



**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

FERNANDA MELLO TAVARES

**ESTUDOS *IN SILICO* APLICADOS NA BUSCA DE INIBIDORES DA TIROSINA
QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO ESTROMA
GASTROINTESTINAL (GIST)**

FERNANDA MELLO TAVARES

**ESTUDOS *IN SILICO* APLICADOS NA BUSCA DE INIBIDORES DA TIROSINA
QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO ESTROMA
GASTROINTESTINAL (GIST)**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. - Área de concentração: Ciências das Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Hamilton Mitsugu Ishiki

616.994 33
T231e

Tavares, Fernanda Mello

Estudos *in silico* aplicados na busca de inibidores da tirosina quinase para o tratamento de tumores do estroma gastrointestinal (GIST) \ Fernanda Mello Tavares ; orientador Hamilton Mitsugu Ishiki. -- Presidente Prudente, 2020.

40 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade do Oeste Paulista – Unoeste, Presidente Prudente, SP, 2020.

Bibliografia.

1. Tumor do estroma gastrointestinal. 2. Sistema gastrointestinal - doença. 3. Tirosina quinase. 4. Imatinibe, sunitinibe. I. Ishiki, Hamilton Mitsugu, orient. II. Título.

FERNANDA MELLO TAVARES

**ESTUDOS *IN SILICO* APLICADOS NA BUSCA DE INIBIDORES DA TIROSINA
QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO ESTROMA
GASTROINTESTINAL (GIST)**

Dissertação apresentada à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde – Área de concentração: Ciências da Saúde.

Presidente Prudente, 23 de julho de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hamilton Mitsugu Ishiki
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

Profa. Dra. Luciana Scotti
Universidade Federal da Paraíba - UFP
Paraíba - PB

Prof. Dr. Edson Assunção Mareco
Universidade do Oeste Paulista – Unoeste
Presidente Prudente - SP

LISTA DE SIGLAS

(A)3	– Volume Molecular
CADD	– Desenho Assistido por Computador (Computer Aided Drug Design)
DM	– Dinâmica Molecular
GIST	– Tumor Estromal Gastrointestinal (Gastrointestinal Stromal Tumor)
HBA	– Número De Aceitadores De Ligação De Hidrogênio
HBD	– Número De Doadores De Ligação De Hidrogênio
MiLogP	– Lipofilicidade
NPT	– Partículas Numéricas Constantes, Pressão E Temperatura
NROT	– Número De Ligações Não Rotativas
NVT	– Número Constante de Partículas, Volume E Temperatura
PDB	– Banco de Dados de Proteínas (Protein Data Bank)
PDGFR	– Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (Platelet Derived Growth Factor Receptor)
PM	– Peso Molecular
PTK	– Proteína Tirosina Quinase
RMSD	– Desvio da Raiz Quadrada Média (Root Mean Square Deviation)
RMSF	– Flutuações Residuais (Root Mean Square Fluctuation)
RTK	– Receptor de Tirosina Quinase
SNC	– Sistema Nervoso Central
TGI	– Trato Gastrointestinal
TPSA	– Área de Superfície Polar Topológica (Topological Polar Surface Area)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Fórmula estrutural do imatinibe.....	14
Figura 2 –	Fórmula estrutural do sunitinibe.....	15
Figura 3 –	Resumo de uma abordagem clássica de design de drogas com base em estrutura.....	17
Figura 4 –	Fragmento da estrutura do imatinibe utilizada para realizar a procura por estruturas semelhantes no banco de dados do Sistem-X.....	18
Figura 5 –	Resultado visual do <i>docking</i> realizado entre a enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E) e todos os compostos obtidos através da busca realizada no banco de dados do Sistem-X.....	22
Figura 6 –	Resultado visual do <i>docking</i> realizado entre a enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E) e os 17 compostos, com as menores energias de ligação, obtidos através da busca realizada no banco de dados do Sistem-X.....	23
Figura 7 –	Fórmula estruturas dos compostos selecionados através dos estudos de <i>docking</i> molecular que apresentaram as melhores energias de ligação com a enzima tirosina quinase.....	25
Figura 8 –	Resultado visual do <i>docking</i> ilustrando a interação da molécula 81 com o sítio ativo da enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E) com os contornos hidrofóbicos.....	28
Figura 9 –	Ilustração das ligações de hidrogênio que ocorrem entre a enzima tirosina quinase e o composto 81.....	28
Figura 10 –	Ilustração dos aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima tirosina quinase que estão interagindo com o sunitinibe.....	29
Figura 11 –	Figura 11 – Valores do desvio médio quadrático (RMSD) dos átomos de C α do receptor tirosina quinase (RTK) complexado com os compostos 13, 14, 16, 36, 54, 75, 81, 113, 121, 124 e o sunitinibe.....	31
Figura 12 –	Figura 12 – Valores do desvio médio quadrático (RMSD) dos átomos de C α dos compostos selecionados através dos estudos de <i>docking</i> e o Sunitinibe. A) RMSD dos compostos 14, 54, 36, 16, 13 e o Sunitinibe. B) RMSD dos compostos 75, 81, 113, 121, 124 e Sunitinibe.....	31

Figura 13 –	Valores das flutuações médias da raiz quadrada (RMSF) dos átomos de C α do receptor tirosina quinase (RTK) complexado aos compostos e ao sunitinib.....	32
Figura 14 –	Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps. A – Estrutura do complexo RTK-14 e seu sítio ativo, B – 200ps, C – 400ps, D – 600 ps, E – 800ps e F – 1000ps.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores das energias calculadas através do <i>docking</i> realizando entre os ligantes e a enzima tirosina quinase.....	24
Tabela 2 -	Valores das propriedades físico-químicas <i>in silico</i> , dos compostos sugeridos pelo estudo de <i>docking</i> , determinados pelo Molinspiration..	34

SUMÁRIO

ARTIGO CIENTÍFICO - ESTUDOS IN SILICO APLICADOS NA BUSCA DE INIBIDORES DA TIROSINA QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO ESTROMA GASTROINTESTINAL (GIST).....	10
Resumo.....	11
Abstract	12
1 INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Tumor do Estroma Gastrointestinal.....	13
1.2 Inibidores da Tirosina Quinase.....	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1 Ferramentas computacionais	15
2.2 Busca por ligantes.....	17
2.3 Estrutura da proteína.....	18
2.4 Docking Molecular	19
2.5 Simulações de Dinâmica Molecular (DM)	19
2.6 A regra de Lipinski.....	20
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	21
3.1 A busca por novos ligantes e o Docking.....	21
3.2 Dinâmica Molecular	30
3.3 Previsão in silico de propriedades físico-químicas e perfil farmacocinético.....	33
4 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS	37

ARTIGO CIENTÍFICO**ESTUDOS *IN SILICO* APLICADOS NA BUSCA DE INIBIDORES DA TIROSINA QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO ESTROMA GASTROINTESTINAL (GIST)**

Fernanda Mello Tavares¹, Lenon Christyan Pereira Santana², Luciana Scotti³, Marcus Tullius Scotti³, Hamilton Mitsugu Ishiki^{1,2}.

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil

² Curso Farmácia - Universidade do Oeste Paulista/UNOESTE, Presidente Prudente, SP, Brasil

³ Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos - Universidade Federal da Paraíba/UFPB, João Pessoa, PB, Brasil.

Autor correspondente: Prof. Dr. Hamilton Mitsugu Ishiki

Pós Graduação em Ciências da Saúde

Universidade do Oeste Paulista (UNOESTE)

Rua José Bongiovani, 700 - Cidade Universitária

Presidente Prudente - SP, Brasil

CEP: 19050-920

Email: hamilton@unoeste.br

O trabalho está apresentado sob a forma de artigo, segundo as normas do periódico o qual será submetido: *COMPUTATIONAL BIOLOGY AND CHEMISTRY*, Fator de impacto 1.581, Qualis A3.

RESUMO

ESTUDOS *IN SILICO* APLICADOS NA BUSCA DE INIBIDORES DA TIROSINA QUINASE PARA O TRATAMENTO DE TUMORES DO ESTROMA GASTROINTESTINAL (GIST)

Os tumores do estroma gastrintestinal (GIST) são as neoplasias mesenquimais mais comuns do trato gastrintestinal, sendo que o padrão para o diagnóstico é a expressão de CD117 (c-kit). Tumores inoperáveis ou metastáticos, são tratados com o mesilato de imatinibe (Glivec®), uma droga com alvo molecular que atua como inibidor competitivo múltiplo da tirosina quinase. Mutações celulares fazem com que os medicamentos acabem se tornando ineficazes através de mecanismos de resistência, e, por isso, novos medicamentos ou novos alvos moleculares devem ser pesquisados. As ferramentas computacionais aplicadas à química medicinal, como, por exemplo, o Desenvolvimento de novas Drogas Auxiliadas por Computador, são estratégias para o desenvolvimento de alternativas às terapias já estabelecidas. Neste trabalho foi realizada uma busca no banco de dados do Sistem-X para a procura de novos compostos que se assemelhem estruturalmente aos medicamentos atualmente utilizados. As 169 estruturas obtidas foram submetidas ao processo de *Docking*, contra a enzima tirosina quinase (Codigo PDB: 3G0E) com a utilização do programa iGEMDOCK v 2.0. Os resultados indicaram que 17 compostos atuam no mesmo sítio ativo do sunitinibe e são os que apresentaram as menores energias de interação, 139 compostos atuam em outro sítio de ligação, próximo a este do sunitinibe, mas com energias maiores, e 13 compostos atuam em outros locais da proteína e não tiveram as suas energias de ligação calculadas. Os 10 melhores resultados do *docking* foram submetidos à cálculos de dinâmica molecular com o emprego do programa GROMACS 5.0. Os resultados indicaram que todos os compostos são estáveis no sítio ativo, assim como o sunitinibe. O cálculo das propriedades ADMET indicaram que apenas um composto, o 121, possui as propriedades desejáveis de um fármaco.

Palavras-chave: Tumor do estroma gastrintestinal, modelagem molecular, tirosina quinase, imatinibe, sunitinibe.

ABSTRACT

***IN SILICO* STUDIES APPLIED IN THE SEARCH FOR TYROSINE KINASE INHIBITORS FOR THE TREATMENT OF GASTROINTESTINAL STROMAL TUMORS (GIST)**

Gastrointestinal stromal tumors (GIST) are the most common mesenchymal neoplasms of the gastrointestinal tract, and the standard diagnosis is the expression of CD117 (c-kit). Inoperable or metastatic tumors are treated with imatinib mesylate (Glivec®), a drug with a molecular target that acts as a multiple competitive tyrosine kinase inhibitor. Cellular mutations make the drugs ineffective through resistance mechanisms, and, therefore, new drugs or new molecular targets must be researched. Computational tools applied to medicinal chemistry, such as, the Development of New Computer-Aided Drugs, are strategies for the expansion of alternatives to established therapies. In this paper, a research was performed in the Sistem-X database, in order to find new compounds that structurally resemble the drugs currently used. The 169 structures obtained were submitted to the Docking process, against the tyrosine kinase enzyme (Code PDB: 3G0E), using the program iGEMDOCK v 2.0. The results indicated that 17 compounds act on the same active site as sunitinib and showed the lowest interaction energies, 139 compounds act on another binding site, close to the one of sunitinib, but with higher energies, and 13 compounds act on other protein sites, and did not have their binding energies calculated. The 10 best docking results were subjected to molecular dynamics calculations using the GROMACS 5.0 program. The results indicated that all compounds are stable at the active site, as well as sunitinib. The calculation of ADMET properties indicated that only compound 121 has the desirable properties of a drug.

Keywords: Gastrointestinal stromal tumor, molecular modeling, tyrosine kinase, imatinibe, sunitinibe.

1 INTRODUÇÃO

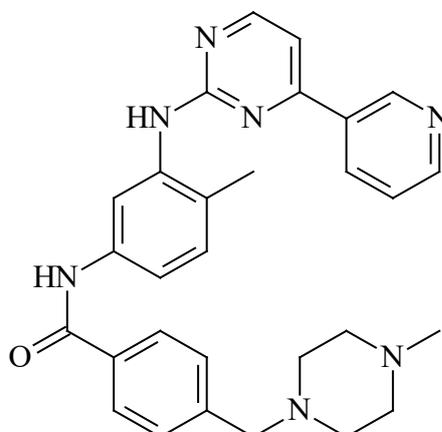
1.1 Tumor Estromal Gastrointestinal

Os GISTs são as neoplasias mesenquimais mais comuns do trato gastrointestinal (TGI), mesmo representando menos de 1% de todas as neoplasias desses órgãos (Monges et al., 2010). Aproximadamente 95% dos tumores estromais gastrointestinais tem expressão positiva para o C-KIT (CD117), um antígeno de superfície celular da proteína transmembrana tirosina quinase que atua como proto-oncogene, responsável por várias funções celulares. A expressão de CD117 emergiu como a característica mais importante e padrão para o diagnóstico dos GISTs, sendo que a mutação no gene Kit é responsável pela ativação constitutiva na proteína, causando estímulo sem oposição para proliferação celular. (Barchi et al., 2012; Santos Junior et al., 2012). Entretanto em torno de 4% dos tumores apresentam características clínicas e patológicas semelhantes, mas não expressam a proteína Kit. Este grupo (GIST c-Kit negativo) exibe mutação em outro receptor tirosina quinase, o Receptor do Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGFR-alfa), representando uma via alternativa na patogênese desta neoplasia (Oliveira et al., 2011).

1.2 Inibidores da Tirosina Quinase

Nos casos de GISTs inoperáveis ou metastáticos, o tratamento de escolha é o Mesilato de Imatinibe (STI571, [Glivec®]), Figura 1. Este medicamento é um inibidor competitivo da tirosina-quinase (Vivi et al., 2017), e revolucionou o tratamento do GIST, por ser a primeira terapia a agir especificamente na alteração molecular responsável pela etiologia do câncer, não havendo indicação de radioterapia ou quimioterapia. O imatinibe é um dos primeiros exemplos de um agente molecularmente direcionado ao tratamento de pacientes com câncer e ilustra a efetividade do desenvolvimento clínico de fármacos baseado nos conhecimentos moleculares de uma doença (Oostendorp et al., 2007).

Figura 1. Fórmula estrutural do mesilato de imatinibe.



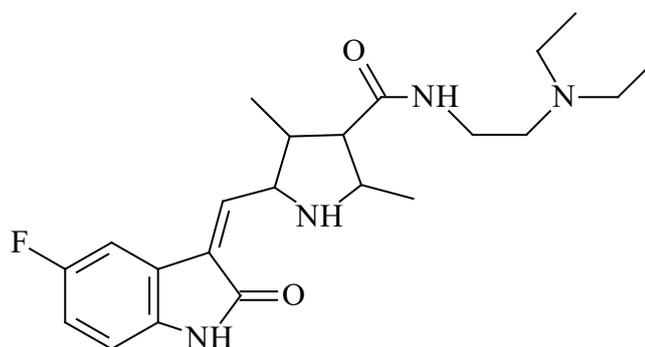
Fonte: O autor (2020).

Embora os inibidores da tirosina quinase (TKIs), tenham excelentes resultados em sobrevida livre da doença, alguns pacientes desenvolverão resistência ao tratamento, o que limita o benefício desses medicamentos a longo prazo, na maioria dos doentes (Lopes et al., 2012; Roskoski, 2018). O Sunitinibe (Figura 2), um TKI de segunda linha, é recomendado para pacientes que experimentam a progressão da doença após a administração de altas doses de imatinibe ou que apresentam efeitos colaterais com risco de vida. Este medicamento atua inibindo receptores de múltiplas quinases e também foi demonstrado ser eficaz contra as mutações secundárias em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Entretanto, assim como o imatinibe, a resistência foi recentemente documentada em pacientes com exposição prolongada ao sunitinibe, além disso, foi demonstrado que o sunitinibe pode causar efeitos adversos sérios e potencialmente fatais, incluindo hipertensão, cardiotoxicidade e hipotireoidismo (Heinrich et al., 2008; Zhao and Yue, 2012).

Caso ocorra uma progressão adicional com o sunitinibe, os doentes devem ser considerados para ensaios clínicos de novos agentes ou novas combinações ou descontinuação da terapêutica anti cancerígena (Lopes et al., 2012).

Figura 2. Fórmula estrutural do sunitinibe.



Fonte: O autor (2020).

A possibilidade de mutações celulares faz com que os medicamentos acabem se tornando ineficazes com o passar do tempo (Wilson et al., 2018) e uma das maneiras para se tentar descobrir novos medicamentos ou novos alvos moleculares é o emprego de ferramentas computacionais aplicadas à química medicinal.

Na tentativa de se obter novos agentes em um tempo menor, e de maneira mais eficiente (Rahman et al., 2012; Lin et al., 2020) pode-se utilizar, por exemplo, o Desenvolvimento de novas Drogas Auxiliadas por Computador (CADD – Computer Aided Drug Design). Os modelos *in silico* podem reduzir em até 50% os custos no processo de desenvolvimento de um novo fármaco (Taft et al., 2008).

Deste modo, este trabalho tem o objetivo de buscar novos inibidores da enzima tirosina quinase, cuja estrutura foi extraída do PDB - “Protein Data Bank” (código PDB 3G0E), oriundos de fontes naturais como flores e plantas, catalogados em um banco de dados de livre acesso, o Sistem X, através de ferramentas computacionais como o *docking* molecular (ancoragem).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Ferramentas Computacionais

Considerando que a atividade farmacológica de um determinado ligante em seu sítio de ação está relacionado com o arranjo espacial e a natureza eletrônica dos átomos do ligante e com a forma com que estes átomos interagem com seus

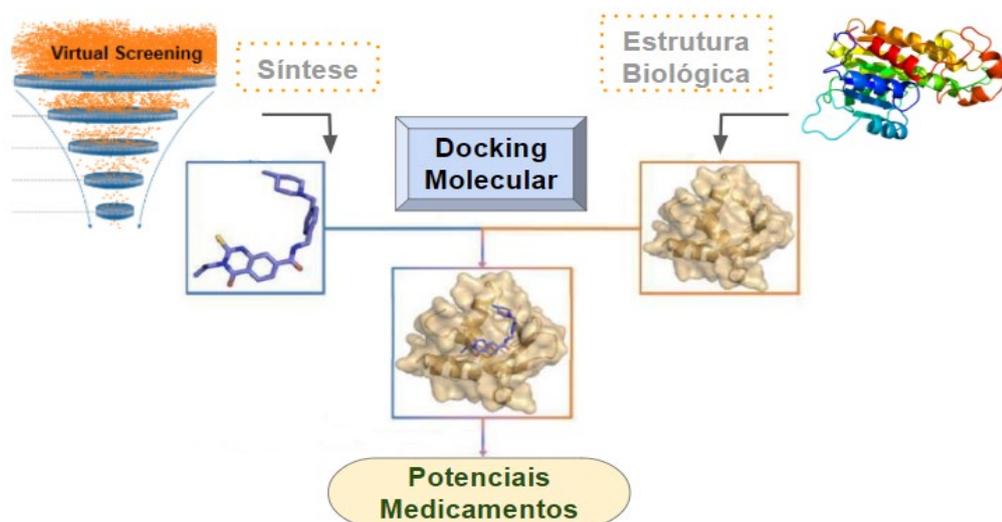
respectivos alvos biológicos, a química computacional pode ser utilizada para caracterizar a dinâmica, as energias e as estruturas das interações (Taft et al., 2008; Garofalo, 2020).

A concepção de fármacos *in silico* pode ser realizada utilizando-se várias abordagens. As diferentes formas de concepção dos fármacos envolvem o Desenho de Drogas Baseados em: estrutura, ligantes, farmacóforo e fragmentos, métodos amplamente utilizados na pesquisa de fármacos para a triagem de alta capacidade das moléculas que aceleram o processo de descoberta de novas drogas (Usha et al., 2017).

O método de *docking* (ancoragem) molecular possui como objetivo prever o modo de ligação e a afinidade de pequenas moléculas, denominadas ligantes, dentro de um sítio ativo, localizado em um receptor de interesse, denominado alvo. Quando aplicado a uma grande biblioteca de compostos (*virtual screening*), o método deve ser capaz de distinguir as moléculas que se ligariam ao receptor e classificar os ligantes com maior afinidade. Para tanto existem os algoritmos de busca conformacional, utilizados para explorar o perfil de energia livre e encontrar o melhor modo de ligação do ligante com o sítio ativo do receptor, e a função de pontuação “score” de energia que avalia a qualidade desta ligação e seleciona as conformações mais relevantes (Vlachakis, 2018).

Segundo Ruyck e colaboradores a ferramenta computacional mais popular desde o início dos estudos *in silico* é o *docking* - um termo que foi cunhado no final da década de 1970 - sintetizado através do esquema ilustrado na figura 3.

Figura 3. Resumo de uma abordagem clássica de design de drogas com base em estrutura.



Fonte: O autor (2020).

O iGEMDOCK é uma ferramenta integrada que cria um ambiente de seleção virtual a partir de preparações realizadas através de uma análise pós-triagem utilizando-se de interações farmacológicas (Hsu et al., 2011).

Primeiro, o iGEMDOCK fornece interfaces interativas para preparar o local de ligação da proteína alvo e a biblioteca de ligantes. Em seguida, cada ligante da biblioteca é ancorado no local de ligação usando a ferramenta de acoplamento iGEMDOCK. Posteriormente, o iGEMDOCK gera perfis de interação proteína-ligante de interações eletrostáticas, de ligação de hidrogênio e de van der Waals.

Com base nesses perfis e estruturas dos ligantes, o iGEMDOCK infere as interações farmacológicas e agrupa os ligantes para a análise pós-triagem. Finalmente, o iGEMDOCK classifica e visualiza os ligantes combinando as interações farmacológicas e a função de pontuação, baseada em energia do iGEMDOCK.

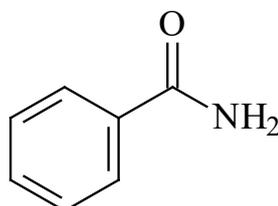
2.2 Busca por Ligantes

A primeira etapa do trabalho foi a realização de uma procura em um banco de dados de compostos (ligantes) que se assemelhassem estruturalmente aos inibidores já conhecidos da tirosina quinase e que são empregados atualmente no tratamento do GIST.

Para esta busca foi utilizado o banco de dados Sistemats X, uma biblioteca de dados virtual e de livre acesso que possui informações de diversos metabólitos secundários de plantas (Scotti et al., 2018).

Nesta etapa utilizou-se apenas um fragmento do sunitinibe (Figura 4), para realizar a busca por moléculas com estruturas semelhantes. Este fragmento foi escolhido considerando que o imatinibe também possui o mesmo fragmento.

Figura 4. Fragmento da estrutura do sunitinibe utilizada para realizar a procura por estruturas semelhantes no banco de dados do Sistemats-X.



Fonte: O autor (2020).

2.3 Estrutura da Proteína

A estrutura do sítio receptor pode ser utilizada para definir um farmacóforo para a triagem (*screening*) virtual em bibliotecas de compostos e em estudos de *docking* que podem ser utilizados para aprimorar a estrutura dos compostos líderes selecionados.

Neste estudo foi utilizada para os estudos de *docking*, como alvo, a estrutura tridimensional da enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E), complexada com o sunitinibe (Cowan-Jacobs et al., 2007) retirada do banco de dados do Brookhaven PDB. A estrutura do sunitinibe foi removida para a realização dos cálculos de *docking*.

Todos os cálculos realizados neste estudo foram efetuados em um microcomputador com processador AMD Athlon II X4 Quad core 600e, 2.2 GHz, com 4.0 GB de memória RAM.

2.4 Docking Molecular

Todos os ligantes encontrados no banco de dados do Sistem-X foram submetidos ao processo de *docking* contra a enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E) com a utilização do programa iGEMDOCK v 2.0 (Yang and Chen, 2004).

O módulo de busca foi ajustado para o *docking* preciso (*very slow docking*) e os seguintes parâmetros ajustados como: Population Size = 800, Generations = 80, Numbers of solutions = 10. Dentre os 10 resultados gerados através dos cálculos de interação, apenas o resultado de menor energia foi considerado nas análises seguintes.

2.5 Simulações de Dinâmica Molecular (DM)

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas para estimar a flexibilidade das interações entre proteínas e ligantes usando o software GROMACS 5.0 (Abraham et al., 2015; Berendsen et al., 1995). A topologia dos ligantes e da proteína foi preparada usando o campo de força GROMOS96 54a7 (Schmid et al., 2001). A simulação da dinâmica molecular foi realizada usando o modelo de água SPC de carga pontual estendida em uma caixa cúbica (Bondi, 1964).

O sistema foi neutralizado através da adição de íons (Cl^- e Na^+) e minimizado para remover os maus contatos entre as moléculas complexas e o solvente. O sistema também foi balanceado em 300 K, usando o algoritmo V-rescale em 100 ps representado por NVT (número constante de partículas, volume e temperatura), seguido por equilíbrio a 1 atm de pressão usando o algoritmo Parrinello-Rahman como NPT (partículas numéricas constantes, pressão e temperatura) até 100 ps.

As simulações de DM foram realizadas em 5.000.000 etapas a 10 ns. Para determinar a flexibilidade da estrutura e se o complexo é estável perto da estrutura experimental, o deslocamento médio da raiz quadrada (RMSD) de todos os átomos de $\text{C}\alpha$ foi calculado em relação às estruturas de partida. Flutuações residuais (RMSF) também foram analisadas para entender o papel dos resíduos próximos ao local de ligação da proteína. Os gráficos de RMSD e RMSF foram

gerados no software Grace (<http://plasma-gate.weizmann.ac.il/Grace/>) e a proteína e os ligantes foram visualizados no UCSF Chimera (Pettersen et al., 2004).

2.6 A regra de Lipinski's

Neste trabalho, as propriedades de semelhança de drogas segundo a regra dos cinco de Lipinski para a biodisponibilidade oral foram calculadas através do programa Molinspiration [Molinspiration Cheminformatics]. O programa foi utilizado para avaliar se os compostos mais ativos possuem os parâmetros ideais para exibir semelhança a um medicamento ou não. É importante observar que as métricas de semelhança com a droga não garantem que um composto seja a droga ideal para uma determinada doença. No entanto, compostos que falham nos critérios de semelhança com o medicamento geralmente não se qualificam para ser um candidato clínico eficaz devido à baixa biodisponibilidade, toxicidade excessiva ou outras preocupações.

O servidor Molinspiration Cheminformatics foi utilizado para prever os valores dos descritores moleculares usados por Lipinski na formulação de sua regra dos cinco: lipofilicidade (MiLogP), peso molecular (PM), número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) e aceitadores (HBA), volume molecular (A^3), número de ligações não rotativas (NROT).

Segundo Lipinski e colaboradores, é mais provável que um composto seja permeável à membrana e seja facilmente absorvido pelo organismo se corresponder aos seguintes critérios:

1. A lipofilicidade do composto menor que 5.
2. Seu peso molecular inferior a 500.
3. O número de grupos na molécula que podem doar átomos de hidrogênio para realizar as ligações de hidrogênio menor que 5.
4. O número de grupos na molécula que podem aceitar átomos de hidrogênio para formar ligações de hidrogênio menor que 10.

O servidor também forneceu o resultado para o cálculo da violação da regra de Lipinski, além disso, foi calculada a Área de Superfície Polar Topológica (TPSA) (Å^2). Os valores de TPSA são usados para calcular a porcentagem de absorção oral. Uma molécula geralmente requer um TPSA abaixo de 140-150 Å^2

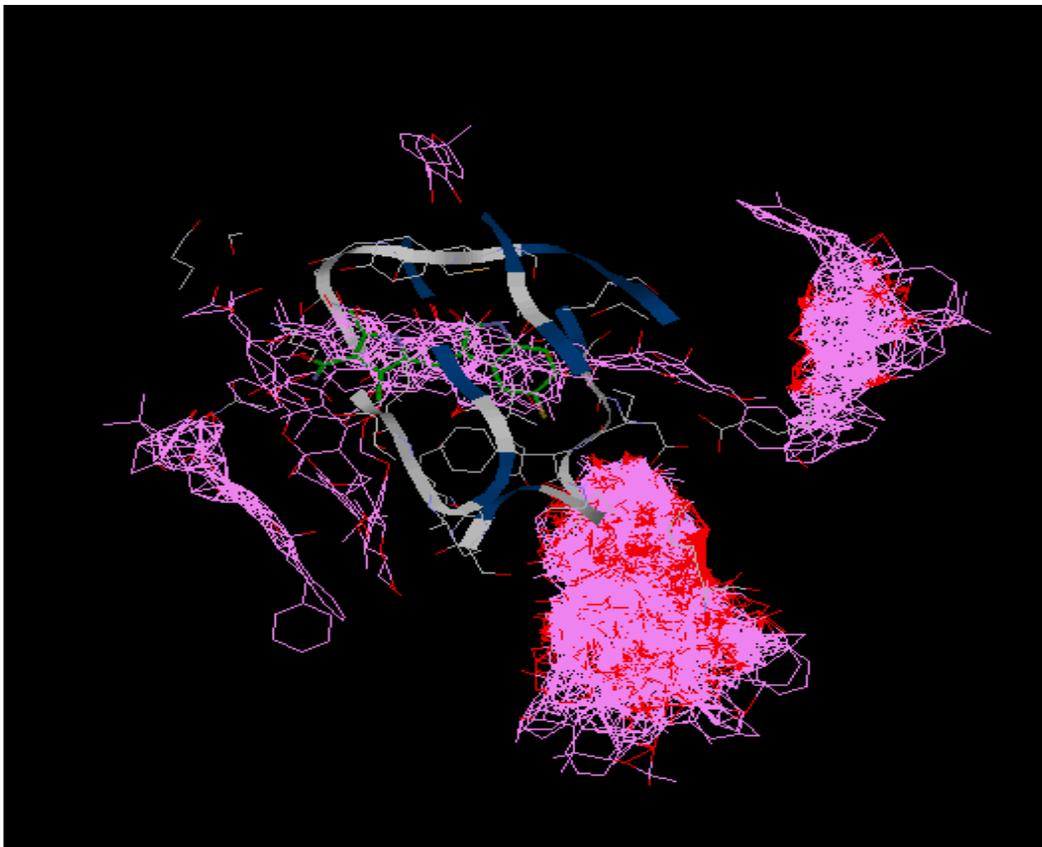
para mostrar a biodisponibilidade aceitável. Enquanto para as moléculas atuantes do SNC, este valor deve estar abaixo de 70-80 Å². Uma combinação de TPSA e o número de ligações rotativas na molécula afeta a biodisponibilidade oral de tal maneira que compostos com 10 ou menos ligações rotativas e um TPSA menor que 140 Å² têm uma alta probabilidade de serem biodisponíveis oralmente em ratos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 A busca por novos ligantes e o *Docking*

Ao se realizar a busca de compostos estruturalmente semelhante ao fragmento do sunitinibe (Figura 4), atualmente utilizado como medicamento de primeira linha no combate à GIST, no banco de dados do Sistem-X, foram encontradas 169 estruturas homólogas. Através dos estudos de *docking* entre esses 169 compostos e a enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E), com o emprego do programa iGEMDOCK, foi verificado que 17 compostos atuam no mesmo sítio ativo do sunitinibe, que está representado em verde na Figura 5, e são os que apresentaram as menores energias de interação. Cento e trinta e nove compostos atuam em outro sítio de ligação, próximo a este do sunitinibe, na região à direita inferior, mas com energias maiores e 13 compostos atuam em outros locais da proteína e não conseguiram ter as suas energias de ligação calculadas.

Figura 5. Resultado visual do *docking* realizado entre a enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E) e todos os compostos obtidos através da busca realizada no banco de dados do Sistem-X. Em verde está destacada a estrutura do sunitinibe em seu sítio ativo.



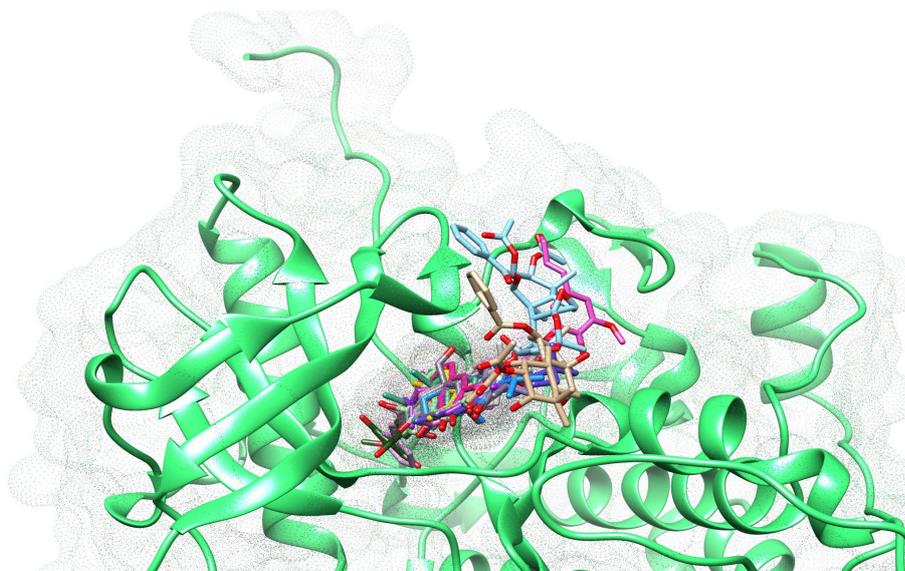
Fonte: O autor (2020)

No caso do *docking* molecular, as possíveis moléculas bioativas são testadas para um determinado alvo molecular a fim de estabelecer qual, ou quais, delas apresentam melhor acomodação ao sítio ativo do alvo. Os resultados obtidos nos ensaios computacionais são dados em termos da energia de ligação necessária para que a provável molécula bioativa se ligue ao sítio ativo do alvo molecular selecionado (Barros, 2015).

A estabilidade do complexo receptor-ligante pode ser traduzida em níveis de energia livre – que se refere à quantidade de energia disponível para a realização de trabalho cinético pelo composto, quanto menor a energia de ligação, mais estável será o complexo, pois menor será a quantidade de energia disponível para a realização de trabalho cinético. Por essa razão, as técnicas de *docking* procuram orientações espaciais do ligante que maximizem essas interações, diminuindo a energia livre de ligação do sistema (Santos e Freitas, 2018).

Seguindo esse conceito, ilustramos na Figura 6 apenas os compostos que, de acordo com os resultados do *docking*, se encontram no mesmo sítio ativo do sunitinibe e como dito, foram os que apresentaram os menores valores da energia de interação entre composto-sítio ativo.

Figura 6. Resultado visual do *docking* realizado entre a enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E) e os 17 compostos, com as menores energias de ligação, obtidos através da busca realizada no banco de dados do Sistemát-X.



Fonte: O autor (2020).

A Tabela 1 apresenta os 17 ligantes com as menores energias calculadas através das análises de *docking* e os respectivos valores das energias, em kJ/mol.

Dentre os resultados obtidos, os compostos 36 e 31 apareceram duas vezes, interagindo no mesmo sítio, entretanto com conformações diferentes. Deste modo, apenas umas das conformações, a de menor energia, será considerada. A Figura 7 ilustra as fórmulas estruturais dos compostos selecionados através dos estudos de *docking*.

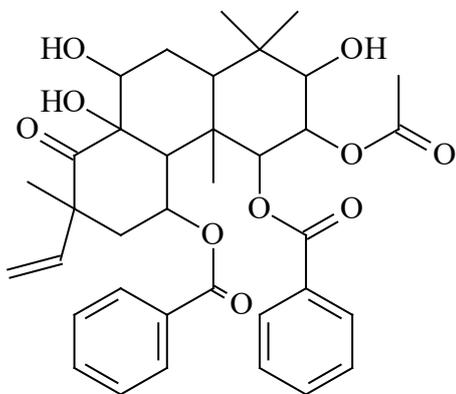
Tabela 1. Valores das energias, em kJ/mol, calculadas através do *docking* realizando entre os ligantes e a enzima tirosina quinase.

Composto	Energia total de ligação (kJ/mol)	Força de van der Waals	Ligação de hidrogênio	Ligação eletrostática
molécula 81	-122,54	-89,49	-33,05	0,00
molécula 124	-119,13	-107,64	-11,50	0,00
molécula 14	-107,36	-98,27	-9,09	0,00
molécula 75	-96,51	-85,60	-10,91	0,00
molécula 121	-93,71	-86,60	-7,11	0,00
molécula 54	-91,68	-80,51	-11,17	0,00
molécula 113	-91,04	-85,47	-5,58	0,00
molécula 36.1	-90,36	-85,37	-4,99	0,00
molécula 16	-87,89	-82,89	-5,00	0,00
molécula 13	-87,86	-85,75	-2,10	0,00
molécula 36.2	-87,82	-87,82	0,00	0,00
molécula 77	-87,47	-79,50	-7,98	0,00
molécula 31.1	-86,73	-77,94	-8,79	0,00
molécula 100	-84,35	-83,32	-1,03	0,00
molécula 60	-83,02	-79,15	-3,87	0,00
molécula 66	-80,86	-72,94	-7,92	0,00
molécula 31.2	-71,43	-55,60	-15,83	0,00

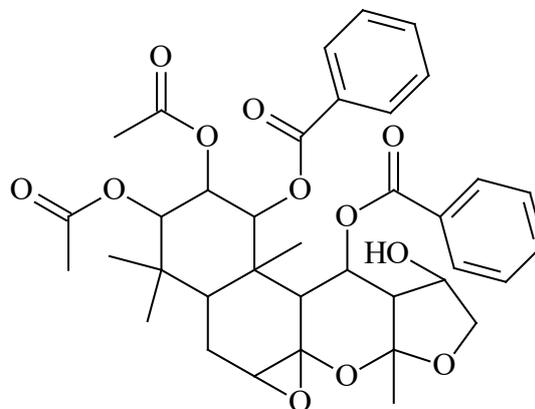
Fonte: O autor (2020).

Figura 7. Fórmula estruturas dos compostos selecionados através dos estudos de *docking* molecular que apresentaram as melhores energias de ligação com a enzima tirosina quinase.

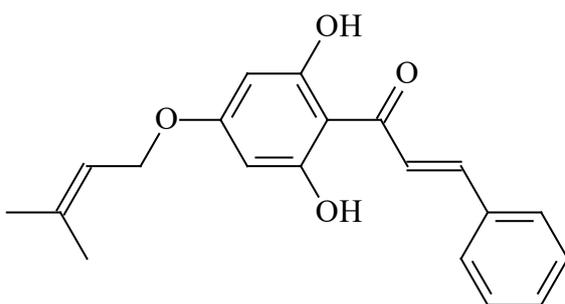
continua



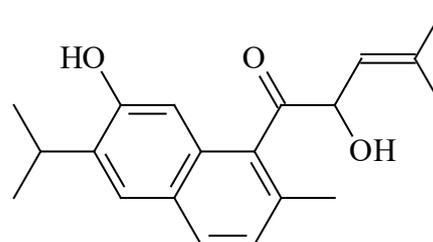
Composto 81



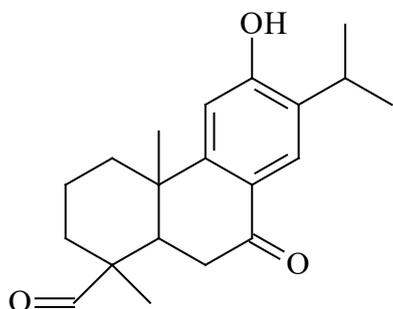
Composto 124



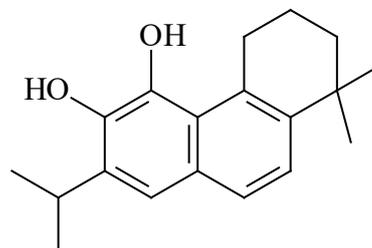
Composto 14



Composto 75



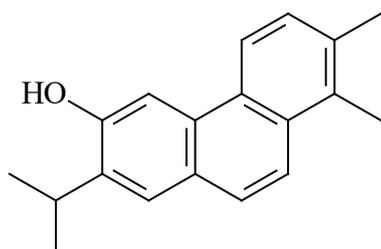
Composto 121



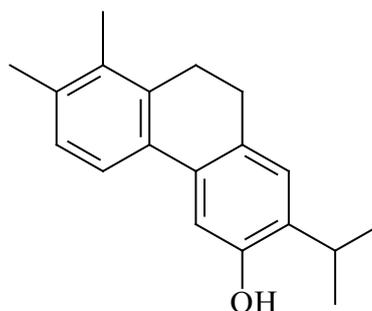
Composto 54

Figura 7. Fórmulas estruturais dos compostos selecionados através dos estudos de *docking* molecular que apresentaram as melhores energias de ligação com a enzima tirosina quinase.

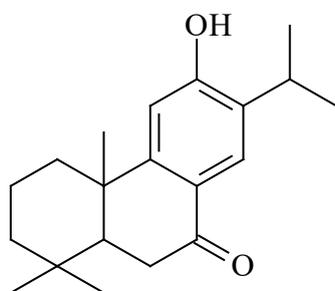
continuação



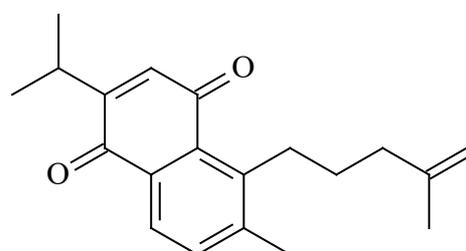
Composto 113



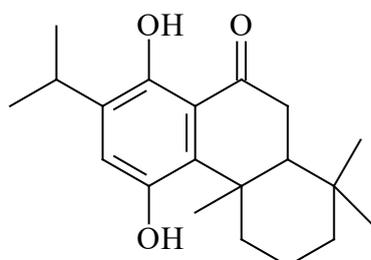
Composto 36



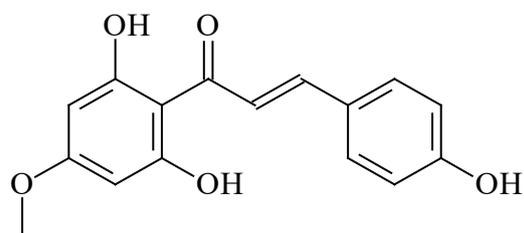
Composto 16



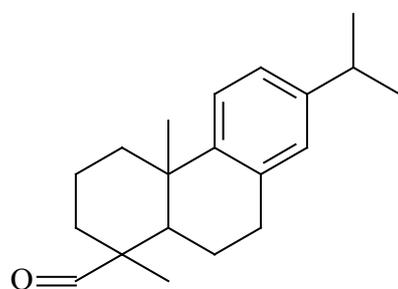
Composto 13



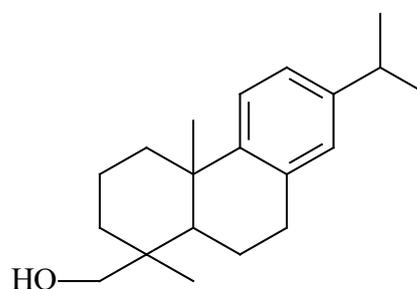
Composto 77



Composto 31



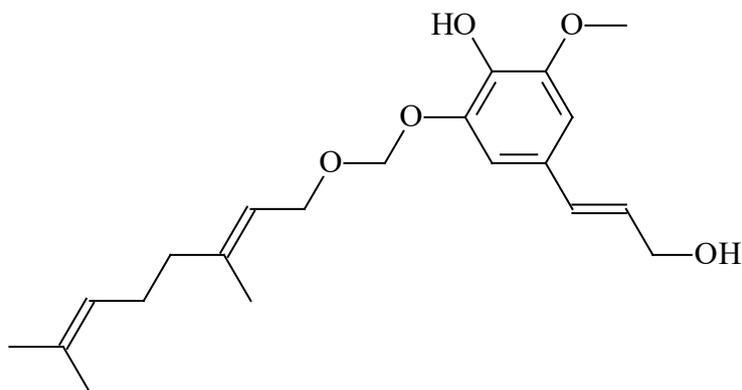
Composto 100



Composto 60

Figura 7. Fórmula estruturas dos compostos selecionados através dos estudos de *docking* molecular que apresentaram as melhores energias de ligação com a enzima tirosina quinase.

conclusão



Composto 66

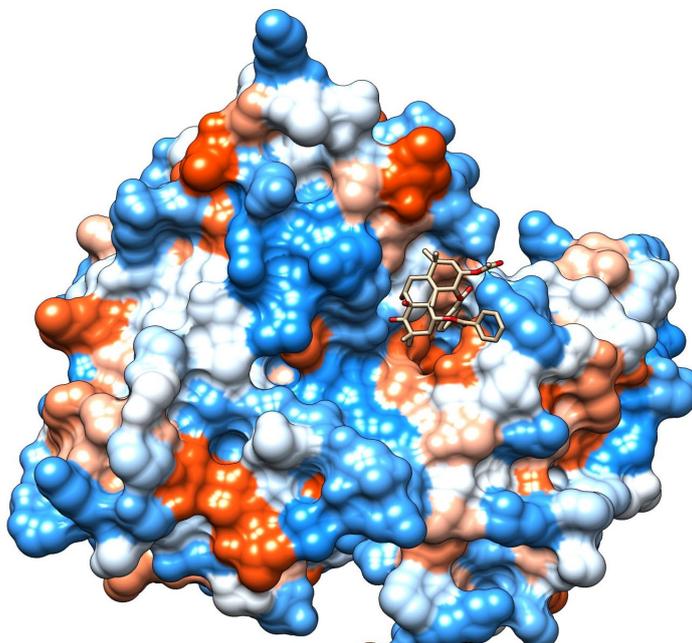
Fonte: O autor (2020).

Através dos dados da Tabela 1, verifica-se que em todos os resultados obtidos, as forças de van der Waals predominam sobre as ligações de hidrogênio e as ligações eletrostáticas não demonstraram ter importância para as ligações ligante-enzima.

A molécula 81 registrou a menor energia de ligação dentre todos os compostos, interagindo com o sítio ativo da enzima tirosina quinase, ilustrada na Figura 8, com os contornos hidrofóbicos. Nos contornos apresentados, em azul estão localizados os aminoácidos menos eletronegativos e em vermelho estão localizados os aminoácidos mais eletronegativos.

Em outra imagem (figura 9) percebemos a molécula 81 (de menor energia de ligação), interagindo com o sítio ativo da enzima, apresentando as ligações de hidrogênio, (linha azul). Como pode ser observado, existem duas ligações de hidrogênio que ocorrem entre a molécula 81 e o sítio da enzima, o que fortalece a interação entre as duas. A ligação de hidrogênio do lado esquerdo ocorre com o grupamento tiol (-SH) da cisteína 674A e a do lado esquerdo ocorre com glicina 676A.

Figura 8. Resultado visual do *docking* ilustrando a interação da molécula 81 com o sítio ativo da enzima tirosina quinase (código PDB 3G0E) com os contornos hidrofóbicos.



Fonte: O autor (2020).

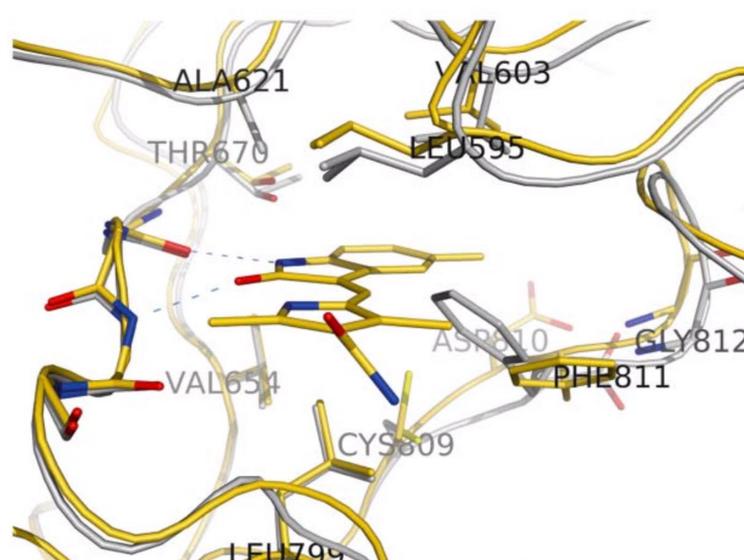
Figura 9. Ilustração das ligações de hidrogênio que ocorrem entre a enzima tirosina quinase e o composto 81.



Fonte: O Autor (2020).

Esse resultado é particularmente importante pois reproduz um desfecho similar obtido por Gajiwala et al. (2009), da interação entre o sunitinibe e os aminoácidos que se encontram no sítio ativo da enzima tirosina quinase (Figura 10). Este sítio é o mesmo encontrado através das análises de *docking*, embora a interação entre o composto 81 e a enzima não ocorra com os mesmos aminoácidos.

Figura 10. Ilustração dos aminoácidos presentes no sítio ativo da enzima tirosina quinase que estão interagindo com o sunitinibe.



Fonte: Gajiwala et al. 2009.

De acordo com Gajiwala et al. (2009), o modo com que o sunitinibe se liga à forma auto inibida da proteína C-KIT, sugere que regimes bem-sucedidos de tratamento do câncer podem exigir uma mistura de inibidores para bloquear várias conformações da proteína alvo. Essa estratégia seria usada para contornar, ou pelo menos atrasar, o início da resistência à droga, e é um resultado com potencial impacto no tratamento deste tipo de tumor. Como os compostos obtidos neste trabalho atuam no mesmo sítio ativo do sunitinibe devem atuar provavelmente do mesmo modo. Os compostos que demonstraram atuar em outras localidades poderiam auxiliar a bloquear as outras conformações da proteína.

3.2 Dinâmica Molecular

A etapa seguinte constituiu-se nas simulações de dinâmica molecular (DM), efetuadas com o emprego do programa GROMACS, com o objetivo de caracterizar as interações entre o receptor tirosina quinase em um sistema contendo ligantes, solvente, íons, pressão e temperatura.

Foram selecionadas as 10 moléculas que apresentaram as melhores energias de interação, obtidas nos estudos de *docking* molecular para se estudar a flexibilidade e mudanças conformacionais dos complexos durante a simulação de DM. Nesta etapa foram utilizadas as moléculas 13, 14, 16, 36, 54, 75, 81, 113, 121, 124 e o sunitinibe, para ser utilizado como padrão de comparação.

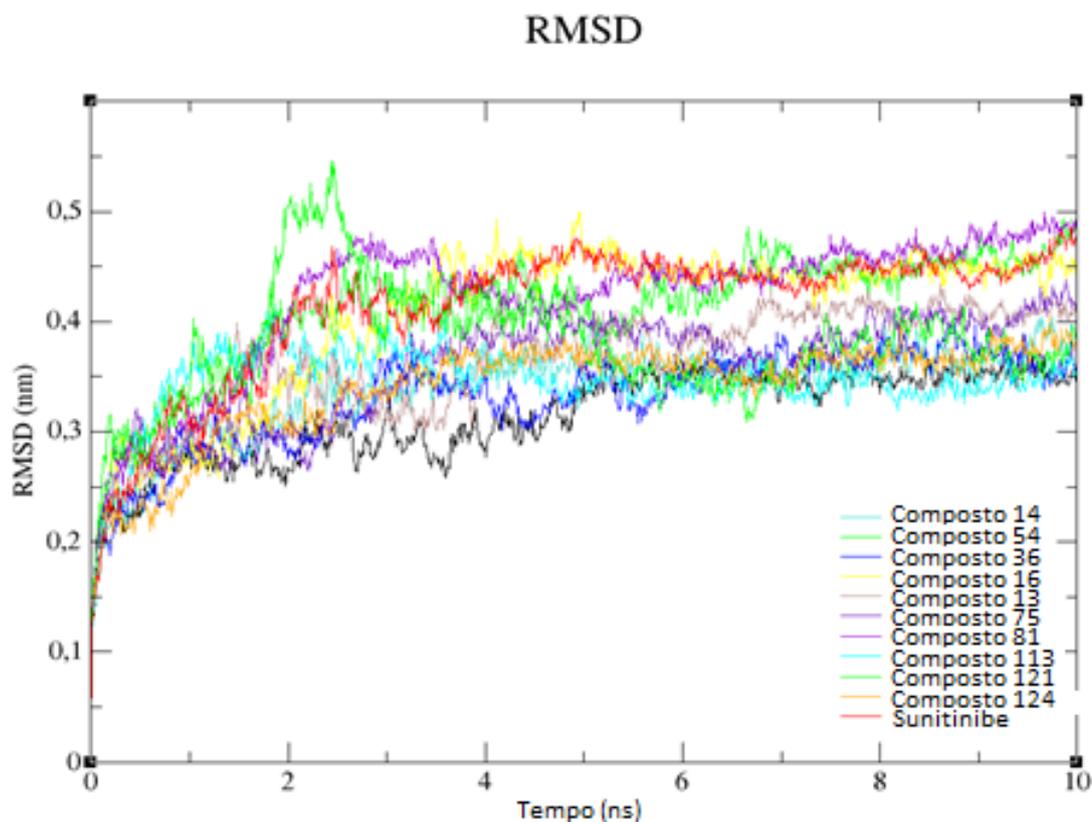
O desvio médio quadrático (RMSD) foi calculado para os átomos de C α da proteína e das estruturas de cada ligante separadamente. A análise de RMSD do RTK mostrou que a proteína atingiu conformações variando de 0,2 a 0,3 nm de tamanho em 10 ns. Os resultados mostraram que a proteína é altamente estável (Figura 11), sem alterações estruturais relevantes.

Quando comparado o RMSD da RTK complexada aos ligantes e o medicamento Sunitinibe, observou-se que os mesmos apresentaram o mesmo padrão, porém com valor de RMSD superior ao do receptor não complexado (Figura 11). A estabilidade foi alcançada a partir dos 4 ns, alcançando flutuação de 0,3 a 0,4 nm. Com essas informações, pode-se dizer que o RTK é um receptor que sofre poucas modificações estruturais na presença de diversos fatores, não comprometendo a afinidade de ligação observada no *docking*.

A análise de RMSD apenas dos ligantes mostrou que os compostos 14 e 121 são os mais estáveis e com estabilidade observada durante toda a simulação de dinâmica (Figura 12 A e B), enquanto o sunitinibe só alcançou estabilidade após 4 ns.

Deste modo, embora a proteína sofra pequenas alterações estruturais, supõe-se que os compostos 14 e 121 tendem a permanecer ligados no sítio ativo, mantendo a afinidade de ligação.

Figura 11. Valores do desvio médio quadrático (RMSD) dos átomos de Ca do receptor tirosina quinase (RTK) complexado com os compostos 13, 14, 16, 36, 54, 75, 81, 113, 121, 124 e o sunitinibe.

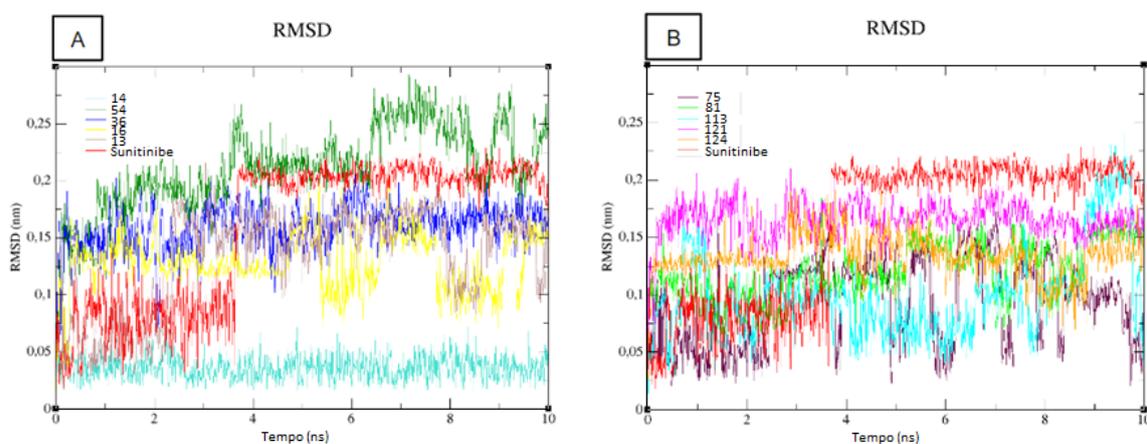


Fonte: O autor (2020).

Figura 12. Valores do desvio médio quadrático (RMSD) dos átomos de Ca dos compostos selecionados através dos estudos de *docking* e o Sunitinibe.

A) RMSD dos compostos 14, 54, 36, 16, 13 e o Sunitinibe.

B) RMSD dos compostos 75, 81, 113, 121, 124 e Sunitinibe.



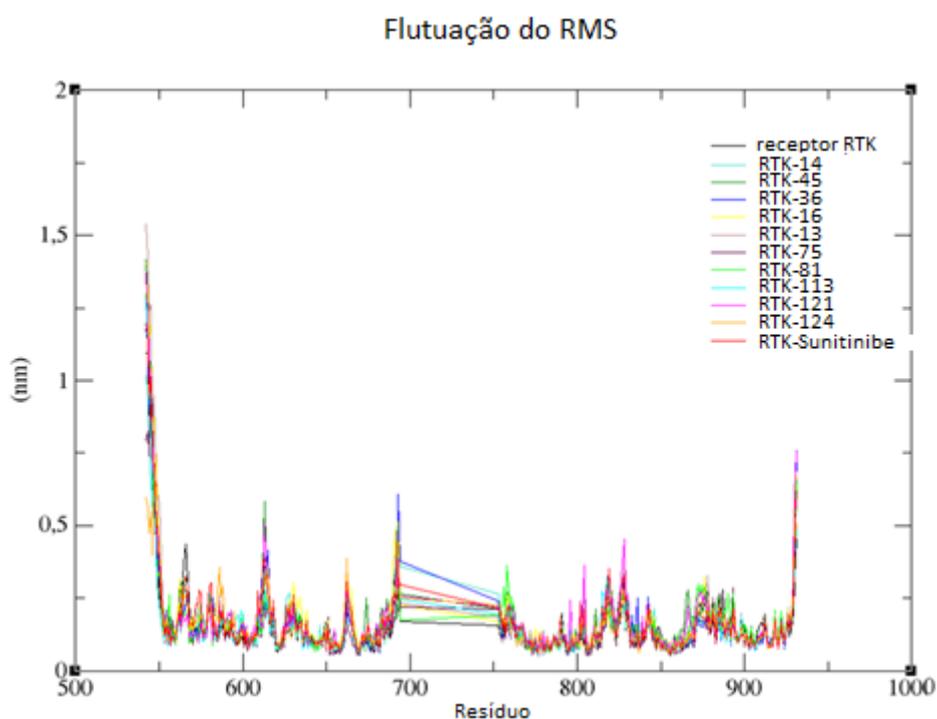
Fonte: O autor (2020).

Para compreender a flexibilidade dos resíduos e os aminoácidos que contribuem para a mudança conformacional do RTK, foram calculadas as flutuações médias da raiz quadrada (RMSF) de cada aminoácido do receptor. Resíduos com altos valores de RMSF sugerem mais flexibilidade e valores baixos de RMSF refletem menor flexibilidade.

Considerando que os aminoácidos com flutuações acima 0,3 nm contribuem para a flexibilidade da estrutura proteica, foi constatado que dentre os 389 aminoácidos do receptor RTK, apenas 18 aminoácidos contribuíram para a mudança conformacional.

Os resíduos envolvidos na flexibilidade da estrutura proteica são: 542-550, 690-694, 827, 828, 929-931 (Figura 13). Nenhum destes aminoácidos faz parte dos resíduos críticos do sítio ativo, o que contribui para manter a afinidade de ligação entre os complexos.

Figura 13. Valores das flutuações médias da raiz quadrada (RMSF) dos átomos de C α do receptor tirosina quinase (RTK) complexado aos compostos e ao sunitinibe.



Fonte: O autor (2020).

A Figura 14 mostra o complexo RTK com o composto mais estável, a molécula 14, durante diferentes etapas das simulações de dinâmica em 1000ps.

FIGURA 14. Simulações de dinâmica molecular durante 1000ps.

A – Estrutura do complexo tirosina quinase (RTK)-14 e seu sítio ativo,

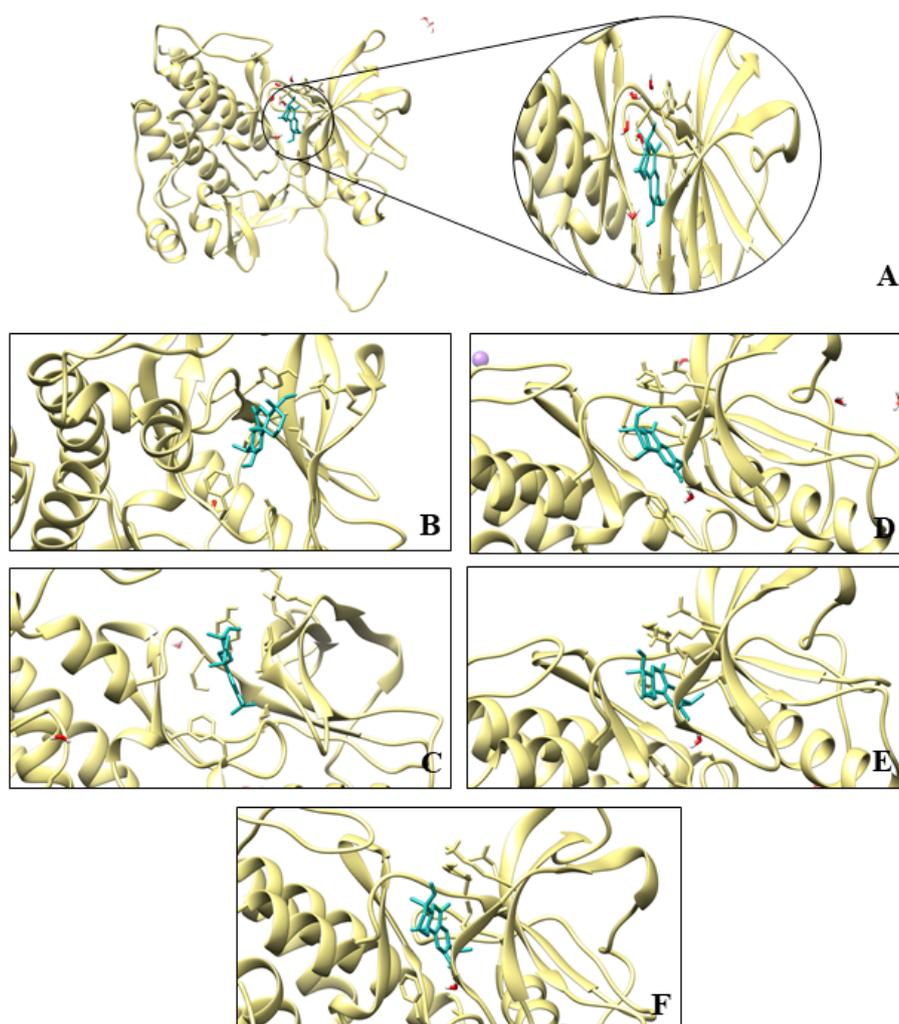
B – 200ps,

C – 400 ps,

D – 600 ps,

E – 800ps e

F – 1000ps.



Fonte: O autor (2020).

3.3 Previsão *in silico* de propriedades físico-químicas e perfil farmacocinético

Os valores resultados dos cálculos realizados através do site Molinspiration para cada um dos 10 compostos sugeridos pelos estudos de *docking* estão apresentados na Tabela 2.

Nesta tabela, os compostos que obedecem a regra dos 5 de Lipinski são os que não apresentam nenhuma violação (N_{viol}).

Tabela 2. Valores das propriedades físico-químicas *in silico*, dos compostos sugeridos pelo estudo de *docking*, determinados pelo Molinspiration.

Composto	miLogP	TPSA	PM	HBA	HBD	N_{viol}	N_{ROT}	Vol
81	5,14	156,67	634,72	10	3	2	9	577,82
124	6,22	156,44	678,73	12	1	3	10	598,52
14	5,38	66,76	324,38	4	2	1	6	304,21
75	4,98	57,53	312,41	3	2	0	4	306,93
121	4,78	54,37	314,43	3	1	0	2	308,46
54	5,46	40,46	284,40	2	2	1	1	283,21
113	6,04	20,23	264,37	1	1	1	1	263,12
36	5,59	20,23	266,38	1	1	1	1	269,30
16	5,51	37,30	300,44	2	1	1	1	306,04
13	5,15	34,14	296,41	2	0	1	5	299,79

Fonte: O autor (2020).

MiLogP: logaritmo do coeficiente de partição n-octanol-água.

TPSA: Área total de superfície polar.

%ABS: Porcentagem de absorção.

PM: Peso molecular.

HBA: Aceitadores de ligação de hidrogênio.

HBD: Doadores de ligação de hidrogênio.

N_{viol} : Numero de violações.

N_{ROT} : Numero de ligações racionáveis.

Vol: Volume molecular.

Dois compostos obtidos através do estudo de *docking* não possuem nenhuma violação, compostos 75 e 121 e poderiam ser sugeridos para estudos posteriores.

Através do estudo de *docking*, o composto 81 foi o que apresentou a melhor energia de interação com a enzima, mas apresenta duas violações na regra dos 5. Possui um alto peso molecular e o miLogP é maior que 5,0. Já o composto 14, que demonstrou uma boa estabilidade nos estudos de dinâmica molecular apresenta uma violação à regra dos 5. Este composto também apresenta o valor de miLogP maior que 5,0.

O segundo composto que demonstrou uma boa estabilidade nos estudos de dinâmica molecular foi a molécula 121, e que não apresentou nenhuma violação à regra dos 5. O composto 75 foi o quarto melhor posicionado através dos estudos de *docking*, mas não foi um dos melhores posicionados nos estudos de DM.

4. CONCLUSÃO

A Química Medicinal, ferramenta do planejamento racional de novos fármacos, compreende a síntese ou isolamento de compostos com atividade biológica de alta seletividade, visando a produção de medicamentos que possuem uma maior absorção e com menos efeitos adversos para a saúde dos pacientes.

Embora a ideia de um medicamento alvo para um tumor pareça simples, esta abordagem é complexa e nem sempre eficaz. A terapia alvo representa um avanço no tratamento do câncer, porém apenas alguns tipos de neoplasias podem ser tratadas com estas drogas. Os inibidores de tirosina quinase utilizados no combate GIST atualmente são bem estabelecidos, entretanto sua efetividade diminui devido às mutações celulares que levam à resistência medicamentosa.

Tendo em vista que de cada 30.000 moléculas estudadas, 66,7% entram na fase de estudos pré-clínicos, 0,027% são aprovadas pelos órgãos regulatórios, e apenas 0,003%, ou seja, uma satisfaz o mercado, a busca por novos compostos bioativos nunca cessa.

Este trabalho conseguiu identificar 169 compostos, com estruturas semelhantes ao sunitinibe, em um banco de dados de compostos naturais, o SISTEMAT-X, que foram submetidos ao *docking* e cálculos de dinâmica molecular para testar a afinidade com a enzima tirosina quinase. O composto 121 demonstrou ser um bom ligante, estável em seu sitio ativo e obedece a regra dos 5 de Lipinski, tornando-o um grande candidato a testes futuros.

Como proposta, seria interessante a realização de testes *in vivo* entre a enzima tirosina quinase e os compostos 121, 14 e 75, visto que os estudos computacionais apenas sugerem possíveis ligantes e os estudos *in vivo* poderiam verificar a eficiência destas moléculas.

REFERÊNCIAS

- Abraham, M.J., Murtola, T., Schulz, R., Páll, S., Smith, J.C., Hess, B., Lindahl, E., 2015. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1, 19-25. <https://doi.org/10.1016/j.softx.2015.06.001>.
- Barchi, L.C., Gama-Rodrigues, J., Carvalho, F.A., Barchi, M.C., Oliveira, O.C. Grimaldi, Carneiro, M. F., 2012. Tumor estromal gástrico cístico C-kit negativo. *ABCD arq. bras. cir. Dig*, 25(4), 300-302. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-67202012000400018>.
- Barros, M.E.S.B., 2015. Estudos de Docking Molecular, síntese e atividade biológica de análogos da (-)-massoialactona e da combretastatina A-4 (Master's thesis, Universidade Federal de Pernambuco). https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/18477/1/Tese%20Maria%20Ester%20Barros_CD_4.pdf (acesso em 3 ago. 2019).
- Berendsen, H.J., van der Spoel, D., van Drunen, R., 1995. GROMACS: a message-passing parallel molecular dynamics implementation. *Computer physics communications*, 91(1-3), 43-56. [https://doi.org/\(...\)0010-4655\(95\)00042-e](https://doi.org/(...)0010-4655(95)00042-e).
- Bondi, A.V., 1964. van der Waals volumes and radii. *The Journal of physical chemistry*, 68(3), 441-451. <https://doi.org/10.1021/j100785a001>.
- Cowan-Jacobs, S.W., Fendrich, G., Liebetanz, J., Fabbro, D., Manley, P., 2007. Human Abl kinase domain in complex with imatinib (STI571, Glivec). *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 63, 80-93. <https://doi.org/10.2210/pdb2HYY/pdb>.
- De Ruyck, J., Brysbaert, G., Blossey, R., Lensink, M.F., 2016. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. *Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC*, 9, 1 <https://doi.org/10.2147/AABC.S105289>.
- Gajiwala, K.S., Wu, J.C., Christensen, J., Deshmukh, G.D., Diehl, W., DiNitto, J.P., English, J.M., Greig, M.J., He, Y.A., Jacques, S.L, Lunney, E.A., McTigue, M., Molina, D., Quenzer, T., Wells, P.A., Yu, X., Zhang, Y., Zou, A., Emmett, M.R.,

- Marshall, A.G., Zhang, H.M., Demetri, G.D., 2009. KIT kinase mutants show unique mechanisms of drug resistance to imatinib and sunitinib in gastrointestinal stromal tumor patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 06, 1542-1547. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812413106>.
- Garofalo, M., Grazioso, G., Cavalli, A., Sgrignani, J., 2020. How Computational Chemistry and Drug Delivery Techniques Can Support the Development of New Anticancer Drugs. *Molecules*, 25(7), 1756. <https://doi.org/10.3390/molecules25071756>.
- Heinrich, M.C., Maki, R.G., Corless, C.L., Antonescu, C.R., Harlow, A., Griffith, D., Town, A., McKinley, A., Ou, W.B., Fletcher, J.A., Fletcher, C.D., Huang, X., Cohen, D.P., Baum, C.M., Demetri, G.D., 2008. Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. *J Clin Oncol*; 26(33):5352-5359. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.15.7461>.
- Hsu, K.-C., Chen, Y.-F., Lin, S.-R., Yang, J.-Y., 2011. iGEMDOCK: a graphical environment of enhancing GEMDOCK using pharmacological interactions and post-screening analysis. *BMC Bioinformatics*, 12(Suppl 1), S33-S33. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-S1-S33>
- Lin, X., Li, X., Lin, X., 2020. A Review on Applications of Computational Methods in Drug Screening and Design. *Molecules*, 25(6), 1375. <https://doi.org/10.3390/molecules25061375>.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23(1-3), 3-25. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0).
- Lopes, J.M., Soares, M., Gouveia, A.M., Barroso, S., Cravo, M., Mansinho, H., Penedo, J., Sá, A., Santos, L.L., Teixeira, J.A., 2012. Recomendações para Análise Mutacional em Tumores do Estroma Gastrointestinal (GISTs). Grupo de Trabalho Português GIST: Proposta de Condeixa. *Rev. Port. Cir.*, Lisboa, 23, 61-68. http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1646-69182012000400011&lng=pt. (acesso 2 mar. 2019).

- Monges, G., Bisot-Locard, S., Blay, J.Y., Bouvier, A.M., Urbieta, M., Coindre, J.M., Scoazec, J.Y., 2010. The estimated incidence of gastrointestinal stromal tumors in France. Results of PROGIST study conducted among pathologists. *Bulletin du cancer* 97(3), E16-E22. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1041>.
- Oliveira, L.R.P., Pace, F.H.L., Souza, A.F.M., 2011. Tumores estromais do trato gastrointestinal: revisão da literatura. *HU Rev.*, 37(2), 247-255.
- Oostendorp, R.L., Beijnen, J.H., Schellens, J.H., Tellingen, O., 2007. Determination of imatinib mesylate and its main metabolite (CGP74588) in human plasma and murine specimens by ion-pairing reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Biomedical chromatography* 21 (7), 747-754. <https://doi.org/10.1002/bmc.816>.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E., 2004. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612. <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.
- Rahman, M.M., Karim, M., Ahsan, M., Khalipha, A., Chowdhury, M., Saifuzzaman, M2012. Use of computer in drug design and drug discovery: A review. *International Journal of Pharmaceutical and Life Sciences, Bangladesh*, 1 (2), 1-21. <https://doi.org/10.3329/ijpls.v1i2.12955>.
- Roskoski Jr, R., 2018. The role of small molecule Kit protein-tyrosine kinase inhibitors in the treatment of neoplastic disorders. *Pharmacological research*, 133, 35-52. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.04.020>.
- Santos, E.B.D., Freitas, B.D.S., 2018. Docking molecular da proteína Quinase ativada por AMP (AMPK): caracterização in silico das principais propriedades referentes à interação proteína-ligante. bdta.ufra.edu.br/jspui/handle/123456789/1263. (acesso 10 set. 2019).
- Santos Júnior, H.M., Silva Araújo, E.R., Arêa Leão, F.G., 2012. Avaliação dos Casos de GIST do Hospital do Câncer do Ceará: Análise de 8 Anos. *Rev. bras. cancerol.*, 58(2), 189-195. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2012v58n2.618>.

- Schmid, N., Eichenberger, A.P., Choutko, A., Riniker, S., Winger, M., Mark, A.E., van Gunsteren, W.F., 2011. Definition and testing of the GROMOS force-field versions 54A7 and 54B7. *Eur Biophys J* 40(7), 843. <https://doi.org/10.1007/s00249-011-0700-9>.
- Scotti, M.T., Herrera-Acevedo, C., Oliveira, T.B., Costa, R.P.O., Santos, S.Y.K.O., Rodrigues, R.P., Scotti, L., Da-Costa, F.B., 2018. Sistemax, an Online Web-Based Cheminformatics Tool for Data Management of Secondary Metabolites. *Molecules*, 23, 103. <https://doi.org/10.3390/molecules23010103>
- Taft, C.A., Da Silva, V.B., Da Silva, C.H., 2008. Current topics in computer-aided drug design. *J. pharm. sci.*, 97, (3), 1089-1098. <https://doi.org/10.1002/jps.21293>
- Usha, T., Shanmugarajan, D., Goyal, A.K., Kumar, C.S., Middha, S.K., 2017. Recent Updates on Computer-aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(30), 3296-3307. <https://doi.org/10.10.2174/1568026618666180101163651>.
- Vivi, A.A.G., Antoniassi, A.C.D., Coelho, A.C.T.E.R., Garetti, B., Barbisan, G.G., 2017. Tumor estromal gastrointestinal de origem gástrica: relato de caso. *Medicina (Ribeirão Preto, Online.)* 50(3), 197-200. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v50i3p197-200>.
- Vlachakis, D.P., 2018. *Molecular Docking*. Londres: IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.69830>.
- Wilson, E.A., Russu, W.A., Shallal, H.M., 2018. Preliminary in vitro and in vivo investigation of a potent platelet derived growth factor receptor (PDGFR) family kinase inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 28(10), 1781-1784. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.04.030>.
- Yang, J.M., Chen, C.C., 2004. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 55(2), 288-304. <https://doi.org/10.1002/prot.20035>.
- Zhao, X.; Yue, C., 2012. Gastrointestinal stromal tumor. *Journal of Gastrointestinal Oncology*, 3(3), 189-208. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2078-6891.2012.031>.