

**Estudo QSAR 3D de complexos tricarbonilo
de Re e Tc com afinidade estabelecida
para os recetores 5HT_{1A}**

Zélia Barbosa

Artigo integrado na
Parte 3 "Domínio das Ciências da Saúde"
da publicação.

Páginas do artigo
147 a 163

Título da Publicação
Ciências Aplicadas: Coletânea de Estudos

Coordenação
Susana Gonçalves, Helena Almeida, Paula Fonseca, Cândida Malça,
Fátima Neves, Carlos Dias Pereira e Marco Veloso

Data de publicação
Fevereiro de 2017

Editor
CINEP/IPC

ISBN (impresso) 978-989-99463-0-9

ISBN(ebook) 978-989-99463-1-6

Nota biográfica

Zélia **Barbosa**

Licenciada em Farmácia pela Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra, Pós graduada em Administração em Serviços de Saúde na opção de gestão de Recursos Humanos pela Escola Superior de Enfermagem Dr. Ângelo da Fonseca, Mestre em Química Inorgânica Biomédica- Aplicações em Diagnóstico e Terapia pela Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa em Parceria com o Instituto Tecnológico e Nuclear e especialista em Farmácia, Professora Adjunta do Departamento de Farmácia da Escola Superior de Tecnologia da Saúde de Coimbra. Com publicações de artigos nacionais e internacionais e apresentação de comunicações em congressos.



Estudo QSAR 3D de complexos tricarbonilo de Re e Tc com afinidade estabelecida para os recetores 5HT_{1A}

Zélia Barbosa

Várias estratégias podem ser utilizadas no desenvolvimento de fármacos. Algumas envolvem alterações de natureza estereoquímica nas moléculas, para que seja melhorada a ligação entre o fármaco e o alvo ou mudança de grupos funcionais ou substituintes de forma a melhorar a farmacocinética e/ou a farmacodinâmica do fármaco que envolvem a síntese de vários análogos. Se forem consideradas todas as combinações possíveis o número de análogos que pode ser sintetizado é infinito. Assim, é claramente vantajosa uma abordagem racional, para decidir quais as alterações a realizar na molécula. A abordagem QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) tem demonstrado ser muito útil na resolução destes problemas. Esta abordagem visa identificar e quantificar as propriedades físico-químicas do fármaco para as correlacionar com a sua atividade biológica. Se essa relação for encontrada, é possível escrevê-la sob a forma de uma equação matemática permitindo assim identificar as propriedades que desempenham um papel importante na farmacocinética ou na farmacodinâmica do fármaco e obter informação sobre as novas estruturas a desenvolver. Esta estimativa antecipada da atividade biológica de uma nova molécula a sintetizar apresenta vantagens evidentes. As propriedades mais comuns num estudo QSAR são as propriedades hidrofóbicas, eletrónicas e estereoquímicas uma vez que é possível quantificar esses efeitos (Patrick, 2005).

Os recetores 5-HT_{1A} pré ou pós-sinápticos desempenham um papel bastante importante na regulação do humor, cognição e controlo motor, funções que se encontram alteradas nos doentes esquizofrénicos, e que são profundamente alteradas pelos agentes anti psicóticos (Caliendo, Santagada, Perissutti &



Fiorino, 2005). Estudos *post mortem* demonstraram a existência de uma redução na densidade dos recetores 5-HT_{1A} em pacientes com doença de Alzheimer (Bowen, Najlerahim, Procter, Francis & Murphy, 1989). O receptor 5-HT_{1A} é um dos recetores associados à proteína G e inibe a atividade da adenilatociclase (B. Kobilka, Frielle, Collins, Yang-Feng, T. Kobilka, Francke, Lefkowitz & Caron, 1987).

Devido à importância deste recetor em patologias do foro psiquiátrico a descoberta de novos ligandos tem sido uma importante área de investigação neurobiológica. Do ponto de vista químico, os ligandos conhecidos podem ser divididos em diferentes classes (Caliendo, Santagada, Perissutti & Fiorino, 2005; Olivier, Soudijn, van Wijngaarden 1999; Oh, Ha, Chi & Lee, 2001; Lopez-Rodriguez, Ayala, Benhamu, Morcillo & Viso, 2002; Pessoa-Mahana, Araya-Maturana, Saitz & Pessoa-Mahana, 2003).

Material e métodos

A estratégia de modelação consistiu em vários passos. O primeiro e mais longo consistiu numa extensa pesquisa bibliográfica de complexos tricarbonilo de Re e de ^{99m}Tc preparados com o objetivo de visualizar os recetores da serotonina 5-HT_{1A} e com a afinidade para este recetor determinada experimentalmente em termos de IC₅₀ por ensaios de competição usando homogenado de hipocampo de cérebro de rato e [³H]-8-OH-DPAT como radioligando.

Desta pesquisa resultaram vinte estruturas distintas que cumpriam estes requisitos.

Na Figura 1 apresentam-se as estruturas dos complexos utilizados neste estudo.

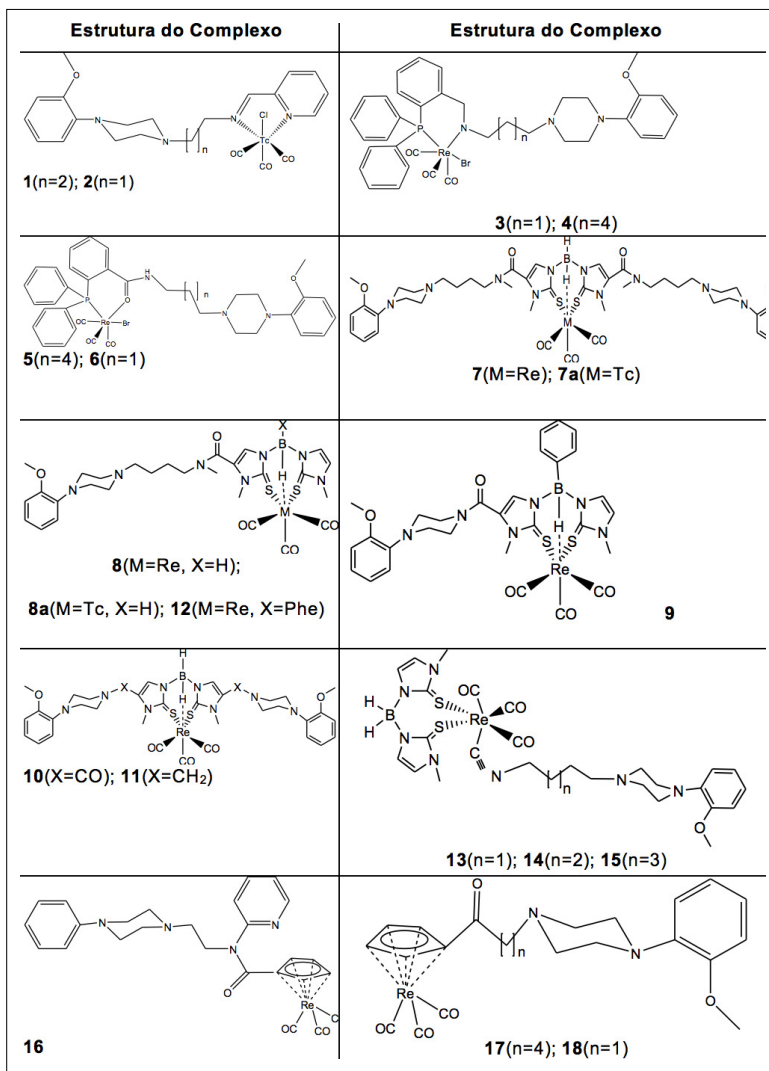


Figura 1. Estrutura dos complexos incluídos no estudo

Na Tabela 1 apresentam-se os valores experimentais da afinidade para o receptor 5-HT_{1A}, bem como o valor do coeficiente de partição octanol/água, usando o programa informático cLogP (versão 4.0; BioByte Corp) um programa validado com um número muito elevado de valores experimentais

de fármacos. Este programa calcula o LogP utilizando o método da adição de fragmentos.

Tabela 1. Valores da afinidade experimental dos complexos com o receptor e do Coeficiente partição octanol/água usando o programa cLogP

Complexo	IC ₅₀ 5HT _{1A} (nM)	cLogP
1	5±4	2,595
2	630	2,391
3	285±4	6,483
4	1100±4	7,748
5	200±4	7,163
6	20±0,1	6,155
7	0,172±0,003	4,369
7a	0,172±0,003	2,264
8	0,71±0,02	1,978
8a	0,71±0,02	1,978
9	9290±212	5,264
10	8130±505	1,722
11	4666±155	4,659
12	0,65±0,01	5,173
13	66,5±1	0,399
14	21,9±0,5	1,538
15	23,2±0,2	4,747
16	71±0	0,423
17	6±0	1,204
18	217±0	0,775

Os compostos **3,5,8,10,12,13** e **18** foram caracterizados por difração de raios-X de cristal único e depositados no CCDC (Cambridge Crystallographic Data Centre), sob os números 235824, 235823 (Amlai, Ramboz, Boschert, Plassat & Hen, 1992), 157756 (Adham *et al.*, 1993; 19], 189597 (Sodhi & Sanders-Bush, 2004), 157757, 250856 (Adham *et al.*, 1993; Hoyer *et al.*, 1994) e 160746 (Oh, Ha, Chi & Lee, 2001), respetivamente, o que constituiu uma

situação ótima para a elaboração da base de dados estrutural, que constituiu o segundo passo.

As estruturas foram modeladas utilizando o programa informático Molecular Modeling Pro Plus (MMP, versão 6.24; ChemSW, Inc.) e em seguida exportadas no formato de base de dados em MS Access (Versão 2003, Microsoft Co).

Os complexos que tinham sido caracterizados por difração de raios-X de cristal único, foram então colocados na base de dados, sem terem sido alvo de qualquer modificação estrutural. No caso dos complexos que não tinham sido caracterizados pela referida técnica, foi utilizada a estrutura cristalográfica mais próxima do composto a modelar a qual foi depois editada em modo 3D até se obter a estrutura pretendida. As estruturas das moléculas editadas, e só as destas, foram posteriormente alvo de minimização energética em todas as secções editadas utilizando algoritmos de Mecânica Molecular (MM2) e seguidamente enviadas para a base de dados (Dyott, Stuper & Zander, 1980).

Os programas de modelação atualmente disponíveis calculam de forma automática uma grande quantidade de descritores moleculares (“propriedades”) de carácter global, utilizando algoritmos rápidos de Mecânica Molecular ou de Mecânica Quântica (semi-empíricos). Estes descritores têm necessariamente de ser complementados com um conjunto alargado de propriedades específicas para o modelo em causa. No caso considerado, e para além dos mais de 140 descritores moleculares calculados pelo programa MMP, foram também calculadas e adicionadas todas as propriedades moleculares, na sua maioria locais, que se julgou poderem de alguma forma influenciar a afinidade da molécula para com o recetor.

Foi também calculado o logaritmo do coeficiente de partição octanol/água, com o programa cLogP versão 4.0; BioByte Corp. (cLogP), cujo valor se adicionou à base de dados

Elaboração da base de dados

A base de dados foi criada no formato Access 2003 (Microsoft Office Access 2003 versão 5.1.2600 Service Pack 2 Compilação 2600). As estruturas tridimensionais dos 20 complexos foram modeladas utilizando o programa MMP sempre que possível recorrendo aos dados de cristalografia e depois gravadas na base de dados utilizando o formato MacroModel file (*.dat, MDL Information Systems Inc) (Mohammadi *et al.*, 1990). O programa permite adicionar várias dezenas de propriedades moleculares calculadas para cada uma das estruturas introduzidas as quais são depois correlacionadas com a respetiva atividade biológica do composto, neste caso, a afinidade para o recetor 5-HT_{1A}.

Avaliou-se diretamente a correlação em bruto de cada uma das propriedades com a variável resposta. Quantificou-se a correlação existente entre todas as propriedades moleculares integrantes da base de dados (matriz correlacional com todas as propriedades moleculares) e a variável resposta \log_1/IC_{50} e selecionados os melhores (leia-se mais correlacionados) descritores moleculares para cada tipo de interação possível (lipofilia, polaridade, comprimento do espaçador, etc.). A base de dados ficou assim com um total de 49 propriedades moleculares.

Procedeu-se então a uma verificação de que forma as variáveis se correlacionavam com a variável resposta simulando a construção de modelos de até 4 variáveis incluindo transformações, (nomeadamente logaritmos), bem como combinações não lineares (multiplicação, divisão, elevação a uma potência).

Resultados

Elaboração de modelos

Após a elaboração da base de dados definitiva procedeu-se ao tratamento estatístico dos dados, tendo em conta a dimensão e representatividade da



amostra. Além disso, é fundamental avaliar os modelos em termos do seu poder de previsão. Para esse efeito, foram utilizados métodos de validação cruzada separando a amostra entre grupo de treino e grupo de teste e por intermédio de análise PRESS (Predicted Residual Sum of Squares).

Numa fase inicial, utilizando o programa Molecular Analysis Pro (Norgwyn Montgomery Software Inc) foram extraídos todos os modelos até 4 variáveis, posteriormente foram ordenados por valores decrescentes de coeficiente de determinação (r^2).

Tabela 2. Modelos com quatro variáveis

Modelos de quatro variáveis para $\log(1/IC_{50})$						
	Variável	Df	Interceção	Coefficiente	r2	Probabilidade
Modelo 1	Ligações de H (Hansen)	19	0,862915	-0,435788	0,815105	0,0000225952
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0208382		
	Coefficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP			-0,24254		
	$\log(1/N^\circ$ Grupos Funcionais)			-2,58877		
Modelo 2	(Ligações de H Hansen) ²	19	-0,995683	-0,0252226	0,814513	0,0000231288
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0206987		
	Coefficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP			-0,226637		
	Logaritmo decimal do inverso do nº. de grupos funcionais			-2,33126		
Modelo 3	Ligações de H (Hansen)	19	0,771348	-0,447529	0,816557	0,0000213297
	(Coefficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP) ²			-0,0317526		
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0200587		
	Logaritmo decimal do inverso do nº. de grupos funcionais			-2,81083		
Modelo 4	(Ligações de H Hansen) ²	19	-1,13653	-0,0257657	0,815044	0,0000226493
	(Coefficiente de partição octanol/água calculado usando cLogP) ²			-0,0294745		
	(Distância do metal ao último átomo de N do anel não aromático do farmacóforo) ²			0,0199625		
	Logaritmo decimal do inverso do nº. de grupos funcionais			-2,53547		

Com vista à obtenção de modelos fiáveis analisou-se a correlação entre as variáveis usadas pelos modelos obtidos. Em cada modelo não pode haver variáveis fortemente correlacionadas entre si (superior a 0,6).

Da regressão com todas as combinações resultaram quatro modelos válidos com quatro variáveis e com $r^2 > 0,8$ os quais são apresentados na Tabela 2.

Os modelos foram obtidos por regressão linear múltipla (RLM) e sujeitos a uma análise estatística exaustiva incluindo análise PRESS para avaliar a sua significância e capacidade de previsão.

Tabela 3. *Análise de variância dos modelos*

	Origem da variação	df	SS	MS	Estatística	Probabilidade
Modelo 1	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,435788		
	Média	1	50,00292	0,0208382		F=16,53174
	Total (corrigido)	19	42,79628	-0,24254		$r^2=0,8151$
	Regressão	4	34,88344		8,72086	S=0,72631
	Resíduos	15	7,91283	-2,58877	0,52752	
Modelo 2	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,0252226		
	Média	1	50,00292	0,0206987		F=16,46703
	Total (corrigido)	19	42,79628			$r^2=0,81451$
	Regressão	4	34,85812	-0,226637	8,71453	S=0,72747
	Resíduos	15	7,93816	-2,33126	0,52921	
Modelo 3	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,447529		
	Média	1	50,00292	-0,0317526		F=16,69237
	Total (corrigido)	19	42,79628			$r^2=0,81656$
	Regressão	4	34,94562	0,0200587	8,73641	S=0,72345
	Resíduos	15	7,85066	-2,81083	0,52338	
Modelo 4	Total (não corrigido)	20	92,7992	-0,0257657		
	Média	1	50,00292	-0,0294745		F=16,52509
	Total (corrigido)	19	42,79628			$r^2=0,81504$
	Regressão	4	34,88085	0,0199625	8,72021	S=0,72643
	Resíduos	15	7,91543	-2,53547	0,5277	

Nota: probabilidade de significância $F \leq 0,0001$

df- Graus de liberdade; SS- Soma dos quadrados; MS- Quadrado da média; F- Teste F de Fischer



Os resultados da análise estatística dos modelos são apresentados na Tabela 3. Todos os modelos possuem uma análise estatística bastante razoável e uma boa capacidade de previsão, visto que todos possuem r^2 superior a 0,8 e passaram na análise PRESS.

Os resíduos dos quatro modelos apresentam-se distribuídos aleatoriamente. Pode então inferir-se que os quatro modelos apresentados possuem solidez e validade.

Discussão e conclusão

O objetivo deste trabalho foi estabelecer relações estrutura-atividade com utilidade para o processo de desenvolvimento de compostos tricarbonilo de Re e Tc com afinidade para os receptores serotoninérgicos 5-HT_{1A}. A estratégia utilizada foi a de utilizar propriedades moleculares estimadas por modelação computacional por permitirem a sua utilização em moléculas ainda não sintetizadas. Os modelos tomaram a forma de equações matemáticas e descrições de farmacóforos.

Na pesquisa bibliográfica efetuada, alguns autores apontam fatores importantes para o sucesso ou insucesso da ligação *in vivo* de uma molécula ao recetor. Este é o caso, por exemplo, do coeficiente partição octanol/água, importante para a afinidade, mas também para a possibilidade dos compostos atravessarem a BHE (Johannsen & Pietzsch, 2002). A facilidade de efetuar ligações de hidrogénio foi também relacionada com a afinidade para o recetor podendo contribuir positiva ou negativamente segundo os autores (Johannsen & Pietzsch, 2002). Outros fatores como tamanho da molécula (Caliendo, Santagada, Perissutti & Fiorino, 2005) e conformação dos anéis são também referidos por outros autores como tendo impacto sobre a afinidade e seletividade (Gastone & Bertolasi, 1979; Huff *et al.*, 1985; Kuipers *et al.*, 1995).

Apesar de existirem estudos estrutura-atividade para os receptores 5HT_{1A}, efetuados com compostos orgânicos, não existem estudos que se dediquem

especificamente a compostos organometálicos. Assim, o objetivo do trabalho apresentado consistiu efetivamente em tentar realizar estudos de estrutura/atividade para os complexos organometálicos de Tc(I) e Re(I) com afinidade para os recetores $5HT_{1A}$. Dada a potencial importância destes compostos para a imagiologia médica foi considerado que o estabelecimento de relações QSAR poderiam ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de novas moléculas para este fim, tanto ao nível dos compostos a sintetizar como, muitas vezes mais importante, definindo os caminhos que não se devem seguir.

Tendo em conta a variedade de propriedades moleculares incluídas nos estudos (mais de 200) considera-se muito relevante que os modelos desenvolvidos tenham convergido em apenas 4, todas com relevância tendo em conta as interações moleculares que se sabe estarem em jogo.

Nos nossos modelos verificou-se que a variável comprimento do espaçador aparece sob a forma de uma função quadrática. Este tipo de variação significa que a afinidade aumenta com o aumento da cadeia alquílica entre o centro metálico e o farmacóforo do complexo. Mas esta correlação só se verifica até um certo ponto. Ultrapassado este ponto a afinidade diminui. Devemos referir que este efeito já tinha sido constatado experimentalmente (Caliendo, Santagada, Perissutti & Fiorino, 2005; Lopez-Rodriguez *et al.*, 1999).

Os modelos incluem ainda o fator número de grupos funcionais, que aparece como uma função linear. Este facto leva a concluir que um complexo com um ligando bifuncional tem uma afinidade superior a um complexo idêntico que possua apenas um ligando funcional.

Assim, aquando da síntese de complexo tricarbonilo de Re e ^{99m}Tc com afinidade para os recetores $5-HT_{1A}$ da serotonina deve ter-se em conta:

- A distância entre o centro metálico e o segundo átomo de azoto do farmacóforo. Esta distância não se deve encontrar no intervalo 6,5 – 11 Å.
- O valor do coeficiente de partição octanol/água. Este valor deve estar no intervalo 2 – 4,5.

- A capacidade do complexo efetuar ligações de hidrogénio de Hansen. Este deve estar incluída no intervalo 7 – 10.
- A vantagem em utilizar ligandos bifuncionais.

Seria efetivamente muito interessante que se obtivessem novos dados experimentais que permitissem validar os modelos desenvolvidos. Seria também muito interessante alargar os modelos a outros parâmetros, nomeadamente ao comportamento in vivo dos radiofármacos, tanto a nível da farmacocinética como da farmacodinâmica.

Referências

- Adham N., Kao H-T., Schechter, L.E., Bard, J., Olsen, M., Urquhart, D., Durkin, M., Hartig, P.R., Weinschank, R.L., and Branchek, T.A. (1993). Cloning of another human serotonin receptor (5-HT_{1F}): A fifth 5-HT₁ receptor subtype coupled to the inhibition of adenylate cyclase. *Neurobiology*. 90, 408-412.
- Amlaiky, N., Ramboz, S., Boschert, U., Plassat, J-L & Hen, R. (1992). Isolation of a Mouse “5HT_{1E}-like” Serotonin Receptor Expressed Predominantly in Hippocampus. *Journal of biological chemistry*. 267(28), 19761-19764.
- Bowen, D.M., Najlerahim, A., Procter, A.W., Francis, P.T. & Murphy, E. (1989) Circumscribed changes of the cerebral cortex in neuropsychiatric disorders of later life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86(23), 9504-8.
- Caliendo, G., Santagada, V., Perissutti, E., Fiorino, F. (2005). Derivatives as 5HT_{1A} receptor ligands--past and present. *Current Medicinal Chemistry*. 12(15), 1721-53.
- Dyott, T.M., Stuper, A.J. & Zander, G.S. (1980) MOLY-an interactive system for molecular anlysis. *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. 20, 28-35.
- Gastone, G. and Bertolasi, V. (1979) Crystal and molecular structures of 2,6-cis-dimethylpiperidyl-N-phenylacetamidine and 2,6-cis-dimethylpiperidyl-N-phenyl-2,2-dimethylpropionamidine. An x-ray crystallographic investigation of the C(sp²)-N(piperidyl) bond. *Journal of the American Chemical Society*. 101(26), 7704 - 7711.
- Hoyer, D., Clarke, D.E., Fozard, J.R., Hartig, P.R., Martin, G.R., Mylecharane, E.J., Saxena, P.R. and Humphrey, P.P.(1994). International Union of Pharmacology classification of receptors for 5- hydroxytryptamine (Serotonin). *Pharmacological Reviews*. 46(6), 157-203.

- Huff, J.R., King, S.W., Saari, W.S., Springer, J.P., Martin, G.E. & Williams, M. (1985) Bioactive conformation of 1-arylpiperazines at central serotonin receptors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 28(7), 945-948.
- Johannsen, B. & Pietzsch, H.-J. (2002). Development of technetium-99m-based CNS receptor ligands: have there been any advances?. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*. 29(2), 263-275.
- Kobilka, B.K., Frielle, T., Collins, S., Yang-Feng, T., Kobilka, T.S., Francke, U., Lefkowitz, R.J. & Caron, M.G. (1987). An intronless gene encoding a potential member of the family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins. *Nature*. 329(6134), 75-9.
- Kuipers, W., van Wijngaarden, I., Kruse, C.G., van Amstel, M. ter H., Tulp, M. Th. M. and IJzerman, A.P. (1995). N4-Unsubstituted N1-Arylpiperazines as High-Affinity 5-HT_{1A} Receptor Ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*. 38(11), 1942-1954.
- Lopez-Rodriguez, M.L., Ayala, D., Benhamu, B., Morcillo, M.J. & Viso, A. (2002), Arylpiperazine derivatives acting at 5-HT_{1A} receptors. *Current Medicinal Chemistry*. 9(4), 443-69.
- Lopez-Rodriguez, M.L., Morcillo, M.J., Rovat, T.K., Fernandez, E., Vicente, B., Sanz, A. M., Hernandez, M. & Orensanz, L. (1999). Synthesis and structure-activity relationships of a new model of arylpiperazines. 4. 1-[omega-(4-Arylpiperazin-1-yl)alkyl]-3-(diphenylmethylene) - 2, 5-pyrrolidinediones and -3-(9H-fluoren-9-ylidene)-2, 5-pyrrolidinediones: study of the steric requirements of the terminal amide fragment on 5-HT_{1A} affinity/selectivity. *Journal of Medicinal Chemistry*. 42(1), 36-49.
- Mohammadi, F., Richards, N.G.J., Guida, W.C., Liskamp, R., Lipton, M., Caufield, C., Chang, G., Hendrickson, T. & Still, W.C. (1990). MacroModel - An Integrated Software System for Modeling Organic and Bioorganic Molecules Using Molecular Mechanics. *Journal of Computational Chemistry*. 11, 440-467.

- Oh, S.J., Ha, H.J., Chi, D.Y. & Lee, H.K. (2001). Serotonin receptor and transporter ligands - current status. *Current Medicinal Chemistry*. 8(9), 999-1034.
- Olivier, B., Soudijn, W., van Wijngaarden, I. (1999). The 5-HT_{1A} receptor and its ligands: structure and function. *Progress in Drug Research*. 52, 103-65.
- Patrick, G.L.(2005), *An introduction to Medicinal Chemistry*. New York, NY: Oxford University Press.
- Pessoa-Mahana, H., Araya-Maturana, R., Saitz, C.B. and Pessoa-Mahana, D.C., (2003). A synthetic overview of new molecules with 5-HT_{1A} *binding affinities*. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. 3(2), 77-93.
- Sodhi, M.S & Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. *International Review of Neurobiology*. 59, 111-74.



