



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



ODAILSON SANTOS PAZ

**ESTUDOS DE QSAR 2D E QSAR 3D PARA UM CONJUNTO
DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE ADENOSINA 2b,
POTENCIALMENTE ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ANEMIA
FALCIFORME**

Feira de Santana, BA

2012

ODAILSON SANTOS PAZ

**ESTUDOS DE QSAR 2D E QSAR 3D PARA UM CONJUNTO
DE ANTAGONISTAS DE RECEPTORES DE ADENOSINA 2b,
POTENCIALMENTE ÚTEIS NO TRATAMENTO DA ANEMIA
FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho

Feira de Santana, BA

2012

A Deus,
minha fonte de força e sabedoria.

Aos meus pais,
Oscarino e Edite,
meus primeiros e maiores mestres.

Ao meu irmão,
Osni,
meu exemplo de vida e conselheiro.

A minha esposa,
Daniela,
minha amiga e companheira de cada dia.

AGRADECIMENTO

Ao meu orientador professor Marcelo Castilho que com seu conhecimento academico norteou os passos desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular – LABIMM/Laboratório de Cristalografia de Macromoléculas – LaCriMa pelo apoio irrestrito, pela amizade, estímulo e colaboração. Em especial a Camila pelo apoio na correção desta dissertação.

Resumo

Os receptores de adenosina estão envolvidos em diversas vias fisiológicas e patológicas, assim, eles têm sido considerados como alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos contra diferentes patologias. O principal desafio para atingir esse objetivo é a inibição seletiva de um subtipo de receptor em relação aos demais. Este tópico é particularmente crucial para antagonistas do receptor de adenosina A2b (AdoRA2b) que tem sido apontados como moléculas promissoras para o tratamento da anemia falciforme, uma hemoglobinopatia que ocorre devido a uma mutação (GLU-VAL) na cadeia beta da hemoglobina e acomete principalmente indivíduos negros. A fim de contribuir para o desenvolvimento de fármacos contra a anemia falciforme esse projeto tem como objetivo investigar as propriedades químicas e estruturais de AdoRA2b importantes para sua atividade biológica. A estratégia empregada para alcançar tal objetivo se baseia no estudo quantitativo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR). Dessa forma foram desenvolvidos modelos de QSAR 2D baseados em hologramas moleculares para um conjunto de 195 derivados de 9-deazaxantina, cuja potência varia de 1,55nM a 2,19µM. Visando complementar os estudos de QSAR 2D foi realizada também análise comparativa de campos moleculares (CoMFA). Os modelos de QSAR 2D e CoMFA obtidos apresentam boa qualidade estatística (HQSAR - $r^2=0,85$, $q^2=0,77$; CoMFA - $r^2=0,86$, $q^2=0,70$) e capacidade preditiva ($r^2_{pred1}= 0,78$, $r^2_{pred2} = 0,78$ e $r^2_{pred1} = 0,70$, $r^2_{pred2} = 0,70$, respectivamente). A análise dos mapas de contribuição e de contorno revelam características importantes para a potência de derivados 9-deazaxantina frente ao receptor de adenosina A2b, tais como o efeito negativo para atividade de substituinte metoxi no anel 8-fenil, enquanto substituintes volumosos na região oxocetamida contribuem positivamente para a afinidade dos compostos estudados. A associação desses resultados pode ser útil no planejamento de novos antagonistas mais potentes e seletivos.

Palavras chave: AdoRA2B, anemia falciforme, QSAR 2D, QSAR 3D.

Abstract

The adenosine receptors are involved in many physiological and pathological processes, hence they have been considered as potential targets for the development of drugs against various diseases. The main challenge to achieve this goal is the selective inhibition of one receptor subtype over the others. This topic is particularly crucial for antagonists adenosine A2b receptor (AdoRA2B) which have been identified as promising compounds for the treatment of sickle cell disease, a hemoglobinopathy that is a consequence of a mutation (GLU-VAL) in the beta chain of hemoglobin and affects mainly black people. In order to contribute to the development of drugs against sickle cell disease this project aims to investigate the chemical and structural properties of AdoRA2B that are important for their biological activity. The strategy employed to achieve this goal is based on the quantitative structure activity relationship study (QSAR). Thus 2D-QSAR models have been developed with molecular holograms as descriptors, for a set of 195 deazaxanthine derivatives whose potency ranges from 1.55 nM to 2.19 μ M. In order to further investigate the steric and electronic properties that are responsible for the biological activity of these compounds, comparative molecular field (CoMFA), a 3D-QSAR approach, was also carried out. 2D-QSAR and 3D-QSAR models have good statistical quality (HQSAR - $r^2 = 0.85$, $q^2_{\text{LOO}} = 0.77$; CoMFA - $r^2 = 0.86$, $q^2 = 0.70$) and predictive ability ($r^2_{\text{pred1}} = 0.78$, $r^2_{\text{pred2}} = 0.78$ and $r^2_{\text{pred1}} = 0.70$, $r^2_{\text{pred2}} = 0.70$, respectively). Analysis of contour and contribution maps reveal important features for the affinity of 9-deazaxanthine derivatives, such as the adverse effect of methoxy substituent in the 8-phenyl ring on the activity, whereas bulky substituent near the oxocetamide positively contribute to the affinity of the studied compounds. The association of these results may be useful in design of novel more potent and selective antagonists.

Keywords: AdoRA2b, sickle cell disease, 2D QSAR, 3D QSAR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos fármacos que tem a finalidade de aumentar a concentração de hemoglobina F sanguínea em indivíduos com anemia falciforme.

Figura 2. Intervalo de produtividade na indústria farmacêutica.

IND (*Investigational New Drug*) = novos medicamentos aprovados por dólar pelo número de ensaios pré-clínicos dos fármacos candidatos recebidos pelo FDA. NDA (*New Drug Application*) = Novo medicamento (ASHBURN; THOR, 2004).

Figura 3. Principais dados da frequência da hemoglobina S nas diferentes regiões do Brasil (vermelho). População 186,7 milhões. AS = traço falciforme; DF = doença falciforme. Fonte: Dados Ministério da Saúde (Cançado; Jesus, 2007).

Figura 4. Representação esquemática das interações entre as globinas β e polimerização da HbS, resultando na falcização do eritrócito. Adaptado de STATIUS van Eps, 1999.

Figura 5. Mecanismo resumido da falcização dos eritrócitos. A ativação do RA2b aumenta os níveis de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) através da ativação da proteína cinase (PKA) e conseqüentemente promove a polimerização da Hb e falcização dos eritrócitos. Fonte: Adaptado de Dai et al., 2011

Figura 6. Sequência de alinhamento para os receptores A2b, A1, A2a e A3. TM – α -hélice transmembrana, ECL – Alça extracelular e ICL – Alça intracelular. Os principais resíduos TM e ECL2 são destacados em vermelho e os resíduos que forma ligação de dissulfeto estão coloridos em amarelo. Resíduos idênticos são coloridos em cinza, enquanto resíduos parcialmente idênticos em A2b e A2a são coloridos em rosa.

Figura 7. Representação esquemática da estrutura do receptor de adenosina. Os domínios transmembrana (TM) são representados pelos números romanos (I – VII). S-S representa a presença de pontes de dissulfeto. (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998)

Figura 8. Derivado de adenina com substituição nas posições 8 e 9 (8-bromo-9-etiladenina). Atividade biológica RA2b, $K_i = 840\text{nM}$; RA2a, $K_i = 520\text{nM}$; RA1, $K_i = 280\text{nM}$; RA3, $K_i = 278\text{nM}$.

Figura 9. Derivado triazolo pirimidínicos substituído na posição 8. Atividade biológica RA2b, $K_i = 5\text{nM}$; RA2a, $K_i = 0,31\text{nM}$; RA1, $K_i = 1\text{nM}$; RA3, $K_i = 2030\text{nM}$.

Figura 10. Derivados de quinazolina.

*CMB6446= 4-metil-7-metoxiquinazolil-2-(2'-amino-4' imidazolinona)

Atividade biológica RA2b, $K_i = 112\text{nM}$; RA2a, $K_i = 2,4\text{nM}$; RA1, $K_i = 1,3\text{nM}$.

Figura 11. Estrutura base dos derivados de xantina.

Figura 12. Compostos da classe das xantinas

Figura 13. Derivado de xantina substituído na posição 8. Atividade biológica: $K_i = 7\text{nM}$.

Figura 14. Estrutura dos derivados de 9-deazaxantina

Figura 15. Estrutura química de derivados de 9-deazaxantina antagonistas do RA2b. A seta aponta para a posição *orto* do anel 8-fenil.

Figura 16. Esquema ilustrativo da geração do holograma molecular. Adaptado de BASKIN; VARNEX, 2008.

Figura 17. Etapas envolvidas na geração de um modelo de HQSAR.

Figura 18. Etapas padrão do CoMFA.

Figura 19. . Estrutura base dos derivados de 9-deazaxantina

Figura 20. Estrutura do composto do composto 91. Átomos utilizados para guiar a sobreposição por máxima subestrutura comum estão em destaque.

Figura 21. Distribuição dos valores de pK_i para os ligantes do RA2b utilizados nesse estudo.

Figura 22. Gráfico de *pontuação* da análise de componentes principais. Distribuição das moléculas do conjunto treino (◆) e teste (□) no espaço químico definido por PC1 e PC2. Q= quadrante.

Figura 23. Valores experimentais e calculados de pK_i para o conjunto de dados de 195 compostos, segundo o melhor modelo de HQSAR.

Figura 24. Mapa de contribuição para o composto **128** ($pK_i = 6,57$), segundo o melhor modelo de HQSAR.

Figura 25. Mapa de contribuição para o composto **91** ($pK_i = 8,81$), segundo o melhor modelo de HQSAR.

Figura 26. Alinhamento tridimensional do conjunto de dados pelo método de máxima subestrutura comum (Alinhamento I).

Figura 27. Alinhamento tridimensional do conjunto de dados pelo método similaridade morfológica.

Figura 28. Estratégia para o realinhamento molecular das conformações oriundas dos Alinhamentos I e alinhamento II, pelo método da máxima estrutura comum, para a geração dos alinhamentos III.

Figura 29. Valores experimentais e calculados de pK_i para o conjunto de dados de 195 compostos (treino e teste), segundo o melhor modelo de CoMFA.

Figura 30. Mapa de contorno dos campos eletrostático (composto **77**, $pK_i = 7,76$), gerado pela análise de CoMFA. Poliedro verde - nível de contribuição 80%, poliedro amarelo - nível de contribuição 20%.

Figura 31. Mapa de contorno dos campos estereos (composto **98**, $pK_i = 6,73$), gerado pela análise de CoMFA. Poliedro verde - nível de contribuição 80%, poliedro amarelo - nível de contribuição 20%.

Figura 32. Mapa de contorno dos campos eletrostático (composto **77**, $pK_i = 7,76$), gerado pela análise de CoMFA. Poliedro vermelho – nível de contribuição 75%, poliedro azul – nível de contribuição 25%.

Figura 33: Estratégias de modificações moleculares a partir da análise dos mapas de contorno dos modelos de CoMFA para aumentar a atividade da série de compostos em estudo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos receptores de adenosina.

Tabela 2. Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR. (LOWIS, 1997).

Tabela 3. Modelos de HQSAR – Influência da distinção de fragmento, usando tamanho de fragmento padrão sobre os parâmetros estatísticos. SEE= erro padrão; HL= tamanho do holograma; N= número de componentes.

Tabela 4. Influência do tamanho de fragmento nos parâmetros estatísticos usando a melhor distinção de fragmento (átomo, conectividade, hidrogênio e quiralidade).

Tabela 5. Valores de K_i experimentais e preditos do conjunto teste (54 compostos) obtidos com o melhor modelo de HQSAR (A/C/H/Ch).

Tabela 6: Modelos de CoMFA obtidos com parâmetros padrão e espaçamento de 2Å.

Tabela 7: Influência da focagem da região e do espaçamento da grade nos valores de q^2 dos modelos de CoMFA.

Tabela 8: Resultados dos melhores modelos de CoMFA obtido com os Alinhamentos I, II, III.

Tabela 9. Valores de K_i experimentais e preditos do conjunto teste (54 compostos) obtidos com o melhor modelo de CoMFA.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

2D - Bidimensional

2,3-DPG - 2,3-Difosfoglicerato

3D - Tridimensional

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

AF - Anemia falciforme

A - Átomo

B - Ligação

C - Conectividade

Ch - Quiralidade

CoMFA - Análise Comparativa dos Campos Moleculares (do inglês *Comparative Molecular Field Analysis*)

DA - Doador e acceptor de hidrogênio

dAX - Deazaxantina

FDA - *Food and Drug Administration*

H - Hidrogênio

HbA - Hemoglobina A

HbF - Hemoglobina F

HbS - Hemoglobina S

HQSAR - Holograma QSAR

HTS - Ensaio em Larga Escala (do inglês *high throughput screening*)

IND - Novo Medicamento em investigação (do inglês *investigation new drug*)

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LBDD - Planejamento de Fármacos Baseado no Ligante (do inglês *ligand-based drug design*)

LMO - Deixe vários fora (do inglês *Leave-Many-Out*)

LOO - Deixe um fora (do inglês *Leave-One-Out*)

MLR - Regressão Linear Múltipla (do inglês *Multiple Regression Linear*)

NCE - Nova Entidade Química (do inglês *New Chemical Entities*).

NDA - Novo Medicamento (do inglês *New Drug Application*)

PC - Componente Principal (do inglês *Principal Components*)

PCA - Análise de Componentes Principais (do inglês *Principal Components Analysis*)

PLS - Mínimos Quadrados Parciais (do inglês *Partial Least Square*)

PKA - Proteína Cinase

QSAR - Relação Quantitativa Estrutura-Atividade (do inglês *Quantitative Structure-Activity Relationship*)

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

SAR - Relação Estrutura-Atividade (do inglês *Structure-Activity Relationship*)

SBDD - Planejamento de Fármacos Baseado na estrutura do Ligante (do inglês *Structure-Based Drug Design*).

SDC - Coeficiente de Desvio Padrão (do inglês *Standard Deviation Coefficient*)

SEE - Estimativa do Erro Padrão (do inglês *Standard Error Estimate*)

SEP - Predição do Erro Padrão (do inglês *Standard Error Prediction*)

TM - Domínio Transmembrana

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	18
1.1.1 Geral	18
1.1.2 Específicos	18
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	19
2.2 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACO	20
2.3 ANEMIA FALCIFORME	22
2.4 EPIDEMIOLOGIA	23
2.5 ASPECTO MOLECULAR DA ANEMIA FALCIFORME	24
2.6 RECEPTOR DE ADENOSINA A2b - RA2b	26
2.7 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DO RA2b	30
2.8 ESTUDOS DE QSAR	36
3 MÉTODOS	41
3.1 CONJUNTO DE DADOS	41
3.2 QSAR BASEADO EM DESCRITORES MOLECULARES	42
3.2.1 Cálculo e seleção dos descritores 2D	42
3.3 HQSAR	43
3.4 CoMFA	43
3.4.1 Alinhamento molecular	43
3.4.2 Cálculo dos descritores de QSAR 3D	45
3.5 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS FINAIS	45
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 QSAR BASEADO EM DESCRITORES MOLECULARES	50
4.2 ANÁLISES DE HQSAR	51
4.3 ANÁLISES DE CoMFA	58
5 CONCLUSÃO	70
REFERÊNCIAS	71
ANEXO	85

1 INTRODUÇÃO

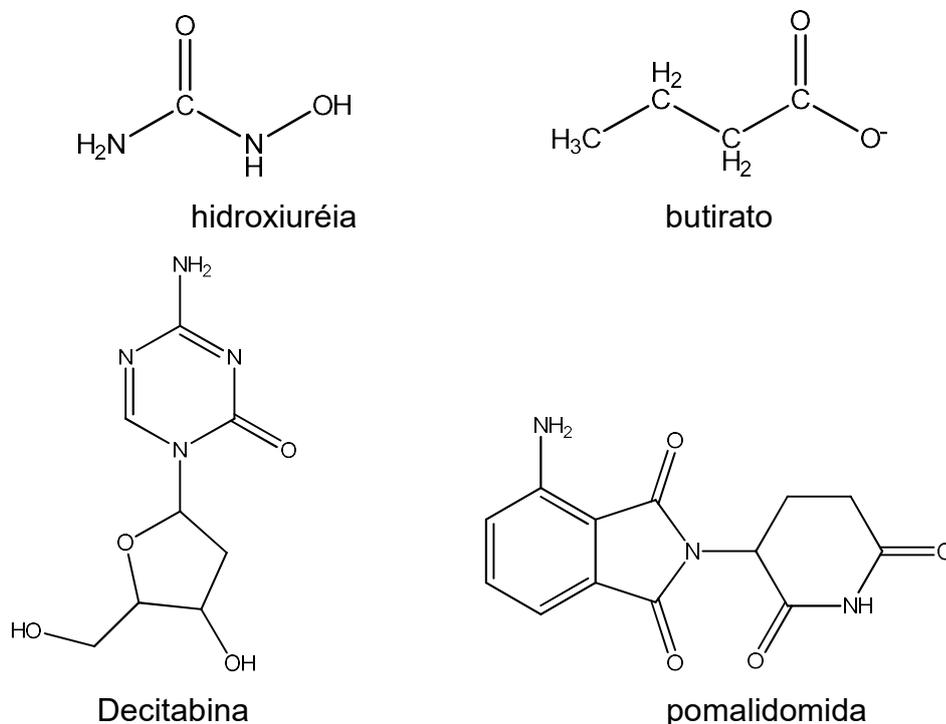
A anemia falciforme é um distúrbio genético de caráter autossômico recessivo, que se caracteriza pela homozigose da hemoglobina S (HbS) e está associada a eventos vaso-oclusivos, hemólise, vasculopatia endotelial e danos crônicos a vários órgãos (WARE & AYGUN, 2009). Esses sintomas são decorrentes da presença de eritrócitos em forma de foice nos quais se observa uma mutação no gene da globina β , que resulta na substituição de um resíduo ácido glutâmico por uma valina na posição 6 (Bunn, 1997). Como resultado dessa mutação, formam-se agregados que se polimerizam e alteram a estrutura globular da HbS desoxigenada, modificando também a morfologia discóide do eritrócito para forma de foice, a qual apresenta flexibilidade reduzida (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). Esses eritrócitos rígidos são responsáveis pelos fenômenos vaso-oclusivos que são marca da doença e, conseqüentemente, causam isquemia e necrose de tecidos (Buchanan et al., 2010). Além do quadro descrito acima, o paciente com anemia falciforme pode apresentar diversos sintomas clínicos como: síndrome torácica aguda; febre; acidente vascular cerebral; priapismo; úlcera de perna. (FABRON, 1997; FIGUEIREDO, 2001; NAOUM, 2004; SAAD, 2001).

A anemia falciforme é encontrada principalmente em negros de origem africana, essa doença afeta cerca de 250.000 crianças a cada ano no mundo, sendo 100.000 somente na Nigéria (SIMÕES et al, 2010). No Brasil, onde se verifica diversificado grau de miscigenação, estima-se que 700-1.000 casos novos ocorram anualmente. Porém no estado da Bahia, onde há um predomínio de afrodescendentes, a incidência dessa doença é de 1:650 entre os nascidos vivos (SILVA et al., 2006; CURY et al., 2010), o que torna essa doença particularmente importante para a saúde pública nesse estado.

Até o momento, a maioria dos tratamentos disponíveis para anemia falciforme tem finalidade paliativa (ex. Controle da dor decorrente de eventos vaso-oclusivos com opióides) ou não interferem diretamente na fisiopatologia da doença. Uma das principais estratégias terapêuticas para o tratamento da anemia falciforme é recorrer a agentes que elevam a concentração de hemoglobina fetal (HbF $\alpha 2\text{-}\gamma 2$) no sangue, uma vez que ela, ou tetrâmeros de hemoglobina que contêm pelo menos uma cadeia de HbF, não são incorporados no polímero de HbS. De fato, estudos

epidemiológicos mostram uma relação inversa entre a concentração de HbF e o número de complicações decorrentes da anemia falciforme (BANDEIRA et al, 2004). Como exemplo de fármaco que age nessa linha (Figura 1) pode-se citar hidroxiureia (inibidor de ribonucleotídeo redutase), butirato (inibidor de histona deacetilase), decitabina (agente que promove a hipometilação do DNA), pomalidomida (análogo da talidomida que promove a eritropoiese), entre outros (ATAGA, 2009).

Figura 1. Estrutura química dos fármacos que tem a finalidade de aumentam a concentração de Hemoglobina F sanguínea em indivíduos com anemia falciforme.



Outra estratégia terapêutica busca manter a hidratação dos eritrócitos falciformes (redução da concentração intracelular de hemoglobina), visando assim reduzir a polimerização de HbS. No entanto, moléculas que agem por esse mecanismo não são capazes de reduzir as crises de dor decorrentes da vaso-oclusão (STOKER, 2003). Isso se deve, em parte, ao fato de que esses fármacos não agem na etiologia da doença.

Recentemente descobriu-se um novo alvo potencial para o tratamento da anemia falciforme. Zhang e colaboradores (2011) demonstraram que durante o evento de hipóxia em camundongos com anemia falciforme, a concentração de adenosina está elevada. Esses estudos sugerem ainda que níveis elevados de adenosina, em

camundongos e humanos, levam ao aumento da concentração de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), um modulador alostérico que controla a afinidade de hemoglobina pelo oxigênio, sugerindo que adenosina, através do 2,3-DPG, contribui para a falcização das hemácias e, conseqüentemente, para as crises vaso-oclusivas agudas observadas em pacientes com anemia falciforme.

Os dados acima sugerem que receptores de adenosina são alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos contra a anemia falciforme. Considerando que modelos de QSAR 2D e 3D podem ser úteis para acelerar a otimização de antagonistas para o receptor de adenosina A2b e, até o momento não existem estudos utilizando essa metodologia para derivados de 9-deazaxantina. O presente trabalho teve por objetivo empregar técnicas de holograma QSAR e análise de campos moleculares para investigar as características estereoquímicas, eletrônicas e estruturais que determinam a atividade biológica dessa classe de compostos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Investigar as propriedades químicas (estruturais, físico-químicas, estéreas e eletrônicas) que determinam a ação antagonista de derivados de 9-deazaxantina sobre o receptor de adenosina 2b.

1.1.2 Específicos

- Desenvolver modelos de QSAR 2D robustos e preditivos, empregando hologramas moleculares;
- Identificar fragmentos estruturais e/ou propriedades físico-químicas que são essenciais para atividade antagonista de derivados de 9-deazaxantina frente a receptores de adenosina 2b;
- Criar modelos de interação ligante-receptor que possam ser úteis na elaboração de modelos farmacofóricos para derivados de 9-deazaxantina com atividade antagonista sobre receptores de adenosina 2b;
- Construir modelos de QSAR 3D, utilizando a técnica CoMFA, que permitam guiar a síntese de moléculas congênicas mais potentes contra receptores de adenosina 2b.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRATÉGIAS UTILIZADAS NO DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

Desde os primórdios da civilização, a procura de uma terapêutica para as principais patologias que afetam a humanidade tem sido uma preocupação constante (CALIXTO; SIQUERIA, 2008). Os povos antigos tentavam curar doenças comendo, bebendo ou aplicando substâncias, muitas vezes extratos de plantas, agora referidos como fitoterápicos. Originalmente, as tentativas de descobrir novos medicamentos e cura foram baseadas em intuição e observações empíricas. Durante o século passado no entanto, a busca por novos fármacos mudou drasticamente. Avanços no conhecimento da biologia humana, novas tecnologias e, mais recentemente, considerações de mercado alteraram a forma como os fármacos estão sendo descobertos (TSINOPOULOS; MCCARTHY, 2012). Durante a primeira parte do século passado, quando o conhecimento e a tecnologia eram limitados, houve mínimo ou nenhum planejamento estratégico e o desenvolvimento de novos fármacos foi dominado pela “sorte científica”. Entretanto, o avanço na compreensão da biologia e química do organismo humano permitiu que se desenvolvesse soluções específicas para o tratamento de inúmeras doenças (planejamento de fármacos) (TSINOPOULOS; MCCARTHY, 2012). As novas abordagens envolvem técnicas avançadas como a química combinatória, ensaio em larga escala (HTS do inglês *high throughput screening*), engenharia genética e desenho de fármaco auxiliado por computador (CADD do inglês, *computer-aided drug design*), o qual tem contribuído para diminuir os custos e agilizar o processo de descoberta de fármacos (THAKUR; CHANDAN, 2012).

As principais técnicas de CADD incluem: planejamento baseado no ligante (por exemplo, modelos farmacofóricos), planejamento baseado na estrutura do alvo terapêutico (por exemplo, acoplamento molecular) e estudo da relação quantitativa entre a estrutura química e atividade biológica (QSAR do inglês *quantitative structure-activity relationship*) (por exemplo, predição da atividade biológica de novos compostos com base em modelos matemáticos) (KAPETANOVIC, 2008). A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC do *International Union of Pure and Applied Chemistry*) define farmacóforo como “o conjunto de características

estereoquímica e eletrônicas necessário para garantir a interação entre a molécula e a estrutura do alvo biológico, determinando assim a resposta biológica” ([HTTP://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#p7](http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/medchem/ix.html#p7)). Os modelos farmacofóricos são descritos em função das interações que a molécula pode realizar. Por essa razão, seus grupos são classificados em doadores/aceitadores de ligação de hidrogênio, grupos hidrofóbicos, aromáticos e grupos ionizáveis. Para a geração de modelos farmacofóricos é necessário o conhecimento de ligantes ativos ou da estrutura alvo (FUNK et al, 2004). Por outro lado, a metodologia baseada no alvo terapêutico requer informações estruturais desse receptor, que podem ser obtidas por ressonância magnética nuclear (RMN), cristalografia de raio-X ou por modelagem por homologia. Essa técnica é usada para identificar e otimizar candidatos a fármacos através da análise de interações moleculares entre o ligante e a estrutura alvo (WARREN et al., 2006).

As técnicas apresentadas até agora oferecem uma visão qualitativa das relações entre a estrutura química e a atividade biológica, entretanto não permitem quantificar qual seria o impacto da substituição de um determinado grupo (ex. amina primária) por outro (ex. hidroxila). Uma alternativa para contornar essa limitação é empregar métodos de QSAR (relação quantitativa entre a estrutura e atividade – *quantitative structure activity relationships*) que tem como objetivo criar modelos estatísticos que relacionem, quantitativamente, a estrutura química e/ou as propriedades físico-químicas decorrentes dela com a atividade biológica observada. Assim, esses modelos são extremamente valiosos no planejamento de moléculas com propriedades biológica superiores àquelas do conjunto de dados empregado na modelagem molecular (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

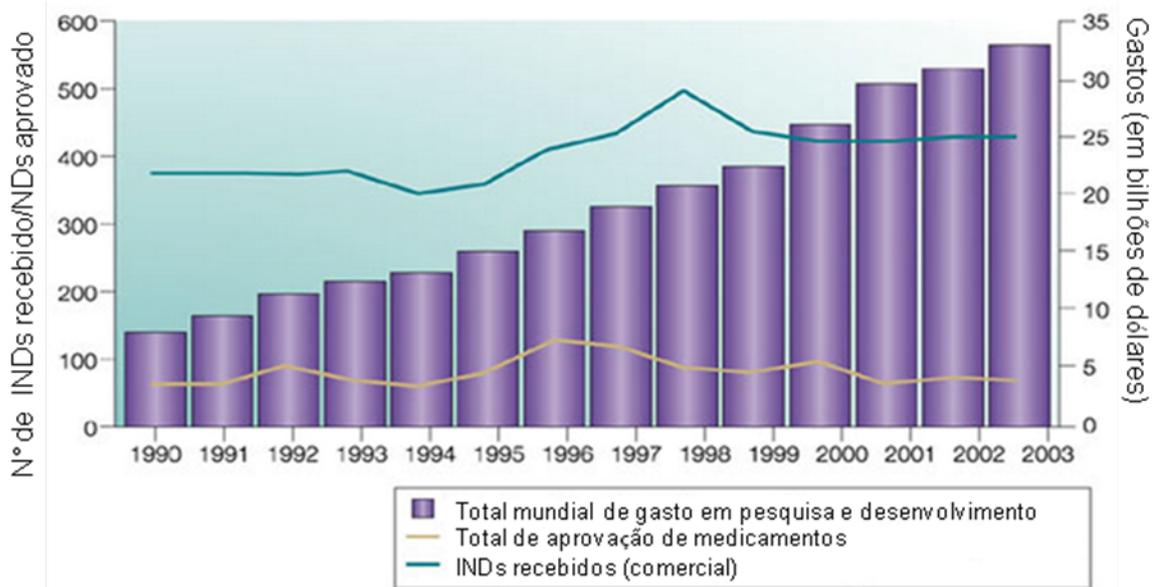
2.2 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACO

Um dos principais desafios para a indústria farmacêutica é manter o ritmo da descoberta de novos fármacos face aos gastos com pesquisas e desenvolvimento (Figura 2) (LANDERS, 2012). Esse problema persiste, apesar das empresas farmacêuticas terem investido valores altos no planejamento baseados na estrutura do alvo, química combinatória, ensaios de HTS e em técnicas genômicas (ASHBURN; THOR, 2004). Um exemplo emblemático disso foi a expectativa frustrada de que HTS facilitaria e reduziria o custo para identificação de moléculas

bioativas que posteriormente poderiam ser otimizadas a fármacos (MARTIS; RADHAKRISHNAN; BADVE, 2011).

As pequenas taxas de sucesso no processo de desenvolvimento de fármacos, aliado a concorrência de medicamentos genéricos e obstáculos crescentes impostos pelas agências reguladoras, tem levado a indústria farmacêutica a redefinir sua estratégia de inovação, buscando, por exemplo, investigar a utilidade de medicamentos já existentes para novas indicações terapêuticas (EDITORIAL, 2004; ASHBURN; THOR, 2004).

Figura 2. Intervalo de produtividade na indústria farmacêutica.



IND (*Investigational New Drug*) = novos medicamentos em investigação por dólar pelo número de ensaios pré-clínicos dos fármacos candidatos recebidos pelo FDA. NDA (*New Drug Application*) = Novo medicamento.

Fonte: ASHBURN; THOR, 2004

O reposicionamento de fármaco (do inglês, *drug repurposing*) é aplicado a medicamentos já bem estabelecidos no mercado, bem como aqueles que ainda estão sendo avaliados nas fases clínicas (SWAMIDASS, 2011). Entre os exemplos de sucesso dessa estratégia se incluem o sildenafil, desenvolvido inicialmente para problema cardíaco e hoje utilizado para o tratamento de disfunção erétil; talidomida que originalmente foi desenvolvida para o tratamento de enjôo é atualmente indicada para o tratamento do mieloma múltiplo e da hanseníase; aminobifosfonato desenvolvido para tratar a osteoporose, hoje é utilizado no tratamento da progeria (envelhecimento acelerado) (SLEIGH; BARTON, 2010; OPROMOLLA, 2000; SAWAMIDASS, 2011). Não há critérios definidos para identificar os candidatos mais

adequados para o reposicionamento. No entanto, existem duas situações principais onde esse estratégia pode ser empregada: 1) Alguns fármacos apresentam baixa seletividade pelo seu alvo macromolecular, causando efeitos colaterais oriundos de interações “fora do alvo” (do inglês, *off target*). A modificação da molécula original, visando aumentar sua afinidade por esses alvos “secundários”, pode resultar em uma nova aplicação terapêutica; 2) Em outros casos o que se busca é um nova indicação terapêutica pela modulação do mesmo alvo. Por exemplo, o processo biológico importante para uma determinada patologia pode ser relevante para mais de uma doença, portanto a modificação da dose ou de parâmetros farmacocinéticos do fármaco podem contribuir para que ele seja indicado para diferentes enfermidades (SLEIGH; BARTON, 2010). Esse tipo de reposicionamento pode ser observado para a finasteride que inibe seletivamente a enzima esteróide tipo II alfa redutase. A indicação principal desse fármaco é para o tratamento do aumento da próstata, mas ele também é eficaz no tratamento da calvície masculina, inibindo a mesma enzima (EKMAN, 1999). Outro exemplo de nova indicação para o mesmo alvo envolve o receptor de adenosina subtipo A2b (RA2b) que tem papel patológico na asma (BROWN; SPINA; PAGE, 2008) mas também está envolvido no processo da anemia falciforme (ZHANG et al, 2011).

2.3 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme (AF) é causada por uma mutação no gene da globina beta da hemoglobina, originando uma hemoglobina variante, denominada hemoglobina S (HbS) (ANVISA, 2001). Os indivíduos homozigotos afetados apresentam anemia grave (anemia falciforme), enquanto os heterozigotos normalmente não apresentam sintomatologia clínica (PAIVA E SILVA; RAMALHO, 1997). A mutação no gene que codifica a hemoglobina leva à substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia beta, com conseqüente modificação das propriedades físico-químicas da hemoglobina (GUALANDO, 2001). Como resultado das alterações físico-químicas, ocorre a distorção da forma das hemácias, ocasionando redução da vida média dos glóbulos vermelhos (BRASIL, 2001; EMBURY, 1997; WALLACE; LINDEN, 2010). Quando a HbS está na forma desoxigenada, a valina que substitui o ácido glutâmico realiza uma interação hidrofóbica com resíduo de outra molécula de hemoglobina, desencadeando o processo de agregação. A polimerização da HbS

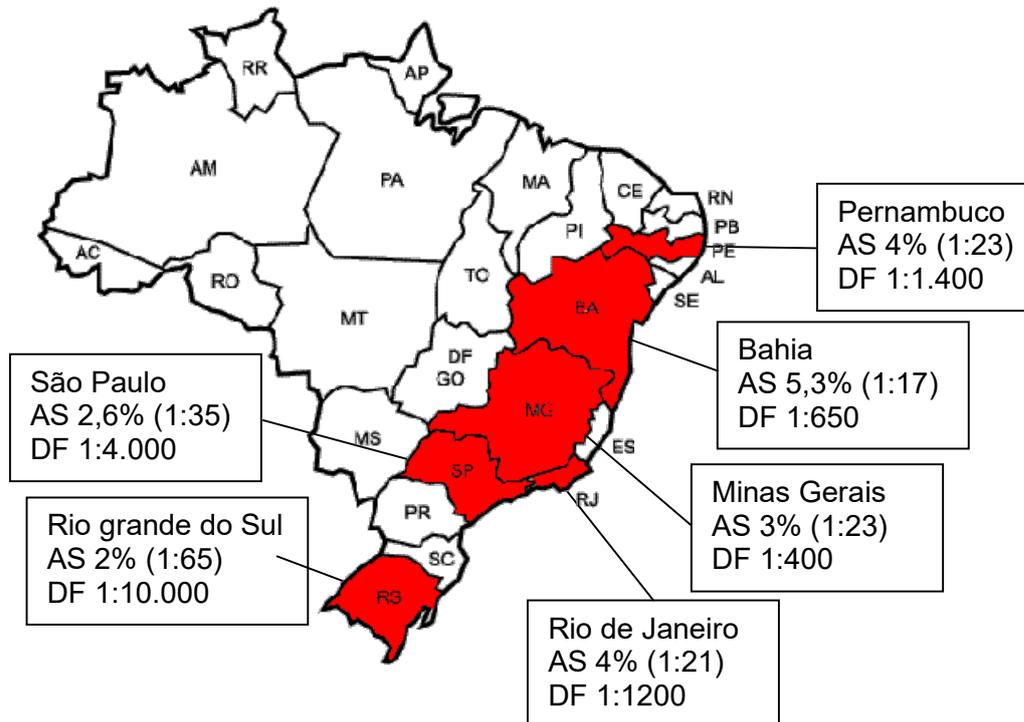
desoxigenada promove uma distorção no formato das hemácias e diminuição importante de sua deformabilidade. Estas células rígidas são responsáveis pelo fenômeno vaso-oclusivo característico da doença (BUNN, 1997). Além do quadro de oclusão que resulta em morte tecidual e crises dolorosas, a anemia falciforme pode apresentar diversos sintomas como: síndrome torácica aguda; febre; acidente vascular cerebral; priapismo e úlcera de perna (FABRON JR, 1997; FIGUEIRREDO, 2001; GUALANDRO, 2001; NAOUM; NAOUM, 2004; SAAD, 2001; STEINBERG, 1999).

2.4 EPIDEMIOLOGIA

A anemia falciforme é a doença hematológica hereditária mais comum no mundo. Estima-se que aproximadamente 7% da população mundial seja acometida pelos transtornos das hemoglobinas, representados, na sua maioria, pelas talassemias e pela doença falciforme (Loureiro, 2005; Weatherall; Clegg, 2001). Além disso, estimativas sugerem que 250.000 crianças com anemia falciforme nascem a cada ano, sendo 100.000 delas somente na Nigéria (SERJEANT, 1997; Townes, 2008). No Brasil, a anemia falciforme foi apontada como questão central para a saúde pública, devido a diferentes origens raciais e diversificado grau de miscigenação (PAIVA E SILVA; RAMALHO, 1997). A distribuição do gene S nesse país é bastante heterogênea, dependendo de composição negróide ou caucasóide da população. A figura 3 mostra dados da frequência da hemoglobina S em alguns estados do Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (Cançado; Jesus, 2007). Estima-se que no Brasil existam mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS. Desses, mais de 8 mil apresentam a forma grave (SS). Estimativas indicam ainda que haja setecentos a mil novos casos anuais de anemia falciforme (BRASIL, 2001; Silva; Shimaauti, 2006). Os dados acima indicam que 0,1 a 0,3% da população negroide é acometida pela anemia falciforme, sendo que essa porcentagem tende a aumentar, devido ao grau de miscigenação crescente em nosso país. (NUZZO; FONSECA, 2004). Entre as crianças que nascem com anemia falciforme, a letalidade pode atingir até 25% nos primeiros cinco anos de idade (DINIZ et al, 2009). A Bahia, em decorrência de sua história de povoamento, é o Estado com maior prevalência da anemia falciforme no país (SILVA; et al., 2006). De fato, no estado da Bahia cada 650 crianças que nascem 1 nasce com anemia falciforme (SIMÕES et al., 2010) sendo que em

crianças afrodescendentes, na cidade de Salvador, apontou uma frequência de 7,4% (AZEVEDO et al., 1980). Além disso, estudos populacionais têm demonstrado aumento no número de indivíduos caucasóides portadores da anemia falciforme (NUZZO; FONSECA, 2004).

Figura 3. Principais dados da frequência da hemoglobina S nas diferentes regiões do Brasil (vermelho).



População 186,7 milhões. AS = traço falciforme; DF = doença falciforme.

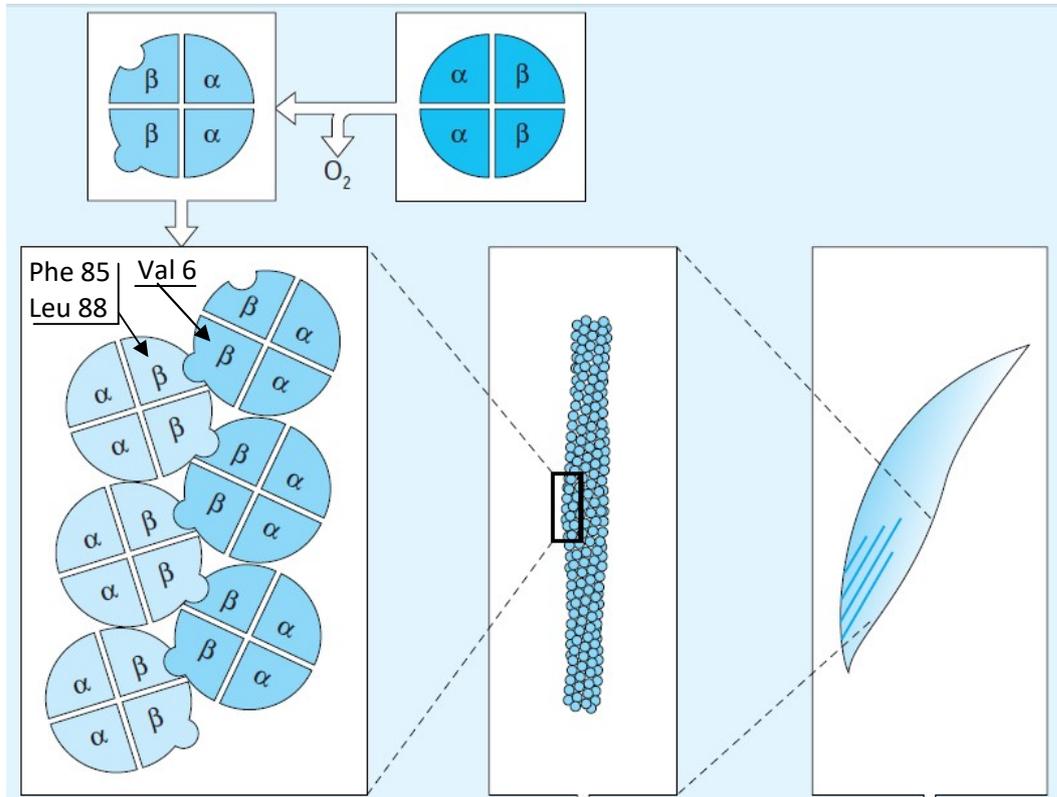
Fonte: Dados Ministério da Saúde (SIMÕES et al., 2010).

2.5 ASPECTO MOLECULAR DA ANEMIA FALCIFORME

A base molecular da doença é uma transversão da adenina por uma timina no sexto códon do gene que codifica a cadeia β da hemoglobina. Através dessa mutação pontual, o códon GAA transforma-se em GTA, levando a substituição do ácido glutâmico pela valina na cadeia polipeptídica (TOWNES, 2008; LEVASSEUR; et al., 2003). Na hemoglobina A (HbA) não há essa modificação, o ácido glutâmico na posição 6 da globina β não permite a polimerização dessa hemoglobina. Por outro lado, a valina (cadeia β , posição 6) promove uma interação hidrofóbica com a fenilalanina (cadeia β , posição 85) ou leucina (cadeia β , posição 88) de outro

tetrâmero (Figura 4), o que favorece a polimerização sob condições de baixo teor de oxigênio (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Figura 4. Representação esquemática das interações entre as globinas β e polimerização da HbS, resultando na falcização do eritrócito.

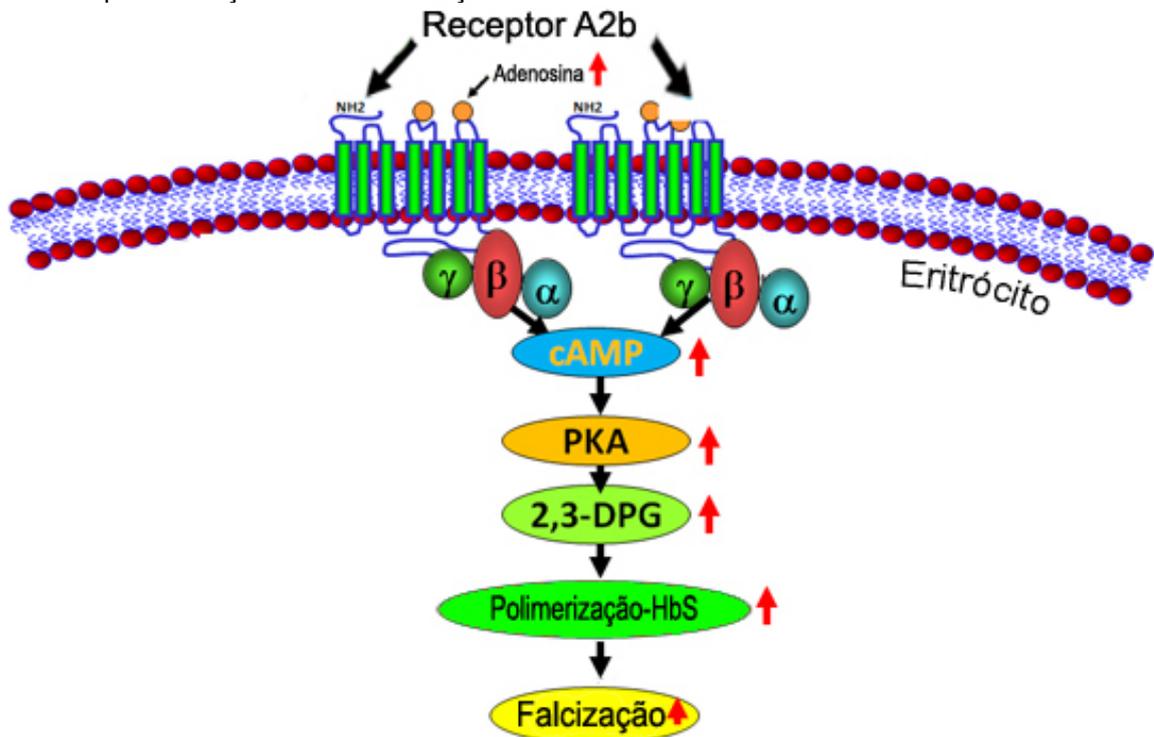


Fonte: Adaptado de STATIUS, 1999.

A polimerização intracelular da desoxihemoglobina (hemoglobina sem oxigênio) tem influência de alguns fatores, tais como concentração intracelular de HbS, temperatura, acidez, força iônica e 2,3-DPG (PADLAN; LOVE, 1985). Quando o 2,3-DPG se encontra em concentração elevada nos eritrócitos de pacientes com anemia falciforme ocorre diminuição da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio. Concomitante à isso, a acidificação do citoplasma celular favorece a polimerização, pela diminuição da solubilidade da HbS desoxigenada (POILLON et al., 1995). A elevação do 2,3-DPG pode ser explicada da seguinte forma: A ativação do RA2b, um receptor acoplado a proteína G, eleva os níveis de AMPc através da ativação da adenilil ciclase. Na presença desse segundo mensageiro a proteína cinase (PKA) é estimulada a produzir 2,3-DPG (Figura 5). Diante desse mecanismo bioquímico, o

bloqueio de RA2b parece ser uma abordagem interessante para o tratamento da doença falciforme (ZHANG et al., 2011).

Figura 5. Mecanismo resumido da falcização dos eritrócitos. A ativação do RA2b aumenta os níveis de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG) através da ativação da proteína cinase (PKA) e conseqüentemente promove a polimerização da Hb e falcização dos eritrócitos.



Fonte: Adaptado de Xia et al., 2011

2.6 RECEPTOR DE ADENOSINA A2b – RA2b

Além do seu papel no metabolismo energético, a adenosina atua na sinalização celular, uma vez que ela se liga a receptores específicos presentes na superfície da célula e regula, desta forma, alguns processos fisiológicos (FREDHOLM, 2007). As funções biológicas da adenosina extracelular são mediadas por quatro subtipos de receptores de adenosina diferentes (Tabela 1): A1 e A3 (receptores acoplados a proteína G (G_i) cuja ativação inibe a adenilil ciclase com conseqüente inibição da produção de AMPc), A2a e A2b (receptores acoplados a proteína G (G_s) cuja ativação estimula a adenilil ciclase promovendo aumento do AMPc) (FREDHOLM et al., 2000).

Há extensa similaridade de sequência entre as espécies para os receptores A1, A2a e A2b, enquanto o receptor A3 é mais variável (LONDOS; COOPER; WOLFF, 1980).

Assim como outros receptores acoplados a proteína G, os RAs apresentam sete domínios transmembrana (TM), cada um deles formado por hélices alfa com cerca de 21-28 aminoácidos, predominantemente hidrofóbicos. A porção N-terminal do receptor encontra-se no lado extracelular, ao passo que no citoplasma da célula encontra-se o C-terminal. As α -hélices TM são conectadas por seis alças hidrofílicas, três extracelulares e três voltadas para o citoplasma (RELEVIC; BURNSTOCK, 1998) (Figura 6).

Tabela 1. Classificação dos receptores de adenosina.

	A1	A2a	A2b	A3
Acoplamento proteína G	$G_{i/o}$	G_s	$G_{s/q}$	$G_{i/q}$
Efeitos	\downarrow cAMP \uparrow IP ₃ \uparrow K ⁺ \downarrow Ca ²⁺	\uparrow AMPc	\uparrow AMPc \uparrow IP ₃	\downarrow AMPc \uparrow IP ₃
Agonistas seletivos	CPA, CCPA, CHA, R-PIA	CGS21680, HE-NECA, APEC, CV 1808, DPMA, a WRC-0470	-	IB-MECA, 2Cl-IB-MECA
Antagonistas seletivos	DPCPX, XAC, KW-3902, ENX, KFM 19, N 0861, FK 453, WRC 0571	KF17837, ZM241385, CSC, SCH 58261	-	I-ABOPX <u>2-a</u> , L-268.605, L-249313, MRS 1067, MRS 109

Abreviações: APEC = 2-[(aminoetilamino) carboniletilfeniletilamino]-5-N-etilcarboxaminoadenosina; CGS21680 = 2-[p-(2-carbonil-etil)-feniletilamino]-5- N-etilcarboxaminoadenosina; CCPA = 2-cloro-CPA; CHA= N⁶-ciclopentiladenosina; 2Cl-IB-MECA= 2-cloro-N⁶-(3-iodobenzil)-5-(N-metilcarbamoil) de adenosina; CPA= N⁶-ciclopentil adenosina; CSC= 8-(3-chlorostiri) cafeína; CV 1808= 2-fenilamino adenosina; DPCPX= 1,3-dipropil-8-ciclopentil xantina; DPMA= N⁶-[2(3,5-dimetoxifenil)-2-(2-metilfenil) de etiol]- adenosina; ENX= 1,3-dipropil-8-[2-(5,6-epóxi) norbornil] xantina; FK 453= (+)-(-)-(R)-[(E)-3-(2-fenilpirazol[1,5- α]piridin-3-il) acriloil etanol]-2-piperidina; HE-NECA= 2-hexil-5-N-etilcarboxaminoadenosina; I-ABOPX= 3-(3-iodo-4-aminobenzil)-8-(4-oxiacetato)fenil-1-propirilxantina; IB-MECA= N⁶-(3-iodobenzil)-5-(N-metilcarbamoil) adenosina; KF17837= 1,3-dipropil-8-(3,4-dimetoxistiril)-7-metilxantina; KFM19= [(\pm)-8-(3-oxociclopentil)-1,3-dipropilxantina]; KW-3902= 8-noradamant-3-il-1,3-dipropilxantina; L-249313= 6-carboximetil-5,9-dihidro-9-metil-2-fenil-[1,2,4]-triazol[5,1-a][2,7]naftiridina; L-268605= 3-(4-metoxifenil)-isopropiloxi-4-metilflavona; MRS1097= 3,5-dietil 2-metil-6-fenil-4-(*trans*-2-fenilvinil)-1,4(R,S)-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato; N0861= 1,3-dipropil-8-[2,(5,6-epoxi)norbornil]xantina; R-PIA= (R)N⁶-fenilisopropiladenosina; SCH58261= 5-amino-7-(2-feniletil)-2 (2-furil)-pirazol[4,3-e]-1,2,4-triazol[1,5-c]pirimidina; WRC0470= 2-ciclohexilmetilidanehidrazina adenosina; WRC0571= 8-(N-metilisopropil)amino-N⁶-(5-endohidroxi-endonorbopil)-9-metiladenina; XAC= xantina amina congenero; ZM241385= 4-(2-[7-amino-2-(2-furil)]1,2,4-triazol[2,3-a][1,3,5]triazin-5-ilamino]etil)fenol. (RELEVIC; BURNSTOCK, 1998)

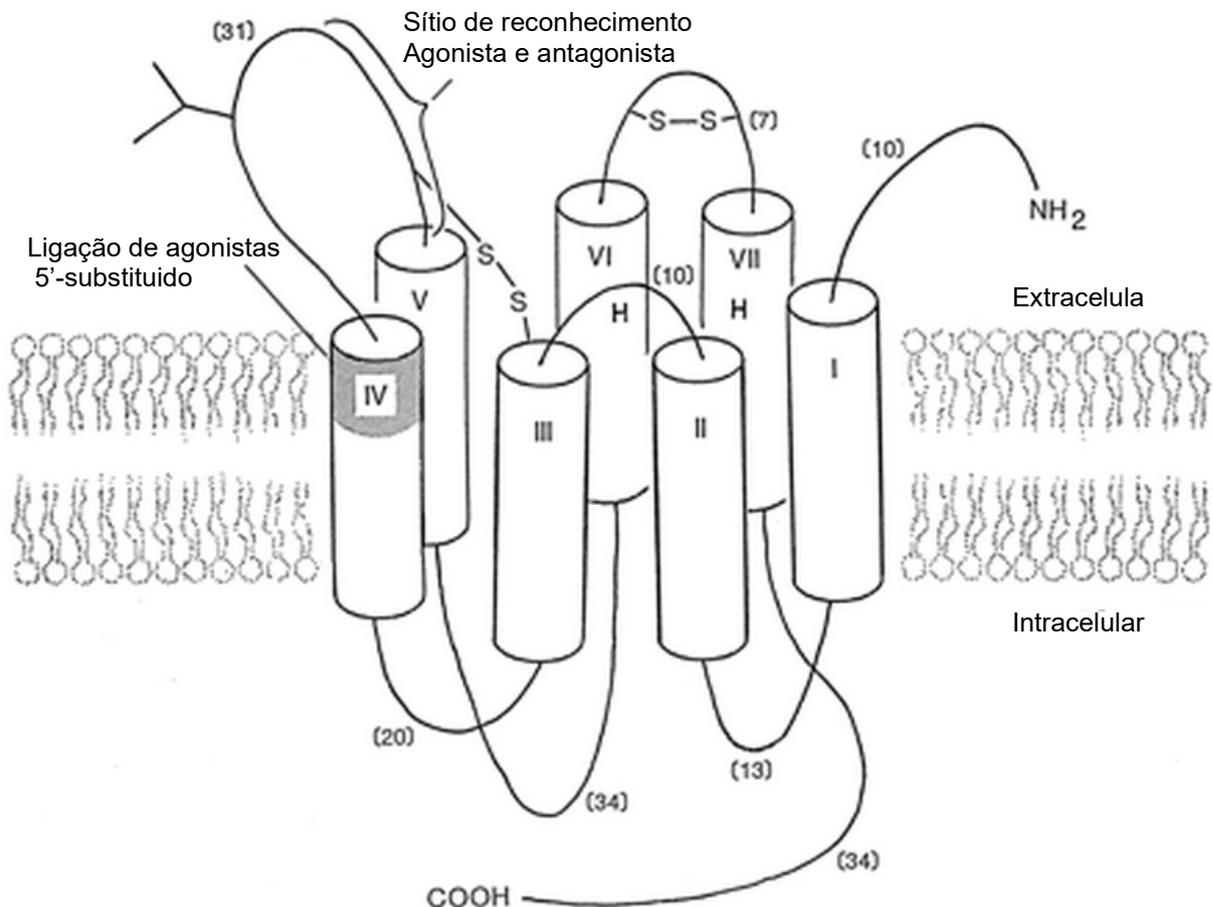
Figura 6. Sequência de alinhamento para os receptor A2b, A1, A2a e A3. TM – α -hélice transmembrana, ECL – Alça extracelular e ICL – Alça extracelular. Os principais resíduos TM e ECL2 são destacados em vermelho e os resíduos que forma ligação de disulfeto está colorido em amarelo. Resíduos idênticos são coloridos em cinza, enquanto resíduos parcialmente idênticos em A2b e A2a são coloridos em rosa.

	N-tern	TM1	ICL1	TM2	ECL1																																	
A _{2A}	1	MPIMGSSVYITV	ELAI	AVLAILGNVLVCWAVWLN	SNLQNV	TNYFVVS	LAAADIAVGLFAI	PPFAITISTG	69																													
A _{2B}	2	LLETQDALYVALELVIA	AALS	VAGNVLVCAAVGTANT	LQTP	TNYFLVSLAAAD	VAVGVLAIPFAITISLG	70																														
A ₁	4	SISAFQAAYIGIEVLIA	LVSVP	GNVLVIWAVKVNQAL	LRDATFCF	FIVSLAVAD	VAVGALVIPLAILINIG	72																														
A ₃	7	ALSLANVTYITMEIF	IGLCAIV	GNVLVICVVKLNPS	LQTTTFYF	FIVSLALAD	IAVGVLMPLAIVVSLG	75																														
		TM3	ICL2	TM4																																		
A _{2A}	70	FCAACHGCLFIACFV	LVLTQSSIFS	LLAIAIDRYIAIRI	PLRYNGLVTG	TRAKGIIA	ICWVLSFAIGL	137																														
A _{2B}	71	FCTDFYGCLFLACFV	LVLTQSSIFS	LLAVA	VDRYLAI	CVPLRYKSLVTG	TRARGVIAVLWVLA	FGIGL 138																														
A ₁	73	PQTYFHTCLMVAC	PVLIITQSSIL	LALLAIA	VDRYL	RVKIP	PLRYKMVTP	PRRAVAIAGCWIL	SFVVGL 140																													
A ₃	76	ITIHFYSCLEMTCL	LLIFTHASIMS	LLAIA	VDRYL	RVKLT	VRYKRVTT	HRRIWLALGLC	WLVSLVGL 143																													
		ECL2	TM5																																			
A _{2A}	138	TPMLGWN-----	NCGQPK	EKGNH	SQCGEGQ	VACL	FDVVP	MNYMVF	NFFACVLP	LLMLGVY 197																												
A _{2B}	139	TPFLGWN	SKDSAT	NCTEP	WDGTTN	ESCC---	LVKCL	FEN	VVPM	SYMVF	NFFGCVLP	LLIMLVY 202																										
A ₁	141	TPMFGWN-----	NLSA	VERA	WAANG	SMGEP	VIKCF	PKV	ISME	YMVF	NFFVWVLP	LLLMVLIY 200																										
A ₃	144	TPMFGWN-----	MKLT	SEY	HRNV	TFLSCQ	FVS	VMR	DM	YMVF	SFLT	WIFIP	LVVMCAIY 197																									
		ICL3	TM6	ECL3																																		
A _{2A}	198	LRIFLAARRQLKQ	MESQ	PLPGER	ARSTLQ	KEVHA	AKSLA	IVGLFALC	WLP	LIINC	FTFFCP	DCS- 263																										
A _{2B}	203	IKIFLVACRQLQR	TELM---	DHS	RTTLQ	REI	HAAK	SLAM	IVGIFALC	WLPV	HAVN	CVTLFQ	PAQ GK 265																									
A ₁	201	LEVYLI	LRKQLN	KKVSAS	--SGDP	QKY	GKEL	KIAKSL	ALILF	FALS	WLP	LIINC	ITLFCPSCH- 263																									
A ₃	198	LDIF	YIIRNK	LSL	NLSNS---	KETG	AFY	GR	FKTAKS	LFLV	FLFALS	WLP	LSIINC	IYFN---G- 257																								
		TM7	c-term																																			
A _{2A}	264	HAPLWLMYL	LAIVLS	HTNS	VVNP	FII	YVRI	REFR	QTF	FRKII	RSHV	L	RQ	EP	FK	AAGT	SARVL 324																					
A _{2B}	266	NKPKWAM	NMAIL	LSHANS	VVNP	I	YVYR	N	RDFR	YTF	FKIIS	RYLL	C	Q	AD-	VK	SGNG	QAGVQ 325																				
A ₁	264	-KPSILTYIAIF	LTHG	NSAM	NP	I	YAFRI	Q	KFR	V	TFL	KI	W	N	D	H	F	R	C	Q	P	A	P	I	D	E	L	P	E	E	R	P 324						
A ₃	258	EV	PQLV	LYMG	ILLS	HANS	MNP	I	YAY	KIKK	F	K	E	T	Y	L	L	K	A	C	V	V	C	H	P	S	D	S	L	D	T	S	I	E	K	N	S	E 318

Fonte: CHENG et al., 2010.

Os TM são geralmente conservados, com regiões homólogas em TM-II, TM-III e TM-V (Figura 7). As principais diferenças na sequência são observadas na região variável localizada na porção N-terminal da alça extracelular (TUCKER; LINDEN, 1993). Porém, os resíduos dos TMs são cruciais, uma vez que determinam as diversas funções de cada receptor (FREDHOLM, 2001) e o sítio de ligação dos diferentes ligantes também pode ser encontrado nessa região (OLAH et al., 1994).

Figura 7. Esquema da estrutura do receptor de adenosina. Os domínios transmembrana (TM) são representados pelos números romano (I – VII). S-S representa a presença de ligação de sulfeto.



Fonte: RALEVIC; BURNSTOCK, 1998)

Devido a função dos RA em eventos fisiológicos e fisiopatológicos, esses receptores tem sido considerado alvos potenciais para tratamento de diversas doenças (FREDHOLM, 2010). O receptor de adenosina 2b (RA2b), em particular, tornou-se objeto de intenso estudo na área da química medicinal, pois evidências indicam que antagonistas e agonistas desse receptor podem ter uma variedade de aplicações terapêuticas (FERNÁNDEZ, 2009). De fato, foi demonstrado que a ativação do RA2b pode conduzir a: (1) aumento da concentração de cálcio e secreção de íons cloreto

nas células intestinais (assim, causando irritações intestinal) (RALEVIC; BURNSTOCK, 1998); (2) aumento na formação e circulação de interleucina cerebral IL-6, que tem sido associada com demências e doença de Alzheimer (MRAK; GRIFFIN, 2001); (3) super-estimulação de mastócitos, induzindo distúrbios de hipersensibilidade, febre e eczema tópico (XAUS et al, 1999).

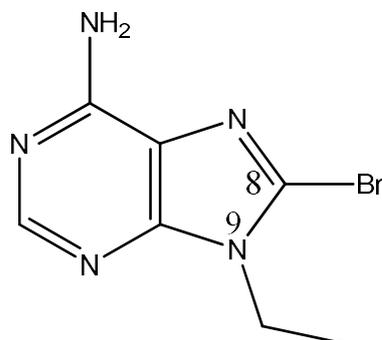
Além disso, considerou que a estimulação de mastócitos pode levar a broncoconstrição (ZHONG; et al, 2005). Foi postulado que este receptor desempenha um papel fundamental na modulação de processos patológicos que levam a doenças pulmonares, tal como a asma (RYZHOV; et al., 2004). Assim, o tratamento com antagonistas seletivos de RA2b pode ser uma abordagem terapêutica para a asma, devido à sua ação broncodilatadora e anti-inflamatória.

Diante dos fatos descritos acima, identificar antagonistas seletivos de RA2b passou a ser considerado uma estratégia interessante para o desenvolvimento de potenciais agentes antiasmáticos (CHENG et al. 2010; KIM, et al, 2002). Essa busca se fundamenta na observação de que teofilina e emprofilina, utilizados no tratamento da asma, apresentam afinidade por RA2b (STEFANACHI et al., 2008b). Como compostos xantínicos naturais (exemplo: teofilina) apresentam afinidade moderada pelo RA2b, análogos estruturais e derivados desses compostos foram investigados quanto a sua afinidade e seletividade frente ao RA2b (CAROTTI, 2006; BARALDI; et al., 2004; FOZARD, 2003; KALLA; et al, 2008).

2.7 RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DOS LIGANTES DO RA2b

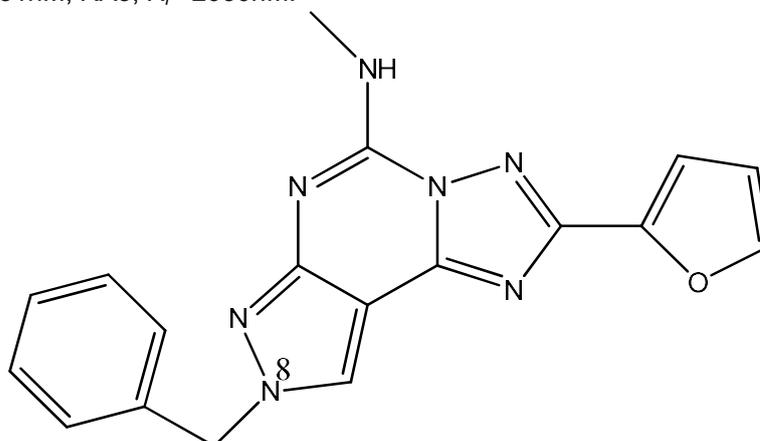
Como o próprio nome sugere, o ligante endógeno dos quatro RAs é a adenosina. Considerando que o anel purínico da adenosina é essencial para atividade agonista de ligantes, diversos grupos de pesquisa tem estudado derivados de adenina no desenvolvimento de antagonista do RA2b (BEUKERS; MEURS; IJZERMAN, 2006). A própria molécula de adenina apresenta afinidade baixa pelos RAs (BRUNS, 1981), o que muda consideravelmente para derivados alquilados na posição 9. Por exemplo, a introdução de bromo na posição 8 e *etil* na posição 9 da adenina garante afinidade nanomolar ($K_i = 840\text{nM}$) frente ao RA2b (Figura 8) (CAMAIONI et al., 1998).

Figura 8. Derivado de adenina substituída nas posições 8 e 9 (8-bromo-9-etiladenina). Atividade biológica RA2b, K_i = 840nM; RA2a, K_i = 520nM; RA1, K_i = 280nM; RA3, K_i = 278nM.



A fim de ampliar a diversidade química dos antagonistas estudados, derivados pirazolo ou triazolo pirimidínicos foram avaliados como ligantes do RA2b. Esses compostos foram inicialmente descobertos como antagonistas do receptor A3 (BARALDI et al, 2001a), entretanto substituintes na posição 8-pirazol (Figura 9), como *benzila*, aumenta a afinidade pelo subtipo RA2b (K_i = 5nM), ao passo que a afinidade pelo receptor A3 diminui (K_i = 2030nM) (BARALDI et al, 2001b).

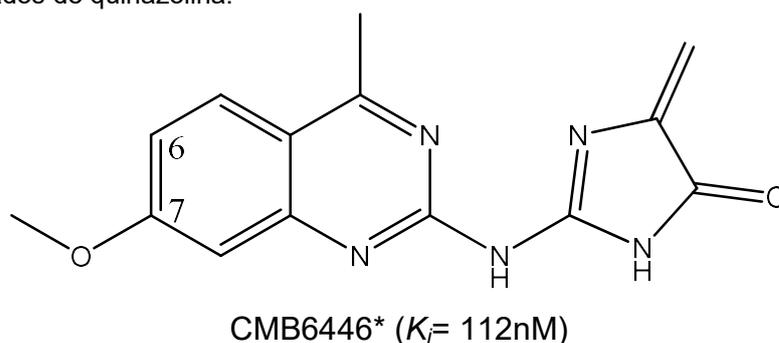
Figura 9. Derivado de triazolo pirimidínicos substituído na posição 8. Atividade biológica RA2b, K_i = 5nM; RA2a, K_i = 0,31nM; RA3, K_i = 2030nM.



Várias modificações no anel imidazol da xantina foram avaliadas para investigar possível função dos nitrogênios desse anel na ligação com os receptores de adenosina. A substituição do imidazol por um benzeno resultou na classe das quinazolininas (SHIREESHA et al., 2010). Alguns compostos dessa classe apresentaram atividade biológica frente ao RA2b (SHIREESHA et al., 2010). De fato, ensaio baseado em modelo farmacofóricos permitiu a identificação de composto

com alta afinidade (CMB6446, Figura 10) pelo RA2b e seletividade moderada quando comparado com os subtipos A1 e A2a (WEBB et al, 2000). No entanto, tentativas subseqüentes para aumentar a afinidade do composto CMB6446 falharam (WEBB, 2003).

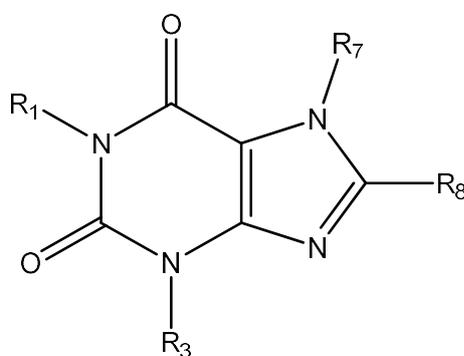
Figura 10. Derivados de quinazolina.



*CMB6446= 4-metil-7-metoxiquinazolil-2-(2'-amino-4' imidazolinona)
Atividade biológica RA2b, $K_i = 112\text{nM}$; RA2a, $K_i = 2,4\text{nM}$; RA1, $K_i = 1,3\text{nM}$

Entre os antagonistas do RA2b identificados até o momento, os derivados de xantina têm sido uma das classes mais estudadas. O interesse por esses derivados se origina do fato que modificações nesse esqueleto molecular (Figura 11) levaram a identificação de antagonistas seletivos para receptores A1, A2a e A3. Esforços para o desenvolvimento de antagonistas seletivos para a RA2b estão focados, portanto, nessa classe de compostos (KATRITCH; KUFAREVA; ABAGYAN, 2011; CHENG et al., 2010; GONZÁLEZ; TERÁN; TEIJEIRA, 2007; BEUKERS; MEURS; IJZERMAN, 2006).

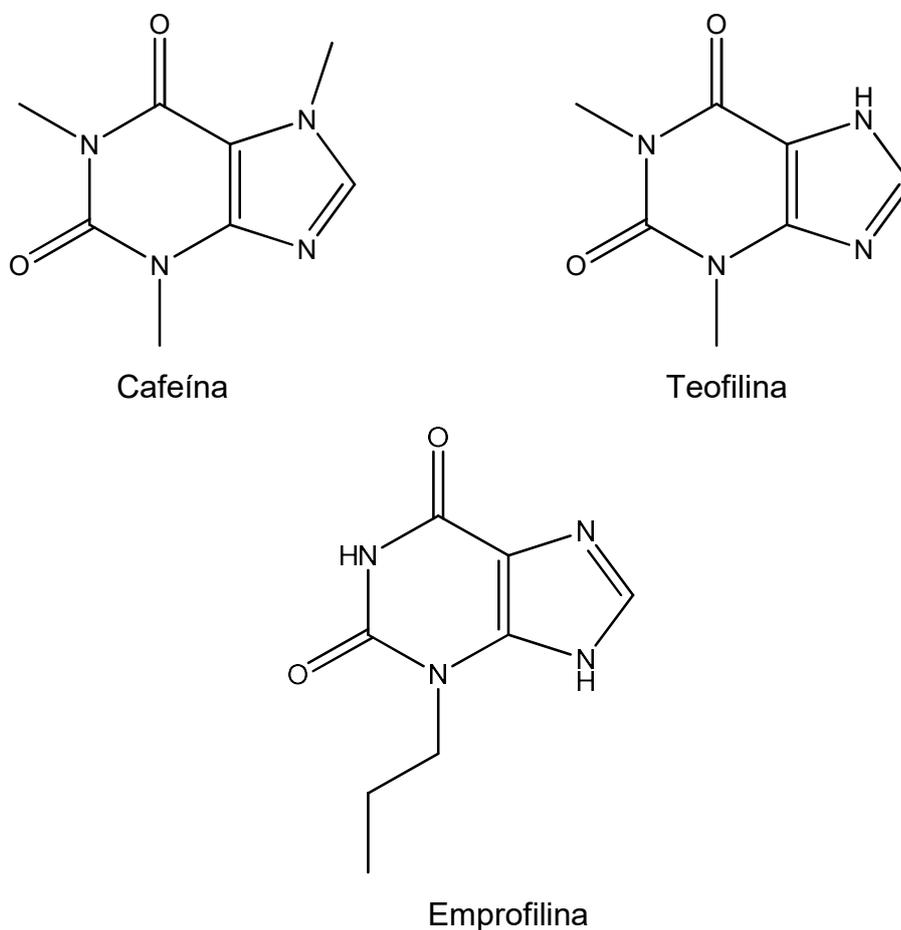
Figura 11. Estrutura base dos derivados de xantina.



Exemplos de compostos com esse esqueleto molecular são: cafeína (1,3,7-trimetil xantina), emprofilina (3-propil xantina) e teofilina (1,3-dimetil xantina) (Figura 12),

todos com afinidade micromolar pelos receptores de adenosina (JI et al., 2001; KIM et al. 2002). A teofilina tem sido usada para o tratamento da asma por décadas, contudo seu mecanismo de ação foi elucidado recentemente (CHENG et al., 2010). A emprofilina que também é utilizada no tratamento da asma apresenta afinidade baixa pelos RA1 e RA2a, por isso, acreditava-se que o efeito terapêutico não estava associado à modulação dos RAs. Contudo, a descoberta que a emprofilina tem afinidade por RA2b ($K_i = 4730\text{nM}$) sugere que a atividade antiasmática dos derivados de xantina é decorrente da modulação desse receptor (FEOKTISTOV et al., 1998; ROBEVA et al. 1996; JACOBSON; IJZERMAN; LINDEN, 1999).

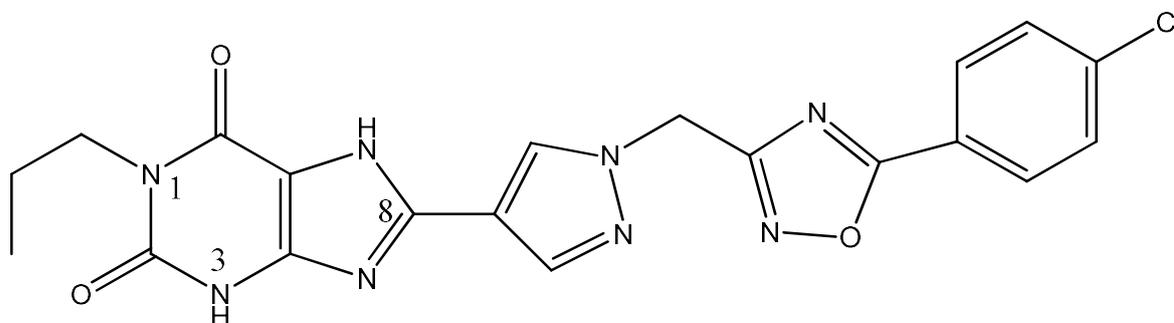
Figura 12. Compostos da classe das xantinas



Estudos das relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos derivados de xantina mostraram que substituição na posição 1 (R_1 , Figura 13) por grupos maiores que os substituintes da posição 3 (hidrogênio ou metil) (R_3 , Figura 13) favorece a afinidade pelo receptor (KIM et al, 2002). Além disso, substituintes heterocíclicos na posição 8 (Figura 13) resultam em antagonistas com afinidade e

seletividade elevadas (36 vezes superior com relação aos demais subtipos de RA) (BARALDI et al, 2004).

Figura 13. Derivado de xantina substituído na posição 8. Atividade biológica: $K_i = 7\text{nM}$.



Modificações no anel xantina, como a retirada de um dos nitrogênios (N-9) levou ao surgimento de uma nova classe de compostos xantínicos, 9-deazaxantina (9-dAX) (Figura 14) (HAYALLAH et al., 2002). Os derivados pirrolo[3,2-*d*]pirimidinona 9-deazaxantina (Figura 14), que inicialmente foram estudados como antagonistas dos receptores de adenosina A1 e A2a, apresentam afinidades nano molar pelo RA2b (HAYALLAH et al., 2002; GRAHNER, et al., 1994) Estudos com uma série de 8-fenil-9-dAX que possuem um grupo sulfonamida ligado na posição *para* do grupo fenil apresentaram boa afinidade pelo receptor de RA2b (Derivado **A**, Figura 15) (ESTEVE, et al., 2006). Outro composto com substituintes piperidina no região oxocetamida também apresentou afinidade alta pelo RA2b (Derivado **B**, Figura 15) (STEFANACHI et al., 2008a). A avaliação de um conjunto de derivados de 8-[4-fenoxi(N1-piperazinil)acetamida]-9-deazaxantina mostrou que a introdução de um grupo *orto*-metoxi no anel 8-fenoxi diminui a afinidade dos compostos pelo RA2b (Derivado **C**, Figura 15). A queda da afinidade pelo RA2b pode ser devido a efeitos estereoquímicos (STEFANACHI et al., 2008a). De fato, compostos que não possuem substituintes nessa posição apresentam potência elevada (Derivado **D**, **E**, **F** Figura 15) (STEFANACHI et al., 2008a).

Figura 14. Esqueleto molecular dos derivados de 9-deazaxantina (Pirrol[2,3-*d*]pirimidina-2,4-diol)

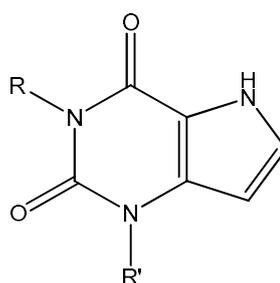
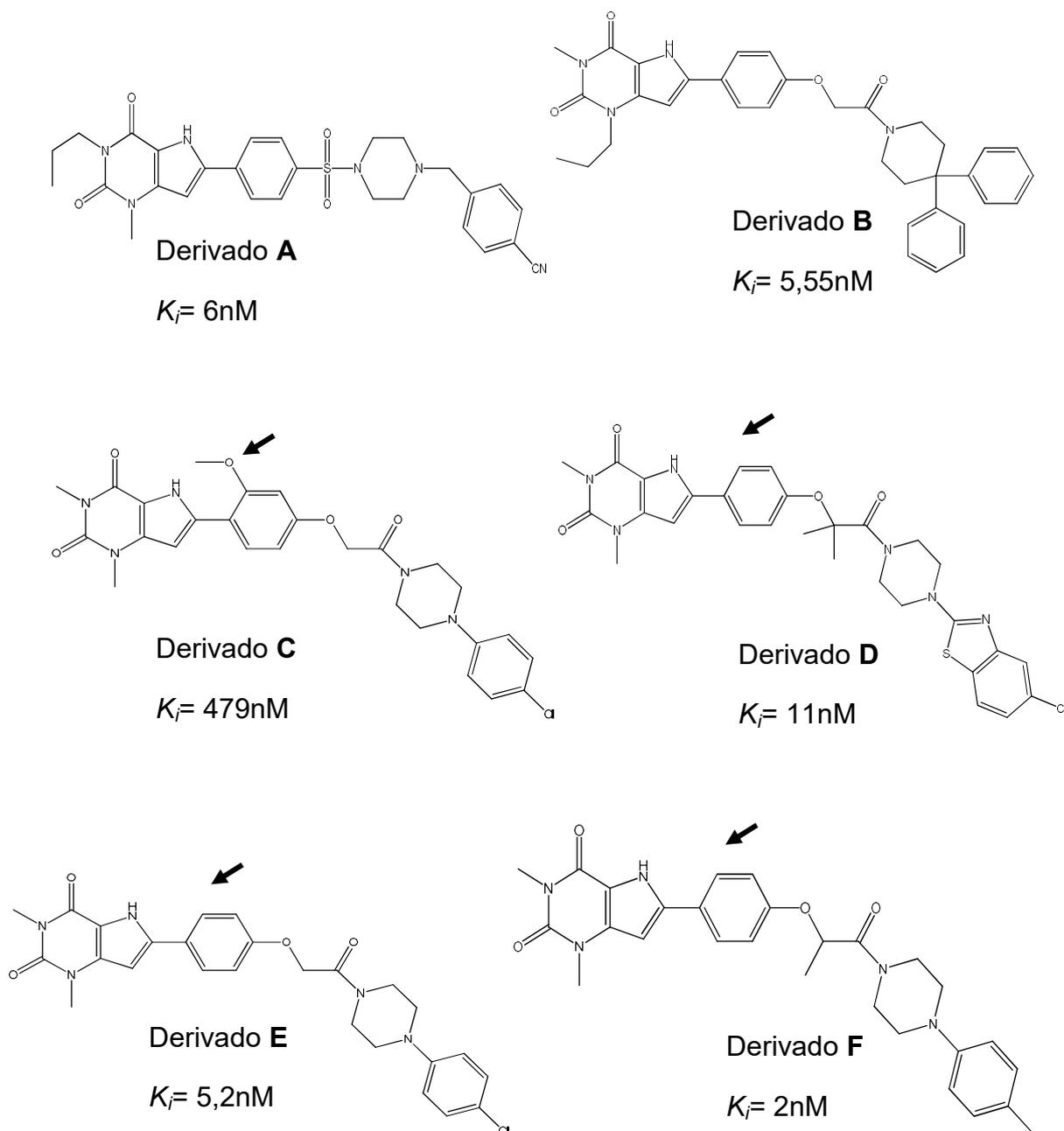


Figura 15. Estrutura química dos derivados de 9-deazaxantina antagonistas do RA2b. A seta aponta para a posição *orto* do anel 8-fenil, substituído e não substituído.



Diante desse cenário, pode-se notar que embora a afinidade elevada tenha sido obtida, até o momento, principalmente para derivados de xantina, a investigação das relações entre a estrutura química e a atividade biológica das demais classes pode levar ao desenvolvimento de moléculas com afinidade alta e seletividade para RA2b (BEUKERS; MEURS; IJZERMAN, 2006). Sendo assim, ferramentas ou técnicas que sejam rápidas, eficientes e de baixo custo, como os métodos de QSAR, podem ser alternativas para a otimização de outras classes de antagonistas de RA2b. Estudos

anteriores de QSAR com derivados de xantina (THAKUR; THAKUR; BALASUBRAMANIA, 2006) flavonóide (MORO et al., 1998), pirazolotriazolopirimidina (MORO et al., 2005), quinozalina (ROY, 2003a; BHATTACHARYA; ROY, 2005), quinolina (ROY, 2003b), 1,2,4-triazolo[5,1-i]-purina (ROY; LEONARD; SENGUPTA, 2004), piridina (LI et al., 1999), análogos tiazol e tiadiazol (BHATTACHARYA; LEONARD; ROY, 2005; BORGHINI et al., 2005) evidenciaram que essa abordagem pode contribuir significativamente para elucidar modificações na estrutura química que afetam a atividade biológica dessas classes de moléculas.

2.8 ESTUDOS DE QSAR

O estudo quantitativo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR do inglês *Quantitative structure-activity relationship*) baseia-se na hipótese que variações da resposta biológica de uma série de moléculas estão relacionadas com as mudanças nas suas propriedades estrutural, física e química. Modelos de QSAR tem sido amplamente aplicados em diversas áreas científicas incluindo química, biologia e toxicologia (HANSCH, 1995; KATRITZKY, 2007; EROGLU, 2007). As técnicas de QSAR adquiriram essa relevância devido as suas habilidades de gerar modelos que sejam capazes de prever a atividade biológica e guiar a síntese de compostos com propriedades superiores às das moléculas presentes no conjunto de dados original (CRONIN, 2010).

HQSAR (*Hologram Quantitative Structure-Activity Relationships*) é uma abordagem de QSAR que parte do princípio de que a estrutura química bidimensional contém informação suficiente para explicar a atividade biológica de um conjunto de moléculas (DODDAREDDY et al., 2004). Sendo assim, essa técnica permite prever a atividade biológica de compostos evitando algumas das dificuldades associadas aos estudos de QSAR baseado em descritores topológicos ou QSAR 3D, como cálculo e seleção de descritores físico-químicos, geração de conformações dos compostos no conjunto de dados e alinhamento molecular tridimensional, etc. (DODDAREDDY et al, 2004; SALUM; ANDRICOPULO, 2009; TONG et al, 1998; VRTACNIK; VODA, 2003).

Nessa metodologia as estruturas bidimensionais são decompostas em fragmentos moleculares, de acordo com parâmetros previamente estabelecidos e com tamanho

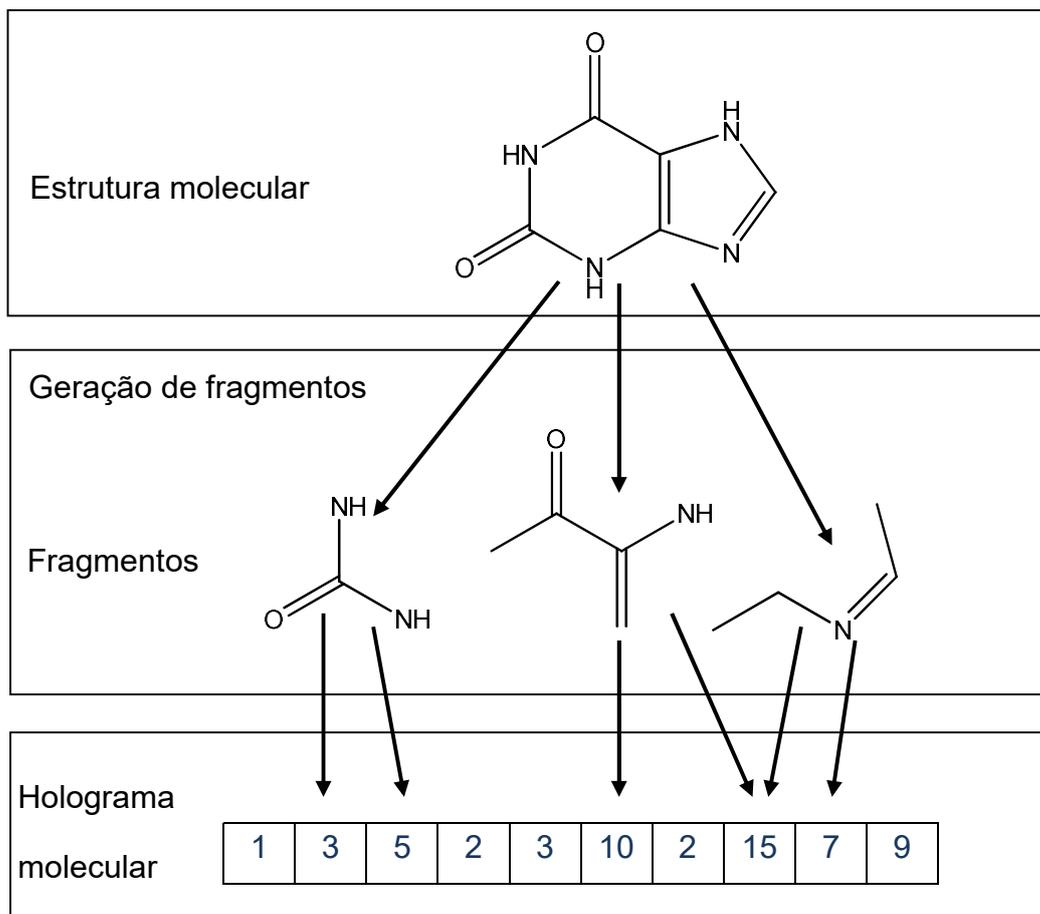
definido (M a N átomos), que são utilizados para construção do holograma molecular (Figura 16) (MODA; MONTANARI; ANDRICOPULO, 2007). Cada posição do holograma contém a frequência de fragmentos alocados, sendo que fragmentos iguais são sempre colocados na mesma posição (DODDAREDDY et al, 2004).

A qualidade do modelo de HQSAR pode ser afetada pelos seguintes parâmetros: (1) comprimento do holograma (número de posições no holograma disponível para que diferentes fragmentos sejam alocados); (2) tamanho de fragmento - números máximo e mínimo de átomos presentes nos fragmentos a serem gerados; (3) distinção de fragmento (características moleculares que distinguem um fragmento do outro (Tabela 2) (LOWIS, 1997).

Tabela 2. Parâmetros de distinção de fragmentos no método HQSAR. (LOWIS, 1997).

Distinção de fragmentos	Definição
Átomo (A)	Distinção com base nos tipos de átomos
Ligação (B)	Distinção com base nos tipos de ligação: simples, dupla, tripla e aromática
Conectividade (C)	Diferenciação de acordo com a hibridização dos átomos contidos no fragmento
Hidrogênio (H)	Diferenciação com base na presença e número de átomos de hidrogênio
Quiralidade (Ch)	Fragmentos são distinguidos de acordo com a presença de centros assimétricos
Doador e Aceptor (DA)	Diferenciação com base na presença de átomos aceptores ou doadores de ligações hidrogênio

Figura 16. Esquema ilustrativo da geração do holograma molecular.



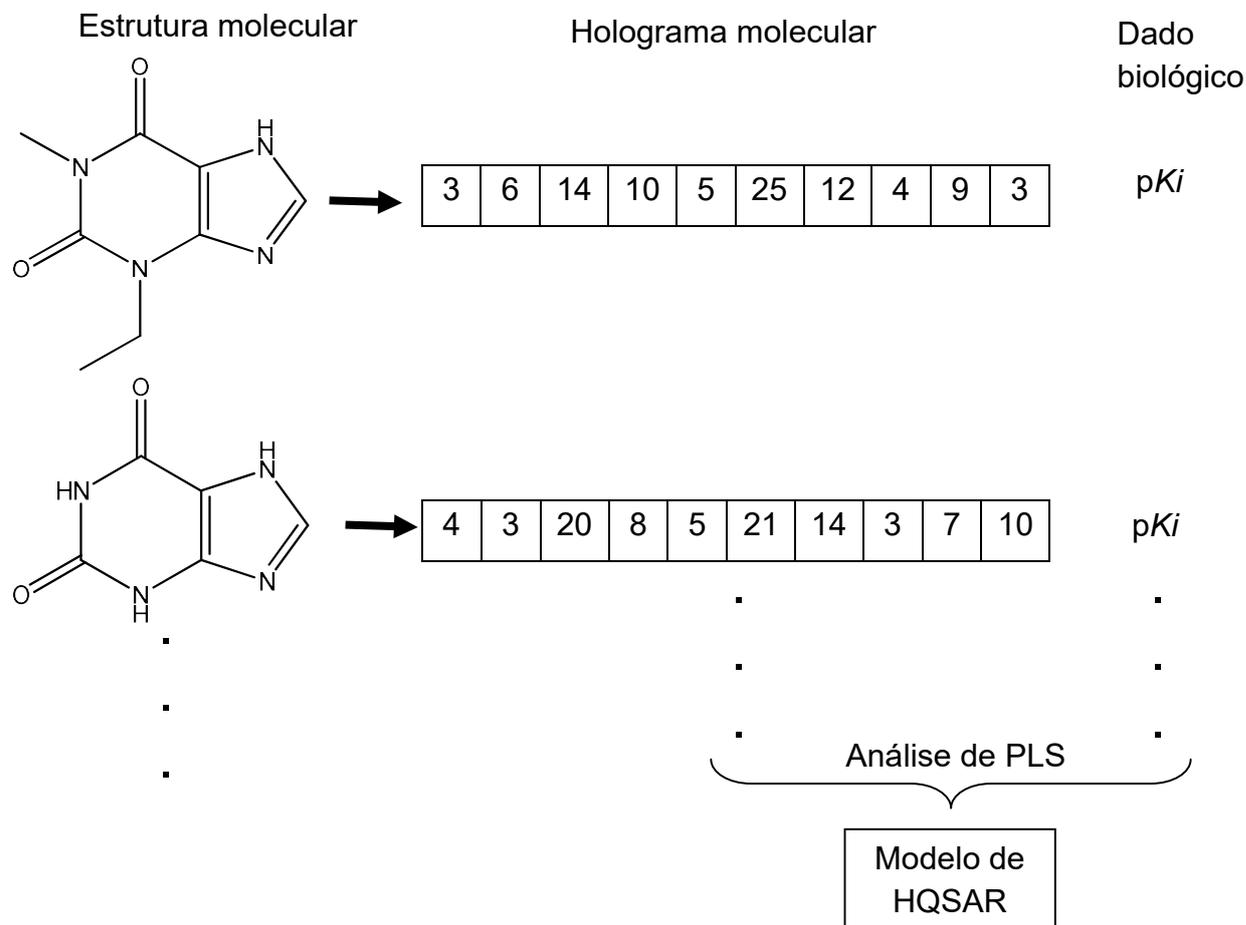
Adaptado de BASKIN; VARNEX, 2008.

Os hologramas moleculares são então utilizados como variável independente para construção dos modelos de HQSAR por meio de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS, do inglês *partial least squares*) (Figura 17). A partir do modelo de HQSAR pode-se prever a propriedade biológica de moléculas que não foram utilizadas para calibração do modelo (ANDRADE et al., 2008; TONG et al., 1998). Contudo, além de prever a atividade de novas moléculas, modelos de HQSAR fornecem informações sobre quais fragmentos moleculares são mais importantes para a atividade biológica (GUIDO et al., 2008).

Os resultados da análise de HQSAR podem ser exibidos graficamente na forma de uma mapa de contribuição atômica, no qual a cor de cada átomo reflete sua contribuição para a atividade biológica: cores no espectro vermelho-laranja estão associadas a contribuições negativas, enquanto cores no espectro verde-amarelo são decorrentes de contribuições positivas. Átomos comuns a todas as moléculas ou

com contribuições intermediárias se apresentam na cor branca (SALUM; ANDRICOPULO, 2009).

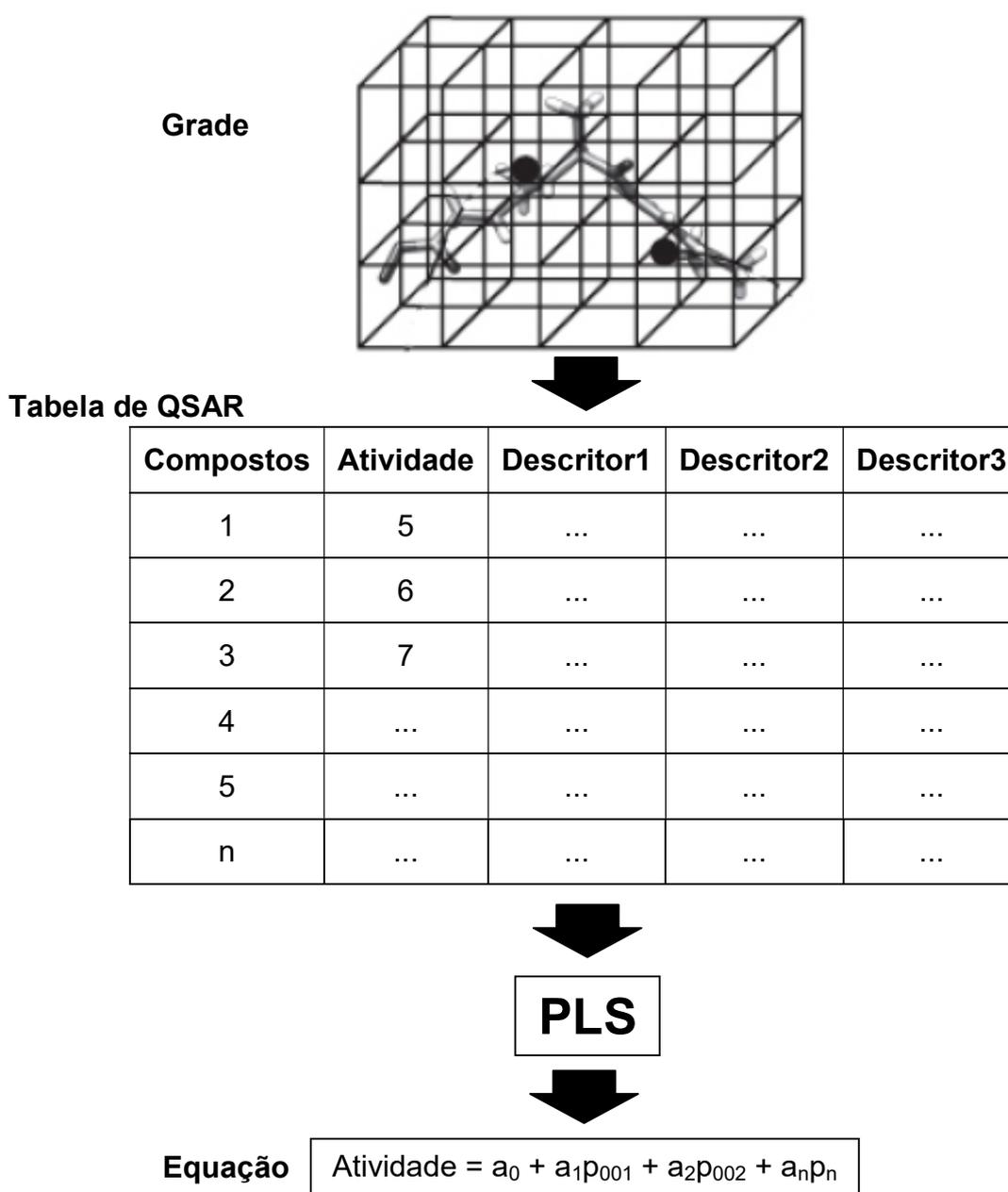
Figura 17. Etapas envolvidas na geração de um modelo de HQSAR



Apesar das vantagens descritas acima, métodos de QSAR bidimensionais desconsideram o fato que a afinidade entre ligante e macromolécula é determinado pela complementaridade espacial de ambos, ou seja, é função de uma propriedade tridimensional. Todavia, metodologias de QSAR tridimensional (3D) são mais complexas que abordagens bidimensionais pois somente moléculas na sua conformação bioativa darão origem a descritores que tenham relação com a atividade biológica. Por essa razão, a conformação bioativa dos compostos tem de ser determinada, seja através de dados experimentais ou de métodos indiretos como, por exemplo, modelos farmacofóricos (AKAMATSU, 2002). Na maioria das vezes, modelos de QSAR 3D utilizam descritores de campo, cuja utilidade depende

do alinhamento espacial das moléculas. Uma vez alinhadas, pode-se calcular a interação eletrônica e estérea (potenciais de Coulomb e Lennard-Jones, respectivamente) de cada uma dessas moléculas com uma carga de prova e, então, utilizar esses valores de energia como variável independente para a construção dos modelos de QSAR (Figura 18). (PERKINS et al, 2003). Entre os métodos que utilizam essa abordagem, a análise comparativa dos campos moleculares (CoMFA, do inglês *comparative molecular Field analysis*) é a mais utilizada (McGOVERN; et al., 2010).

Figura 18. Processo padrão do CoMFA.

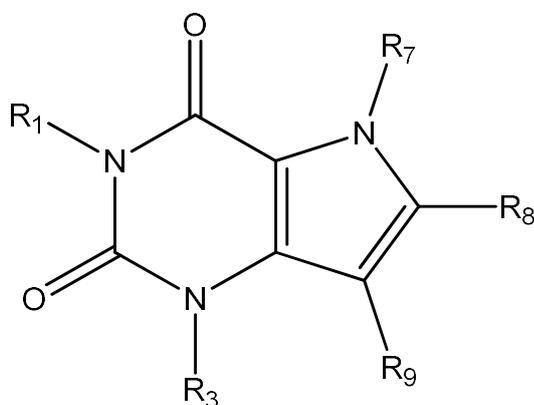


3 MÉTODOS

3.1 CONJUNTO DE DADOS

O conjunto de dados é composto por 195 derivados de 9-deazaxantina (FERNANDEZ et al., 2009; STEFANACHI et al, 2008a; CARROTTI et al., 2006; CARROTI et al. 2004), cujo esqueleto molecular base pode ser observado na figura 19. As estruturas tridimensionais dos compostos foram desenhadas com auxílio da plataforma SYBYL 11.1 (TRIPOS) e então minimizadas empregando o campo de força Tripos e algoritmo Gradiente Conjugado (*Conjugate Gradient*) com critério de convergência de 0,001 kcal/mol.Å. A seguir, as cargas atômicas parciais foram atribuídas usando método PM3 (palavras chave: 1SCF XYZ ESP NOINTER SCALE=1.4 NSURF=2 SCINCR=0.4 NOMM). O conjunto total foi dividido aleatoriamente em treino (141 moléculas, anexo 1) e teste (54 moléculas, anexo 1) para avaliar a capacidade preditiva do modelo. Os compostos foram cuidadosamente selecionados para garantir uma distribuição adequada das moléculas com diferentes valores de potência em ambos os conjuntos e para que moléculas estruturalmente diversas estivessem presentes em ambos os conjuntos. A diversidade química foi avaliada pela análise de componentes principais (PCA), utilizando 18 descritores topológicos e/ou físico-químicos calculados e selecionados com o auxílio dos programas DRAGON 5.5 (TALETE, 2007) e MOBDIGS 1.0 (TALETE, 2004), respectivamente, como descrito a seguir.

Figura 19. Estrutura base dos derivados de 9-deazaxantina



3.2 QSAR BASEADO EM DESCRITORES MOLECULARES

3.2.1 Cálculo e seleção dos descritores 2D

572 descritores moleculares 2D foram calculados com o auxílio do programa DRAGON 5.5 (TALETE, 2007). Em seguida, os descritores com baixa variância interna ($< 0,01$) ou com alta correlação entre si ($>0,97$) foram excluídos por não contribuírem com informações relevantes para o desenvolvimento dos modelos de QSAR 2D.

A fim de reduzir o número de descritores foi realizada uma etapa de seleção através de construção de modelos preliminares de regressão linear múltipla, como disponível no programa MOBYDIGS 1.1 (TALETE, 2004). Resumidamente, 10 populações de 100 indivíduos (equações com 4 descritores) evoluíram por pelo menos 1000 gerações, sendo que a cada geração os modelos foram gerados aleatoriamente por mutação ou permutação (*crossover*). Os critérios utilizados para determinar quais indivíduos estão mais aptos (melhores modelos), a cada geração, foram: função QUIK (0,005), função Q^2 assintótico (-0,005), função de redundância RP (0,1) e função de superajuste (*overfitting*) RN (0,01) (TALETE, 2004; TODESCHINI, 1999). Ao final desse processo, as melhores soluções (equações) foram selecionadas de acordo com seus valores de q^2_{LOO} (TODESCHINI, 2004). A equação para o cálculo de q^2_{LOO} é expressa da seguinte forma:

$$q^2_{LOO} = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2} = 1 - \frac{PRESS}{TSS} \quad (1)$$

Onde y_i é o valor experimental da variável dependente, \hat{y}_i é o valor predito, \bar{y} é a média dos valores das variáveis dependente, PRESS é a soma dos quadrados dos erros da predição e TSS é o total da soma dos quadrados do número de compostos do conjunto de dados.

Na etapa seguinte, os descritores presentes nos modelos com valor de $q^2_{LOO} > 0,4$ foram reunidos, autoescalados e utilizados para a construção de modelos de PLS e PCA (utilizado na divisão do conjunto treino e teste) utilizando o programa PIROUETTE 4.0 (INFOMETRIX, 2008). O número ótimo de componentes principais

(PCs), correspondendo ao menor erro padrão da predição (SEP), foi determinado pelo procedimento de validação cruzada chamado “deixe um de fora” (LOO, do inglês *leave-one-out*)

3.3 HQSAR

Todas as etapas descritas a seguir foram realizadas no módulo de HQSAR disponível na plataforma SYBYL-X 1.1. A análise HQSAR envolve três passos principais: geração de fragmentos estruturais para cada uma das moléculas do conjunto treino; alocação desses fragmentos no holograma; e correlação destes com os dados biológicos disponíveis (DODDAREDDY et al., 2004). De acordo com este protocolo, uma molécula é descrita como uma única série de números ou *bins* (holograma molecular) que representam cada um dos fragmentos incluídos em uma molécula (WANG et al., 2003).

Para a geração dos modelos, primeiramente, foram especificados os parâmetros relativos à obtenção dos hologramas. A distinção dos fragmentos foi definida com base nas seguintes distinções: A (átomos), B (ligações), C (conectividade), H (átomos de hidrogênio), Ch (quiralidade) e DA (doadores e aceptores de hidrogênio). Inicialmente foram gerados fragmentos de 4-7 átomos, porém num segundo momento a influência de modificações nesse parâmetro (2-5, 3-6, 5-8, 6-9, 7-10) sobre os coeficientes estatísticos também foi investigada. Em todos os casos, os fragmentos gerados foram organizados em arranjos de comprimento fixo (53, 59, 61, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353, 401) para produzir um holograma molecular. Finalmente, a correlação das informações contidas nos hologramas moleculares com a propriedade biológica foi feita através de regressão por PLS. Durante a construção dos modelos, o valor de correlação por validação cruzada (q^2_{LOO}) foi utilizado como critério para seleção dos modelos com melhor qualidade estatística.

3.4 CoMFA

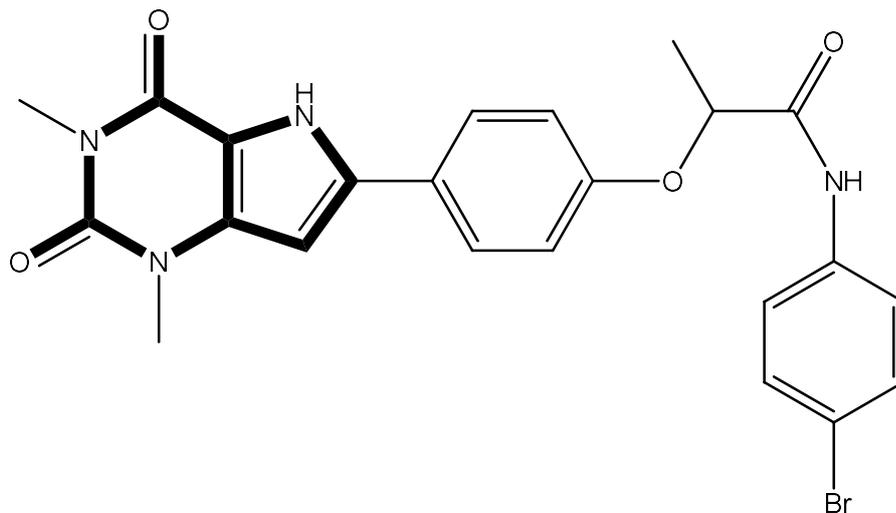
3.4.1 Alinhamento molecular

O alinhamento estrutural é um dos parâmetros mais importantes nos estudos de CoMFA e por essa razão várias estratégias para esse propósito têm sido descritas

na literatura (CASTILHO et al., 2006; JAIN, 2004; MUSMUCA, 2010; McGOVERN et al., 2010). Nesse estudo, três abordagens foram utilizadas: a primeira foi baseada na sobreposição das estruturas minimizadas de cada derivado 9-deazaxantina, como corpos rígidos, considerando a máxima subestrutura comum entre as moléculas. A segunda estratégia levou em consideração a similaridade química (morfológica) das moléculas entre si. Num terceiro momento, foram utilizadas as duas primeiras estratégias para geração do terceiro alinhamento.

Para a geração do primeiro alinhamento, todas as moléculas nas suas respectivas conformações de baixa energia foram individualmente sobrepostas no composto **91** (mais potente, $pK_i = 8,81$), visando minimizar desvio quadrático médio entre os átomos dos anéis deaza-xantina (Figura 20) presentes em todos os compostos.

Figura 20. Estrutura do composto 91. Átomos utilizados para guiar a sobreposição por máxima subestrutura comum estão em destaque.



O segundo alinhamento foi obtido pelo método de similaridade morfológica baseado no protocolo escrito por Jain (2004), utilizando o programa Surfex-Sim disponível no SYBYL-X 1.1. Este método otimiza a sobreposição das moléculas, a fim de maximizar a similaridade tridimensional. A semelhança entre as moléculas é definida como uma função das diferenças observadas na superfície, a partir de pontos de observação externos. Num primeiro momento, os cinco compostos mais potentes do conjunto treino (**24**, **31**, **62**, **63**, **91**) foram comparados entre si, considerando a flexibilidade rotacional presente em cada molécula. A hipótese de alinhamento de maior pontuação foi utilizada como molde sobre o qual as demais moléculas foram

sobrepostas (alinhadas), utilizando parâmetros padrão do programa (100 conformeros para cada fragmento) e a opção de minimização de energia no final da sobreposição. A hipótese de alinhamento (para todas as moléculas) de maior pontuação construída nessa segunda etapa, foi selecionada para construção dos modelos CoMFA.

Para o terceiro alinhamento, as conformações obtidas no segundo alinhamento (similaridade morfológica) foram realinhadas segundo sua máxima subestrutura comuns, assim moléculas foram alinhadas sobre mais potente do conjunto (91) com base nos átomos do anel deazaxantina.

3.4.2 Cálculo dos descritores de QSAR 3D

O conjunto treino, alinhado de acordo com cada uma das metodologias descritas acima, foi posicionado numa grade tridimensional, com uma margem de segurança de 4 Å nos vértices x, y, z, contados a partir do átomo da molécula mais distante do centro da grade e espaçamento entre os pontos da grade de 2 Å. Os campos do CoMFA, potenciais de Lennard-Jones e Coulomb, respectivamente, foram gerados em cada ponto de interseção da grade utilizando o campo de força Tripos e um átomo carbono $sp^3 +1$ como carga de prova. Foi imposto um limite de 30 kcal/mol para os valores de energia estérea e eletrostática.

Num segundo momento, foi aplicada a estratégia de “focagem”, com o objetivo de obter modelos mais robustos e preditivos. Nesse procedimento, os potenciais em cada ponto são multiplicados por uma fração (0,3, 0,6, 0,9, 1,2) do coeficiente do desvio padrão (SDC, do inglês, *standard deviation coefficient*) daquela região. Outro fator investigado foi a influência da variação do espaçamento entre os pontos da grade (0,5, 1,0, 1,5 Å) sobre a qualidade estatística e capacidade preditiva dos modelos.

3.5 AVALIAÇÃO E VALIDAÇÃO DOS MODELOS FINAIS

Para verificar a estabilidade do modelo e a chance dele ter sido fruto de correlação ao acaso, foi realizada a análise *progressive scrambling*. Nessa metodologia a variável dependente (atividade biológica) é aleatoriamente permutada e um novo modelo de QSAR é desenvolvido utilizando as variáveis independentes (descritores)

originais. No presente trabalho, a análise *progressive scrambling* foi realizada variando as variáveis no máximo 8 vezes e ao menos duas vezes.

Para avaliar a robustez e a validade estatística dos melhores modelos de QSAR, a análise de reamostragem (do inglês, *bootstrapping*). Essa técnica consiste geração de modelos a partir de reamostras obtidas do conjunto de dados (Conjunto treino). Para que a aplicação da técnica resultasse em valores confiáveis foram feitas, a partir do conjunto treino, 100 de reamostras do mesmo tamanho. A reamostragem foi realizada com reposição, selecionando os compostos de forma aleatória.

Uma vez geradas as reamostras, foram calculados para cada reamostra os valores de correlação (r_{boot}^2).

O método de validação externa, que avalia a capacidade real de predição dos modelos para moléculas congêneras, foi realizado com um conjunto teste de 54 compostos que não foram considerados durante as etapas de construção dos modelos de QSAR. Dessa forma, os seguintes critérios de validação foram utilizados para avaliar os modelos de QSAR:

$$r_{pred1}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_i - \bar{y}_{TR})^2} \quad (2)$$

Onde y_i é o valor experimental da variável dependente, \hat{y}_i é o valor calculado pelo modelo. No denominador, a soma dos quadrados das diferenças do valor experimental do conjunto teste (y_i) e a média do conjunto treino (\bar{y}_{TR}) foi utilizado. No segundo processo de avaliação dos modelos foi utilizado um critério proposto por Schuurmann e colaboradores (2008):

$$r_{pred2}^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (\hat{y}_i - y_i)^2}{\sum_{i=1}^{n_{EXT}} (y_i - \bar{y}_{EXT})^2} \quad (3)$$

A diferença entre a equação 2 e 3 (r_{pred1}^2 e r_{pred2}^2) são os valores da média do denominador (\bar{y}_{TR} e \bar{y}_{EXT} , respectivamente; onde \bar{y}_{EXT} é a média dos valores experimental do conjunto teste)).

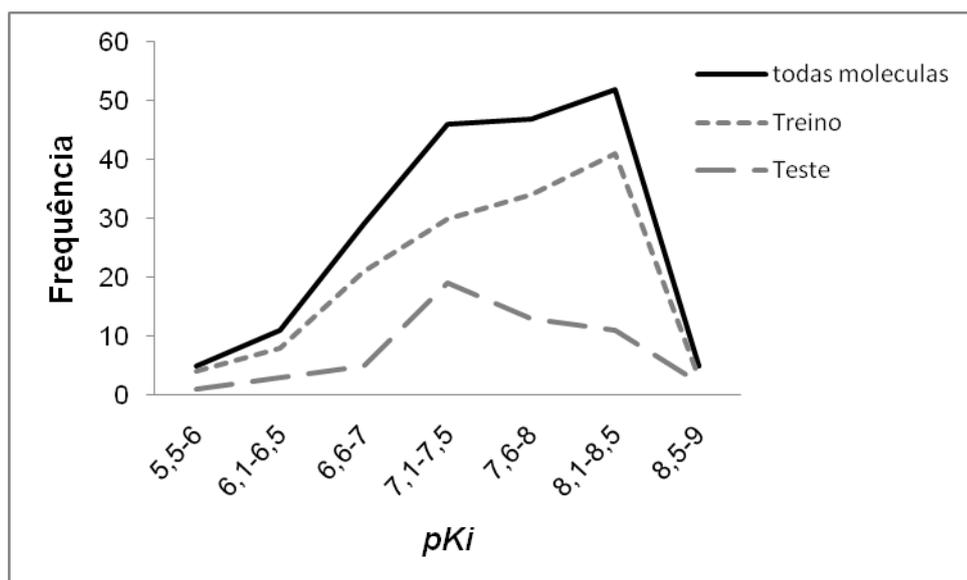
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A hidroxiuréia é, atualmente, o fármaco mais estudado do grupo dos antifalcêmicos, e diversas pesquisas têm provado sua eficácia no tratamento da anemia falciforme, sendo seu uso aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*), agência Norte Americana que regula o consumo dos alimentos e medicamentos no país. No Brasil não é diferente, a ANVISA (agência Nacional de Vigilância Sanitária) também aprovou o uso do medicamento para o tratamento da anemia falciforme. Apesar da eficácia já comprovada do fármaco no combate aos sintomas da anemia falciforme, seu uso é restrito a casos de graves, uma vez que ainda não se sabe que tipo de agressões ao organismo pode causar a utilização, por um longo período, de um fármaco como a Hidroxiuréia. Esse medicamento é mutagênico e carcinogênico e apresenta como principal efeito hematológico a depressão da medula óssea, causando leucopenia e trombocitopenia (BUCHANAN et al., 2004). Diante desse problema, tem-se tentado descobrir novas formas terapêuticas contra a anemia falciforme. Recentemente, estudos demonstraram que o receptor de adenosina A2b está envolvido no desenvolvimento dessa patologia e que antagonistas do RA2b podem ser úteis contra a anemia falciforme (ZHANG et al., 2010). A teofilina e a emprofilina são dois antagonistas do RA2b utilizados no tratamento da asma, mas esses fármacos não podem ser considerados como alternativas para o tratamento da anemia falciforme, devido a sua seletividade baixa frente aos diversos subtipos de receptores de adenosina (BEUKERS; MEURS; IJZERMAN, 2006). O desenvolvimento de antagonistas de RA2b potentes e seletivos pode ser alcançado através da utilização de informações acerca da estrutura tridimensional do receptor. Porém, até o momento, a estrutura tridimensional de RA2b não foi resolvida, provavelmente em decorrência de dificuldades para purificar e cristalizar essa proteína de membrana. Como alternativa, pode-se modificar ligantes conhecidos desse alvo terapêutico, visando com isso elucidar, de forma indireta, as exigências químicas e estruturais que asseguram a afinidade por RA2b. Por essa razão iniciamos esse trabalho com a identificação de um conjunto de 195 moléculas, cuja afinidade frente a RA2b varia de 1,55nM a 2,19µM, um fator de potência de aproximadamente 3000 vezes. Todos os valores de K_i foram determinados nas mesmas condições experimentais, o que é um requisito essencial para o desenvolvimento de modelos confiáveis de QSAR. Os valores de K_i foram

convertidos à escala logarítmica ($-\log K_i$). Essa transformação foi aplicada para assegurar que os dados biológicos tivessem uma distribuição adequada (figura 21) para a aplicação das análises de regressão (KUBINYI, 1993). Na sequência, o conjunto de moléculas foi dividido em conjunto treino (compostos 1 a 141, anexo 1), empregado na construção dos modelos de QSAR e conjunto teste (compostos 142 a 195, anexo 1), empregado na avaliação da capacidade de prever a propriedade biológica de moléculas que não foram incluídas na calibração do modelo de QSAR. A divisão dos conjuntos treino e teste foi feita na razão de 2,6:1 (38%), dessa forma pode-se afirmar que o conjunto é grande o suficiente para que a capacidade preditiva do modelo não seja superestimada, como ocorre para conjuntos teste pequenos (menos do que 5 moléculas) (TONG et al., 2004).

Outro fato importante na definição dos conjuntos treino e teste é que ambos devem ocupar o mesmo espaço biológico, ou seja, a distribuição dos valores de afinidade deve ser equivalente em ambos os conjuntos, pois somente assim pode-se verificar a consistência interna e a capacidade preditiva dos modelos para toda a faixa de potência estudada. O conjunto teste apresenta moléculas em todas as faixas de potência, podendo ser considerado adequado para o propósito estabelecido acima (Figura 21).

Figura 21. Distribuição dos valores de pK_i para os ligantes do RA2b.

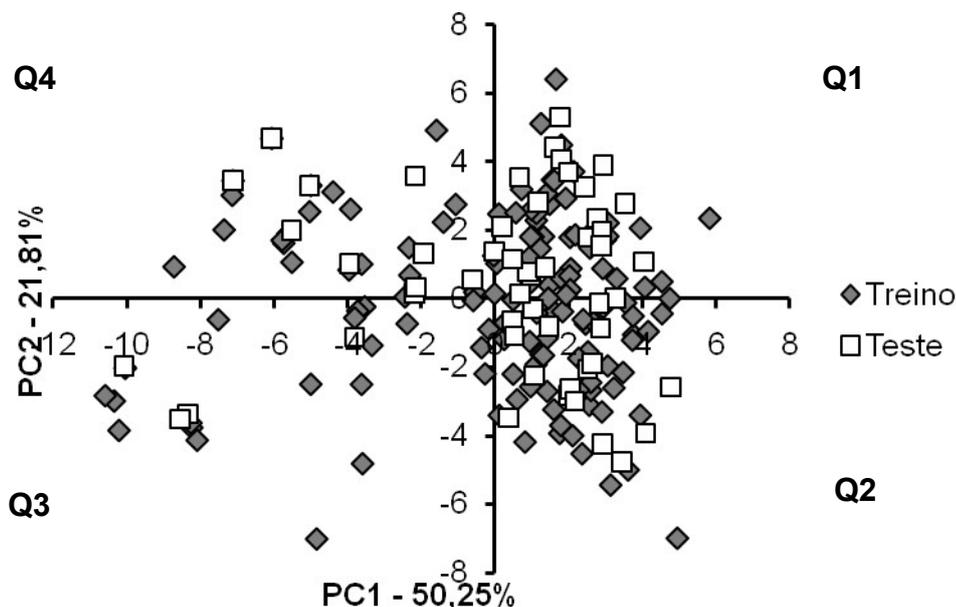


Por fim, é amplamente estabelecido que modelos de QSAR são utilizados para planejar moléculas congênicas com propriedades farmacodinâmicas e/ou

farmacocinéticas otimizadas (CRONIN, 2010), para que isso ocorra ele deve ser capaz de representar o espaço químico descrito pelas moléculas em estudo. Em outras palavras, a diversidade estrutural dos compostos é importante para a construção de modelos robustos e preditivos de QSAR. Nessa perspectiva, os conjuntos treino e teste devem amostrar o espaço químico de forma semelhante.

A representação do espaço químico depende dos descritores e métricas utilizados (TONG et al., 2004). Nesse trabalho decidiu-se utilizar um conjunto de 18 descritores bidimensionais, previamente selecionados com o auxílio do programa MOBYDIGS. O espaço multidimensional codificado por esses descritores foi condensado em 2 dimensões através da análise de componentes principais. Nessa metodologia os dados originais são condensados em duas matrizes, através das quais é calculado um novo conjunto de variáveis, denominadas componentes principais (PCs), que representam grande parte da variância contida nos descritores originais num número pequeno de PCs, geralmente menos que 5 (SAN JUAN, 2008). A projeção das amostras no espaço químico definido pelas primeiras duas ou três PCs (Figura 22) permite a análise visual de informações que antes estavam contidas num espaço multidimensional (LEACH; GILLET, 2007). No nosso caso, a utilização das duas primeiras PCs permite explicar 72% da variância dos dados originais e visualizar a distribuição das amostras nos quadrantes do gráfico de pontuação (Figura 22). Esse resultado sugere que nenhuma molécula tem propriedades químicas únicas, que poderiam estar associadas à amostras anômalas (*outliers*), pois nenhuma molécula encontra-se num espaço isolado e distante das demais (LEACH; GILLET, 2007). Com base nessas informações, moléculas de todos os quadrantes foram aleatoriamente selecionadas para compor o conjunto teste, desde que elas respeitassem o critério de representatividade do espaço biológico.

Figura 22. Gráfico de pontuação da análise de componentes principais.



Distribuição das moléculas do conjunto treino (◆) e teste (□) no espaço químico definido por PC1 e PC2. Q= quadrante

4.1 QSAR BASEADO EM DESCRITORES MOLECULARES

Num segundo momento, decidiu-se utilizar os descritores bidimensionais previamente calculados para construir modelos de regressão linear múltipla. Todavia, dentre os descritores 2D disponíveis no programa DRAGON 5.5 (cerca de 2500), apenas 572 apresentam variância interna ($>0,03$) e correlação mínima com a atividade biológica ($r^2 > 0,10$) para serem úteis no desenvolvimento de modelos de QSAR. Deve-se considerar ainda que apenas uma pequena parcela desses descritores deve possuir correlação com a atividade biológica (GONZALEZ et al., 2007; GAO; LAJINESS; Van DRIE, 2002) por essa razão, empregou-se um algoritmo genético para selecionar subconjuntos de até 4 descritores que fornecessem modelos de QSAR com parâmetros estatísticos aceitáveis ($q^2 > 0,6$). Os modelos de regressão linear múltipla, obtidos com auxílio do programa MOBYDIGS 1.0, apresentaram parâmetros estatísticos insatisfatórios ($r^2 < 0,55$ e $q^2_{LOO} < 0,48$) para permitir uma análise segura das relações entre a estrutura química e a atividade biológica dessa série de compostos, razão pela qual se decidiu empregar técnicas estatísticas mais robustas. Dessa forma, 18 descritores encontrados nos 10 melhores modelos de Regressão Linear Múltipla (RLM) ($q^2_{LOO} > 0,40$) foram

agrupados e autoescalados para serem utilizados em regressão por mínimos quadrados parciais (PLS), como disponível no programa PIROUETTE 4.0.

Embora esse método de regressão permita utilizar a informação contida em todos os descritores, de forma condensada no cálculo das PCs, o melhor modelo ainda apresenta valores estatísticos muito baixos ($r^2 = 0,50$ e $q^2_{LOO} = 0,49$ com 6 PCs). Esse resultado sugere que descritores topológicos não sejam adequados para descrever as relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos do grupo treino. Por esse motivo, decidiu-se empregar outra técnica de QSAR 2D, o holograma QSAR (HQSAR) (LOWIS, 1997)

4.2 ANÁLISE DE HQSAR

A análise de HQSAR envolve três passos principais: geração de fragmentos subestruturais para cada molécula no conjunto treino; codificação desses fragmentos em holograma; e correlação do holograma com os dados biológicos. Sendo assim, os 141 compostos do conjunto treino, foram divididos em todos os fragmentos estruturais possíveis (incluindo fragmentos cíclicos, ramificações e fragmentos que se sobrepõem). O tamanho dos fragmentos foi determinado pelo número mínimo e máximo de átomos (padrão, 4-7). Durante a geração desses fragmentos, aqueles idênticos foram alocados na mesma posição (do inglês, *bin*) do holograma. No entanto, como o comprimento do holograma, geralmente, é menor do que o número total de fragmentos únicos, fragmentos diferentes podem ser alocados no mesmo *bin*, causando colisão entre os fragmentos. A fim de reduzir a probabilidade de colisão, hologramas com comprimento igual a números primos foram utilizados (valores padrão, 53, 59, 71, 83, 97, 151, 199, 257, 307, 353 e 401). A natureza dos fragmentos subestruturais gerados pelo HQSAR e, conseqüentemente, as informações contidas no holograma resultantes podem ser alteradas pelo ajuste do parâmetro distinção de fragmento (átomo (A), ligação (B), conectividade (C), ligação de hidrogênio (H), quiralidade (Ch), átomos doador/aceptor de ligação de hidrogênio (DA), pois eles são utilizados para a criação dos fragmentos.

Analisando os modelos com base no valor de coeficiente de correlação (r^2) e no valor obtido por validação cruzada (q^2_{LOO}), observa-se que adição do parâmetro (H)

à distinção de fragmento padrão (A/B/C) não influencia nos dados estatísticos (modelo 1 vs 2, Tabela 3). Por outro lado, a adição do termo (DA) reduz de forma significativa a qualidade estatística dos resultados (modelo 2 vs 4, Tabela 3). A exclusão do parâmetro (B) é capaz de fornecer modelos melhores (modelos 2 vs 12 e modelo 3 vs 8, Tabela 3) e sua eliminação das combinações (A/B/C/H e A/B/C/H/Ch) levou aos modelos com os mais altos valores estatísticos ($q^2_{LOO} = 0,77$; $r^2 = 0,85$; 6 PCs e $q^2_{LOO} = 0,77$; $r^2 = 0,85$; 6 PCs, respectivamente).

Numa segunda etapa, a influência da variação do tamanho dos fragmentos sobre os parâmetros estatísticos foi analisada para os dois melhores modelos (8 e 12). Contudo, não se observou melhora estatisticamente em nenhum dos modelos gerados (Tabela 4).

Tabela 3. Modelos de HQSAR – análise dos vários parâmetros de distinção de fragmento usando tamanho de fragmento padrão. SDEP= erro padrão da predição; HL= tamanho do holograma; N= número de componentes.

Modelo	Distinção de fragmento	q^2_{LOO}	SDEP	r^2	HL	N
1	ABC	0,68	0,39	0,85	401	6
2	ABCH	0,69	0,38	0,83	401	6
3	ABCHCh	0,68	0,39	0,83	401	6
4	ABCHDA	0,57	0,45	0,77	307	6
5	ABCHChDA	0,62	0,43	0,78	257	6
6	ABH	0,70	0,38	0,83	353	6
7	ABHCh	0,70	0,38	0,82	353	6
8	ACHCh	0,77	0,33	0,85	199	6
9	ABCCCh	0,70	0,38	0,86	401	6
10	ABCh	0,68	0,39	0,83	401	6
11	ABChDA	0,58	0,45	0,76	257	6
12	ACH	0,77	0,33	0,85	199	6
13	ACHDA	0,64	0,42	0,80	199	6
14	ACCh	0,69	0,39	0,83	199	6
15	ACHChDA	0,63	0,42	0,80	401	6

q^2_{LOO} = coeficiente de correlação com validação cruzada; r^2 = coeficiente de correlação sem validação cruzada; HL= comprimento do holograma; Distinção do fragmento: A= átomo, B= ligação, C= conexão, H= átomos de hidrogênio, Ch= quiralidade, DA= doador e receptor de ligação de hidrogênio; PC= número de componentes principais.

Tabela 4. Influência do tamanho de fragmento nos parâmetros estatísticos usando a melhor distinção

Distinção fragmento	Modelo	Tamanho fragmento	Q^2_{LOO}	SDEP	R^2	HL	N
ACHCh	16	2-5	0,70	0,39	0,80	199	6
	17	3-6	0,70	0,39	0,83	199	6
	18	4-7	0,77	0,33	0,85	199	6
	19	5-8	0,67	0,40	0,84	199	6
	20	6-9	0,62	0,42	0,81	199	6
	21	7-10	0,60	0,44	0,81	199	6
ACH	22	2-5	0,68	0,39	0,78	199	6
	23	3-6	0,70	0,38	0,80	199	6
	24	4-7	0,77	0,33	0,86	199	6
	25	5-8	0,69	0,39	0,82	199	6
	26	6-9	0,62	0,43	0,78	199	6
	27	7-10	0,60	0,44	0,77	199	6

de fragmento (átomo, conectividade, hidrogênio e quiralidade)

q^2 = coeficiente de correlação com validação cruzada; r^2 = coeficiente de correlação sem validação cruzada; HL= comprimento do holograma; Distinção do fragmento: A= átomo, B= ligação, C= conexão, H= átomos de hidrogênio, Ch= quiralidade, DA= doador e receptor de ligação de hidrogênio; PC= número de componentes principais.

A estabilidade do melhor modelo foi avaliada com o método de *progressive scrambling* (permutação de variáveis). Espera-se que os resultados dos modelos construídos através dessa técnica, apresentem baixos valores de q^2_{LOO} , pois valores elevados podem ser obtidos devido à chance de correlação ou redundância estrutural das moléculas do conjunto treino.

O modelo obtido com a permutação das variáveis dependente apresentou $q^2 = 0,44$, indicando que o modelo final não foi gerado de forma aleatória e que não há redundância estrutural das moléculas no conjunto de dados.

Outra análise estatística, reamostragem (do inglês, *bootstrapping*), foi empregada para determinação do coeficiente de correlação da reamostragem (r^2_{boot}) e o erro padrão de correlação da reamostragem (SEE_{boot}) para o modelo de CoMFA. O *bootstrapping* envolve a geração de subconjuntos de dados, obtidos por amostragem aleatória, a partir do conjunto de dados original. A partir dos valores estatísticos obtidos para cada modelo, pode-se calcular o intervalo de confiança e a estabilidade dos modelos de PLS. Essa técnica permitiu avaliar a precisão do modelo que apresentou valor médio de $r^2_{boot} = 0,83$ e $SEE_{boot} = 0,276$ para 100 reamostras. Esses resultados comprovam a validade estatística do modelo.

Apesar da validação cruzada ser útil para avaliar a ocorrência de *overfitting* (sobre ajuste do modelo), robustez e a estabilidade do modelo, não se acredita que a capacidade de prever a atividade de novos compostos possa ser estimada por essas técnicas (CHIRICO; GRAMATICA, 2011; GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; HAWKINS, 2004; KUBINYI, 2002). Isso ocorre, pois na validação cruzada a molécula excluída, eventualmente, faz parte do conjunto utilizado para construir o modelo. Assim, o valor de q^2_{LOO} não se refere de fato à predição de compostos novos e, portanto, a estimativa da capacidade preditiva pode ser excessivamente otimista (CHIRICO; GRAMATICA, 2011). Sendo assim, a capacidade preditiva real de um modelo de QSAR deve ser testada utilizando um conjunto externo (que não fez parte da calibração do modelo) (GOLBRAIKH; TROPSHA, 2002; HAWKINS, 2004; KUBINYI, 2002; BAUMANN, 2003; TROPSHA; GRAMATICA; GOMBAR, 2003).

Além disso, a utilização de mais de um critério de validação apresenta vantagens, quando comparado a modelos que utilizam apenas um critério, uma vez que diversos fatores, tais como tamanho e distribuição dos dados do conjunto teste, influenciam no cálculo do poder preditivo do modelo. Nesse sentido a utilização de mais de uma metodologia para o cálculo de r^2_{pred} contribui para seleção de modelos cuja capacidade preditiva, de fato, se aproxima daquela que seria encontrada num caso real (CHIRICO; GRAMATICA, 2011).

Com o objetivo de selecionar o modelo com maior poder preditivo, os modelos 8 e 12 foram utilizados para prever a atividade dos compostos do conjunto teste. O melhor modelo foi selecionado com base nos valores de r^2 preditivo (r^2_{pred1} , r^2_{pred2}). Os valores calculados de r^2_{pred} para os modelos para o modelo 8 e 12 foram $r^2_{\text{pred1}}=0,78$; $r^2_{\text{pred2}}= 0,78$ e $r^2_{\text{pred1}}=0,77$; $r^2_{\text{pred2}}= 0,77$ respectivamente. As funções r^2_{pred1} e r^2_{pred2} apresentam desvantagem quando os dados biológico dos compostos do conjunto teste não são uniformemente distribuídos ao longo do conjunto treino (CONSONNI; BALLABIO; TODESCHINI, 2009). Como o conjunto teste utilizado neste trabalho apresenta boa diversidade química e distribuição adequada da atividade biológica ao longo do conjunto treino, as funções r^2_{pred1} e r^2_{pred2} são adequadas para avaliar a capacidade preditiva dos modelos.

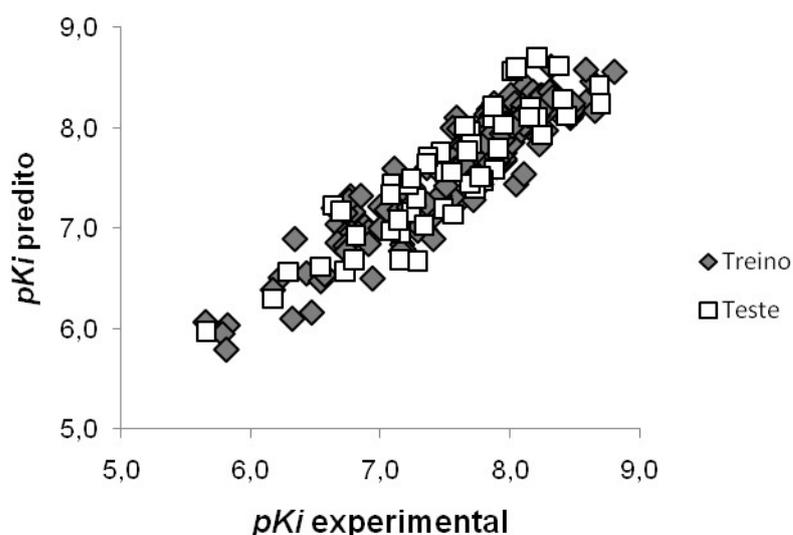
A análise dos valores de r^2_{pred1} e r^2_{pred2} para os modelos 8 e 12 indica que não há uma diferença significativa entre os dois modelos. Sendo assim, o modelo 12 foi selecionado como melhor modelo de HQSAR para o conjunto de antagonistas do

RA2b, uma vez que este modelo é mais simples e com qualidade estatística equivalente ao modelo 8. Dessa forma, as próximas etapas do trabalho serão realizadas utilizando as informações do melhor modelo (14).

Na análise do gráfico predito vs experimental (Figura 23), pode-se observar que os pontos seguem uma linha reta, mostrando boa concordância entre os valores preditos e experimentais. Os dados demonstram (Tabela 5) que o resíduo (subtração entre os valores de atividade biológica experimental e predito) não é superior a 0,61 unidade logarítmica.

O procedimento de validação externa mostrou que o modelo apresenta resultados estatísticos satisfatórios, indicando que o modelo pode ser utilizado para prever a atividade de novos compostos congêneres.

Figura 23. Valores experimentais e calculados de pK_i para o conjunto de dados de 195 compostos, segundo o melhor modelo de HQSAR.



Uma função importante dos modelos de HQSAR, além de prever a atividade biológica de novas moléculas, é fornecer sugestões sobre quais fragmentos moleculares desempenham papel importante para a atividade biológica. Essa informação é obtida através do cálculo da contribuição individual de cada átomo/fragmento das moléculas e pode ser visualizada através de mapas de contribuição, nos quais cada átomo é colorido de acordo com sua contribuição para a atividade do composto. As cores do lado vermelho do espectro (vermelho, laranja avermelhado, laranja) refletem as contribuições negativas, enquanto que as cores da extremidade verde do espectro (amarelo, azul esverdeado e verde) refletem as

Tabela 5. Valores de Ki_{50} experimentais e preditos do conjunto teste (54 compostos) obtidos com o melhor modelo de HQSAR.

Compostos	Ki_{50} experimental	Ki_{50} predito	Resíduo	Compostos	Ki_{50} experimental	Ki_{50} predito	Resíduo
142	8,44	8,26	-0,18	169	7,70	7,84	0,14
143	7,88	7,58	-0,30	170	7,56	7,20	-0,36
144	7,87	8,08	0,21	171	7,47	7,70	0,23
145	7,69	8,04	0,35	172	7,28	7,36	0,08
146	7,50	7,63	0,13	173	7,22	7,39	0,17
147	7,49	7,20	-0,29	174	7,08	7,36	0,28
148	7,24	7,15	-0,09	175	8,41	8,35	-0,06
149	8,38	8,51	0,13	176	7,65	7,83	0,18
150	8,21	8,74	0,53	177	7,16	6,99	-0,18
151	8,16	8,17	0,01	178	8,25	7,89	-0,36
152	8,69	8,33	-0,36	179	7,91	7,77	-0,14
153	8,21	8,07	-0,14	180	7,87	8,27	0,40
154	8,02	8,52	0,50	181	7,67	7,76	0,09
155	6,54	6,63	0,09	182	7,69	7,35	-0,34
156	6,29	6,61	0,32	183	7,37	7,73	0,36
157	6,64	7,21	0,57	184	7,29	6,68	-0,61
158	6,70	7,19	0,49	185	7,08	6,98	-0,10
159	6,81	6,88	0,07	186	6,73	6,52	-0,21
160	7,15	6,74	-0,41	187	7,77	7,54	-0,23
161	8,21	8,74	0,53	188	7,55	7,52	-0,04
162	7,09	7,44	0,35	189	7,36	7,46	0,10
163	8,15	8,06	-0,09	190	7,34	7,04	-0,30
164	8,70	8,18	-0,52	191	7,14	7,15	0,01
165	8,05	8,43	0,38	192	6,80	6,73	-0,07
166	7,95	8,02	0,07	193	5,66	6,02	0,36
167	7,79	7,44	-0,35	194	7,24	7,47	0,23
168	7,73	7,43	-0,30	195	6,17	6,26	0,09

contribuições positivas para a resposta biológica. Os átomos que apresentam contribuições intermediárias e aqueles do esqueleto base são coloridos em branco. O mapa de contribuição para o composto 128 indica que substituinte *metoxi* ligado na posição meta do anel 8-fenil apresenta contribuição desfavorável (Figura 24) para atividade dos compostos, o que segundo dados da literatura pode ser decorrente de impedimento estéreo (CAROTTI et al. , 2006).

Embora, o modelo de HQSAR tenha apresentado boa capacidade preditiva e permitido verificar visualmente os fragmentos que contribuem positiva ou negativamente para a atividade biológica, essa metodologia não é capaz de explicar as razões químicas para o esquema de cores exibidos nos mapas de contribuição. Por exemplo, a contribuição dos átomos do anel deaza-purina no composto mais potente (composto 91) é positiva, ao passo que para o composto 128 (que está entre os menos potentes) a contribuição dos átomos é negativa (Figuras 24 e 25). Essa aparente contradição ocorre, pois os espectros obtidos são a soma das contribuições de diversos fragmentos que se superpõe parcialmente. Adicionalmente, não se pode afirmar que uma determinada contribuição é resultante de componentes estéreos e/ou eletrônicos, pois somente critérios fragmentais são utilizados na construção do holograma molecular. Dessa maneira, visando investigar mais a fundo as propriedades que determinam a atividade biológica de derivados 9-deazaxantina decidiu-se empregar uma técnica de QSAR 3D, a análise comparativa de campos moleculares (CoMFA).

Figura 24. Mapa de contribuição para o composto 128 ($pK_i = 6,57$), segundo o melhor modelo de HQSAR.

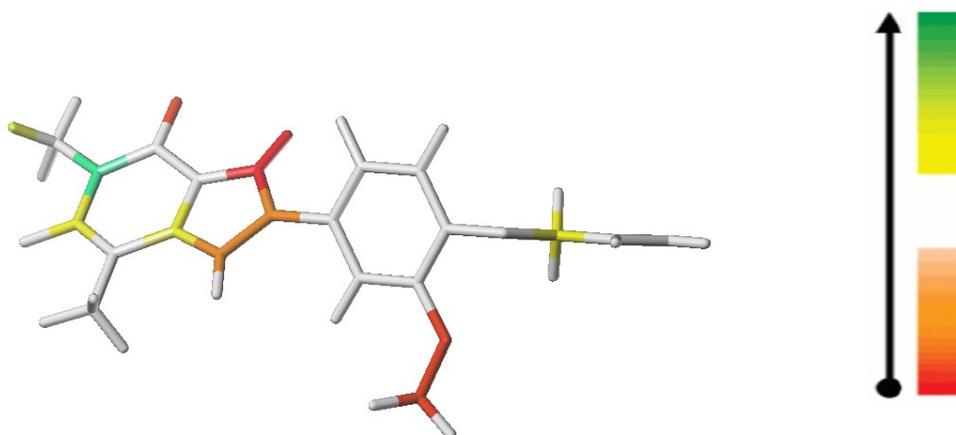
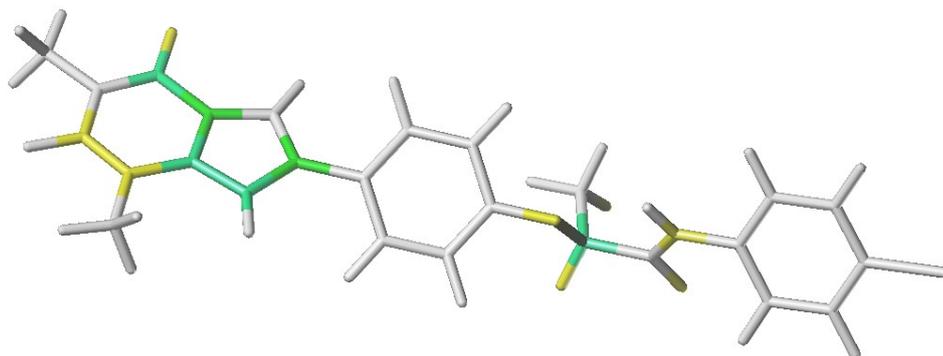


Figura 25. Mapa de contribuição para o composto **91** ($pK_i = 8,81$), segundo o melhor modelo de HQSAR.



4.3 ANÁLISE DE CoMFA

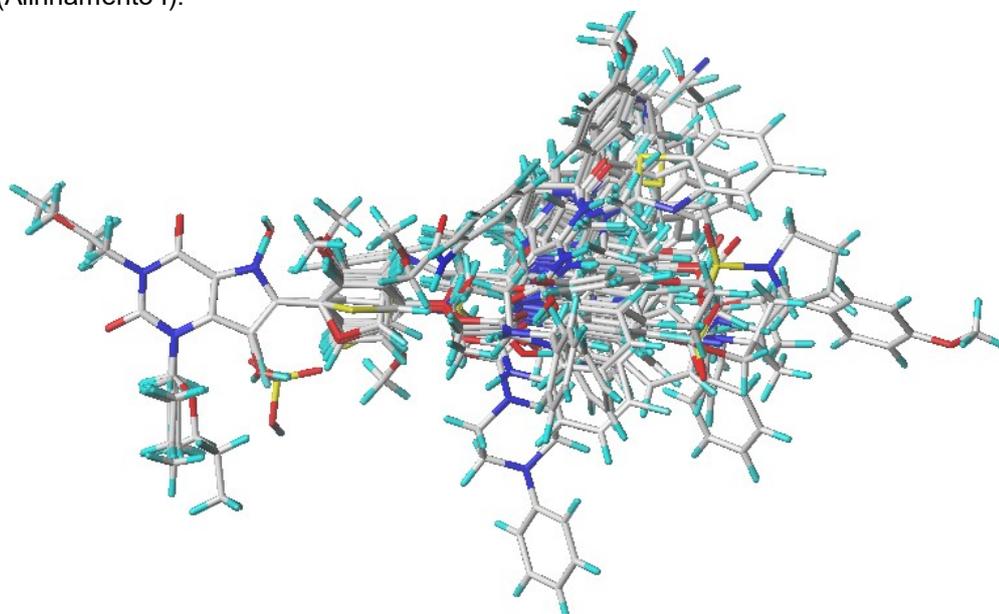
O método de CoMFA é baseado no pressuposto que as alterações na afinidade de ligação dos compostos estão relacionadas com mudanças nas propriedades das moléculas, representadas por campos moleculares. Diferente do método de HQSAR, as conformações e as cargas atômicas parciais das moléculas em estudo alteram de forma significativa o cálculo dos descritores moleculares, que nesse caso são campos de interação estereoquímicos e eletrostáticos (descritores de campo).

Mudanças graduais nas interações são mapeadas através da medida de energia potencial de interação em pontos determinados ao redor das moléculas dos ligantes alinhados. Se o potencial de interação de duas moléculas difere em uma determinada região no espaço, isso indica que essas moléculas podem interagir de forma diferente nesta região. Essa diferença de interação pode ser responsável pela diferença na atividade dos compostos. Devido a este fato, pequenas alterações na orientação espacial ou pequenas diferenças conformacionais das moléculas em estudos podem resultar em variações nos descritores de campo moleculares. Assim, a etapa de alinhamento representa um dos principais desafios do método de CoMFA (KUBINYI, 1998). Dessa forma, as moléculas do conjunto de dados foram alinhadas com base em três estratégias.

O primeiro método de alinhamento (Alinhamento I, Figura 26), sobreposição de moléculas minimizadas, pode levar a modelos preditivos, considerando que dentre as conformações mais estáveis (ou de menores energias) deve estar a conformação bioativa (NETO et al, 2006). Por isso, grupos funcionais e/ou átomos comuns a

todas as moléculas foram identificados e utilizados para sobrepor as estruturas minimizadas dos antagonistas do RA2b.

Figura 26. Alinhamento tridimensional do conjunto de dados pelo método de máxima subestrutura comum (Alinhamento I).



Numa segunda abordagem (Alinhamento II, Figura 27) considerou-se que moléculas com volume e propriedades químicas (hidrofobicidade e átomos capazes de realizar ligações de hidrogênio) similares devem se encaixar da mesma forma no sítio do alvo macromolecular (SCHWAHA; ECKER, 2008). A similaridade morfológica entre as moléculas em estudo foi calculada com auxílio do programa SURFLEX-SIM. Este método baseia-se na comparação das moléculas em relação as suas superfícies de Van der Waals, átomos doadores e aceptores de ligação de hidrogênios e átomos carregados negativamente a fim de obter conformações próximas das bioativas, visando a máxima sobreposição entre elas, sem, contudo, ocupar um volume muito maior que o da molécula referência, que no nosso caso foram os compostos mais potentes do conjunto de dados.

Por fim, a terceira estratégia de alinhamento (Figura 28) foi conduzida a fim de unir as vantagens das informações sobre as conformações dos ligantes obtidas após análise por similaridade morfológica com a sobreposição espacial pelo método baseado na máxima estrutura comum. Tomadas juntas, estas estratégias podem proporcionar a aproximação de grupos semelhantes no espaço atenuando as

diferenças na sobreposição relativa entre as moléculas nos Alinhamentos I e II, levando a uma melhora na qualidade estatística dos modelos de CoMFA gerados.

Figura 27. Alinhamento tridimensional do conjunto de dados pelo método similaridade da forma, Surfex-sim (Alinhamento II).

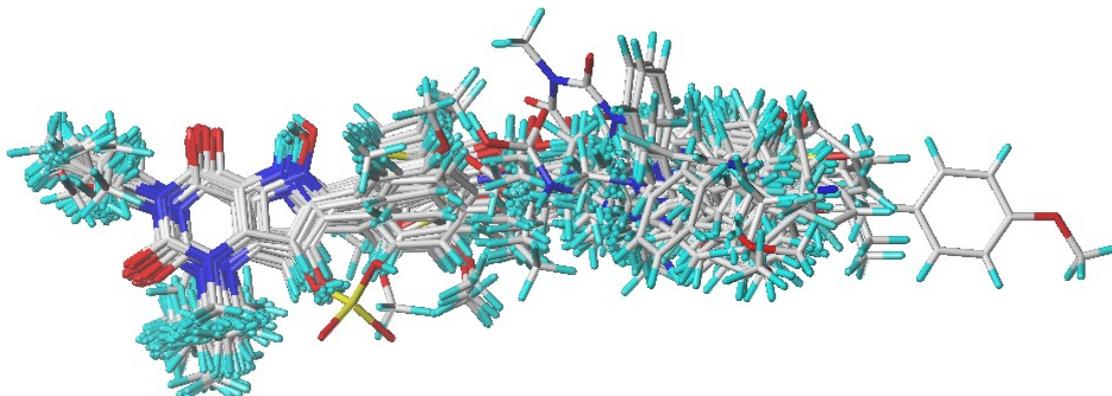
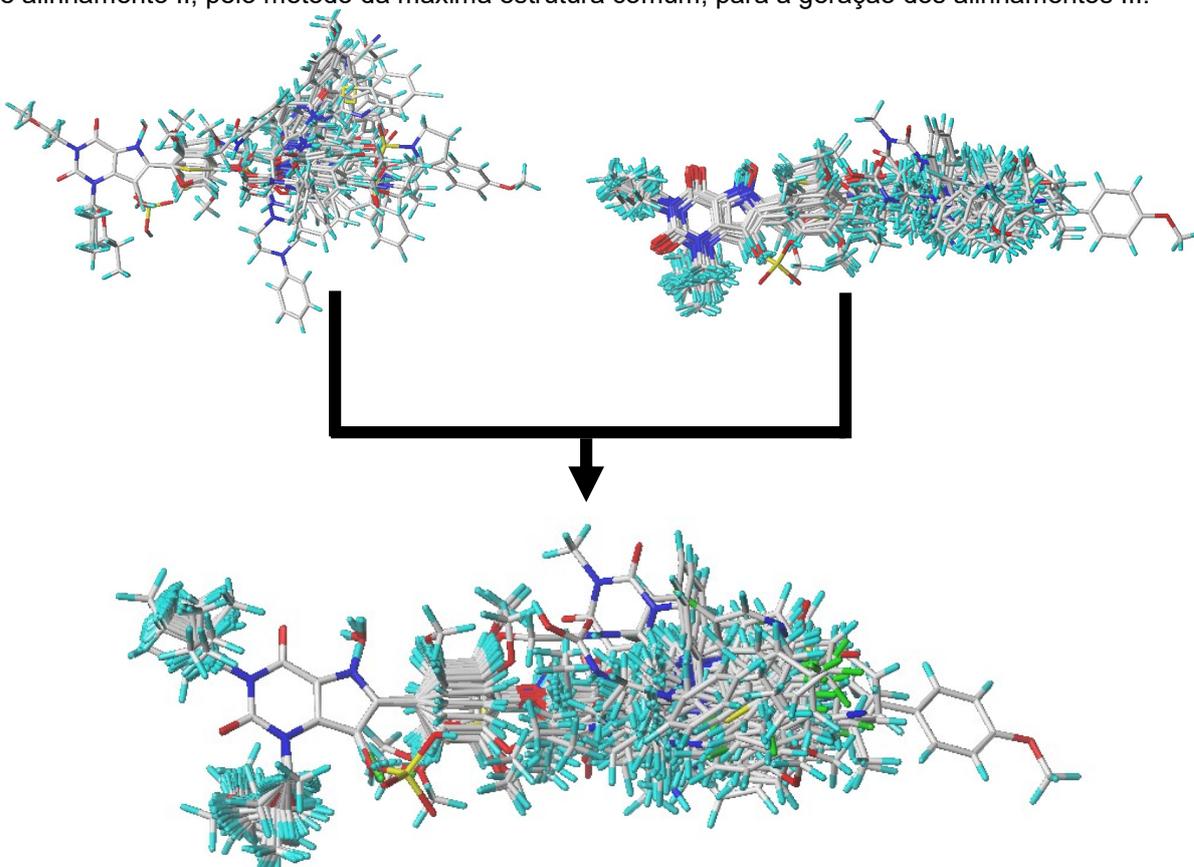


Figura 28. Estratégia para o realinhamento molecular das conformações oriundas dos Alinhamentos I e alinhamento II, pelo método da máxima estrutura comum, para a geração dos alinhamentos III.



Na etapa de construção dos modelos foram calculadas as propriedades estéreas e eletrostáticas de acordo com os potenciais Lennard-Jones e os de Coulomb,

respectivamente. Para isso, as moléculas do conjunto treino, nas conformações e orientações espaciais definidas nos alinhamentos I, II e III, foram inseridas em uma grade tridimensional com espaçamento padrão de 2.0 Å entres os pontos da grade. O valor padrão de 30 kcal/mol foi definido como o corte de energia máxima estérea e eletrostática, para que as energias de interação fossem tratadas como tendo a mesma ordem de grandeza, esses processos foram escalonados pelo método “CoMFA padrão” (GADHE et al., 2010).

Uma vez gerados os descritores, foram construídos os modelos de CoMFA utilizando o mesmo conjunto de dados empregado para gerar os modelos de HQSAR. Como os modelos de CoMFA gerados a partir dos três alinhamentos apresentaram parâmetros estatísticos considerados insatisfatórios ($q^2_{LOO} < 0,7$) (Tabela 6) foi empregado o recurso de focagem de melhor região, visando obter um aumento na consistência interna e um refinamento dos mapas de contorno. O escalonamento “CoMFA padrão” atribui, o mesmo peso para todos os campos utilizados na análise de PLS. Como muitos desses pontos foram incluídos na análise, os modelos gerados não apresentaram resultados estatísticos satisfatórios. Com o recurso de focagem da melhor região foi atribuído um peso maior para os pontos da grade que contribuíram de maneira mais significativa para o modelo e menor peso para pontos que apresentaram redundância ou baixa variância. Para evidenciar os campos apropriados foi utilizado o método de diferenciação pelo coeficiente de desvio padrão (do inglês, *Standard Deviation Coefficient* - SDC), que atribuiu pesos para assim realizar nova análise. Nessa etapa, diferentes tamanhos de espaçamentos foram considerados (0,5, 1,0 e 1,5 Å) e os campos moleculares foram multiplicados por um peso fixo (0,3, 0,6, 0,9 ou 1,2). A combinação de ambos os parâmetros deu origem a 12 modelos de CoMFA para cada alinhamento (Tabela 7).

Tabela 6: Modelos de CoMFA obtidos com parâmetros padrão e espaçamento de 2Å.

Alinhamento	Parâmetros Estatísticos			
	q^2_{LOO}	r^2	SEE	PCs
I	0,61	0,87	0,43	6
II	0,57	0,89	0,45	6
III	0,50	0,88	0,48	4

q^2 : Coeficiente de Correlação por Validação Cruzada; r^2 : Coeficiente de Correlação sem Validação Cruzada; SEE: Erro Padrão de Estimativa; PC: Número Ótimo de Componentes

A maioria dos modelos apresentou valores elevados de q^2_{LOO} com espaçamento de 1,0 Å e SDC 0,6. Adicionalmente, é possível observar que os valores de q^2_{LOO} dos modelos baseados no Alinhamento I aumentaram significativamente, se comparados aos resultados obtidos com a análise previamente discutida (Tabela 6).

Tabela 7: Influência da focagem da região e do espaçamento da grade nos valores de q^2 dos modelos de CoMFA.

Alinhamento	GS (Å)	q^2/PC			
		Valor de SDC (Focus CoMFA)			
		0.3	0.6	0.9	1.2
I	0.5	0,63/6	0,65/6	0,64/6	0,60/6
	1.0	0,70/6	0,70/6	0,66/6	0,65/6
	1.5	0,50/6	0,49/6	0,45/6	0,44/6
II	0.5	0,60/6	0,61/6	0,60/6	0,57/6
	1.0	0,64/6	0,66/6	0,64/6	0,61/6
	1.5	0,51/3	0,52/3	0,51/6	0,50/6
III	0.5	0,53/5	0,62/5	0,62/5	0,61/5
	1.0	0,64/5	0,66/6	0,66/6	0,63/6
	1.5	0,57/4	0,59/5	0,58/6	0,55/6

GS = espaçamento da grade; PC = Componentes principais; q^2 : Coeficiente de Correlação por Validação Cruzada. **Negrito** =

O melhor modelo de CoMFA obtido apresentou boa significância estatística ($q^2_{LOO}=0,70$; $r^2=0,86$ – Modelo 1, Tabela 8) indicando que esse alinhamento pode produzir modelos preditivos e com consistência interna razoável. Já o melhor resultado de CoMFA obtido a partir do Alinhamento II (modelo 2, Tabela 8), forneceu um modelo ligeiramente inferior ($q^2_{LOO}=0,67$ e $r^2=0,89$).

Finalmente, na terceira estratégia de sobreposição, considerando as conformações oriundas dos alinhamentos I e II, foi realizado um realinhamento rígido das conformações para obtenção do Alinhamento III. O modelo gerado a partir desse alinhamento (Modelo 3, Tabela 8) apresentou valores estatísticos pouco inferior ao modelo 1 e ligeiramente superior ao modelo 2.

Levando em consideração os resultados estatísticos apresentados, o modelo 1 (Tabela 8) construído a partir do alinhamento I, foi escolhido para as análises posteriores.

Tabela 8: Resultados dos melhores modelos de CoMFA obtido com os Alihamentos I, II, III.

Alinhamento	Parâmetros Estatísticos						
	GS	SDC	q^2_{LOO}	r^2	SEEP	PC	$r^2_{pred1} / r^2_{pred2}$
I – modelo 1	1.0	0.3	0,70	0,86	0,38	6	0,65 / 0,65
	1.0	0.6	0,70	0,86	0,38	6	0,70 / 0,70
II – modelo 2	1.0	0.6	0,67	0,89	0,40	6	0,54 / 0,54
III – modelo 3	1.0	0.3	0,64	0,87	0,42	5	0,51 / 0,51
	1.0	0.6	0,66	0,84	0,42	6	0,53 / 0,53
	1.0	0.9	0,66	0,82	0,40	6	0,17 / 0,17

GS – Espaçamento da grade; SDC – Valor do coeficiente para focagem da região por *Standard Deviation Coefficient*; q^2_{LOO} – Coeficiente de correlação por validação cruzada; r^2 – Coeficiente de correlação sem validação cruzada; SEEP – Estimativa do erro da predição; PC – Componente principal. **Negrito = modelo com maior r^2_{pred}**

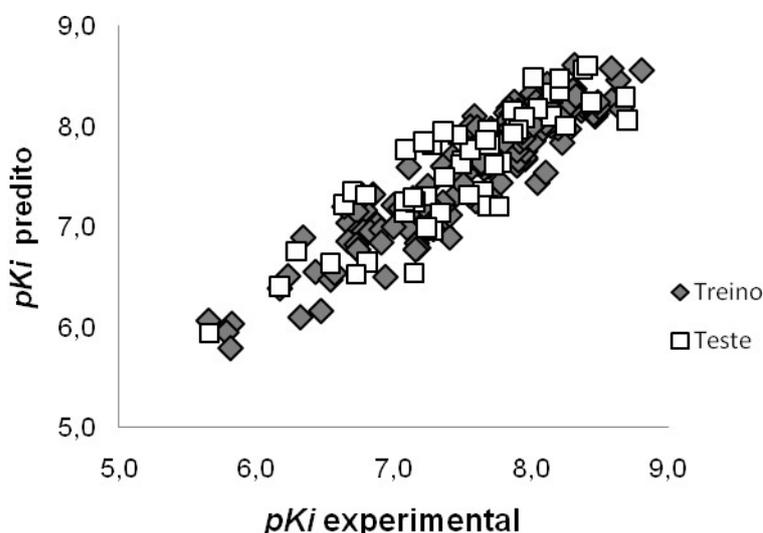
A estabilidade do melhor modelo foi também avaliada com o método de *progressive scrambling* (permutação das variáveis dependentes). Espera-se que os resultados dos modelos construídos através dessa técnica, apresentem valores baixos de q^2_{LOO} , pois valores elevados podem ser obtidos devido à correlação ao acaso ou redundância estrutural elevada das moléculas do conjunto treino (CLARK; FOX, 2004).

O modelo obtido com a permutação das variáveis dependentes apresentou $q^2_{LOO} = 0,48$, indicando que o modelo final não foi gerado de forma aleatória e que não há redundância estrutural das moléculas no conjunto de dados, portanto os modelos são consistentes. A análise estatística de reamostragem (do inglês, *bootstrapping*) foi empregada para determinação do coeficiente de correlação da reamostragem (r^2_{boot}) e o erro padrão de correlação da reamostragem (SEE_{boot}) para o modelo de CoMFA. O *bootstrapping* envolve a geração de subconjuntos de dados obtidos por amostragem aleatória, a partir do conjunto de dados original. A partir dos valores estatísticos obtidos para cada modelo, pode-se calcular o intervalo de confiança e a estabilidade dos modelos de PLS. Essa técnica permitiu avaliar a precisão do modelo que apresentou valor médio de $r^2_{boot} = 0,87$ e $SEE_{boot} = 0,246$ para 100 execuções. Esses resultados comprovam a validade estatística do modelo.

A fim de avaliar a capacidade preditiva do modelo, a atividade dos compostos do conjunto teste foi avaliada. Esses compostos foram submetidos aos mesmos

procedimentos de minimização de energia, cálculo de cargas parciais e alinhamento molecular tais como os compostos do conjunto treino. A validação externa do modelo de CoMFA foi realizada com o conjunto teste de 54 compostos que não participaram das etapas de construção dos modelos. Os valores de predição $q^2_{rpred1}=0,70$; $q^2_{rpred2}=0,70$ comprovam a boa concordância entre os valores experimentais e preditos (Figura 29; Tabela 9), confirmando a robustez dos modelos construídos. Portanto, pode-se inferir que o modelo apresenta uma boa capacidade de predição para novos antagonistas do RA2b, que pertencem a classe dos 9-deazaxantina.

Figura 29. Valores experimentais e calculados de pK_i para o conjunto de dados de 195 compostos (treino e teste), segundo o melhor modelo de CoMFA.



O conhecimento do padrão de interação entre o RA2b e o antagonista é um requisito importante para o planejamento de novas moléculas mais potentes (GUIDO; OLIVA; ANDRICOPULO, 2008). Assim, além de prever satisfatoriamente o valor da atividade de interesse, os modelos de QSAR 3D também fornecem informações gráficas extremamente úteis relacionadas com a propriedade-alvo. Uma das características mais exploradas dos métodos de QSAR 3D é a capacidade de visualizar as regiões no espaço responsáveis pelo aumento ou diminuição da atividade biológica, no nosso caso, os valores de pK_i (GUIDO et al., 2008). Diante disso, a discussão dos mapas de contorno CoMFA será realizada apenas para o modelo com maior capacidade preditiva (modelo 1, Tabela 8).

Os mapas de contorno 3D CoMFA permitem a visualização dos campos estéreos e eletrostáticos que apresentam maior importância para explicar as diferenças nos

Tabela 9. Valores de Ki_{50} experimentais e preditos do conjunto teste (54 compostos) obtidos com o melhor modelo de CoMFA.

Compostos	Ki_{50} experimental	Ki_{50} predito	Resíduo	compostos	Ki_{50} experimental	Ki_{50} predito	Resíduo
142	8,44	8,24	0,20	169	7,70	7,81	-0,11
143	7,88	7,97	-0,09	170	7,56	7,77	-0,21
144	7,87	8,16	-0,29	171	7,47	7,92	-0,45
145	7,69	7,96	-0,27	172	7,28	7,82	-0,54
146	7,50	7,66	-0,16	173	7,22	7,84	-0,62
147	7,49	7,62	-0,13	174	7,08	7,14	-0,06
148	7,24	7,30	-0,06	175	8,41	8,60	-0,19
149	8,38	8,57	-0,19	176	7,65	7,35	0,30
150	8,21	8,48	-0,27	177	7,16	7,24	-0,08
151	8,16	8,33	-0,17	178	8,25	8,00	0,25
152	8,69	8,29	0,40	179	7,91	7,97	-0,06
153	8,21	8,35	-0,14	180	7,87	7,93	-0,06
154	8,02	8,48	-0,46	181	7,67	7,87	-0,20
155	6,54	6,63	-0,09	182	7,69	7,21	0,48
156	6,29	6,76	-0,47	183	7,37	7,50	-0,13
157	6,64	7,22	-0,58	184	7,29	6,96	0,33
158	6,70	7,35	-0,65	185	7,08	7,25	-0,17
159	6,81	6,65	0,16	186	6,73	6,53	0,20
160	7,15	6,54	0,61	187	7,77	7,20	0,57
161	8,21	8,48	-0,27	188	7,55	7,32	0,23
162	7,09	7,77	-0,68	189	7,36	7,95	-0,59
163	8,15	8,10	0,05	190	7,34	7,14	0,20
164	8,70	8,06	0,64	191	7,14	7,29	-0,15
165	8,05	8,18	-0,13	192	6,8	7,31	-0,51
166	7,95	8,09	-0,14	193	5,66	5,94	-0,28
167	7,79	7,64	0,15	194	7,24	6,99	0,25
168	7,73	7,62	0,11	195	6,17	6,41	-0,24

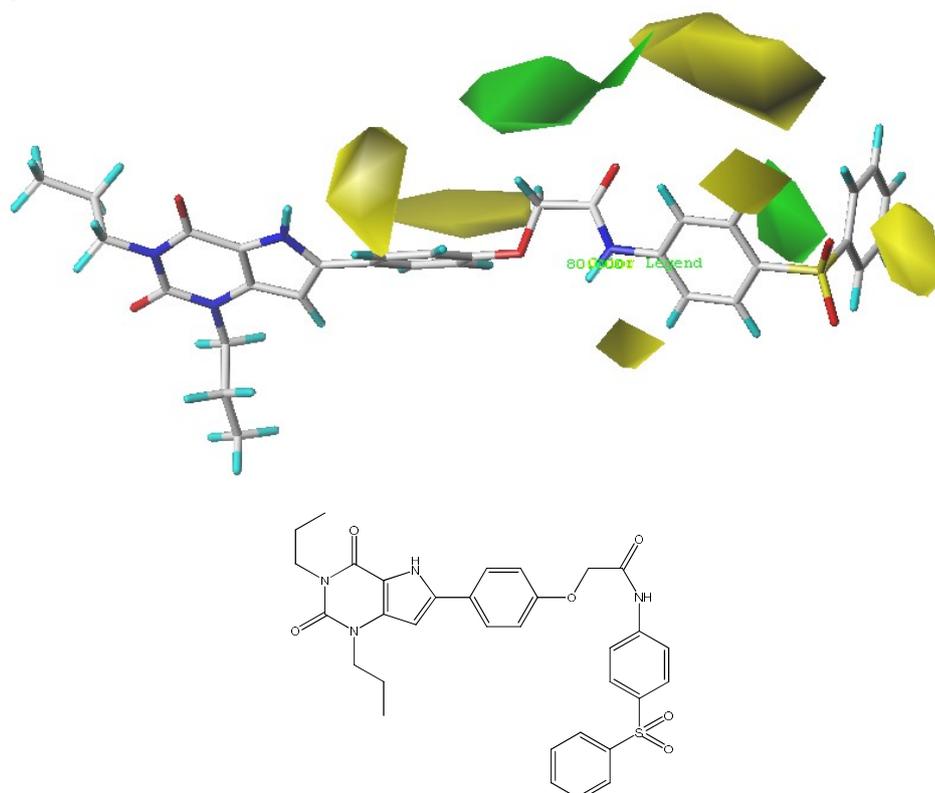
valores de afinidade da série de compostos em estudo, sendo úteis no trabalho químico medicinal, em especial nos estudos de SAR e síntese planejada.

As representações dos campos com cores verde e amarelo referem-se a características estereoquímicas, ao passo que os campos 3D com cor azul e vermelha se referem a características eletrostáticas. É importante ressaltar que estes mapas são encontrados nas áreas da grade caracterizados pela variância das propriedades estéreas e eletrostáticas dos ligantes. Assim, a ausência de um mapa não significa que determinado elemento farmacofórico não seja importante, mas apenas que todos os ligantes do conjunto analisado exercem nesta determinada área, aproximadamente, a mesma influência estérea ou eletrostática. Poliedros verdes em torno de determinadas regiões da molécula, sugerem substituições com grupos mais volumosos, ao passo que poliedros amarelos sugerem substituintes naquela posição causarão impedimento estéreo. A presença de poliedros azuis em determinada região da molécula sugere substituições por grupos com carga positiva (deficientes em elétrons) são favoráveis a atividade, ao passo que poliedros vermelhos sugerem grupos eletronegativos contribuem positivamente para esse objetivo.

Os campos estéreos explicam cerca de 51% da variância na atividade dos antagonistas do RA2b, enquanto que os campos eletrostáticos são responsáveis por 49%. Portanto, os campos estéreos e eletrostáticos apresentam influência equilibrada na atividade dos compostos. Uma análise dos mapas de contornos estéreos mostra que o anel aromático do substituinte 4-fenil sulfonil está próxima de uma região estericamente desfavorável (Figura 30). De fato, substituintes na posição meta do anel parecem reduzir a afinidade (CAROTTI et al., 2006). Já a presença de poliedro verde próximo ao grupo oxoacetamida indica que substituintes no carbono vizinho a carbonila da amida podem aumentar a afinidade dos ligantes.

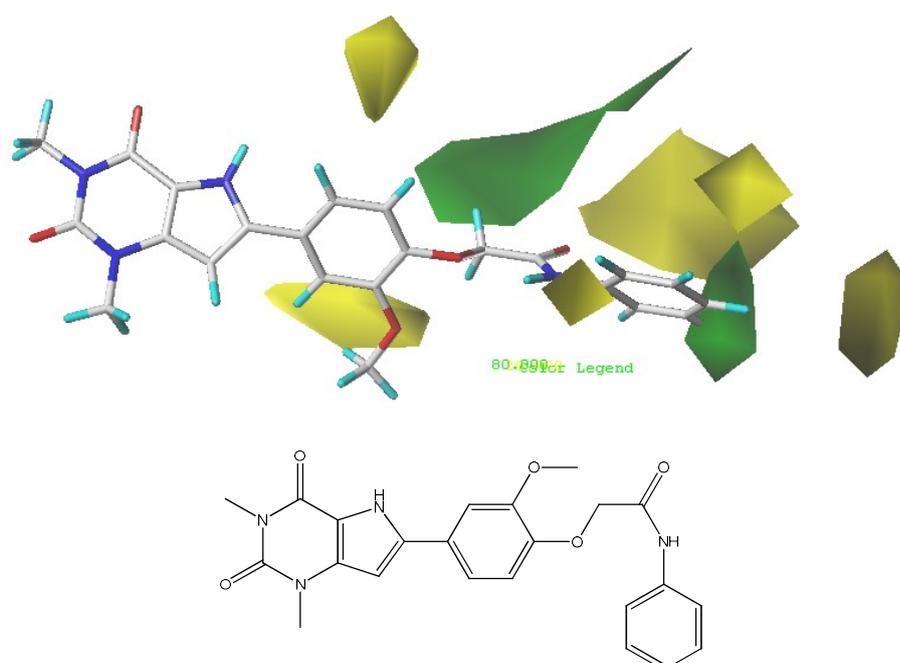
Os mapas de contorno estéreos também estão de acordo com dados da literatura (CAROTTI et al., 2006), uma vez que poliedros amarelos circunvizinhos ao grupo metoxi na posição meta do anel localizado na posição 8 do anel deaxantina corroboram a influência estérea negativa desse substituinte (Figura 31). Além disso, esses dados confirmam a informações do HQSAR, indicando que o grupo metoxi contribui negativamente para a atividade do composto.

Figura 30. Mapa de contorno dos campos estereoquímicos (composto **77**, $pK_i = 7,76$), gerado pela análise de CoMFA.



Poliedro verde - nível de contribuição 80%, poliedro amarelo - nível de contribuição 20%.

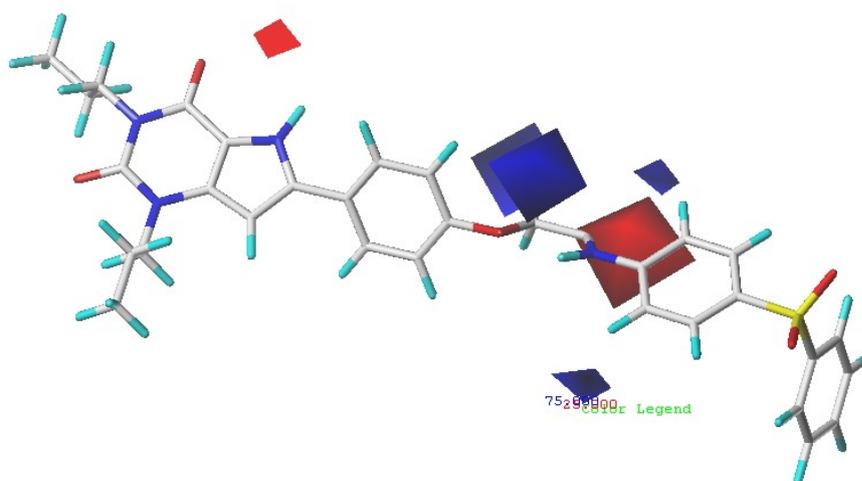
Figura 31. Mapa de contorno dos campos estereoquímicos (composto **98**, $pK_i = 6,73$), gerado pela análise de CoMFA.



Poliedro verde - nível de contribuição 80%, poliedro amarelo - nível de contribuição 20%.

O mapa de contorno eletrostático representado pelo poliedro vermelho sobre a carbonila do grupo oxocetamida sugere que antagonistas contendo substituintes eletronegativos nessa posição apresentam maior afinidade pelo receptor. Por outro lado, a presença de poliedro azul próximo ao carbono vizinho a carbonila indicam que substituintes nessa posição devem ser deficientes em elétrons para que haja aumento na afinidade (Figura 32).

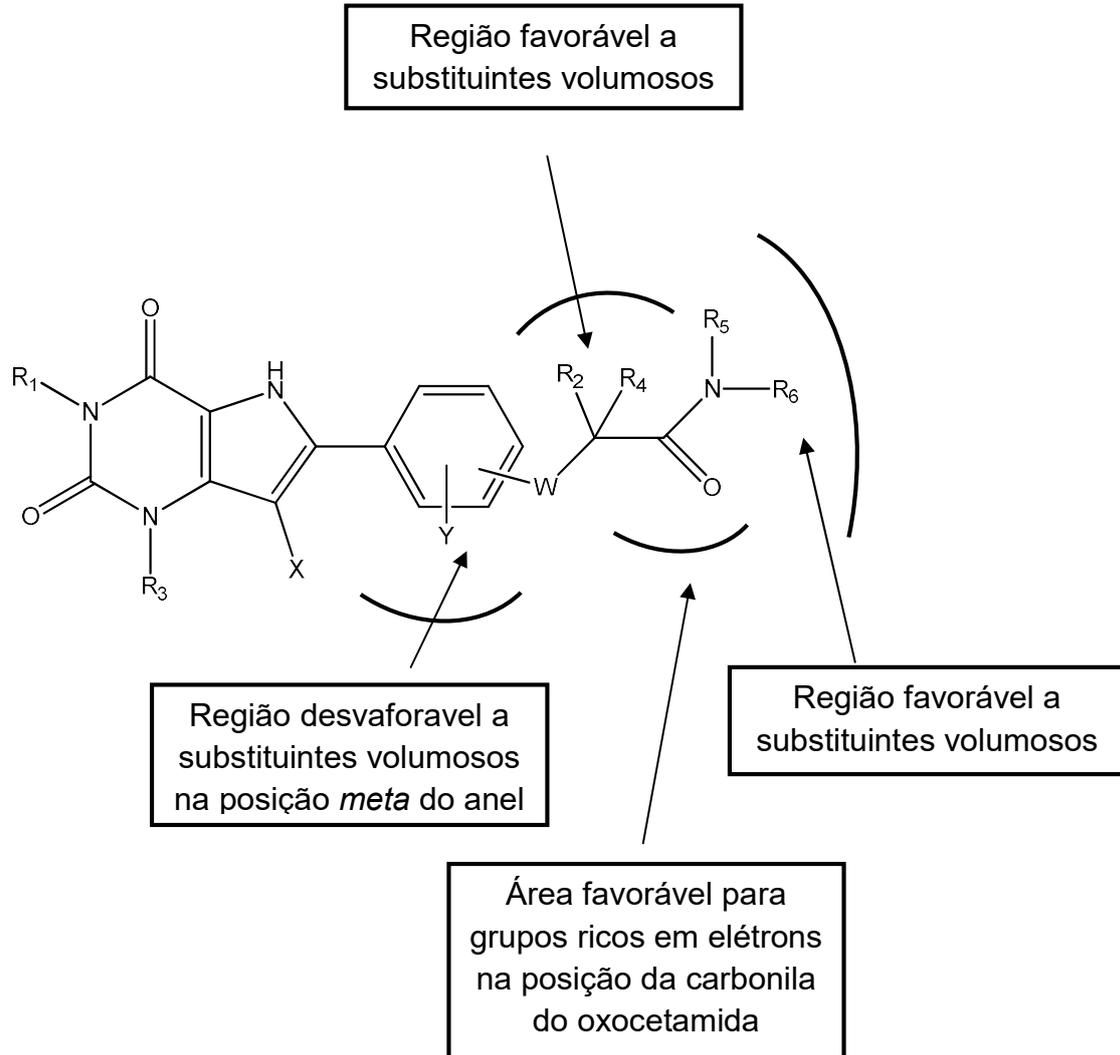
Figura 32. Mapa de contorno dos campos eletrostático (composto **77**, $pK_i = 7,76$), gerado pela análise de CoMFA.



Poliedro vermelho – nível de contribuição 25%, poliedro azul – nível de contribuição 75%.

Por fim, a partir do melhor modelo (modelo 1), as estratégias de modificações moleculares sugeridas (Figura 33) foram reunidas e espera-se que estas informações possa auxiliar na obtenção de derivados congêneres, antagonistas do RA2b mais potentes.

Figura 33: Estratégias de modificações moleculares a partir da análise dos mapas de contorno dos modelos de CoMFA para aumentar a atividade da série de compostos em estudo.



5 CONCLUSÃO

Três técnicas diferentes foram utilizadas para gerar modelos de uma série de derivados de 9-deazaxantina. No entanto, apenas duas técnicas apresentaram resultados satisfatórios. O modelo de HQSAR obtido mostrou boa consistência interna ($r^2 = 0,85$ e $q^2_{LOO} = 0,77$) e capacidade preditiva ($r^2_{pred1} = 0,78$, $r^2_{pred2} = 0,78$). Assim, este modelo pode ser utilizado para prever a afinidade de novas moléculas pelo RA2b. Informações obtidas com os mapas de contribuição indicam que substituintes na posição *meta* do anel 8 fenoxi, como grupo *metoxi*, contribuem negativamente para a atividade. Todavia não é possível afirmar, apenas com base nos modelos de HQSAR se essa contribuição é decorrente de propriedades estereoquímica ou eletrônicas.

A análise comparativa de campos moleculares foi capaz de produzir modelos robustos ($r^2 = 0,86$ e $q^2_{LOO} = 0,70$) e com capacidade preditiva razoável ($r^2_{pred1} = 0,70$, $r^2_{pred2} = 0,70$). Além disso, o teste de randomização (*scrambling*) da variável dependente indicou que os dados dos descritores 3D não são redundantes, portanto a correlação entre a estrutura e a atividade não foi gerada ao acaso. A avaliação do modelo por *bootstrapping*, ($r^2_{boot} = 0,87$ e $SEE_{boot} = 0,246$) comprova a validade estatística do modelo. Adicionalmente, os mapas de contorno estereo estão de acordo com dados da literatura (CAROTTI et al., 2006) e indicam que a contribuição negativa identificada nos mapas de HQSAR é decorrente de impedimento estereoquímico, uma vez que poliedros amarelos circunvizinhos ao grupo *metoxi* na posição *meta* do anel benzeno, localizado na posição 8 do anel deazaxantina, são observados no modelo CoMFA.

O uso de métodos baseado no ligante, QSAR 3D (CoMFA) e QSAR 2D (HQSAR), confirma que é válido associar estratégias procurando uma sinergia útil no planejamento de candidatos a novos fármacos. Os modelos finais de QSAR com boa consistência interna, habilidade preditiva e estabilidade obtidos devem ser úteis para guiar futuros trabalhos de química medicinal no planejamento de novos antagonistas do receptor de adenosina 2b.

REFERÊNCIAS

- AKAMATSU, M. Current state and perspectives of 3D-QSAR. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, p. 1381-1394, 2002;
- ANDRADE, C. H. et al. Fragment-based and classical quantitative structure-activity relationships for a series of hydrazides as antituberculosis agents. **Mol. Divers.** v. 12, p. 47-59, 2008;
- ASHBURN, T. T.; THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Drug discovery**, v. 3, p. 673-683, 2004;
- ATAGA, K. I.; et al. Improvements in haemolysis and indicators of erythrocyte survival do not correlate with acute vaso-occlusive crises in patients with sickle cell disease: a phase III randomized, placebo-controlled, double-blind study of the gardos channel blocker senicapoc (ICA-17043). **British Journal of Haematology**, v. 153, p. 92-104, 2010;
- AUCHAMPACH, J. A. et al. Canine mast cell adenosine receptors: cloning and expression of the A3 receptor and evidence that degranulation is mediated by the A2b receptor. **Molecular pharmacology**, v. 52, p. 846-860, 1997;
- EVERY, M. A. et al. Structure-activity relationships of the antimalarial agent artemisinin. The development of predictive in vitro potency models using CoMFA and HQSAR methodologies. **J. Med. Chem.**, v. 45, n. 2, p. 292-303, 2002;
- AZEVEDO, E. S. et al. Distribution of abnormal hemoglobins and glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in 1200 school children of Bahia, Brazil. **Am J Phys Anthropol.** v. 53, p. 509-12, 1980;
- BARALDI, P. G.; et al. Design, synthesis, and biological evaluation of new 8-heterocyclic xanthine derivatives as highly potent and selective human A2b adenosine receptor antagonists. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 1434-1447, 2004;
- BANDEIRA, F. M. G. C. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no hospital Hemope, Recife-PE. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, n. 3, p. 189-194, 2004.
- BARALDI, P. G. et al. Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-Triazolo[1,5 c]Pyrimidine Derivatives: A New Pharmacological Tool for the Characterization of the Human A3 Adenosine Receptor. **Drug development research**, v. 52, p. 406-415, 2001a;
- BARALDI, P. G. et al. Pyrazolo [4,3-e]1,2,4-Triazolo[1,5-c] Pyrimidine Derivatives as adenosine receptor ligands: a starting point for searching A2b adenosine receptor antagonists. **Drug development research**, v. 53, p. 225-235, 2001b;
- BAUMANN, K. Cross-validation as the objective function for variable-selection techniques. **Trends in analytical chemistry**, v. 22, n. 6, 2003;

BASKIN, I.; VARNEK, A. **Fragment descriptors in SAR/QSAR/QSPR studies, molecular similarity analysis and in virtual screening**. In: VARNEK, A.; TROPSHA, A. (Eds). *Chemoinformatics Approaches to virtual screening*. Hardcover: Royal society of chemistry, 2009. p. 335;

BEUKERS, M. W.; MEURS, I.; IJZERMAN, P. Structure-affinity relationships of adenosine A2b receptor ligands. **Medicinal research reviews**, v. 26, n. 5, p. 667-698, 2006;

BHATTACHARYA, P.; ROY, K. QSAR of adenosine A3 receptor antagonist 1,2,4-triazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one derivatives using chemometric tools. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 15, p. 3737-3743, 2005;

BHATTACHARYA, P.; LEONARD, T.; ROY, K. Exploring QSAR of thiazole and thiadiazole derivatives as potent and selective human adenosine A3 receptor antagonists using FA and GFA techniques. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, p. 1159-1165, 2005;

BORGHINI, A. et al. QSAR study on thiazole and thiadiazole analogues as antagonists for the adenosine A1 and A3 receptors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, p. 5330-5337, 2005;

BRACKETT, E.; DALY, J. W. Functional characterization of the A2b adenosine receptor in NIH 3T3 fibroblasts. **Biochemical pharmacology**, v. 47, n. 5, p. 801-814, 1994;

BRADBURY, S. P. Quantitative structure-activity relationships and ecological risk assessment: an overview of predictive aquatic toxicology research. **Toxicology Letters**, v. 79, p. 229-237, 1995;

BRASIL, Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciformes. - Brasília: ANVISA, 2001;

BROWN, R. A.; SPINA, D.; PAGE, C. P. Adenosine receptors and asthma. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. S446-456, 2008;

BUCHANAN, G. et al. Severe sickle cell disease – pathophysiology and therapy. **Biol. Blood Marrow Transplant**, v. 16, p. S64-S67, 2010;

BRUNS, R. F. Adenosine antagonism by purines, pteridines and benzopteridines in human fibroblasts. **Biochemical pharmacology**, v. 30, p. 325-333, 1981;

CALIXTO, J. B.; SIQUERIA, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 78, p. 98-106, 2008;

CAMAIONI, E. et al. New substituted 9-alkylpurines as adenosine receptor ligands. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 6, p. 523-533, 1998;

CAROTTI, A. et al. Design, Synthesis, and Structure-Activity Relationships of 1-,3-,8, and 9-Substituted-9-deazaxanthines at the Human A2B Adenosine Receptor. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 282-299, 2006;

CAROTTI, A. et al. 8-substituted-9-deazaxanthines as adenosine receptor ligands: Design, synthesis and structure-affinity relationships at A2b. **Eur. J. Med. Chem.** v., 39, p. 879-887, 2004;

CASTILHO, M. S. et al. Two- and three-dimensional quantitative structure-activity relationships for a series of purine nucleoside phosphorylase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, p. 516-527, 2006;

CAVALLA, D.; SINGAL, C. Retrospective clinical analysis for drug rescue: for new indications or stratified patient groups. **Drug discovery today**. v. 17, n. 3/4, p. 104-109, 2012;

CHIRICO, N.; GRAMATICA, P. Real external predictivity of QSAR models: how to evaluate it? Comparison of different validation criteria and proposal of using the concordance correlation coefficient. **Journal of chemical information and modeling**, v. 51, p. 2320-2335, 2011;

CHENG, F.; XU, Z.; LIU, G.; TANG, Y. Insights into binding modes of adenosine A2b antagonists with ligand-based and receptor-based methods. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3459-3471, 2010;

CHOO, H. Y. P.; et al. A comparative study of quantitative structure activity relationship methods based on antitumor diarylsulfonylureas. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, p. 829-836, 2001;

CLARK, R. D. Statistical variation in progressive scrambling. **Journal of computer-aided molecular design**, v. 18, p. 563-576, 2004;

CONSONNI, V.; BALLABIO, D.; TODESCHINI, R. Comments on the definition of the Q2 parameter for QSAR validation. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 49, p. 1669-1678, 2009;

CURY, D.; BOA-SORTE, N.; LYRA, I. M.; ZANETTE, A. D.; LIMA, H. C.; CASTRO, B. G.; GONÇALVES, M. S. Ocular lesions in sickle cell disease patients from Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 69, n. 4, p. 259-63, 2010;

BUNN, H. F. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. **N. Eng. J. Med.**, v. 337, n. 11, p. 762, 1997;

CURY, D. et al. Ocular lesions in sickle cell disease patients from Bahia, Brazil. **Rev. Bras. Oftalmol.**, v. 69, n. 4, p. 259-63, 2010;

DINIZ, D.; et al. Prevalência do traço e da anemia falciforme em recém-nascidos do Distrito Federal, Brasil, 2004 a 2006. **Cad. Saúde Pública**, v. 25, n. 1, p. 188-194, 2009;

DINIZ, D.; GUEDES, C. Informação genética na mídia impressa: a anemia falciforme em questão. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 11, n. 4, p. 1055-1062, 2006;

DODDAREDDY, M. R. et al. Hologram quantitative structure activity relationship studies on 5-HT₆ antagonists. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 12, p. 3815-3824, 2004;

Editorial, Colonizing therapeutic space: the overlooked science of drug husbandry. **Drug discovery**, v. 3, p. 101, 2004;

EKMAN, P. Finasteride in the treatment of benign prostatic hypertrophy: an update. **Scand. J. Nephrol. Suppl.**, v. 203, p. 12-20, 1999;

EMBURY S.H. Anemia falciforme e hemoglobinopatias associadas. In: Bennett J. C. **Cecil tratado de medicina interna**. Ed. 20, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1997;

EROGLU, E. et al. Comparative QSTR study using semi-empirical and first principle methods based descriptors for acute toxicity of diverse organic compounds to the fathead minnow. **International journal of molecular sciences**, v. 8, p. 1265-1283, 2007;

ESTEVE, C.; NUEDA, A.; DÍAZ, J. L.; BELETA, J.; CÁRDENAS, A.; LOZOYA, E.; CADAVID, M. I.; LOZA, M. I.; RYDER, H.; VIDAL, B. New pyrrolopyrimidin-6-yl benzenesulfonamides: potent A_{2b} adenosine receptor antagonists. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 16, p. 3642-3645, 2006;

FABRON JR., A. Clínica e tratamento das doenças falciformes. In: NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997. p.48-60;

FEOKTISTOV, I. et al. Adenosine A_{2B} receptors: a novel therapeutic target in asthma? **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 19, 148-153, 1998;

FERNÁNDEZ, F.; et. al. 1,3-Dialkyl-8-N-substituted benzyloxycarbonylamino-9-deazaxanthines as potent adenosine receptor ligands: Design, synthesis, structure-affinity and structure-selectivity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 3618-3629, 2009;

FIGUEIREDO, M. S. Situações de emergência. In: ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA. p.71-77, 2001;

FOZARD, J. R. The case for a role for adenosine in asthma: almost convincing? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 3, p. 264-269, 2003;

FREDHOLM B. B. et al. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev.**, v. 53, p. 527, 2001;

FREDHOLM, B. B. Adenosine, an endogenous distress signal, modulates tissue damage and repair. **Cell Death and Differentiation**, v. 14, p. 1315-1323, 2007;

FUNK, O. F. et al. Chemical function based pharmacophore generation of endothelin-A selective receptor antagonists. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 2750-2760, 2004;

GADHE, C. G. et al. Ligand based CoMFA, CoMSIA and HQSAR analysis of CCR5 antagonists. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 31, n. 10, p. 2761, 2010;

GANELLIN, C. R.; ROBERTS, S. M. **Medicinal chemistry: The role organic chemistry in drug research**. 2. Ed. San Diego: Academic Press, 1994. 1275p;

GAUDIO, A. C.; ZANDONADE, E. Proposição, validação e análise dos modelos que correlacionam estrutura química e atividade biológica. **Quim. Nova**, v. 24, p. 658, 2001;

GLADWIN, M. T. Adenosine receptor crossroads in sickle cell disease. **Nature medicine**, v. 17, n. 1, 2011;

GOLBRAIKH, A.; TROPSHA, A. Beware of q²! **Journal of Molecular Graphics and Modeling**, v. 20, p. 269-276, 2002.

GONZALEZ, M. P.; TERAN, C.; TEIJEIRA, M. Search for new antagonist ligands for adenosine receptors from QSAR point of view. How close are we?, **Med. Res. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 329-371, 2008;

GRAHNER, B. et al. Synthesis and structure-activity relationships of deazaxanthines: analogs of potent A1 and A2 adenosine receptor antagonists. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 1526-1534, 1994;

GRAMATICA, P. Principles of QSAR models validation: internal and external. **QSAR Comb. Sci.**, v. 26, n. 5, 694-701, 2007;

GROVER, M. et al. Quantitative structure-property relationships in pharmaceutical research – part 1. **PSTT**, v. 3, n. 1, p. 28, 2000;

GUALANDO, S. F. M. Fisiologia da anemia falciforme. In: BRASIL, **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doença Falciforme**. Brasília: ANVISA, 2001;

GUALANDRO, S. F. M. Lesões osteoarticulares na doença falciforme. In: **ANVISA. Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001. p.92-97;

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, 2010;

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Curr Med. Chem.**, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008;

GUIDO, R. V. C. et al. Structural basis for selective inhibition of trypanosomatid glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase: molecular docking and 3D QSAR studies. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 48, p. 918, 2008;

GUIDO, R. V. C. et al. Classical and hologram QSAR studies on a series of inhibitors of trypanosomatid glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. **QSAR & Combinatorial science**, v. 27, n. 6, p. 768-781, 2008;

HAAS, M. J. Two edges of sickle cell disease. **SciBX.**, v. 4, n. 3, 2011;

HANSCH, C.; TELZER, B. R.; ZHANG, L. Comparative QSAR in toxicology: examples from teratology and cancer chemotherapy of aniline mustards. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 25, n. 1, p. 67-89, 1995;

HAWKINS, D. M. The problem of overfitting. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 44, p. 1-12, 2004;

HORROBIN, D. Realism in drug discovery – could Cassandra be right? **Nature biotechnology**, v. 19, p. 1099-1100, 2001;

HONÓRIO, K. M.; ANDRICOPULO, A. D. Two-dimensional quantitative structure-activity relationships: Hologram QSAR. In: TAFT, C. A.; SILVA, C. H. T. P. (Ed). **Current methods in medicinal chemistry and biological physics**. Trivandrum: Research Signpost, 2007, p. 49-60;

HUANG, M. et al. 3D-QSAR Studies on 4-Hydroxyphenylpyruvate Dioxygenase Inhibitors by Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA). **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 12, p. 2271-2275, 2002;

INFOMETRIX. **Multivariate Data Analysis**. Infometrix, Inc, 2009;

JACOBSON, K. A.; IJZERMAN, A. P.; LINDEN, J. 1,3-Dialkylxanthine derivatives having high potency as antagonists at human A2b adenosine receptors. **Drug development research**, v. 47, p. 45-53, 1999;

JI, X. et al. [³H]MRS 1754, a selective antagonist radioligand for a2b adenosine receptors. **Biochemical pharmacology**, v. 61, p. 657-663, 2001;

JOHNSON, M.; MAGGIORA, G. M.. **Concepts and Applications of Molecular Similarity**. New York: John Wiley, 1990;

JOSEPH, T. B. et al. Quantitative Structure Activity Relationship and Pharmacophore Studies of Adenosine Receptor A2B Inhibitors. **Chem Biol Drug Des.** v. 72, p. 395-408, 2008;

KALLA, R. V.; ZABLOCKI, J. Progress in the discovery of selective, high affinity A2b adenosine receptor antagonists as clinical candidates. **Purinergic Signalling.**, v. 5, p. 21-29, 2009;

KALLA, R. V.; et al. Selective, high affinity A2b adenosine receptor antagonists: N-1 monosubstituted 8-(pyrazol-4-yl) xanthenes. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, p. 1397-1401, 2008;

KALLA, R. V. et al., Recent developments in A2B adenosine receptor ligands. **Handb. Exp. Pharmacol.** v. 193, p. 99-122, 2009;

KAPETANOVIC, I. M. computer-aided drug discovery and development (CADD): in silico chemico biological approach. **Chem boil. Interact.**, v. 171, n. 2, p. 165-176, 2008;

KATRITZKY, A. R. et al. QSPR modeling of hyperpolarizabilities. **Journal of molecular modeling**, v. 13, n. 9, p. 951-963, 2007;

KATRITCH, V.; KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Structure based prediction of subtype-selectivity for adenosine receptor antagonists. **Neuropharmacology**, v. 60, p. 108-115, 2011;

KIM, S. A. et al. Structure-activity relationships at human and rat A2b adenosine receptors of xanthine derivatives substituted at the 1-,3-,7-, and 8-positions. **J. med. Chem.**, v. 45, p. 2131-2138, 2002;

KIM, Y. C.; JI, X. et al. Anilide derivatives of an 8-phenylxanthine carboxylic congener are highly potent and selective antagonists at human A2B adenosine receptors. **J. med. Chem.**, v. 43, p. 1165-1172, 2000;

KISHORE, D. P. et al. QSAR of adenosine receptor antagonists: exploring physicochemical requirements for binding of pyrazolo [4,3-e]-1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives with human adenosine A3 receptor subtype. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, p. 818-823, 2011;

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 11, p. 935-49, 2004;

KOLDKJAER, P.; BERENBRINK, M. In vivo red blood cell sickling and mechanism of recovery in whiting, *Merlangius merlangus*. **The Journal of experimental Biology.**, v. 210, p. 3451-3460, 2007;

KUBINYI, H. From narcosis to hyperspace: The history of QSAR. **Quant. Struct. Act. Relat.**, v. 21, p. 348, 2002;

KUBINYI, H. **Comparative molecular Field analysis**. In: encyclopedia of computational chemistry. USA: John Wiley & Sons, Ltd., 1998, v. 1, p. 1-12.

KUBINYI, H. **QSAR**: Hansch analysis and related approaches. New York: VCH, 1993. 240p;

KUMAR, N.; HENDRIKS, B. S.; JANES, K. A.; GRAAF, D.; LAUFFENBURGER, D. A. Applying computational modeling to drug discovery and development. **Drug discovery today**, v. 11, n. 17/18, 2006;

LANDERS, L. Drug industry's big push into technology falls short. Disponível em: <<http://online.wsj.com/article/0,,SB107758348388437255,00.html>>. Acesso em: 01/02/2012;

LEACH, A. R.; GILLET, V. J. **An Introduction to Chemoinformatics**. The Netherlands: Dordrecht, 2007. 71p;

LEVASSEUR, D. N.; et al. Correction of a mouse model of sickle cell disease: lentiviral/antisickling β -globin gene transduction of unmobilized, purified hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 102, n. 12, p. 4312-4319, 2003;

LEVASSEUR, D. N.; et al. A recombinant human hemoglobin with anti-sickling properties greater than fetal hemoglobin. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 26, p. 27518-27525, 2004;

LI, A. H. et al. Synthesis, CoMFA analysis, and receptor docking of 3,5-diacyl-2,4-dialkylpyridine derivatives as selective A₃ adenosine receptor antagonists. **J. med. Chem.**, v. 42, p. 706-721, 1999;

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug Discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 46, p. 3-26, 2001;

LOUREIRO, M. M.; ROZENFELD, S. Epidemiologia de internação por doença falciforme no Brasil. Ver. **Saúde Pública**, v. 39, n. 6, p. 943-9, 2005;

LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery – then and now. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 10, p. 853-62, 2004;

LOWIS, D. R. HQSAR: A new, highly predictive QSAR technique. **Tripos Technical Notes**, v. 1, n. 5, 1997;

MARTIS, E. A.; RADHAKRISHNAN, R.; BADVE, R. R. High – throughput screening: the hits and leads of drug discovery – An overview. **Journal of applied pharmaceutical science**, v. 1, n. 1, p. 02-10, 2011;

MARX, D. et al. Therapy of bronchial asthma with adenosine receptor agonists or antagonists. **Drug News Perspect.**, 14, 89-100, 2001;

McGOVERN, D. L. CoMFA analyses of C-2 position salvinorin A analogs at the kappa-opioid receptor provides insights into epimer selectivity. **J. Mol. Graph Model.**, v. 28, n. 2, p. 612-625, 2009;

MITTAL, R. R.; HARRIS, L.; McKINNON, R. A.; SORICH, M. J. Partial charge calculation method affects CoMFA QSAR prediction accuracy. **J. Chem. Inf. Model**, v. 49, p. 704-709, 2009;

MODA, T. L.; MONTANARI, C. A.; ANDRICOPULO, A. D. Hologram QSAR model for the prediction of human oral bioavailability. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 7738-7745, 2007;

MORO, S.; GAO, Z.G.; JACOBSON, K.A.; SPALLUTO, G. Progress in the pursuit of therapeutic adenosine receptor antagonists. **Med Res Rev.**, v. 26, n. 2, P. 131–159, 2006;

MORO, S. et al. Flavonoid derivatives as adenosine receptor antagonists: a comparison of the hypothetical receptor binding site based on a comparative molecular field analysis model. **J. med. Chem.**, v. 41, p. 46-52, 1998;

MORO, S. et al. combined target-based and ligand-based drug design approach as a tool to define a novel 3D-pharmacophore model of human A3 adenosine receptor antagonists: Pyrazolo[4,3-e]1,2,4-triazolo[1,5-c]pyrimidine derivatives as a key study. **J. med. Chem.**, v. 48, p. 152-162, 2005;

MOZZARELLI, A.; HOFRICHTER, J.; EATON, W. A. Delay time of hemoglobin S polymerization prevents most cells from sickling in vivo. **Science**, v. 237, p. 500-506, 1987;

MRAK, R.; GRIFFIN, W. S. T. Interleukin-1, neuroinflammation, and Alzheimer's disease. **Neurobiology of aging**, v. 22, p. 903-908, 2001;

NAOUM, P. C.; NAOUM, F. A. **Doenças das células falciformes**. São Paulo: Sarvier, 2004. 224 p.;

NARNES, P. J. Theophylline in chronic obstructive pulmonary disease. **Proc. Am. Thorac. Soc**, v. 2, p. 334-339, 2005;

NETO, Q. A. L. et al. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista brasileira de cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 345-357, 2006;

NUZZO, D. V. P.; FONSECA, S. F. Anemia falciforme e infecções. **Jornal de Pediatria**. v. 8, n. 5, 2004;

OPROMOLLA, D. V. A. O tratamento das reações na hanseníase. **Hansen. Int.**, v. 25, n. 1, p. 1-3, 2000;

OZLEM, T.A.; Betul, T.G.; Yildiz, I.; Esin, A.S.; Ismail, Y. 3D-QSAR analysis on benzazole derivatives as eukaryotic topoisomerase II inhibitors by using comparative molecular field analysis method. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 13, p. 6354-6359, 2005;

PAIVA E SILVA, R. B.; RAMALHO, A. S. Riscos e benefícios da triagem genética: o traço falciforme como modelo de estudo em uma população brasileira. **Cad. Saúde Pública**, v.13, n.2, p. 285-294, 1997;

PADLAN, E. A.; LOVE, W. E. Refined crystal structure of deoxyhemoglobin S. **The journal of biological chemistry.**, v. 260, n. 14, p. 8272-8279, 1985;

PARK, H. Y.; LIM, J. S.; KAM, Y.; KIM, S. Y.; LEE, J. A comparative study of quantitative structure activity relationship methods based on antitumor diarylsulfonylureas. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 36, p. 829-836, 2001;

PERKINS, R. et al. Quantitative structure-activity relationship methods: perspectives on drug discovery and toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry.**, v. 22, n. 8, p. 1666-1679, 2003;

RALEVIC, V.; BURNSTOCK, G. Receptors for purines and pyrimidines. **Pharm. Rev.** v. 50, n. 3, 1998;

RAGHAVAN, K. et al. Three-dimensional quantitative structure-activity relationship (QSAR) of HIV integrase inhibitors: a comparative molecular field analysis (CoMFA) study. **J. Med. Chem.**, v. 38, p. 890-897, 1995;

REES, D.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. **Lancet.**, v. 37, n. 6, p. 2018-31, 2010;

ROBEVA, A. S.; WOODARD, R. L.; JIN, X.; GAO, Z.; BHATTACHARYA, S.; TAYLOR, H. E.; ROSIN, D. L.; LIDEN, J. **Drug development research**, v. 39, p. 243-252, 1996;

ROSI, S.; MCGANN, K.; HAUSS-Wegrzyniak, B.; WENK, G. L. The influence of brain inflammation upon neuronal adenosine A2B receptors. **J. Neuro chem.** 86, 220-227, 2003;

ROY, K. QSAR of adenosine receptor antagonists I: Exploration of receptor interaction sites of 1,2-dihydro-2-phenyl-1,2,4-triazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one derivatives using AM1 calculations. **Indian J. Chem.**, v. 42b, p. 1485, 2003a;

ROY, K. QSAR of adenosine receptor antagonists II: exploring physicochemical requirements for selective binding of 2-arylpyrazolo[3,4-c]quinoline derivatives with adenosine A1 and A3 receptor subtypes. **QSAR & combinatorial science**, v. 22, p. 614, 2003b;

ROY, K; LEONARD, T.; SENGUPTA, C. QSAR of adenosine receptor antagonists. Part 3: Exploring physicochemical requirements for selective binding of 1,2,4-triazolo[5,1-i]purine derivatives with human adenosine A3 receptor subtype. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 14, p. 3705-3709, 2004;

RYAN, T. M.; et al. Human sickle hemoglobin in transgenic mice. **Science**, v. 247, p. 566-568, 1990;

RYZHOV, S.; et al. Adenosine-activated mast cells induce IgE synthesis by b lymphocytes: an A2b-mediated process involving Th2 cytokines IL-4 and IL-13 with implications for asthma. **J. Immunol.**, v. 172, p. 7726-7733, 2004;

SAAD, S. T. O. Complicações pulmonares. In: ANVISA. **Manual de diagnóstico e tratamento de doenças falciformes**. Brasília: ANVISA, 2001a. p.124-127;

SALUM, L. B.; ANDRICOPULO, A. D. Fragment-based QSAR: perspectives in drug design. **Mol Drive**, v. 13, p. 277-285, 2009;

SAN JUAN, A. A. 3D-QSAR models on clinically relevant K103N mutant HIV-1 reverse transcriptase obtained from two strategic consideration. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 18, p. 1181-1194, 2008;

SCHWAHA, R.; ECKER, G. F. The similarity principle – new trends and applications in ligand-based drug discovery and ADMET profiling. **Sci. Pharm.**, v. 76, p. 5-18, 2008;

SHANKAR, R.; FRAPAISE, X.; BROWN, B. LEAN drug development in R&D. **Drug Discov Development**, n. 5, p. 57–60, 2006;

SHIREESHA, B. et al. N-Substituted quinazolin-2,4-diones as adenosine receptor ligands. **International journal of pharmaceutical sciences and nanotechnology**, v. 3, n. 2, 2010;

STEWART, M. et al. [3H]OSI339391, a selective, novel, and high affinity antagonist radioligand for adenosine A2B receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 68, p. 305-312, 2004;

SILVA, W. S. et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano, **Brasil. Cad. Saúde Pública.**, v. 22, n. 12, p. 2561-2566, 2006;

SERJEANT G. R. Sickle-cell disease. **Lancet.**, v. 350, p. 725-30, 1997;

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T. Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Rev. bras. Hematol. hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006;

SLEIGH, S. H.; BARTON, C. L. Repurposing strategies for therapeutics. **Pharm. med.**, v. 24, n. 3, p. 151-159, 2010.

SIMÕES, B. P. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: comitê de hemoglobinopatias. **Revista brasileira de hematologia e hemoterapia**, v. 32, p. 46-53, 2010;

STATIUS, L. W. **Sickle cell disease**. In: KLAHR, S. Atlas of diseases of the Kidney. Philadelphia: Currient Medicine Inc, 1999. p. 4.1-4.22;

STEINBERG, M. H. Management of sickle cell disease. **N. Engl. J. Med.**, v.340, n.13, p.1021-1030, 1999;

STEDMAN, T. L. **Dicionário médico**. Ed. 25. Rio de Janeiro, Guanabara: Koogan, 1996;

STEFANACHI, A. et al. 1, 3- and 8-substituted-9d-deazaxanthines as potent and selective antagonists at the human A2b adenosine receptor. **Bioorg. Med. Chem.**, v.16, p. 2852-2869, 2008a;

STEFANACHI, A.; et. al. 1,3-Dialkyl-8-(hetero)aryl-9-OH-9-deazaxanthines as potent A2b adenosine receptor antagonists: Design, synthesis, structure-affinity and structure-selectivity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 9780-9789, 2008b;

STEPHEN, P. H. A.; COOPER, J.; SHINE, J.; HILL, S. J. Characterization of the human brain putative A2b adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, p. 1286-1290, 1996;

SUN, C. X. et al. Role of A2B adenosine receptor signaling in adenosine-dependent pulmonary inflammation and injury. **J. Clin. Invest.**, 116, 2173-2182, 2006;

SWAMIDASS, S. J. Mining small-molecule screens to repurpose drugs. **Briefings in bioinformatics.**, v. 12, n. 4, p. 327-335, 2011;

TABRIZI, M. A. et al. 1,3-Dipropyl-8-(1-phenylacetamide-1H-pyrazol-3-yl)-xanthine derivatives as highly potent and selective human A(2B) adenosine receptor antagonists. **Bioorg Med Chem.**, v. 16, p.2419–2430, 2008;

TALETE. **User Manual Mobydigs version 1.0**; Copyriht: Italy, 2004;

TALETE. **User Manual Dragon version 5.5**; Copyriht: Italy, 2007;

THAKUR, M.; THAKUR, A.; BALASUBRAMANIAN, K. QSAR and SAR studies on the reduction of some aromatic nitro compounds by xanthine oxidase. **J. Chem. Inf. Model**, v. 46, p. 103-110, 2006;

THOMKE, S.; HIPPEL, E. V.; FRANKE, R. Modes of experimentation: an innovation process – and competitive – variable. **Research policy**, v. 27, p. 315-332, 1998;

THOMPSON, R. D. et al. N6, 9-disubstituted adenines: potent, selectie antagonists at the A1 adenosine receptor. **J. Med. Chem.**, v. 34, p. 2877-2882, 1991;

TODESCHINI, R., CONSONNI, V., Mauri, A. and PAVAN, M. Detecting "bad" regression models: multicriteria fitness functions in regression analysis. **Anal. Chim. Acta.**, v. 515, 199-208, 2004;

TODESCHINI, R., CONSONNI, V., MAIOCCHI, A. The K correlation index theory development and its application in chemometrics. Chemom. **Intell. Lab. Syst.**, v. 46, p. 13-29, 1999;

TONG, W. Assessment of prediction confidence and domain extrapolation of two structure-activity relationship models for predicting estrogen receptor binding activity. **Toxicogenomics**, v. 112, n. 12, 2004;

TONG, W. et al. Evaluation of quantitative structure-activity relationship methods for large-scale prediction of chemical binding to the estrogen receptor. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 38, p. 669-677, 1998;

TOWNES, T. M. Gene replacement therapy for sickle cell disease and other blood disorders. **Current and Future Therapies of Sickle Cell Anemia**, v. 1, n. 1, p. 193-196, 2008;

TROPSHA, A.; GRAMATICA, P.; GOMBAR, V. K. The importance of being earnest: validation is the absolute essential for successful application and interpretation of QSPR models. **QSAR Comb. Sci.**, v. 22, p. 69, 2003;

TSINOPOULOS, C.; MCCARTHY, I. An evolutionary classification of the strategies for drug discovery. Disponível em: <http://www.ifm.eng.cam.ac.uk/mcn/pdf_files/part7_2.pdf>. Acesso em: 01/02/2012;

VALADARES, N. F.; CASTILHO, M. S.; POLIKARPOV, I.; GARRAT, R. C. 2D QSAR studies on thyroid hormone receptor ligands. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 4609-4617, 2007;

VRTACNIK, M.; VODA, K. HQSAR and CoMFA approaches in predicting reactivity of halogenated compounds with hydroxyl radicals. **Chemosphere**, v. 52, p. 1689-1699, 2003;

XAUS, J.; et al. Adenosine inhibits macrophage colony-stimulating factor-dependent proliferation of macrophages through the induction of p27 kip-1 expression. **J. Immunol.** v. 163, p. 4140-4149, 1999;

XIA, Y. Molecular basis of cardiovascular diseases. Disponível em: <<http://www.uth.tmc.edu/bmb/faculty/yang-xia.html>>. Acesso em: 10/12/2011.

XUSHU, Y. et al. Holographic quantitative structure-activity relationship for prediction of the toxicity of polybrominated diphenyl ether congeners. **Sci. China Ser B-Chem.**, v. 52, n. 12, p. 2342-2350, 2009;

YAN, L et al. A new synthesis of sulfonamides by aminolysis of p-nitrophenylsulfonates yielding potent and selective adenosine A2b receptor antagonists. **J. med. Chem.**, v. 49, p. 4384-4391, 2006;

ZHANG, Y. et al. DETRIMENTAL EFFECTS OF ADENOSINE SIGNALING IN SICKLE CELL DISEASE. **Nature Medicine**, v. 17 n.1, p. 79-86, 2010;

WALLACE, K. L.; LINDEN, J. Adenosine A2A receptor induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury mice with sickle cell disease. *Blood*, 2010. Disponível em < <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/>> acesso em 17/05/2011;

WANG, X.; TANG, S.; LIU, S.; CUI, S.; WANG, L. Molecular hologram derived quantitative structure-property relationships to predict physico-chemical properties of polychlorinated biphenyls. **Chemosphere**, v. 51, p. 617-632, 2003;

WARREN, G. L. et al. A critical assessment of docking programs and scoring functions. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 5912-5931, 2006;

WEBB, T. R. et al. A. Quinazoline as adenosine receptor antagonists: SAR and Selectivity for A2b receptors. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 11, p. 77-85, 2003;

WEBB, T. R. et al. The utilization of a unified pharmacophore query in the discovery of new antagonists of the adenosine receptor family. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 10, p. 31-34, 2000;

WEN, J.; et al. Increased adenosine contributes to penile fibrosis, a dangerous feature of priapism, via A2b adenosine receptor signaling. **FASEB J.**, v. 24, p. 740-749, 2010;

WEATHERAL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the world health organization**, v. 79, p. 704-712, 2001;

WU, L. C.; et al. Correction of sickle cell disease by homologous recombination in embryonic stem cells. **Blood**, v. 108, n. 4, p. 1183-1188, 2006;

ZHANG, H.; LI, H.; LIU, C. CoMFA, CoMSIA, and molecular hologram QSAR studies of novel neuronal nAChRs ligands-open ring analogues of 3-pyridyl ether. **J. Chem. Inf. Model**, v. 45, p. 440-448, 2005;

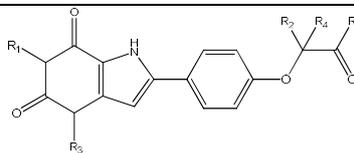
ZHANG, L. et al. Quantitative high-throughput drug screening identifies novel classes of drugs with anticancer activity in thyroid cancer cells: Opportunities for repurposing. **J. Clin. Endocrin. Metab.**, v. 97, n. 3, p. 1-10, 2011;

ZHONG, H.; BELARDINELLI, L.; MAA, T.; ZENG, D. Synergy between A2b adenosine receptors and hypoxia in activating human lung fibroblasts. **Am. J. Respir. Cell Mol Biol.**, v. 32, p. 2-8, 2005.

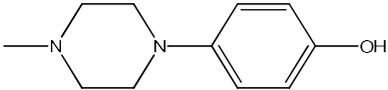
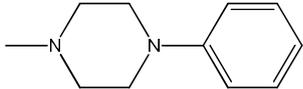
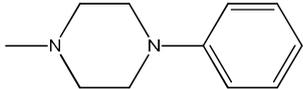
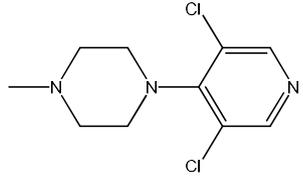
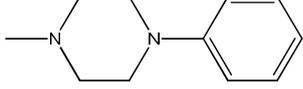
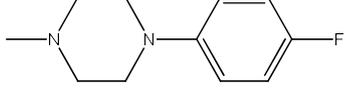
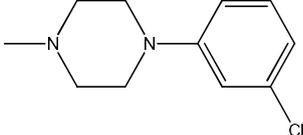
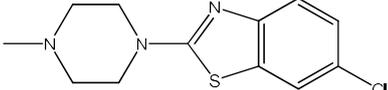
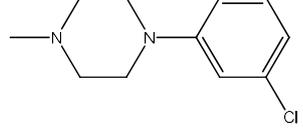
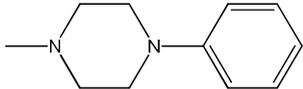
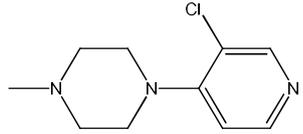
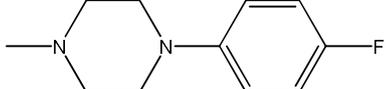
ANEXO

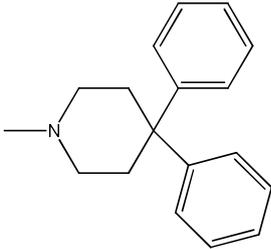
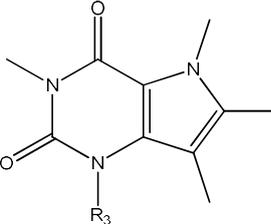
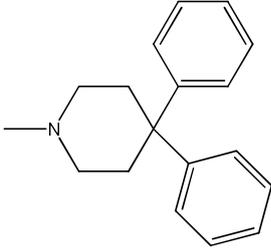
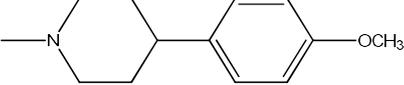
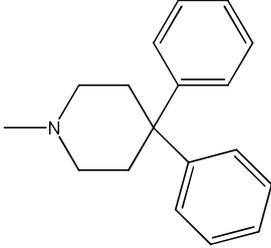
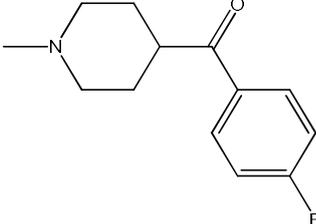
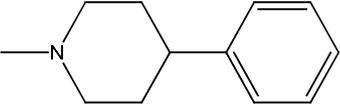
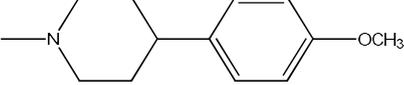
Estrutura química dos derivados de xantina usados para o estudo de HQSAR e CoMFA.

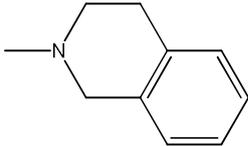
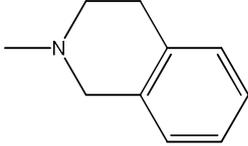
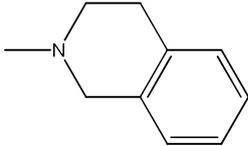
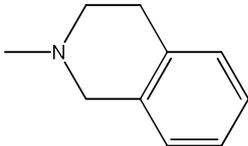
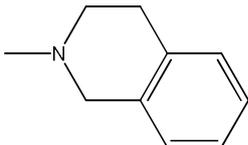
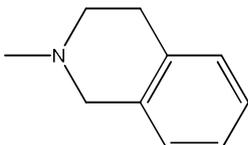
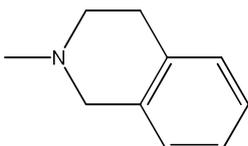
Conjunto treino

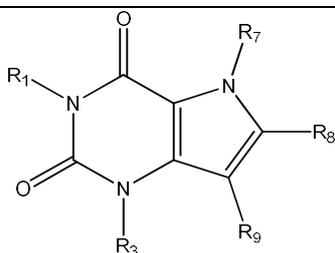


Cpd	R ₁ /R ₂	R ₂ /R ₄	R ₅	Y	pKi
1	Me/Me	H/H		H	8,47
2	Me/Me	H/H		H	8,46
3	Me/Me	H/H		H	8,38
4	Me/Me	H/H		H	8,28
5	Me/Me	H/H		H	8,20
6	Me/Me	H/H		H	8,20
7	Me/Me	H/H		H	8,15
8	Me/Me	CH ₃ /H		H	8,09
9	Me/Me	H/H		H	8,02
10	Me/Me	H/H		H	7,96

11	Me/Me	H/H		H	7,56
12	Pr/Pr	H/H		H	8,32
13	Pr/Pr	CH ₃ /H		H	8,18
14	Pr/Pr	H/H		H	8,12
15	Pr/Pr	CH ₃ /CH ₃		H	7,61
16	CH ₃ /Pr	H/H		H	8,37
17	CH ₃ OCH ₂ /CH ₃ OCH ₂ C H ₂	H/H		H	8,31
18	Me/Pr	H/H		H	8,24
19	Me/Pr	H/H		H	8,22
20	Pr/Me	H/H		H	7,88
21	Me/Pr	H/H		H	7,83
22	Me/Pr	H/H		H	7,82

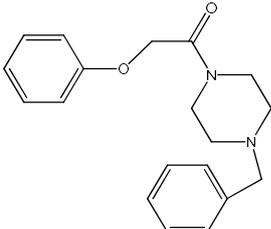
23	Me/Pr	H/H		H	7,59
24	CH ₃ /Pr	H/H		H	8,59
25	Me/Pr	H/H		H	8,25
26	Me/Pr	H/H		H	8,04
27	Me/Me	H/H		H	8,02
28	Me/Me	H/H		H	7,95
29	Me/Me	H/H		H	7,91
30	Me/Me	H/H		<i>m</i> -OCH ₃	7,51

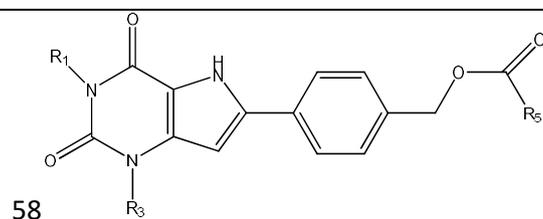
31	Pr/Pr	H/H		H	8,64
32	Pr/Pr	H/H		H	8,33
33	Me/Pr	H/H		H	8,14
34	Me/Me	H/H		H	8,06
35	Me/Pr	H/H		H	7,84
36	Me/Me	H/H		<i>o</i> -OCH ₃	7,36
37	Me/Me	H/H		<i>m</i> -OCH ₃	6,77

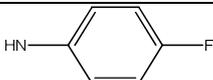


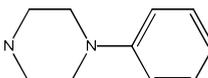
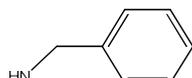
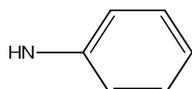
Cpd	R ₁	R ₃	R ₇	R ₉	R ₈	pKi
38	Me	Me	H	H	C ₆ H ₅	6,74
39	Me	Me	OH	H	C ₆ H ₅	5,78
40	Me	Me	H	H	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	6,34

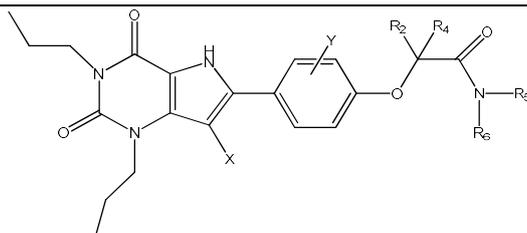
41	Me	Me	OH	H	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	5,65
42	Me	Me	H	OH	4-CH ₃ SO ₂ -C ₆ H ₄	7,17
43	Pr	Pr	OH	H	C ₆ H ₅	6,17
44	Pr	Pr	H	OH	C ₆ H ₅	7,27
45	Pr	Pr	OH	H	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	6,23
46	Pr	Pr	H	OH	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	7,05
47	Pr	Pr	H	H	4-NH ₂ -C ₆ H ₄	8,05
48	Pr	Pr	H	OH	4-NH ₂ -C ₆ H ₄	7,72
49	Pr	Pr	H	H	4-OH-C ₆ H ₄	7,36
50	Pr	Pr	OH	H	4-OH-C ₆ H ₄	6,94
51	Pr	Pr	OH	H	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	6,32
52	Pr	Pr	H	OH	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	7,30
53	Pr	Me	H	OH	4-CH ₃ SO ₂ -C ₆ H ₄	7,19
54	Pr	Pr	H	OH	2-Furil	7,64
55	Pr	Pr	H	OH	4-COOH-C ₆ H ₄	6,47
56	Pr	Pr	H	OSO ₃ H	2-Furil	7,46

57	Pr	Pr	H	OH		8,59
----	----	----	---	----	---	------



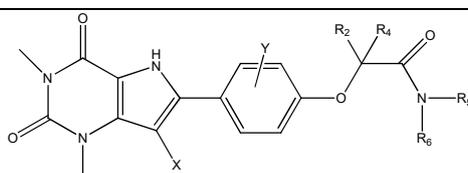
Cpd	R ₁	R ₃	R ₅	pK _i
58	Me	Me		8,02

59	Me	Me		7,94
60	Me	Me		7,79
61	Pr	Me		7,86

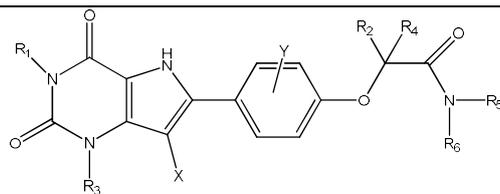


Cpd	X	Y	R ₂ /R ₄	R ₅ /R ₆	pK _i
62	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4Br	8,66
63	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4Cl	8,50
64	H	H	Me/H	H/C ₆ H ₄ -4F	8,49
65	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4F	8,48
66	H	H	Me/H	H/C ₆ H ₅	8,29
67	H	H	Me/H	H/C ₆ H ₄ -OMe	8,29
68	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4OCF ₃	8,16
69	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CH ₂ SO ₂ NC ₄ H ₈	8,11
70	H	H	Me/Me	H/C ₆ H ₄	8,10
71	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄	8,03
72	H	H	Et/H	H/C ₆ H ₄	8,01
73	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4OMe	7,92
74	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ CONH(CH ₂) ₂ -C ₆ H ₄ -4OMe	7,91
75	Br	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4F	7,90
76	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4Me	7,85
77	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4SO ₂ C ₆ H ₅	7,76
78	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -2OH	7,72

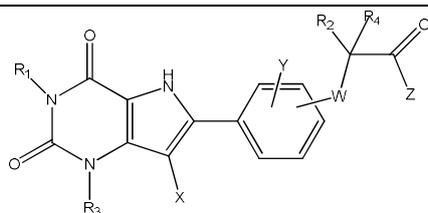
79	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4I	7,71
80	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4Cl	7,64
81	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4Br	7,61
82	Br	H	H/H	H/C ₆ H ₅	7,61
83	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CONH ₂	7,60
84	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4F	7,56
85	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4-4,4-dimetil-4,5-dihidro-1,3-oxazol-2-il	7,46
86	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₅	7,43
87	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4COOEt	7,25
88	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -3F	7,22
89	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4COC ₆ H ₅	7,11
90	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -2F	6,85



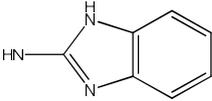
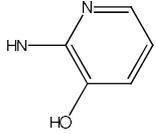
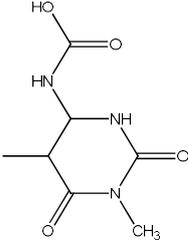
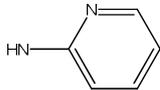
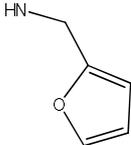
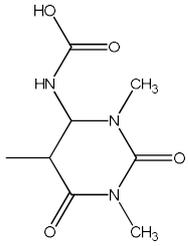
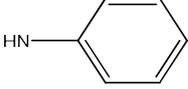
Cpd	X	Y	R ₂ /R ₄	R ₅ /R ₆	pKi
91	H	H	Me/H	H/C ₆ H ₄ -4Br	8,81
92	H	H	Me/H	H/C ₆ H ₅	8,32
93	H	H	H/H	H/C ₆ H ₅	7,96
94	H	<i>o</i> -OMe	H/H	H/C ₆ H ₄ -4F	7,60
95	H	<i>m</i> -OMe	H/H	H/C ₆ H ₄ -4Br	7,41
96	H	H	H/H	H/-c. C ₅ H ₁₁	7,10
97	H	<i>m</i> -OMe	H/H	H/C ₆ H ₄ -4F	6,83
98	H	<i>m</i> -OMe	H/H	H/C ₆ H ₅	6,73
99	H	H	H/H	H/CH ₂ CH ₂ NH ₂	6,73
100	H	<i>m</i> -OMe	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CN	6,67



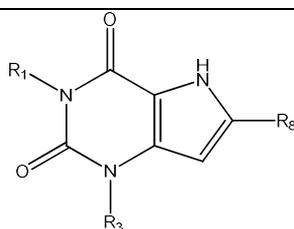
Cpd	R ₁ /R ₃	X	Y	R ₂ /R ₄	R ₅ /R ₆	pK _i
101	Pr/Me	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4I	8,23
102	Et/Et	H	H	H/H	H/C ₆ H ₅	8,11
103	Me/Pr	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4F	8,02
104	Me/MeOPr	H	H	H/H	H/C ₆ H ₅	7,86
105	Pr/Me	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CH ₂ COOEt	6,88
106	Pr/Pr	H	H	Me/H	H/CH ₂ C ₆ H ₄ -4Cl	8,39
107	Me/Me	H	H	H/H	H/CH(Me)C ₆ H ₅	7,56
108	Me/Me	H	H	H/H	H/CH ₂ C ₆ H ₅	7,29
109	Me/Me	H	H		Me/CH ₂ C ₆ H ₅	7,26
110	Me/Me	H	<i>o</i> -OMe	H/H	H/CH ₂ C ₆ H ₄ -4Cl	6,91
111	Pr/Pr	Cl	H	H/H	H/CH ₂ C ₆ H ₅ -4F	6,76



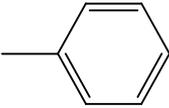
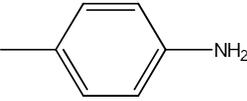
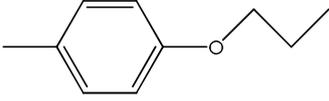
Cpd	R ₁ /R ₃	X	Y	W	R ₂ /R ₄	Z	pK _i
112	Pr/Pr	H	H	4-O-	H/H		7,97
113	Pr/Pr	H	H	4-O-	H/H		7,96
114	Pr/Pr	H	H	4-O-	H/H		7,90

115	Me/Me	H	H	4-O-	H/H		7,70
116	Pr/Pr	H	H	4-O-	H/H		7,68
117	Pr/Pr	H	H	4-O-	H/H		7,66
118	Pr/Pr	H	H	4-O-	H/H		7,57
119	Me/Me	H	H	3-O-	H/H		7,35
120	Me/Me	H	H	4-O-	H/H		7,15
121	Pr/Pr	H	H	4-O-	H/H		7,00
122	Me/Me	H	H	3-O-	H/H		6,78
123	Pr/Me	H	H	4-O-	H/H	OH	7,36
124	Et/Me OPr	H	H	4-O-	H/H	OEt	7,18
125	Pr/Pr	Br	H	4-O-	H/H	OH	7,10
126	Me/Me	H	H	4-O-	H/H	OH	6,91
127	Me/Me OPr	H	H	4-O-	H/H	OH	6,67

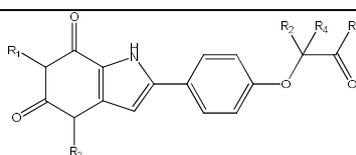
128	Me/Me	H	<i>m</i> -OMe	4-O-	H/H	OH	6,57
129	Me/Me	H	H	4-O-	H/H	OEt	6,54
130	Me/Me OPr	H	H	4-O-	H/H	OEt	6,43
131	Me/Me	H	<i>m</i> -OMe	4-O-	H/H	OEt	5,82
132	Me/Me	H	<i>o</i> -OMe	4-O-	H/H	OH	5,81

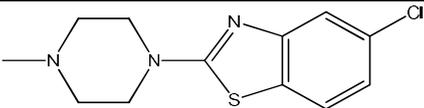
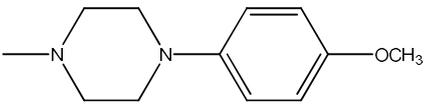
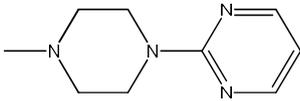
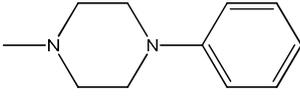
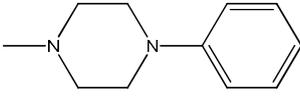
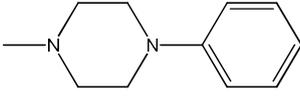
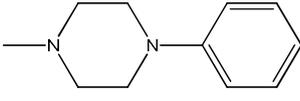
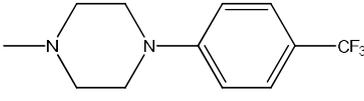


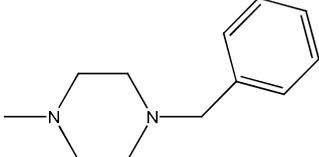
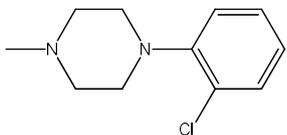
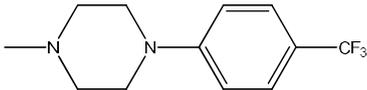
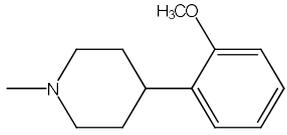
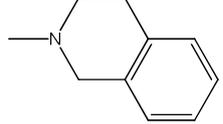
Cpd	R ₁ /R ₃	R ₈	pKi
133	Me/Me		6,74
134	Me/Me		7,16
135	Me/Me		7,00
136	Me/Me		7,14
137	Me/Me		7,41
138	Me/Me		6,73

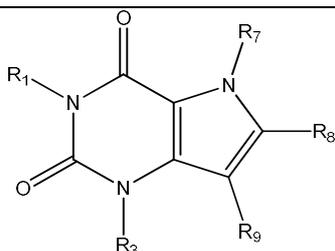
139	Pr/Pr		6,64
140	Pr/Pr		7,78
141	Pr/Pr		6,79

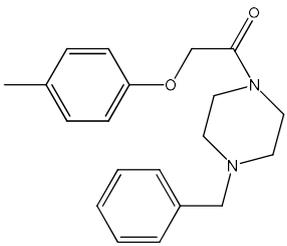
CONJUNTO TESTE

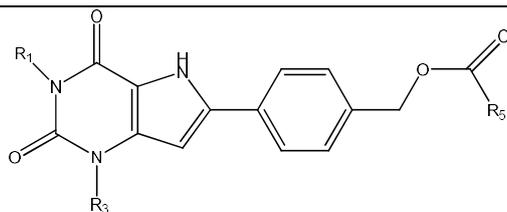


Cpd	R ₁ /R ₂	R ₂ /R ₄	R ₅	Y	pK _i
142	Me/Me	H/H		H	8,44
143	Me/Me	H/H		H	7,88
144	Me/Me	H/H		H	7,87
145	Me/Me	Me/H		H	7,69
146	Me/Me	Me/Me		H	7,50
147	Me/Me	H/H		<i>o</i> -OCH ₃	7,49
148	Me/Me	H/H		<i>m</i> -OCH ₃	7,24
149	Pr/Pr	H/H		H	8,38

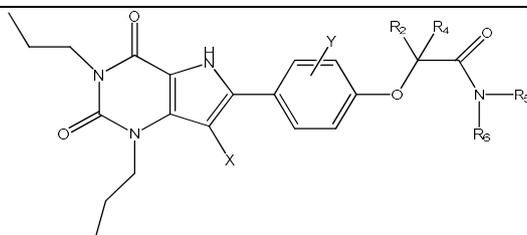
150	Pr/Pr	H/H		H	8,21
151	Pr/Pr	H/H		H	8,16
152	Me/Pr	H/H		H	8,69
153	Me/Pr	H/H		H	8,21
154	Cipropil CH ₂ /cipr opil-CH ₂	H/H		H	8,02



Cpd	R ₁ /R ₃	R ₇ /R ₉	R ₈	pKi
155	Me/Me	H/OH	C ₆ H ₅	6,54
156	Me/Me	H/OH	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	6,29
157	Pr/Pr	H/H	C ₆ H ₅	6,64
158	Pr/Pr	H/H	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	6,70
160	Pr/Pr	H/OH	4-CH ₃ O-C ₆ H ₄	7,15
161	Pr/Pr	H/H		8,21

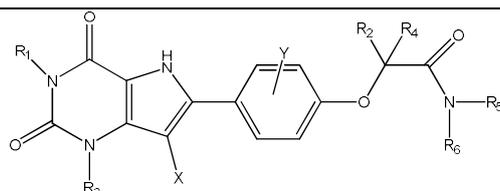


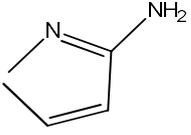
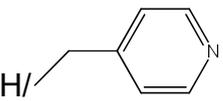
Cpd	R1/R3	R5	pKi
162	Me/Me		7,09
163	Pr/Pr		8,15
164	Pr/Pr		8,7
165	Pr/Pr		7,62

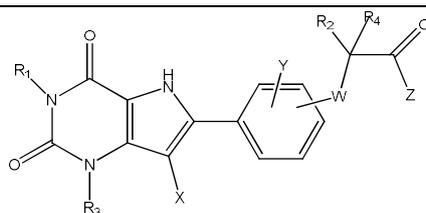


Cpd	X	Y	R2/R4	R5/R6	pKi
166	H	H	Me/Me	H/C ₆ H ₄ -4F	8,05
167	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CH ₂ CN	7,95
168	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -C ₆ H ₅	7,79
169	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4Me	7,73
170	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4COMe	7,70
171	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4OMe	7,56
172	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CH ₂ COOH	7,47
173	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CH ₂ COOEt	7,22

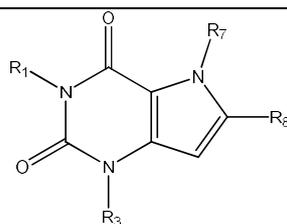
174	Cl	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -2Cl	7,08
175	H	H	Me/H	H/C ₆ H ₄ -4F	8,41
176	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4NO ₂	8,16
177	H	H	H/H	H/indan-lil	7,65
178	H	<i>o</i> -OMe	H/H	H/C ₆ H ₅	7,15



Cpd	R ₁ /R ₃	X	Y	R ₂ /R ₄	R ₅ /R ₆	<i>pKi</i>
179	Pr/Me	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4F	8,25
180	Pr/Me	H	H	H/H	H/C ₆ H ₅	7,91
181	Et/Et	H	H	H/H	H/C ₆ H ₄ -4CN	7,87
18	Me/Pr	H	H	H/H	H/C ₆ H ₅	7,67
182	Pr/Me	H	H	H/H	H/CH ₂ C ₆ H ₄ -4Cl	7,69
183	Me/Me	H	H	H/H	Et/CH ₂ C ₆ H ₅	7,37
184	Me/Me	H	H	H/H	H/CH ₂ C ₆ H ₄ -3OMe	7,29
185	Pr/Pr	Cl	H	H/H	H/CH ₂ C ₆ H ₅	7,08
186	Me/Me	H	<i>m</i> -OMe	H/H	H/CH ₂ C ₆ H ₅ -4Cl	6,73
187	Pr/Pr	H	H	H/H		7,77
188	Pr/Pr	H	H	H/H		7,55



Cpd	R ₁ /R ₃	X	Y	W	R ₂ /R ₄	Z	pKi
189	Pr/Pr	H	H	4-O-	Me/H	OH	7,36
190	Me/Pr	H	H	4-O-	H/H	OH	7,34
191	Et/MeOPr	H	H	4-O-	H/H	OH	7,14
192	Pr/Pr	Cl	H	4-O-	H/H	OH	6,80
193	Me/Me	H	<i>o</i> -OMe	4-O-	H/H	OEt	5,66



Cpd	R ₁ /R ₃	R ₇	R ₈	pKi
194	Me/Me	H		7,24
195	Pr/Pr	OH		6,17