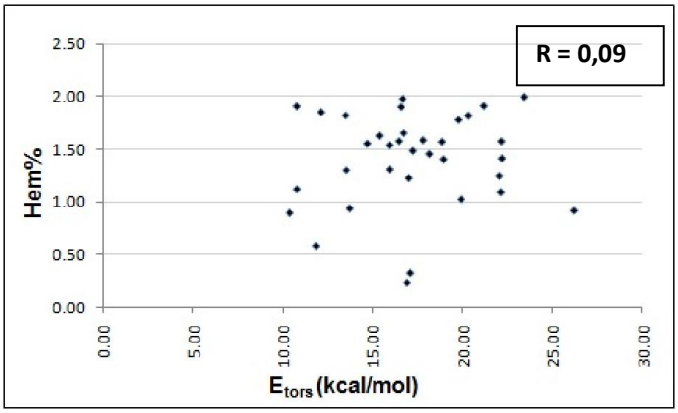
Anexo 7C (cont.)

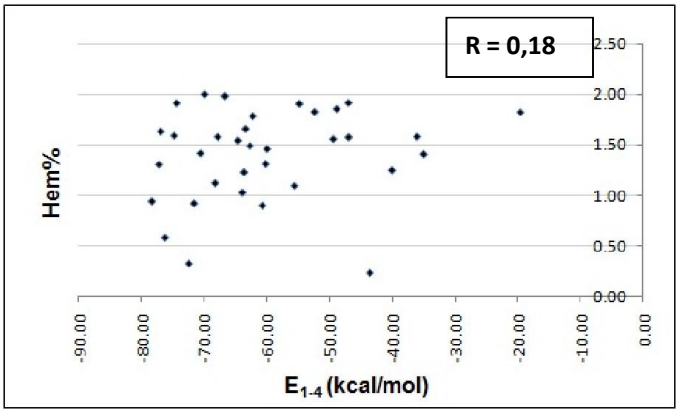


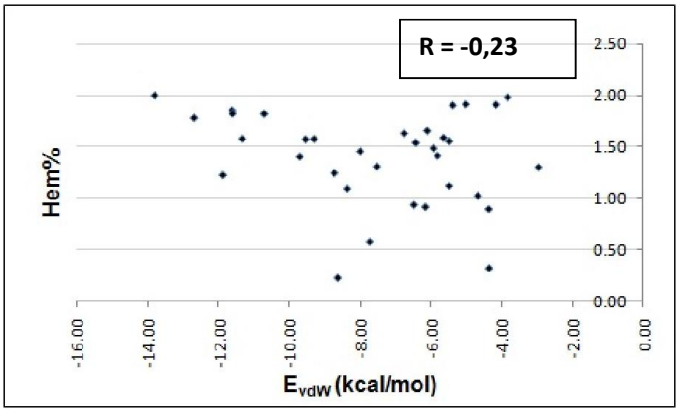



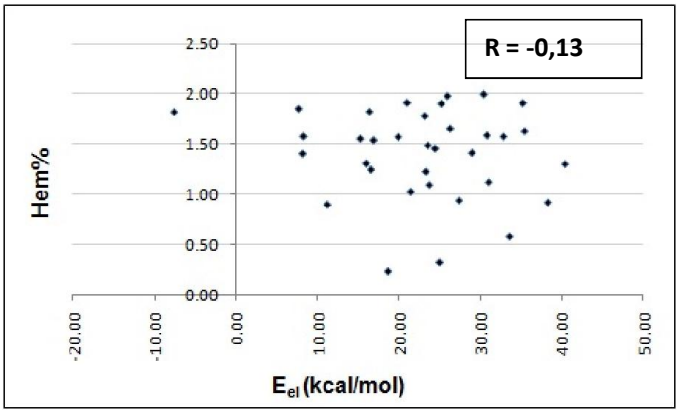



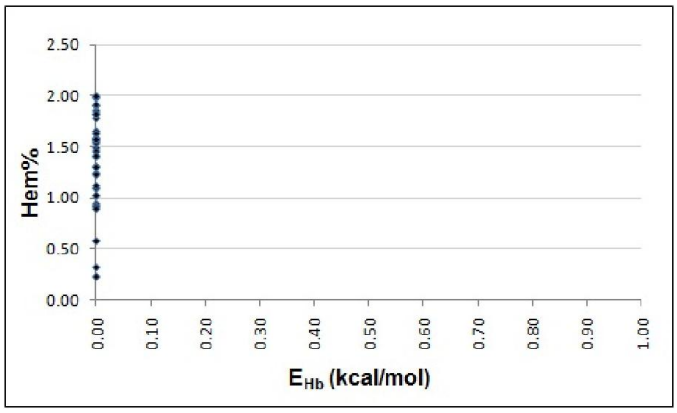



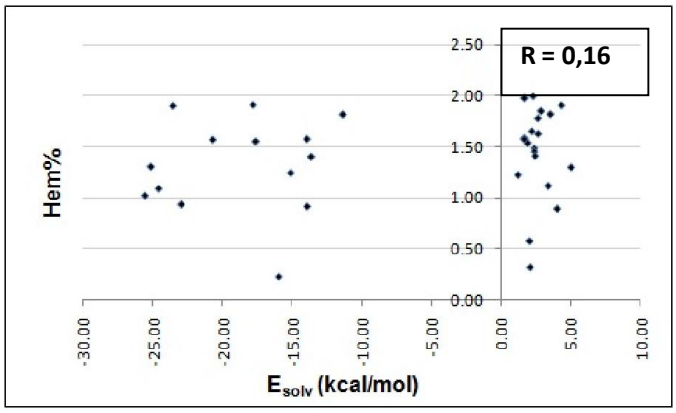



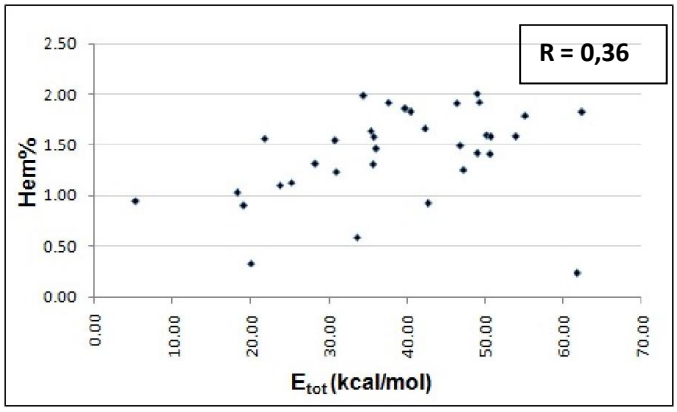



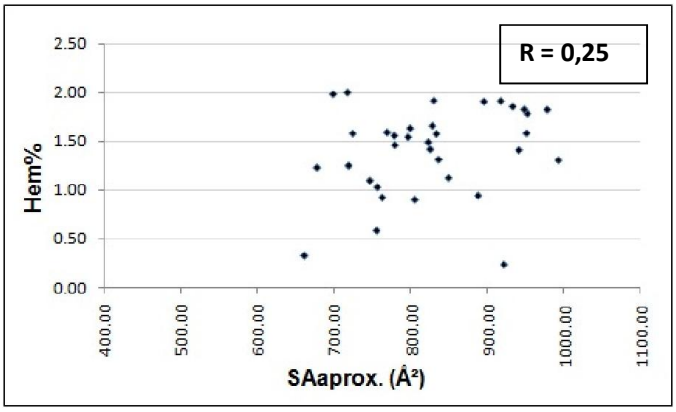



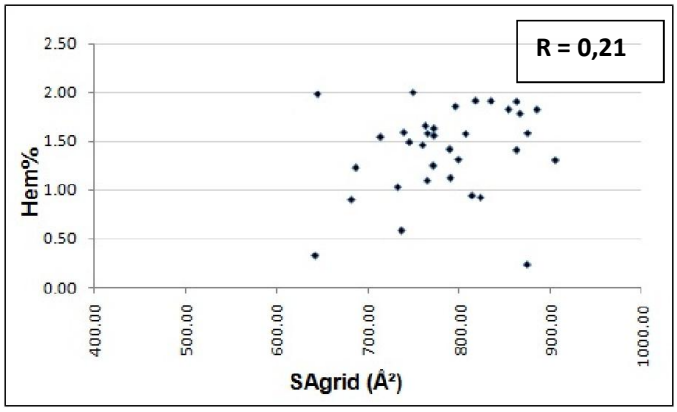
Anexo 7C (cont.)

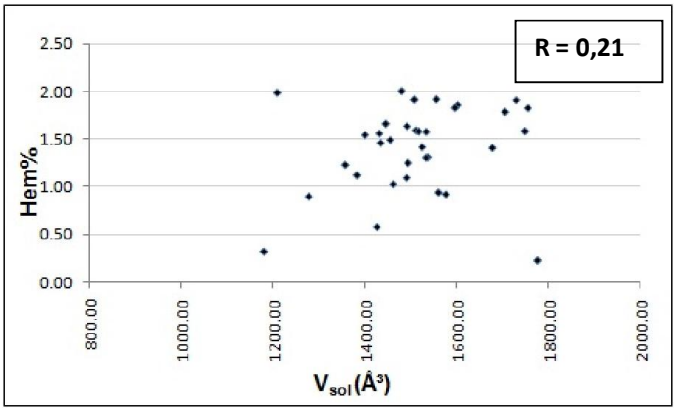


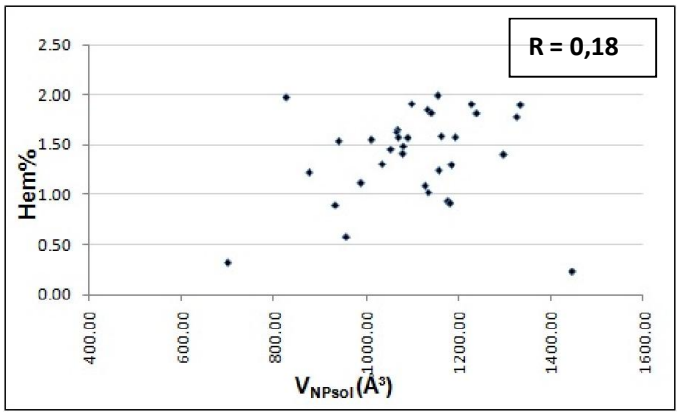



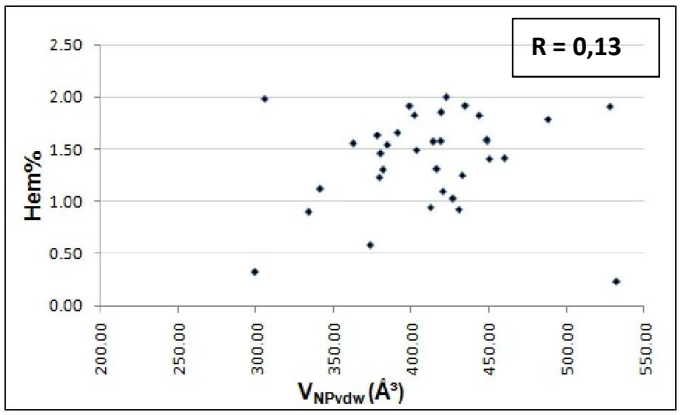



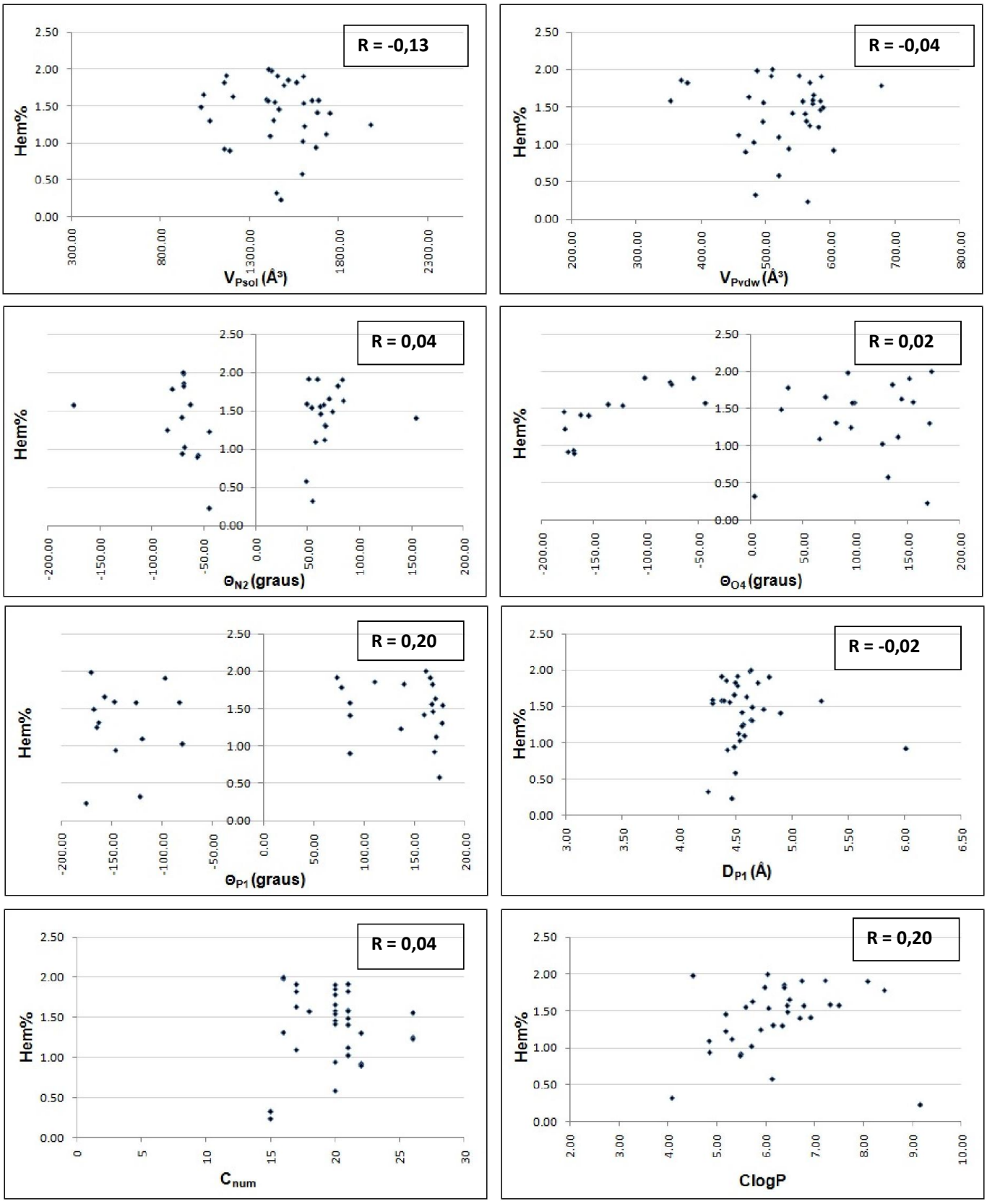



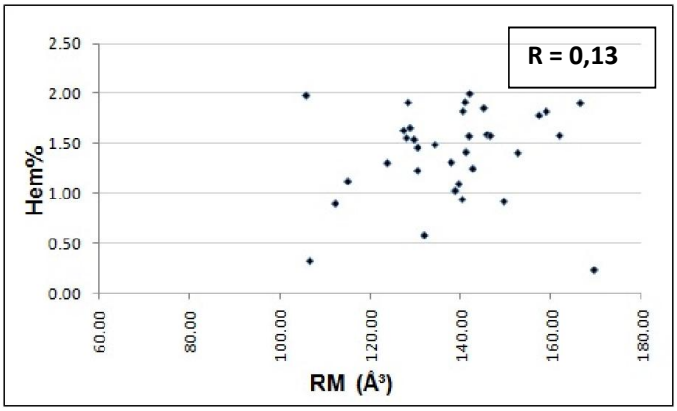



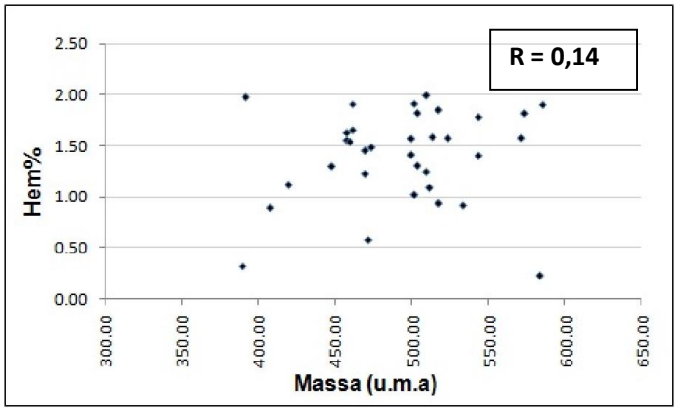



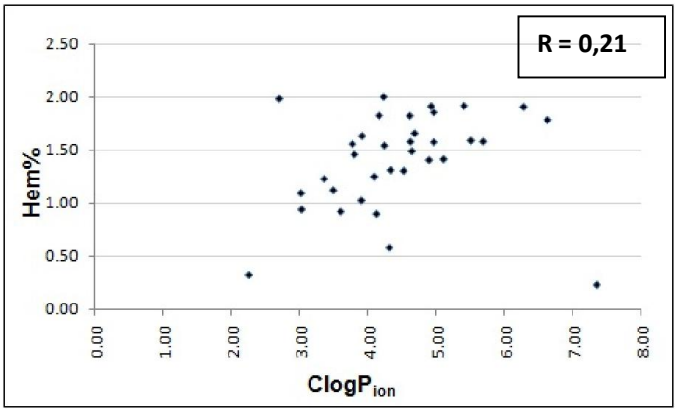
Anexo 7C (cont.)

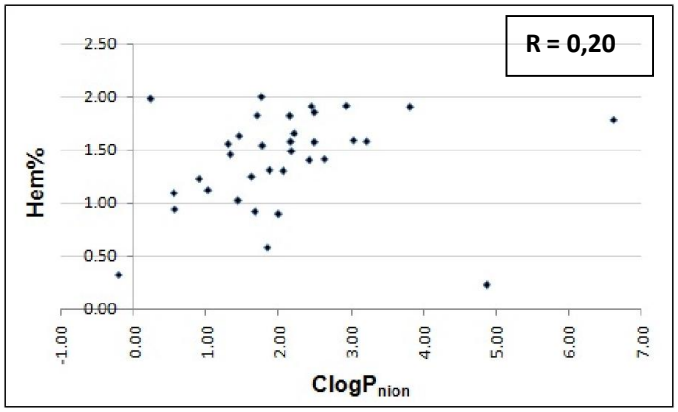


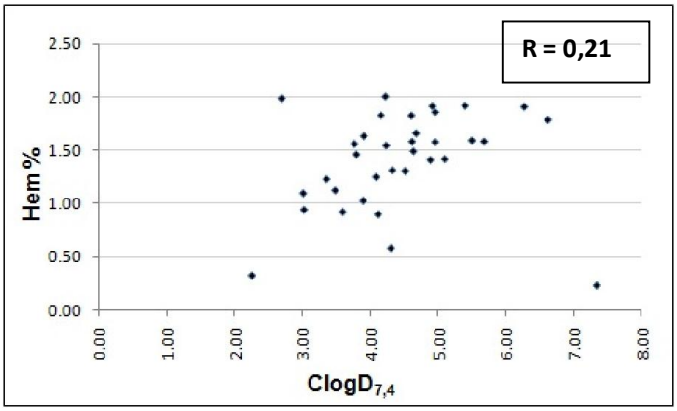
Anexo 7C (cont.)

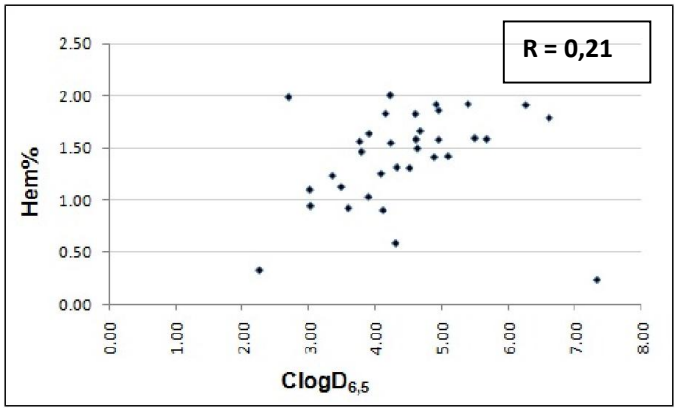


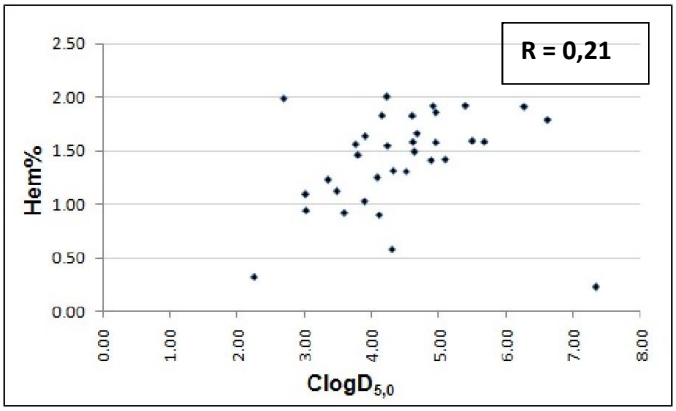



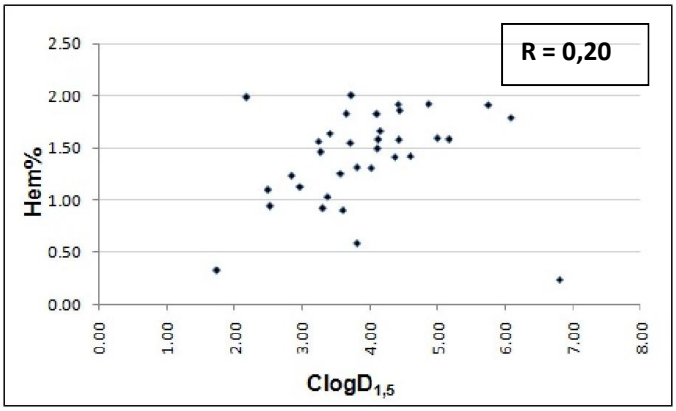



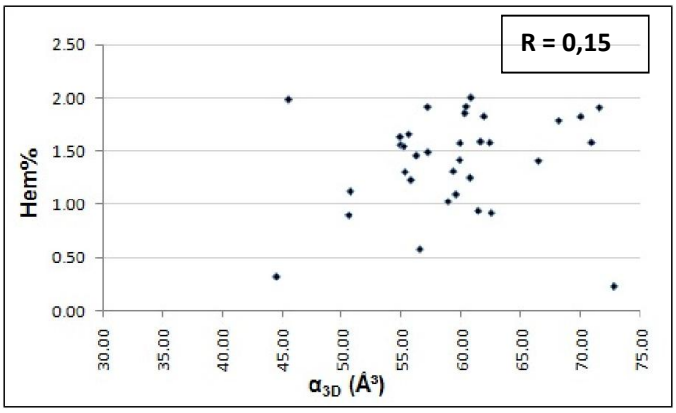



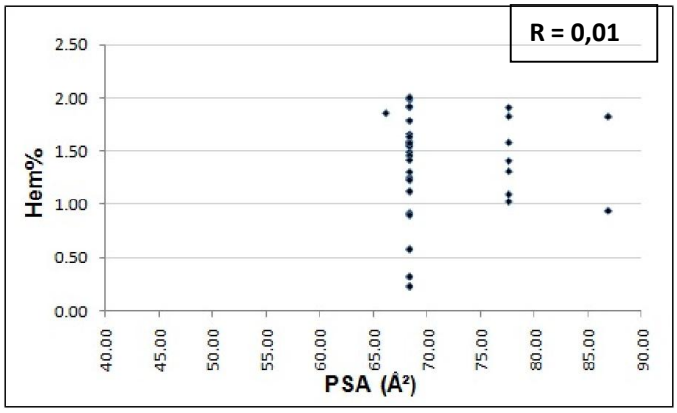



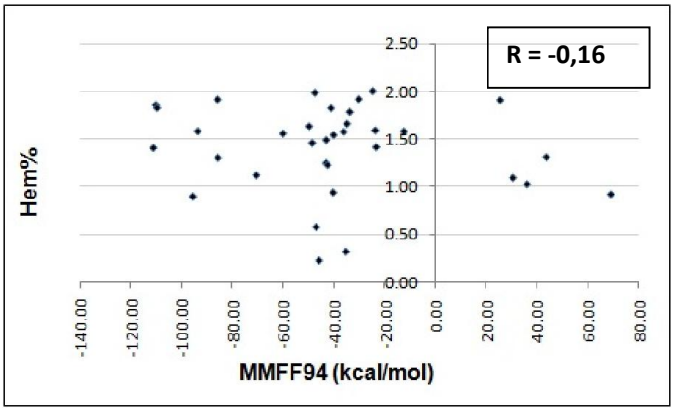



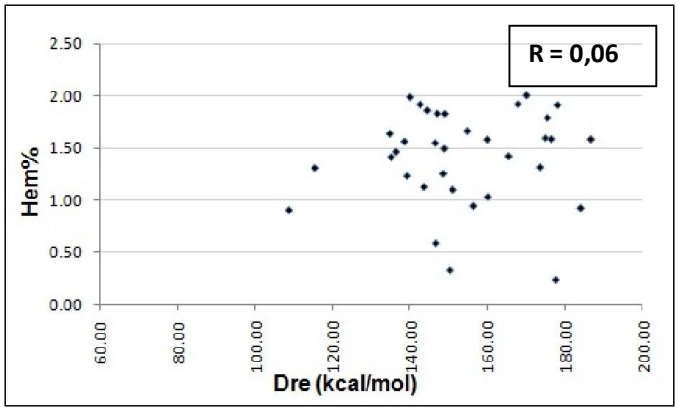



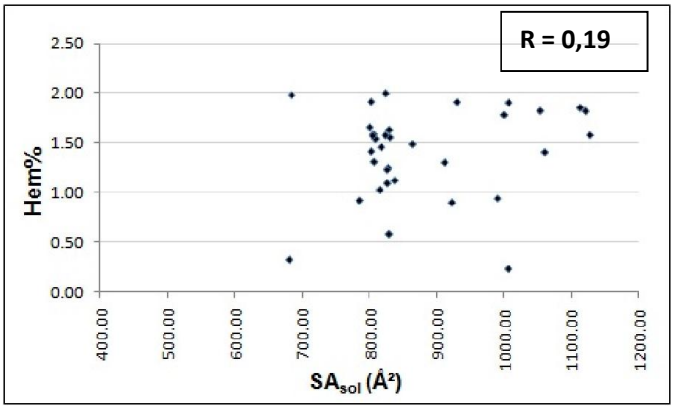
Anexo 7C (cont.)

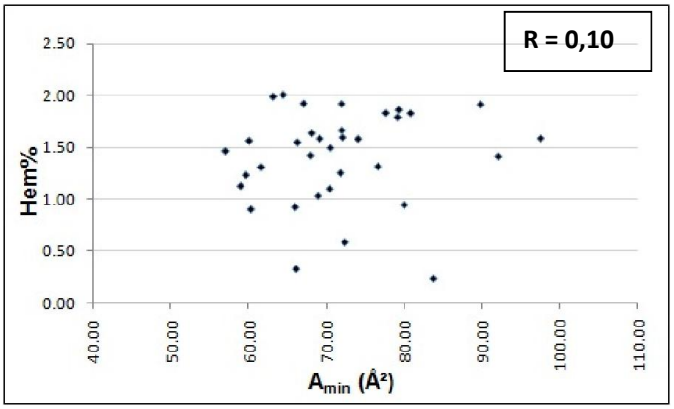


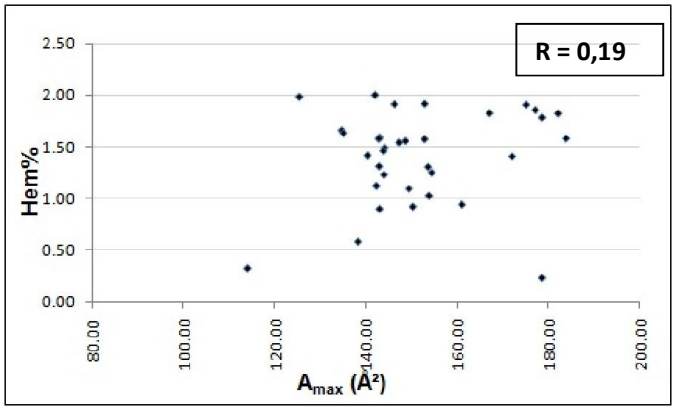



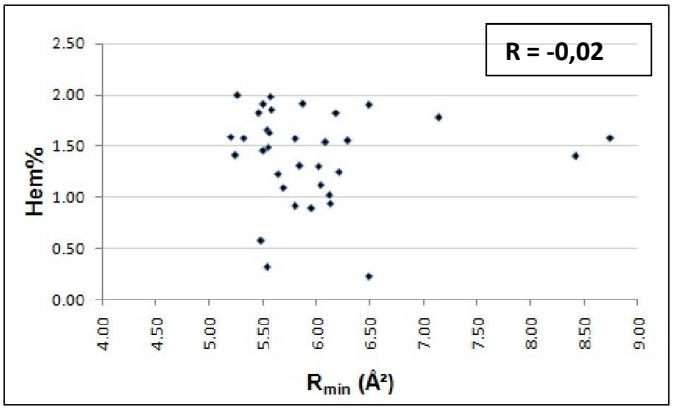



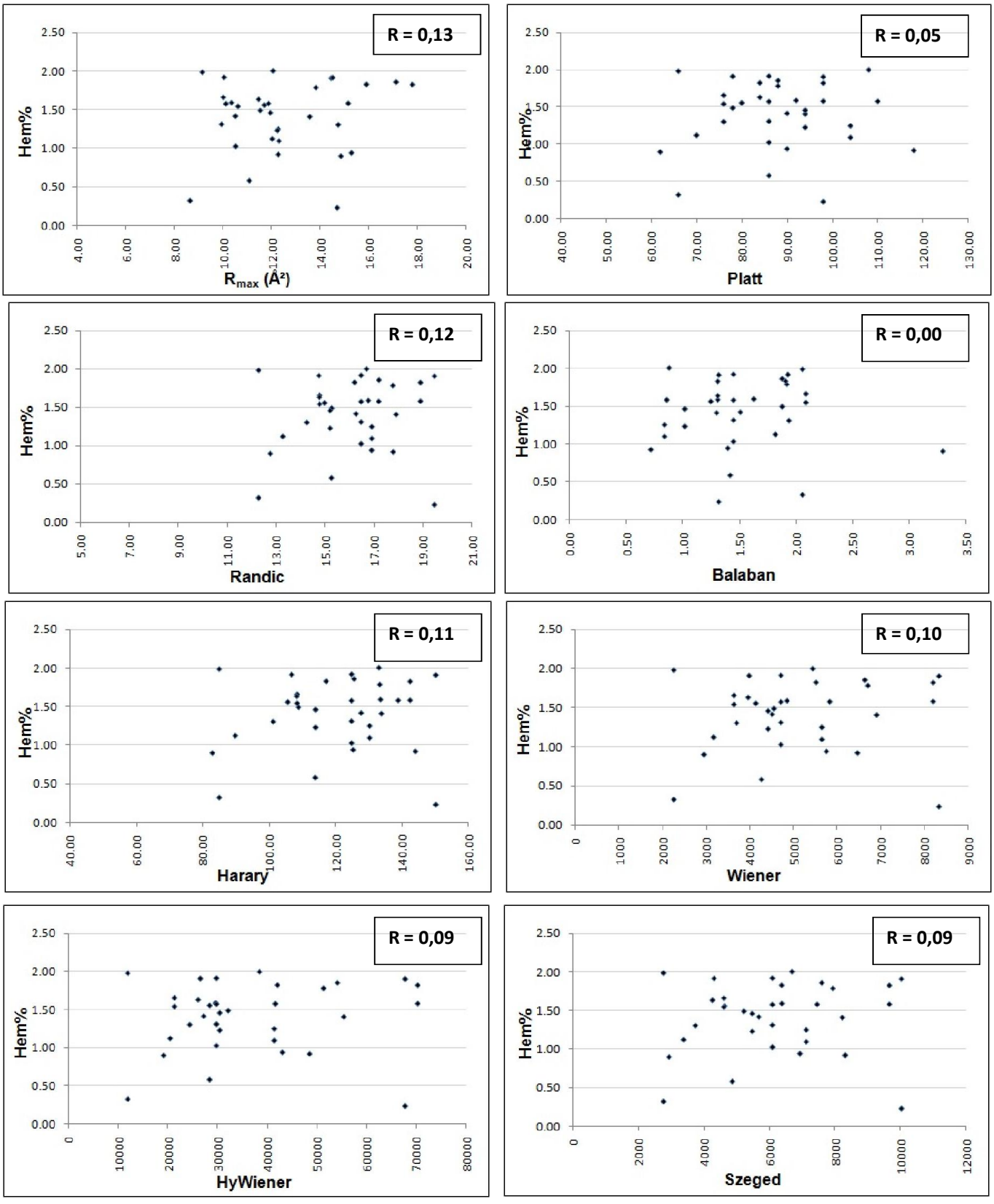



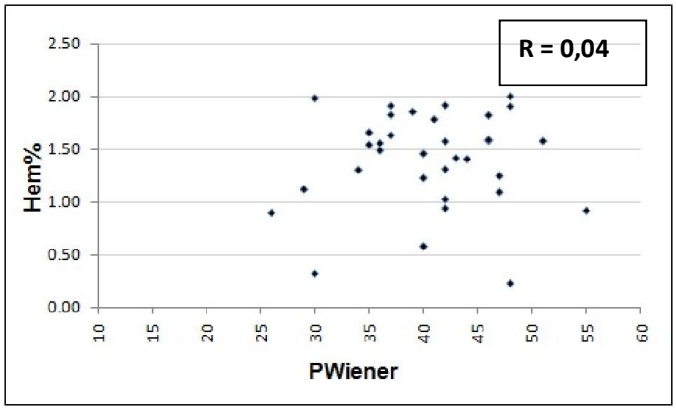



Anexo 7C (cont.)



Anexo 7C (cont.)



# CAPÍTULO 3

## Interação de derivados de alquilfosfocolina e domínio C2 da PKCα

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Ancoramento molecular no planejamento de fármacos

Metodologias de ancoramento ou *docking* de ligantes no sítio de interação são comumente empregadas no processo de planejamento baseado na estrutura para sugerir a orientação entre o ligante e biomacromolécula alvo. A maioria dos algoritmos de *docking* disponíveis gera grande número de possíveis estruturas para o mesmo ligante, que são classificadas em termos de valores de energia de interação, permitindo identificar aquelas de maior interesse (LEACH, 2001; MORGON; COUTINHO, 2007).

Sabe-se que há seis graus de liberdade translacional e rotacional de uma molécula em relação à outra, bem como os graus de liberdade conformacional de cada molécula, considerando o número de ligações sigma. No entanto, as metodologias de *docking* consideram somente os graus de liberdade conformacional do ligante, ou seja, a biomacromolécula alvo é supostamente rígida na análise, semelhante ao modelo chave-fechadura de Emil Fischer (1894). Alguns algoritmos incluem certo grau de flexibilidade à cadeia lateral de resíduos de aminoácido do sítio de interação, para permitir o "encaixe" dos ligantes, mas o restante da biomacromolécula permanece rígido. Estes critérios estão longe da realidade, já que tanto os átomos do ligante como da biomacromolécula alvo sofrem mudanças de posições ou rearranjos durante o processo de reconhecimento molecular (LEACH, 2001; MORGON; COUTINHO, 2007). Dessa forma, o método de *docking* ideal seria aquele que permitisse explorar os graus de liberdade conformacional tanto do ligante quanto biomacromolécula alvo.

Uma maneira de considerar e a flexibilidade do sistema é através de simulações de dinâmica molecular (DM) do complexo ligante-biomacromolécula alvo. Como abordado no Capítulo 1, em DM, sucessivas configurações do sistema são geradas integrando-se as leis newtonianas de movimento. O resultado é uma trajetória que especifica como as posições (energia potencial) e as velocidades (energia cinética) das partículas do sistema variam em função do tempo. Esta trajetória corresponde ao perfil de amostragem conformacional (PAC) do sistema investigado (LEACH, 2001).

Geralmente, as simulações de DM de complexos envolvem alto custo computacional e não exploram, de forma efetiva, vários modos de interação a não ser para ligantes muito pequenos, que apresentam maior mobilidade. Além disso, para muitos sistemas as barreiras de energia, que separam um modo de interação do outro, são frequentemente muito grandes para

serem superadas (LEACH, 2001; MORGON; COUTINHO, 2007). No entanto, além de considerar a flexibilidade do sistema como um todo, metodologias de DM que empregam esquemas de variação de temperatura (aquecimento/resfriamento) (TOKARSKI; HOPFINGER, 1997) contribuem para a transposição de barreiras energéticas na busca de uma conformação de equilíbrio termodinâmico e devem ser consideradas no estudo de modos de interação de complexos moleculares.

### 1.2 Proteína quinase C (PKC) e sua participação no câncer

As proteínas quinases cálcio-dependentes (PKC, do inglês *Protein Kinase Calcium-dependent*) são serina/treonina quinases envolvidas em vias de transdução celular por meio da fosforilação de diferentes substratos. A PKC foi descoberta em 1977 pelo grupo do Professor Yasutomi Nishizuka como uma histona quinase (INOUE et al., 1977). Ela apresenta duas porções distintas: domínio regulador (próximo ao C-terminal) e domínio catalítico quinase (próximo ao N-terminal). Ambos os domínios possuem regiões altamente conservadas, conhecidas por C1, C2, C3 e C4. As regiões C1 e C2 compõem o domínio regulador, ao passo que as regiões C3 e C4 compõem o domínio catalítico. Essas duas regiões são separadas por alças variáveis de pouca homologia, conhecidas como V0-V5 (WEBB; HIRST; GIEMBYCZ, 2000) A família das PKCs pode ser dividida em três grupos (figura 1), de acordo com sua estrutura e características bioquímicas (tabela 1) (BONINI et al., 2005; VAN DER ZEE; DOUMA, 1997).

O subtipo α da PKC está ubiquamente distribuído pelos tecidos de mamíferos. Além do $Ca^{2+}$ e diacilglicerol (DAG), essa isoforma pode ser ativada por outros lipídios como fosfatidilserina, ácidos graxos livres e lisofosfatidilcolina (NISHIZUKA, 1995). O pseudosubstrato, que está presente em todas as três classes de PKC, é uma região composta por uma pequena sequência de aminoácidos que imita e se liga à cavidade de ligação do substrato no domínio catalítico. Esta região possui sequências de fosforilação, mas não possui resíduos fosforiláveis e, desta forma, controla a atividade catalítica da enzima por meio do bloqueio do acesso dos substratos endógenos ao sítio catalítico (WEBB; HIRST; GIEMBYCZ, 2000). Quando $Ca^{2+}$ e DAG estão presentes em concentrações suficientes, eles se ligam aos domínios C2 e C1, respectivamente, de forma a recrutar a PKC para a membrana, auxiliado pela proteína RACK (receptor acoplado à membrana para a forma ativada da proteína quinase C, do inglês *Receptor for Activated C-kinase*). Essa interação com a membrana resulta na liberação do pseudosubstrato do sítio catalítico e ativação da enzima.

O domínio C1 é responsável pela ligação do DAG e os análogos não-hidrolisáveis e não-fisiológicos dos ésteres do forbol. Este domínio está presente em todas as isoformas, entretanto nas atípicas ele é incapaz de ligar DAG e ésteres do forbol (LANGDRAF; MALMBERG; FALKE, 2008; CONESA-ZAMORA; GÓMEZ-FERNANDEZ; CORBALÁN-GARCÍA, 2000; CONESA-ZAMORA et al., 2001; NALEFSKI; NEWTON, 2001).

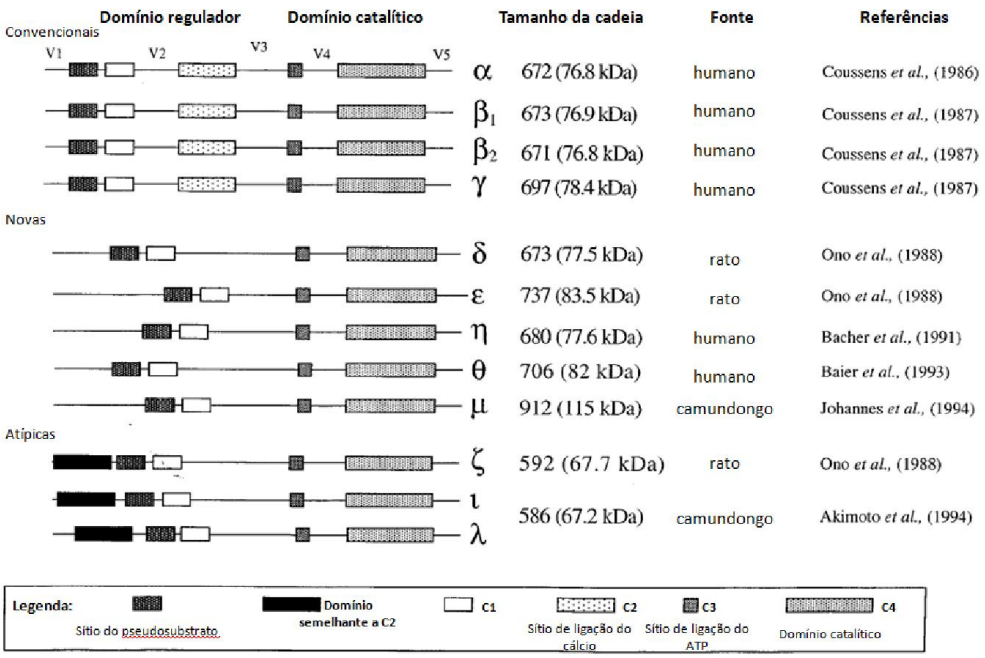



Figura 1 - Representação esquemática dos domínios das isoenzimas da PKC, convencionais, novas e atípicas. (adaptado de Webb e colaboradores, 2000).

Tabela 1 - Classificação das isoformas da PKC (adaptado de VAN DER ZEE; DOUMA, 1997 e MELLOR; PARKER, 1998).

| Classificação | Isoforma | Ativadores |
|---|---|---|
| PKC clássicas ou convencionais (PKCc) | α, βI, βII e γ | $Ca^{2+}$ e DAG |
| PKC "novas" (PKCn) | δ, δ1, δ2, δ3, ε, η, θ e μ | $Ca^{2+}$ |
| PKC atípicas (PKCa) | ζ, ι/λ, PKN1, PKN2, PKN2 | Não necessitam |

O domínio C2 da PCKα está associado de forma reversível à membrana celular (GUERRERO-VALERO et al., 2009). A ligação ao folheto interno da membrana plasmática

(estimulada por $Ca^{2+}$) permite que o domínio C2 reconheça alvos lipídicos, como fosfatidilserina (**PS**) e bisfosfato de 4,5-fosfatidilinositol (PIP2) (LANGDRAF; MALMBERG; FALKE, 2008). O domínio C2 exibe duas regiões funcionais: a região de ligação do $Ca^{2+}$ e uma porção polibásica. A primeira porção está localizada em uma alça flexível no topo, na qual se ligam dois ou três átomos de cálcio, dependendo da isoenzima, e interagem com substratos endógenos, como **PS**. A segunda região polibásica localiza-se na superfície côncava do domínio C2 formado pelas folhas β3 e β4. Estudos demonstraram que esta região pode interagir especificamente com o fosfatidilinositol-4,5-bifosfato de modo cálcio-dependente (figura 2) (GUERRERO-VALERO, 2009).

A ligação dos átomos de cálcio é possível devido à presença de cinco resíduos altamente conservados de aminoácido Asp, sendo que 3 destes resíduos na PKCα (187, 246 e 248) coordenam simultaneamente ligações com o Ca1 e Ca2. Os outros dois resíduos restantes contribuem com um oxigênio para coordenar ligações com o Ca1 (Asp193) e Ca2 (Asp254) (VERDAGUER et al., 1999). A ligação do Ca3 é coordenada pelos oxigênios da cadeia principal dos resíduos Thr251 e Arg252. Quando em presença da fosfatidil-serina, o átomo um dos átomos de cálcio é coordenado com o oxigênio do grupo fosforil, enquanto a porção serina interage especificamente com o átomo de nitrogênio da Asn189. Adicionalmente, os resíduos de Arg216, Arg249 e Thr251 estabelecem, respectivamente, ligações hidrogênio diretas e interações hidrofóbicas com o oxigênio carbonílico e cadeias acíclicas do fosfolipídio (VERDAGUER et al., 1999; CORBALÁN-GARCIA; GÓMEZ FERNANDEZ, 2006). A figura 3 mostra outras interações que ocorrem no domínio C2 da PKCα.

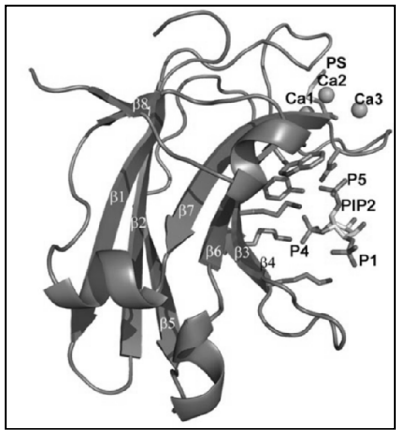



Figura 2 - Complexo formado entre o domínio C2-PKCα, cálcio, fosfatidilserina (**PS**) e fosfatidil-inositol-4,5-bifosfato (PIP2). P5, P4 e P1 são fosfatos. As setas planas são folhas-β, as espirais são α-hélices e as esferas verdes são os átomos de cálcio (adaptado de GUERRERO-VALERO, 2009).

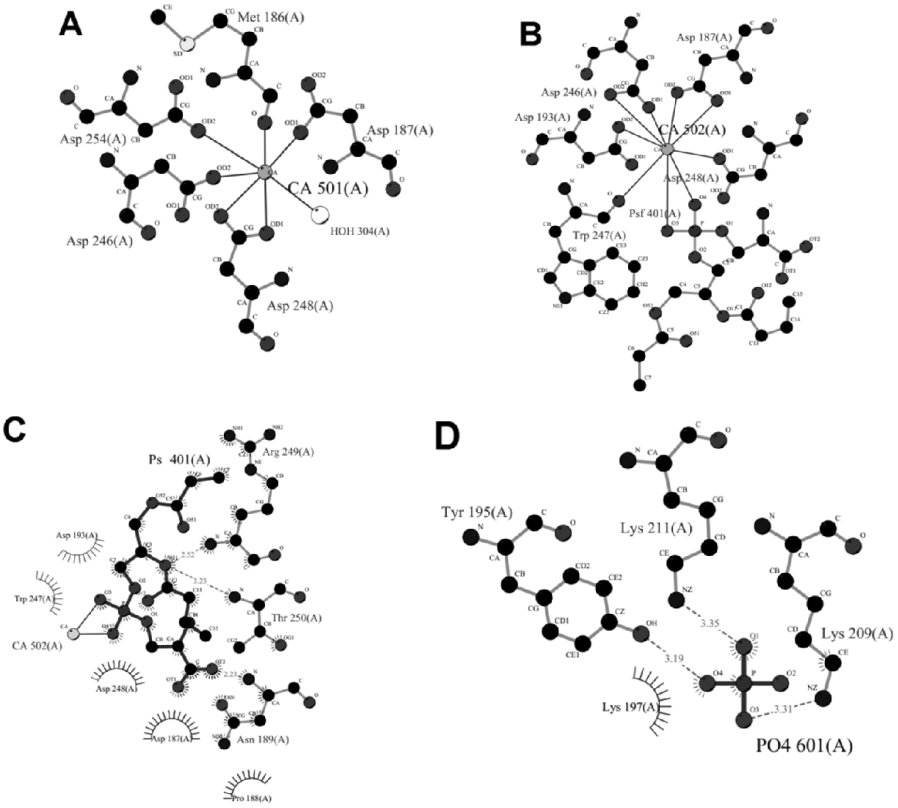



Figura 3 - LIGPLOT do complexo depositado no PDB (*Protein Data Bank*), código 1dsy (VERDAGUER et al., 1999) mostrando a interação entre ligantes e os resíduos de aminoácido da PKCα. A) Ca1 (átomo 501), B) Ca2 (átomo 502), C) Fosfatidilserina (Ps, número 401), D) fosfato (PO4, número 601). O: oxigênio, N: nitrogênio, C: carbono, P: fósforo, S: enxofre. As ligações-hidrogênio estão indicadas por linhas pontilhadas, enquanto as interações não ligadas estão representadas por arcos com setas irradiando. Linhas cheias representam pontes salinas. Adaptado de Verdaguer e colaboradores (1999).

O C-terminal de todas as PKCs se caracteriza pela presença de domínios altamente conservados (C3 e C4) separados por uma região curta e variável (V4). A região C3, que é essencial para a atividade enzimática, representa o sítio de ligação do trifosfato de adenosina (ATP) e é encontrada em todas as isoformas. Um resíduo invariante (Lys380) é fundamental para a atividade quinase. O domínio C4 é o núcleo catalítico da PKC, responsável pela fosforilação de proteínas (WEBB; HIRST; GIEMBYCZ, 2000; MELLOR; PARKER, 1998). A cascata de fosforilação imposta pela ativação da PKC tem importante papel na transdução de sinal de fatores de crescimento e proliferação celular (ÜBERALL et al., 1991), portanto, sua modulação é relevante foco de estudos como alvo celular para terapia antineoplásica

(VINK et al., 2007; JASINSKI et al., 2009; LIOU; CHEN; FALLER, 2004; GONELLI et al., 2009).

As cascatas de sinalização das quais a PKC participa envolvem as vias da PI3K que leva à ativação de PDK-1 (3-fosfoinositida dependente de proteína quinase-1) e Akt (também conhecida por PKB); e a via Ras/MAPK (*rat sarcoma*/*mitogen-activated protein kinases*) que leva à ativação de Ras-1, MEK (membro da família MAPK) e MAPK. A via JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducer and activator of transcription*) é outra importante envolvida nos eventos de sinalização, e o desenvolvimento tumoral está associado com a ativação das vias mencionadas, que convergem para expressão de ciclinas (figura 4) (MARMOR; SHAKIA; YARDEN, 2004; ALI et al., 2009; GRINER; KAZANIETZ, 2007; VARGA et al., 2004; PAN et al., 2005; GROSSINI et al., 2009; MANDIL et al., 2001; D'COSTA et al., 2006).

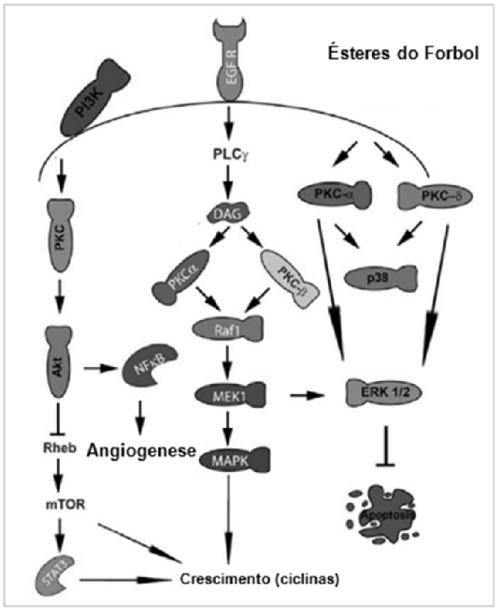



Figura 4 - Diagrama esquemático da cascata de sinalização da PKC (adaptado de ALI et al., 2009).

A expressão e função das isoformas da PKC, sobretudo as isoenzimas α, βII, δ, ε, ζ e ι, encontram-se alteradas em tumores. As PKCs podem atuar tanto na oncogênese quanto na supressão do tumor através de cascatas de fosforilação de proteínas e há evidências de expressão aberrante em diversas linhagens tumorais de isoformas da enzima (tabela 2) (TOTOŃ et al., 2011; BOSCO et al., 2011). Este dado, entretanto, deve ser interpretado com

cuidado uma vez que o mesmo isotipo regula, de maneira sutil, diversos caminhos bioquímicos envolvidos na transformação celular (MARENGO et al., 2011). A PKCα, por exemplo, pode atual como um promotor ou supressor de tumores, uma vez que sua expressão pode estar aumentada ou diminuída em diversos cânceres (MARENGO et al., 2011).

Tabela 2 - Expressão das diferentes isoformas da PKC em alguns tumores humanos (adaptado de BOSCO et al., 2011).

| **Tipo de câncer** | **Isoforma da PKC com expressão aumentada** | **Isoforma da PKC com expressão diminuída** |
|---|---|---|
| Pele | - | α, β, δ |
| Cólon | βII, δ, ι | α, β, βII, δ, η |
| Fígado | α | - |
| Esôfago | δ | - |
| Tumor estromal gastrintestinal | θ | - |
| Pâncreas | β, ι, ζ | ε, γ |
| Bexiga | α, ε | β, δ |
| Rim | δ, η, ζ | α |
| Próstata | α, δ, ε | β |
| Ovário | ι | α |
| Endométrio | α | α, η |
| Mama | ε, α | - |
| Pulmão | ι, η | - |
| Cabeça/Pescoço | ε | - |
| Tireóide | - | ε |
| Cérebro | γ, δ, ε | α |
| Linfoma difuso de células B grandes | βII | α |
| Leucemia mielóide crônica | ι | - |
| Leucemia linfocítica crônica de células B | βII, γ, δ, ζ | - |
| Leucemia de células T | - | α, β |

O processo de desenvolvimento do tumor aparentemente não está associado a mutações nos genes que codificam a PKC, uma vez que mutações nesta enzima são raras em seres humanos. Por outro lado, estudos sugerem que seu envolvimento no câncer se dá por um aumento da atividade da PKCα e diminuição da atividade da PKCδ (MANDIL et al., 2001; D'COSTA et al., 2006).

A PKCα, especificamente, tem sido apontada com uma isoforma importante para promover sobrevivência celular. Em linhagens de célula de tumor endotelial e glioma,

apoptose foi induzida pela depleção de PKCα. Embora o mecanismo exato de como a PKCα suprime a apoptose não seja totalmente conhecido, sugere-se que fosforilação da proteína anti-apoptótica Bcl-2 aumenta a habilidade desta de prevenir a apoptose (MARENGO et al., 2011).

A participação PKCs no processo de tumorigênese estimula a busca de compostos químicos que interajam com a enzima. Diversos moduladores da ativação da PKC estão em estudos clínicos como agentes quimioterápicos (MARENGO et al., 2011). A estaurosporina é um inibidor da PKC que compete com ATP, produzido por cepas de *Streptomyces sp*. (TAKAHASHI et al., 1987). Embora esse composto não apresente especificidade para nenhuma isoforma da PKC, ele serviu de modelo para o desenvolvimento de outras moléculas, como a midostaurina e enzastaurina (MEYER et al, 1989). Outras moléculas têm sido testadas como moduladores de proteínas quinases, como a briostatina, ingenol-3-angelado, curcumina, dissulfiram, aprinocarsen, e análogos de nucleotídeos (MARENGO et al., 2011).

As alquilfosfocolinas (APCs) apresentam semelhança estrutural com os substratos endógenos do domínio C2 da PKCα: PS e PIP2. Estudos mostram que a miltefosina interage com a PKC por inibição competitiva com a **PS** e não-competitiva com $Ca^{2+}$, resultando em interrupção do crescimento celular. (SHOJI et al., 1991; ÜBERALL et al., 1991; HOFMANN, 2001; GRUNICKE et al., 1996; BARRATT; SAINT-PIERRE-CHAZALET; LOISEAU, 2009). A perifosina é capaz de interagir com membranas celulares e inibir proteínas de sinalização, como a PKC, embora o mecanismo não esteja totalmente elucidado (ÜBERALL et al., 1991). Além disso, demonstrou-se que a atividade da PKC foi reduzida após o tratamento de células epiteliais com APCs, resultando na inibição da proliferação dessas células (EIBL et al., 2003), sugerindo que o mecanismo de ação envolva a inibição dessa enzima.

## 2. OBJETIVO

O objetivo desta parte do estudo foi explorar o modo de ligação de APCs no sítio de interação do domínio C2 da PKCα. Este domínio foi selecionado uma vez que ele reconhece o ativador endógeno **PS**, e supõe-se que as APCs compitam pelo mesmo sítio de ligação que esta molécula, inibindo a PKC. Para isso, combinaram-se as metodologias de ancoramento molecular (*docking*), simulações de DM, e análise exploratória de dados (HCA e PCA) com a

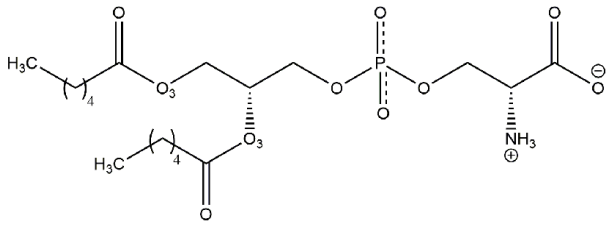
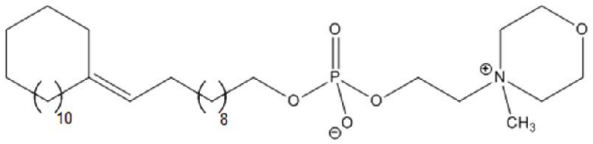
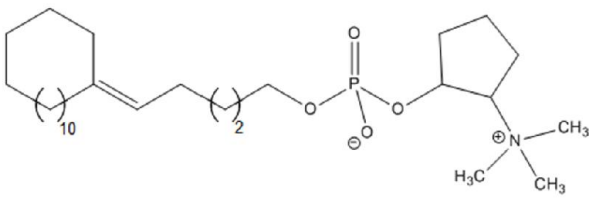
finalidade de se mapear os resíduos de aminoácidos importantes no sítio da enzima, estabelecer tipos de interações envolvidas e possíveis modificações moleculares que contribuam no processo de inibição da enzima.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

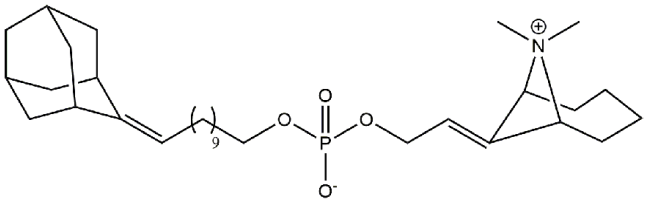
### 3.1 Construção dos modelos tridimensionais

Todos os compostos foram desenhados no programa HyperChem 7.51 (HYPERCUBE, INC., 2003) na forma zwiteriônica, uma vez predominante em pH 7.4 ($pK_a$ da miltefosina ~2) (DORLO et al., 2012). A construção das moléculas seguiu o protocolo descrito no Capítulo 2 desta tese. Os ligantes **1** a **3** foram sintetizados por Papazafiri e colaboradores (2005). As moléculas **4-7** são APCs em estudo clínico (tabela 4).

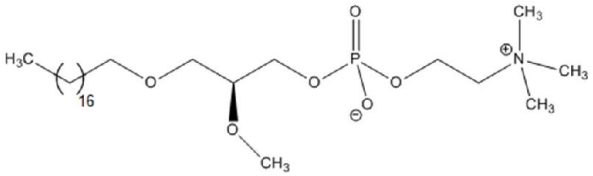
Tabela 4 - Estrutura 2D dos ligantes. O3 está indicado na estrutura da fosfatidilserina (**PS**). A estrutura química geral **A** mostra a denominação dos oxigênios usada nesse estudo, incluindo ângulos e distâncias medidas.

| Código | Estrutura |
|---|---|
| **PS** |  |
| **1** |  |
| **2** |  |

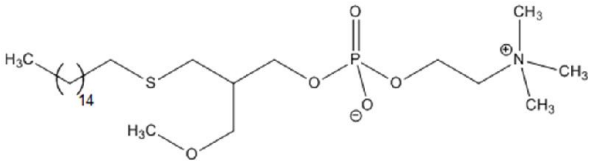
**3**



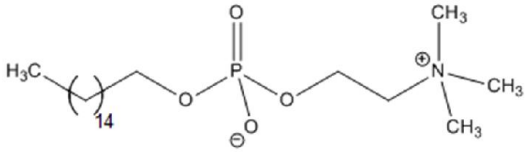
**4**
**(edelfosina)**



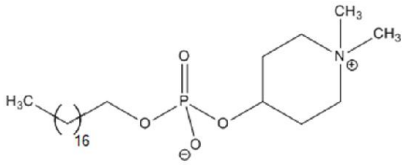
**5**
**(ilmofosina)**



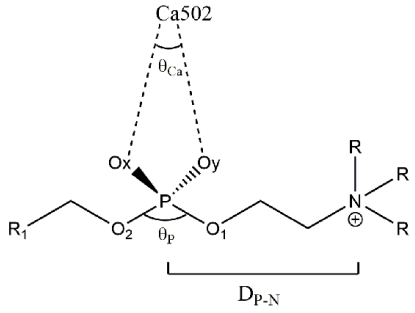
**6**
**(miltefosina)**



**7**
**(perifosina)**



**A**




---

A estrutura da biomacromolécula alvo usada encontra-se depositada na base de dados PDB (*Brookhaven Protein Data Bank*), sob código de entrada **1dsy** (resolução 2,60 Å) (VERDAGUER et al., 1999). Esta estrutura corresponde ao domínio C2 da PKCα na presença de 1,2-dicaproil-*sn*-fosfatidil-L-serina (PS), cálcio, água e íon fosfato. A molécula de água do sítio ativo (aqui representada como W304) foi mantida, pois ela participa nas interações envolvidas com o ligante (figura 3A). O número adequado de hidrogênios foi adicionado a todos os átomos,

e grupos bloqueadores metila foram adicionados ao N e C terminal. O campo de força AMBER (WEINER et al., 1984) foi usado para calcular os tipos atômicos e cargas parciais da proteína. Os resíduos de aminoácido ionizáveis foram modelados de acordo com seu estado predominante em pH 7,4.

### 3.2 Ancoramento molecular e simulações de DM

O programa computacional AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010) foi usado para explorar os modos de interação dos ligantes com energia minimizada dentro do sítio da enzima. A função de classificação é inspirada no X-cscore (WANG; LAI; WANG, 2002), entretanto o AutoDock Vina leva em consideração as contribuições de energia intra e intermolecular na classificação dos compostos. Dessa forma, $\Delta G_{ligação}$ pode ser escrita como:

$$\Delta G_{binding} = \Delta G_{gauss} + \Delta G_{repulsão} + \Delta G_{Hb} + \Delta G_{hidrofóbico} + \Delta G_{tors} \quad \text{(eq. 1)}$$

Em que $\Delta G_{gauss}$ é o termo atrativo para dispersão, que usa duas gaussianas para interações estéricas ($gauss_1$ e $gauss_2$); $\Delta G_{repulsão}$ é o termo de repulsão, calculado como função da distância superficial *d*; $\Delta G_{Hb}$ é o termo referencia à ligação-hidrogênio; $\Delta G_{hidrofóbico}$ se refere a interações hidrofóbicas; e $\Delta G_{tors}$ é proporcional ao número de ligações rotacionáveis na molécula (TROTT; OLSON, 2010).

Os termos específicos para cada contribuição energética são calculados como:

$$gauss_1(d) = e^{\left(-\frac{d}{0{,}5\text{Å}}\right)^2} \quad \text{(eq. 2)}$$

$$gauss_2(d) = e^{\left[\frac{-d-3\text{Å}}{2\text{Å}}\right]^2} \quad \text{(eq. 3)}$$

$$repulsão(d) = \begin{cases} d^2, se\ d < 0 \\ 0, se\ d > 0 \end{cases} \quad \text{(eq. 4)}$$

Em que a distância superficial *d* entre átomos *i* e *j* é definida como:

$$d_{ij} = r_{ij} - R_{ti} - R_{tj} \quad \text{(eq. 5)}$$

Em que *r* é a distância interatômica e $R_t$ é o raio de van der Waals para o átomo de tipo *t*.

O termo hidrofóbico é igual a 1, quando $d < 0,5$ Å; 0, quando $d > 1,5$ Å; e é linearmente interpolado entre esses valores. A ligação-hidrogênio é igual a 1, quando $d < -0.7$ Å; 0, quando $d > 0$ e, de maneira semelhante, é interpolada linearmente entre esses valores.

O algoritmo de otimização usado é o *Iterated Local Search*, no qual uma sucessão de passos constituintes de mutação (10%) com uma otimização local são considerados, sendo que cada passo é recusado ou aceito de acordo com o critério de Metropolis. No AutoDock Vina, essa otimização local é computada usando o algoritmo de Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS), um método quase-newtoniano (NOCEDAL; WRIGHT, 1999).

Uma caixa medindo 30×30×30 pontos de grid foi construída no meio do sítio de interação da proteína, usando o átomo Ca502 como referência. Para cada um dos 7 complexos, 20 procedimentos independentes de *docking* forma conduzidos, iniciados nas mesmas condições, considerando 10 conformações, totalizando 200 conformações para cada ligante. Todas as conformações foram analisadas e a melhor pose foi escolhida com base nas distâncias entre os oxigênios do grupo fosforila (Ox e Oy) dos ligantes e os átomos de cálcio presentes na proteína.

Os 8 complexos (incluindo **PS**) foram minimizados energeticamente no programa MOLSIM 3.2 (DOHERTY, 2002) com os algoritmos de declive máximo e gradientes conjugados, com critério de convergência de 0,01 kcal/mol. As estruturas minimizadas foram usadas como ponto de partida para as simulações de DM. Massas atômicas fictícias de 5000 u.m.a foram atribuídas ao esqueleto carbônico da proteína de maneira a manter a integridade estrutural durante as simulações. Esse procedimento equivale a restringir as posições cartesianas dos átomos, especialmente se as massas atribuídas são grandes o suficiente (TOKARSKI; HOPFINGER, 1997).

Simulações curtas de DM foram empregadas com esquema de aquecimento, aumentando a temperatura de 50 K a 310 K (temperatura corpórea). Os sistemas foram simulados durante 50 ps (tamanho de passo 1 fs) nas temperaturas de 50 K, 100 K, 200 K e 300 K. Este esquema foi adotado para gerar estados de baixa energia de cada complexo de maneira rápida, permitindo o sistema transpor barreiras energéticas durante o aquecimento (TOKARSKI; HOPFINGER, 1997). Cada simulação gerou um PAC, na qual o sistema de menor energia foi escolhido, minimizado e usado como estrutura inicial para a próxima simulação, numa temperatura mais alta. Ao atingir 310 K, todos os complexos foram simulados por 2 ns. Depois de atingido o equilíbrio, o confôrmero de menor energia do ligante foi escolhido e as contribuições de energia de solvatação e ligação-hidrogênio foram computadas com o modelo de camada de hidratação proposto por Hopfinger (1973). A ausência de moléculas explícitas de

água pode levar a artefatos relacionados ao modo de ligação. Entretanto, a inclusão de moléculas explícitas levanta questões sobre o tratamento adequado das águas e introduz a necessidade de simulações longas para alcançar o equilíbrio termodinâmico e amostrar a superfície potencial de maneira satisfatória. Isso também pode levar a artefatos durante a simulação, sobretudo se o sistema não atingiu o equilíbrio. O uso de solvente implícito é uma alternativa viável e computacionalmente eficaz que permite avaliar os efeitos de solvatação em sistemas moleculares estudados (FORSYTHE; HOPFINGER, 1973).

### 3.3 Análise exploratória (HCA e PCA)

O PAC dos sistemas simulados a cada temperatura foi utilizado para selecionar as conformações de menor energia dos ligantes de cada um dos complexos. De maneira semelhante à feita no Capítulo 2, descritores termodinâmicos, eletrônicos e estruturais, bem como distâncias interatômicas entre o ligante e resíduos de aminoácidos, foram calculados com os programas computacionais MOLSIM 3.2, HyperChem 7.51, PyMol (2013) e Gaussian 03W/GaussView 3.0 (FRISCH et al., 2004) (tabela 5).

Tabela 5 - Descritores calculados para os sistemas simulados.

| Descritor | Natureza | Descrição | Método | Programa |
|---|---|---|---|---|
| $\mu_{tot}$ | Eletrônica | Momento dipolar total | HF/6-31G* (d,p) ChelpG (FOCK, 1930; BRENEMAN; WIBERG, 1990; PETERSSON et al., 1988; PETERSSON; AL-LAHAM, 1990) | Gaussian 03W para Windows |
| $E_{str}$ | Termodinâmica | Contribuição de energia de deformação axial | Simulações de DM (Materiais e Métodos) | MOLSIM 3.2 |
| $E_{bend}$ | | Contribuição de energia de deformação angular | | |
| $E_{tors}$ | | Contribuição de energia de deformação torsional | | |
| $E_{1,4}$ | | Contribuição de energia de Lennard-Jones ou 1-4 | | |
| $E_{vdW}$ | | Contribuição de energia de van der Waals | | |
| $E_{el}$ | | Contribuição de energia eletrostática | | |
| $E_{Hb}$ | | Contribuição de energia de ligação-hidrogênio | | |
| $E_{solv}$ | | Contribuição de energia de solvatação | | |
| $E_{inter}$ | | Soma das contribuições | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | intermoleculares de energia de van der Waals e eletrostática | | |
| **$E_{tot}$** | | Energia potencial total | | |
| **SA** | Estérica | Área superficial aproximada | HASEL; HENDRICKSON; STILL, 1988 | HyperChem 7.51 para Windows |
| **Vol** | | Volume de van der Waals da cabeça polar | BODOR; GABAYANI; WONG, 1989; GAVEZOTTI, 1983 | |
| **ClogP** | Hidrofóbica | Coeficiente de partição calculado n-octanol/água | GHOSE; PRITCHETT; | |
| **MR** | Estérica/ Hidrofóbica | Refratividade molar | CRIPPEN, 1988; VISWANADHAN et al., 1989 | |
| **A** | Estérica/ Electronica | Polarizabilidade | MILLER; SAVCHIK, 1979 | |
| **Ox-Ca501** | Distâncias interatômicas | Distância entre Ox e Ca501 | Valores medidos selecionando os átomos especificados | PyMol |
| **Ox-Ca502** | | Distância entre Ox e Ca502 | | |
| **Oy-Ca501** | | Distância entre Oy e Ca501 | | |
| **Oy-Ca502** | | Distância entre Oy e Ca502 | | |
| **$H_2$/W304-Ox** | | Distância entre H número 2 da água 304 e Ox | | |
| **$H_2$/W304-Oy** | | Distância entre H número 2 da água 304 e Oy | | |
| **$H_3$/W304-$O_{1558}$/Asp248** | | Distância entre H número 3 da água 304 e $O_{1558}$ do Asp248 | | |
| **$H_3$/W304-$O_{1559}$/Asp248** | | Distância entre H número 3 da água 304 e $O_{1559}$ do Asp248 | | |
| **$H_{1575}$/Asp249-Ox** | | Distância entre H número 1575 do Asp249 e Ox | | |
| **$H_{1575}$/Asp249-Oy** | | Distância entre H número 1575 do Asp249 e Oy | | |
| **$H_{1595}$/Thr250-Ox** | | Distância entre H número 1595 do Thr250 e Ox | | |
| **$H_{1595}$/Thr250-Oy** | | Distância entre H número 1595 do Thr250 e Oy | | |
| **$H_{564}$/Asn189-Ox** | | Distância entre H número 564 do Asn189 e Ox | | |
| **$H_{564}$/Asn189-Oy** | | Distância entre H número 564 do Asn189 e Oy | | |
| **$N_{1009}$/Arg216-Ox** | | Distância entre N número 1009 do Arg216 e Ox | | |
| **$N_{1009}$/Arg216-Oy** | | Distância entre N número 1009 do Arg216 e Oy | | |
| **$D_{P-N}$** | | Distância interatômica entre P do grupo fosforila e N da cabeça colina | | |
| **$\theta_P$** | Ângulos | Ângulo formado entre os átomos O1-P-O2 | | |
| **$\theta_{Ca}$** | | Ângulo impróprio formado entre os átomos Ox-Ca502-Ou | | |

Após o cálculo dos descritores, a matriz **X** foi gerada para cada temperatura contendo 8 linhas (número de complexos) e 35 colunas (número de variáveis ou descritores) (Anexo 7A deste capítulo). As linhas foram embaralhadas e os valores autoescalados antes dos procedimentos de HCA e PCA, conduzidos no programa Pirouette 3.11 (INFOMETRIX, INC.

1985-2003). O procedimento adotado nos métodos de HCA e PCA foi o mesmo empregado no estudo do Capítulo 2 (seção de Materiais e Métodos). O procedimento de PCA foi processado com até 7 fatores (PCs) e a distância de Mahalanobis foi empregada como diagnóstico de *outliers*.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ancoramento molecular explorou os alinhamentos mais prováveis dos análogos de APC dentro da cavidade PKCα-C2. As poses foram selecionadas levando-se em consideração a menor distância entre os oxigênios do grupo fosforila das APCs e os átomos de cálcio (Ca501 e Ca502), e então comparadas com as mesmas distâncias no complexo PKC-PS (complexo de referência) (tabela 6). As distâncias interatômicas foram refinadas nas simulações de DM.

Table 6 - Resultados das distâncias medidas para as poses selecionadas do procedimento de docking para os ligantes complexados com a PKCα-C2.

| Ligante | Distância Ox-Ca501 (Å) | Distância Ox-Ca502 (Å) | Distância Oy-Ca501 (Å) | Distância Oy-Ca502 (Å) |
|---|---|---|---|---|
| **PS** | 3,7 | 2,5 | 5,4 | 2,2 |
| **1** | 6,8 | 3,9 | 5,3 | 2,6 |
| **2** | 6,0 | 5,7 | 4,2 | 4,2 |
| **3** | 5,9 | 5,9 | 4,8 | 3,9 |
| **4** | 5,1 | 2,4 | 7,4 | 4,7 |
| **5** | 5,5 | 2,7 | 7,4 | 4,5 |
| **6** | 5,1 | 2,6 | 7,2 | 3,9 |
| **7** | 5,3 | 2,4 | 7,1 | 4,3 |

Para cada temperatura, os mesmos descritores moleculares e distâncias foram calculados para os ligantes. Além de permitir que o sistema transponha barreiras energéticas e alcance o equilíbrio, as simulações de DM com esquema de aquecimento também exploram como as interações entre os átomos variam em função da temperatura. Para cada temperatura, as variáveis foram selecionadas de maneira a eliminar informação irrelevante. Os resultados de PCA são mostrados na figura 5 para a temperatura de 310 K. De acordo com a seleção de fatores (figura 5A), as primeiras duas componentes principais foram responsáveis por explicar mais de 84% da variância total dos dados. As tabelas de *loadings* para as outras temperaturas

mostrando a contribuição de cada descritor estão no Anexo 7B deste capítulo.

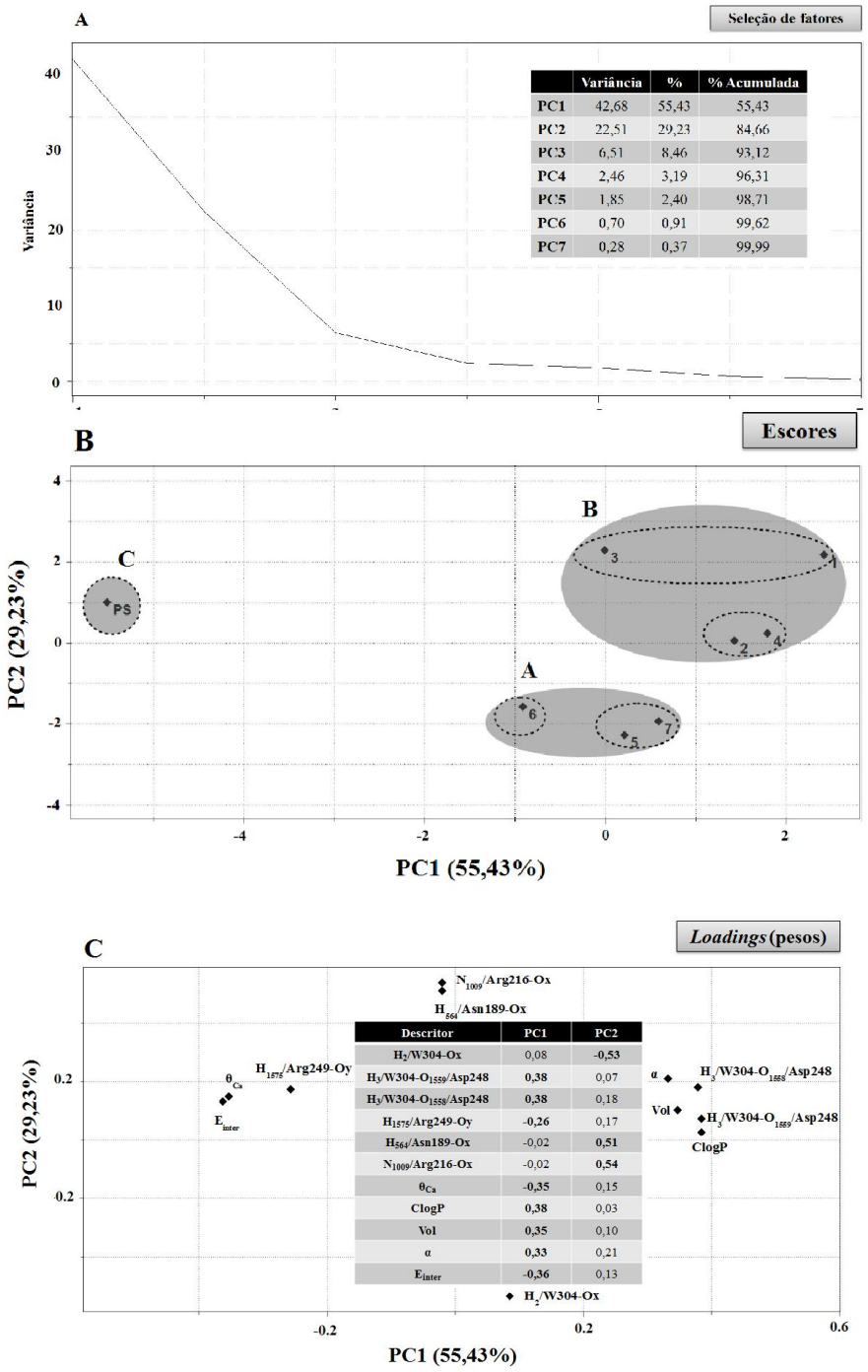



Figura 5 - Resultados do método de PCA. (A) Seleção de fatores (gráfico e tabela). (B) Escores. (C). *Loadings* ou pesos (gráfico e tabela).

O gráfico de escores (figura 5B) mostra que, a 310 K as duas primeiras PCs dividem as amostras em três grupos: **A** (complexos **5**, **6** e **7**), **B** (complexos **1**, **2**, **3** e **4**) e **C** (**PS**). Nota-se que o complexo **PS** mantém-se afastado dos demais compostos.

O gráfico e tabela de *loadings* (figura 5C) fornece informação sobre a distribuição das variáveis nas PCs, e também quais propriedades mais influenciaram a separação dos complexos. Descritores relacionados com o formato/volume, distribuição de carga e hidrofobicidade têm maiores valores absolutos de peso na PC1. A análise dos gráficos de escore e *loadings* mostra que a PC1 define a separação da **PS** dos outros compostos. Essa molécula possui propriedades moleculares distintas quando comparada aos outros ligantes, como menor valor de ClogP (maior hidrofilicidade), menor valor de α (maior concentração de carga) e menor volume molecular. De maneira semelhante, a posição dos complexos **1**-**7** é caracterizada por altos valores de pesos de ClogP, α e Vol, sugerindo que modificações moleculares que alterem essas propriedades na **PS** poderiam tornar esse composto mais semelhante e próximo aos outros ligantes. Diferentes ligantes podem desencadear diferentes padrões de ativação e localização da PKC. Embora as características estruturais específicas que levam a esses diferentes padrões não sejam totalmente conhecidas, sabe-se que a lipofilicidade é um dos fatores importantes pelo menos para a interação com o domínio C1 (KEDEI et al., 2004; WANG et al., 2000).

É importante citar a influência da distância $H_{1575}$/Arg249-Oy na classificação e posição do complexo **PS** e a possibilidade de formação de ligação de hidrogênio. A distância entre o átomo doador e aceptor para que uma ligação de hidrogênio seja formada é da ordem de 2,6 – 3,5 Å (OVERINGTON et al., 1990). Considerando o comprimento da ligação H–O como sendo de aproximadamente 1,0 Å (KHAN, 2000), a distância entre o átomo de H e o doador/aceptor deve menos que 2,5 Å para que a interação seja possível. Os valores medidos para a distância entre Ox e Oy da **PS** até $H_{1575}$/Arg249 (Anexo 7A, tabela I) mostram que eles são maiores que o valor limite de ~ 2,5 Å, impossibilitando formação de ligação-hidrogênio nesse ligante. Em contrapartida, as APCs estão orientadas de tal forma que estes átomos são capazes de interagirem entre si. Essa tendência, entretanto, é maior em baixas temperaturas, e conforme o sistema ganha mobilidade, menos ligantes são capazes de se posicionar numa distância ideal para formação de ligação-hidrogênio. A 310 K, apenas os ligantes dos complexos **2**, **4** e **7** têm essa possibilidade (a 50 K, por exemplo, os complexos **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **7** são virtualmente capazes de interagirem por ligação-hidrogênio nesses átomos).

À medida que a temperatura aumenta PC1 começa a ter mais participação de descritores relacionados a distâncias entre as cadeias laterais de aminoácidos e os ligantes, assim como a

influência da molécula de água. Em baixas temperaturas, os ligantes e a biomacromolécula não têm mobilidade suficiente e, portanto, essas distâncias não têm relevância significante na classificação dos complexos. Ao aumentar a temperatura, os sistemas ganham energia cinética e interações intermoleculares começam a ser estabelecidas. A 310 K, observa-se a participação dos resíduos Asp248, Asn189 e Arg216, bem como W304.

Outra característica interessante é a contribuição do descritor $E_{inter}$, possivelmente substituindo o descritor $E_{sol}$ (cuja contribuição é relevante a baixas temperaturas). Com o aumento da temperatura, as interações entre os ligantes e a biomacromolécula começam a se tornar mais evidentes, ao passo que a interação ligante-solvente torna-se menos importante. Esse fato pode ser interpretado como a perda da camada de solvatação ao redor dos ligantes à medida que eles se posicionam para interagir com aminoácidos da enzima. A ausência dos descritores $E_{el}$ e $E_{vdW}$ na PC1 e PC2 sugere que as contribuições energéticas intramoleculares são menos relevantes que as interações intermoleculares.

Enquanto a PC1 define a separação da **PS** dos demais compostos, a PC2 determina a posição dos complexos **1**-**7**. Os sistemas **1**, **3**, **5**, **6** e **7** possuem maiores valores de escore na PC2 e são mais afetados por variáveis com alto valor absoluto de peso nessa componente como $H_2$/W304-Ox, $H_{564}$/Asn189-Ox e $N_{1009}$/Arg216-Ox.

O gráfico de diagnóstico de *outliers* (figura 6) mostra que, de acordo com as propriedades calculadas, as amostras compartilham similaridades na estrutura química, não sendo observada nenhuma amostra anômala, considerando o intervalo de confiança de 95%.

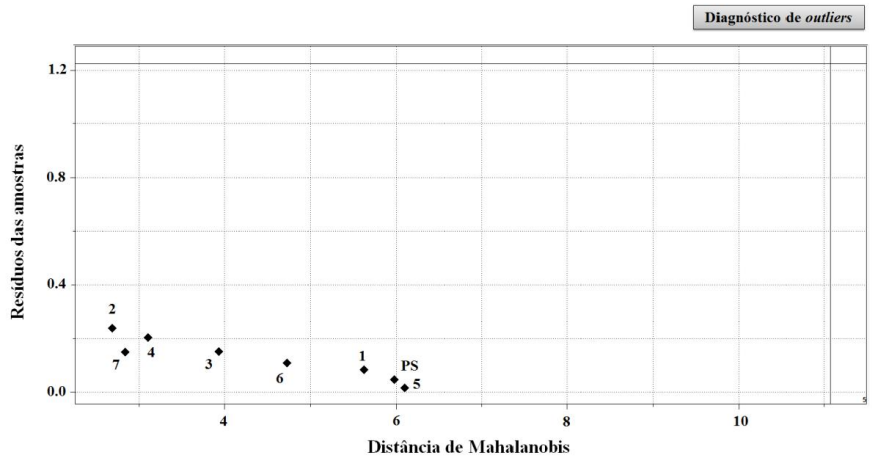



Figura 6- Gráfico da distância de Mahalanobis *versus* Resíduos das amostras. As linhas na borda direita e superior do gráfico representam o limite de confiança de 95%.

O procedimento de HCA reforçou o padrão de separação observado no PCA, como

pode ser visto no dendrograma das amostras (figura 7A). Os descritores $E_{inter}$, $\theta_{Ca}$, $H_{1575}$/Arg249-Oy, $N_{1009}$/Arg216-Ox e $H_{564}$/Asn189-Ox fazem parte do mesmo *cluster*, sugerindo que a contribuição de energia intermolecular tem a participação de Ca502, Arg249, Arg216 e Asn189 (figura 7B). O átomo de cálcio e os resíduos citados participam de alguma forma de interações com os ligantes, e eles parecem ser importantes para o processo de ligação das moléculas no sítio da enzima. As propriedades moleculares α, Vol e ClogP formam um agrupamento separado, juntamente com descritores que relacionam o posicionamento da água 304. O volume da cabeça polar parece influenciar a posição da água, sendo essa alteração refletida no aumento da distância até Asp248.

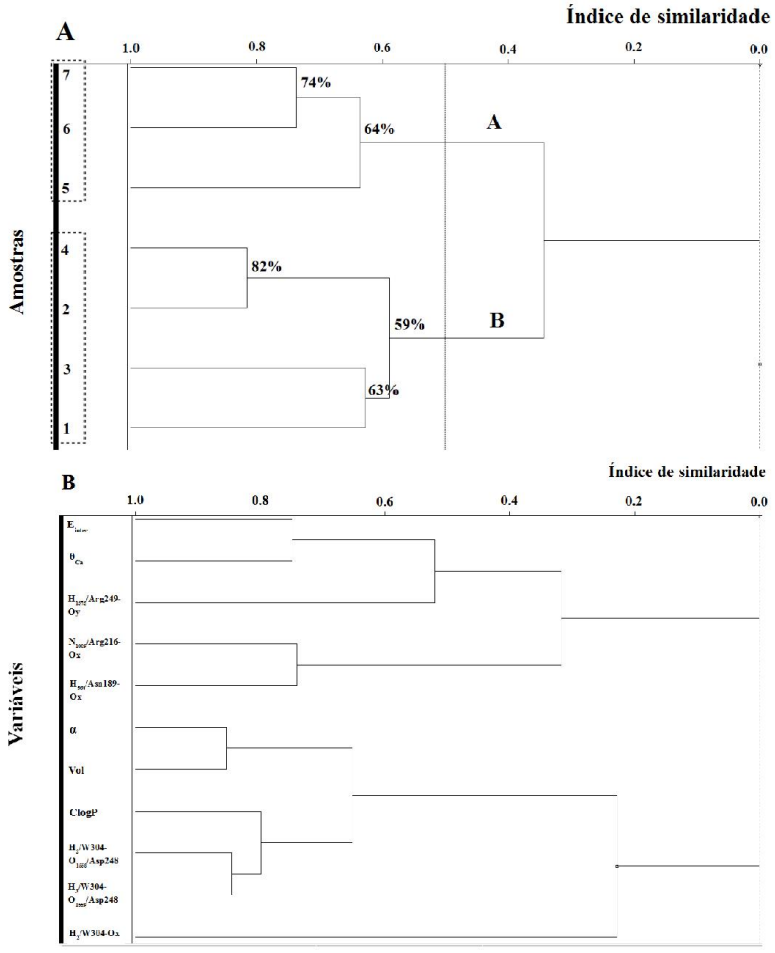


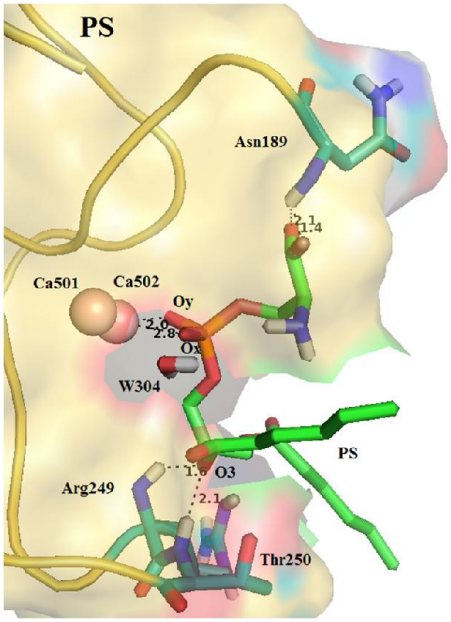

Figura 7 - Resultados do método de HCA. (A) Dendrograma de amostras. (B) Dendrograma de variáveis.

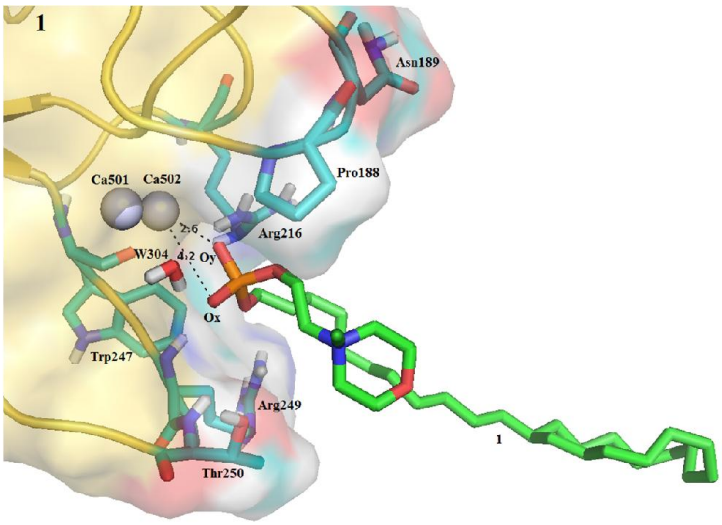
Com relação ao dendrograma das amostras, usando um índice de similaridade de 0,5 (linha cheia na figura 7A), os mesmos três grupos observados no PCA são formados: **A** (64% de similaridade), **B** (59% de similaridade) e **C** (0% de similaridade). **PS** não foi agrupada em

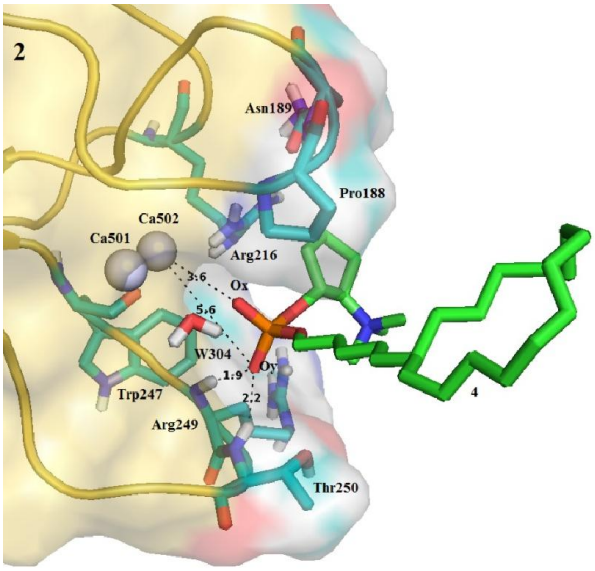
nenhum *cluster*, reforçando a ideia de que essa molécula possui modo de ligação distinto das demais. O *cluster* **A** é formado pela ilmofosina (**5**), miltefosina (**6**) e perifosina (**7**). Os complexos **6** e **7** formam um subgrupo com 74% de similaridade, e **5** se junta a este grupo em 64% de similaridade. As três moléculas apresentam maior distância $H_2$/W304-Ox quando comparadas aos outros ligantes, indicando que ligação-hidrogênio não é possível nestes casos. É importante lembrar que na estrutura do cristal 1dsy, ligação de hidrogênio entre W304 e **PS** não é reportada. Da mesma forma, não parece possível que a maioria dos complexos estabeleça ligação de hidrogênio com a água, mas, a julgar pelas distâncias, as moléculas do *cluster* **1**-**4** estão posicionadas mais próximas da W304. Os ligantes do *cluster* **A** apresentam menores valores de distância $N_{1009}$/Arg216-Ox, sugerindo a possibilidade de interação eletrostática entre o nitrogênio e o oxigênio mais forte que nas outras moléculas.

O cluster **B** é formado a 59% de similaridade. Os complexos **2** e **4** (edelfosina) são os primeiros a se agruparem com 82% de similaridade. O ângulo $\theta_{Ca}$ para esses complexos (21° e 25° para **2** e **4**, respectivamente) é mais agudo quando comparado a outros ligantes e substancialmente diferente de **PS** (61°). Considerando que a distância O–P da porção fosforila não varie significantemente durante as simulações, assim como a distância entre O1 e O2, este ângulo mais agudo indica que a cabeça polar está posicionada mais distante do Ca502, e estabelece interação eletrostática fraca. Todos os ligantes neste grupo estão posicionados de tal maneira que as distâncias $H_{564}$/Asn189-Ox e $N_{1009}$/Arg216-Ox estão maximizadas, descartando a possibilidade de interação entre esses átomos. O grupo volumoso *N*,*N*-dimetiltropano parece impedir o posicionamento adequado do ligante **3** para contribuir com Ox e Oy na interação com Ca502.

A figura 8 mostra que os complexos **1**-**7** não conseguem contribuir com Ox e Oy ao mesmo tempo para interagir com Ca502, como acontece com a **PS**. É importante mencionar que tanto Ox quanto Oy devem participar da complexação com cálcio, e embora algumas distâncias estejam dentro de um raio ideal de ~3,4 Å para interação eletrostática (considerando uma geometria octaédrica) (HARDING, 2000), apenas **PS** pode contribuir simultaneamente com os 2 oxigênios para essa interação.


PS
Asn189
2.1
1.4
Ca501
Ca502
Oy
2.0
2.8
Ox
W304
PS
1.6
O3
Arg249
2.1
Thr250


1
Asn189
Pro188
Ca501
Ca502
2.6
Arg216
W304
4.2
Oy
Ox
Trp247
Arg249
Thr250
1


2
Asn189
Pro188
Ca502
Ca501
Arg216
3.6
Ox
5.6
W304
Oy
1.9
2.2
Trp247
Arg249
Thr250
4

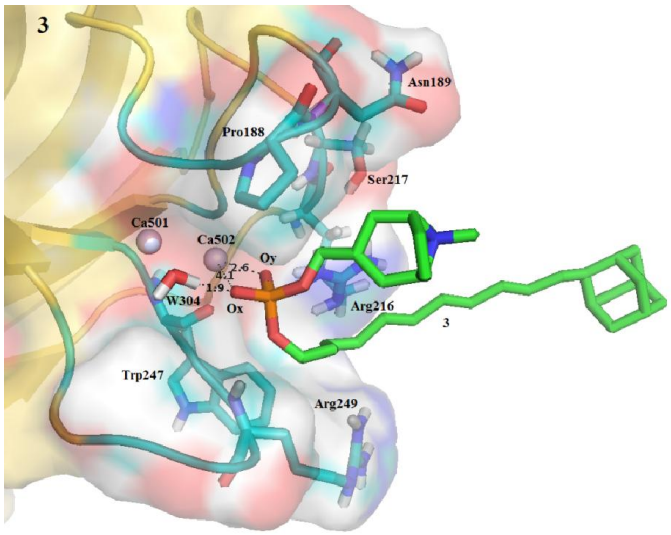

3
Asn189
Pro188
Ser217
Ca501
Ca502
Oy
2.6
4.1
1.9
W304
Ox
Arg216
3
Trp247
Arg249

Fig. 8. Continuação

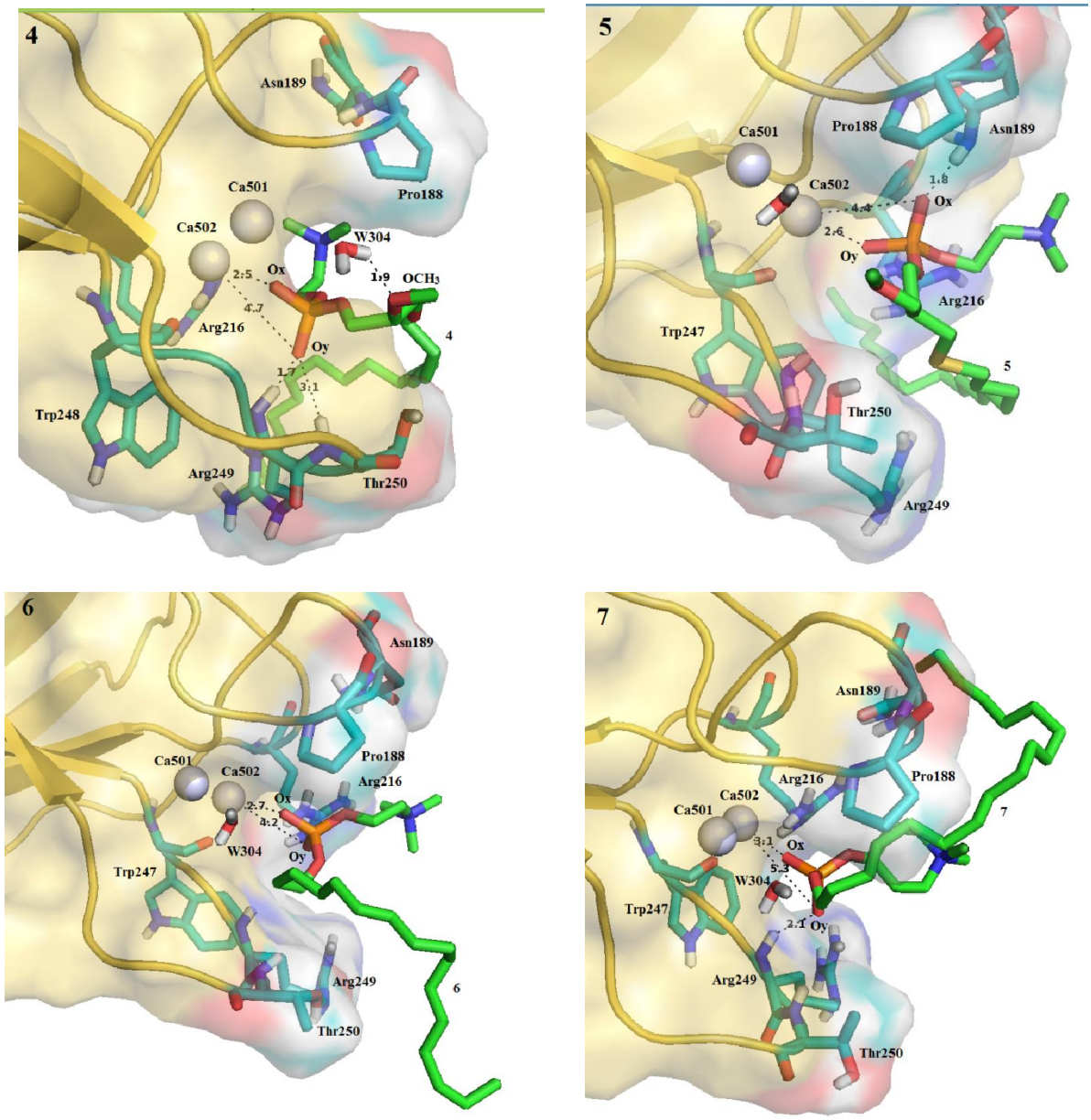



Figura 8 - Resultados do ancoramento molecular da fosfatidilserina (**PS**) e análogos de APC (complexos **1**-**7**) no sítio regular C2 da PKCα. As posições foram ajustadas por simulações de DM a 310 K. Os ligantes estão posicionados de maneira a tornar fácil a visualização das interações mais relevantes. Os carbonos dos resíduos de aminoácidos estão representados em ciano. Os carbonos dos ligantes estão em verde. Nitrogênio está representado por azul-escuro; fósforo está representado pela cor laranja; oxigênio está representado pela cor vermelha; os átomos de cálcio (Ca501 e Ca502) estão representados como esferas cinza; enxofre está representado pela cor amarela; os átomos de hidrogênio polares estão representados pela cor branca. Os hidrogênios apolares foram ocultados de maneira a facilitar a visualização. As distâncias entre átomos relevantes (medidas em Å) estão representadas como linhas pontilhadas. A identificação dos resíduos relevantes, átomos de oxigênio

(Ox e Oy) bem como dos ligantes encontra-se em preto ao lado de cada molécula. A área sombreada ao redor da biomacromolécula representa o volume superficial de van der Waals de cada resíduo, ressaltando a impossibilidade da enzima em acomodar o grupo catiônico dos ligantes **1**-**7**.

Na **PS**, o oxigênio carboxílico da porção serina está suficientemente perto do $H_{564}$/Asn189, estabelecendo uma possível ligação-hidrogênio. O átomo O3 (tabela 4) da cadeia alquílica, está localizado a 1,6 Å de $H_{1575}$/Arg249 e a 2,1 Å de $H_{1595}$/Thr250, possivelmente interagindo com esses átomos. Essas ligações auxiliam o posicionamento adequado do grupamento fosforila de maneira a interagir eficientemente com o átomo Ca502. Ox e Oy estão a 2,8 Å e 2,0 Å do Ca502, respectivamente,

No complexo **2**, Oy está posicionado a 1,9 Å de $H_{1575}$/Arg249 e 2,2 Å $H_{1595}$/Thr250, possivelmente estabelecendo ligações-hidrogênio com um desses dois átomos. Esses aminoácidos não estão perto dos íons cálcio e a ligação-hidrogênio formada afasta Oy do Ca502. No complexo **3**, Ox está orientado de maneira a estabelecer ligação-hidrogênio com $H_2$/W304 (distância de 1,9 Å). Semelhante ao ligante **2**, Oy do composto **4** (edelfosina) está posicionado a 1,7 Å de $H_{1575}$/Arg249 e 3,1 Å de $H_{1595}$/Thr250. O grupo metoxila da edelfosina está próximo ao $H_3$/W304 (1,9 Å), o que auxilia a manter o ligante nessa posição. No complexo **5**, Ox está suficientemente perto de $H_{564}$/Asn189 (1,8 Å) e apenas Oy parece estar disponível para interagir com cálcio. O ligante **7** também está posicionado de maneira que Oy está próximo a $H_{1575}$/Arg249 (2,1 Å). Embora Ox e Oy dos ligantes **1** e **6** não pareçam estabelecer ligações-hidrogênio com resíduos próximos, o grupo catiônico volumoso impede o posicionamento da fosforila próximo a Ca502. Em **1**, apenas Oy parece interagir com Ca502, e em **6**, Ox é capaz de complexar com o cálcio.

A porção catiônica das APCs parece desempenhar papel importante no ajuste dentro do sítio do C2-PKCα. Este grupo é muito mais volumoso que a amina primária da **PS** e parece impedir a aproximação do grupo fosforila aos átomos de cálcio. Além disso, esse grupo nas APCs não possui um doador de ligação de hidrogênio (como o oxigênio carboxílico da **PS**) para estabelecer contato com $H_{564}$/Asn189. Desta forma, um dos oxigênios da fosforila das APCs acaba sendo o substituto para a interação com o átomo de hidrogênio da Asn189. De maneira semelhante, a falta do oxigênio O3 na cadeia alquílica dos compostos **1**-**7** faz com que o Oy seja o substituto e interaja com $H_{1575}$/Arg249 ou com $H_{1595}$/Thr250. Nota-se que o sítio de interação C2 da PKCα não possui uma região que acomode grupos volumosos e hidrofóbicos ligados ao nitrogênio [como *N*,*N*,*N*-trimetilamina (**4**, **5**, **6**), *N*,*N*-dimetil-tropano (**3**), *N*,*N*-dimetil-piperidina (**7**), *trans*-*N*,*N*,*N*-dimetil-ciclopentanamina (**2**) e *N*-

dimetilmorfolina (**1**)]. Além disso, a cavidade deste sítio é principalmente composta por resíduos polares ou carregados, como os que interagem com o cálcio (Met186, Asp187, Asp193, Asp246, Trp247, Asp248, Asp254), e com a fosfatidilserina (Asn189, Arg249, Thr250) (figura 3), de forma que interações hidrofóbicas, que poderiam estabilizar os substituintes do grupo catiônico, não estão presentes. As cadeias laterais da Asn189 e Pro188 impedem o acesso da porção catiônica ao interior da enzima. Além disso, esses resíduos não estabelecem nenhum tipo de interação com o nitrogênio quaternário do ligante. A cadeia lateral positiva da Arg216 bloqueia a entrada mais profunda da porção catiônica dos ligantes, provavelmente por repulsão eletrônica. No complexo de referência, a Arg216 está posicionada de maneira que o grupo guanidina parece interagir com os oxigênios carboxílicos do Asp193 e o oxigênio carbonílico da cadeia alquílica da **PS**, permitindo a entrada profunda do ativador endógeno na enzima. A cadeia lateral positiva da Arg249 e os resíduos Trp247 e Thr250 impedem a aproximação do nitrogênio quaternário das APCs, sendo que os ligantes não têm acesso ao interior da enzima por esta entrada. Entretanto, como abordado, no complexo de referência, Arg249 ajuda o posicionamento da **PS** através de uma ligação-hidrogênio entre O3 e $H_{1575}$. O volume superficial de cada resíduo (área sombreada ao redor da biomacromolécula – figura 8) ressalta que as cadeias laterais de Pro188, Asn189, Arg216, Trp247, Arg249 e Thr250 bloqueiam a aproximação do grupo catiônico por impedimento estérico.

Dessa forma, a falta de uma região que acomode grupos volumosos, a impossibilidade de interações hidrofóbicas e a repulsão eletrônica criada por certos resíduos, bloqueiam a acomodação profunda dos ligantes e forçam as APCs a se posicionarem de tal forma que os oxigênios da fosforila interajam com os resíduos circundantes, ao invés de se complexarem com o cálcio. Uma vez que o número de interações com o cálcio é menor, a afinidade de ligação deste íon com a enzima diminui, impossibilitando sua permanência no sítio regulador da enzima. A ausência de átomos de cálcio faz com que os eventos conformacionais que levam à ativação da PKC não ocorram e, dessa forma, a enzima não migra para a porção aniônica da membrana plasmática e não reconheça o outro ativador endógeno do domínio C1, DAG (GUERRERO-VALERO et al., 2009). Os eventos subsequentes que dependem da PKC ativada ficam bloqueados, resultando em diminuição da atividade das vias ilustradas na figura 4 (KHEIFETS; MOCHLY-ROSEN, 2007). Usando estudos de mutagênese sítio-dirigida, Scott e colaboradores (2013) observaram que a afinidade da PKC pela membrana é diminuída por mutações no domínio C2 que reduzem ligação do $Ca^{2+}$, e essa redução da afinidade contribui para o tratamento do câncer.

É importante ressaltar que a estrutura química da cadeia alquílica, isto é, a presença de insaturações, ramificações ou substituintes, não parece influenciar de maneia significante no processo na ligação ao sítio regulador da PKCα, visto que ligantes com cadeias alquílicas essencialmente diferentes são agrupados no mesmo *cluster* (**1** e **4**), e ligantes com cadeias alquílicas semelhantes fazem parte de grupos distintos (**4** e **5**). Entretanto, a cadeia alquílica parece influenciar na lipofilicidade dos compostos, que é função apenas do número e tipo de átomos da molécula e seu estado de hibridação (VISWANADHAN et al., 1989), sem levar em consideração ramificações ou substituintes volumosos. Sabe-se também que o equilíbrio hidrofílico-hidrofóbico é essencial para a penetração de moléculas no interior da célula e, nesse sentido, a estrutura e o tamanho da porção apolar têm relevância. Como nesse estudo as variáveis medidas se referem especificamente à interação com o sítio regulador C2 da PKCα, não foi observada participação da cauda apolar.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados forneceram informações sobre o modo de ligação de diferentes ligantes derivados da miltefosina no domínio regulador C2 da PKCα, elucidando um possível mecanismo de ação de inibição desse alvo. O grupo catiônico volumoso das APCs impede a aproximação aos íons $Ca^{2+}$, fazendo com que os átomos de oxigênio da porção fosforila interajam com outros resíduos de aminoácidos, estando menos disponíveis para complexação com o cálcio. Dessa forma, a afinidade de ligação dos íons diminui, e a ativação da PKCα, fica comprometida.

Os métodos de PCA e HCA permitiram identificar os resíduos de aminoácidos e distâncias relevantes nesse processo de interação, determinando diferenças no modo de ligação das APCs quando comparadas ao ativador endógeno **PS**, bem como similaridades nesta interação, como a preferencia pela interação com $H_{1575}$/Arg249. A metodologia também ressaltou a influência de descritores moleculares relacionados à hidrofobicidade, volume da cabeça polar e carga, reforçando a hipótese de que a natureza da porção fosfocolina (ou análogo) é importante para o modo de ligação. Essa informação pode auxiliar o planejamento de fármacos inibidores de PKC.

A interação competitiva com relação à fosfatidilserina faz das APCs candidatos promissores à inibição do domínio regulador da PKCα que, como mostrado, desempenha papel importante na ativação da enzima e na cascata de sinalização de fatores de crescimento

celular.

## 6. REREFÊNCIAS

ALI, A. S.; ALI, S.; EL-RAYES, B. F.; PHILIP, P. A.; SARKAR, F. H. Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy. **Cancer Treat Rev**, v. 35, n. 1, p. 1-8, 2009.

BARRATT, G.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M.; LOISEAU, P.M. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. **Curr Drug Metab,** v. 10, n. 3, p. 247-255, 2009.

BODOR, N.; GABANYI, C.; WONG, C. A new method for the estimation of partition coefficient. **J Am Chem Soc**, v. 111, n. 11, p. 3783-3786, 1989.

BONINI, J. S.; CAMMAROTA, M.; KERR, D. S.; BEVILAQUA, L. R. M.; IZQUIERDO, I. Inhibiton of PKC in basolateral amygdale and posterior parietal cortex impairs consolidation of inhibitory avoidance memory. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 80, p. 63-67, 2005.

BOSCO, R.; MELLONI, E.; CELEGHINI, C.; RIMONDI, E.; VACCAREZZA, M.; ZAULI, G. Fine tuning of protein kinase C (PKC) isoforms in cancer: shortening the distance from the laboratory to the bedside. **Mini Rev Med Chem,** v. 11, n. 3, p. 185-199, 2011.

BRENEMAN, C. M.; WIBERG, K. B.; Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potencials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis. **J Comput Chem**, v. 11, n. 3, p. 361-379, 1990.

CONESA-ZAMORA, P.; LOPEZ-ANDREO, M. J.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; CORBALÁN-GARCÍA, S. Identification of the phosphatidylserine binding site in the C2 domain that is important for PKC alpha activation and in vivo cell localization. **Biochemistry,** v. 40, n. 6, p. 13898-13905, 2001.

CONESA-ZAMORA, P.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; CORBALÁN-GARCÍA, S. The C2 domain of protein kinase calpha is directly involved in the diacylglycerol-dependent binding of the C1 domain to the membrane. **Biochim Biophys Acta**, v. 1787, n. 2-3, p. 246-254, 2000.

CORBALÁN-GARCÍA, S.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, n. 7, p. 633-654, 2006.

D'COSTA, A. M.; ROBINSON, J. K.; MAUDUDI, T.; CHATURVEDI, V.; NICKOLOFF, B. J.; DENNING, M. F. The proapoptotic tumor suppressor protein kinase C-delta is lost in human squamous cell carcinomas. **Oncogene**, v. 25, n. 3, p. 378-386, 2006.

DOHERTY, D. **MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software, User's Guide**; versão: 3.2; Chem21 Group: Lake Forest, IL, 2002.

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H., DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p.2576-2597, 2012.

EIBL, K. H.; BANAS, B.; SCHOENFELD, C. L.; MAY, C. A.; NEUBAUER, A. S.; PRIGLINGER S.; KAMPIK, A.; LUSSEN-WELGE, U. Alkylphosphocholines Inhibit Proliferation of Human Retinal Pigment Epithelial Cells. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 44, n. 8, p. 3556-3561, 2003.

FISCHER, E. Einfluss der konfiguration auf die wirkung der enzyme. **Ber Dt Chem Ges**, v. 27, p. 2985-2993, 1894.

FOCK, V. Näaherungsmethode zur Lösung des quantenmechanischen Mehrkörper-problems. **Z phys**, v. 61, p. 126-148, 1930.

FORSYTHE, K. H.; HOPFINGER, A. J. The influence of solvent on the secondary structures of poly(L-alanine) and poly(L-proline). **Macromolecules**, v. 6, n. 3, p. 423-437, 1973.

FRISCH, M. J. et al. **Gaussian 03, Revision B.02**, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2004.

GAVEZZOTTI, A. The calculation of molecular volumes and the use of volume analysis in the investigation of structured media and of solid-state organic reactivity. **J Am Chem Soc** v. 105, n. 16, p. 5220-5225, 1983.

GHOSE, A. K.; PRITCHETT, A.; CRIPPEN, G. M. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships III: modeling hydrophobic interactions. **J Comput Chem**, v. 9, n. 1, p. 80-90, 1988.

GONELLI, A.; MISCHIATI, C.; GUERRINI, R.; VOLTAN, R.; SALVADORI, S.; ZAULI, G. Perspectives of protein kinase C (PKC) inhibitors as anti-cancer agents. **Mini Rev Med Chem**, v. 9, n. 4, p. 498-509, 2009.

GRINER, E. M.; KAZANIETZ, M. G. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. **Nat Rev Cancer,** v. 7, n. 4, p. 281-294, 2007.

GROSSONI, V. C.; TODARO, L. B.; KAZANIETZ, M. G.; DE KIER JOFFÉ, E. D.; URTREGER, A. J. Opposite effects of protein kinase C beta1 (PKCbeta1) and PKCepsilon in the metastatic potential of a breast cancer murine model. **Breast Cancer Res Treat,** v. 118, n. 3, p. 469-480, 2009.

GRUNICKE, H. H.; MALY. K.; UBERALL. F.; SCHUBERT. C.; KINDLER. E.; STEKAR. J.; BRACHWITZ. H. Cellular signalling as a target in cancer chemotherapy. Phospholipid analogues as inhibitors of mitogenic signal transduction. **Adv Enzyme Regul,** v. 96, p. 385-407, 1996.

GUERRERO-VALERO, M.; FERRER-ORTA, C.; QUEROL-AUDI, J.; MARIN-VICENTE, C.; FITA, I.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C.; VERDAGUER, N.; CORBALÁN-GARCÍA, S. Structural and mechanistic insights into the association of PKCα-C2 domain to PtdIns(4,5)$P_2$. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 106, n. 16, p. 6603-6607, 2009.

HARDING, M. M. Geometry of metal ligand interactions in proteins. **Acta Cryst D**, v. 57, p. 401-411, 2000.

HASEL, W.; HENDRICKSON, T. F.; STILL, W. C. A rapid approximation to the solvent accessible surface areas of atoms. **Tet Comput Meth**, v. 1, n. 2, p. 103-116, 1988.

HOFMANN, J.; Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 142, p. 1-96, 2001.

HOPFINGER, A. J. **Conformational Properties of Macromolecules**. Academic Press, New York, 1973, p. 71.

HYPERCUBE INC. **Hyperchem Program Release 7.51 para Windows**, Gainesville, FL, 2003. (Conjunto de dados. Ambiente operacional).

INFOMETRIX, INC. Pirouette. **Multivariate Data Analysis: User's Guide**. Versão: 3.11. Woodinville, WA, 1985- 2003. CD-ROM.

INOUE, M.; KISHIMOTO, A.; TAKAI, Y.; NISHIZUKA, Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its

activation by calcium-dependent protease from rat brain**. J Biol Chem**, v. 254, n. 21, p. 7610-7616, 1977.

JASINSKI, P.; ZWOLAK, P.; TERAI, K.; BORJA-CACHO, D.; DUDEK, A. Z. PKC-alpha inhibitor MT477 slows tumor growth with minimal toxicity in in vivo model of non-Ras-mutated cancer via induction of apoptosis. **Invest New Drugs**. v. 29, n. 1, p. 33-40, 2011.

KEDEI, N.; LUNDBERG, D. J.; TOTH, A.; WELBURN, P.; GARFIELD, S. H.; BLUMBERG, P. M. Characterization of the interaction of ingenol 3-angelate with protein kinase C. **Cancer Res**, v. 64, n. 9, p. 3243-3255, 2004.

KHAN, A. A Liquid Water Model: Density Variation from Supercooled to Superheated States, Prediction of H-Bonds, and Temperature Limits. **J Phys Chem B**, v. 104, n. 47, p. 11268-11274, 2000.

KHEIFETS, V.; MOCHLY-ROSEN, D. Insight into intra- and inter-molecular interactions of PKC: design of specific modulators of kinase function. **Pharmacol Res**, v. 55, n. 6, p. 467-476, 2007.

LANDGRAF, K. E.; MALMBERG, N. J.; FALKE, J. J. Effect of $PIP_2$ Binding on the Membrane Docking Geometry of PKCα C2 Domain: An EPR Site-Directed Spin-Labeling and Relaxation Study. **Biochemistry**, v. 47, n. 32, p. 8301-8313, 2008.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications***,* 2.ed. Londres: Prentice Hall, 2001. 744p.

LIOU, J. S.; CHEN, J. S.; FALLER, D. V. Characterization of p21Ras-mediated apoptosis induced by protein kinase C inhibition and application to human tumor cell lines. **J Cell Physiol**, v. 198, n. 2, p. 277-294, 2004.

MANDIL, R.; ASHKENAZI, E.; BLASS, M.; KRONFELD, I.; KAZIMIRSKY, G.; ROSENTHAL, G.; UMANSKY, F.; LORENZO, P. S.; BLUMBERG, P.M.; BRODIE, C. Protein kinase Calpha and protein kinase Cdelta play opposite roles in the proliferation and apoptosis of glioma cells. **Cancer Res,** v. 61, n. 11, p. 4612-4619, 2001.

MARENGO, B. et al. Protein Kinase C: An Attractive Target for Cancer Therapy. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 1, p. 531-567, 2011.

MARMOR, M. D.; SHAKIA, K. B. YARDEN, Y. Signal transduction and oncogenesis by Erb/HER receptors. **Int J Radian Oncol Bio Phys,** v. 58, n. 1, p. 903-913, 2004.

MELLOR, H.; PARKER. P.J. The extended protein kinase C superfamily. **Biochem J,** v.332 (Pt.2), p.281-292.

MEYER, T. et al. A derivative of staurosporine (CGP 41 251) shows selectivity for protein kinase C inhibition and in vitro anti-proliferative as well as in vivo anti-tumor activity. **Int J Cancer**, v. 43, n. 5, p. 851-856, 1989.

MILLER, K.J.; SAVCHIK, J. A new empirical method to calculate average molecular polarizabilities. **J Am Chem Soc**, v. 101, n. 24, p. 7206-7213, 1979.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, 1ª ed., São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. 539p.

NALEFSKI, E. A.; NEWTON A. C. Membrane binding kinetics of protein kinase CβII mediated by the C2 domain. **Biochemistry,** v. 40, n. 44, p. 13216-13229, 2001.

NISHIZUKA, Y. Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. **FASEB J,** v. 9, n. 7, p. 484-496, 1995.

NOCEDAL, J.; WRIGHT, S. J. Numerical Optimization. **Springer Series in Operations Research**, Eds. Peter Glynn, Stephen M. Robinson, Springer: Nova Iorque, 1999.

OVERINGTON, J. P.; JOHNSON, M. S.; SALI, A.; BLUNDELL, T. L. Tertiary constraints on protein evolutionary diversity: Templates, key residues and structural prediction. **Proc Roy Soc London B**, v. 241, p. 132-145, 1990.

PAN, Q.; BAO, L. W.; KLEER, C. G.; SABEL, M. S.; GRIFFITH, K. A.; TEKNOS, T. N.; MERAJVER, S. D. Protein kinase C epsilon is a predictive biomarker of aggressive breast cancer and a validated target for RNA interference anticancer therapy. **Cancer Res**, v. 65, n. 18, p. 8366-8371, 2005.

PAPAZAFIRI, P.; AVLONITIS, N.; ANGELOU, P.; CALOGEROPOULOU, T.; KOUFAKI, M.; SCOULICA, E.; FRAGIADAKI, I. Structure-activity relationships of antineoplastic ring-substituted ether phospholipid derivatives. **Cancer Chemother Pharmacol,** v. 56, n. 3, p. 261-270, 2005.

PETERSSON, G. A.; AL-LAHAM, M. A. A complete basis set model chemistry. II. Open-shell systems and the total energies of the first-row atoms. **J Chem Phys**, v. 94, n. 9, p. 6081-6091, 1990.

PETERSSON, G. A.; BENNETT, T. G.; TENSFELDT, M. A.; AL-LAHAM, W. A.; SHIRLEY, J. M.; MANTZARIS, J. A complete basis set model chemistry. I. The total energies of closed-shell atoms and hydrides of the first-row elements. **J Chem Phys**, v. 89, n. 4, p. 2193-2219, 1988.

SCOTT, A. M.; ANTAL, C. E.; NEWTON, A. C. Electrostatic and Hydrophobic Interactions Differentially Tune Membrane Binding Kinetics of the C2 Domain of Protein Kinase Cα. **J Biol Chem**, v. 288, n. 23, p. 16905-16915, 2013.

SHOJI, M.; RAYNOR, R. L.; FLEER, E. A.; EIBL, H.; VOGLER, W. R.; KUO, J. F. Effects of hexadecylphosphocholine on protein kinase C and TPA-induced differentiation of HL60 cells. **Lipids**, v. 26, n. 2, p. 145-149, 1991.

TAKAHASHI, I. et al. UCN-01, a selective inhibitor of protein kinase C from Streptomyces. **J Antibiot (Tokyo)**, v. 40, p. 1782-1784, 1987.

THE PYMOL **Molecular Graphics System**, versão: 1.5.0.4 Schrödinger, LLC, 2013.

TOKARSKI, J.S.; HOPFINGER, A. J. Constructing protein models for ligand- receptor binding thermodynamic simulations: An application to a set of peptidometic rennin inhibitors. **J.Chem Inf Comput Sci,** v. 37, n. 4, p. 779-791, 1997.

TOTOŃ, E.; IGNATOWICZ, E.; SKRZECZKOWSKA, K.; RYBCZYŃSKA, M. Protein kinase Cε as a cancer marker and target for anticancer therapy. **Pharmacol Rep**, v. 63, n. 1, p. 19-29, 2011.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J Comput Chem**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

ÜBERALL, F.; MALY, K.; EGLE, A.; DOPPLER, W.; HOFMANN, J.; GRUNICKE, H. H.; Inhibition of cell proliferation, protein kinase C, and phorbol ester-induced fos expression by the dihydropyridine derivative B859-35. **Cancer Res**, v. 51, n. 21, p. 5821-5825, 1991.

ÜBERALL, F.; OBERHUBER, H.; MALY, K.; ZAKNUN, J.; DEMUTH, L.; GRUNICKE, H. H. Hexadecylphosphocholine Inhibits Inositol Phosphate Formation and Protein Kinase C Activity. **Cancer Res**, v.51, n.3, p.807-812, 1991.

VAN DER ZEE, E. A.; DOUMA, B. R. Historical review of research on protein kinase C in learning and memory. **Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry**, v. 21, n. 3, p. 379-406, 1997.

VARGA, A.; CZIFRA, G.; TÁLLAI, B.; NÉMETH. T.; KOVÁCS, I.; KOVÁCS, L.; BÍRÓ, T. Tumor grade-dependent alterations in the protein kinase C isoform pattern in urinary bladder carcinomas. **Eur Urol**, v. 46, n. 4, p. 462-465, 2004.

VERDAGUER, N.; CORBALÁN-GARCÍA, S.; OCHOA, W. F.; FITA, I.; GÓMEZ-FERNÁNDEZ, J. C. $Ca^{2+}$ bridges the C2 membrane-binding domain of protein kinase Cα directly to phosphatidylserine. **EMBO J**, v. 15, n. 22, p. 6329-6338, 1999.

VINK, S. R.; VAN DER LUIT, A. H.; KLARENBEEK, J. B.; VERHEIJ, M.; VAN BLITTERSWIJK, W. J. Lipid rafts and metabolic energy differentially determine uptake of anti-cancer alkylphospholipids in lymphoma versus carcinoma cells. **Biochem Pharmacol**, v. 74, n. 10, p. 1456-1465, 2007.

VISWANADHAN, V.N.; GHOSE, A.K.; REVANKAR, G.R.; ROBINS, R.K. Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics. **J Chem Inf Comput Sci**, v. 29, n. 3, p. 163-172, 1989.

WANG, Q. J. et al. The lipophilicity of phorbol esters as a critical factor in determining the pattern of translocation of protein kinase C delta fused to green fluorescent protein. **J Biol Chem**, v. 275, n. 16, p. 12136-12146, 2000.

WANG, R.; LAI, L.; WANG, S. Further development and validation of empirical scoring functions for structure-based binding affinity prediction. **J Comput Aided Mol Des**, v. 16, n. 1, p. 11-26, 2002.

WEBB, B. L.; HIRST, S. J.; GIEMBYCZ, M. A. Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airways smooth muscle tone and mitogenesis. **Br J Pharmacol,** v. 130, n. 7, p. 1433-1452, 2000.

WEINER, S. J.; KOLLMAN, P. A.; CASE, D. A.; SINGH, U. C.; GHIO, C.; ALAGONA, G.; PROFETA, S. JR.; WEINER, P. A new force field for molecular mechanical simulation of nucleic acids and proteins. **J Am Chem Soc,** v. 106, n. 3, p. 765-784, 1984.

## 7. ANEXOS

**Anexo 7A.** Tabela dos descritores calculados nesse estudo para temperatura de 310 K.

Parte I.

| Compostos | Ox-Ca502 (Å) | Ox-Ca501 (Å) | Oy-Ca502 (Å) | Oy-Ca501 (Å) | $H_2$/W304-Ox (Å) | $H_2$/W304-Oy (Å) | $H_3$/W304-$O_{1559}$/Asp248 (Å) | $H_3$/W304-$O_{1559}$/Asp248 (Å) | $H_{1575}$/Arg249-Ox (Å) | $H_{1575}$/Arg249-Oy (Å) | $H_{1595}$/Thr250-Ox (Å) | $H_{1595}$/Thr250-Oy (Å) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **OS** | 2,80 | 3,73 | 1,97 | 5,23 | 3,01 | 5,44 | 2,96 | 3,73 | 5,14 | 5,68 | 6,31 | 7,21 |
| **1** | 4,17 | 5,12 | 2,61 | 5,43 | 3,51 | 5,38 | 3,50 | 4,37 | 3,65 | 4,18 | 4,11 | 5,99 |
| **2** | 3,59 | 4,88 | 5,61 | 6,74 | 4,40 | 5,39 | 3,32 | 4,19 | 3,52 | 1,87 | 4,70 | 2,17 |
| **3** | 4,13 | 3,99 | 2,65 | 4,84 | 1,94 | 4,35 | 3,32 | 4,12 | 4,36 | 4,58 | 5,34 | 6,15 |
| **4 (edelfosina)** | 2,55 | 4,41 | 4,70 | 6,40 | 4,77 | 5,67 | 3,43 | 4,23 | 3,76 | 1,73 | 5,25 | 3,12 |
| **5 (ilmofosina)** | 4,41 | 6,25 | 2,58 | 5,54 | 6,94 | 6,69 | 3,22 | 3,99 | 6,76 | 4,63 | 8,19 | 6,44 |
| **6 (miltefosina)** | 2,66 | 4,86 | 4,23 | 7,24 | 6,07 | 8,32 | 3,28 | 4,00 | 4,70 | 3,83 | 6,24 | 5,75 |
| **7 (perifosina)** | 3,08 | 5,59 | 5,34 | 7,04 | 6,86 | 8,03 | 3,36 | 4,06 | 3,94 | 2,11 | 5,75 | 4,07 |

Parte II.

| Compostos | $H_{564}$/Asn189-Ox (Å) | $H_{564}$/Asn189-Oy (Å) | $N_{1009}$/Arg216-Ox (Å) | $N_{1009}$/Arg216-Oy (Å) | $D_{P-N}$ (graus) | $\theta_P$ (graus) | $\theta_{Ca}$ (graus) | SA (Å²) | ClogP | Vol (Å³) | MR (Å³) | α (Å³) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **OS** | 10,76 | 10,53 | 5,66 | 3,34 | 3,81 | 110,73 | 61,49 | 760,71 | 2,55 | 1293,85 | 104,53 | 42,86 |
| **1** | 11,39 | 9,84 | 6,05 | 3,70 | 4,65 | 111,70 | 36,98 | 1013,76 | 8,09 | 1830,85 | 166,48 | 66,82 |
| **2** | 8,17 | 10,44 | 5,51 | 6,71 | 4,49 | 105,55 | 21,45 | 893,79 | 6,92 | 1600,85 | 141,28 | 56,92 |
| **3** | 10,68 | 9,66 | 6,91 | 4,38 | 6,75 | 109,80 | 38,07 | 796,07 | 5,49 | 1616,23 | 149,65 | 60,02 |
| **4 (edelfosina)** | 10,30 | 12,22 | 4,92 | 5,61 | 4,61 | 112,12 | 24,68 | 1134,12 | 6,01 | 1742,66 | 143,36 | 58,17 |
| **5 (ilmofosina)** | 1,81 | 4,30 | 3,34 | 4,63 | 4,79 | 110,03 | 32,99 | 1147,66 | 5,68 | 1724,09 | 145,22 | 58,69 |
| **6 (miltefosina)** | 5,54 | 6,48 | 4,35 | 2,86 | 4,45 | 106,93 | 35,86 | 901,20 | 5,48 | 1388,84 | 112,40 | 45,73 |
| **7 (perifosina)** | 5,85 | 8,36 | 3,65 | 4,36 | 5,66 | 106,45 | 33,65 | 964,24 | 6,27 | 1544,00 | 129,03 | 52,36 |

Parte III.

| Compostos | $\mu_{tot}$ (Db) | $E_{str}$ (kcal/mol) | $E_{bend}$ (kcal/mol) | $E_{tors}$ (kcal/mol) | $E_{1,4}$ (kcal/mol) | $E_{vdW}$ (kcal/mol) | $E_{el}$ (kcal/mol) | $E_{inter}$ (kcal/mol) | $E_{Hb}$ (kcal/mol) | $E_{sol}$ (kcal/mol) | $E_{tot}$ (kcal/mol) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **PS** | 7,91 | 1003,40 | 1652,92 | 1128,91 | 3003,46 | -709,63 | -3423,98 | 205,19 | -77180,96 | -225,00 | -74546,17 |
| **1** | 23,29 | 1038,80 | 1689,91 | 1141,47 | 2960,36 | -814,64 | -3757,58 | -538,80 | -74753,42 | -236,33 | -73270,26 |
| **2** | 22,63 | 1013,20 | 1619,25 | 1145,33 | 3006,32 | -800,74 | -3681,42 | -555,72 | -75009,99 | -212,94 | -73476,68 |
| **3** | 33,93 | 1016,40 | 1679,78 | 1154,67 | 3043,06 | -820,21 | -3711,43 | -542,46 | -75270,29 | -181,77 | -75270,29 |
| **4 (edelfosina)** | 21,09 | 919,97 | 1634,29 | 1154,04 | 3029,26 | -762,02 | -3734,50 | -544,71 | -73576,94 | -272,00 | -72152,9 |
| **5 (ilmofosina)** | 25,07 | 1025,40 | 1648,25 | 1131,03 | 2991,85 | -831,38 | -3698,33 | -565,40 | -75114,94 | -226,24 | -73639,81 |
| **6 (miltefosina)** | 21,55 | 994,96 | 1649,15 | 1133,69 | 2971,12 | -792,21 | -3550,69 | -554,20 | -75129,63 | -245,01 | 73522,58 |
| **7 (perifosina)** | 27,39 | 866,05 | 1503,10 | 1106,62 | 3046,43 | -838,19 | -3512,16 | -520,68 | -76193,61 | -264,03 | -74806,47 |

**ANEXO 7B.** Tabelas de *loadings* para as temperaturas de 50 K, 100 K, 200 K e 300 K.

50 K.

| Descritor | PC1 | PC2 |
|---|---|---|
| **Ox-Ca502** | 0,19 | 0,43 |
| **$H_{1575}$/Arg249-Ox** | -0,34 | -0,18 |
| **$H_{1575}$/Arg249-Oy** | -0,22 | 0,38 |
| **$\theta_P$** | -0,20 | -0,31 |
| **$\theta_{Ca}$** | -0,36 | 0,04 |
| **SA** | 0,07 | -0,48 |
| **ClogP** | 0,35 | -0,01 |
| **α** | 0,33 | 0,14 |
| **$E_{tors}$** | 0,27 | 0,36 |
| **$E_{vdw}$** | -0,35 | 0,15 |
| **$E_{Hb}$** | 0,27 | -0,29 |
| **$E_{sol}$** | 0,33 | 0,22 |

100 K.

| Descritor | PC1 | PC2 |
|---|---|---|
| **Ox-Ca502** | -0,08 | 0,61 |
| **$H_{1575}$/Arg249-Oy** | 0,29 | 0,26 |
| **$\theta_{Ca}$** | 0,36 | -0,08 |
| **SA** | -0,22 | -0,41 |
| **ClogP** | -0,33 | 0,09 |
| **α** | -0,27 | 0,28 |
| **$E_{bend}$** | 0,15 | 0,53 |
| **$E_{vdW}$** | 0,36 | -0,09 |
| **$E_{el}$** | 0,36 | -0,03 |
| **$E_{inter}$** | 0,37 | -0,10 |
| **$E_{sol}$** | -0,35 | -0,04 |

200 K

| Descritor | PC1 | PC2 |
|---|---|---|
| **Ox-Ca502** | -0,11 | 0,50 |
| **$H_{1575}$/Arg249-Oy** | 0,26 | 0,26 |
| **$H_{1595}$/Thr250-Ox** | 0,21 | -0,47 |
| **$N_{1009}$/Arg216-Ox** | -0,02 | 0,53 |
| **$\theta_{Ca}$** | 0,32 | 0,27 |
| **ClogP** | -0,36 | 0,01 |
| **Vol** | -0,33 | 0,12 |
| **α** | -0,33 | 0,23 |
| **$E_{vdW}$** | 0,36 | 0,15 |
| **$E_{el}$** | 0,38 | 0,10 |
| **$E_{inter}$** | 0,38 | 0,10 |

300 K.

| Descritor | PC1 | PC2 |
|---|---|---|
| **Ox-Ca502** | -0,21 | -0,44 |
| **$H_{1575}$/Arg249-Oy** | 0,22 | 0,34 |
| **$N_{1009}$/Arg216-Ox** | 0,06 | 0,56 |
| **$\theta_{Ca}$** | 0,32 | 0,26 |
| **ClogP** | -0,35 | 0,12 |
| **Vol** | -0,31 | 0,27 |
| **α** | -0,30 | 0,33 |
| **$E_{bend}$** | -0,28 | 0,34 |
| **$E_{vdW}$** | 0,37 | 0,05 |
| **$E_{el}$** | 0,36 | 0,04 |
| **$E_{inter}$** | 0,37 | 0,01 |

# CAPÍTULO 4

## Interação da miltefosina com bicamadas lipídicas

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Interação de alquilfosfocolinas com a membrana celular

Como abordado no Capítulo 1, diferentemente de outros agentes antitumorais, o primeiro local de ação das alquilfosfocolinas (APC) é a membrana celular. Evidências sugerem que esses compostos interferem com o metabolismo fosfolipídico, transporte e homeostase de colesterol, além de vias de sinalização intracelular que determinam a sobrevivência e progressão tumoral (JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2010; VAN BLITTERSWIKJ; VERHEIJ, 2013).

A composição lipídica de membranas difere entre células tumorais e células saudáveis, resultando em diferenças nas propriedades biofísicas da membrana, como a fluidez (HENDRICH; MECHALAK, 2003). Entretanto, não há um padrão geral observado no que diz respeito à fluidez das membranas em diferentes tipos celulares. Por exemplo, a membrana de células de hepatoma parece ser caracterizada por aumento na rigidez, reduzido conteúdo de ácidos graxos insaturados e aumento da proporção colesterol/fosfolipídios (BARITAKI et al., 2007). Em contrapartida, é observado aumento da fluidez da membrana em tumores neurais (RODRIGUES et al., 2002), câncer de pulmão (SOK et al., 2002), linfoma (SHERBET, 1989), leucemia (INBAR et al., 1977), câncer de mama (associado com aumento da adesão e metástase) (ZEISIG et al., 2007), e carcinoma hepatocelular (FUNAKI et al., 2001). Com relação à composição lipídica, é observada uma superexpressão de enzimas lipogênicas no início do desenvolvimento tumoral, sugerindo uma alteração para a síntese *de novo* de lipídios. Como resultado, há um aumento do conteúdo de lipídios saturados na membrana celular, o que protege a célula tumoral contra radicais livres e agentes quimioterápicos (RYSMAN et al., 2010; SCHUG et al., 2012). Durante a progressão e transformação tumoral, a membrana pode se tornar mais fluida devido ao aumento do conteúdo de lipídios insaturados, permitindo que a célula migre e metastatize (SHERBET, 1989). Também foi observado que células tumorais têm conteúdo elevado de *rafts*, o que as torna especialmente sensíveis a agentes que reduzem a quantidade de colesterol na membrana (LI et al., 2006). *Rafts* lipídicos são regiões na membrana celular enriquecidas em colesterol e esfingolipídios, que normalmente existem numa fase mais ordenada, conhecida como fase líquido-ordenada ($l_o$) (LINGWOOD; SIMONS, 2010). Acredita-se que esses domínios desempenham papel importante na adesão e migração de células tumorais, agindo como plataformas para a

distribuição de receptores de membrana, promovendo a migração e invasão de, por exemplo, células de câncer de mama da linhagem MCF-7 (MURAI, 2012). Além disso, o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR, superexpresso em diversos tipos de tumores) (HERBST; BUNN, 2003) e o receptor para fator de crescimento epidermal humano tipo 2 (HER2, superexpresso em cerca de 25-30% dos tumores metastáticos de câncer de mama) (CARLSSON et al., 2004) estão associados aos *rafts* lipídicos, e alterações nos rafts podem modificar a transdução de sinais para o meio intracelular (CHEN; RESH, 2002; FREEMAN et al., 2007).

A interação da miltefosina com membranas celulares é um evento ainda não totalmente conhecido. Sugere-se que os efeitos apoptóticos da molécula são devidos a um acúmulo nos *rafts* lipídicos, interferindo com o transporte não vesicular de colesterol para o retículo endoplasmático (RE), que leva à depleção de colesterol livre no RE e, consequentemente, desequilíbrio da homeostase desse esterol (JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2010). Gomide e colaboradores (2013), descreveram que o derivado alquilfosfolipídico 10-(octiloxi)-decil-2-(trimetil-amônio)-etil fosfato (ODPC), perifosina e, possivelmente, outros compostos como a miltefosina, provocam alterações nos *rafts* por mistura de lipídios, levando a célula a apoptose, uma vez que pode ocorrer a associação/dissociação de proteínas desses *rafts* lipídicos. Entretanto, Castro e colaboradores (2013), afirmam que a miltefosina e a edelfosina, em concentrações farmacologicamente relevantes, não alteram as propriedades biofísicas dos *rafts* lipídicos. Os autores ainda sugerem que o mecanismo de ação parece não estar associado a alterações específicas da membrana plasmática e/ou dos *rafts*, sendo mais possivelmente associado a modificações no metabolismo e transporte de lipídios. Em outro estudo, Moreira e colaboradores (2013) observaram aumento da fluidez da membrana de eritrócitos causada pela miltefosina, sem, entretanto, alteração da fluidez de vesículas artificialmente preparadas, contendo *rafts* lipídicos. Alonso e colegas (2012), por sua vez, não observaram alterações na fluidez de membranas de di-palmitoil-fosfatidilcolina (DPPC) na presença de 25-35% (fração molar) de miltefosina. Os mesmos autores observaram grande aumento da fluidez de membrana intercelular de *stratum corneum* na presença de miltefosina.
Sabe-se que a alteração da fluidez da membrana, principalmente determinada pela composição lipídica e interações com proteínas (GRUNBERGER; HAIMOVITZ; SHINITZKY, 1982), afeta funções celulares, como transporte mediado por carreadores, propriedade de proteínas e receptores ancorados na membrana, fagocitose, endocitose, exocitose dependente de despolarização, citotoxicidade de quimioterápicos, produção de

prostaglandicas e crescimento celular (BARITAKI et al., 2007). Desta forma, a perturbação da membrana que leva a alterações na fluidez pode levar a célula a um caminho apoptótico (BARITAKI et al., 2007). Fujimoto e colaboradores (1999) sugeriram que alguns fármacos e componentes lipídicos podem promover apoptose pelo aumento da fluidez da membrana nos estágios iniciais do ciclo apoptótico (FUJIMOTO et al., 1999). Isso levaria à perda da seletividade da membrana aos íons, bem como modificações na expressão de proteínas, exposição de receptores e alteração do transporte de solutos (BARITAKI et al., 2007).

Até o momento, pouco se sabe da interação de APCs com os componentes da membrana celular. As APCs podem modular funções das membranas, incluindo a permeabilidade e fluidez, composição lipídica, metabolismo de lipídios, e transdução de sinais (VAN BLITTERSWIKJ; VERHEIJ, 2013; JENDROSSEK; HANDRICK, 2003). Entretanto, ainda não é certo qual componente da membrana é responsável pela seletividade das APC em células tumorais, poupando células saudáveis (WNĘTRZAK; LĄTKA; DYNAROWICZ-ŁĄTKA, 2013).

A interação da miltefosina com diferentes componentes da membrana pode ser estudada do ponto de vista termodinâmico através do cálculo da energia livre de transferência da miltefosina da água para o interior da bicamada lipídica. A energia livre é uma quantidade física central na termodinâmica, da qual diversas outras quantidades podem ser obtidas, como o coeficiente de partição da molécula. Simulações de DM têm sido usadas para estudar a interação de pequenas moléculas e bicamadas lipídicas, e derivar quantidades termodinâmicas (MARRINK et al., 2007; PORASSO et al., 2009; WINTER; SCHATZ, 2010). A seguir, será apresentada uma explicação técnica da obtenção da energia livre através de simulações de DM.

## 1.2 Mecânica estatística – conceitos gerais e cálculo de quantidades físicas em simulações de Dinâmica Molecular

Considerando um sistema molecular, suponha que desejemos calcular uma determinada quantidade física, como pressão ou capacidade térmica. Essa grandeza depende do número de partículas $N$ do sistema e da posição $\mathbf{r}^N$ e momento $\mathbf{p}^N$ dessas partículas. O valor instantâneo de uma propriedade física genérica $A$ pode ser escrito como função do momento e da posição das partículas:

$$A(\mathbf{p}^N(t), \mathbf{r}^N(t)) \qquad \text{(eq. 1)}$$

Em que $\mathbf{p}^N(t)$ e $\mathbf{r}^N(t)$ representam o momento e posição, respectivamente, das partículas em um tempo *t*. O valor instantâneo de *A* flutua em função do tempo como resultado da interação das partículas, que também varia em função do tempo. Experimentalmente, mede-se a média dos valores instantâneos de *A* durante o tempo *t*, sendo, portanto, essa medida conhecida como média temporal (MORGON; COUTINHO, 2007). Conforme o tempo de medida $\tau$ tende para o infinito, a média temporal se aproxima de um valor "real" da propriedade, podendo ser calculada como:

$$A_{média} = \lim_{\tau\to\infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A\left(\mathbf{p}^N(t)\boldsymbol{r}^N(t)\right)dt \qquad \text{(eq.2)}$$

Dessa forma, sabendo o tipo de interação que ocorre nas partículas do sistema (determinada pelo campo de força – Capítulo 1, Introdução) e a posição inicial do sistema (configuração), é possível saber a força atuante em cada partícula diferenciando a função de energia. Sabendo-se a força atuante em cada partícula, é possível, através da segunda lei de Newton, determinar a aceleração de cada partícula. Integrando-se as equações Newtonianas, obtêm-se a velocidade, aceleração e trajetória de cada partícula em função do tempo e, dessa forma, a média temporal para a propriedade *A* pode ser calculada (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990; NAMBA; DA SILVA; DA SILVA, 2008). O problema surge quando consideramos sistemas reais, cujo número de partículas é da ordem de $10^{23}$. Nesses conjuntos, a determinação inicial da configuração e força atuantes em cada partícula é praticamente impossível, e a integração das equações de Newton torna-se impraticável (LEACH, 2001).

Com esse problema em mente, Boltzmann e Gibbs desenvolveram a mecânica estatística, na qual ao invés de considerar um único sistema evoluindo no tempo, considera-se um grande número de replicações desse sistema. A média temporal é então substituída pela média do *ensemble*:

$$\langle A \rangle = \iint d\mathbf{p}^N \, d\mathbf{r}^N A(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)\rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) \qquad \text{(eq.3)}$$

Em que os colchetes ‹ › indicam a média do *ensemble*, isto é, o valor esperado médio de *A* calculado nos diversos sistemas replicados gerados em uma simulação (de dinâmica molecular ou Monte Carlo). A propriedade *A* é então calculada integrando-se todas as

possíveis configurações do sistema. A equação 3 foi escrita de forma simplificada, com uma dupla integral, entretanto, ela deveria ser escrita contendo 6*N* símbolos de integrais para todas os possíveis 6*N* momentos e posições das partículas. O termo $\rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$ representa a probabilidade de encontrar determinada configuração com momento $\mathbf{p}^N$ e posição $\mathbf{r}^N$, sendo, portanto, conhecido como *densidade de probabilidade* (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

Desse ponto em diante, iremos considerar a *hipótese ergódica*, um dos axiomas fundamentais da mecânica estatística, que postula que a média do ensemble é igual à média temporal do sistema. Considerando número fixo de partículas, a volume e pressão constantes, a densidade de probabilidade $\rho$ assume a forma da distribuição de Boltzmann:

$$\rho(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N) = \frac{e^{\frac{-E(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{k_B T}}}{Q} \qquad \text{(eq. 4)}$$

Em que o termo $E(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)$ é a energia do sistema em função do momento e posição das partículas, $k_B$ é a constante de Boltzmann e $T$ é a temperatura absoluta. $Q$ é conhecida como função de partição, e não será demonstrada aqui, mas ela é função do hamiltoniano $H$ do sistema que, por sua vez, pode ser considerado como a soma das energias cinética $K(\mathbf{p}^N)$ e potencial $V(\mathbf{r}^N)$ do sistema. A função de partição assume formas diferentes dependendo do tipo de ensemble, e para o ensemble canônico (NVT), ela pode ser escrita como:

$$Q_{NVT} = \frac{1}{N!}\frac{1}{h^{3N}} \iint d\mathbf{p}^N \, d\mathbf{r}^N e^{\frac{-H(\mathbf{p}^N, \mathbf{r}^N)}{k_B T}} \qquad \text{(eq. 5)}$$

Em que *N!* surge do fato da indistinguibilidade das partículas (degeneração do sistema), e $1/h^{3N}$ garante que a função de partição $Q$ se iguale ao resultado de mecânica quântica para uma partícula na caixa (LEACH, 2001).

Como abordado no Capítulo 1, a simulação de DM baseia-se na integração das leis Newtonianas do movimento, das quais podem serem obtidas as médias dos *ensembles* e, dessa forma, grandezas físicas derivadas do potencial entre as partículas como função do tempo (HÖLTJE et al., 2008). Dessa forma, uma variedade de propriedades termodinâmicas podem ser calculadas e previstas através de simulações de DM, e comparadas com dados experimentais para determinar a acurácia do método. Vamos discutir a seguir o cálculo de energia livre em simulações de DM.

### *1.2.1 Cálculo de energia livre em simulações de DM*

Considerando mais uma vez um sistema de $N$ partículas, espera-se que $6N$ valores determinem o estado do sistema ($3N$ para o momento considerando as 3 coordenadas geométricas, e $3N$ para a posição das partículas, considerando as mesmas coordenadas $x$, $y$, e $z$). Cada combinação das $3N$ posições e $3N$ momentos define um ponto no espaço $6N$ dimensional, sendo a coleção de pontos conhecida como curva potencial. O espaço dimensional para sistemas considerados em DM é imenso, sendo que é inviável visitar e amostrar cada ponto desse espaço $6N$ dimensional, em outras palavras, não é praticável simular todos os possíveis estados energéticos e configurações que um sistema, mesmo pequeno, possa ter. A energia livre de um sistema é uma das quantidades mais importantes e centrais da termodinâmica e seu cálculo depende da amostragem adequada dessa curva potencial e de todos os possíveis estados energéticos, de maneira que a não visitação de determinados estados compromete a acurácia do valor obtido (LEACH, 2001).

Em teoria, a energia livre de um sistema pode ser calculada com precisão caso todos os possíveis estados sejam adequadamente visitados (ou seja, caso a simulação seja conduzida por tempo suficientemente longo). Estima-se, entretanto, que o tempo necessário para explorar satisfatoriamente um espaço $6N$ dimensional para um sistema pequeno, contendo apenas algumas dezenas de partículas, ultrapasse a idade do universo. Portanto, em prática, é inviável obter o valor de energia livre diretamente de uma simulação de DM, sendo necessário recorrer a técnicas especiais (LEACH, 2001; MORGON; COUTINHO, 2007).

### *1.2.2 Potencial de Força Média e Simulações de DM do tipo* Umbrella Sampling

Como abordado na seção anterior, a energia livre (assim como outras propriedades termodinâmica ditas *térmicas*, como o potencial químico $\mu$, e a entropia $S$) não pode ser diretamente obtida de simulações de DM ou de Monte Carlo, pois esses métodos amostram regiões de baixa energia (e alta probabilidade de ocorrerem) do espaço $6N$ dimensional de um sistema molecular. É preciso, então, recorrer a técnicas que aumentem a amostragem de regiões de alta energia e com baixa probabilidade de ocorrerem.

Dentre as diversas formas de cálculo de energia livre por simulações computacionais, uma possível é através do potencial de força média (PMF, do inglês *Potential of Mean Force*), particularmente útil quando se quer calcular a energia livre de sistemas onde não ocorra

transformação química, como, por exemplo, na interação de duas espécies moleculares separadas por uma determinada distância (LEACH, 2001). Dessa forma, o PMF pode ser obtido em função da separação de duas espécies química em uma coordenada de reação. Para que se obtenha um valor acurado de energia livre, o potencial de força média do sistema precisa ser adequadamente amostrado em todas as posições ao longo da coordenada de reação, garantindo que posições menos favoráveis (de alta energia) sejam adequadamente visitadas, assim como posições mais favoráveis (de baixa energia) (LEACH, 2001).

A técnica conhecida como *Umbrella Sampling* garante que estados não favoráveis ao longo da coordenada de reação sejam adequadamente amostrados. Isso é obtido alterando-se a função potencial do sistema:

$$V'(\mathbf{r}^N) = V(\mathbf{r}^N) + W(\mathbf{r}^N) \qquad \text{(eq. 8)}$$

Em que $V'(\mathbf{r}^N)$ é chamado de potencial "enviesado", $W(\mathbf{r}^N)$ é uma função que altera o potencial padrão e pode assumir a seguinte forma quadrática:

$$W(\mathbf{r}^N) = k_W(\mathbf{r}^N - \mathbf{r}_0^N)^2 \qquad \text{(eq. 9)}$$

Para sistemas longe da configuração de equilíbrio $\mathbf{r}_0^N$, $W(\mathbf{r}^N)$ assume grande valor, de forma que o potencial modificado $V'(\mathbf{r}^N)$ "enviesado" é grandemente afetado. A distribuição, nesse caso, assume forma diferente da distribuição de Boltzmann (eq. 4) (LEACH, 2001). A distribuição de Boltzmann pode ser extraída de um potencial enviesado pelo método descrito por Torrie e Valleau (1977), no qual a média do ensemble é obtida através da probabilidade $P_W(\mathbf{r}^N)$ de determinado estado acontecer no potencial modificado $V'(\mathbf{r}^N)$.

Na prática, as simulações do tipo *Umbrella Sampling* são conduzidas afastando-se gradualmente uma espécie da outra, restringindo as posições em pequenos espaços, conhecidos como "janelas" através do potencial enviesado $V'(\mathbf{r}^N)$. A forma quadrática da função $W(\mathbf{r}^N)$ garante que a espécie oscile harmonicamente dentro dessa "janela". Simulações suficientemente longas garantem que os estados de cada "janela" sejam adequadamente amostrados. A figura 1 ilustra a técnica de *Umbrella Sampling*.

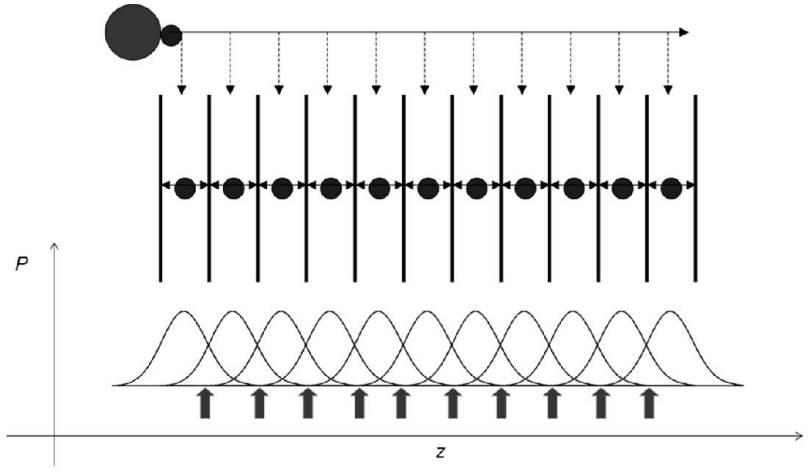



Figura 1 - Representação esquemática da técnica *Umbrella Sampling* (adaptado de LEMKUL, 2013). Observa-se a esfera menor se afastando gradualmente da esfera maior ao longo da coordenada *z*. Sua posição é restringida em espaços discretos, permitindo que a molécula oscile ao redor de uma determinada posição. A probabilidade *P* de cada posição é representada como uma série de curvas de distribuição ao longo da coordenada de reação *z*, sendo que as posições (configurações) mais favoráveis apresentam alto valor de probabilidade. Mesmo configurações menos favoráveis são amostradas. Quanto menor o tamanho de cada "janela", ou seja, quanto mais gradual for a separação entre as espécies simuladas, maior a sobreposição dessas curvas de probabilidade, garantindo a amostragem adequada de toda a coordenada de reação.

A recombinação das curvas de distribuições observadas ao longo da coordenada de reação, obtidas pela técnica de *Umbrella Sampling*, pode ser feita pelo método conhecido como *Weighted Histogram Analysis Method* (WHAM) (KUMAR et al., 1992), resultando da curva de PMF que assume a forma geral representada na figura 2. A energia livre pode ser então finalmente calculada como a diferença de energia entre os estados *i* e *j*. Matematicamente, isso é equivalente a:

$$\Delta A_{ij} = -k_B T \ln \frac{Q_j}{Q_i} \qquad \text{(eq. 10)}$$

Em que $Q_j$ e $Q_i$ são as funções de partição dos estados *j* e *i*, respectivamente. Existem outros métodos para obtenção de energia livre através de simulações de DM, muitos deles buscando aumentar a amostragem de estados não favoráveis. Entretanto, apenas a técnica de *Umbrella Sampling* foi aplicada nesse estudo, e as outras técnicas não serão abordadas.

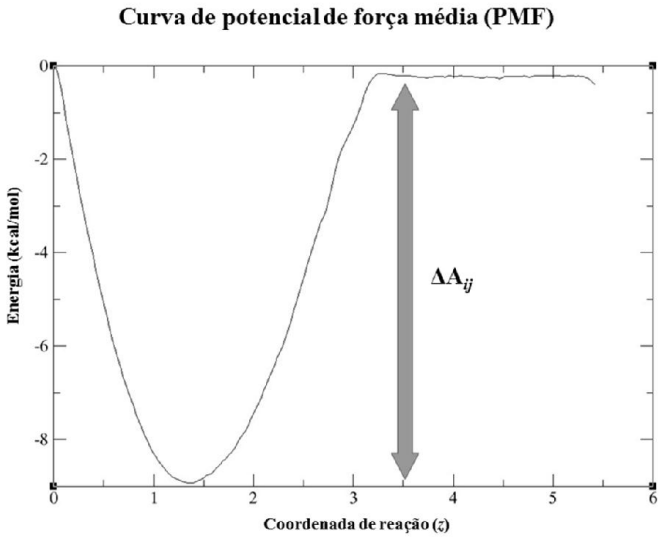



Figura 2 - Representação geral de uma curva de potencial de força média. $\Delta A_{ij}$ representa a diferença de energia livre entre os estados *i* e *j*.

## 2. OBJETIVOS

Nessa parte do trabalho, determinou-se a partição da miltefosina no interior de bicamadas lipídicas contendo lipídios saturados, mono-insaturados, poli-insaturados e colesterol (nas concentrações de 10%, 20% e 30%). O PMF foi calculado através de simulações de DM do tipo *Umbrella Sampling* (TORRIE; VALLEAU, 1977), com campo de força MARTINI de *coarse-grained* (MARRINK et al., 2007). Esse estudo fornece entendimento termodinâmico da interação da miltefosina com os diferentes componentes lipídicos da membrana celular presente em células malignas e saudáveis, ajudando a elucidar o mecanismo de ação desse fármaco.

## 3. MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 Auto-associação de bicamadas lipídicas e campo de força.

O campo de força MARTINI desenvolvido por Marrink e colaboradores (2007) foi usado neste estudo. Todas as simulações foram conduzidas no programa GROMACS 4.5.5 (HESS et al., 2008). De acordo com esta abordagem, as moléculas são representadas por partículas, sendo que cada partícula corresponde a, em média, 4 átomos pesados (não

considerando hidrogênios). As moléculas foram dispostas aleatoriamente numa caixa contendo água e deixadas para interagir e se auto-associarem em bicamadas lipídicas. Os seguintes lipídios foram usados, utilizando os parâmetros padrões do campo de força MARTINI: di-palmitoil-fosfatidilcolina (DPPC), di-oleoil-fosfatidilcolina (DOPC), palmitoil-oleoil-fosfatidilcolina (POPC), di-araquidonoil-fosfatidilcolina (DAPC), di-linoleil-fosfatidilcolina (DUPC) e colesterol (CHOL).

Um raio de corte de 1,2 nm for aplicado para as interações não ligadas de Lennard-Jones e Coulomb o potencial de Lennard-Jones foi alterado para zero entre 0,9 e 1,2 nm, e o potencial de Coulomb foi alterado para zero entre 0 e 1,2 nm, com constante dielétrica relativa de 15. A temperatura e pressão foram mantidas flutuando ao redor do valor de referência (para a pressão, $P_0$ = 1 bar), usando o barostato e o termostato de Berendsen (BERENDSEN et al, 1984), com constante de acoplamento de de $\tau_T$ = 0,3 os para a temperatura e $\tau_P$ = 3,0 os para a pressão. O acoplamento semi-isotrópico foi aplicado a todos os sistemas, isto é, a deformação da caixa de simulação nos eixos *xy* é diferente da deformação no eixo *z*. Um tamanho de passo de 20 fs foi usado para sistemas sem colesterol, sendo que 30 fs foi o valor usado para bicamadas com colesterol, uma vez que tamanho de passo maior é recomendado para sistemas que contenham moléculas com anéis (MARRINK et al., 2007). Para determinar o equilíbrio das bicamadas, a variação da área superficial em função da temperatura foi monitorada e comparada com dados experimentais. Para garantir que a bicamada estivesse na fase líquida, todos os sistemas foram simulados acima da temperatura de transição de fase para cada lipídio. Cada bicamada foi simulada em condições totalmente hidratadas com, pelo menos, 32 moléculas de água por lipídio, o que equivale a 8 moléculas de água CG (cada partícula CG de água equivale a 4 moléculas de água) (MARRINK et al., 2007; NAGLE; TRISTRAM-NAGLE, 2000).

Quando comparado com modelos atomísticos, simulações de DM de CG são mais rápidas, uma vez que a curva potencial é muito mais "suave", como resultado das partículas de maior tamanho e diminuição de sítios de interação. A difusão da molécula de água no campo de força MARTINI é quatro vezes mais rápida que em simulações atomísticas, portanto, o tempo efetivo da dinâmica pode ser interpretado como sendo o valor real multiplicado por quatro. Todas as escalas de tempo apresentadas nesse capítulo vão se referir ao tempo efetivo, ou seja, tempo da simulação multiplicado por quatro (MARRINK et al., 2007). Um sumário das simulações de auto-associação das bicamadas lipídicas está na tabela 2.

### 3.2 Parametrização da miltefosina

A miltefosina não faz parte do campo de força MARTINI. Entretanto, os grupos de átomos do campo de força permitem que representações de moléculas sejam estendidas e novos compostos sejam facilmente adicionados ao campo de força, uma vez que características químicas, tais como polaridade e distribuição de cargas, são conhecidas para cada partícula modelada. As interações ligadas para a miltefosina (denominada como MIL) foram escolhidas em analogia à molécula dodecil-fosfocolina (DPC), constituinte do campo de força original. O mapeamento seguindo o modelo 4-para-1 (ou seja, 4 átomos pesados modelados em 1 partícula CG) foi respeitado e uma partícula C1 foi adicionada em relação à estrutura do DPC para representar a MIL (figura 3). As interações ligadas foram modeladas com potencial harmônico fraco, com distância de equilíbrio de 0,47 nm e constante harmônica de 1250 kJ $mol^{-1}$ $nm^{-2}$. De maneira semelhante, os ângulos foram modelados com potencial harmônico, com ângulo de equilíbrio de 180° e constante harmônica angular de 25 kJ $mol^{-1}$ para moléculas lineares com cadeias alquílicas lineares (MARRINK et al., 2007) (tabela 1 partes I, II, e III).

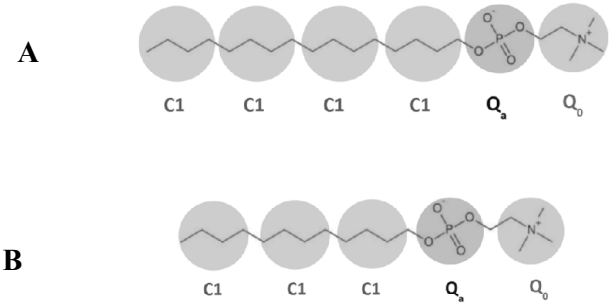



Figura 3 - Estruturas da miltefosina (MIL) (A) e dodecilfosfocolina (DPC) (B) mapeadas de acordo com os tipos de partículas do campo de força MARTINI: $Q_0$: partícula carregada positivamente; $Q_a$: partícula carregada negativamente; C1: tipo apolar.

Tabela 1 - Parâmetros usados para representar a miltefosina.

I. Tipos de partículas

| Número do átomo | Tipo de partícula | Carga | Partícula |
|---|---|---|---|
| 1 | $Q_0$ | +1.0 | NC3 |
| 2 | $Q_a$ | -1.0 | PO4 |
| 3 | C1 | 0.0 | C4 |
| 4 | C1 | 0.0 | C4 |
| 5 | C1 | 0.0 | C4 |
| 6 | C1 | 0.0 | C4 |

II. Ligações

| Partículas *i,j* | Comprimento de ligação(nm) | $K_{bond}$ (kJ mol$^{-1}$ nm$^{-2}$) |
|---|---|---|
| 1,2 | 0,47 | 1250 |
| 2,3 | 0,47 | 1250 |
| 3,4 | 0,47 | 1250 |
| 4,5 | 0,47 | 1250 |
| 5,6 | 0,47 | 1250 |

III. Ângulos

| Partículas *i,j,k* | Ângulo (graus) | $K_{angle}$ (kJ mol$^{-1}$ rad$^{-2}$) |
|---|---|---|
| 3,4,5 | 180 | 25 |
| 4,5,6 | 180 | 25 |

De maneira semelhante às bicamadas, a MIL foi simulada no programa GROMACS 4.5.5 solvatada em água por 100 ns a 323 K. Os raios de corte de interação de Lennard-Jones e Coulomb foram os mesmos usados para simular as bicamadas. O acoplamento isotrópico de pressão foi usado para manter o valor a 1 bar, com $\tau_P$ = 3,0 ps. A estrutura equilibrada da MIL foi usada nos estudos de interação da molécula com as bicamadas.

### 3.3 Simulações e DM do tipo *Umbrella Sampling* e calculo do PMF

Simulações de DM foram usadas para calcular o PMF em função da separação entre o centro de massa (COM, do inglês *centre of mass*) da MIL e das bicamadas lipídicas, nas quais a bicamada lipídica serviu como grupo de referência, enquanto a miltefosina foi afastada gradualmente ao longo da coordenada de reação *z*. Começando com as bicamadas descritas na seção 3.2, a caixa inicial foi expandida no eixo *z* de maneira a conter mais moléculas de água para satisfazer as condições periódicas de borda e evitar que os lipídios interagissem entre si durante a simulação. Após uma etapa de minimização usando declive máximo, a molécula de MIL foi alocada na caixa a uma distância de pelo menos 2,5 vezes o raio de corte de Lennard-Jones (1,2 nm) de maneira a garantir que forças de longo alcance não atuassem nessa molécula (SMIT, 1992).

A MIL foi "puxada" por cerca de 5,3 nm ao longo do eixo *z* até atravessar a bicamada lipídica (figura 4), com uma constante de mola de 500 kJ mol$^{-1}$, e constante de velocidade de 0,005 Å ps$^{-1}$. A simulação foi conduzida por 80 ns para bicamadas sem colesterol, e 120 ns para sistemas com colesterol, no ensemble NVT. A partir da trajetória gerada nessa simulação em que a MIL foi "puxada" para o interior das bicamadas, configurações iniciais foram extraídas

com um espaçamento de cerca de 0,1 nm (espaçamento das "janelas" em *Umbrella Sampling*). Mais "janelas" foram incluídas caso houvesse necessidade de melhorar a amostragem. Cada "janela" foi simulada por 200 ns para os sistemas sem colesterol e, pelo menos, 420 ns para bicamadas com colesterol, com constante de mola de 1000 kJ $mol^{-1}$ $nm^{-2}$. Para reduzir a rugosidade do sistema com 30% de colesterol, a simulação de cada "janela" foi de 1200 ns. O gráfico de PMF foi contruído usando o método WHAM (KUMAR et al., 1992), com erros estimados por *boostrapping* (HUB; GROOT; VAN DER SPOEL, 2010).

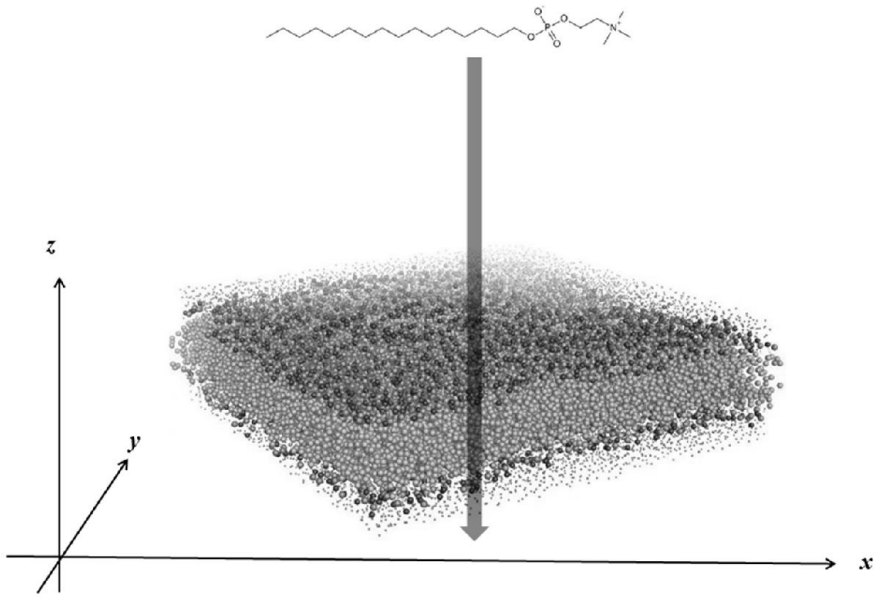



Figura 4 - Representação da MIL sendo "puxada" até atravessar a bicamada lipídica. A seta indica a direção na qual a molécula foi puxada (eixo *z*).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Estabilização das bicamadas

A variação da área superficial por lipídeo foi um dos parâmetros usados para determinar o equilíbrio das bicamadas. A tabela 2 mostra os resultados encontrados para os sistemas simulados.

Tabela 2 - Sumário das simulações nas bicamadas.

| Bicamada | Número total de lipídios | Temperatura simulada (temperatura de transição de fase) [K] | t [ns] | Área superficial média por lipídio[a] [nm²][b] | Espessura da bicamada[a] [nm] |
|---|---|---|---|---|---|
| DPPC | 512 | 323 (314) | 1600 | 0,64 (0,63 a 323 K) | 4,17 |
| DOPC | 512 | 300 (253) | 1600 | 0,75 (0,72 a 303 K) | 4,56 |
| POPC | 512 | 300 (271) | 1600 | 0,64 (0,64 a 303 K) | 4,34 |
| DAPC | 512 | 300 (203) | 1600 | 0,86 | 3,86 |
| DUPC | 512 | 300 (220) | 1600 | 0,75 | 3,63 |
| DPPC:CHOL (10%) | 456:48 | 323 | 3600 | 0,58 | 4,24 |
| DPPC:CHOL (20%) | 456:120 | 323 | 3600 | 0,52 | 4,38 |
| DPPC:CHOL (30%) | 342:144 | 323 | 3600 | 0,47 | 4,43 |

[a]Valores experimentais de temperatura para transição de fase (SILVIUS, 1982) e área por lipídeo (KUČERKA et al., 2011) são dados em parêntesis.

[b]Valor médio da área superficial por lipídeo medido em cada simulação dividindo-se o tamanho da caixa no eixo *xy* pelo número de lipídios em cada folheto (metade do número total de lipídios). Os primeiros 50 ns foram descartados nesse cálculo.

Com relação às bicamadas com colesterol, sabe-se que esse lipídio altera a transição de fase de lipídios torando a transição da fase líquido-cristalina para gel mais fácil. Desta forma, espera-se que regiões contendo colesterol estejam na fase $l_o$, enquanto que regiões sem esse esterol estão na fase líquido-desordenada ($l_d$) (MCMULLEN et al., 2004). O efeito condensante do colesterol causa a diminuição da área por lipídio seguido por uma diminuição na área de seção transversal do lipídio, aumento da espessura da bicamada e restrição do movimento intra e intermolecular (MCMULLEN et al., 2004). Em contrapartida, o aumento do conteúdo de lipídios insaturados permite um empacotamento mais frouxo, aumentando a área superficial média por lipídio (OLBRICH et al., 2000).

## 4.2 PMF e cálculo de energia livre (ΔG)

O cálculo de PMF necessita de convergência para gerar uma curva suave e simétrica, e amostrar lipídios individuais e a resposta de bicamadas a alterações causadas por moléculas é difícil e longa (TIELEMAN; MARRINK, 2006). Neste sentido, o erro estimado no sistema DPPC é maior que nas bicamadas com lipídios mono e poli-insaturados (figura 5, área sombreada ao redor das curvas), e pode ser explicada pelas transições mais lentas que ocorrem conforme aumenta a rigidez da bicamada, tornando a amostragem mais difícil. Erros maiores são observados quando a MIL está no interior da bicamada (z = 0,0), indicando que transições lentas ocorrem nessa região, quando a molécula está totalmente envolta por lipídios.

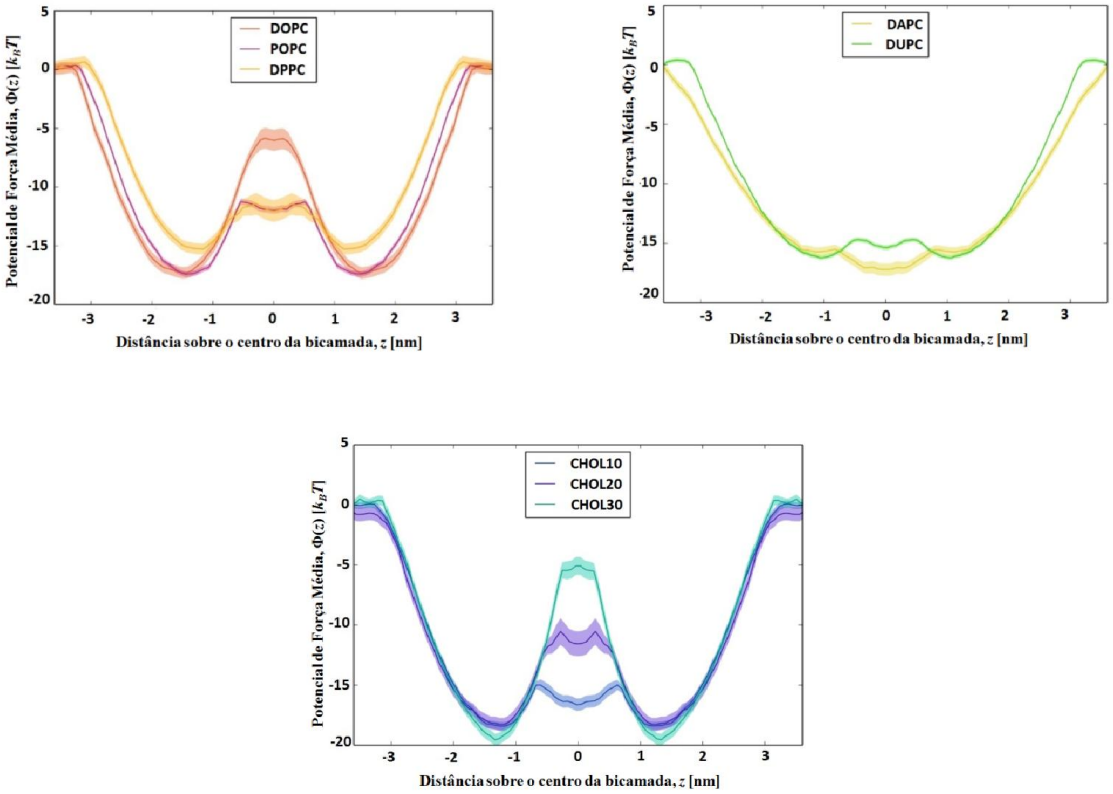



Figura 5 - Curvas de potencial de força média (PMF) para os sistemas estudados. CHOL10 = DPPC + 10% de colesterol; CHOL20 = DPPC + 20% de colesterol; CHOL30 = DPPC + 30% de colesterol. As áreas sombreadas ao redor das curvas são os erros, estimados por *bootsrapping*.

Na figura 5, observa-se que as regiões de z ~ 2 ─ > 3 nm e z~ -2 ─ < -3 nm correspondem á MIL em água. A molécula começa a penetrar na bicamada em z ~ 2 nm, onde é observado um mínimo de energia correspondendo ao equilíbrio. As regiões de platô à esquerda e à direita indicam que a molécula não tem contato com a bicamada e não sofre efeito de forças de longo alcance. A energia aumenta rapidamente quando a MIL é removida do ponto de equilíbrio (mínimo de energia) tanto para valores próximos de 0 nm (penetração para dentro da bicamada), quanto para valores distantes de 0 nm (transferência da molécula para água). A energia livre de transferência da MIL da água para as bicamadas pode ser diretamente obtida medindo a diferença de energia do platô para o mínimo observado. Este mínimo não ocorre quando a MIL está totalmente inserida no centro da bicamada (z ≈ 0 nm), mas em torno de 1-1,5 nm, posição na qual a cabeça polar da MIL está na interface lipídio/água e a cadeia alquílica está no centro apolar da bicamada. Observa-se que o mínimo de energia está levemente mais distante de 0 nm à medida que a espessura da bicamada aumenta. A penetração mais profunda da MIL além do ponto de equilíbrio leva a um aumento na energia, devido à existência da barreira energética de *flip-flop*, que corresponde à transferência da molécula do folheto externo para o folheto interno. O evento de *flip-flop* não é espontâneo, sendo que a internalização de APCs é mediada por proteínas dependentes de ATP, conhecidas como flippases (DORLO et al., 2012). A energia necessária para que a MIL mude de um folheto para o outro (aqui denominada de $\Delta G_{flip}$) pode ser calculada medindo a diferença entre o ponto de equilíbrio (mínimo de energia) e z = 0,0 nm (centro da bicamada). Esse aumento de energia pode ser entendido como uma dificuldade de mover a cabeça polar do tensoativo (solvatada por água) para o interior hidrofóbico da bicamada. Esse movimento para dentro da bicamada está normalmente associado a defeitos na estrutura da membrana, com formação de pequenos poros de água que impedem a dessolvatação da cabeça polar do tensoativo. Devido à simplificação na representação CG, mais especificamente o fato do sistema possuir uma constante dielétrica uniforme em todos os ambientes (MARRINK et al., 2007), esse tipo de deformação não é claramente observada.

Abaixo da concentração micelar crítica (cmc), ou seja, em sua forma monomérica, o tensoativo apresenta alta afinidade pelo interior hidrofóbico da bicamada, com um máximo de energia quando a molécula está totalmente inserida em água e outro (menor) quando a molécula está próxima do centro da bicamada. A clara exceção ocorre no caso da bicamada DAPC, cuja energia da barreira energética de *flip-flop* (definida como $\Delta G_{barr}$, calculada como a diferença entre o pico de energia encontrado um pouco antes de z = 0,0 e o ponto de mínimo

de energia) não existe, sugerindo que este é um evento energeticamente espontâneo. O $\Delta G_{barr}$ observado para DUPC também é significantemente menor quando comparado a outros sistemas. Estes dois lipídios apresentam cadeias alquílicas poli-insaturadas, que são responsáveis por alterar a fluidez e permeabilidade de membranas plasmáticas (STUBBS; SMITH, 1984). Armstrong e colaboradores (2003) demonstraram que membranas enriquecidas com o fosfolipídio poli-insaturado docosahexanoato (DHA) tornam os eventos de *flip-flop* e permeabilidade mais rápidos quando comparados às taxas observadas em membranas com menor conteúdo de lipídios poli-insaturados. Ogushi e colaboradores mostraram que a taxa de *flip-flop* aumenta à medida que número de duplas ligações na cadeia alquílica também aumenta (OGUSHI et al., 2012). Além disso, essas bicamadas são mais finas quando comparadas aos outros sistemas. Os valores de energia livre obtidos nesse trabalho corroboram esses resultados mostrando que a penetração da MIL além do ponto de equilíbrio, e o evento de flip-flop, são energeticamente mais favoráveis em regiões da membrana ricas em lipídios poli-insaturados, como o ácido araquidônico e ácido linolênico.

O valor $\Delta G_{barr}$ é maior no sistema DOPC. Esse lipídio possui 18 carbonos (5 partículas CG) em cada cadeia alquílica *versus* os 16 carbonos encontrados na cadeia do DPPC (4 partículas CG), resultando em uma bicamada mais espessa. Isso significa que a cabeça polar da MIL permanece mais tempo em contato com o interior hidrofóbico da bicamada antes de atingir o centro. A mesma tendência é observada na bicamada de POPC. Nos sistemas contendo colesterol, além da maior espessura das bicamadas, há o efeito condensante do colesterol, resultado em movimento mais lento da MIL no núcleo hidrofóbico. Apesar das diferenças quantitativas, uma tendência é clara: o aumento da espessura da bicamada leva a um aumento na energia necessária para que a molécula mude de folheto, resultando em menor quantidade de eventos de *flip-flop*. Essa mesma tendência foi observada em bicamadas contendo colesterol, considerando outras moléculas (BENNETT et al., 2009).

A partir dos gráficos de PMF, o coeficiente de partição da MIL dentro das bicamadas lipídicas foi calculado segundo a relação:

$$K = e^{\frac{-\Delta G_{min}}{k_B T}} \qquad \text{(eq. 11)}$$

Em que $\Delta G_{min}$ corresponde ao mínimo de energia observado no ponto de equilíbrio. A tabela 3 resume os valores de $\Delta G$ calculados para a transferência da MIL para o interior das

bicamadas em $k_BT$ ($\Delta G_{trans}$), bem como os valores de $\Delta G_{flip}$, $\Delta G_{barr}$, do coeficiente de partição *K* relativo à bicamada de DPPC e a posição de $G_{min}$.

Tabela 3 - Valores de $\Delta G$ para a transferência da MIL da água para o ponto de equilíbrio ($\Delta G_{trans}$), do ponto de equilíbrio para o meio dos dois folhetos ($\Delta G_{flip}$), a barreira energética para *flip-flop* ($\Delta G_{barr}$), o coeficiente de partição *K* relativo à bicamada de DPPC, e a posição de $G_{min}$.

| **Sistema** | **$\Delta G_{trans}$ ($k_BT$)** | **$\Delta G_{flip}$ ($k_BT$)** | **$\Delta G_{barr}$ ($k_BT$)** | ***K* relativo à DPPC** | **Posição de $G_{min}$ (nm)** |
|---|---|---|---|---|---|
| DPPC | -15,7 | 3,2 | 3,8 | 1,0 | 1,16 |
| DOPC | -17,4 | 11,3 | 11,4 | 5,3 | 1,45 |
| POPC | -17,6 | 5,5 | 6,1 | 7,0 | 1,42 |
| DAPC | -15,7 | -1,5 | -1,3 | 1,0 | 1,12 |
| DUPC | -16,5 | 0,8 | 1,5 | 2,2 | 1,06 |
| DPPC:CHOL (10%) | -18,4 | 1,8 | 3,4 | 14,9 | 1,28 |
| DPPC:CHOL (20%) | -19,8 | 7,8 | 8,8 | 43,5 | 1,33 |
| DPPC:CHOL (30%) | -20,0 | 14,7 | 14,3 | 76,2 | 1,36 |

Como pode ser observado na tabela 3, MIL apresenta maior partição nos sistemas DOPC e POPC quando comparados a DPPC (5,3 e 7,0 vezes maior, respectivamente). Esses resultados estão de acordo com os dados experimentais de Wnętrzak e colaboradores (2013). Os autores não especificaram o valor da constante de partição, mas eles mostraram, através de dados de entalpia da mudança do excesso de energia livre ($\Delta G_{exe}$) que a MIL tem menor desvio repulsivo em monocamadas de POPC, indicando interações mais fortes com esse lipídio. A insaturação na cadeia do ácido graxo oleil permite que esse lipídio tenha empacotamento mais, de forma que a MIL pode se acomodar de melhor maneira dentro da bicamada. Entretanto, a presença de uma instauração a mais no DOPC reduz, mesmo que levemente, a partição da MIL e isso parece estar relacionado com o fato que a cadeia alquílica da MIL tem menos propensão a permanecer em uma região de maior densidade de carga. A presença de duplas ligações nas cadeias alquílicas parece desempenhar papel similar nos sistemas poli-insaturados. Embora DUPC tenha empacotamento mais frouxo (evidenciado por maior valor de área superficial por lipídio), o coeficiente de partição K é apenas 2,2 vezes maior que DPPC, provavelmente pela menor propensão da MIL em ser miscível em meios com alta densidade de carga. Na bicamada de DAPC, MIL se comporta de maneira semelhante à observada em DPPC, com valores de *K* iguais. É importante lembrar que DAPC possui 4 duplas ligações em cada cadeia.

Valores de *K* significantemente maiores são observados nas bicamadas contendo colesterol, e a partição da MIL aumenta conforme o conteúdo de colesterol aumenta. Isso indica que MIL apresenta interação atrativa mais forte pelo colesterol do que por DPPC sozinho, sendo que a partição da molécula é de 15 a 76 vezes maior que em DPPC. Esse dado sugere que a MIL tem preferência por interagir com regiões enriquecidas em colesterol, como os *rafts* lipídicos. O valor de *K* não aumenta linearmente nos sistemas com colesterol, uma vez que o valor observado com 20% CHOL é mais de duas vezes o valor com 10% CHOL, e mais da metade do *K* observado com 30%. Foi observado que essas interações atrativas podem surgir da formação de complexos na superfície da membrana, resultando em desvios do comportamento ideal para uma mistura de lipídios (SEOANE et al., 1988; GONG et al., 2002; WNĘTRZAK et al., 2013). Esses resultados estão de acordo com valores experimentais de $\Delta G_{exe}$ que mostram que a interação de APCs em monocamadas sem colesterol é significantemente menor que em sistemas contendo colesterol (WNĘTRZAK et al., 2013).

O colesterol é um componente essencial de células de mamíferos, presente em altas concentrações na membrana plasmática (25-40mol%) e em menores concentrações no retículo endoplasmático (0-5mol%) (SPRONG; VAN DER SLUIJS, VAN MEER, 2001). Embora o papel exato do colesterol em membranas celulares não esteja totalmente esclarecido, sua presença é crucial para a fluidez da membrana e formação de *rafts* lipídicos, desempenhando um papel importante na sinalização celular, tráfico de lipídios e no ancoramento de proteínas (SPRONG; VAN DER SLUIJS, VAN MEER, 2001). Como foi observado por outros autores, a forte atração entre MIL e colesterol sugere uma interferência no transporte desse esterol da membrana plasmática para o retículo endoplasmático, causando um desequilíbrio na esterificação do colesterol, sinalizando a célula para apoptose (JIMÉNEZ-LÓPEZ et al., 2010). A molécula de colesterol tem formato de cone invertido truncado complementar ao formato cônico da MIL, o que favorece o empacotamento entre essas duas moléculas, resultando em interações atrativas (figura 6) (WNĘTRZAK et al., 2013). Embora o campo de força MARTINI não reproduza de maneira precisa o formato das moléculas, os valores de *K* confirmam a alta miscibilidade da MIL em bicamadas mistas contendo colesterol.

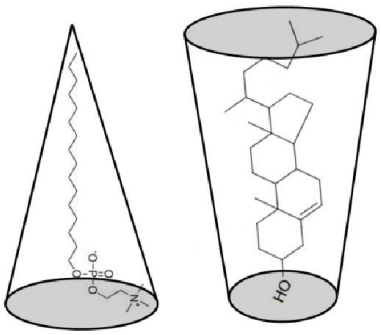



Figura 6 - Representação esquemática do formato adotado pela miltefosina (cone) e colesterol (cone invertido truncado) em solução.

## 5. CONCLUSÃO

O perfil termodinâmico de interação da miltefosina com bicamadas lipídicas permitiu verificar o comportamento dessa molécula em diferentes ambientes lipídicos. Os altos valores de constante de partição sugerem a presença de fortes interações atrativas entre as moléculas, o que justifica o fato da miltefosina interferir na mobilidade e transporte não vesicular do colesterol. O possível desbalanço na esterificação do colesterol sinaliza a célula para a apoptose. Além disso, as menores barreiras energéticas de *flip-flop* observadas em bicamadas poli-insaturadas sugerem que a miltefosina é mais facilmente internalizada em regiões da membrana celular ricas em lipídios com várias insaturações. Esse dado está de acordo com experimentos que demonstram que células com alto conteúdo de lipídios saturados na membrana plasmática são mais resistentes a agentes quimioterápicos e à radioterapia (RYSMAN et al., 2010; SCHUG et al., 2012), incluindo moléculas altamente hidrofóbicas. Em contrapartida, foi observado que a miltefosina tem ação antitumoral em células de leucemia (WANG et al., 1997), e sabe-se que essas células tem maior fluidez da membrana devido ao maior conteúdo de ácidos graxos poli-insaturados (GAFFNEY et al., 1991).

Os dados, portanto, sugerem um possível mecanismo de ação da miltefosina via interação com *rafts* lipídicos e alteração no tráfico do colesterol, além da internalização facilitada por regiões mais frouxamente empacotadas. Esses resultados ajudam a compreender a ação citotóxica da miltefosina e sua preferência pela interação com células tumorais contendo mais colesterol, poupando células sadias.

## 6. REFERÊNCIAS

ALONSO, L.; MENDANHA, S. A.; MARQUEZIN, C. A.; BERARDI, M.; ITO, A. S.; ACUÑA, A. U.; ALONSO, A. Interaction of miltefosine with intercellular membranes of stratum corneum and biomimetic lipid vesicles. **Int. J. Pharm**, v. 434, p. 391-398, 2012.

ARMSTRONG, V. T.; BRZUSTOWICZ, M. R.; WASSALL, S. R.; JENSKI, L. J.; STILLWELL, W. Rapid flip-flop in polyunsaturated (docosahexaenoate) phospholipid membranes. **Arch. Biochem. Biophys**, v. 414, p. 74-82, 2003.

BARITAKI, S.; APOSTOLAKIS, S.; KANELLOU, P.; DIMANCHE-BOITREL, M. T.; SPANDIDOS, D. A.; BONAVIDA, B. Reversal of tumor resistance to apoptotic stimuli by alteration of membrane fluidity: therapeutic implications. **Adv Cancer Res**, v. 98, p. 149-190, 2007.

BENNETT, W. F. D.; MACCALLUM, J. L.; HINNER, M. J.; MARRINK, S. J.; TIELEMAN, D. P. Molecular view of cholesterol flip-flop and chemical potential in different membranes environment. **J. Am. Chem. Soc**, v. 131, p. 12714-12720, 2009.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; DINOLA, A.; HAAK, J. R. Molecular dynamics with coupling to an external bath. **J. Chem. Phys**, v. 81, p. 3684-3690, 1984.

CARLSSON, J.; NORDGREN, H.; SJOSTROM, J.; WESTER, K.; VILLMAN, K.; BENGTSSON, N. O.; OSTENSTAD, B.; LUNDQVIST, H.; BLOMQVIST, C. HER2 expression in breast cancer primary tumours and corresponding metastases. Original data and literature review. **Br. J. Cancer** v. 90, p. 2344–2348, 2004.

CASTRO, B. M.; FEDOROV, A.; HORNILLOS, V.; DELGADO, J.; ACUÑA, A. U.; MOLLINEDO, F.; PRIETO, M. Edelfosine and miltefosine effects on lipid raft properties: membrane biophysics in cell death by antitumor lipids. **J. Phys. Chem. B,** v. 117, p. 7929-7940, 2013.

CHEN, X.; RESH, M. D. Cholesterol depletion from the plasma membrane triggers ligand-independent activation of the epidermal growth factor receptor. **J. Biol. Chem,** v. 277, p. 49631-49637, 2002.

DORLO, T. P.; BALASEGARAM, M.; BEIJNEN, J. H.; DE VRIES, P. J. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 67, p. 2576-2597, 2012.

FREEMAN, M. R.; CINAR, B.; KIM, J.; MUKHOPADHYAY, N. K.; DI VIZIO, D.; ADAM, R. M.; SOLOMON, K. R. Transit of hormonal and EGF receptor-dependent signals through cholesterol-rich membranes. **Steroids**, v. 72, p. 210-217, 2007.

FUJIMOTO, K.; IWASAKI, C.; KAWAGUCHI, H.; YASUGI, E.; OSHIMA, M. Cell membrane dynamics and the induction of apoptosis by lipid compounds. **FEBS Lett**, v. 446, p. 113-116, 1999.

FUNAKI, N. O.; TANAKA, J.; KOHMOTO, M.; SUGIYAMA, T.; OHSHIO, G.; NONAKA, A.; YOTSUMOTO, F.; TAKEDA, Y.; IMAMURA, M. Membrane fluidity correlates with liver cancer cell proliferation and infiltration potential. **Oncol. Rep**, v. 8, p. 527-532, 2001.

GAFFEY D. K. et al., Cholesterol content but not plasma membrane fluidity influences the susceptibility of L1210 leukemia cells to merocyanine 540-sensitized irradiation. **Photochem Photobiol**, v. 54, p. 717-723, 1991.

GOMIDE, A. B.; THOMÉ, C. H.; DOS SANTOS G. A.; FERREIRA, G. A.; FAÇA, V. M.; REGO, E. M.; GREENE, L. J.; STABELI, R. G.; CIANCAGLINI, P.; ITRI, R. Disrupting membrane raft domains by alkylphospholipids. **Biochim. Biophys. Acta,** v. 1828, p. 1384-1389, 2013.

GRUNBERGER, D.; HAIMOVITZ, R.; SHINITZKY, M. Resolution of plasma membrane lipid fluidity in intact cells labelled with diphenylhexatriene. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 688, p. 764-774, 1982.

HENDRICH, A. B.; MICHALAK, K. Lipids as a target for drugs modulating multidrug resistance of cancer cells. **Curr. Drug Targets**, v. 4, p. 23-30, 2003.

HERBST, R. S.; BUNN, P. A. JR. Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. **Clin. Cancer Res**, v. 9, p. 5813-5824, 2003.

HESS, B.; KUTZNER, C.; VAN DER SPOEL, D.; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **J. Chem. Theory Comput,** v. 4, 435–447, 2008.

HÖLTJE, H.-D.; SIPPL, W.; ROGNAN, D.; FOLKERS, G. **Molecular Modeling – Basic Principles and Applications**. 3ª ed. Wiley-VCH: Darmstadt, 2008. 320p.

HUB, J. S.; GROOT, B. L.; VAN DER SPOEL, D. g_wham – A free weighted histogram analysis implementation including robust error and autocorrelation estimates. **J. Chem. Theory Comput**, v. 6, p. 3713-3720, 2010.

INBAR, M.; GOLDMAN, R.; INBAR, L.; BURSUKER, I.; GOLDMAN, B.; AKSTEIN, E.; SEGAL, P.; IPP, E.; BEN-BASSAT, I. Fluidity difference of membrane lipids in human normal and leukemic lymphocytes as controlled by serum components. **Cancer Res**, v. 37, p. 3037-3041, 1977.

JENDROSSEK, V.; HANDRICK, R. Membrane targeted anticancer drugs: Potent inducers of apoptosis and putative radiosensitisers. **Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agent,** v. 3, p. 343-353, 2003.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. M.; RÍOS-MARCO, P.; MARCO, C.; SEGOVIA, J. L.; CARRASCO, M. P. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. **Lipids Health. Dis,** v. 9, p. 1-10, 2010.

KUMAR, S.; ROSENBERG, J. M.; BOUZIDA, D.; SWENDSEN, R. H.; KOLLMAN, P. A. THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method. **J Comput Chem,** v. 13, p**.** 1011-1021, 1992.

LEACH, A. R. **Molecular Modelling: Principles and Applications**, 2.ed. Londres: Prentice Hall, 2001. 744p.

LEMKUL, J. Gromacs Tutotial. **Umbrella Sampling**. Disponível em: http://www.bevanlab.biochem.vt.edu/Pages/Personal/justin/gmx-tutorials/umbrella/index.html. Acesso em 15 de Janeiro de 2014.

LI, Y. C.; PARK, M. J.; YE, S. K.; KIM, C. W.; KIM, Y. N. Elevated levels of cholesterol-rich lipid rafts in cancer cells are correlated with apoptosis sensitivity induced by cholesterol-depleting agents. **Am J Pathol**, v. 168, p. 1107-1118, 2006.

LINGWOOD, D.; SIMONS, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. **Science**, v. 327, p. 46-50, 2010.

MARRINK, S. J.; RISSELADA, H. J.; YEFIMOV, S.; TIELEMAN, D. P.; DE VRIES, A. H. The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. **J. Phys. Chem. B**, v. 111, p. 7812-7824, 2007.

MCMULLEN, T. P. W.; LEWIS, R. N. A. H.; MCELHANEY, R. N. Cholesterol-phospholipid interactions, the liquid-ordered and lipid rafts in model and biological membranes. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci,** v. 8, p. 459-468, 2004.

MOREIRA, R. A.; MENDANHA, S. A.; HANSEN, D.; ALONSO, A. Interaction of miltefosine with the lipid and protein components of the erythrocyte membrane. **J. Pharm. Sci**, v. 102, p. 1661-1669, 2013.

MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de Química Teórica e Modelagem Molecular**, 1ª ed., São Paulo: Editora Livraria da Física, 2007. 539p.

MURAI, T. The Role of Lipid Rafts in Cancer Cell Adhesion and Migration. **Int J Cell Biol,** v. 2012, p. 1-6, Article ID 763283, doi:10.1155/2012/763283.

NAMBA, A. M.; DA SILVA, V. B.; DA SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Ecl Quim**. v. 34, n. 4, p. 13-24, 2008.

OGUSHI, F.; ISHITSUKA, R.; KOBAYASHI, T.; SUGITA, Y. Rapid flip-flop motions of diacylglycerol and ceramide in phospholipid bilayers. **Chem. Phys. Lett**, 522, 96-102, 2012.

OLBRICH, K.; RAWICZ, W.; NEEDHAM, D.; EVANS, E. Water permeability and mechanical strength of polyunsaturated lipid bilayers. **Biophys. J,** v. 79, p. 321-327, 2000.

PORASSO, R. D.; BENNETT, W. F.; OLIVEIRA-COSTA, S. D.; LÓPEZ CASCALES, J. J. Study of the benzocaine transfer from aqueous solution to the interior of a biological membrane. **J. Phys. Chem B**, v. 113, p. 9988-9994, 2009.

RODRIGUES, C. M.; SOLÁ, S.; CASTRO, R. E.; LAIRES, P. A.; BRITES, D.; MOURA, J. J. Perturbation of membrane dynamics in nerve cells as an early event during bilirubin-induced apoptosis. **J Lipid Res**, v. 43, p. 885-894, 2002.

RYSMAN, E.; BRUSSELMANS, K.; SCHEYS, K.; TIMMERMANS, L.; DERUA, R; MUNCK, S.; VAN VELDHOVEN P. P.; WALTREGNY, D.; DANIËLS, V. W.; MACHIELS, J.; VANDERHOYDONC, F.; SMANS, K.; WAELKENS, E.; VERHOEVEN, G.; SWINNEN, J. V. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. **Cancer Res**, v. 70, p. 8117-8126, 2010.

SCHUG, Z. T.; FREZZA, C.; GALBRAITH, L. C.; GOTTLIEB, E. The music of lipids: how lipid composition orchestrates cellular behaviour. **Acta Oncol**, v. 51, 301-310, 2012.

SEOANE, R.; MIÑONES, J.; CONDE, O.; CASAS, M.; IRIBARNEGARAY, E. Molecular organisation of amphotericin B at the air–water interface in the presence of sterols: a monolayer study. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1375, p. 73–83, 1988.

SHERBET, G. V. Membrane fluidity and cancer metastasis. **Exp. Cell Biol***,* v. 57, p. 198-205, 1989.

SILVIUS, J. R. **In Thermotropic Phase Transitions of Pure Lipids in Model Membranes and Their Modifications by Membrane Proteins;** JOST, P. C.; GRIFFITH, O. H., Eds.; John Wiley & Sons, Inc., New York, 1982; pp. 239-281.

SMIT, B. Phase-diagram of Lennard-Jones fluids. **J. Chem. Phys**, v. 96, p. 8639-4640, 1992.

SOK, M.; SENTJURC, M.; SCHARA, M.; STARE, J; ROTT, T. Cell membrane fluidity and prognosis of lung cancer. **Ann. Thorac. Surg**, v. 73, p. 1567-1571, 2002.

SPRONG, H.; VAN DER SLUIJS, P.; VAN MEER, G. How proteins move lipids and lipids move proteins. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** v. 2, 504-513, 2001.

STUBBS, C. D.; SMITH, A. D. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta**, 779, 89-137, 1984.

TIELEMAN, D. P.; MARRINK, S. J. Lipids out of equilibrium: energetics of desorption and pore mediated flip-flop. **J. Am. Chem. Soc**, v. 128, p. 12462-12467, 2006.

TORRIE, G. M.; VALLEAU, J. P. Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free energy estimation: umbrella sampling. **J Comput Phys**, v. 23, p. 187-199, 1977.

VAN BLITTERSWIJK, W. L.; VERHEIJ, M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1831, n. 3, p. 663-674, 2013.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer Simulation of Molecular Dynamics: Methodology, Applications and Perspectives in Chemistry. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl,** v. 29, p. 992-1023, 1990.

WANG, Y. Z.; LIU, X. Y.; WU, L. J.; ZHANG, Y. B.; HOU, L.; XU, Q. S. Antiproliferation effects of hexadecylphosphocholine on solid tumour and leukaemia selectively in vitro. **Drugs Exp Clin Res**, v. 23, p. 97-102, 1997.

WINTER, N. D.; SCHATZ, G. C.; Coarse-grained molecular dynamics study of permeability enhancement in DPPC bilayers by incorporation of lysolipid. **J. Phys. Chem. B**, v. 114, p. 5053-5060, 2010.

WNĘTRZAK, A.; LĄTKA, K.; DYNAROWICZ-ŁĄTKA, P. Interactions of alkylphosphocholines with model membranes-the Langmuir monolayer study. **J. Membr. Biol**, v. 246, p. 453-466, 2013.

ZEISIG, R; KOKLIC, T.; WIESNER, B.; FICHTNER, I.; SENTJURC, M. Increase in the fluidity in the membrane of MT3 breast cancer cells correlates with enhanced cell adhesion in vitro and increased lung metastasis in NOD/SCID mice. **Arch. Biochem. Biophys,** v. 459, p. 98–106, 2007.

## CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

As alquilfosfocolinas são uma alternativa interessante aos fármacos quimioterápicos atualmente usados devido à sua versatilidade e interação com componentes biológicos que normalmente não são alvos dos compostos tradicionalmente empregados no tratamento do câncer. A ação antiproliferativa dessa classe, bem como as rotas bioquímicas nas quais ela atua, justificam a busca por fármacos com estrutura semelhante, mas com toxicidade reduzida. Nesse sentido, esse trabalho contribuiu para a elucidação de características estruturais e propriedades físico-químicas que são determinantes para a hemólise, um dos maiores problemas concernentes à aplicação terapêutica dessa classe de compostos. O tamanho da cabeça catiônica, bem como o volume da cadeia alquílica, desempenham funções importantes na interação com a membrana de eritrócitos.

A cabeça catiônica também parece ter função importante na inibição do domínio C2 da PKCα. O impedimento estérico causado por esse grupo impede a coordenação dos oxigênios do grupamento fosforila com átomos de cálcio, que são fundamentais para a ativação da enzima. Sem cálcio, os eventos conformacionais que levam a PKCα para a membrana e a subsequente fosforilação de proteínas, ficam bloqueados. O resultado final é a redução da ativação de fatores de transcrição mitogênicos, resultando na interrupção do crescimento tumoral. Esses dados evidenciam que alterações da estrutura química da cabeça catiônica podem levar a novos candidatos a fármacos com as características farmacológicas de interesse.

Somando-se a isso, o aprisionamento do colesterol na membrana celular causado pela miltefosina cria um desequilíbrio na homeostase desse esterol, o que sinaliza a célula para a apoptose, sendo esse outro possível mecanismo para a ação antiproliferativa desse composto. A identificação do colesterol como plataforma de interação do protótipo das alquilfosfocolinas suscita questões sobre a importância desse esterol na sobrevivência celular, bem como sua função na interação de fármacos. Portanto, os resultados de interação da miltefosina com bicamadas lipídicas permitiram a identificação do colesterol, bem como dos *rafts* lipídicos, como potenciais novos alvos biológicos para ligação de compostos químicos, cuja alteração da homeostase tem impactos importantes na sobrevivência celular.

As técnicas versáteis de modelagem molecular permitiram o estudo minucioso das interações envolvidas em cada processo, possibilitando a criação de hipóteses sobre os mecanismos de ação das alquilfosfocolinas. A resolução atômica proporcionada pelas

metodologias computacionais é muitas vezes difícil (se não impossível) de se obter com técnicas experimentais, fazendo da modelagem molecular uma ferramenta tão importante quanto os resultados obtidos experimentalmente. A possibilidade do cálculo de quantidades físicas torna possível a quantificação de fenômenos que, em muitos casos, são descritos apenas qualitativamente, fornecendo informações para a resolução do problema.

Por fim, dois outros trabalhos estão em fase de finalização. O primeiro se dedica ao estudo das alterações biofísicas de bicamadas lipídicas com variadas concentrações de miltefosina (5mol% e 10mol%). Esse estudo pretende elucidar os possíveis mecanismos envolvidos na ruptura de membranas, como a mudança para fases não lamelares e as sequências de eventos envolvidos, além de caracterizar a suscetibilidade de cada tipo de bicamada (saturada, mono- e poli-insaturada, e contendo colesterol) ao efeito detergente das alquilfosfocolinas. O segundo estudo busca determinar o formato, número de agregação e tamanho de micelas de miltefosina, empregando simulações de dinâmica molecular e técnicas experimentais de espalhamento de luz.