



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



ODAILSON SANTOS PAZ

**TRIAGEM *in silico* E AVALIAÇÃO *in vitro* DE COMPOSTOS
ANTIFALCIZANTES**

Feira de Santana, BA

2017

ODAILSON SANTOS PAZ

**TRIAGEM *in silico* E AVALIAÇÃO *in vitro* DE COMPOSTOS
ANTIFALCIZANTES**

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho

Feira de Santana, BA

2017

Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado

P368

Paz, Odailson Santos

Triagem *in silico* e avaliação *in vitro* de compostos antifalcizantes
/Odailson Santos Paz. -- 2017.

88 f. : il

Orientador: Marcelo Santos Castilho.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2017.

1. Anemia Falciforme - Tratamento. 2. RA2B - Inibidores.
I. Castilho, Marcelo Santos, orient. II. Universidade Estadual de Feira
de Santana. III. Título

CDU: 57.08

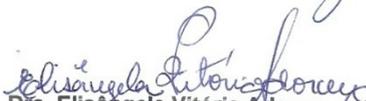
BANCA EXAMINADORA



Dr. Rafael Victorio Carvalho Guido
(Universidade de São Paulo)



Dra. Marilda de Souza Gonçalves
(Universidade Federal da Bahia)



Dra. Elisângela Vitória Adorno
(Universidade Federal da Bahia)



Dra. Milena Botelho Pereira Soares
(Fundação Oswaldo Cruz da Bahia)



Dr. Marcelo Santos Castilho
(Universidade Federal da Bahia)
Orientador e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA
2017**

A Deus,
minha fonte de força e sabedoria.

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

Ao meu avô
José Cardoso (em memória),
que em vida já profetizava
“ô filhinho, o netim do vô vai ser doutor”

AGRADECIMENTO

Ninguém disse que seria fácil, mas eu tenho certeza que se eu não tivesse a contribuição daqueles que foram surgindo ao longo do desenvolvimento desta pesquisa, tudo seria ainda mais difícil. Por isso, não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

O meu primeiro agradecimento vai para meu orientador, Professor Dr. Marcelo Castilho, pelo apoio científico, dado desde a iniciação científica. Não poderia deixar de reconhecer a confiança que depositou em mim, o seu empenho e sua disponibilidade. Pelas constantes cobranças misturadas a incentivos que, com certeza, foram essenciais para meu desenvolvimento.

Ao Dr. Reginaldo Mato que me permitiu realizar os primeiros ensaios biológicos em seu laboratório.

Ao Professor Dr. Ramon pela ideia que foi providencial.

Agradeço também, ao pessoal do Laboratório de Pesquisa em Anemia, em especial à Professora Dra. Marilda e à Jean Tadeu por todo apoio incansável. Muito obrigado.

Meus agradecimentos ao pessoal do LACTFAR, em especial a Leidinha pelo apoio.

Agradeço a Faculdade Maria Milza, através do PROINC, ao Professor Dr. Robson e as alunas de iniciação científica Milena de Jesus e Jade Graziela pelas contribuições no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a secretaria de saúde de Cruz das Almas e a Coordenadora da atenção básica Letícia pelo apoio incondicional.

Meus agradecimentos ao PPGBIOTEC e à Helton, sempre muito solícito.

Expresso os meus agradecimentos aos colegas do LABIMM, em especial à Thamires, Camila e Barbará pelo apoio científico e humano.

A todos o meu sincero obrigado.

“Se avexe não...
Amanhã pode acontecer tudo
Inclusive nada.”
(A natureza das coisas – Accioly Neto)

RESUMO

Os receptores de adenosina são considerados como alvos potenciais para o desenvolvimento de fármacos contra diferentes patologias por estarem envolvidos em diversas vias fisiológicas. Devido ao papel dos receptores de adenosina do subtipo 2B (RA2B) no processo de falcização de hemácias, antagonistas capazes de bloquear RA2B podem ser compostos protótipos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas para o tratamento de pacientes com anemia falciforme. Diante desse cenário, o objetivo desse trabalho foi identificar agentes antifalcizantes capazes de antagonizar a atividade do RA2B. Para alcançar esse objetivo foi construído um modelo farmacofórico (modelo 04 - 3 características acceptor e 1 doador de ligação de hidrogênio e 3 centros hidrofóbicos) que é capaz de diferenciar ligantes verdadeiros de falso-positivos (área sob a curva ROC= 0,94) e classificar antagonistas de RA2B, não utilizados na calibração do modelo, quanto as suas atividades biológicas (pK_i = 7,5-9,3 (alta potência), 5,5-7,4 (potência intermediária) e 5,4-4,0 (baixa potência)). Esse modelo farmacofórico permitiu a seleção de 33 compostos *lead like* do banco de dados ZINC *database* para avaliação biológica, dos quais 12 apresentaram atividade antifalcizante. Testes *in vitro* com um agonista (NECA) e um antagonista de RA2B (MRS1754), sugerem que a atividade antifalcizante está relacionada a modulação de RA2B. Os compostos Z1139491704 (pEC_{50} = 7,77±0,17), Z168278894 (pEC_{50} = 7,64±0,09) e Z847449186 (pEC_{50} = 7,66±0,21) possuem atividade antifalcizante superior ao MRS1754 (pEC_{50} =7,63±0,12) e não apresentam atividade citotóxica em concentrações micromolares. Dessa forma, pode-se concluir que a estratégia *in silico* utilizada logrou sucesso em identificar compostos com provável ação antagonistas de RA2B que podem ser considerados como protótipos para o desenvolvimento de fármacos úteis no tratamento de pacientes com anemia falciforme.

Palavras-chaves: Anemia falciforme; RA2B; Modelo Farmacofórico; Ensaio virtual; Agente Antifalcizante

ABSTRACT

Adenosine receptors are considered as potential targets for the development of drugs against different pathologies because they are involved in several physiological pathways. Due to the role of adenosine receptors of subtype 2B (RA2B) in the process of sickling cell, antagonists capable of blocking RA2B may be lead compounds for the development of new therapeutic alternatives to treatment of patients with sickle cell anemia. Then, the objective of this work was to identify anti-sickle cell agents capable of blocking RA2B activity. To achieve this goal, was built a pharmacophore model (model 04) capable of differentiating true ligands false-positive (area under the ROC curve = 0.94) and to classify RA2B antagonists, not used in the calibration of the model, regarding their Biological activities $pK_i = 7.5-9.3$ (high potency), 5.5-7.4 (intermediate potency) and 5.4-4.0 (low potency). This pharmacophore model allowed the selection of 33 lead-like compounds from the ZINC database, between them 12 compounds presented anti-sickle cell activity. In vitro cell assay with an agonist (NECA) and a RA2B antagonist (MRS1754), suggest that the anti-sickle cell activity is related to modulation of RA2B. Compounds Z1139491704 ($pEC_{50} = 7,77 \pm 0,17$), Z168278894 ($pEC_{50} = 7,64 \pm 0,09$) e Z847449186 ($pEC_{50} = 7,66 \pm 0,21$) have anti-sickling activity Higher than MRS1754 ($pEC_{50} = 7,63 \pm 0,12$) and do not present cytotoxic activity at micromolar range. In sum, it can be concluded that the *in silico* strategy used succeeded in identifying compounds with probable action antagonists of RA2B that can be considered as prototypes for the development of drugs useful in the treatment of patients with sickle cell anemia.

Keywords: Sickle cell anemia; RA2B; Pharmacophore model; Virtual screening; Anti-sickling Agent.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1. 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.....21
- Figura 2. 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 está colorido em amarelo. Resíduos idênticos são coloridos em cinza, enquanto resíduos parcialmente idênticos em A2b e A2a são coloridos em rosa.....22
- Figura 3. Compostos da classe das xantinas.....25
- Figura 4. Derivados de xantina substituídos na posição 8.25
- Figura 5. Esqueleto molecular dos derivados de 9-deazaxantina (Pirrol[2,3-d]pirimidina-2,4-diol).....26
- Figura 6. Derivado de quinazolina. *CMB6446= 4-metil-7-metoxiquinazolil-2-(2'-amino-4' imidazolinona), atividade biológica RA2b, K_i = 112nM; RA2a, K_i = 2,4nM; RA1, K_i = 1,3nM.26
- Figura 7. Derivado de triazol pirimidínicos substituído na posição 8.....27
- Figura 8. Estrutura química de compostos derivados de aminopiridina e aminopirimidina com seus valores afinidade pelos RA.28
- Figura 9. Estrutura química de derivados triazoltriazina. LUF5452. RA2B, K_i =9,9nM; RA2A, K_i =5.4nM; RA1, K_i =7.1nM; RA3=1450nM.....30
- Figura 10. Estrutura química da pentoxifilina30
- Figura 11. Análise da conformidade entre os critérios de sobreposição farmacofórica (MOL_QRY e HBOND). ▲ = modelos selecionados para a etapa de avaliação; ● = modelos com dissonância entre os critérios de sobreposição farmacofórica ou baixo valor de MOL_QRY.....43
- Figura 12. Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos gerados a partir de antagonistas do RA2B. AUC, área sob a curva.....45
- Figura 13. Relação entre ajuste farmacofórico (MOL_QRY) e atividade biológica relativa.....46

Figura 14. Características farmacofóricas do modelo de antagonista RA2B. (A) AA = aceptor de ligação de hidrogênio; DA = doador de ligação de hidrogênio; HY = centro hidrofóbico. Todas as distâncias são dadas em angstrom e o tamanho das esferas variam de acordo com o raio de tolerância. (B) Sobreposição de antagonistas conhecidos de RA2B de baixa potência ($pK_i=4,0$) e alta ($pK_i=9,0$) afinidade.47

Figura 15. Similaridade química dos 88 compostos selecionados com o modelo 4, segundo análise hierárquica de agrupamentos usando distância euclidiana, método de união pelo vizinho mais distante e descritores calculados com auxílio do servidor NP-ChemGPS (<http://chemgps.bmc.uu.se/batchelor/queue.php?show=submit>).50

Figura 16. Falcização de hemácias de pacientes portadores de anemia falciforme em função do tempo, na presença de metabisulfito de sódio 2% a 37°C. Os dados foram apresentados como média \pm DPM (desvio padrão da média) de 5 amostras de 5 pacientes. # Indica diferença significativa $P < 0,0001$ (8 horas vs 10 horas) e ## $P < 0,0001$ (10 horas vs 12 horas), segundo ANOVA unidirecional (teste de Tukey). ..53

Figura 17. Avaliação dos compostos com potencial antifalcizante.....54

Figura 18. Curva concentração resposta aos compostos identificados na triagem biológica. Dados são apresentados como média \pm DPM de 5 amostras de 5 pacientes.....55

Figura 19. Estrutura química dos compostos derivados do benzodioxol e seus respectivos valores de atividade antifalcemia. Os compostos que não apresentaram atividade antifalcemia maior que 50% nos testes de dose única e que não tiveram os valores de pEC_{50} definidos foram considerados inativos.59

Figura 20. Curva concentração resposta ao NECA na ausência ou presença de compostos identificados na triagem biológica. Dados são apresentados como média \pm DPM de 5 amostras de 5 pacientes.61

Figura 21. Gráfico de Schild para os compostos Z1151205940, Z17974526, Z241893728, Z223070016 Z1139491704 e antagonista conhecido MRS1754 frente ao NECA. Dados obtidos de 5 experimentos para cada concentração, com amostras de diferentes pacientes. As barras verticais nos pontos representam o erro padrão da média. [M] é a concentração de cada composto65

Figura 22. Efeito citotóxico de Z17974526 e Z223070016 em células de mamífero. As células de macrófagos J774 foram incubadas com veículo (DMSO a 5% em solução salina, Ct, grupo de controle) ou diferentes concentrações de Z223070016 (100, 50, 25, 12,5 ou 6,25 μ M, painel A) ou Z17974526 (100, 50, 25, 12,5 ou 6,25 μ M) durante 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio Alamar Blue. Utilizou-se violeta de genciana (GV) como controle positivo. Os valores representam as médias \pm SEM de três determinações obtidas em uma das três experiências realizadas. * indica significância das culturas tratadas com veículo ($p < 0,05$). ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.....67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Moléculas utilizadas na construção dos modelos farmacofóricos de antagonista RA2B.	36
Tabela 2. Parâmetros estatísticos dos modelos farmacofóricos para antagonistas RA2B.....	42
Tabela 3. Moléculas adquiridas para ensaios biológicos.	51

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

2D	Bidimensional
2,3-DPG	2,3-difosfoglicerato
3D	Tridimensional
9-Dax	9-deazaxantina
A1	Receptor de adenosina 1
A2	Receptor de adenosina 2
A3	Receptor de adenosina 3
AF	Anemia falciforme
ANOVA	Análise de variância
AUC	Área sob a curva
AVC	Acidente vascular cerebral
CCE	Curva concentração efeito
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DMSO	Dimetil sulfóxido
DPM	Desvio padrão médio
E1F	Esfingosina-1-fosfato
EP	Especificidade
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina F
HbS	Hemoglobina S
HCA	Hierarchical cluster analysis (Análise hierárquica de agrupamento)
HIT	Compostos ativos identificados em triagem biológica
NECA	5-N-etilcarboxiamida adenosina
REA	Relação estrutura atividade
ROC	Receiver Operating Characteristic (Características operacionais do receptor)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Hemácia e seu conteúdo de hemoglobina	18
2.2 Anemia Falciforme	19
2.2.1 Mecanismo bioquímico de formação de polímeros de HbS.....	20
2.3 Receptores de Adenosina 2B (RA2B)	22
2.3.1 Relevância farmacológica de RA2B.....	22
2.3.2. Características estruturais de RA2B.....	23
2.3.3 Antagonistas de RA2B.....	24
2.3 Ensaio Virtual	31
3. METODOLOGIA.....	34
3.1 Geração dos modelos farmacofóricos.....	34
3.1.1 Preparação dos ligantes	34
3.1.2 Modelo farmacofórico para antagonista RA2B	34
3.2 Validação dos modelos farmacofóricos.....	36
3.3 Ensaio virtual baseado em modelo farmacofórico.....	37
3.4 Triagem de agentes antifalcizantes.....	38
3.4.1 Compostos teste e controles	38
3.4.2 Amostra biológica	38
3.4.3 Ensaios antifalcizante	39
3.5 Citotoxicidade para células de mamífero.....	40
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.2 Avaliação dos modelos farmacofóricos	43
4.3 Triagem Virtual baseada nos modelos farmacofóricos.....	48
4.4 Ensaios Antifalcemia	52
4.5 Estudo da relação entre a estrutura química e atividade biológica das moléculas com atividade antifalcizante	57
4.6 ANÁLISES DA LIGAÇÃO COMPETITIVA.....	59
5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA	68
5.1 Conclusão	68

5.1 PERSPECTIVAS.....	68
REFERÊNCIAS.....	70
APÊNDICE.....	83
ANEXO A	86

1. INTRODUÇÃO

Anemia falciforme(AF) é causada por uma mutação,no gene que codifica a cadeia beta da hemoglobina(CURY et al., 2010), que resulta na substituição de um ácido glutâmico por uma valina na posição 6 da cadeia, gerando a hemoglobina S (HbS). Essa substituição tem consequências estruturais na hemoglobina, bem como na sua função biológica:Durante eventos de hipóxia, mudanças conformacionais levam a cadeia lateral hidrofóbica da valina a interagir com bolsões, hidrofóbicos formados pelos resíduos leucina (Leu88) e fenilalanina (Phe85) da hemoglobina adjacente, desencadeando o processo de agregação que culmina da formação de polímero insolúveis (CHIKEZIE; CHIKEZIE; AMARAGBULEM, 2011), os quais precipitam na membrana plasmática promovendo distorção no formato das hemácias e diminuição de sua deformabilidade(BRASIL, 2007; WALLACE; LINDEN, 2010).Devido a sua morfologia alterada, os eritrócitos falciformes podem obstruir arteríolas e pequenos vasos, causando eventos isquêmicos. De fato, crianças com AF têm 300 vezes mais probabilidade de sofrerem AVC que crianças da mesma idade (VERDUZCO; NATHAN, 2009), razão pela qual AVC é a causa de morte mais frequente entre crianças com AF(CHATURVEDI; DEBAUN, 2016). Adicionalmente, portadores de AF podem apresentar síndrome torácica aguda, febre, acidente vascular cerebral, priapismo e úlcera de perna(CHATURVEDI; DEBAUN, 2016; CHIRICO; PIALOUX, 2012; KOHNE, 2011), mesmo quando em acompanhamento médico adequado(DEUS-SILVA et al., 2013; NAOUM, 2000; STEINBERG et al., 2003).

Estimativas apontam que AF é responsável por 28.600 mortes por ano em todo o mundo (MALINOWSKI et al., 2015), sendo que o maior número de pessoas afetadas está na África subsaariana, onde 0,74% dos recém nascidos tem AF e aproximadamente 90% delas vem a óbito antes dos 5 anos(PULE et al., 2016). No Brasil, estima-se que existam mais de 2 milhões de portadores do gene da HbS. Desses, mais de 8.000 apresentam a forma grave de AF e 700-1.000 novos casos são diagnosticados anualmente(BRASIL, 2007; SILVA et al., 2006). A Bahia, em decorrência de sua história de povoamento, é o estado com maior prevalência de AF no país (SILVA et al., 2006) e como consequência disso 1 a cada 650 crianças nascidas nesse estado tem AF(SIMÕES et al., 2010).

Apesar da sua prevalência e da morbimortalidade, muitos dos tratamentos disponíveis para pacientes com AF tem finalidade apenas paliativa (ex. Controle da dor decorrente de eventos vaso-oclusivos com opioides)(SZABO; FLEISHMAN, 2015). Como exemplo de fármaco que age nessa linha pode-se citar: hidroxiuréia (inibidor de ribonucleotídeo redutase), butirato de sódio (inibidor de histona deacetilase), decitabina (agente que promove a hipometilação do DNA) e pomalidomida (análogo da talidomida que promove a eritropoiese) (ATAGA, 2009). Dentre esses medicamentos, a hidroxiuréia apresenta maior impacto na sobrevida dos pacientes portadores de AF, pois reduz o número de crises vaso oclusivas, hospitalizações, tempo de internação e a necessidade de transfusão de sangue bem como o risco de AVC (CANÇADO, 2007). Apesar dos benefícios da hidroxiuréia cerca de 30% dos pacientes tratados com este fármaco não obtém resposta clínica satisfatória (STEINBERG et al., 2003). Além disso, a hidroxiuréia não está isenta de eventos adversos, tais como neutropenia e infertilidade, que podem ocorrer quando doses elevadas são utilizadas (DEBAUN, 2014; MULAKU et al., 2013). Considerando que a associação de fármacos pode ter um efeito sinérgico é possível diminuir as doses necessárias de hidroxiuréia associando-o a outro fármaco(TALLARIDA, 2011). Um exemplo de sucesso dessa estratégia é a combinação de hidroxiuréia com butirato (PERRINE; CUI, 2016).

A transfusão sanguínea também é usada como tratamento preventivo de complicações da anemia falciforme, especialmente em pacientes com síndrome torácica progressiva. Mas essa estratégia terapêutica envolve complicações próprias, tais como aloimunização e sobrecarga de ferro (VERDUZCO; NATHAN, 2009).

Por fim, deve-se destacar que a terapia genética é uma estratégia promissora que corrigiria os defeitos na células tronco hematopoiéticas, mas a implementação dessa técnica é limitada por problemas de instabilidade vetorial (HOBAN; ORKIN; BAUER, 2016). Diante desse cenário, a descoberta de novos fármacos para tratar pacientes com AF é primordial para milhares de pacientes em todo o mundo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

- Identificar compostos protótipos para o desenvolvimento de fármacos com ação antifalcizante

1.1.2 Objetivos Específicos

- Construir modelos farmacofóricos para antagonistas de RA2B;
- Empregar modelos farmacofóricos para seleção de compostos com potencial ação antifalcizante;
- Avaliar *in vitro* compostos selecionados na triagem farmacofórica;
- Investigar o efeito antagonista dos compostos em RA2B;
- Determinar o perfil de citotoxicidade *in vitro* dos compostos mais potentes

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HEMÁCIA E SEU CONTEÚDO DE HEMOGLOBINA

As hemácias, também denominadas eritrócitos ou glóbulos vermelhos, são estruturas anucleadas, flexíveis e com formato bicôncavo, produzidas na medula óssea, elas são constituídas por moléculas de hemoglobina (Hb), cuja principal função é transportar oxigênio e gás carbônico aos tecidos (DIEZ-SILVA et al., 2010; DOS SANTOS; CHIN, 2012). A Hb é uma proteína hidrossolúvel constituída por dois pares de cadeias e de quatro grupos heme (um por cadeia) (GHODEKAR et al., 2010).

O organismo humano sintetiza outros tipos de Hb, em adultos normais a hemácia é formada principalmente de HbA₁, que é composta por duas cadeias alfa (α_2) e duas betas (β_2), enquanto os bebês, ao nascer, têm principalmente HbF, constituída por duas cadeias alfa (α_2) e duas gamas (γ_2) (CANTÚ; PHILIPSEN, 2014; SANKARAN; ORKIN, 2013; THOMAS; LUMB, 2012; WILBER; NIENHUIS; PERSONS, 2011). Entretanto, a concentração de HbF cai para <3-5% quando o bebê chega a idade de 3-5 meses e permanece em <2%, na maioria dos adultos, após 6 meses.¹

Mutações no gene que codifica a cadeia beta da hemoglobina resultam em um grupo de doenças denominadas hemoglobinopatias. Entre as formas anormais de Hb podemos citar: HbC, D, E, S e associações entre Hb S, C ou D, as quais geram respectivamente, HbSC e HbSD (FELIX; SOUZA; RIBEIRO, 2010; JESUS, 2010). Embora essas duas últimas formas estejam associadas a doença falciforme, HbS é a hemoglobinopatia que mais causa danos a seus portadores (KOHNE, 2011), pois essa hemoglobina anormal, na presença de baixas concentrações de oxigênio, tende a polimerizar, provocando modificações morfológicas no eritrócito (forma de foice) (MPIANA et al., 2014). Embora o aumento nos níveis de oxigênio possa reverter esse processo, os danos e alterações químicas na membrana, decorrentes de episódios repetidos de hipóxia, podem resultar em alterações irreversíveis da

¹Concentrações elevadas de HbF estão inversamente relacionadas com AF pois as cadeias γ_2 não favorecem a formação de polímeros (ALLI; OKOH, 2016). Essa observação explica porque recém nascidos não manifestam os sintomas de AF nos cinco ou seis primeiros meses de vida (THOMAS; LUMB, 2012).

hemácia (FISSEHA; KATIYAR, 2012), culminando nos sintomas característicos da anemia falciforme (DIEZ-SILVA et al., 2010).

2.2 ANEMIA FALCIFORME

A anemia falciforme é uma desordem genética autossômica recessiva que afeta a qualidade de vida de homens e mulheres. O maior número de pessoas com essa desordem genética ocorre na região Subsaariana da África, especialmente na Nigéria onde 20 a 30% da população é portadora de HbS (ADEWOYIN; OBIECHE, 2014) e mais de 100.000 crianças nascem com anemia falciforme a cada ano (BUCHANAN et al., 2010). Embora haja uma maior incidência na raça negra, estudos epidemiológicos demonstram a presença de HbS em descendentes da população do mediterrâneo (Gregos e Italianos), Caribe, América Central e do Sul, Arábia e Índia (WATANABE, 2007).

Nas américas 1,1% dos nascidos vivos são portadores da doença e aproximadamente 90.000-100.000 Americanos são afetados por anemia falciforme (CHATURVEDI; DEBAUN, 2016). Esse cenário sugere que AF tem alta importância para a saúde pública, pois impõe uma carga não só sobre a população afetada, mas também sobre a infraestrutura de saúde. De fato, o custo mundial, por ano, estimado com cuidados médicos para pacientes portadores da HbS é superior a 1,1 bilhões de dólares, sendo que a maior parte desse valor (80,5%) está relacionada a pacientes em cuidados hospitalares (KAUF et al., 2009). Nesse sentido, intervenções destinadas a prevenir complicações da AF podem reduzir significativamente a carga econômica decorrente dessa doença (MOHANTY, 2014).

As estratégias de tratamento para pacientes com anemia falciforme são limitadas ao uso profilático de antibióticos para prevenir infecções, manejo da dor, terapia de transfusão e utilização de agente que estimulam a produção de Hb fetal (WALLACE; LINDEN, 2010). Dentre os fármacos que elevam os níveis de HbF, a hidroxiúria tem se demonstrado mais eficiente (CHIKEZIE; CHIKEZIE; AMARAGBULEM, 2011). Esse medicamento foi, inicialmente, planejado para atuar como citostático, utilizado no tratamento da policitemia vera e da leucemia mieloide crônica. Seu mecanismo de ação nos casos de pacientes com anemias falciforme ainda não é totalmente conhecido, mas provavelmente envolve uma alteração na proliferação de

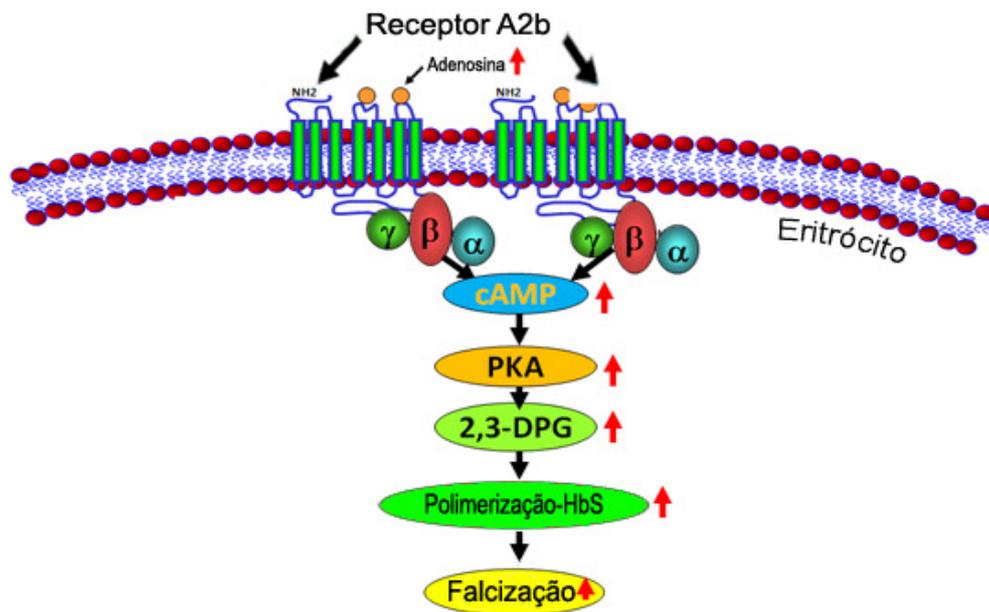
precursores eritróides com consequente aumento da síntese de HbF(VICHINSKY et al., 2012). A hidroxiuréia é atualmente o único medicamento aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para tratamento da anemia falciforme. Ensaios duplo-cego com indivíduos adultos, portadores de anemia falciforme, demonstraram a eficácia da terapia com hidroxiuréia. Os benefícios clínicos incluem redução significativa na frequência de hospitalizações, episódios de dor, síndrome torácica aguda e transfusões de sangue. O uso de hidroxiuréia é um exemplo de intervenção que pode gerar compensações substanciais na qualidade de vida de portadores de anemia falciforme e, conseqüentemente, redução de hospitalizações (MOHANTY, 2014). Embora a hidroxiuréia tenha sido um forma terapêutica eficiente em 40% dos pacientes(DRISCOLL, 2007), em outros esse medicamento causa pronunciados efeitos adversos (SANDHYARANI; KUMAR, 2014), como infertilidade, susceptibilidade a infecções, potencial efeito teratogênico e reações cutâneas. Esses efeitos deletérios, dificultam o uso seguro da hidroxiuréia (PULE et al., 2015).

2.2.1 Mecanismo bioquímico de formação de polímeros de HbS

A polimerização intracelular da desoxihemoglobina (hemoglobina sem oxigênio) é influenciada pela temperatura, acidez, força iônica, concentração intracelular de HbS e de 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG)(CORDOVIL et al., 2015). Foi demonstrado que a concentração de 2,3-DPG tem correlação direta com a modulação de RA2B, pois sua ativação estimula a produção de AMPc intracelular, o qual ativa a proteína quinase A, que por sua vez é responsável por induzir a produção de 2,3-DPG (Figura 1)(ZHANG et al., 2011). Além disso, os RA2B estão envolvidos, também, na síntese de esfingosina-1-fosfato (E1F), um lipídio bioativo indutor da desoxihemoglobina, que é encontrado em altas concentrações em hemácias falciformes. Uma vez que os eritrócitos são os maiores reservatórios de E1F, a hemólise associada a anemia falciforme libera essa molécula no plasma, causando inflamação e lesão tecidual. Assim, E1F atua de forma sinérgica com o 2,3-DPG na redução da afinidade da hemoglobina pelo oxigênio, provocando falcização em cadeia (KAIQI et al., 2013). Portanto, E1F não tem função apenas nas mudanças morfológicas da hemácia, mas também no agravamento da anemia falciforme(ZHANG et al., 2014). Considerando que RA2B é o responsável pela

produção desses metabólitos (2,3-DPG e E1F), esse receptor pode ser considerado como o principal agente iniciador dos sintomas e da progressão da anemia falciforme (SUN et al., 2015).

Figura 1. 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 Zhang et al., 2011.

2.3 RECEPTORES DE ADENOSINA 2B (RA2B)

2.3.1 Relevância farmacológica de RA2B

A adenosina é um nucleosídeo endógeno que modula diversos processos fisiológicos por meio de seus receptores de membrana (HASKO; PACHER, 2012). Quatro subtipos de receptores de adenosina são conhecidos: A1, A2A, A2B, A3 (KATRITCH; KUFAREVA; ABAGYAN, 2011) (Figura 2).

Figura 2. Sequência de alinhamento para os receptores 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-term	TM1	ICL1	TM2	ECL1						
A _{2A}	1	MPIMGSSVYITVELAIAVLAAILGNVLVCMVWVLSNMQNVTVYFVWVSLA	AD	IAVGLFAI	PPFAITISTG	69					
A _{2B}	2	LLETQDALYVALELVIAALSVAGNVLVCAAVGTANTLQTPHYFLVSLA	AD	VAVGVLA	PPFAITISLG	70					
A ₁	4	SISAFQAAYIGIEVLIALVSVPGNVLVIVAVKVNQALREDA	FCF	IVSLAVAD	VAVGALVIPLAILINIG	72					
A ₃	7	ALSLANVTYITMIEIFIGLCAIVGNVLVICVWKLNPSLQTTTFYF	IVSLA	IAD	IAVGVIVWPLAIVVSLG	75					
		TM3	ICL2	TM4							
A _{2A}	70	FCAACHGCLFIACEVVLVLTQSSIFSLIAIDRYIAIRIPLRYNGLV	TRAKGIIA	ICWVLSFAIGL		137					
A _{2B}	71	FCTDFYGCFLFACEVVLVLTQSSIFSLIAVADRYLAICVPLRYKSL	VTRARGVIA	VLVVLA	PGIGL	138					
A ₁	73	PQTYFHTCLMVACEVVLITQSSILALLAIAVDRYLRVKIPLRYX	MVTPRRAAV	AIAGC	WILSFVVG	140					
A ₃	76	ITIHFYSCLMFCLLLLFTHASIMSLLAIAVDRYLRVKLT	VRYKRV	TER	IWLALGLCLVLSFLVGL	143					
		ECL2	TM5								
A _{2A}	138	TPMLGWN-----NCGQPKEGKMHSGGEGEQVACIPE	DVVPMNYM	VYF	FFACVLP	PLLMLGVY	197				
A _{2B}	139	TPFLGWNKDSATNNGTEPWDGTTNESC---	LVKCLFEN	VVPMNSY	MVYF	FFGCVLP	PLLIMLVIY	202			
A ₁	141	TPMFGWN-----NLSAVERAWAANGSMGEPVIKCFE	FKVISMEY	MVYF	FFVWVLP	PLLMLVLIY	200				
A ₃	144	TPMFGWN-----MKLTSEYHRMVTFLSCQFV	VMRDM	YVYF	SFLT	WIFIP	PLVVMCAIY	197			
		ICL3	TM6	ECL3							
A _{2A}	198	LRIFLAARQKQMESQPLPGERARSTLQKEVHA	AKSLAII	VGLFALC	WLP	LIICFTFFC	PDGCS-	263			
A _{2B}	203	IKLFLVACHQLQRTELM----DHSHTTLQREI	HAAKSLA	MI	VGIFALC	WLPVAV	CVTLFQ	PAQK	265		
A ₁	201	LEVFYLRKQLNERVSAS--SGDPQKYGKEL	KIAKSLA	LI	LFLFALS	WLP	LIILNCITL	FCPSCH-	263		
A ₃	198	LDTFYIIRNKLSINLSNS---KETGAFYGR	FKTAKSL	FLVLF	FALS	WLP	LSIILNCI	IYFN---G-	257		
		TM7	C-term								
A _{2A}	264	HAPLWLMYLAIVLSHTNSVVPFIYAYRI	REFRQTF	FKIIRSHVLR	QQEPP	KRANGT	SARVL	324			
A _{2B}	266	NKPKWAMNMAILLSHANSVVVP	PIVYAYR	NRDPR	YTFH	KIISRYLL	QQAD-VK	SGNGQAGVQ	325		
A ₁	264	-KPSILTYIAIFLTNGSAM	PIVYAYF	RIQTR	RVTF	IKIWN	DHFR	CPAPPIDED	IPERP	324	
A ₃	258	EVPQLVLYMGILLSRNSMM	PIVYAY	KIKK	KET	YLLI	LKACV	VCHPS	DSLDT	SIKNS	310

Fonte: CHENG et al., 2010

Até o final da década de 1990, pesquisadores consideravam que os RA2B possuíam pouca relevância fisiológica, por causa da sua baixa afinidade pela adenosina (FEOKTISTOV; BIAGGIONI, 1997). Posteriormente, estudos

demonstraram que diversas vias bioquímicas são ativadas por vias desinibição celular relacionada a esse receptor (FIELD; NATHAN; LINDEN, 2014; KALLA; ZABLOCKI, 2009; ZHANG et al., 2011). Por exemplo: (1) aumento da concentração de cálcio e secreção de íons cloreto nas células intestinais, causando irritação intestinal (SIRCI et al., 2012); (2) aumento na formação e circulação de interleucina cerebral IL-6, que tem sido associada com demências e doença de Alzheimer (SCHIEDEL et al., 2011); (3) super-estimulação de mastócitos, induzindo distúrbios de hipersensibilidade, febre e eczema tóxico (ASANO et al., 2017; GOMEZ, 2013; LIANG et al., 2015). Além disso, foi demonstrado que RA2B modula processos patológicos que levam a doenças pulmonares como a asma (HUA et al., 2013). Outro efeito deletério relacionado com a ativação do RA2B é falcização de eritrócitos, como discutido anteriormente. Vale a pena destacar que hemácias de camundongos deficientes de RAB tem menor capacidade de falcização (HAAS, 2011) e que hemácias humanas deficientes de RA2B são resistentes as mudanças fisiológicas que levam a falcização (FIELD; NATHAN; LINDEN, 2014). Além disso, o bloqueio farmacológico de RA2B parece ser suficiente para inibir a falcização de hemácias (SUN et al., 2015).

Diante dos fatos descritos acima, RA2B pode ser considerado um alvo validado para o desenvolvimento de fármacos que sejam úteis no tratamento de pacientes portadores de AF.

2.3.2. Características estruturais de RA2B

RA2B apresenta sete domínios transmembranares característico dos receptores acoplados a proteína G (BEN et al., 2005). Na segunda alça extracelular de RA2B, onde o ligante endógeno interage, existem dois sítios de N-glicosilação. Embora essa modificação pós-transducional não influencie na interação entre receptor-ligante, ela direciona o receptor para membrana plasmática (PIIRAINEN et al., 2011).

RA2B apresenta quatro resíduos de cisteína na alça extracelular 2 (ECL2), dos quais três (C154, C167, C171) são encontrados também em RA2A (SCHIEDEL et al., 2011). Essa alça é essencial para a ligação do ligante endógeno no RA2B bem como para a função desse receptor (DE FILIPPO et al., 2016; SUN et al., 2011).

Até o momento, a estrutura cristalográfica do RA2B não foi elucidada experimentalmente. Entretanto, RA2B possui elevada semelhança sequencial com RA2A, cuja estrutura 3D é conhecida(CHENG et al., 2010). De fato, modelos por homologia baseados na rodopsina bovina e em RA2A humano são usados para compreender os requisitos estruturais de RA2B (FAROUK; SELIM, 2011; SHERBINY et al., 2009). No entanto, vale a pena destacar que, diferentemente do que é observado para RA2A a adenosina apresenta baixa afinidade por RA2B (SHERBINY et al., 2009). Por isso, acredita-se que esse receptor se mantém silencioso em condições fisiológicas, sendo ativado apenas na presença de níveis elevados de adenosina(EISENSTEIN; PATTERSON; RAVID, 2015).

Já é bem estabelecido que o RA2B é um receptor acoplado a proteína (G_s) e ativa a adenilil ciclase(GODINHO; DUARTE; PACINI, 2015; SUN et al., 2015). A ativação desta via resulta no acúmulo de AMPc e estimula a proteína cinase A, essa proteína fosforila outras proteínas na célula. Outra importante via de sinalização do RA2B é a fosfolipase C através da proteína G_q , que é encontrada em mastócitos (BEN et al., 2005). A ativação desta via resulta no aumento de diacilglicerol e inositol trifosfato. Porém, esse processo de sinalização pode ser inibido por antagonistas metilxantinas endógenos, tal como cafeína (PIIRAINEN et al., 2011).

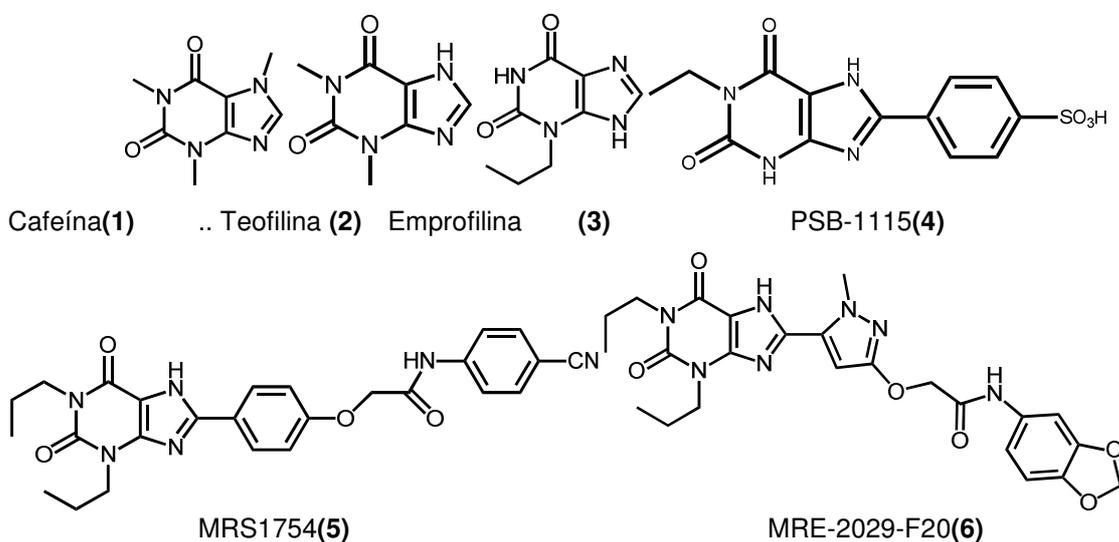
2.3.3 Antagonistas de RA2B

A busca por ligantes de RA2B se fundamenta na observação de que teofilina(**2**) e emprofilina(**3**) (Figura 3), utilizados no tratamento da asma, apresentam afinidade por RA2B (STEFANACHI et al., 2008a). Em decorrência disso, a maioria das moléculas que tem afinidade pelo receptor de adenosina são derivados de xantina (MÜLLER; JACOBSON, 2011). Exemplos de compostos com afinidade micromolar pelos receptores de adenosina são: cafeína(**1**), emprofilina (**3**) e teofilina (**2**) (Figura 3)(JI et al., 2001; KIM et al., 2002).

Um dos primeiros antagonistas seletivo de RA2B foi o derivado de xantina MRS1754(**5**)(Figura3)(FREDHOLM et al., 2001). Outros derivados de xantina com ação seletiva sobre RA2B incluem MRE-2029-F20(**6**)(BARALDI et al., 2004) e PSB-1115 (SCHIEDEL et al., 2011) (Figura3). Esforços para o desenvolvimento de antagonistas seletivos para a RA2B estão focados, portanto, nessa classe de compostos (BEUKERS; MEURS; IJZERMAN, 2006; CHENG et al., 2010;

GONZÁLEZ; TERÁN; TEIJEIRA, 2008; KATRITCH; KUFAREVA; ABAGYAN, 2011). A fim de alcançar esse objetivo derivados substituídos nas posições 1, 3, 7 e 8 (7 e 8) (Figura 4) foram sintetizados (KIM et al., 2002).

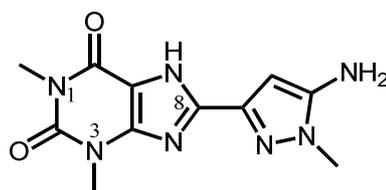
Figura 3. Compostos da classe das xantinas(1-6).



Fonte: Jim et al., (2001); Ji et al. (2001); Muller e acobson, (2011).

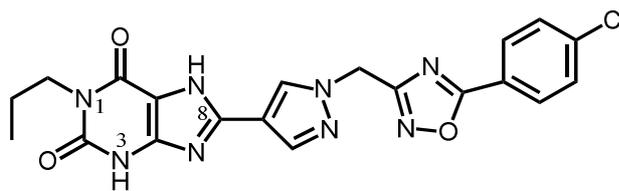
Estudos das relações entre a estrutura química e a atividade biológica (REA) dos derivados de xantina mostraram que substituição na posição 1 (composto 7, Figura 4) por grupos maiores que os substituintes da posição 3 (hidrogênio ou metil) (composto 8, Figura 4) favorece a afinidade por RA2B (KIM et al., 2002). Além disso, substituintes heterocíclicos na posição 8 (compostos 7 e 8, Figura 4) resultam em antagonistas com afinidade e seletividade elevadas para RA2B (36 vezes superior com relação aos demais subtipos de RA) (BARALDI et al., 2004).

Figura 4. Derivados de xantina substituídos na posição 1,3 e 8.



(7)

Atividade biológica: $K_i = 175 \text{ nM}$



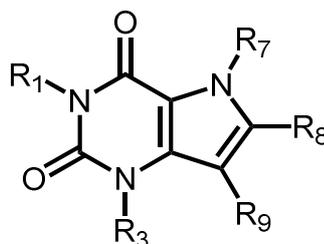
(8)

Atividade biológica: $K_i = 7\text{nM}$.

Fonte: Baraldi et al., 2004

A Substituição de um dos nitrogênios (N-9) por carbono, resultou na classe de compostos 9-deazaxantina (9-dAX) (compostos **9-13**, Figura 5) (HAYALLAH et al., 2002), cujos derivados apresentam afinidade nanomolar pelo RA2B (GRAHNER et al., 1994; HAYALLAH et al., 2002).

Figura 5. Esqueleto molecular dos derivados de 9-deazaxantina (Pirrol[2,3-d]pirimidina-2,4-diol)

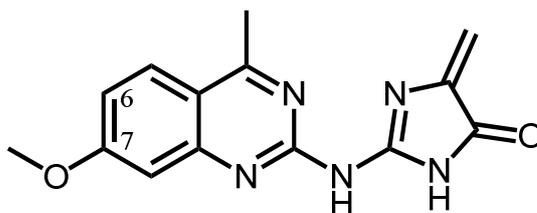


Compostos	R ₁	R ₃	R ₇	R ₉	R ₈	K_i (nM)
9	CH ₃	CH ₃	H	H	C ₆ H ₅	182
10	CH ₃	CH ₃	H	OH	C ₆ H ₅	228
11	<i>n</i> C ₃ H ₇	<i>n</i> C ₃ H ₇	H	H	C ₆ H ₅	229
12	<i>n</i> C ₃ H ₇	<i>n</i> C ₃ H ₇	H	OH	4-CH ₃ -C ₆ H ₄	89

Fonte: Stefanachi, et al., 2008a

A expansão do anel imidazólico resultou na classe das quinazolinonas (composto **13**, Figura 6) (SHIREESHA et al., 2010). Alguns compostos dessa classe, tal como CMB-6446, apresentam afinidade ($K_i < 10\text{ nM}$) e seletividade frente ao RA2B. (SHIREESHA et al., 2010).

Figura 6. Derivado de quinazolinona. *CMB6446= 4-metil-7-metoxiquinazolin-2-(2'-amino-4'-imidazolinona), atividade biológica RA2b, $K_i = 112\text{nM}$; RA2a, $K_i = 2,4\text{nM}$; RA1, $K_i = 1,3\text{nM}$.

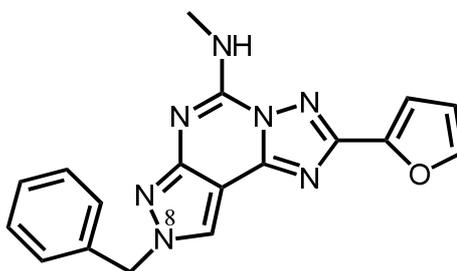


(13)

Fonte:WEBB et al., 2000

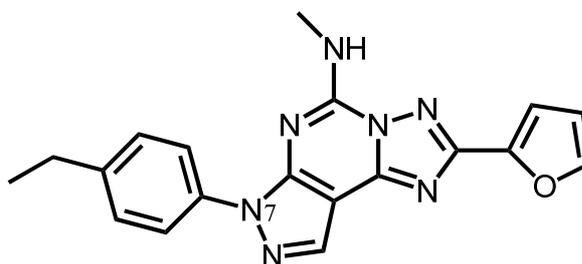
A fim de ampliar a diversidade química dos antagonistas de RA2B, derivados pirazol ou triazol pirimidínicos, previamente conhecidos como antagonistas de RA3 (BARALDI, 2001), foram avaliados. O estudo de REA dessa classe sugere que substituintes na posição 8-pirazol (compostos **14**, Figura 7), como *benzila*, aumentam a afinidade pelo subtipo RA2B ($K_i = 5\text{nM}$), ao passo que a afinidade por RA3 diminui ($K_i = 2030\text{nM}$) (BARALDI et al., 2001). Por outro lado, substituintes na posição sete tem efeito contrário (composto **15**, Figura 7).

Figura 7. Derivado de triazol pirimidínicos substituído na posição 8.



(14)

. Atividade biológica RA2b, $K_i = 5\text{nM}$; RA2a, $K_i = 0,31\text{nM}$; RA3, $K_i = 2030\text{nM}$.



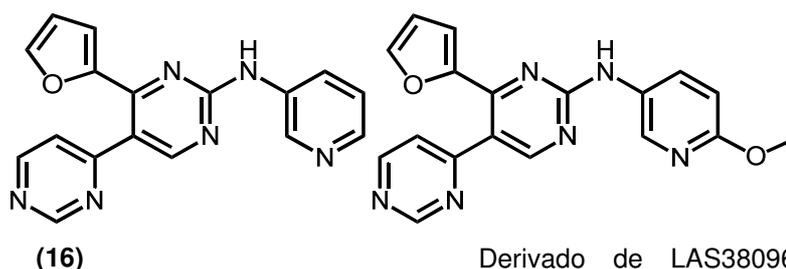
(15)

. Atividade biológica RA2b, $K_i > 10.000\text{nM}$; RA2a, $K_i = 549\text{nM}$; RA3, $K_i > 10.000\text{nM}$.

Fonte:BARALDI et al., 2001

Embora derivados de xantina tenham afinidade elevada pelo RA2B, seu uso terapêutico ainda é limitado (FREDHOLM et al., 2011). Isso pode estar relacionado com presença dos RAs em diversos tecidos e a interação não seletiva dos derivados de xantina ou a problemas farmacocinéticos (KATRITCH; KUFAREVA; ABAGYAN, 2011). Por isso, moléculas que não apresentam o esqueleto xantinapodem ser alternativas promissoras. Por exemplo, o derivado 2-amino-(3-piridil) (composto **16**, Figura 8) possui afinidade de 17nM e alta seletividade pelo RA2B. Substituinte na posição 6 da piridina, desse derivado, diminui a afinidade ($K_i = 115\text{nM}$) (composto **17**, Figura 8)(VIDAL et al., 2007). Além disso, modificações na estrutura do pirrolpirimidina resultou no composto OSIP-339391(**18**) (Figura 8), que possui afinidade de 0,5nM pelo RA2B e seletividade 70 vezes maior em relação aos receptores A1, A2A e A3(ORTORE; MARTINELLI, 2010).

Figura 8. Estrutura química de compostos derivados de aminopiridina e aminopirimidina com seus valores de afinidade pelos RA.

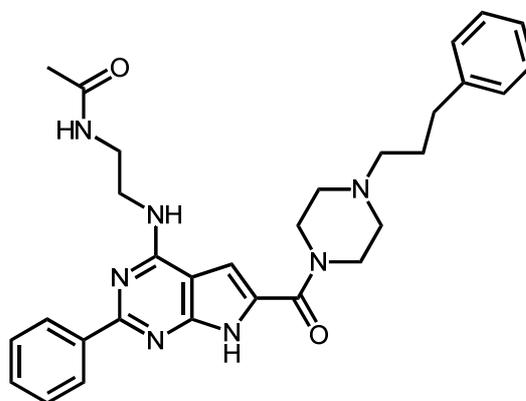


(16)

Derivado de LAS38096 substituído na posição 6. RA2B, $K_i=115\text{nM}$; RA2A, $K_i=2500\text{nM}$; RA1, $K_i>1000$. RA3 > 10000nM.

LAS38096 = 2-amino-(3-piridil). RA2B, $K_i=17\text{nM}$; RA2A, $K_i=2500\text{nM}$; RA1, $K_i>1000$. RA3 > 1000nM.

(17)



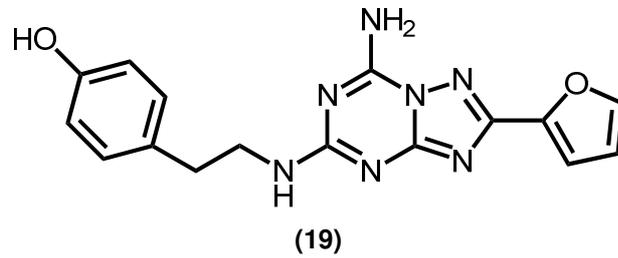
(18)

OSIP339391 = pirrolpirimidina. RA2B, $K_i=0.5\text{nM}$; RA2A, $K_i=328\text{nM}$; RA1, $K_i=37\text{nM}$; RA3=450nM.

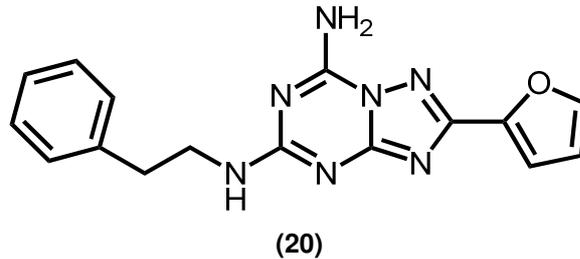
Fonte: Ortore e Martinelli (2010); Vidal e colaboradores (2007).

Derivados de triazoltriazina (composto **19**) são antagonistas seletivos de RA2A. No entanto, a retirada do substituinte da posição 4 do anel fenila (composto **20**) aumenta a afinidade pelo RA2B e, conseqüentemente, redução da afinidade pelo RA2A (Figura 9), indicando que o grupo hidroxila contribui para a seletividade dos antagonista por RA2A (BEUKERS; MEURS; IJZERMAN, 2006).

Figura 9. Estrutura química de derivados triazoltriazina. LUF5452. RA2B, $K_i=9,9\text{nM}$; RA2A, $K_i=5.4\text{nM}$; RA1, $K_i=7.1\text{nM}$; RA3=1450nM.



ZM241385. RA2B, $K_i=16,5\text{nM}$; RA2A, $K_i=1,7\text{nM}$; RA1, $K_i=255$; RA3=3090nM.



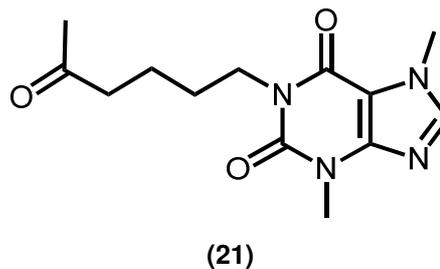
LUF5452. RA2B, $K_i=9,9\text{nM}$; RA2A, $K_i=5.4\text{nM}$; RA1, $K_i=7.1\text{nM}$; RA3=1450nM.

Fonte:(BEUKERS; MEURS; IJZERMAN, 2006).

Grande progresso tem sido realizado ao longo dos últimos anos na identificação de antagonistas de alta afinidade para o RA2B. Entretanto, um derivado de xantina (composto **21**, Figura 10) apresentou baixa eficácia na redução dos sintomas de pacientes com anemia falciforme (CHRISTAKIS et al., 1990; SHERER; GLOVER, 2000).

Nesse contexto, ferramentas ou técnicas que sejam rápidas, eficientes e de baixo custo, como os métodos de abordagem no ligante, tal como modelos farmacofóricos, podem ser alternativas para a identificação e otimização de outras classes de antagonistas de RA2B mais eficientes (JOSEPH et al., 2008; SARMA et al., 2008).

Figura 10. Estrutura química da pentoxifilina



2.3 ENSAIO VIRTUAL

Nas últimas décadas, o ensaio virtual emergiu como uma ferramenta poderosa para identificar novos compostos com diversidade estrutural (BIELSKA et al., 2011; MUSMUCA et al., 2010). Por isso, essa técnica é uma abordagem complementar aos ensaios biológicos (JIANG et al., 2015). As ferramentas disponíveis para o ensaio virtual são capazes de simular as interações de moléculas com o sítio de ligação em um tempo curto, se comparado com técnicas experimentais (BALLESTER et al., 2012; LIONTA et al., 2014; MUSMUCA et al., 2010; THIYAGARAJAN et al., 2013).

Os ensaios virtuais podem ser realizados através de duas abordagens: a primeira requer o conhecimento da estrutura tridimensional da proteína-alvo e o segundo é baseado em informações de ligantes conhecidos da proteína-alvo (DANISHUDDIN; KHAN, 2015). A estrutura do receptor pode ser determinada por técnicas experimentais, tais como cristalografia de raio-X e espectroscopia de RMN ou pode ser prevista utilizando modelagem por homologia (REDDY et al., 2007). A partir dessa informação, a forma e a natureza química do sítio ativo da proteína-alvo são utilizados para identificação de novos ligantes por meio de modelos farmacofóricos baseados na estrutura do alvo macromolecular, planejamento *de novo* ou acoplamento molecular dos possíveis ligantes no sítio ativo (CAVASOTTO; ORRY, 2007).

Métodos baseados em receptores tem vantagem sobre os métodos baseados no ligante por que usam informações do alvo e fornecem informações sobre o modo de interação (JENA et al., 2014). No entanto, eles são limitados pela disponibilidade de informação tridimensional da macromolécula alvo. De fato, essa é a situação para RA2B, cuja estrutura tridimensional não é conhecida. Adicionalmente, os métodos baseados na estrutura são computacionalmente mais caros e complexos devido à dificuldade de se descrever as contribuições entrópicas e os fenômenos de solvatação/dessolvatação utilizando termos simples de campos de força padrão (ENGLEBIENNE; MOITESSIER, 2009; FERREIRA et al., 2015; MENG et al., 2011). A maioria dos métodos baseados na estrutura também pressupõem que o alvo é rígido, ou não apresenta alterações conformacionais significativas após a interação com o ligante (ELOKELY; DOERKSEN, 2013). Esse tipo de simplificação explica, em

parte, o desempenho inferior da triagem virtual baseada na estrutura do alvo, quando comparado aos métodos baseados no ligante(AWUNI; MU, 2015).

Por outro lado, o planejamento de fármaco baseado no ligante (LBDD) pode ser empregado quando moléculas que modulam a macromolécula são conhecidas(APAROY; REDDY; REDDANNA, 2012). Pois, compostos com propriedades químicas semelhantes também apresentam efeitos biológicos semelhantes(FRANKE et al., 2007) e podem ser utilizados como molde na busca de outros compostos que também tenham a propriedade biológica de interesse(KRISTENSEN; NIELSEN; PEDERSEN, 2013).

Nessa abordagem o cálculo da similaridade química entre a molécula referência e cada molécula da base de dados depende principalmente da representação da molécula e do coeficiente de similaridade utilizados (BENDER, 2005; KITCHEN et al., 2004). Nesse sentido, descritores 2D, 3D ou que descrevem as interações farmacofóricas que os ligantes realizam podem ser utilizados para calcular a similaridade química (VYAS et al., 2008): Nos métodos que utilizam descritores 2D a semelhança entre duas moléculas é calculada a partir de descritores topológicos, ou seja, que não variam com a conformação adotada pela molécula(LENGAUER et al., 2004). Por outro lado, os métodos que usam descritores 3D possuem maior complexidade pois os descritores usados (ex. distância interatômicas, superfícies moleculares, campos eletrostáticos) são influenciados pela conformação que a molécula adota(SEIDEL et al., 2010).

A terceira abordagem se baseia no conceito de farmacóforo, originalmente introduzido em 1909 por Ehrlich como aporção molecular que carrega as características essenciais para a atividade biológica de um fármaco(KASERER et al., 2015). Desde então, a definição sofreu modificações significativas e atualmente um farmacóforo representa as características eletrônicas e estereais necessárias para desencadear ou bloquear uma resposta biológica(SEIDEL et al., 2010). Nas etapas iniciais do planejamento de fármacos as informações sobre o farmacóforo são bastante limitadas, razão pela qual se utiliza o termo hipótese farmacofórica ou modelo farmacofórico para definir o conjunto de propriedades que são, supostamente, essenciais para ação biológica do composto bioativo(JAIN, 2004).

As hipóteses farmacofóricas podem ser determinadas a partir do alinhamento espacial das moléculas no qual grupos funcionais/anéis que realizam o mesmo tipo de interação estão sobrepostos. O programa GALAHAD, por exemplo, produz

alinhamentos moleculares utilizando uma representação tridimensional das moléculas alinhadas (hipermolécula), que as caracteriza como um conjunto de hiperátomos conectados entre si e que formam as características farmacofóricas (por exemplo: centros hidrofóbicos, doadores de ligação de hidrogênio, etc.) (CLARK; ABRAHAMIAN, 2009; RICHMOND et al., 2006)(CLARK; ABRAHAMIAN, 2009). Essas características devem mimetizar interações que ocorrem com resíduos do sítio alvo (CLARK; ABRAHAMIAN, 2009).

3. METODOLOGIA

3.1 GERAÇÃO DOS MODELOS FARMACOFÓRICOS

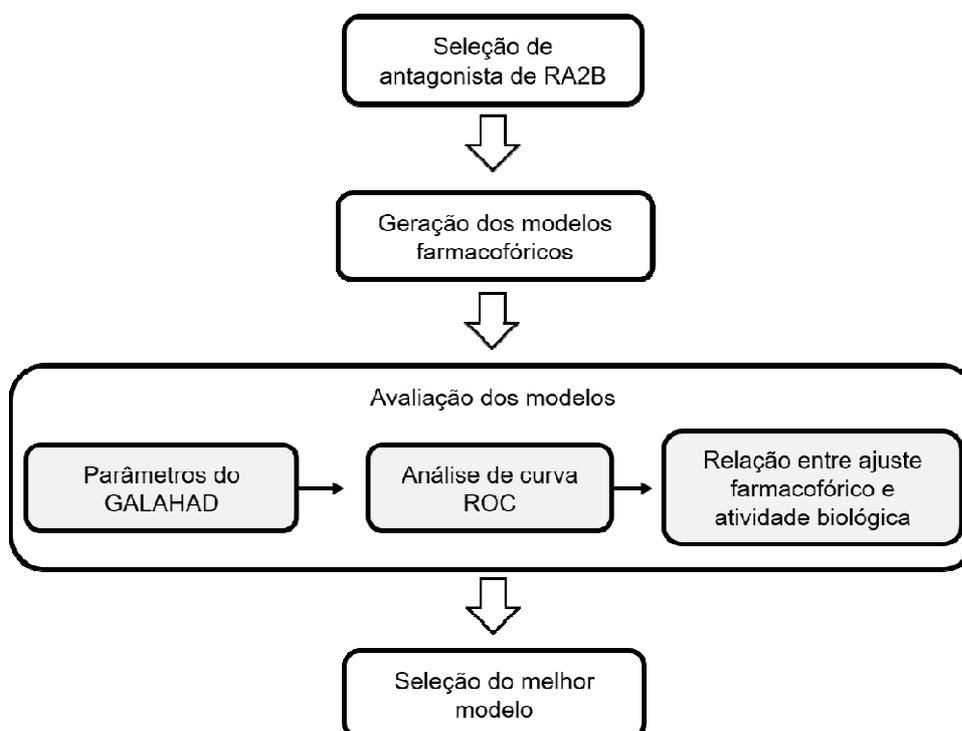
3.1.1 Preparação dos ligantes

Todos os compostos descritos nesse trabalho foram desenhados na forma tridimensional utilizando a plataforma SYBYL-X 2.1 e minimizados com auxílio do campo de força Tripos, utilizando o método de Powell (10000 iterações ou gradiente menor que 0,001Kcal/(mol*A), considerando cargas de Gasteiger Huckel e constante dielétrica do meio igual a 80.

3.1.2 Modelo farmacofórico para antagonista RA2B

A geração e avaliação dos modelos farmacofóricos de antagonista do RA2B foram realizadas conforme etapas apresentadas no esquema 1. Mais detalhes desses ensaios são demonstrados ao longo desse tópico.

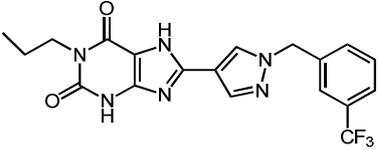
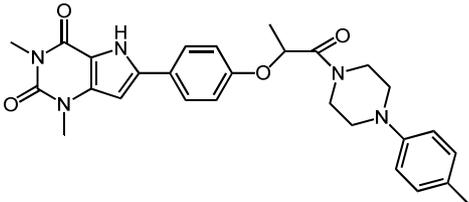
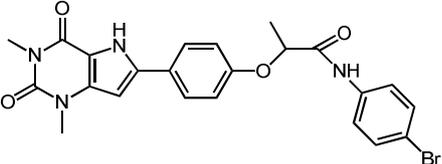
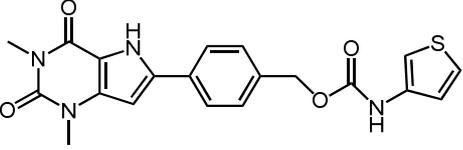
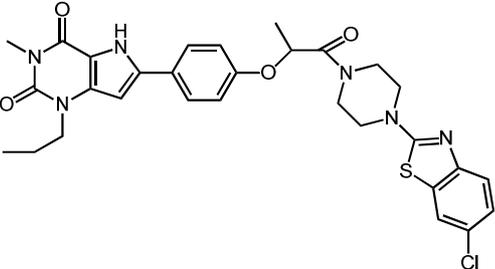
Esquema 1. Passos aplicados no planejamento e desenvolvimento de modelo farmacofórico para antagonista de RA2B



Cinco antagonistas de RA2B com potência variando entre 8,22 e 9,1 (Tabela 1) (CAROTTI et al., 2004; CHENG et al., 2010; STEFANACHI et al., 2008a) foram alinhados flexivelmente, a fim de maximizar a sobreposição das suas características farmacofóricas (aceptores e doadores de ligação de hidrogênio, centros hidrofóbicos, nitrogênios positivos e negativos, e características estéreas) com auxílio do programa GALAHAD, disponível na plataforma SYBYL 2.1.

O processo de alinhamento foi conduzido em duas etapas: na primeira etapa foram geradas conformações de baixa energia para cada ligante selecionado para a construção dos modelos farmacofóricos, utilizando método de algoritmo genético multiobjeto de Pareto. Na etapa seguinte o método extrai as características farmacofóricas das moléculas em cada conformação e posteriormente as sobrepõe de acordo com as coordenadas tridimensionais das características identificadas (RICHMOND et al., 2006). O tamanho da população (30) e número máximo de gerações (90) utilizados na etapa de alinhamento molecular foram determinados automaticamente a partir do número de compostos empregados na criação dos modelos farmacofóricos. Os parâmetros razão de mutação (0,4, 0,2), redução de mutação (1,0, 1,0) e razão de permutação (1,0, 1,0) foram mantidos nos valores padrão.

Tabela 1. Moléculas utilizadas na construção dos modelos farmacofóricos de antagonista de RA2B.

Compostos	Estruturas	Atividade biológica (p <i>K_i</i>)
01		8,22
02		8,74
03		8,88
04		9,1
05		8,98

3.2 VALIDAÇÃO DOS MODELOS FARMACOFÓRICOS

Os modelos farmacofóricos foram avaliados quanto à pontuação de Pareto, calculado a partir dos parâmetros STERICS, ENERGY, HBONDS. Aqueles com valor igual a zero foram testados quanto sua habilidade para diferenciar antagonistas de RA2B de compostos sem atividade (falso-positivos), também conhecidos como decoys, que foram gerados com auxílio do servidor e-DUD (<http://dude.docking.org>) (VENKATRAMAN et al., 2010), na proporção de 1 composto ativo para 50 falso-positivos. Todos os compostos passaram pelas mesmas etapas

de minimização e atribuição de carga, descritos anteriormente, e posteriormente foram adicionados ao banco de dados contendo os antagonistas conhecidos de RA2B.

Na etapa seguinte, os compostos dos bancos de dados foram sobrepostos nos modelos que apresentaram Pareto igual a zero e bom ajuste na sobreposição farmacofórica. Essa etapa foi realizada com auxílio do programa UNITY-3D, pelo método de busca flexível. Os compostos foram classificados de acordo com o valor de QFIT calculado automaticamente por esse programa. Com auxílio da área sob a curva (AUC), os valores de QFIT foram aplicados para selecionar modelos utilizados na etapa subsequente.

Os modelos farmacofóricos selecionados foram então avaliados quanto sua capacidade de classificar os compostos de acordo com sua potência. Para isso, 287 antagonistas de RA2B ($pK_i = 4.0-9.3$) (CAROTTI et al., 2004; CHENG et al., 2010; FERNÁNDEZ et al., 2009; JOSEPH et al., 2008; STEFANACHI et al., 2008a, 2008b) não empregados na construção dos modelos, foram sobrepostos individualmente e de forma flexível aos modelos farmacofóricos, utilizando o programa GALAHAD (opção *Align individually to a template*). O ajuste das moléculas às características farmacofóricas foi pontuado de acordo com o valor de MOL_QRY. As moléculas foram divididas em classes, de acordo com seus valores de pK_i (potentes, intermediários e pouco potentes), e cada classe foi relacionada à média ponderada dos seus valores de MOL_QRY.

3.3 ENSAIO VIRTUAL BASEADO EM MODELO FARMACOFÓRICO

O modelo farmacofórico que apresentou melhor desempenho nas etapas anteriores foi utilizado para realizar o ensaio virtual no banco de dados de compostos *lead-like* ZINC database (<http://zinc.docking.org/>), por meio do algoritmo de ajuste direto (*direct tweak*-UNITY), que ajusta as ligações rotacionáveis para combinar as características farmacofóricas da molécula com o modelo (TRIPOS, 2012a).

Compostos que apresentaram valor de QFIT > 0 (zero) foram analisados com auxílio do servidor CHEMGPS-NP (<http://chemgps.bmc.uu.se/batchelor/queue.php?show=submit&proc=file>). A

seguir, as 3 primeiras componentes principais (PC) calculadas por esse servidor foram utilizadas como descritores para uma análise hierárquica de

agrupamentos, utilizando distâncias euclidianas e método de ligação pelo vizinho mais distante, com auxílio do programa Pirouette[®]. Pelo menos uma molécula de cada agrupamento, considerando similaridade de 80% entre os grupos, foi selecionada para a aquisição e, subsequente, avaliação biológica

3.4 TRIAGEM DE AGENTES ANTIFALCIZANTES

3.4.1 Compostos teste e controles

33 potências antagonistas de RA2B, identificados na triagem farmacofórica, foram adquiridos da Enamine Chemistry (<http://www.enamine.net/>), com grau de pureza maior que 95%. MRS1754 (antagonista de RA2B) e NECA (agonista de RA2B), utilizados como controle experimentais, foram adquiridos da sigma-Aldrich (códigos M6316 e E2387, respectivamente) com grau de pureza acima de 99%. Os potenciais antagonistas e os controles foram solubilizados em água miliQ contendo 1% de dimetil sulfoxido (DMSO).

3.4.2 Amostra biológica

As amostras de sangue utilizadas nos ensaios biológicos foram coletadas de 5 pacientes adultos, com idade entre 19 e 38 anos, de ambos os sexos, atendidos no Programa de Saúde da Família da Cidade de Cruz das Almas, com diagnóstico de anemia falciforme, confirmado por cromatografia líquida de alta performance – HPLC, anexado no prontuário de cada paciente.

Foram excluídos da pesquisa pacientes que não aceitaram ou não puderam, por qualquer motivo, assinar o Termo de consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (apêndice A), que apresentaram crises de dor ou que estiveram internados na semana da coleta.

Uma amostra de 5ml de sangue, de cada paciente, foi coletada em EDTA e centrifugada, por 5 minutos a 2500rpm por minuto e 4°C, para retirada do soro. Os eritrócitos remanescentes foram lavados com salina a 0,9% e centrifugados (2500rpm por 5 minutos), por pelo menos 3 vezes. A seguir, os eritrócitos foram ressuspensos em salina 0,9% (900µl de salina para 100µl de eritrócito) e utilizados para os ensaios subsequentes. Os procedimentos realizados foram aprovados pelo

Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) do Hospital Roberto Santos (No 928.405/2014 (anexo A).

3.4.3 Ensaio antifalcizante

3.4.3.1 Ensaio em concentração única

Os testes de atividade antifalcizante foram realizados conforme método descrito por Sofowora e colaboradores (1979), modificado por EGUNYOMI e colaboradores (2009). Resumidamente, 0,2 mL de metabisulfito de sódio a 2% foi adicionado em 0,1 mL de hemácias em salina (proporção de 1:9) para desoxigenação do sistema. Uma amostra foi analisada a cada duas horas para verificar o tempo em que as hemácias falcizam nesta condição. Na etapa seguinte, 10 µM dos diferentes compostos foram adicionados em 0,1 mL de hemácias em salina e incubados a 37 °C por 3 horas, sob agitação discreta/suave a cada 30 minutos. Após o período de incubação uma amostra foi retirada de cada tubo, transferido para lâmina de microscópio e adicionado 0,2 mL de metabisulfito de sódio a 2% à suspensão de hemácias. A mistura foi homogeneizada, a lâmina de microscópio coberta com lamínula, selada com vaselina sólida e incubada a vácuo em temperatura ambiente. A morfologia das hemácias foi analisada após 12 horas. Essa análise foi realizada em microscópio óptico (Olympus CX22RFS2), com objetiva de 40X e pelo menos 500 hemácias foram contadas, em todas as amostras, em pelo menos cinco campos diferentes. Todas as substâncias foram avaliadas em triplicata. Nos casos que houve diferença maior que 10% na contagem de hemácias falcizadas, uma quarta análise foi realizada. Os compostos com atividade antifalcizante, estatisticamente superior ($p < 0,05$) ao controle positivo (MRS 1754), foram selecionados para as etapas posteriores. Três tipos de controles foram utilizados neste ensaio biológico: salina; um antagonista (MRS 1754, 10 µM) e um agonista (NECA, 10 µM) de RA2B.

3.4.3.2 Ensaio concentração-resposta

A curva dose-resposta dos compostos e MRS 1754 foram construídas seguindo uma escala logarítmica, a partir da dose utilizada nos testes de triagem, ou seja 0,0001 a 10 vezes a dose de 10 µM, equivalendo a 0,001 a 100 µM.

A seguir as curvas concentração-resposta para o agonista NECA na presença ou ausência dos compostos testes foram construídas e as concentrações necessárias para se obter 50% do efeito máximo $-E_{max}$ observado, EC_{50} , determinadas por regressão não linear, como disponível no programa GraphPad Prism 6.1.

Após a obtenção das curvas concentração-resposta, foi estimada a afinidade dos compostos através da pA_2 , determinado pela análise de regressão linear, utilizando a equação de Schild: (equação 1)

$$pA_2 = -\log[B] + \log(CR-1) \text{ (equação 1)}$$

onde CR = razão da concentração (EC'_{50}/EC_{50}) do agonista; [B] = concentração do antagonista; pA_2 = medida da afinidade de um antagonista competitivo (KENAKIN, 2008).

Os dados são apresentados como média \pm EPM e foram analisados pela Análise de Variância (ANOVA), com auxílio do programa GraphPad Prism 6.1. Foram considerados estatisticamente significantes valores com $P < 0,05$.

3.5 CITOTOXICIDADE PARA CÉLULAS DE MAMÍFERO

Células da linhagem J774 de macrófagos de murinos foram colocadas em placas de 96 poços com densidade celular de 2×10^5 células/poço em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS; GIBCO) e $50 \mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil) e incubados durante 2 horas a 37°C e 5% de CO_2 . Os compostos testes foram adicionados em cinco concentrações que variaram de 6,25 a $100 \mu\text{M}$ em triplicata e as placas foram incubadas durante 24 horas. Vinte por poço de Alamar Blue (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram adicionados às placas após 12 horas. As leituras colorimétricas foram realizadas a 570 e 600nm. Utilizou-se violeta de genciana (Synth, São Paulo, Brasil) a $10 \mu\text{M}$ como controle positivo. Três experimentos independentes foram realizados.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os derivados de xantina apresentam características que limitam seu uso em pacientes com anemia falciforme, como por exemplo incidência significativa de efeitos adversos (MARGAY et al., 2015). Entretanto, esses compostos podem ser usados como modelos para identificação de novos compostos capazes de antagonizar RA2B e, portanto, reduzir a falcização de hemácias. A fim de alcançar esse objetivo foram empregados modelos farmacofóricos gerados a partir de múltiplos ligantes. Esse processo envolveu duas etapas: amostragem conformacional de cada ligante do conjunto treino e alinhamento mútuo entre eles, a fim de determinar as características químicas essenciais e comuns para construção dos modelos farmacofóricos (SANDERS et al., 2012). Essas etapas representam as principais dificuldades para construção de modelos farmacofóricos baseados no ligante (YANG, 2010; ZHAO et al., 2010), pois a conformação dos ligantes do RA2B não são conhecidas.

Dessa forma, um conjunto treino com cinco derivados de xantina foi utilizado na construção dos modelos farmacofóricos. Os compostos dessa classe foram selecionados por apresentar alta afinidade (pK_i variando entre 8,22 e 9,1) (CAROTTI et al., 2004; CHENG et al., 2010; STEFANACHI et al., 2008; KALLA; ZABLOCKI, 2009). Segundo Sakkiah e Lee (2012), compostos de alta afinidade fornecem informações críticas e necessárias para construção de modelos farmacofóricos confiáveis. Programas como o GALAHAD, utilizam apenas características estruturais de ligantes ativos e estimam a potência de novos compostos de forma qualitativa, por isso o desempenho do modelo depende, principalmente, da definição e localização das características farmacofóricas (LIAO et al., 2011). Neste caso, o uso de compostos de alta afinidade é apropriado. Em contrapartida, o tamanho conjunto treino não apresenta impacto significativo na qualidade dos modelos gerados (LEACH et al., 2010), pois embora a modelagem farmacofórica possa ser realizada com apenas dois compostos (KASERER et al., 2015), 5-7 compostos fornecem informações não redundantes para atingir o objetivo dessa técnica (COTTRELL; GILLET; TAYLOR, 2007), sem impor restrições excessivas para os modelos finais, tal como alta especificidade para fins de triagem (TRIPOS, 2012b). A partir dessas informações, um conjunto de cinco compostos foi considerado

suficiente para construção de modelos farmacofóricos confiáveis e com baixo custo computacional.

Uma vez que a conformação bioativa dos ligante do RA2B não é conhecida, foram geradas até 100 conformações de baixa energia para cada composto do conjunto treino. Esta estratégia fundamenta-se no pressuposto que, na biofase, conformações termodinamicamente estáveis é que devem interagir com o receptor (INAMDAR, 2011).

Na etapa seguinte, múltiplos alinhamentos das características farmacofóricas foram realizados para esses ligantes, resultando em 35 hipóteses farmacofóricas, que podem ser classificadas por meios seguintes critérios: tensão de energia (ENERGIA), volume de sobreposição (STERICs) e combinação das características farmacofóricas (MOL_QRY/HBOND). Um problema com os métodos de pontuação utilizados é que eles requerem pesos a serem atribuídos aos diferentes critérios e esses pesos são inevitavelmente arbitrários (LEACH et al., 2010). Para evitar esse problema utilizar-se a função de Pareto, que converge um conjunto de hipóteses não-dominantes, de forma que nenhum modelo é superior ao outro. Nesses caso, aos modelos são atribuídos escore de Pareto igual a zero (MARTIN, 2010; NICOLAOU; BROWN, 2013). Sendo assim, 12 modelos (modelos 24 a 35) que apresentaram pontuação de Pareto diferente de zero foram excluídos. No entanto, os modelos remanescentes (escore de Pareto = 0) (tabela 2) são estatisticamente equivalentes. Neste caso, para selecionar o melhor modelo, estudos realizados por Caballero (2010), Chiu e Amin (2012) sugerem que a complementariedade das características farmacofóricas seja levada em consideração, buscando modelos com a combinação de valores máximos para MOL_QRY e HBOND. Seguindo esta estratégia, 13 modelos (Figura 11) foram selecionados para a etapa de avaliação.

Tabela 2. Parâmetros estatísticos dos modelos farmacofóricos para antagonistas RA2B.

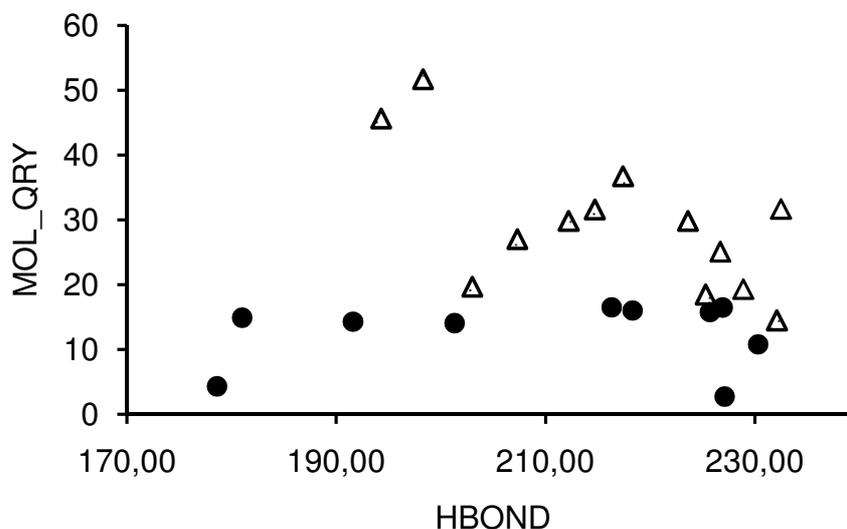
MODELO	PARETO	ENERGIA	STERICs	HBOND	MOL_QRY
01	0	9,98	7.980,90	214,70	31,63
02	0	15,00	7.821,20	232,50	31,69
03	0	11,52	7.778,70	217,40	36,76
04	0	11,35	7.452,50	223,60	29,87
05	0	12,96	7.565,00	228,90	19,34
06	0	7,58	7.896,70	232,10	14,51
07	0	9,92	7.946,20	225,30	16,5
08	0	6,73	7.258,30	198,30	51,73

09	0	13,67	7.430,10	226,70	25,06
10	0	7,85	7.317,20	216,30	16,51
11	0	10,42	7.296,40	226,90	16,49
12	0	9,87	7.541,90	203,00	19,73
13	0	7,13	7.168,00	207,30	27,04
14	0	6,53	6.891,60	194,30	45,67
15	0	9,14	6.728,50	212,20	29,86
16	0	14,84	7.585,30	230,30	10,8
17	0	9,39	7.058,30	225,70	15,79
18	0	11,23	7.497,10	218,30	16,04
19	0	10,2	8.031,20	201,30	14,08
20	0	7,95	7.538,60	181,00	14,92
21	0	6,93	7.468,90	191,60	14,3
22	0	10,16	7.162,80	227,10	2,75

Os modelos marcados em negritos são aqueles selecionados para a etapa de validação.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11. Análise da conformidade entre os critérios de sobreposição farmacofórica (MOL_QRY e HBOND). ▲ = modelos selecionados para a etapa de avaliação; ● = modelos com dissonância entre os critérios de sobreposição farmacofórica ou baixo valor de MOL_QRY.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 AVALIAÇÃO DOS MODELOS FARMACOFÓRICOS

Apesar dos modelos apresentarem parâmetros estatísticos dentro dos valores aceitáveis para uso em triagem virtual (ATHRI et al., 2010; ZHAO et al., 2010), não se pode afirmar, apenas com base nesses parâmetros que eles sejam capazes de diferenciar ligantes verdadeiros de falsos positivos. Por essa razão, foi realizada

uma simulação de triagem virtual a fim de mensurar a capacidade de cada modelo em identificar ligantes de RA2B dentro de um conjunto de moléculas que possuam propriedades físico-químicas semelhantes a dos ligantes verdadeiros (ex. peso molecular, número de ligações rotacionáveis, total de doadores e aceptores de ligação de hidrogênio e coeficiente de partição octanol-água), mas que sejam falso-positivos (*decoys*)(MYSINGER et al., 2012).

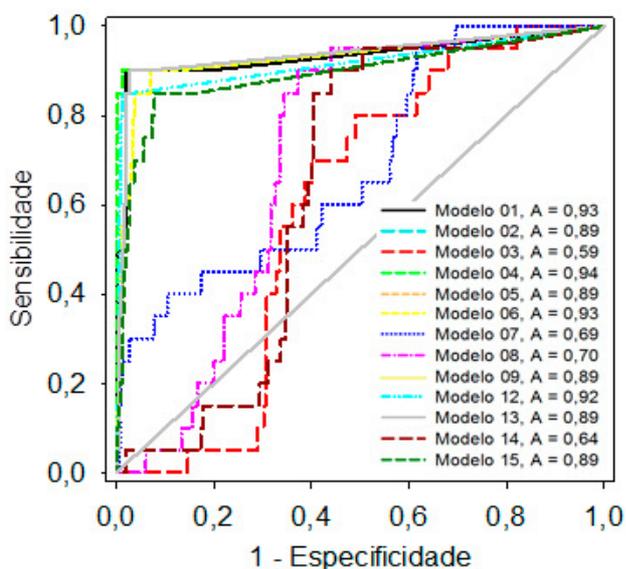
Uma vez que não existem dados experimentais acerca de substâncias reconhecidamente inativas contra RA2B, empregou-se uma ferramenta computacional (e-DUDE <http://dud.docking.org/>)) para gerar os *decoys*. Embora esse tipo de ferramenta tenha sido desenvolvido para avaliar os métodos de acoplamento molecular(LEITE et al., 2017; SLIWOSKI et al., 2013), ela já foi usado para avaliação de modelos farmacofóricos (JOHN et al., 2011; KATRITCH; KUFAREVA; ABAGYAN, 2011; SLIWOSKI et al., 2014).

A única informação necessária para construção do banco de falso positivos (*decoys*) é um conjunto de moléculas ativas contra o alvo macromolecular. Assim, um conjunto de 20 antagonistas, derivados de xantina, com $K_i < 10\mu\text{M}$ (CAROTTI et al., 2004; FERNÁNDEZ et al., 2009; STEFANACHI et al., 2008b) foi fornecido para o servidor e-DUDE. Essa faixa de afinidade foi definida com base em dados da literatura que consideram inativos aqueles compostos com valores de atividade biológica superiores a $10\mu\text{M}$ (JOSEPH et al., 2008). Considerando que aproximadamente 50 falsos positivos são gerados para cada ligante verdadeiro, 1050 *decoys* foram obtidos. A proporção de compostos ativos e inativos na base de dados utilizada neste trabalho está dentro da faixa (1:50) considerada adequada para previsões corretas acerca do desempenho da técnica de triagem virtual(SHEPPHIRD; CLARK, 2006). Como essa etapa deve mimetizar um protocolo de triagem virtual, foi utilizado o programa UNITY ao invés do programa GALAHAD para pontuar o ajuste das moléculas aos modelos farmacofóricos. Embora o valor de MOL_QRY, calculado com o programa GALAHAD, tenha maior correlação com a atividade biológica que o valor de QFIT (CHEN; MYINT; XIE, 2012; LIU; SUN; HU, 2012), não é possível usar o programa GALAHAD para realizar a triagem virtual, em função do tempo necessário para sobreposição de centenas de moléculas em cada modelo farmacofórico. A partir dos valores de QFIT foram construídas curvas ROC para cada modelo, nas quais o eixo x representa a taxa de falsos positivos (1-especificidade - EP), enquanto que o número de verdadeiros positivos é

representado no eixo y (sensibilidade - SE). Espera-se que ligantes verdadeiros tenham pontuação superior ao dos falso-positivos. Um modelo deve apresentar alta sensibilidade (valor=1, no eixo y) e especificidade (valor zero no eixo x), ou seja deve-se observar uma linha que sai da origem e segue verticalmente até o canto superior esquerdo. Ao atingir este ponto, a curva deve continuar horizontalmente até o canto superior direito, indicando que todos os ligantes verdadeiros foram identificados acima dos falsos positivos (SEIDEL et al., 2010)

O desempenho de cada modelo pode ser mensurado pelos valores de AUC de cada curva ROC, de forma que apenas modelos com $AUC > 0,50$ tem desempenho melhor do que a triagem aleatória. Essa abordagem não é inédita e pode ser considerada como padrão para avaliação do desempenho de modelos farmacofóricos (AL-NADAF; TAHA, 2011; DANISHUDDIN; KHAN, 2015; DONG et al., 2011; KASERER et al., 2015). Embora todos os modelos apresentam $AUC > 0,50$, apenas os modelos com $AUC > 0,90$ (**01, 04, 06, 12** – Figura 12) foram selecionados para avaliações subsequentes.

Figura 12. Curvas ROC obtidas para os modelos farmacofóricos gerados a partir de antagonistas do RA2B. AUC, área sob a curva.

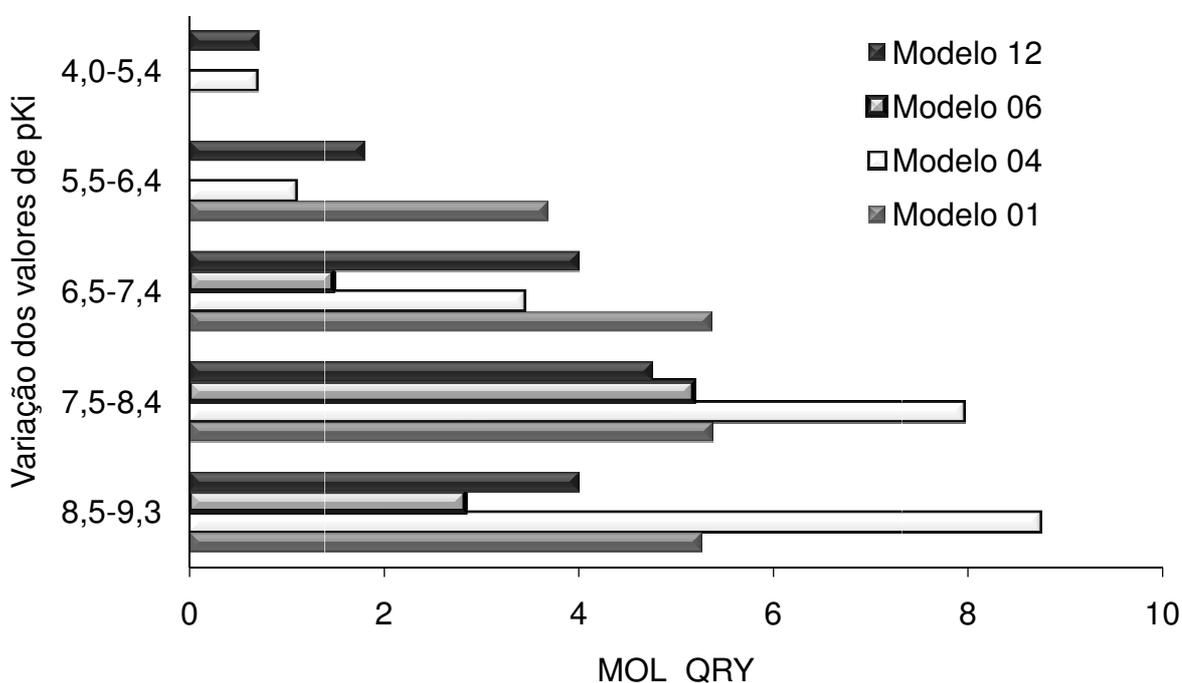


Fonte: Elaborado pelo autor.

Considerando que as diferenças nas atividades biológicas dos compostos podem ser racionalizadas com base na presença ou ausência de grupos químicos, representados por características farmacofóricas (KASERER et al., 2015), decidiu-se

investigar se os modelos com AUC >0,90 são úteis para classificar os ligantes de RA2B quanto a sua afinidade. Dessa forma, um conjunto de antagonistas do RA2B (287 moléculas com pK_i variando entre 4,0 e 9,3(CAROTTI et al., 2004; CHENG et al., 2010; FERNÁNDEZ et al., 2009; JOSEPH et al., 2008; STEFANACHI et al., 2008a, 2008b)foi alinhado nos quatro modelos, com auxílio do programa GALAHAD, e os valores de MOL_QRY foram relacionados com sua atividade biológica. Nessa etapa, o número restrito de moléculas investigado permitiu o emprego do programa GALAHAD e, por consequência, dos valores de MOL_QRY, queapresentam melhor correlação com atividadebiológica do que os valores de QFIT, como discutido anteriormente.Nessa perspectiva, ligantes de alta afinidade devem ter valores elevados de MOL_QRY, enquanto moléculas de baixa afinidade devem ter valores reduzidos de MOL_QRY. Apenas o modelo farmacofórico 04 segue esta tendência (Figura 13).

Figura 13. Relação entre ajuste farmacofórico (MOL_QRY) e atividade biológica relativa.

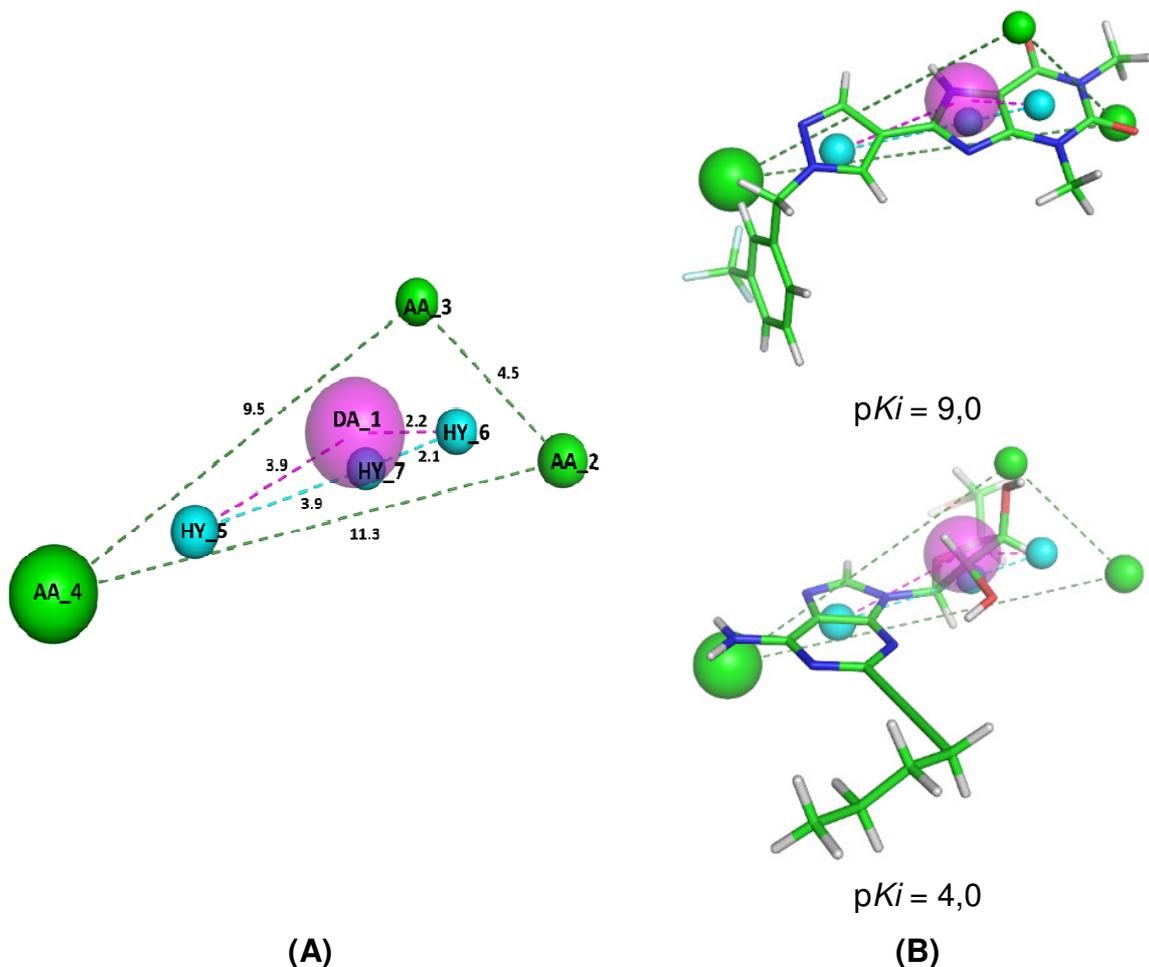


Fonte: Elaborado pelo autor.

A fim de demonstrar a utilidade desse modelo para explicar as relações entre a estrutura química e a atividade biológica de antagonistas já conhecidos de RA2B, foi feita uma análise mais detalhada desse modelo: Inicialmente, cabe destacar que o

modelo 4 consiste de três centros aceptores de ligação de hidrogênio (AA), um centro doador de ligação de hidrogênio (DA) e três centros hidrofóbicos (HY) (Figura 14A). Não foram definidas restrições quanto a orientações espacial dos doadores ou aceptores das ligações de H. Com base nesse modelo, um antagonista do RA2B de alta afinidade ($pK_i=9,0$) deve satisfazer todas as exigências farmacofóricas (Figura 14B). Enquanto que ligantes de baixa afinidade ($pK_i = 4,0$) apresentam apenas quatro características do modelo (Figura 14B), ou seja, a ausência de um doador de ligação de hidrogênio (DA_1), um aceptor de ligação de hidrogênio (AA_2) e de centro hidrofóbico (HY_6) estão relacionadas com a perda de afinidade.

Figura 14. Características farmacofóricas do modelo de antagonista RA2B. **(A)** AA = aceptor de ligação de hidrogênio; DA = doador de ligação de hidrogênio; HY = centro hidrofóbico. Todas as distancias são dadas em angstrom e o tamanho das esferas variam de acordo com o raio de tolerância. **(B)** Sobreposição de antagonistas conhecidos de RA2B de baixa afinidade ($pK_i=4,0$) e alta afinidade ($pK_i=9,0$).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Esses dados são corroborados pelo estudo de modelagem por homologia realizado por Cheng e colaboradores (2010), segundo o qual a carbonila da xantina (aceptor de ligação de hidrogênio) interage com resíduo Asn²⁵⁴ e a região hidrofóbica do anel azólico, ligado na posição 8 do anel xantina, promove interação com Phe¹⁷³ do RA2B.

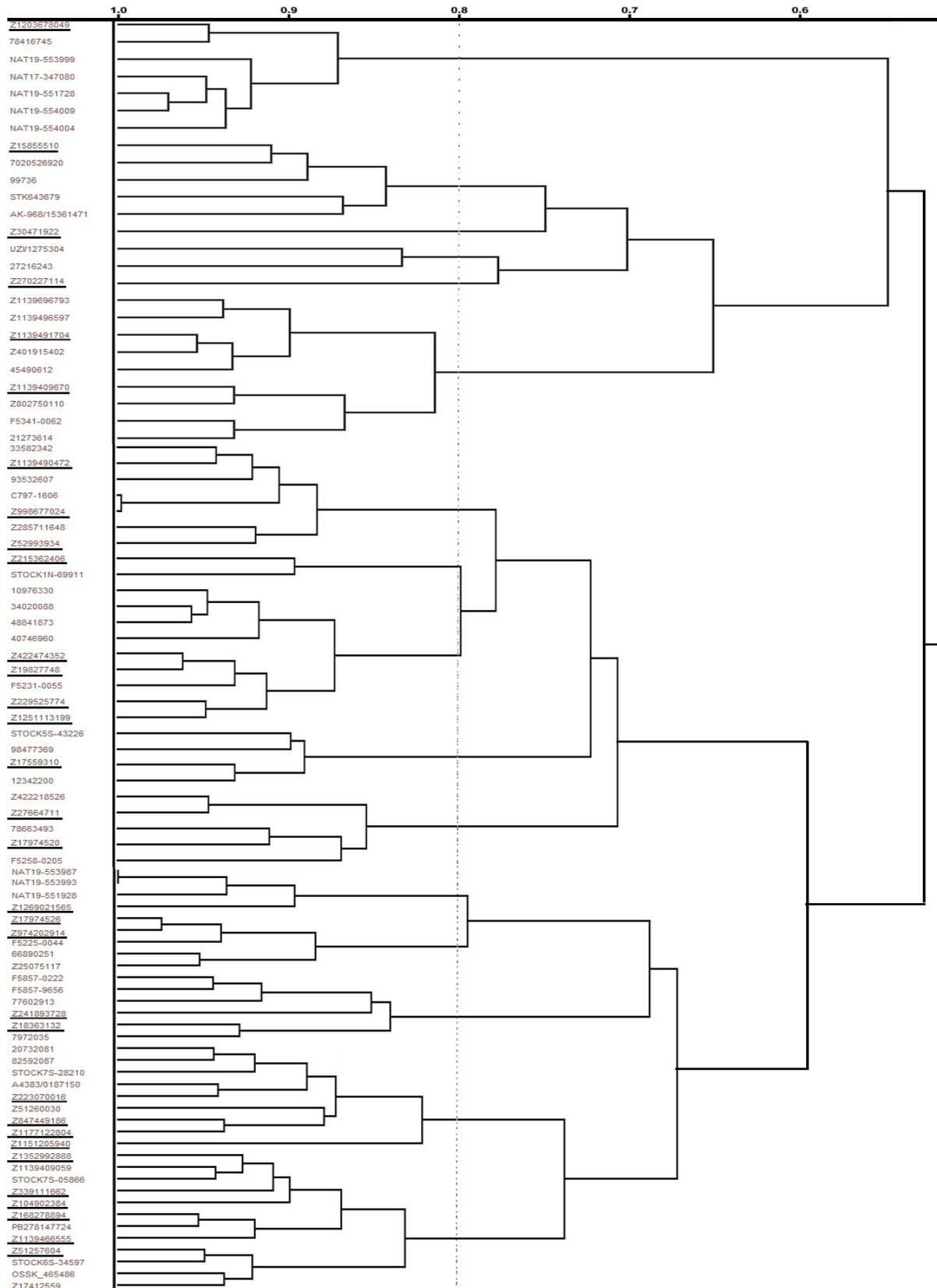
4.3 TRIAGEM VIRTUAL BASEADA NOS MODELOS FARMACOFÓRICOS

Um aspecto estratégico no desenvolvimento de ensaio virtual é a aplicação de filtros capazes de diminuir o número de compostos da base de dados a ser triado (BIELSKA et al., 2011; FAROUK; SELIM, 2011). Nesse contexto, compostos que apresentam propriedades similar a compostos líder (do inglês, *lead-like*) ou similar a fármaco (do inglês, *drug-like*) são comumente desejados para compor a base de dados para o ensaio virtual. Por isso, esses subconjuntos de compostos já se encontram pré-organizados na base ZINC (<http://zinc.docking.org/>). De um modo geral, as principais diferenças entre compostos líderes e fármacos estão no tamanho e complexidade das estruturas, características estas decorrente das várias modificações moleculares a que são submetidos os compostos-líderes até se converterem em fármacos (ANDRICOPULO; GUIDO; OLIVA, 2008; OPREA et al., 2001). Baseado nessas informações foi realizada a triagem de compostos líderes com o modelo farmacofórico 04. Essa estratégia permitiu a identificação de 88 moléculas com pontuação de ajuste farmacofórico (QFIT) variando entre 50 e 85.

Considerando a premissa de que moléculas estruturalmente similares possuem atividades biológica similares (MUEGGE; MUKHERJEE, 2016), não haveria necessidade de se avaliar experimentalmente todas as moléculas selecionadas, caso existisse similaridade estrutural elevada entre elas. A fim de investigar essa hipótese foi utilizada uma técnica multivariada, exploratória e não-supervisionada que tem por objetivo criar grupos homogêneos de moléculas com base nas similaridades ou diferenças entre as amostras do conjunto de dados (LEAL et al., 2016). De fato, a análise hierárquica de agrupamento (*Hierarchical Clusters Analysis* - HCA) sugere que existem 14 grupos, com 80% de similaridade entre si (Figura 15). Esse ponto de corte não foi determinado por critérios estatísticos (ex. incremento da heterogeneidade), mas sim porque compostos com similaridade igual ou superior a 80% geralmente apresentam atividade biológicas semelhantes (MARTIN; KOFRON; TRAPHAGEN, 2002; TEIXEIRA; FALCAO, 2013; ZHANG et al., 2015). Portanto,

avaliar compostos de um mesmo grupo resultaria em informações redundantes, enquanto a avaliação de moléculas de famílias diferentes deve fornecer informações complementares para o estudo das relações entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos bioativos. Por essa razão, pelo menos um composto de cada grupo foi selecionado para aquisição e, posterior, avaliação biológica. Cabe ressaltar que a disponibilidade e valor dos compostos foram utilizados como critério de desempate, na seleção dos compostos. Essa estratégia resultou na seleção de 33 compostos (Tabela 3), estruturalmente diversos, cuja atividade biológica está descrita nas próximas seções.

Figura 15. Similaridade química dos 88 compostos selecionados com o modelo 4, segundo análise hierárquica de agrupamentos usando distância euclidiana, método de união pelo vizinho mais distante e descritores calculados com auxílio do servidor NP-ChemGPS (<http://chemgps.bmc.uu.se/batchelor/queue.php?show=submit>).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 3. Compostos adquiridos para ensaios biológicos.

Código Zinc	Estrutura química	Código Zinc	Estrutura química
Z1139491704		Z241893728	
Z1269021565		Z223070016	
Z1139490472		Z1139466555	
Z30471922		Z1251113199	
Z17559310		Z847449186	
Z215362406		Z18363132	
Z270227114		Z52993934	
Z1139409670		Z339111662	
Z422474352		Z974202914	
Z17974520		Z19827748	
Z1151205940		Z17412559	

Z104902384		Z229525774	
Z17974526		Z1352992888	
Z1203678049		Z168278894	
Z51257604		Z27664711	
Z15855510		Z998677024	
Z1177122804			

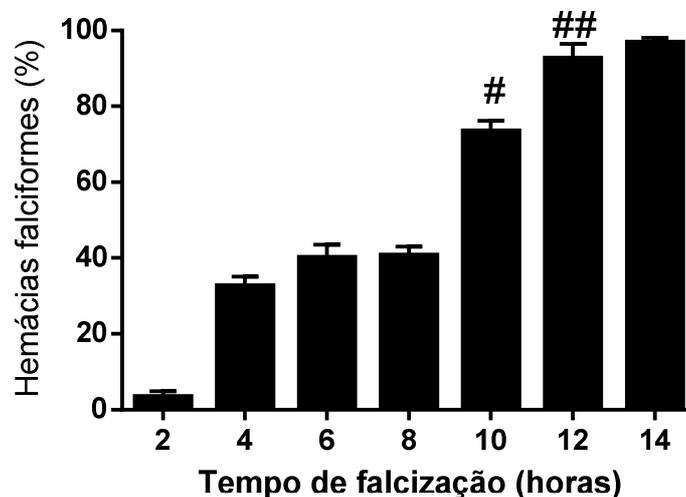
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 ENSAIOS ANTIFALCEMIA

Apesar do teste de falcemia ser um dos ensaios mais utilizados na triagem para compostos antifalcizantes (IMAGA, 2013; PAULINE et al., 2013; SIMEONE et al., 2012), a vedação incorreta/parcial das lamínulas pode gerar resultados incorretos (PRUDÊNCIO; COVAS; BONINI-DOMINGOS, 2000). A fim de eliminar essa limitação as lâminas foram mantidas sob vácuo, após vedação, e foi utilizado também um agente redutor (metabisulfito de sódio 2%) nos testes de falcização, a fim de acelerar a desoxigenação da hemoglobina S, conforme protocolo padrão estabelecido na literatura (HARCOURT; HARCOURT, 2012; NWAOGUIKPE; BRAIDE, 2012; SANDHYARANI; KUMAR, 2014). O tratamento de eritrócitos com metabisulfito de sódio 2% foi avaliado pela contagem de hemácias em microscópio óptico a cada duas horas, com auxílio de microscópio óptico. Essa estratégia permitiu determinar que após 14 horas de incubação, aproximadamente 100% das hemácias adotaram a forma de foice. No entanto, as análises

subsequentes dos testes antifalcizantes foram realizados em tempo médio de 12 horas, pois não há diferença estatística entre esse tempo e o período de 14 horas (Figura 16).

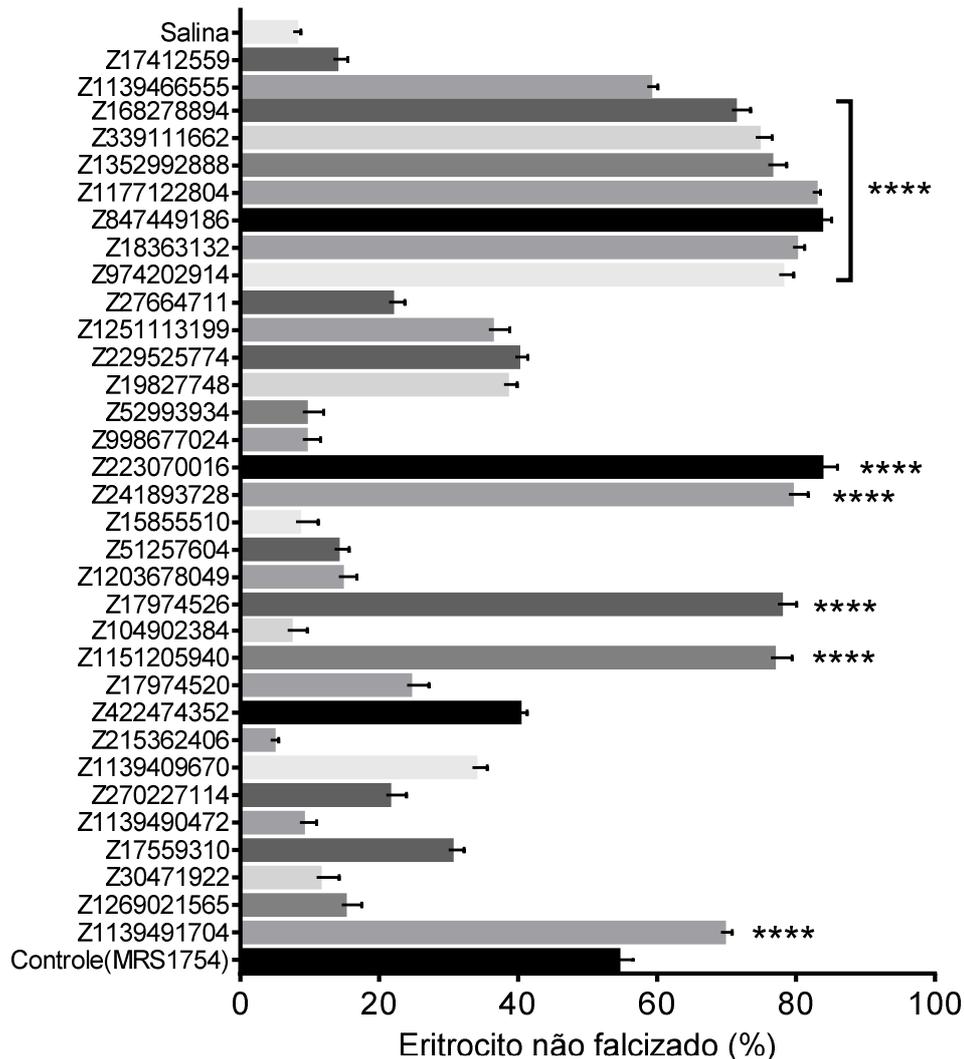
Figura 16. Falcização de hemácias de pacientes portadores de anemia falciforme em função do tempo, na presença de metabisulfito de sódio 2% a 37°C. Os dados foram apresentados como média \pm DPM (desvio padrão da média) de 5 amostras de 5 pacientes. # Indica diferença significativa $P < 0,0001$ (8 horas vs 10 horas) e ## $P < 0,0001$ (10 horas vs 12 horas), segundo ANOVA unidirecional (teste de Tukey).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A atividade antifalcizante das moléculas foi avaliada conforme ensaios descritos no parágrafo anterior. A concentração das moléculas (10 μ M) testadas em concentração única foi determinada de acordo com dados obtidos em estudo realizado com o antagonista conhecido MRS1754(ZHANG et al., 2011). De acordo com os testes de atividade antifalcizante, os compostos Z1139491704, Z1151205940, Z17974526, Z241893728, Z223070016, Z168278894, Z339111662, Z1352992888, Z1177122804, Z847449186, Z18363132, Z974202914 inibem o processo de falcização em mais de 70%, quando comparadas ao tratamento com salina (controle negativo) (Figura 17). Os outros compostos não apresentaram atividade antifalcizante ou suas atividades foram inferiores ao MRS1754.

Figura 17. Avaliação dos compostos com potencial antifalcizante

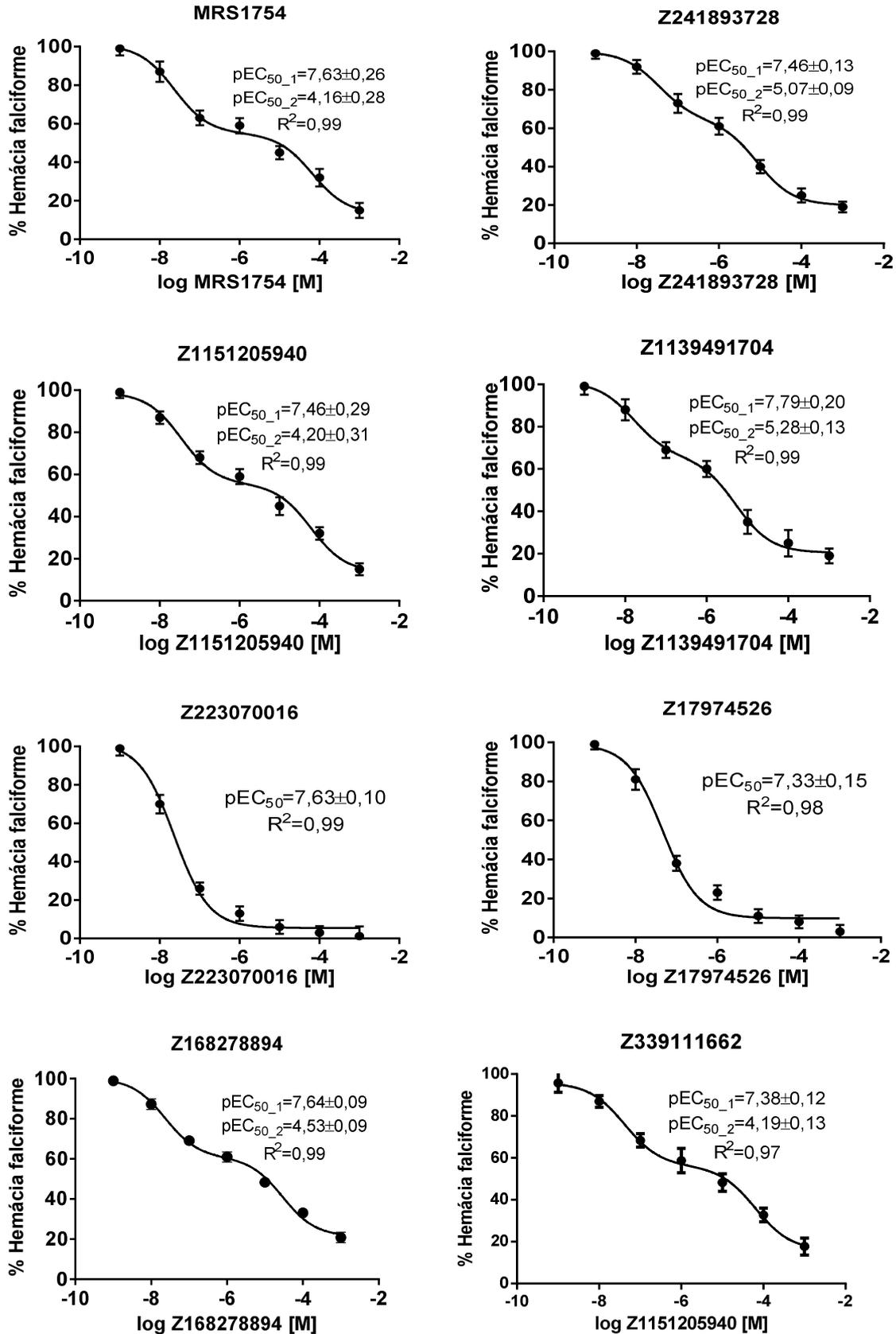


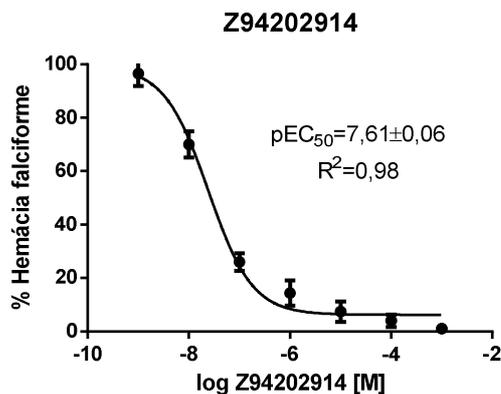
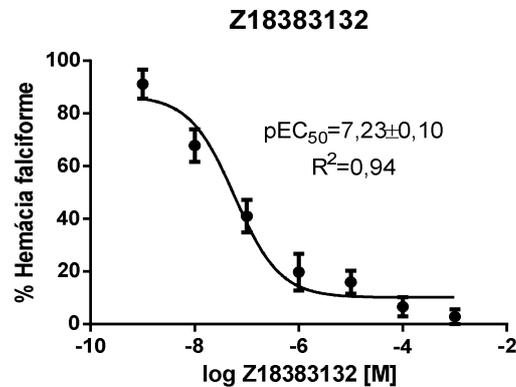
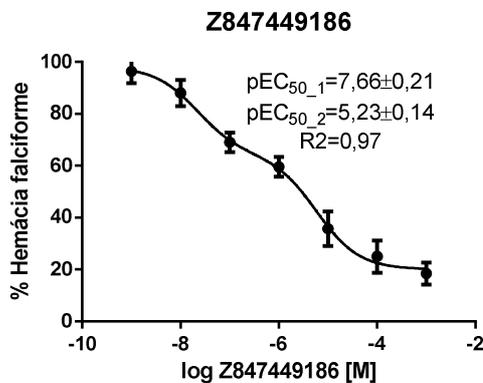
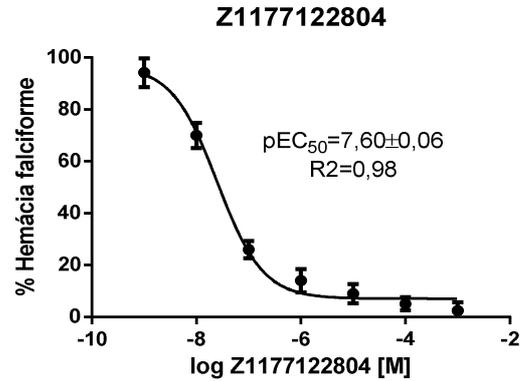
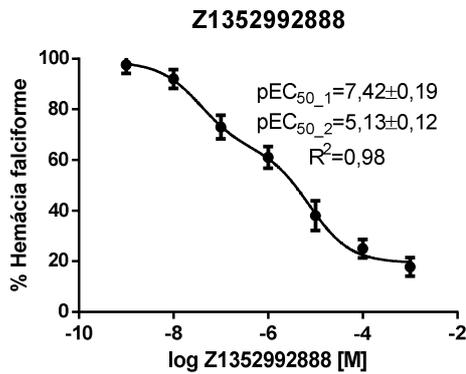
Avaliação antifalcizante de compostos (10 μ M) selecionados por triagem virtual. Os dados são apresentados como média \pm DPM de 5 amostras de 5 pacientes. Indica diferença significativa **** $P < 0,0001$, por ANOVA unidirecional (teste de Tukey), comparado ao controle (MRS1754).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Na concentração de 10 μ Mos compostos Z1139491704, Z1151205940, Z17974526, Z241893728, Z223070016, Z974202914, Z18363132, Z847449186, Z1177122804, Z1352992888, Z339111662, Z168278894 têm efeito antifalcizante maior que MRS1754, um antagonista comercial de RA2B (JI et al., 2001; STEFANACHI et al., 2008a), cuja atividade antifalcizante já é estabelecida na literatura (SUN et al., 2015; ZHANG et al., 2011). Entretanto, comparar a potência de compostos com base em ensaios de dose única pode levar a conclusão errôneas (GUHA, 2005). Portanto, os valores de EC50 desses compostos foram determinados (Figura 18).

Figura 18. Curva concentração resposta aos compostos identificados na triagem biológica. Dados são apresentados como média \pm DPM de 5 amostras de 5 pacientes.





Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise visual dos gráficos sugere um comportamento bifásico (MRS1754, Z241893728, Z1151205940, Z1139491704, Z168278894, Z339111662, Z1352992888, Z847449186) que pode estar relacionado com a ligação em alvo secundário. De fato, MRS1754 é conhecido por bloquear RA2B em concentração nanomolar, mas também se liga a outros receptores de adenosina na concentração

micromolar (IJZERMAN et al., 2017). Por essa razão, utilizou-se o método de regressão bifásica, considerando coeficientes de Hill iguais à unidade, para avaliar a potência dos compostos. De acordo com esta abordagem, o primeiro valor EC50 (EC50_1) é encontrado na faixa nanomolar enquanto que a segunda EC50 (EC50_2) tem escala micromolar. Este comportamento é compatível com alta afinidade de ligação a RA2B e baixa afinidade de ligação por outros receptores. Considerando esta hipótese, os compostos Z241893728 (pEC50 = 7,46 ± 0,15), Z1151205940 (pEC50 = 7,46 ± 0,11) e Z1352992888 (pEC50 = 7,42 ± 0,19) são ligeiramente menos potentes do que MRS1754 (pEC50 = 7,63 ± 0,12) contra RA2B. Por outro lado, Z1177122804 (pEC50 = 7,60 ± 0,06), Z168278894 (pEC50 = 7,64 ± 0,09) e Z847449186 (pEC50 = 7,66 ± 0,21) são equipotentes e Z1139491704 (pEC50 = 7,79 ± 0,17) é mais potente do que MRS1754 na inibição da falcização dos eritrócitos.

Considerando o segundo valor EC50, Z241893728 (pEC50 = 5,07 ± 0,10), Z1352992888 (pEC50 = 5,13 ± 0,12), Z847449186 (pEC50 = 5,23 ± 0,14) e Z1139491704 (pEC50 = 5,30 ± 0,12) são mais potentes contra o receptor secundário do que MRS1754 (pEC50 = 4,17 ± 0,13). Isso sugere que esses compostos são menos seletivos que o controle positivo. Em contraste com isso, a potência de Z1151205940 (pEC50 = 4,21 ± 0,12), Z339111662 (pEC50 = 4,19 ± 0,13) contra o receptor secundário é semelhante à de MRS1754.

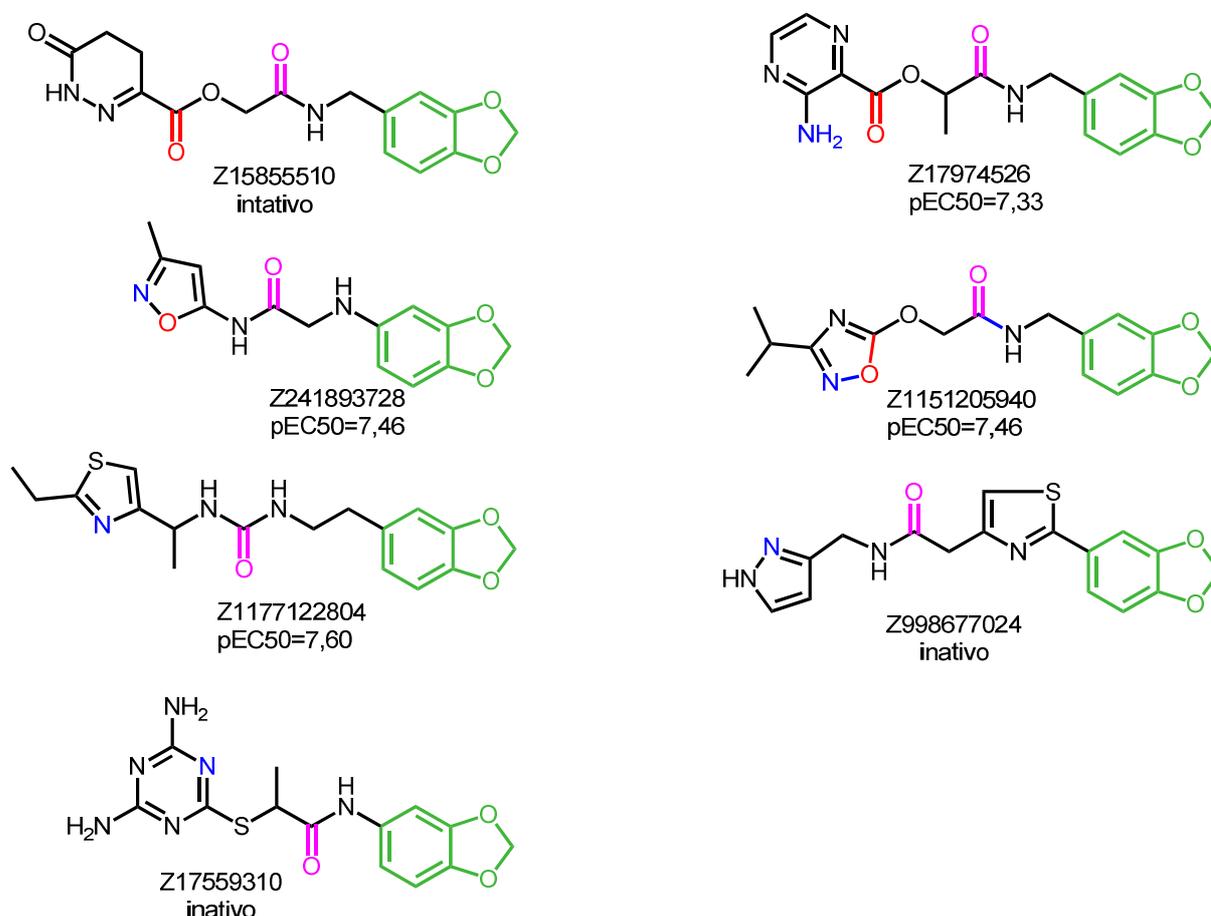
Curiosamente, Z18363132 (pEC50 = 7,23 ± 0,10), Z17974526 (pEC50 = 7,33 ± 0,06), Z1177122804 (pEC50 = 7,60 ± 0,06), Z974202914 (pEC50 = 7,61 ± 0,06) e Z223070016 (pEC50 = 7,63 ± 0,05), mostram um comportamento de curva sigmoide clássica que é compatível com menor ligação a receptores secundários. Além disso, Z1177122804, Z974202914 e Z223070016 possuem potências equivalentes ao MRS1754. No entanto possuem maior seletividade, ainda que concentrações acima da faixa micromolar sejam utilizadas.

4.5 ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE A ESTRUTURA QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DAS MOLÉCULAS COM ATIVIDADE ANTIFALCIZANTE

Na tentativa de esclarecer os determinantes químicos e estéreos que influenciam na atividade biológica, as estruturas da classe de compostos (derivados do benzodioxol) identificadas na etapa de triagem foram analisadas visualmente.

Os derivados de benzodioxol identificados neste estudo podem ser divididos em três partes: benzodioxol, grupo espaçador (entre o benzodioxol e a carbonila) e uma região com estrutura química diversa. O Z15855510 possui na estrutura diversa uma piridazinona que contribui para eliminação da atividade antifalcemia do composto. Isso pode estar relacionado a impedimento estéreo promovido pela carbonila da piridazinona. Por outro lado, o composto Z17974526 não possui substituinte na posição *para* da estrutura diversa (pirazina amina), por isso esse composto apresenta pEC50 igual a 7,33. A influência do volume na região de estrutura diversa pode ser confirmada quando se observa o composto Z241893728 (pEC50 = 7,46). Nessa região o composto possui menor volume, quando comparados aos compostos citados anteriormente. Além disso, observa-se também que a amina presente no grupo espaçados do Z241893728 não influencia na atividade dos compostos, já que mudança na posição desse grupo químico não altera a atividade antifalcemia, como pode ser observado para o composto Z1151205940 (pEC50 = 7,46). O Z1177122804 é composto da classe dos benzodioxol com maior potência (pEC50 = 7,60). A alta atividade desse composto está relacionada ao grupo espaçador maior, em relação aos outros compostos da classe. Isso sugere que a distância entre a carbonila e o benzodioxol, separados por mais que dois átomos, é favorável a atividade antifalcemia. Essa observação pode ser confirmada quando se verifica a estrutura do espaçador do composto Z17559310 (composto inativo), que possui apenas um átomo entre a carbonila e o benzodioxol. A proximidade entre esses dois grupos químicos pode estar associada a inatividade do composto Z17559310. Outro fator que pode eliminar a atividade dos compostos está associado a rigidez do grupo espaçador. Observa-se no composto Z998677024 um grupo químico tiazol entre a carbonila e o benzodioxol. A inserção desse anel rígido parece ser responsável pela eliminação da atividade antifalcemia do composto Z998677024.

Figura 19. Estrutura química dos compostos derivados do benzodioxol e seus respectivos valores de atividade antifalcemia. Os compostos que não apresentaram atividade antifalcemia maior que 50% nos testes de dose única e que não tiveram os valores de pEC50 definidos foram considerados inativos.



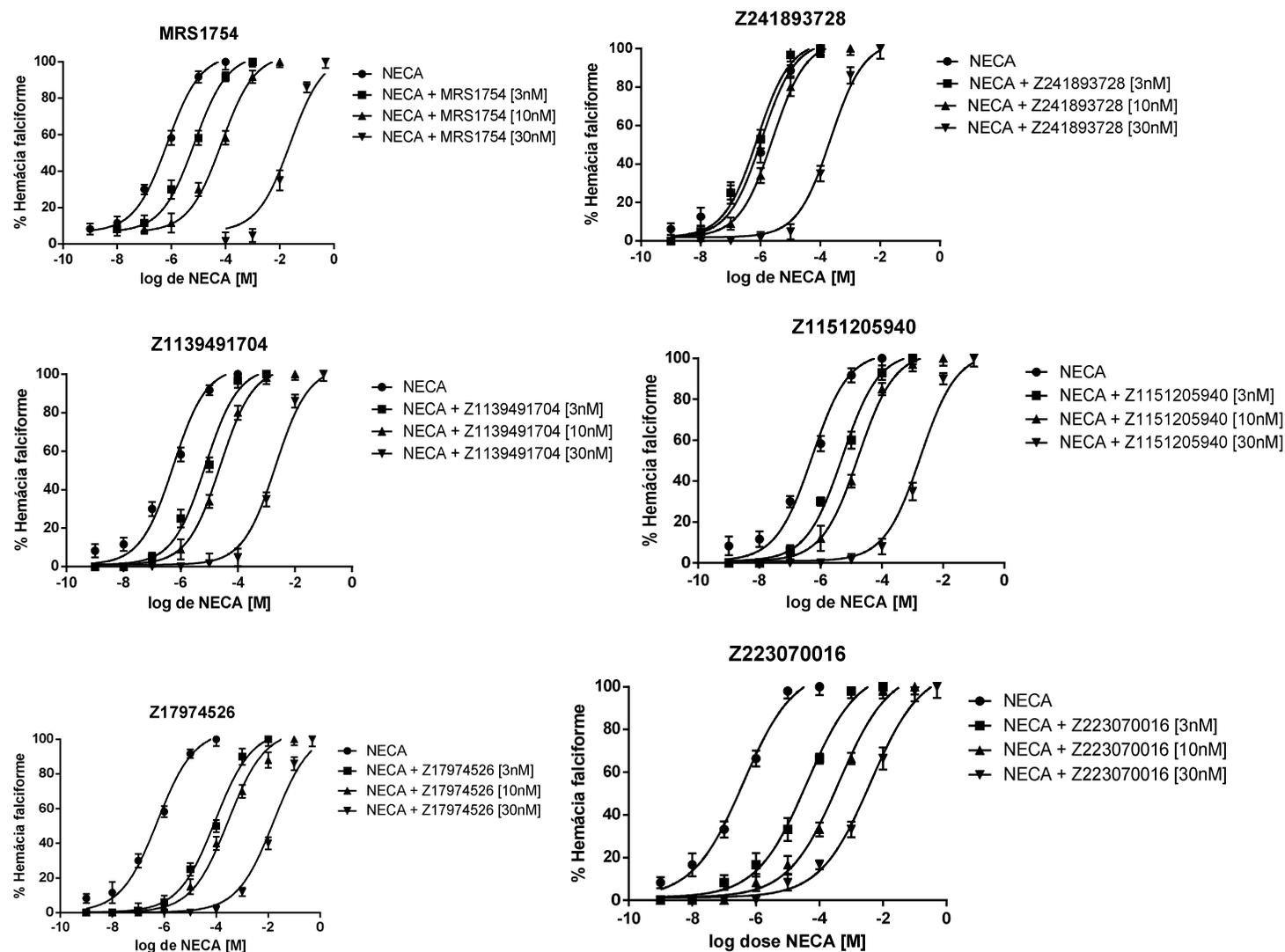
4.6 ANÁLISES DA LIGAÇÃO COMPETITIVA

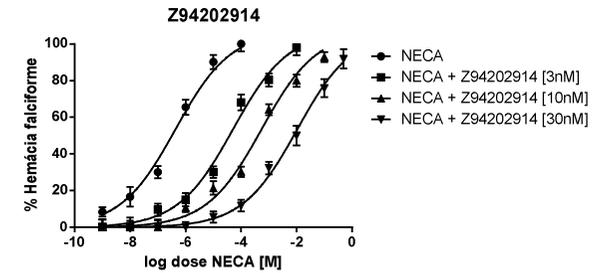
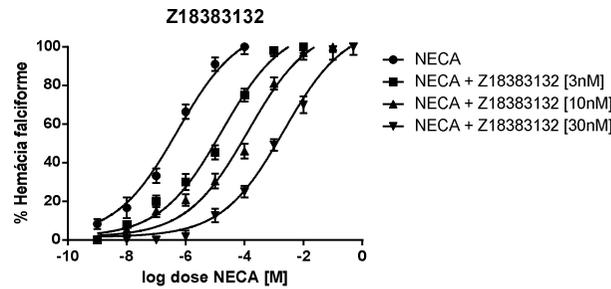
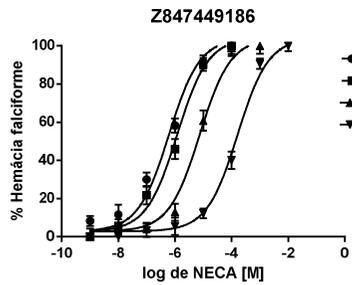
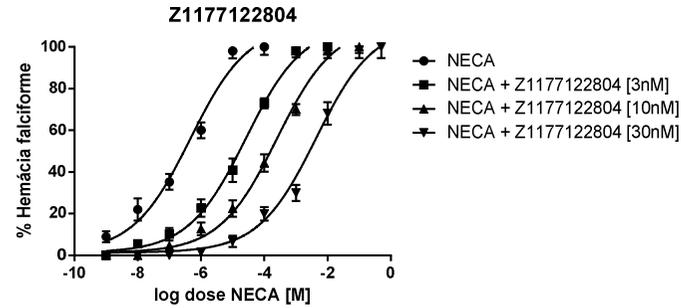
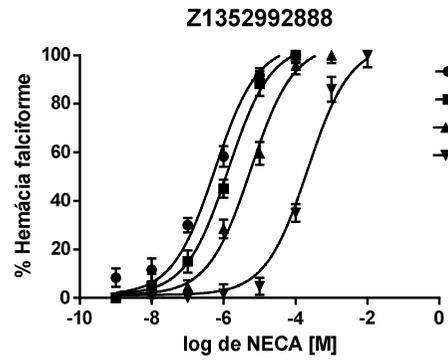
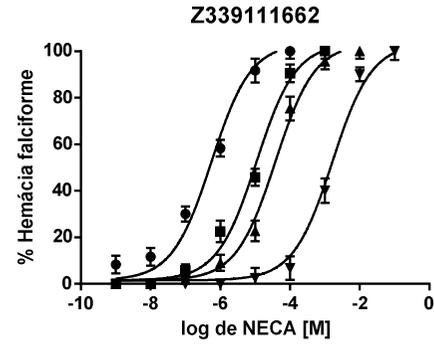
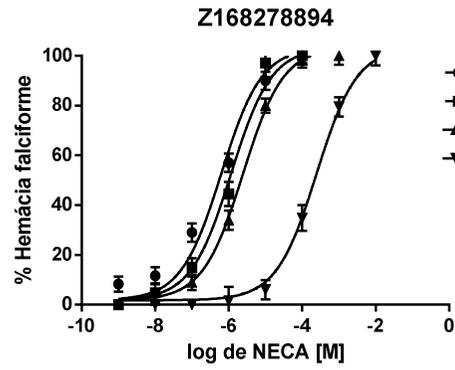
Embora os resultados da análise de antifalcizantes sejam promissores, eles não comprovam que os efeitos antifalcizantes observados são decorrentes da modulação de RA2B. A fim de verificar essa hipótese investigou-se a capacidade dos compostos Z1139491704, Z1151205940, Z17974526, Z241893728, Z223070016, Z168278894, Z339111662, Z1352992888, Z847449186, Z1177122804, Z18363132, Z974202914 bloquearem a ação de um agonista de RA2B (NECA), conforme estabelecido na literatura (HIDE et al., 1992).

As curvas concentração-efeito do NECA obtidas na presença dos compostos testes foram deslocadas para a direita de forma concentração dependente (Figura 20), o que pode ser atribuído a diminuição do valor da afinidade intrínseca do NECA por RA2B. O deslocamento da curva do NECA foi superior a duas unidades logarítmicas quando Z17974526 (2,33), Z223070016 (2,14) e Z974202914 (2,24) foram

adicionados individualmente em cada teste na concentração de 30nM. Da análise dos resultados obtidos para as incubações com os outros compostos, nesta mesma concentração, há um deslocamento da curva para a direita com redução da potência do NECA pouco acentuada, com menos de 1,5 unidades logarítmicas. Porém, quando comparados com o MR1754 (1,13), os compostos Z1139491704 (1,26) e Z339111662 (1,43) apresenta maior deslocamento da curva do NECA na menor concentração testada, demonstrando a eficiência desses compostos no bloqueio do RA2B.

Figura 20. Curva concentração resposta ao NECA na ausência ou presença de compostos identificados na triagem biológica. Dados são apresentados como média \pm DPM de 5 amostras de 5 pacientes.





Fonte: Elaborado pelo autor.

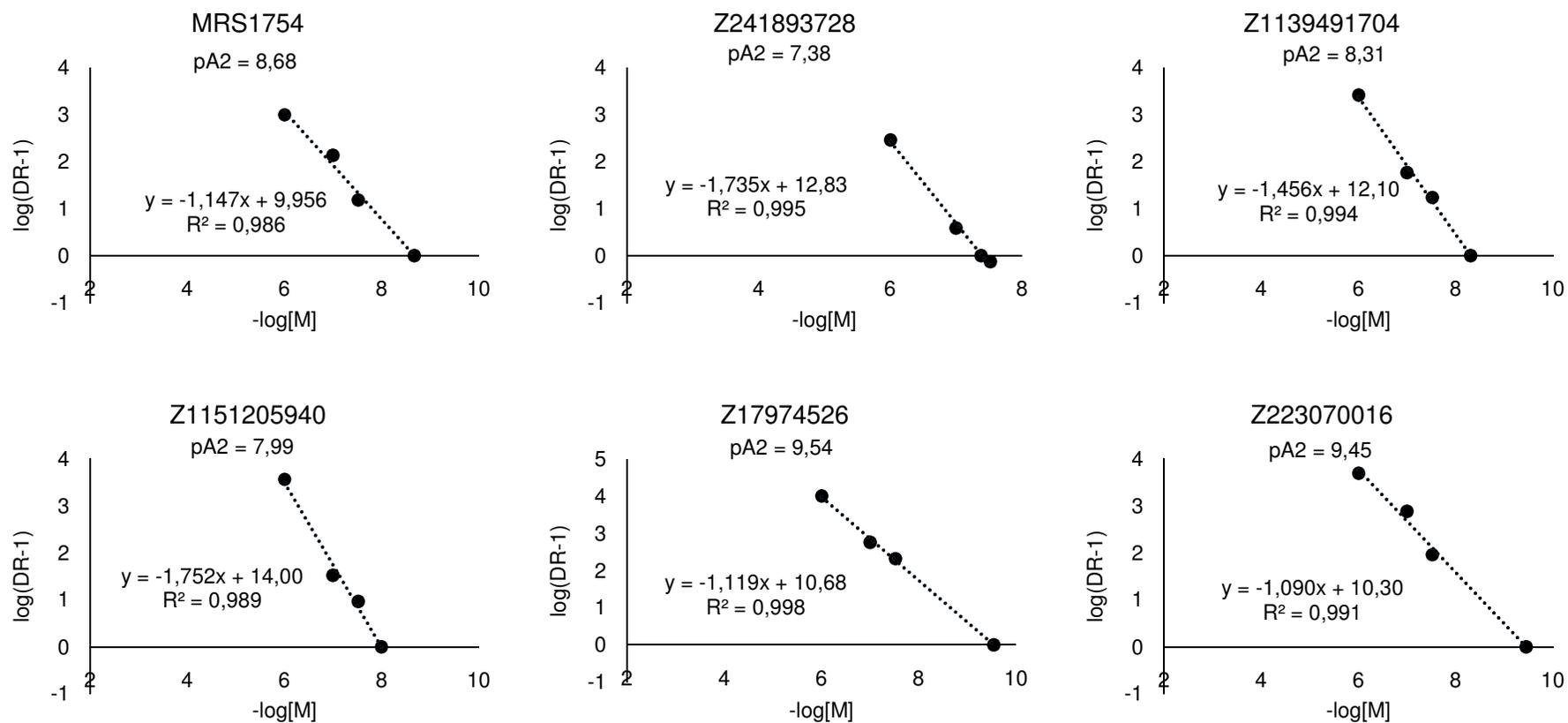
O deslocamento da curva concentração-resposta do NECA para a direita sugere uma ação antagonista competitiva para os compostos Z1139491704, Z1151205940, Z17974526, Z241893728, Z223070016, Z168278894, Z339111662, Z1352992888, Z847449186, Z1177122804, Z18363132, Z974202914. A fim de sustentar essa hipótese foram calculados o coeficiente de regressão e a potência (pA_2) antagonista para esses compostos (COLQUHOUN, 2007). A variável pA_2 expressa numericamente a afinidade do antagonista em deslocar a curva concentração efeito (CCE) para a direita. pA_2 equivale a concentração de antagonista competitivo necessária para deslocar a CCE do agonista num fator 2 para a direita - na prática significa que para obter o mesmo efeito é necessário o dobro da quantidade de agonista (NEUBIG et al., 2003). Os valores de pA_2 , obtidos a partir do cálculo da equação de Schild (KENAKIN, 1982) (Figura 21) sugere que os compostos Z17974526 ($pA_2=9,54$), Z223070016 ($pA_2=9,45$), Z1177122804 ($pA_2=9,13$), Z18363132 ($pA_2=9,03$) e Z974202914 ($pA_2=9,35$) foram superiores ao controle MRS1754 ($pA_2=8,68$) em termo de afinidade. As diferenças de 0,86 e 0,77 unidades entre os valores de pA_2 para Z17974526, Z223070016, permitem concluir que esses compostos são pelo menos 7 e 6 vezes mais potentes que o controle. Além disso, os valores de coeficiente angular (Figura 21), obtidos a partir das retas de regressão de Schild, sugerem que esses compostos são antagonistas competitivos.

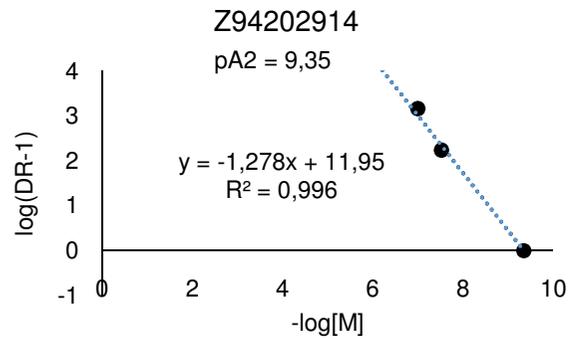
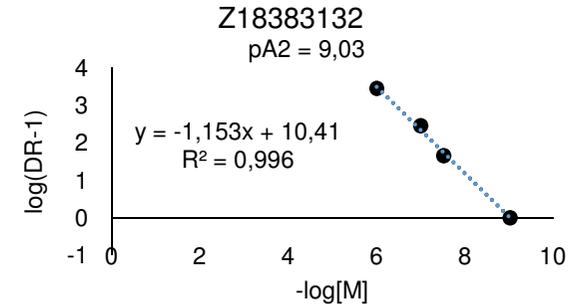
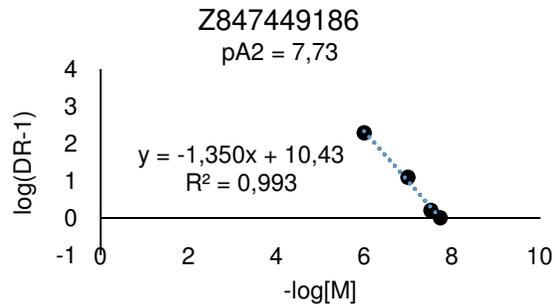
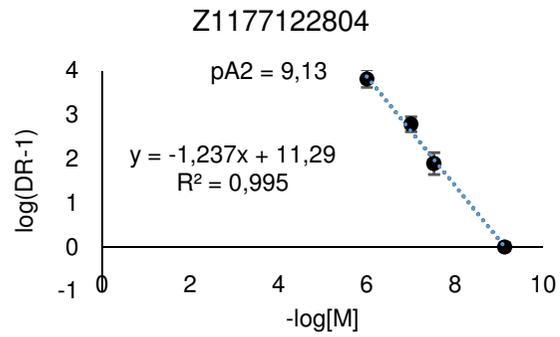
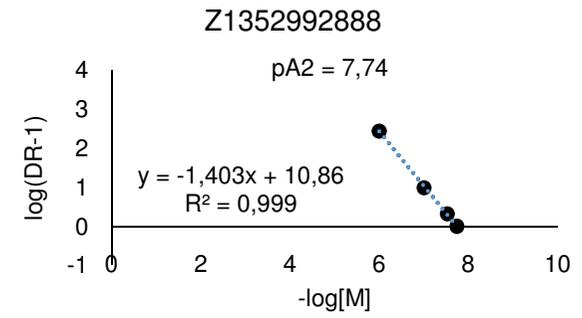
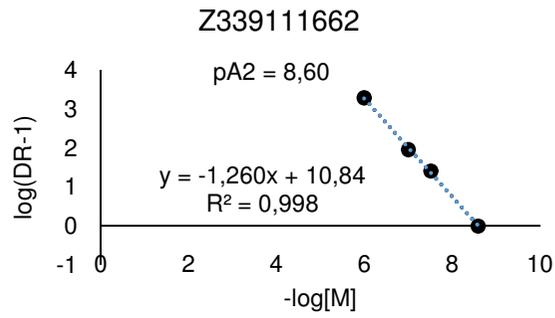
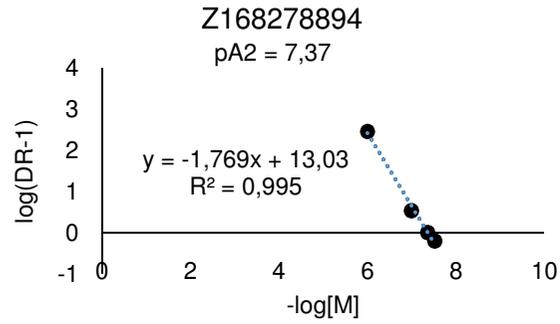
Além disso, os valores de pA_2 determinados para os compostos Z17974526, Z223070016, Z1177122804, Z18363132 e Z974202914 também se demonstraram superiores a outros antagonistas do RA2B descritos na literatura. Por exemplo, a potência do antagonista MRE2029-F20 tem pA_2 igual a 7,8 (GESSI et al., 2005); cinco compostos derivados de deaxantina possuem valores de pA_2 inferiores a 8,0 (STEFANACHI et al., 2008a); nos resultados apresentados por Alexander e colaboradores (1996), o valor de pA_2 para o antagonista de RA2B mais potente (amino xantina – XAC) foi de 7,89.

Apesar da maioria dos compostos testado neste estudo terem demonstrado potência em antagonizar os efeitos do NECA, as análises de regressão linear através do método proposto por Schild revelou que os compostos Z241893728, Z1139491704, Z1151205940, Z168278894, Z1352992888, Z847449186 não parecem interagir com o RA2B através de um mecanismo competitivo clássico, considerando que os

valores de coeficiente angular calculados foram significativamente diferentes da unidade (regressão linear - Figura 21).

Figura 21. Gráfico de Schild para os compostos Z1151205940, Z17974526, Z241893728, Z223070016 Z1139491704 e antagonista conhecido MRS1754 frente ao NECA. Dados obtidos de 5 experimentos para cada concentração, com amostras de diferentes pacientes. As barras verticais nos pontos representam o erro padrão da média. [M] é a concentração de cada composto.

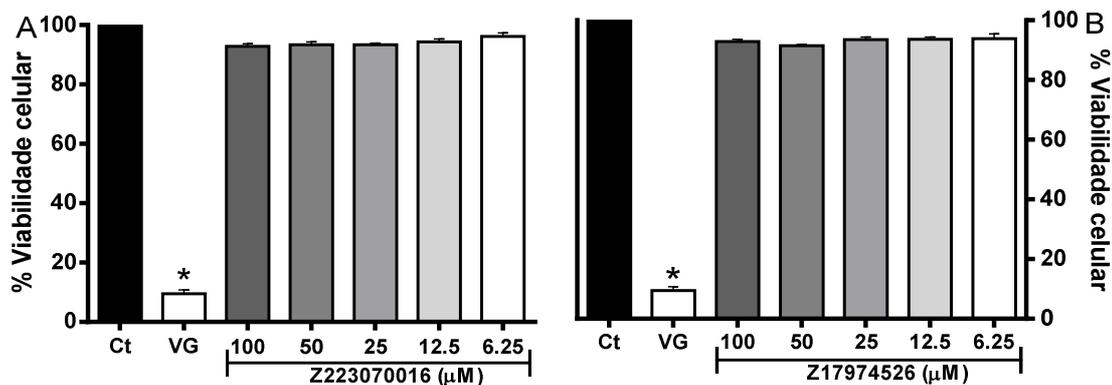




Fonte: Elaborado pelo autor.

A avaliação biológica apresentou compostos, identificados na triagem farmacofórica, capazes de inibir a falcização de hemácias, confirmando suas propriedades como agentes antifalcizantes. No entanto, outro requerimento estabelecido pela OMS para bons candidatos a fármacos é a sua segurança. Os testes de toxicidade celular fornecem as primeiras informações sobre a segurança dos compostos em teste. Sendo assim, para verificar a toxicidade dos compostos foi conduzido o teste de citotoxicidade para os dois compostos com maior valor de pA2 (Z17974526 e Z223070016) em células de mamífero, pelo método colorimétrico Alamar Blue. Na concentração de 100µM ou inferior os compostos Z17974526 e Z223070016 não induziram efeito citotóxico em macrófagos J774 (Figura 22). Por tanto, os resultados desse ensaio sugerem que os compostos mais ativos possuem citotoxicidade insignificante em células de mamíferos, nas condições testadas.

Figura 22. Efeito citotóxico de Z17974526 e Z223070016 em células de mamífero. As células de macrófagos J774 foram incubadas com veículo (DMSO a 5% em solução salina, Ct, grupo de controlo) ou diferentes concentrações de Z223070016 (100, 50, 25, 12,5 ou 6,25 µM, painel A) ou Z17974526 (100, 50, 25, 12,5 ou 6,25 µM) durante 24 h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio Alamar Blue. Utilizou-se violeta de genciana (GV) como controlo positivo. Os valores representam as médias \pm SEM de três determinações obtidas em uma das três experiências realizadas. * indica significância das culturas tratadas com veículo ($p < 0,05$). ANOVA seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

5.1 CONCLUSÃO

O uso de estratégia de triagem virtual baseada em farmacóforo mostrou-se uma ferramenta eficiente na identificação de compostos com atividade antifalcemia. A partir da estratégia de triagem virtual baseada em antagonista do RA2B, foi possível selecionar 12 compostos capazes de evitar o processo de falcização, levando em conta informações relativas à estrutura química de compostos de referência, evidenciando que, embora seja menos dispendiosa se comparada a triagem virtual baseada na estrutura da proteína alvo, esta técnica é robusta e possui grande potencial para identificação de compostos protótipos.

Os ensaios biológicos confirmaram que 12 compostos efetivamente atuam como antifalcizantes e com fortes evidências de que suas atividades estão relacionadas ao bloqueio do RA2B, sendo que os efeitos principais foram competitivos. Dentre os resultados destaca-se a maior potência (pA_2) para 5 compostos em comparação com o controle. Quanto menor a potência de um fármaco e maior a dose necessária, maior será a probabilidade de que outros sítios de ação, que não o primário, tenham importância. Em termos clínicos, isto está frequentemente associado ao aparecimento de efeitos adversos não desejados. Nesse contexto, os compostos Z17974526, Z223070016 parecem ser interessantes já que apresentam potência seis vezes superior ao MRS1754; e os compostos Z1177122804, Z18363132 e Z974202914 duas vezes maior.

5.1 PERSPECTIVAS

O processo de identificação de novos fármacos para tratamento da anemia falciforme, realizado nesta pesquisa, deu os seus primeiros passos com a identificação de compostos com atividade antifalcemia. No entanto, apesar de termos forte indício de que o mecanismo de ação dos compostos testados está relacionado ao bloqueio do RA2B, a solidez desses achados será confirmada com ensaios de determinação do acúmulo de AMPc. Essa técnica irá fornecer informações diretas da ação dos compostos em RA2B.

Paralelamente aos estudos de determinação do acúmulo de AMPc, será analisada a ação combinada da hidroxiuréia com os compostos ativos. A hidroxiuréia é um fármaco eficiente na redução dos sintomas da anemia falciforme, porém significantes efeitos adversos estão relacionados a esse fármaco. Um efeito sinérgico dos composto identificados na triagem virtual com a hidroxiuréia pode resultar em redução da dose desse fármaco e, conseqüentemente, diminuição dos efeitos adversos.

REFERÊNCIAS

ADEWOYIN, A. S.; OBIECHE, J. C. Hypertransfusion therapy in sickle cell disease in Nigeria. **Advances in Hematology**, v. 2014, 2014.

AL-NADAF, A. H.; TAHA, M. O. Discovery of new renin inhibitory leads via sequential pharmacophore modeling, QSAR analysis, in silico screening and in vitro evaluation. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 6, p. 843–864, 2011.

ALEXANDER, S. P. et al. Characterization of the human brain putative A2B adenosine receptor expressed in Chinese hamster ovary (CHO.A2B4) cells. **British journal of pharmacology**, v. 119, n. 6, p. 1286–90, 1996.

ALLI, L. A.; OKOH, M. P. Phyto-Medicine in Gene(s) Targeting Future Direction for Sickle Cell Disease Management. **Hereditary Genetics: Current Research**, v. 5, n. 2, p. 1–10, 2016.

ANDRICOPULO, A. D.; GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. Virtual Screening and Its Integration with Modern Drug Design Technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2008.

APAROY, P.; REDDY, K. K.; REDDANNA, P. Structure and ligand based drug design strategies in the development of novel 5- LOX inhibitors. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 22, p. 3763–78, 2012.

ASANO, T. et al. Aminophylline suppresses stress-induced visceral hypersensitivity and defecation in irritable bowel syndrome. **Scientific Reports**, v. 7, n. July 2016, p. 40214, 2017.

ATAGA, K. I. Novel therapies in sickle cell disease. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. **American Society of Hematology**, p. 54–61, 2009.

ATHRI, P. et al. Pharmacophore model for pentamidine analogs active against Plasmodium falciparum. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 6147–6151, 2010.

AWUNI, Y.; MU, Y. Reduction of false positives in structure-based virtual screening when receptor plasticity is considered. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 5152–5164, 2015.

BALLESTER, P. J. et al. Hierarchical virtual screening for the discovery of new molecular scaffolds in antibacterial hit identification Hierarchical virtual screening for the discovery of new molecular scaffolds in antibacterial hit identification. **J. R. Soc. Interface**, v. 9, p. 3196–3207, 2012.

BARALDI, P. G. 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, n. 2–3, p. 225–235, 2001.

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, n. 1–2, p. 406–415, 2001.

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. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 6, p. 1434–1447, 2004.

BEN, D. D. et al. GPCRs as therapeutic targets: a view on adenosine receptors structure and functions, and molecular modeling support. **J. Iran. Chem. Soc.**, v. 2, n. 3, p. 176–188, 2005.

BENDER, A. Studies on Molecular Similarity. **Darwin**, n. November, 2005.

BEUKERS, M. W.; MEURS, I.; IJZERMAN, A. P. Structure-affinity relationships of adenosine A2B receptor ligands. **Medicinal Research Reviews**, v. 26, n. 5, p. 667–698, 2006.

BIELSKA, E. et al. Virtual screening strategies in drug design - methods and applications. **Biotechnologia**, v. 92, n. 3, p. 249–264, 2011.

BRASIL. **Manual da Anemia Falciforme para a População - Série A. Normas e Manuais Técnicos**. 1. ed. Brasília: [s.n.].

BUCHANAN, G. et al. Severe Sickle Cell Disease-Pathophysiology and Therapy. **Biology of Blood and Marrow Transplantation**, v. 16, n. 1 SUPPL., p. S64–S67, 2010.

CABALLERO, J. 3D-QSAR (CoMFA and CoMSIA) and pharmacophore (GALAHAD) studies on the differential inhibition of aldose reductase by flavonoid compounds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 3, p. 363–371, 2010.

CANÇADO, R. D. Doenças Falciformes. **Prática Hospitalar**, v. 2, n. 50, p. 61–64, 2007.

CANTÚ, I.; PHILIPSEN, S. Flicking the switch: Adult hemoglobin expression in erythroid cells derived from cord blood and human induced pluripotent stem cells. **Haematologica**, v. 99, n. 11, p. 1647–1649, 2014.

CAROTTI, A. et al. 8-Substituted-9-deazaxanthines as adenosine receptor ligands: Design, synthesis and structure-affinity relationships at A 2B. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 10, p. 879–887, 2004.

CAVASOTTO, C. N.; ORRY, A. J. Ligand docking and structure-based virtual screening in drug discovery. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 7, n. 10, p. 1006–1014, 2007.

CHATURVEDI, S.; DEBAUN, M. R. Evolution of sickle cell disease from a life-threatening disease of children to a chronic disease of adults: The last 40 years. **American Journal of Hematology**, v. 91, n. 1, p. 5–14, 2016.

CHEN, J.-Z.; MYINT, K.-Z.; XIE, X.-Q. New QSAR prediction models derived from

GPCR CB2-antagonistic triaryl bis-sulfone analogues by a combined molecular morphological and pharmacophoric approach. **SAR and QSAR in environmental research**, v. 22, n. January, p. 525–544, 2012.

CHENG, F. et al. Insights into binding modes of adenosine A2B antagonists with ligand-based and receptor-based methods. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 8, p. 3459–3471, 2010.

CHIKEZIE, P. C.; CHIKEZIE, C. M.; AMARAGBULEM, P. I. Polymerization of human sickle cell haemoglobin (HbS) in the presence of three antimalarial drugs. **African Journal of Biochemistry Research**, v. 5, n. 2, p. 39–42, 2011.

CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. **IUBMB Life**, v. 64, n. 1, p. 72–80, 2012.

CHIU, T. L.; AMIN, E. A. Development of a comprehensive, validated pharmacophore hypothesis for anthrax toxin lethal factor (LF) inhibitors using genetic algorithms, pareto scoring, and structural biology. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 7, p. 1886–1897, 2012.

CHRISTAKIS, J. et al. INTRAVENOUS OXPENTIFYLLINE AND THE PAINFUL CRISIS OF SICKLE CELL DISEASE KEY WORDS : v. 10, p. 35–42, 1990.

CLARK, R. D.; ABRAHAMIAN, E. Using a staged multi-objective optimization approach to find selective pharmacophore models. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, n. 11, p. 765–771, 2009.

COLQUHOUN, D. Why the Schild method is better than Schild realised. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 12, p. 608–614, 2007.

CORDOVIL, K. et al. Revisão das Propriedades Mediciniais de *Cajanus cajan* Doença Falciforme. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1199–1207, 2015.

COTTRELL, S. J.; GILLET, V. J.; TAYLOR, R. Incorporating partial matches within multiobjective pharmacophore identification. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 20, n. 12, p. 735–749, 2007.

CURY, D. et al. Ocular lesions in sickle cell disease patients from Bahia, Brazil. **Revista Brasileira De Oftalmologia**, v. 69, n. 4, p. 259–263, 2010.

DANISHUDDIN, M.; KHAN, A. U. Structure based virtual screening to discover putative drug candidates: Necessary considerations and successful case studies. **Methods**, v. 71, n. 135–145, 2015.

DE FILIPPO, E. et al. Role of extracellular cysteine residues in the adenosine A2A receptor. **Purinergic Signalling**, v. 12, n. 2, p. 313–329, 2016.

DEBAUN, M. R. Hydroxyurea therapy contributes to infertility in adult men with sickle cell disease: a review. **Expert Review of Hematology**, v. 7, n. 6, p. 767–773, 2014.

DEUS-SILVA, L. et al. Brain Perfusion Impairment in Neurologically Asymptomatic

Adult Patients with Sickle-Cell Disease Shown by Voxel-Based Analysis of SPECT Images. **Frontiers in Neurology**, v. 4, p. 1–6, 2013.

DIEZ-SILVA, M. et al. Shape and Biomechanical Characteristics of Human Red Blood Cells in Health and Disease. **MRS bulletin / Materials Research Society**, v. 35, n. 5, p. 382–388, 2010.

DONG, X. et al. Pharmacophore identification, virtual screening and biological evaluation of prenylated flavonoids derivatives as PKB/Akt1 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 12, p. 5949–5958, 2011.

DOS SANTOS, J. L.; CHIN, C. M. Anemia falciforme: Desafios e avanços na busca de novos fármacos. **Quimica Nova**, v. 35, n. 4, p. 783–790, 2012.

DRISCOLL, C. M. Sickle cell disease. **Pediatr. Rev.**, v. 28, n. 7, p. 259–268, 2007.

EGUNYOMI, A.; MOODY, J. O.; ELETU, O. M. Antisickling activities of two ethnomedicinal plant recipes used for the management of sickle cell anaemia in Ibadan, Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 1, p. 20–25, 2009.

EISENSTEIN, A.; PATTERSON, S.; RAVID, K. The Many Faces of the A2b Adenosine Receptor in Cardiovascular and Metabolic Diseases. **Journal of Cellular Physiology**, v. 230, n. 12, p. 2891–2897, 2015.

ELOKELY, K. M.; DOERKSEN, R. J. Docking challenge: Protein sampling and molecular docking performance. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 8, p. 1934–1945, 2013.

ENGLEBIENNE, P.; MOITESSIER, N. Docking ligands into flexible and solvated macromolecules. 5. Force-field-based prediction of binding affinities of ligands to proteins. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 11, p. 2564–2571, 2009.

FAROUK, F.; SELIM, S. The Human Adenosine A2B Receptor: Homology Modeling, Virtual Screening, and Computer-aided Drug Design. **Outlook**, 2011.

FELIX, A. A.; SOUZA, H. M.; RIBEIRO, S. B. F. Aspectos epidemiológicos e sociais da doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 3, p. 203–208, 2010.

FEOKTISTOV, I.; BIAGGIONI, I. Adenosine A2B Receptors. **Pharmacological reviews**, v. 49, n. 4, p. 381–402, 1997.

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, n. 10, p. 3618–3629, 2009.

FERREIRA, L. et al. Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015.

FIELD, J. J.; NATHAN, D. G.; LINDEN, J. The Role of Adenosine Signaling in Sickle

Cell Therapeutics. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v. 28, n. 2, p. 287–299, 2014.

FISSEHA, D.; KATIYAR, V. Analysis of mechanical behavior of red cell membrane in sickle cell disease. **Applied mathematics**, v. 2, n. 2, p. 40–46, 2012.

FRANKE, L. et al. Identification of natural-product-derived inhibitors of 5-lipoxygenase activity by ligand-based virtual screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2640–2646, 2007.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. **Pharmacol Rev**, v. 53, n. 4, p. 527–552, 2001.

FREDHOLM, B. B. et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors--An Update. **Pharmacological Reviews**, v. 63, n. 1, p. 1–34, 2011.

GESSI, S. et al. Expression , Pharmacological Profile , and Functional Coupling of A 2B Receptors in a Recombinant System and in Peripheral Blood Cells Using a Novel Selective Antagonist Radioligand. **Mol Pharmacol**, v. 67, n. 6, p. 2137–2147, 2005.

GHODEKAR, S. R. et al. S.R.Ghodekar. **International Journal of Pharma. Research & Development**, v. 2, n. 10, p. 101–108, 2010.

GODINHO, R. O.; DUARTE, T.; PACINI, E. S. A. New perspectives in signaling mediated by receptors coupled to stimulatory G protein: The emerging significance of cAMP efflux and extracellular cAMP-adenosine pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, p. 1–9, 2015.

GOMEZ, G. Adenosine : Key Link between Allergy and Asthma. p. 1–3, 2013.

GONZÁLEZ, M. P.; TERÁN, C.; TEJEIRA, M. Search for new antagonist ligands for adenosine receptors from QSAR point of view. How close are we? **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 3, p. 329–371, 2008.

GRAHNER, B. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Deazaxanthines: Analogs of Potent AI- and At-Adenosine Receptor Antagonists**. p. 1526–1534, 1994.

GUHA, R. Methods To Improve the Reliability , Validity and Interpretability of Qsar Models. **Methods**, v. 5, 2005.

HAAS, M. J. Two edges of sickle cell disease. **Science-Business eXchange**, v. 4, n. 3, 2011.

HARCOURT, P.; HARCOURT, P. The effect of some fruit juice extracts on Sickle Cell Erythrocytes. **Comprehensive Journal of Herbs and Medicinal Plants**, v. 1, n. 1, p. 1–6, 2012.

HASKO, G.; PACHER, P. Regulation of macrophage function by adenosine. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 32, n. 4, p. 865–869, 2012.

- HAYALLAH, A. M. et al. 1,8-Disubstituted xanthine derivatives: Synthesis of potent A2B-selective adenosine receptor antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 7, p. 1500–1510, 2002.
- HIDE, I. et al. Mol. Pharmacol. **Mol. Pharmacol.**, v. 41, n. 2, p. 352–359, 1992.
- HOBAN, M. D.; ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Genetic treatment of a molecular disorder: gene therapy approaches to sickle cell disease. **Blood**, v. 127, n. 7, p. 839–848, 2016.
- HUA, X. et al. Gs-Coupled Adenosine Receptors Differentially Limit Antigen-Induced Mast Cell Activation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 344, n. 2, p. 426–435, 2013.
- IJZERMAN, A. P. et al. **Adenosine Receptor**. Disponível em: <<http://www.guidetopharmacology.org/GRAC/FamilyDisplayForward?familyId=3>>. Acesso em: 1 maio. 2017.
- IMAGA, N. A. Phytomedicines and nutraceuticals: Alternative therapeutics for sickle cell anemia. **The Scientific World Journal**, v. 2013, 2013.
- INAMDAR, A. P. **Ligand-based pharmacophore studies in the dopaminergic system**. [s.l.] University of Wollongong, 2011.
- JAIN, A. N. Ligand-Based Structural Hypotheses for Virtual Screening. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 4, p. 947–961, 2004.
- JENA, L. et al. Computational approach to understanding the mechanism of action of isoniazid, an anti-TB drug. **International Journal of Mycobacteriology**, v. 3, n. 4, p. 276–282, 2014.
- JESUS, J. A. DE. Doença Falciforme No Brasil. **Gazeta Médica do Brasil**, v. 80, n. 3, p. 8–9, 2010.
- JI, X. et al. [³H] MRS 1754, a selective antagonist radioligand for A₂B adenosine receptors. **Glass**, v. 61, p. 657–663, 2001.
- JIANG, L. et al. Virtual screening and molecular dynamics study of potential negative allosteric modulators of mGluR1 from Chinese herbs. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12769–12786, 2015.
- JOHN, S. et al. Potent BACE-1 inhibitor design using pharmacophore modeling, in silico screening and molecular docking studies. **BMC bioinformatics**, v. 12, n.1, p. S28, 2011.
- JOSEPH, T. B. et al. Quantitative structure activity relationship and pharmacophore studies of adenosine receptor A₂B inhibitors. **Chemical Biology and Drug Design**, v. 72, n. 5, 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, n. 1, p. 21–29, 2009.

KASERER, T. et al. Pharmacophore models and pharmacophore-based virtual screening: Concepts and applications exemplified on hydroxysteroid dehydrogenases. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22799–22832, 2015.

KATRITCH, V.; KUFAREVA, I.; ABAGYAN, R. Structure based prediction of subtype-selectivity for adenosine receptor antagonists. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 1, p. 108–115, 2011.

KAUF, T. L. et al. The cost of health care for children and adults with sickle cell disease. **American Journal of Hematology**, v. 84, n. 6, p. 323–327, 2009.

KENAKIN, T. Overview of Receptor Interactions of Agonists and Antagonists. In: **Current Protocols in Pharmacology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2008.

KENAKIN, T. P. The Schild regression in the process of receptor classification. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 60, p. 249–265, 1982.

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. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 11, p. 2131–2138, 2002.

KITCHEN, D. B. et al. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 2004.

KOHNE, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. **Deutsches Ärzteblatt international**, v. 108, n. 31–32, p. 532–40, 2011.

KRISTENSEN, T. G.; NIELSEN, J.; PEDERSEN, C. N. S. METHODS FOR SIMILARITY-BASED VIRTUAL SCREENING. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 5, n. 6, p. 1–6, fev. 2013.

LEACH, A. R. et al. Three-dimensional pharmacophore methods in drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 539–558, 2010.

LEAL, W. et al. How frequently do clusters occur in hierarchical clustering analysis? A graph theoretical approach to studying ties in proximity. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 1–16, 2016.

LEITE, F. H. A. et al. An integrated approach towards the discovery of novel non-nucleoside Leishmania major pteridine reductase 1 inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 322–332, 2017.

LENGAUER, T. et al. Novel technologies for virtual screening. **Drug Discovery Today**, v. 9, n. 1, p. 27–34, 2004.

LIANG, D. et al. A₂B adenosine receptor activation switches differentiation of bone marrow cells to a CD11c(+)Gr-1(+) dendritic cell subset that promotes the Th17 response. **Immunity, inflammation and disease**, v. 3, n. 4, p. 360–73, 2015.

LIAO, C. et al. Software and resources for computational medicinal chemistry. **Future**

medicinal chemistry, v. 3, n. 8, p. 1057–1085, 2011.

LIONTA, E. et al. Structure-Based Virtual Screening for Drug Discovery : Principles , Applications and Recent Advances. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 14, p. 1923–1938, 2014.

LIU, M.; SUN, Z.; HU, W. Three-dimensional pharmacophore screening for fentanyl derivatives. **Neural Regeneration Research**, v. 7, n. 18, p. 1398–1405, 2012.

MALINOWSKI, A. K. et al. Prophylactic transfusion for pregnant women with sickle cell disease: a systematic review and meta-analysis. **Blood**, v. 126, n. 21, p. 2424–2436, 2015.

MARGAY, S. M. et al. To study the efficacy and safety of doxophylline and theophylline in bronchial asthma. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 4, p. 5-8, 2015.

MARTIN, Y. C. Pharmacophores. In: ABRAHAM, D. J.; ROTELLA, D. P. (Eds.). . **Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery, and Development, Seventh Edition**. 7. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2010. p. 455–480.

MARTIN, Y. C.; KOFRON, J. L.; TRAPHAGEN, L. M. Do structurally similar molecules have similar biological activity? **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 19, p. 4350–4358, 2002.

MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: A powerful approach fo structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.

MOHANTY, D. A century after discovery of sickle cell disease: keeping hope alive! **Indian Journal of Medical Research**, v. 139, n. 6, p. 793–795, 2014.

MPIANA, P. T. et al. Antisickling Activity and Membrane Stabilizing Effect of Anthocyanins Extracts from *Adansonia digitata* L . Barks on Sickle. v. 2, n. 2012, p. 198–212, 2014.

MUEGGE, I.; MUKHERJEE, P. An overview of molecular fingerprint similarity search in virtual screening. **Expert opinion on drug discovery**, v. 11, n. 2, p. 137–48, 2016.

MULAKU, M. et al. Evidence review of hydroxyurea for the prevention of sickle cell complications in low-income countries. **Archives of disease in childhood**, v. 98, n. 11, p. 908–14, 2013.

MÜLLER, C. E.; JACOBSON, K. A. Xanthines as adenosine receptor antagonists. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 200, p. 151–199, 2011.

MUSMUCA, I. et al. Combining 3-D quantitative structure-activity relationship with ligand based and structure based alignment procedures for in silico screening of new hepatitis c virus NS5B polymerase inhibitors. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 4, p. 662–676, 2010.

MYSINGER, M. M. et al. Directory of useful decoys, enhanced (DUD-E): Better

ligands and decoys for better benchmarking. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 14, p. 6582–6594, 2012.

NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 1, p. 5–22, 2000.

NEUBIG, R. R. et al. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. **Pharmacological reviews**, v. 55, n. 4, p. 597–606, 2003.

NICOLAOU, C. A.; BROWN, N. Multi-objective optimization methods in drug design. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 10, n. 3, p. 1–9, 2013.

NWAOGUIKPE, R.; BRAIDE, W. The antisickling effects of some micronutrients and antioxidant vitamins in sickle cell disease management. **Journal of Medicine and Medical Sciences**, v. 3, n. 5, p. 334–340, 2012.

OPREA, T. I. et al. Is There a Difference between Leads and Drugs? A Historical Perspective. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 41, n. 5, p. 1308–1315, 2001.

ORTORE, G.; MARTINELLI, A. A 2B Receptor Ligands : Past , Present and Future Trends. p. 923–940, 2010.

PAULINE, N. et al. The in vitro antisickling and antioxidant effects of aqueous extracts *Zanthoxylum heitzii* on sickle cell disorder. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 162, 2013.

PERRINE, S. P.; CUI, S. Experimental Therapeutics for Sickle Cell Disease: Challenges and New Potential. **journal of Sickle Cell Disease and Hemoglobinopathies**, v. 1, p. 7–16, 2016.

PIIRAINEN, H. et al. Structural features of adenosine receptors: From crystal to function. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1808, n. 5, p. 1233–1244, 2011.

PRUDÊNCIO, B. C. A B.; COVAS, D. T.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Comparação de metodologia utilizada para a detecção de Hemoglobina S (Hb S) em doadores de sangue. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 99–109, 2000.

PULE, G. D. et al. A Systematic Review of Known Mechanisms of Hydroxyurea-induced Foetal Haemoglobin for Treatment of Sickle Cell Disease. **Expert review of hematology**, v. 8, n. 5, p. 669–679, 2015.

PULE, G. D. et al. Hydroxyurea down-regulates BCL11A, KLF-1 and MYB through miRNA-mediated actions to induce γ -globin expression: implications for new therapeutic approaches of sickle cell disease. **Clinical and Translational Medicine**, v. 5, n. 1, p. 15, 2016.

REDDY, A S. et al. Virtual screening in drug discovery -- a computational perspective. **Current protein & peptide science**, v. 8, n. 4, p. 329–351, 2007.

- RICHMOND, N. J. et al. GALAHAD: 1. Pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 20, n. 9, p. 567–587, 2006.
- SAKKIAH, S.; LEE, K. W. Pharmacophore-based virtual screening and density functional theory approach to identifying novel butyrylcholinesterase inhibitors. **Acta pharmacologica Sinica**, v. 33, n. 7, p. 964–78, 2012.
- SANDERS, M. P. A. et al. Comparative analysis of pharmacophore screening tools. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 52, n. 6, p. 1607–1620, 2012.
- SANDHYARANI, G.; KUMAR, K. P. International Journal of Traditional System of Medicine ANTISICKLING POTENTIAL OF THE ETHANOLIC FLOWER EXTRACTS OF COUROUPITA GUIANENSIS. v. 1, n. 1, p. 7–9, 2014.
- SANKARAN, V. G.; ORKIN, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, p. 1–14, 2013.
- SARMA, R. et al. Pharmacophore modeling of diverse classes of p38 MAP kinase inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 12, p. 2870–2876, 2008.
- SCHIEDEL, A. C. et al. The four cysteine residues in the second extracellular loop of the human adenosine A2B receptor: Role in ligand binding and receptor function. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, n. 4, p. 389–399, 2011.
- SEIDEL, T. et al. Strategies for 3D pharmacophore-based virtual screening. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 7, n. 4, 2010.
- SHEPPHARD, J. K.; CLARK, R. D. A marriage made in torsional space: Using GALAHAD models to drive pharmacophore multiplet searches. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 20, n. 12, p. 763–771, 2006.
- SHERBINY, F. F. et al. Homology modelling of the human adenosine A2B receptor based on X-ray structures of bovine rhodopsin, the β 2-adrenergic receptor and the human adenosine A2A receptor. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 23, n. 11, p. 807–828, 2009.
- SHERER, J. T.; GLOVER, P. H. Pentoxifylline for sickle-cell disease. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 34, n. 9, p. 1070–1074, 2000.
- 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, p. 1015–1021, 2010.
- SILVA, W. S. et al. Avaliação da cobertura do programa de triagem neonatal de hemoglobinopatias em populações do Recôncavo Baiano , Brasil Evaluation of coverage by a neonatal screening program for hemoglobinopathies in the Recôncavo region of Bahia , Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v. 22, n. 12, p. 2561–2566, 2006.
- SIMEONE, E. I. et al. Antisickling potential of the ethanol seed extracts of *Vigna unguiculata* and *Vigna subterranean*. **International Journal of Biochemistry and**

Biotechnology, v. 1, n. 9, p. 226–229, 2012.

SIMÕES, B. P. et al. Consenso brasileiro em transplante de células-tronco hematopoéticas: Comitê de hemoglobinopatias. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 32, n. Supl 1, p. 46–53, 2010.

SIRCI, F. et al. Ligand-, structure- and pharmacophore-based molecular fingerprints: a case study on adenosine A1, A2A, A2B, and A3 receptor antagonists. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 5, p. 1247–1266, 2012.

SLIWOSKI, G. et al. Computational Methods in Drug Discovery. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–395, 2013.

SLIWOSKI, G. et al. Computational methods in drug discovery. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 1, p. 334–95, 2014.

STEFANACHI, A. et al. 1-, 3- and 8-substituted-9-deazaxanthines as potent and selective antagonists at the human A2B adenosine receptor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 6, 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, n. 22, p. 9780–9789, 2008b.

STEINBERG, M. H. et al. Effect of hydroxyurea on mortality and morbidity in adult sickle cell anemia: risks and benefits up to 9 years of treatment. **JAMA : the journal of the American Medical Association**, v. 289, n. 13, p. 1645–1651, 2003.

SUN, K. et al. Elevated adenosine signaling via adenosine A2B receptor induces normal and sickle erythrocyte sphingosine kinase 1 activity. **Blood**, v. 125, n. 10, p. 1643–1653, 2015.

SUN, Y. et al. The four cysteine residues in the second extracellular loop of the human adenosine A2B receptor: Role in ligand binding and receptor function. **Journal of Clinical Investigation**, v. 3, n. 4, p. 389–399, 2011.

SZABO, A.; FLEISHMAN, L. J. **New Sickle Cell Disease Research Shows Improved Patient Outcome**. Disponível em: <<http://www.hematology.org/Newsroom/Press-Releases/2015/4746.aspx>>. Acesso em: 13 mar. 2017.

TALLARIDA, R. J. Quantitative methods for assessing drug synergism. **Genes & cancer**, v. 2, n. 11, p. 1003–8, 2011.

TEIXEIRA, A. L.; FALCAO, A. O. Noncontiguous atom matching structural similarity function. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 10, p. 2511–2524, 2013.

THIYAGARAJAN, C. et al. Structure-based virtual Screening for identification of novel inhibitors against BACE1 from selective medicinal plant compounds. **International Journal of Current Research**, v. 5, n. 12, p. 4097–4101, 2013.

THOMAS, C.; LUMB, A. B. Physiology of haemoglobin. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain**, v. 12, n. 5, p. 251–256, 2012.

TRIPOS. **Manual Unity**. St. Louis: [s.n.].

TRIPOS. **Manual GALAHAD**. Disponível em: <<http://www.tripos.com>>. Acesso em: 24 jul. 2016b.

VENKATRAMAN, V. et al. Comprehensive comparison of ligand-based virtual screening tools against the DUD data set reveals limitations of current 3D methods. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 12, p. 2079–2093, 2010.

VERDUZCO, L. A; NATHAN, D. G. Review article Sickle cell disease and stroke. **Stroke**, v. 114, n. 25, p. 5117–5125, 2009.

VICHINSKY, E. P. et al. Standards of Care Guidelines for Thalassemia. p. 1–27, 2012.

VIDAL, B. et al. Discovery and Characterization of 4'-(2-Furyl)-N-pyridin-3-yl-4,5'-bipyrimidin-2'-amine (LAS38096), a Potent, Selective, and Efficacious A_{2B} Adenosine Receptor Antagonist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 2732–2736, maio 2007.

VYAS, V. et al. Virtual screening: A fast tool for drug design. **Scientia Pharmaceutica**, v. 76, n. 3, p. 333–360, 2008.

WALLACE, K. L.; LINDEN, J. **Adenosine A_{2A} receptors induced on iNKT and NK cells reduce pulmonary inflammation and injury in mice with sickle cell disease**. v. 116, n. 23, p. 1510-1520, 2010.

WATANABE, A. M. **Prevalência Da Anemia Falciforme No Estado Do Paraná**. Dissertação (mestrado) - Programa de pós-graduação em medicina interna. Setor de ciências da saúde. Universidade Federal do Paraná, 2007.

WEBB, T. R. et al. The Utilization of a Uni @ ed Pharmacophore Query in the Discovery of New Antagonists of the Adenosine Receptor Family. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 10, p. 31–34, 2000.

WILBER, A.; NIENHUIS, A. W.; PERSONS, D. A. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: new therapeutic opportunities. **Blood**, v. 117, n. 15, p. 3945–3953, 2011.

YANG, S.-Y. Pharmacophore modeling and applications in drug discovery: challenges and recent advances. **Drug discovery today**, v. 15, n. 11–12, p. 444–450, 2010.

ZHANG, C. et al. CFam: A chemical families database based on iterative selection of functional seeds and seed-directed compound clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D558–D565, 2015.

ZHANG, Y. et al. Detrimental effects of adenosine signaling in sickle cell disease. **Nature medicine**, v. 17, n. 1, p. 79–86, 2011.

ZHANG, Y. et al. Elevated sphingosine-1-phosphate promotes sickling and sickle cell disease progression. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 6, p. 2750–2761, 2014.

ZHAO, X. et al. Ligand-based pharmacophore model of N-Aryl and N-Heteroaryl piperazine α 1A-adrenoceptors antagonists using GALAHAD. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 2, p. 126–136, 2010.

APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Justificativa e os objetivos da pesquisa:

Pacientes portadores de anemia falciforme apresentam hemácias na forma de foice. As hemácias deformadas obstruem os vasos sanguíneos, causando dores severas. Os medicamentos disponíveis apresentam apenas ação paliativa, não tratam a origem da doença. Por isso, gostaríamos de convidar o (a) Sr(a) a participar deste projeto, que tem como objetivo identificar compostos capazes de evitar a falcização das hemácias.

II. Procedimentos que serão realizados:

Serão coletados de 3 a 5ml de sangue (uma única vez, a menos que ocorra algum problema com o processamento da amostra que exija uma coleta), pelo método de coleta a vácuo, em dia e horário agendado previamente. As amostras de sangue serão coletadas e analisadas no laboratório Múltiplo da Faculdade Maria Milza (FAMAM). As amostras serão utilizadas nos testes e **descartadas na mesma semana** da coleta, uma vez que os testes podem perdurar por mais de um dia.

Vale ressaltar que, não poderão participar desta pesquisa pacientes que tenha capacidade de autodeterminação reduzida ou impedida, ou de qualquer forma estejam impedidos de opor resistência, sobretudo no que se refere ao consentimento livre e esclarecido.

III. Riscos e desconfortos potenciais:

O principal risco relacionado a punção para coleta de sangue venoso são hematomas. Pode ocorrer também pequeno sangramento no local da punção. Outro potencial risco é a contaminação sanguínea por bactérias externas ao organismo humano

IV. Técnicas para minimizar riscos:

Para evitar o hematoma, logo que o extravasamento sanguíneo for visualizado durante a coleta, serão retirados o torniquete e a agulha imediatamente do braço do voluntário seguindo de compressão do local, com gaze estéril, por um período de dois minutos. Caso o hematoma persista, o voluntário deve realizar compressa

quente 3 vezes ao dia. Para que não ocorra sangramento, logo após a punção o local puncionado será coberto com curativo oclusivo. O risco de contaminação sanguínea é totalmente extinto com o uso de materiais estéreis e descartáveis. Portanto, nessa pesquisa serão utilizadas agulhas, e seringas totalmente estéreis e descartáveis. Além disso, o local da punção será corretamente desinfetado com álcool a 70%.

V. Benefícios esperados:

Este estudo poderá no futuro beneficiar as pessoas com anemia e doença falciforme. Além disso, poderá contribuir no diagnóstico de doença falciforme (anemia falciforme associada a outras variantes da hemoglobina, tais como hemoglobina C, D, E) para os voluntários participantes.

VI. Formas de acompanhamento e assistência:

As coletas de sangue serão realizadas por pessoal capacitado. Além disso, você pode dirigir-se ao laboratório Múltiplo da FAMAM, em qualquer momento enquanto durar o período do projeto, para solicitar informações sobre o andamento da pesquisa ou informar que não se interessa mais em ser convocado para coleta de sangue.

Pelo presente Consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente projeto de pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados. Declaro ainda que o esclarecimento do TCLE ocorreu no momento a mim cômodo e em local apropriado para manutenção da minha privacidade. Também foi dado o tempo que eu julguei necessário para que pudesse refletir, consultar, se necessário, meus familiares ou outras pessoas que pudessem me ajudar na tomada de decisão livre e esclarecida.

Fui igualmente informado:

- da garantia de receber esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados a pesquisa;
- da liberdade de retirar meu consentimento, a qualquer momento, e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo;
- da segurança de que não serei identificado e que se manterá o caráter confidencial das informações relacionadas com a minha privacidade;

- de que a minha participação no estudo não produz despesas que devam ser reembolsadas pela equipe de pesquisa, uma vez que o meu deslocamento para o local da coleta será realizado pelos membros da pesquisa;
- de que esse TCLE ficará arquivado, em formato digital, no computador da Coordenação do Programa de Iniciação Científica da Faculdade Maria Milza por um período de cinco anos, conforme Resolução 466/2012.

O Centro Coordenador desse projeto de pesquisa localiza-se na Faculdade Maria Milza e os pesquisadores responsáveis por esse projeto de pesquisa são o Prof. MSc. Odailson Santos Paz (71-91341843 – email: odailsonpaz@hotmail.com – Laboratório Múltiplo, Rodovia BR-101, Km 215, Governador Mangabeira) e o Prof. Dr. Marcelo Santos Castilho – email: castilho@ufba.br – Laboratório de Bioinformática e Modelagem Molecular, Faculdade de Farmácia, UFBA, tendo sido esse documento revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral Roberto Santos, o qual poderá ser contatado a qualquer momento para o esclarecimento de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos dessa pesquisa telefone 71-33722864 – email: cep.hgrs@gmail.com – End. Estrada do Saboeiro, s/n, Salvador.

Declaro que recebi uma cópia, de igual teor, assinada deste termo.

Local / Data

Assinatura do Voluntário



Impressão datiloscópica
do voluntário

Pesquisador responsável

Pesquisador participante

Estudante participante

ANEXO A

HOSPITAL GERAL ROBERTO
SANTOS - BA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO BIOLÓGICA DE COMPOSTOS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-FALCEMIA

Pesquisador: Odailson Santos Paz

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 39765214.4.0000.5028

Instituição Proponente: Faculdades Unidas de Pesquisa, Ciências e Saúde

Patrocinador Principal: CENTRO EDUCACIONAL MARIA MILZA LTDA - ME

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 928.405

Data da Relatoria: 17/12/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa de corte transversal, prospectivo e pretende analisar amostras de sangue em pacientes falciformes a partir de produtos naturais e e substâncias de origem sintéticas.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar compostos com atividade anti-falceemia a partir de produtos naturais e substâncias de origem sintética.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Desde quando o pesquisador adote os cuidados descritos na metodologia não visualizamos outros riscos visto que a coleta de amostras de sangue de paciente portadores de anemia falciforme voluntários, será realizada com materiais estéreis e descartáveis adotando os princípios de controle de infecção e higienização. Sendo assim, esse projeto não oferece risco ao voluntário, tão pouco ao manipulador.

Endereço: Estrada do Saboeiro, s/nº

Bairro:

CEP: 41.180-000

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (713)372--2864

Fax: (713)387--3413

E-mail: cep.hgrs@gmail.com

HOSPITAL GERAL ROBERTO
SANTOS - BA



Continuação do Parecer: 928.405

Benefícios:

Eritrócitos falciformes são responsáveis pelos fenômenos vaso-oclusivos que são marca da doença e, conseqüentemente, causam isquemia e necrose de tecidos. Até o momento, a maioria dos tratamentos disponíveis para anemia falciforme tem finalidade paliativa ou apresentam efeitos colaterais acentuados. Os proventos oriundos desse projeto podem ser considerados como etapa chave para a melhoria das condições de saúde de uma parcela considerável da população (4%-15%) mundial que apresenta anemia e doença falciforme.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Não há.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória foram apresentados.

Recomendações:

Ajustar o TCLE às normas básicas, incluindo espaço para identificação dactiloscópica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Faz-se necessário a adequação do cronograma para o novo período da coleta de dados da pesquisa.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Não há.

SALVADOR, 05 de Janeiro de 2015

Assinado por:
MARIA DO ESPIRITO SANTO DA SILVA
(Coordenador)

Endereço: Estrada do Saboeiro, s/nº

Bairro:

CEP: 41.180-000

UF: BA

Município: SALVADOR

Telefone: (713)372--2864

Fax: (713)387--3413

E-mail: cep.hgrs@gmail.com