

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS E BIOTECNOLOGIA

RAFAELA BEZERRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO COMPUTACIONAL DE UM INIBIDOR DAS PROTEÍNAS
MIDKINA E GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

CUITÉ

2015

RAFAELA BEZERRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO COMPUTACIONAL DE UM INIBIDOR DAS PROTEÍNAS
MIDKINA E GLUTATIONA S-TRANSFERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande, em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Plinio Delatorre

CUITÉ

2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA NA FONTE
Responsabilidade Msc. Jesiel Ferreira Gomes – CRB 15 – 256

S586d Silva, Rafaela Bezerra da.

Desenvolvimento computacional de um inibidor das proteínas Midkina e Glutathione S-Transferase. / Rafaela Bezerra da Silva. – Cuité: CES, 2015.

82 fl.

Dissertação (Curso de Mestrado em Ciências Naturais e Biotecnologia) – Centro de Educação e Saúde / UFCG, 2015.

Orientador: Plínio Delatorre.

1. Câncer. 2. Inibidor. 3. Midkina. 4. GSTP1. I. Título.

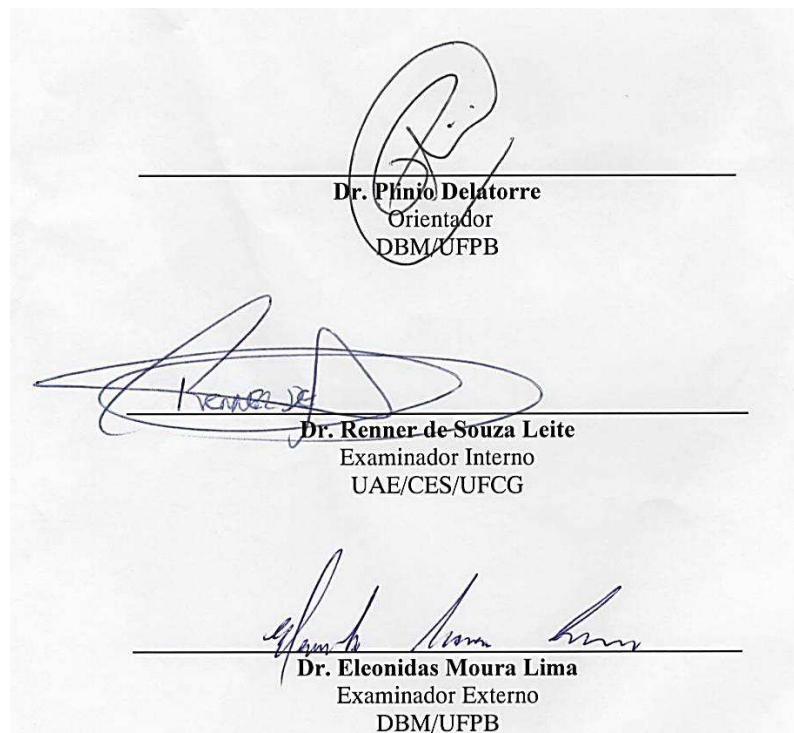
CDU 616-006

RAFAELA BEZERRA DA SILVA

**DESENVOLVIMENTO COMPUTACIONAL DE UM
INIBIDOR DAS PROTEÍNAS MIDKINA E GLUTATIONA S-
TRANSFERASE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia da Universidade Federal de Campina Grande em cumprimento às exigências para a obtenção do título de Mestre

Aprovada em 23/07/2015 pela Banda Examinadora constituída dos seguintes membros:



Aos meus pais, aos quais agradeço todas as conquistas de minha vida, e aos meus dois amores, meu esposo Valdir e meu filho Lorenzo, que são a minha força e motivação cotidiana. A vocês dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar toda a minha trajetória e abençoar toda a minha família.

Ao meu orientador Plínio Delatorre, pela atenção e todos os ensinamentos transmitidos.

Ao PPGCNBio - UFCG, em especial à professora e coordenadora Magnólia Campos, por todo empenho dedicado ao programa favorecendo para que esse objetivo fosse alcançado.

A todos os mestres do PPGCNBio pelos ensinamentos e por proporcionarem momentos que lembrarei por toda a vida.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) que subsidiou a concessão da Bolsa de Estudos Demanda Social.

Ao meu esposo, Valdir Dantas, por caminhar comigo em todos os momentos que necessitei.
Você é parte fundamental deste trabalho.

À razão do meu viver, meu filho Lorenzo.

Aos meus pais, Alcir e Teresinha, por me ensinarem a importância do conhecimento e me possibilitarem uma educação pautada em respeito e cidadania.

Às minhas queridas irmãs: Gabriela, Emanuela, Isabela, Ariela e Daniela, as companheiras de toda a minha vida.

Aos meus queridos sobrinhos: Luanny e Alcir Luan.

À minha sogra, Maria de Lourdes, por possibilitar que a sua casa se tornasse uma extensão do meu lar.

À Liliane, por me acompanhar nas viagens para realização deste trabalho dividindo comigo os cuidados com Lorenzo.

Aos meus colegas de mestrado que dividiram comigo as angústias e os desafios durante a caminhada deste curso.

Aos membros da EEEM Professor Lordão, em especial à direção e aos docentes por toda compreensão e pelas palavras de incentivo.

A todos que contribuíram com essa conquista, meu sincero reconhecimento.

RESUMO

O desenho racional de fármacos tem sido largamente utilizado para o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes no tratamento de diversas doenças, inclusive o câncer. Este termo é utilizado para o conjunto de doenças ocasionadas pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos do próprio organismo, podendo se espalhar por todo o corpo, processo denominado metástase. Entre as diversas pesquisas direcionadas à formação de novas drogas para o tratamento de tumores está a terapia alvo molecular que se baseia na utilização de fármacos que inativam uma determinada proteína de uma célula cancerígena. A Biologia Molecular identificou várias proteínas relacionadas com o câncer, dentre estas estão a midkina (MK) e a glutathione S-transferase da classe Pi (GSTP1), associadas à capacidade de multiplicação e à resistência dos tumores, respectivamente. O desenvolvimento de um inibidor que apresente especificidade tanto para a MK quanto para a GSTP1 possibilitará um tratamento sem prejuízos às células normais e uma melhor qualidade de vida aos pacientes cancerosos. O presente trabalho objetivou projetar uma molécula capaz de inibir as atividades biológicas da MK e da GST na referida patologia. Utilizando como recursos o site de busca Protein Data Banc (PDB) para a obtenção das estruturas tridimensionais estudadas, o **Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)** para alinhamento e análise das sequências protéicas, o software Hex 8.0 para a realização dos testes de docking molecular e o WinCoot 0.7.1 para a identificação das interações intermoleculares hidrofóbicas e de hidrogênio analisadas nos complexos gerados. Para o desenvolvimento da molécula foram utilizados como modelo os inibidores 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX) e o 5-propiltio-1H-benzimidazol-2-il) carbamato (albendazol). O inibidor desenvolvido (RBT15) foi projetado através de estruturas previamente depositadas no PDB e recortadas para atenderem as características topológicas dos receptores. Os testes analisados evidenciaram que o ligante RBT15 é energeticamente mais favorável e demonstrou interação com um maior número de resíduos de interesse que os outros dois inibidores analisados. Os dados sugerem que a estrutura desenvolvida pode vir a ser um potencial inibidor das proteínas MK e GSTP1. Sendo, por esse motivo, uma promissora molécula para o desenvolvimento de fármacos mais eficientes e menos invasivos para o tratamento de câncer.

Palavras- chave: Inibidor. Câncer. Midkina. GSTP1.

ABSTRACT

The rational design of drugs has been widely used for drug development more effective in the treatment of various diseases, including cancer. This term used and hair diseases caused set cluttered cell growth, tissues and organs to invade que own body and can spread throughout the body, process called metastasis. Between how several research aimed at new training drugs for tumor treatment is molecular target therapy, which is based on the use of drugs that inactivate a particular cancer cell protein. Molecular biology has identified several proteins related to cancer, among these are Midkina (MK) and Glutathione S-Transferase Pi class (GSTP1), associated with the multiplication capacity and resistance of tumors, respectively. The development of a specific inhibitor that present both for GSTP1 and MK as to enable a free damage to normal cells treatment and better quality of life for cancer patients. This study aimed to design a molecule capable of inhibiting the biological activity of MK and GST in that condition. Using resources like search website Protein Data Bank (PDB) for obtaining the studied three-dimensional structures, the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) for alignment and analysis of protein sequences, the Hex 8.0 software for the realization of molecular docking test and WinCoot 0.7.1 to identify the hydrophobic intermolecular interactions and hydrogen generated in the analyzed complexes. For the development of the molecule were used as the template inhibitors 6-(7-nitro-2, 1, 3-benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX) and 5-propylthio-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate (Albendazol). The developed inhibitor (RBT15) was designed using previously deposited in PDB structures and trimmed to meet the topological characteristics of the receivers. The tests showed that the analyzed RBT15 binder is energetically more favorable and demonstrated interaction with a larger number of residues of interest than the other two analyzed inhibitors. The data suggest that the developed structure might be a potential inhibitor of GSTP1 and MK proteins. Since, therefore, a promising molecule for the development of more efficient and less invasive drugs for the treatment of cancer.

Keywords: Inhibitor. Cancer. Midkine. GSTP1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: A organização do domínio de midkina (MK) e a estrutura tridimensional dos domínios. Dois sítios de ligação da heparina no C-domínio estão circulados.....	14
Figura 2: Estrutura tridimensional das glutionas S-transferases. Esquema mostra extremidades C terminal (C-term), N-terminal (N-term) e o sítio de ligação (GST biding).....	16
Figura 3: Mecanismos de ação de MK. Dois receptores para MK e suas cascatas de sinalização são propostos.....	22
Figura 4: Reação enzimática catalisada pela glutatona S-transferase.....	24
Figura 5: Interface da página do PDB.....	27
Figura 6: Interface da ferramenta Protein BLAST.....	28
Figura 7: Interface do programa Hex 8.0.....	29
Figura 8: Interface do programa WinCoot) 0.7.1.....	30
Figura 9: Estrutura tridimensional (A) e estrutura química (B) do fármaco albendazol.....	32
Figura 10: A. Estrutura tridimensional do inibidor 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX), B. Estrutura química do anel 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole.....	33
Figura 11: Estrutura tridimensional do tripeptídeo desenvolvido.....	34
Figura 12: Estrutura tridimensional do domínio C-terminal da midkina mostrando em destaque os sítios de ligação à heparina.....	35
Figura 13: Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o albendazol e a midkina.....	37
Figura 14: Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol e a midkina.....	39
Figura 15: Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o inibidor desenvolvido e a midkina.....	41

Figura 16: Estruturas tridimensionais das Glutathionas s-transferases PDB ID 3GUS (A) e 3IE3 (B).....	44
Figura 17: Alinhamento de duas sequências de glutathiona S-transferase da classe Pi, PDB 3GUS e 3IE3.....	45
Figura 18: Interação do albendazol com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile 104.....	46
Figura 19: Interação do albendazol com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ile 104.....	47
Figura 20: Interação do 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol ou NBDHEX com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile 104.....	49
Figura 21: Interação entre 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol ou NBDHEX com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile 104.....	50
Figura 22: Interação do inibidor desenvolvido com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile104.....	52
Figura 23: Interação do inibidor desenvolvido com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ile104.....	53
Figura 24: Interação do albendazol com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ala 104.....	56
Figura 25: Interação do albendazol com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104.....	57
Figura 26: Interação do NBDHEX com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104.....	59
Figura 27: Interação do NBDHEX com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104.....	60
Figura 28: Interação do inibidor com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ala 104.....	62
Figura 29: Interação do inibidor com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104.....	63

APRESENTAÇÃO

O desenho de fármacos é uma técnica empregada de forma crescente no desenvolvimento de novas drogas mais eficazes nos tratamentos de diversas doenças aos quais se destinam, como Doença de Parkinson, Doença de Alzheimer e os diferentes tipos de câncer.

Através da utilização de técnicas computacionais, é possível prever a interação entre moléculas e definir a estrutura a ser estudada experimentalmente, reduzindo gastos e otimizando o tempo desses estudos. O que é imprescindível no tratamento de doenças graves como as já citadas.

Através da utilização de banco de dados disponíveis na internet e de programas de computação específicos, pretendemos desenvolver computacionalmente uma molécula eficaz na inibição de duas proteínas relacionadas com o desenvolvimento e a resistência de células cancerosas, a midkina (MDK) e a glutathione S-transferase, respectivamente. O crescente número de diagnósticos e seus difíceis tratamentos foram motivadores para essa busca.

A estrutura da molécula desenvolvida nesta pesquisa, o RBT15, encontra-se protegida por motivo de sigilo de patente. O que se faz necessário diante da sua relevância para a ciência.

Objetivamos que a estrutura projetada venha a ser uma estratégia mais eficaz no combate ao câncer favorecendo a um tratamento mais específico das células tumorais malignas e, conseqüentemente, a uma melhor qualidade de vida aos pacientes submetidos à terapêutica dessa doença. Sendo, pois, seu desenvolvimento uma conquista de maior importância para a sociedade e motivo de orgulho para seus autores.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Modelagem Molecular.....	17
2.2Câncer.....	18
2.3Novos fármacos para o tratamento de tumores	19
2.4Midkina.....	21
2.5GSTP1.....	23
3 OBJETIVOS	26
3.1Objetivo Geral.....	26
3.2Objetivos específicos.....	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Obtenção das estruturas tridimensionais da midkina e das GSTPs estudadas:.....	27
4.2 BLAST: Alinhamento e Análise de Sequências Proteicas	27
4.3 Planejamento do Inibidor	28
4.4 Docking Molecular	29
4.5 Interações Intermoleculares	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	32
5.1Inibidor desenvolvido	32
5.2Midkina.....	35

5.2.1 Estrutura	35
5.2.2 Docking molecular da MK com o albendazol	36
5.2.3 Docking molecular da MDK com 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX)	38
5.2.4 Docking molecular entre a MDK com o inibidor desenvolvido (RBT15)	40
5.3 Glutathionas S-transferase P1 (GST P1-1).....	43
5.3.1 Estruturas.....	43
5.3.2 Docking molecular da GSTP1.....	45
5.3.2.1 Docking molecular entre a GSTP1/Ile 104 e o albendazol.....	46
5.3.2.2 Docking molecular entre a GSTP1/Ile 104 e o NBDHEX.....	48
5.3.2.3 Docking molecular entre a GSTP1/Ile 104 e o inibidor RBT15.....	52
5.3.2.4 Docking Molecular entre a GSTP1 Ala 104 e o albendazol	55
5.3.2.5 Docking Molecular entre a GSTP1 Ala 104 e o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX)	58
5.3.2.6 Docking Molecular entre a GSTP1 Ala 104 e o inibidor RBT15	62
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

A modelagem molecular é uma ferramenta do planejamento racional de drogas que consiste na geração, manipulação, análise e representação realista de estruturas moleculares obtidas a partir de cálculos computacionais de propriedades físico-químicas (SILVA, 2003). Utilizando técnicas de modelagem molecular é possível analisar, manipular sequências e prever estruturas tridimensionais de moléculas, bem como realizar estudos em macromoléculas (proteínas) e complexos. De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC), o referido planejamento envolve a invenção, a descoberta, o desenho, a identificação e a preparação de fármacos, além do estudo e da interpretação de seu modelo de ação em termos moleculares.

A utilização de ferramentas computacionais tem se tornado, cada vez mais empregada no desenvolvimento de novos fármacos. A disponibilidade de programas computacionais e de bancos de dados disponíveis na internet são, atualmente, importantes recursos para a descoberta e planejamento de novos fármacos, bem como importantes aliados no entendimento do mecanismo de ação de proteínas. Atualmente, o planejamento racional de medicamentos baseado na estrutura e no mecanismo de ação é a estratégia mais eficiente no desenvolvimento de novas drogas, contribuindo em todas as etapas da produção (SILVA, 2008).

As informações obtidas através do uso de softwares certificam a definição de determinadas estruturas a serem utilizadas experimentalmente, tornando mais rápida a análise e compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade biológica verificada, otimizando e reduzindo os gastos das pesquisas a serem desenvolvidas.

O entendimento sobre as interações intermoleculares é fundamental para estabelecer o mecanismo funcional de uma determinada molécula. A partir do instante em que se conhece a localização dos sítios ativos ou de ligação presentes em uma determinada proteína é possível, por exemplo, utilizar ferramentas computacionais com a finalidade de desenvolver uma molécula capaz de inibir a atividade do polipeptídeo estudado. O desenho racional de drogas tem sido largamente utilizado para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes no tratamento de diversas enfermidades como Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson e câncer.

O termo câncer é utilizado para o grupo de doenças causadas pelo crescimento descontrolado de células que invadem tecidos e órgãos do próprio organismo, podendo se espalhar por todo o corpo, processo denominado de metástase. A multiplicação celular

exagerada acarreta em um desenvolvimento de tumores malignos, também chamados de neoplasias malignas.

Segundo relatório da Organização Mundial da Saúde e a Agência Internacional para a Pesquisa sobre o Câncer, em 2012 foram diagnosticados 12 milhões de novos casos e esse número deve chegar a 22 milhões nas próximas duas décadas. Este documento mostra que mais de 70% dos casos e das mortes que acontecem em todo o mundo ocorrem na África, Ásia, América Central e América do Sul.

O diagnóstico precoce e tratamento eficaz são fundamentais no tratamento de neoplasias malignas. Novas tecnologias têm sido desenvolvidas para aumentar a expectativa bem como a qualidade de vida das pessoas afetadas pelos tumores malignos. A cirurgia, radioterapia e quimioterapia são os tipos de tratamento mais empregados no controle das células cancerosas.

A radioterapia é uma técnica que emprega o uso da alta energia dos raios X para destruir as células malignas, limitando os danos às células normais. Entre os efeitos colaterais provocados estão: a queimadura da pele, que é a mais comum, fadiga, desconforto e queda temporária na produção de elementos do sangue (SILVA, 2014).

A quimioterapia envolve a utilização de substâncias citotóxicas, administradas principalmente por via sistêmica (endovenosa). Entre os efeitos provocados por esse tratamento estão: indução de náuseas e vômitos, lesão do esôfago, fraturas, má nutrição, toxicidades renal, pulmonar e cardíaca (SAWADA, 2009).

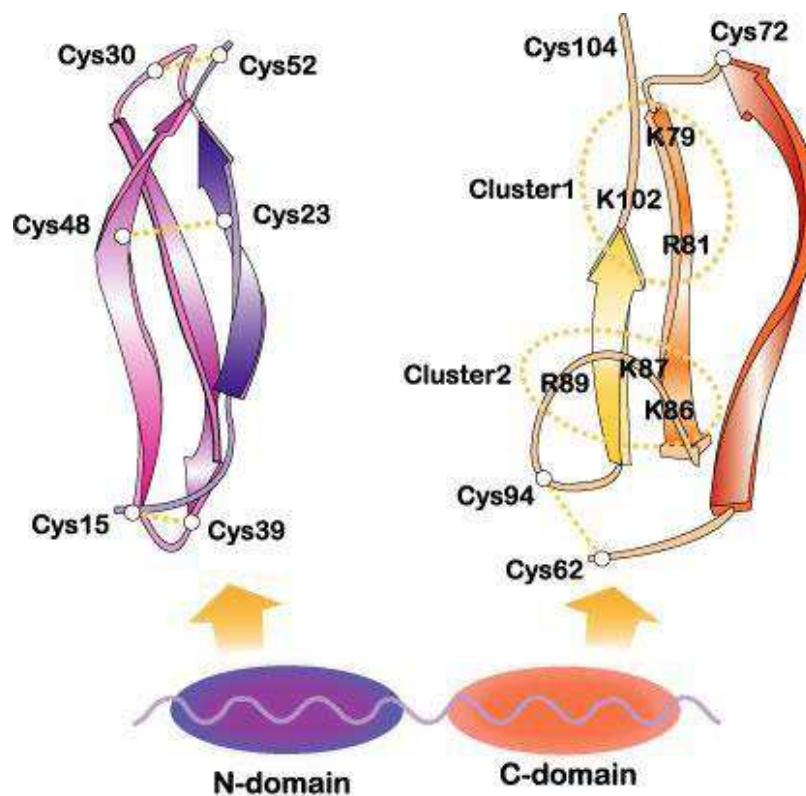
As pesquisas relacionadas ao desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de tumores malignos visam garantir uma vida mais longa e de melhor qualidade aos pacientes. Entre as terapias promissoras está a de alvos moleculares que se baseiam na utilização de fármacos que inativem uma determinada proteína da célula cancerosa. No Brasil, a maioria dessas drogas ainda aguardam aprovação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Desde que se tenha identificado o alvo molecular, essa terapia pode ser utilizada para qualquer tipo de câncer.

O estudo da biologia molecular possibilitou a identificação de várias proteínas relacionadas com a capacidade de multiplicação e resistência das células tumorais. Dentre estas, estão: a midkina e a glutatona S-transferase.

A midkina (MDK) é uma proteína de 13-kDa, rica em aminoácidos básicos e cisteína, sendo estruturalmente formada por dois domínios formados por três fitas β antiparalelas (Figura 1). A MDK é amplamente expressa durante a gestação para estimular a

multiplicação das células embrionárias, após a vida intrauterina a sua expressão é limitada ou inexistente. Porém, durante o desenvolvimento de vários tipos de carcinomas a sua expressão é aumentada o que permite o crescimento das células cancerosas e a progressão do tumor para metástase. A MDK é um fator de crescimento com especificidade de ligação a heparina, sendo altamente expressa em muitos tumores malignos, incluindo o pulmão, esôfago, estômago, cólon, hepatocelular, mama, renal e carcinoma pancreático (HAO et al., 2013).

Figura 1: A organização do domínio de midkina (MDK) e a estrutura tridimensional dos domínios. Dois sítios de ligação da heparina no C-domínio estão circulados. (Muramatsu, T., 2002)



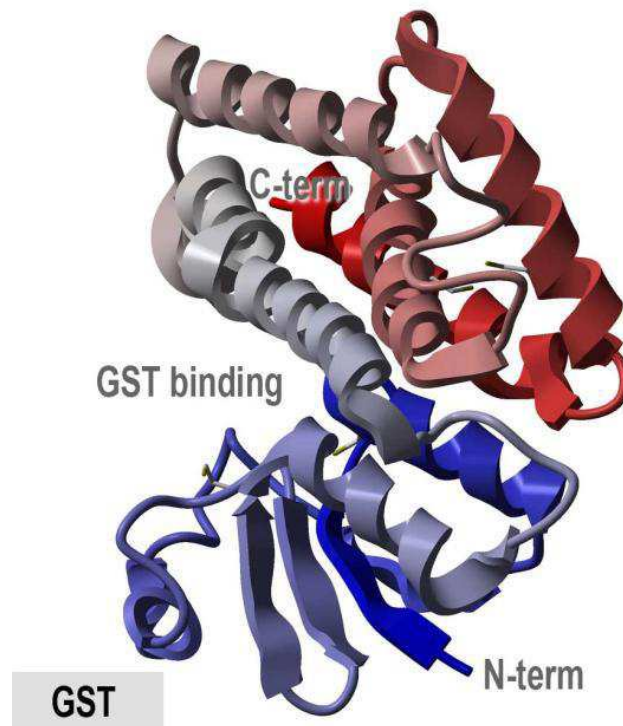
A referida proteína é expressa pelo gene de locus 11p11.2/ 6 exons que tem sido apontado como um agente terapêutico para diversidade de distúrbios (NCBI). A expressão da midkina ocorre frequentemente nos tumores malignos independente do tecido afetado. A alta expressão da MDK e a correlação significativa da maior expressão da MDK com o prognóstico do câncer fazem da mesma uma molécula alvo no estudo molecular do câncer, podendo estar envolvida em novas terapias de carcinomas (KADOMATSU, 2005).

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima que desempenha importante função no mecanismo de detoxicação do organismo humano, função esta que confere resistência às células cancerosas favorecendo a multiplicação das mesmas e dificultando a ação dos medicamentos quimioterápicos utilizados para o tratamento de pacientes com câncer.

As GSTs constituem uma superfamília de enzimas com diversificadas funções. Estas enzimas são conhecidas por diminuir a atividade farmacológica de uma vasta gama de drogas estruturalmente relacionadas através da sua conjugação com glutathione (GSH) (FEDERICI *et al.*, 2009). As variadas classes são expressas diferentemente no organismo humano, sendo a GSTP1 a de maior desempenho na resistência das células cancerígenas às drogas quimioterápicas. Esta classe é expressa por gene de locus 11q13.2/7 exons (NCBI). A GSTP1 é hiper expressa em tecido de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço humano, como também, em muitos outros tipos de câncer, incluindo tumores do cérebro, da mama, do ovário, do esôfago, estômago, pâncreas, cólon, pele, rim, pulmão, ductos biliares, bexiga e sistemas hematopoiéticos e linfático (MUTALLIP *et al.*, 2011).

O sítio ativo de uma GST é composto por dois subsítios, o local de ligação da glutathione (o sítio G) e o local de ligação ao substrato hidrofóbico (sítio H) onde o eletrófilo está ligado (MANNERVIK, apud JOHANSSON, 2010) (Figura 2).

Figura 2: Estrutura tridimensional das glutationas S-transferases. Esquema mostra extremidades C terminal (C-term), N-terminal (N-term) e o sítio de ligação (GST binding). (Disponível em <http://genomebiology.com>).



O desenvolvimento de um inibidor que apresente especificidade tanto para a MDK quanto para a GST possibilitará um tratamento específico das células do câncer, sem prejuízo para as células normais, o que acarretará em um tratamento mais eficiente e que forneça uma melhor qualidade de vida aos pacientes. O presente trabalho teve como objetivo geral desenvolver uma molécula capaz de inibir a ação das proteínas midkina e glutathione s-transferase, impedindo a atividade dessas moléculas, respectivamente, na capacidade de multiplicação e na resistência das células cancerígenas.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Modelagem Molecular

A Biologia Estrutural surgiu em Cambridge na Inglaterra, nos anos 1950, quando foi desvendada a estrutura da dupla hélice do DNA. Também foram resolvidas, pouco tempo depois, as primeiras estruturas tridimensionais de proteínas a partir da cristalização das mesmas, sendo elas a mioglobina (KENDREW, 1958) e a hemoglobina (PERUTZ, 1960). A partir daí, o número de estruturas disponibilizadas somente aumentou, contribuindo para melhorar o conhecimento acerca das relações intrínsecas entre sequências, estruturas e funções de proteínas (BERMAN, 2012). Desde 1971, os dados tridimensionais de proteínas e ácidos nucleicos vêm sendo depositados no PDB (do inglês, **Protein Data Bank**) (BERMAN, 2008). Atualmente, mais de 100.000 estruturas, desvendadas por cristalografia de Raios X, espectrometria de RNM (Ressonância Magnética Nuclear), microscopia eletrônica 3D e métodos híbridos, foram depositadas nesse banco de dados (BERMAN, 2012).

Apesar de todos os avanços feitos na Biologia Estrutural nos últimos anos, há poucos métodos capazes de caracterizar completamente a estrutura tridimensional de uma molécula, desvendando as distâncias e ângulos de sua conformação (BARREIRO & RODRIGUES, 1997). A técnica de cristalografia de Raios X ainda é a mais usada e mais eficiente para obtenção de todos os dados necessários nesse processo (ABRAHAM, 1989), mas ainda assim não há garantia de que a conformação no estado cristalino seja a mesma que a molécula apresenta em solução, um exemplo é a lectina de *Dolichus biflorus* (DB58), que se apresenta como um dímero tipo X1 em solução e um tetrâmero tipo II + X1 na estrutura cristalina (BUTS, 2001). Além disso, algumas moléculas não possuem uma estabilidade estrutural a ponto de se arranjar organizadamente para formar cristais, que são ordenações perfeitas e infinitas de unidades assimétricas que se arranjam em simetrias definidas (DUCRUIX & GIEGÉ, 1992), como é o caso da lectina de *Bauhinia variegata* (BVL-I), que apesar de já ter sido parcialmente caracterizada (PINTO, 2008), não tem estrutura tridimensional determinada por ser intensamente glicosilada, dificultando sua cristalização (MOREIRA & PINTO, 2010). Surgiu, então, a modelagem da estrutura molecular por métodos computacionais, como alternativa para resolução desses problemas.

A modelagem molecular constitui-se de uma ferramenta do planejamento racional que envolve a compreensão a nível molecular da interação existente entre uma molécula e o seu receptor, sob os aspectos quali e quantitativos. Ela também fornece suportes para prever a eficácia de estruturas candidatas a compostos bioativos (SCOTTI, 2007). O planejamento

racional de fármacos baseado em estrutura é a estratégia mais utilizada e de menor custo para o desenvolvimento de novos fármacos. Esta metodologia se baseia na inibição ou estimulação de atividades biológicas de macromoléculas, proteínas ou ácidos nucleicos, associadas a diversas doenças (ALMEIDA, 2011).

Muitas vezes o planejamento de fármacos tem como base um alvo molecular em que as moléculas devem interagir de forma apropriada para modular a sua atividade com função terapêutica (STEVANATTO, 2008).

2.2 Câncer

Câncer é o conjunto de doenças caracterizado por crescimento celular descontrolado ou inadequado e está fortemente associado a defeito nas proteínas transmissoras de sinais (BERG, 2010). É a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento. A sua incidência está aumentando nos países economicamente em desenvolvimento, como resultado de crescimento e envelhecimento da população, bem como, cada vez mais, da adoção de estilos de vida associados ao câncer, incluindo tabagismo, sedentarismo e dietas “ocidentalizadas” (JEMAL, 2011).

A multiplicação das células cancerosas é diferente da multiplicação das células normais, pois ao invés de sofrerem apoptose como ocorre normalmente, as células neoplásicas malignas continuam a se multiplicar e apresentam capacidade de invadir tecidos corporais próximos ou distantes, processo denominado metástase (RENK, 2013).

A angiogênese, processo de formação de vasos sanguíneos, permite o crescimento tumoral, invasão e metástases. Sem a vascularização os tumores não ultrapassam 1-2 mm de diâmetro ou de espessura (CAPELOZZI, 2009).

De acordo com o avanço do conhecimento sobre o câncer, diversos tipos de tratamentos foram desenvolvidos, os três principais indicados para esta doença são: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Sendo este último o de maior enfoque de pesquisas nas últimas quatro décadas (FONTES, 2014).

As células cancerosas apresentam capacidade de se disseminarem na circulação sanguínea, por esse motivo, avanços tecnológicos possibilitam a detecção dessas células tumorais circulantes (CTCs). As CTCs são estruturas dos tumores primários a caminho dos sítios de disseminação e, portanto, representam “intermediários metastáticos” (VALASTYAN, 2011).

Processos carcinogênicos exigem uma sequência de eventos moleculares, incluindo a mutação gênica, como o ras e o p53, e a hiper expressão de fatores de crescimento e os seus receptores. Por isso, é importante detectar a expressão de genes de interesse no início da carcinogênese para determinar a sua significância biológica (KADOMATSU, 2014).

Uma vez que o câncer pode ser causado por mutações no DNA, pode ser detectado por testes sensíveis à referida molécula. Apesar de alguns resultados promissores sugerirem que é possível detectar DNA alterado através de fluidos corporais para diagnóstico precoce, como as proteínas estão mais intimamente ligadas a fisiologia do tumor devem fornecer informações mais precisas que o ácido nucléico citado (COSTA, 2011).

A utilização de marcadores moleculares favorece, além do aumento da sobrevida, a utilização de tratamentos associados a menor morbidade (COLOMBO, 2009). As pesquisas recentes demonstraram marcadores moleculares que podem ser usados com marcadores morfológicos e histopatológicos presentes nos tumores garantindo uma avaliação mais precisa no prognóstico. A expressão de proteínas antioxidantes pelas células tumorais tem sido avaliada como um fator prognóstico (JARDIM, 2011).

As características clínicas e moleculares de tumores podem ajudar no desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas (LEONEL, 2012). A descoberta de novos de alvos moleculares específicos que controlam as atividades das células tumorais representa uma ferramenta fundamental na busca por novos tratamentos que tenham atividade inibitória das características do câncer (DEVES, 2013). A identificação de vias envolvidas na transdução de sinais desencadeados pela ativação de receptores por seus ligantes nas células tumorais tornou possível a descoberta e posterior validação de alvos terapêuticos do câncer, fazendo desenvolver a terapia alvo que é relacionada em direção aos ligantes, aos receptores e às moléculas envolvidas nas vias de sinalização celular (LEITE, 2012).

O grande desafio para a terapia anticancerígena é a especificidade da célula ou tecido, ou seja, fazer com que o medicamento atinja especificamente as células cancerígenas o que acarreta em menos danos aos pacientes (LAJUS, 2010).

2.3 Novos fármacos para o tratamento de tumores

O tratamento das neoplasias, nas últimas décadas, teve grande avanço no campo da cirurgia, da radioterapia, no surgimento de novos quimioterápicos citotóxicos e na terapia

alvo (incluindo anticorpos monoclonais, inibidores de tirosina quinase e inibidores da angiogênese (SANTOS, 2013).

Atualmente os fármacos com platina, como cisplatina, carboplatina e oxaliplatina, estão entre os medicamentos anticancerígenos de maior sucesso. Estas drogas agem impedindo os mecanismos de síntese e reparo do DNA, causando a morte celular. Porém, os efeitos adversos provocados pelo tratamento e o desenvolvimento de resistência das células cancerígenas aos medicamentos têm restringido suas aplicações (ALMEIDA, 2014). A toxicidade da cisplatina é determinada pelo tecido alvo e acúmulo nas células. Esse aumento interfere no funcionamento de diversas organelas, tais como: mitocôndrias, lisossomos, núcleo e membrana citoplasmática causando inflamações e morte celular (PERES, 2013).

Os complexos metálicos que contenham moléculas com atividade biológica têm despertado interesse de muitos pesquisadores, pois a complexação pode potencializar a atividade biológica e diminuir os efeitos colaterais (OLIVEIRA, 2013).

Com o desenvolvimento da biologia molecular a pesquisa para a descoberta de novos fármacos para o tratamento do câncer se voltou para o tratamento alvo. O futuro para novas terapias de tumores reside em prever respostas e selecionar agentes alvo (TAKAGAKI, 2005).

Os estudos laboratoriais identificaram alvos celulares potenciais que poderiam em tese melhorar o tratamento do câncer. Muitas drogas vêm sendo desenhadas especificamente para se ligarem a alvos previamente definidos (terapia-alvo) (SANTOS, 2014). Reduzindo as atividades sobre as células saudáveis e, conseqüentemente, reduzindo os efeitos colaterais.

Desde a descoberta do código genético humano, como também de outros organismos, e do desenvolvimento de novos estudos, entre eles: genoma, proteoma, metaboloma, discute-se cada vez mais a aplicação de ferramentas da biologia molecular na química de produtos naturais, onde o escopo principal pode ser peptídeos e proteínas. Os peptídeos destacam-se como promissores na busca de novos fármacos. Um número considerável de peptídeos estão sendo pesquisados objetivando serem inibidores de proteases, imunossupressores, antimicrobianos e anticancerígenos (PICCHI, et al., 2009).

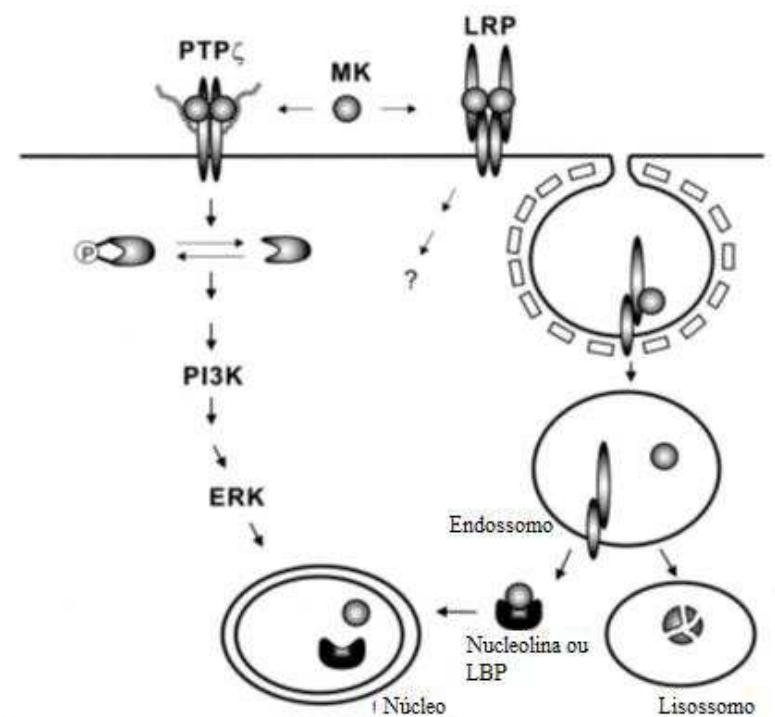
2.4 Midkina

A midkina (MDK) é um fator de crescimento de ligação à heparina multifuncional cujos principais papéis biológicos podem ser classificados em três áreas: sistema nervoso, câncer e inflamações (KOSUGI, *et al.* 2012). Esta proteína promove o crescimento, a sobrevivência, migração e expressão gênica de diferentes células alvo. Muramatsu (2010), reporta que a MK está envolvida na reprodução, reparação, e também desempenha papéis patológicos em muitas doenças.

Os dois membros da família Midkina, midkina e pleiotropina (PTN), são proteínas ricas em aminoácidos básicos, caracterizadas pelo seu único par de resíduos de cisteína altamente conservado. Ambas são compostas por dois domínios, cada um sendo formado por três fitas- β antiparalelas. (LIM *et al.*, 2013).

Os quatro receptores descritos são: N-sindecan, PTPz, ALK e LRP, estes podem ser diferencialmente utilizados para atividades biológicas específicas de MK e podem vir a colaborar entre si para melhorar os sinais intracelulares. O complexo MK e PTPz – receptor de proteína tirosina fosfatase tipo z - utilizam as vias PI3 – quinase e ERK para a migração celular de osteoblastos e sobrevivência neuronal. O RLP – proteína receptora de LDL (sigla em inglês) realiza endocitose de uma ampla gama de ligantes, inclusive da MK, onde está envolvido na atividade antiapoptótica. A endocitose da midkina é totalmente dependente de LRP e o seu direcionamento para o núcleo é realizado por uma proteína nucleocitoplasmática, nucleolina, ou por um precursor da proteína de ligação à laminina (LBP) (Figura 3) (KADOMATSU *et al.* 2014).

Figura 3: Mecanismos de ação de MK. Dois receptores para MK e suas cascatas de sinalização são propostos. Mais estudos são necessários para esclarecer o mecanismo preciso. LBP, precursor da proteína ligante laminina. Adaptado de KADOMATSU *et al.*, 2014.



O fator de crescimento de ligação à heparina Midkine (MK) foi primeiro identificado como um gene induzido por ácido retinóico durante a embriogênese há duas décadas. Desde então, uma infinidade de funções celulares da MK têm sido descritos em tecidos no estado normal e transformado. Embora a expressão do gene MK seja fraco ou indetectável em tecidos adultos, a expressão de MDK em tecidos danificados e inflamados tem sido discutida (GUNGOR *et al.*, 2011)

A MDK é abundante em vários tipos de câncer, incluindo câncer de esôfago, câncer gástrico, câncer de cólon, câncer de pâncreas, carcinoma hepatocelular e câncer de pulmão, mas é expresso em baixas concentrações ou está ausente nos tecidos normais (YU, 2013). Estes resultados sugerem fortemente que midkina seria útil não apenas como um marcador de tumor, mas também como um alvo molecular para a terapia do câncer (KISHIDA; KADOMATSU, 2013).

No câncer do colo-retal humano e da próstata, midkina é fortemente expresso nas fases pré-cancerosas. É importante ressaltar que a retirada de midkina por xenotransplante em

um modelo com células de câncer de colo retal e próstata foi associado com a supressão significativa do crescimento do tumor (KISHIDA, *et. al.* 2013).

Um exemplo em que a terapia-alvo da midkina é promissora, é o câncer de pâncreas adenocarcinoma ductal, um dos mais fatais, no qual a midkina é abundante em 50% do tumor e confere resistência à quimioterapia em células tumorais (MURAMATSU, 2014).

Níveis elevados de midkina refletem mau prognóstico para muitos carcinomas, mas os mecanismos celulares e moleculares, orquestrando sua atividade permanecem obscuros (LIM, 2013). MK está atraindo muita atenção em relação ao tratamento de doenças. Espera-se que inibidores da MK sejam úteis no tratamento não apenas do câncer, como também para artrite, esclerose múltipla, hipertensão, doenças renais, etc. (MURAMATSU, 2010).

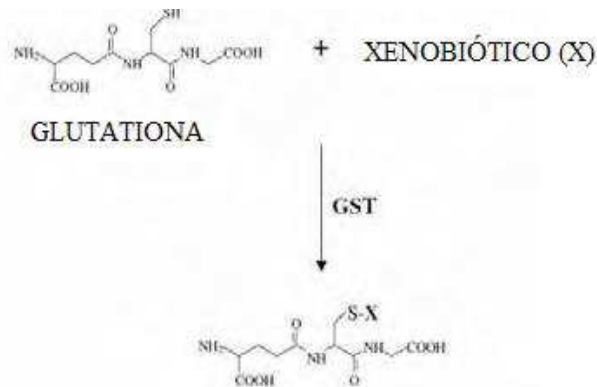
2.5 GSTP1

A glutathione S-transferase é uma família de enzimas que utilizam glutathione para detoxificação de diversos compostos, incluindo produtos de estresse oxidativo, substâncias cancerígenas e drogas terapêuticas. Entre os muitos polimorfismos de GST que foram identificados, GSTM1, GSTM1 e GSTP1 têm sido mais extensivamente estudados (HONG *et. al.*, 2012).

A GSTP1 é a isoenzima GST dominante na maioria dos tecidos extrahepáticos, sendo bastante abundante nos tecidos epiteliais humanos, principalmente no pulmão, esôfago e placenta. A presença de diferentes variantes desta isoenzima podem influenciar na capacidade de detoxificação de uma célula (MEDEIROS, 2009).

A detoxificação enzimática de xenobióticos pode ser classificada em duas fases distintas: Fase I e fase de II. As reações de fase I introduzem ou expõem um grupo funcional da substância. Os produtos da biotransformação da fase I são excretados pela urina e quando não o são, podem reagir com produtos endógenos originando compostos altamente hidrossolúveis. As reação de conjugação da fase II conduzem a formação de uma ligação covalente entre a substância exógena ou um metabólito de fase I com uma determinada molécula, formando conjugados altamente polares, geralmente inativos, que são excretados na urina ou nas fezes (GOODMAN, 2005). As GSTs são enzimas intracelulares da fase II de detoxificação que catalisam a conjugação de diversos compostos eletrofílicos à glutathione (GSH) (Figura 4).

Figura 4: Reação enzimática catalisada pela glutathione S-transferase adaptado de TOWNSEND & TEW 2003 *apud* JARDIM, 2011.



As isoenzimas de GST também têm sido relacionadas com a progressão do câncer. As GSTs desempenham um papel importante na ativação de sinais por ativação mitogênica por proteínas (MAP) quinase e vários fatores de transcrição que regulam a apoptose e sobrevivência das células. A manutenção do antioxidante celular glutathione (GSH) em diferentes compartimentos celulares também é criticamente regulada pelas GSTs (RAZA, 2011).

As variantes polimórficas de três membros da família de GST, GSTM1, GSTT1 e GSTP1, têm sido estudados devido à sua potencial importância na carcinogênese RAMALHINHO *et al.*, 2012).

A glutathione s-transferase é um grupo de enzimas que em mamíferos pode ser dividida em três famílias: GST citossólica, GST mitocondrial e GST microsomal. As GST citossólicas de mamíferos são todas diméricas. São descritas sete classes do referido grupo, são elas: Alpha, Mu, Pi, Sigma, Theta, Omega e Zeta (HUBER, 2008).

Nos seres humanos, as enzimas de GST pode ser dividido em cinco classes principais: alfa (GSTA), mu (GSTM), pi (GSTP), teta (GSTT) e zeta (GSTZ). Entre eles, GSTM1, GSTT1 e GSTP1 são enzimas detoxicantes que têm sido conhecidas por metabolizar uma ampla gama de agentes cancerígenos (KOH *et. al.*, 2011).

A glutathione-S-transferase GSTP é hiper expressa em muitos cânceres humanos e em células cancerosas resistentes à quimioterapia, onde há evidências de que GSTP pode ter funções adicionais para além do seu papel catalisador conhecido (HENDERSON, 2011). O

alto nível de GSTP está associado com o mau prognóstico em muitos tipos de câncer, incluindo o câncer do col retal (JANCOVA, *et al.* 2012).

A GSTP parece ser constante em cânceres (cólon, pulmão, ovário, mama, estômago, bexiga, rim, testículos) apresentando-se em concentrações de 2 a 4 vezes maiores que em células normais. O papel desempenhado por essa proteína na progressão e crescimento tumoral é pouco conhecido (JARDIM, 2011).

Nos seres humanos, o aumento da expressão da classe GSTP foi associado com a progressão do tumor e com a capacidade da célula cancerígena de adquirir resistência a diversos fármacos. A alta expressão de GSTP foi relatada em muitos tumores humanos, e tem sido mostrado estar correlacionada com a fase avançada, a agressividade da doença, a resistência a drogas e a baixa sobrevida. Em contraste, a perda precoce de expressão GSTP resulta em aumento da susceptibilidade ao câncer (KANWAL, *et al.*, 2014).

As GSTs são de interesse farmacologistas e toxicologistas pois são analisadas como alvos para terapias anti-asmáticas e anti-tumorais, além de metabolizarem agentes como quimioterápicos, inseticidas e herbicidas (HAYES *et al.*, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver computacionalmente um inibidor em comum para as proteínas midkina e glutational S-transferase.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar estruturalmente os domínios importantes para inibição das atividades biológicas desempenhadas nos cânceres pelas proteínas midkina e glutational S-transferase;
- Compreender e aplicar técnicas de planejamento computacional para desenvolvimento de um inibidor das proteínas midkina e glutational S-transferase;
- Utilizar testes de docking molecular para prever a afinidade de ligação entre o inibidor desenvolvido e as proteínas MK e GST;
- Identificar as interações intermoleculares formada nos complexos compostos por inibidor/midkina e inibidor/GSTP;

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção das estruturas tridimensionais da midkina e das GSTPs estudadas:

As estruturas a serem utilizadas foram obtidas através do *Protein Data Bank* (PDB) (Figura 5), que é um site de busca de dados de estruturas proteínas e ácidos nucleicos definidos através de difração de raios X ou da ressonância magnética nuclear de acesso livre na internet.

Figura 5: Interface da página do PDB disponível pelo site: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/>

The screenshot displays the RCSB PDB website interface. At the top, there is a navigation bar with options like 'Deposit', 'Search', 'Visualize', 'Analyze', 'Download', 'Learn', and 'More'. A search bar is prominently featured with the text 'Search by PDB ID, author, macromolecule, sequence, or ligands'. Below the search bar, the PDB logo and 'An Information Portal to 107251 Biological Macromolecular Structures' are visible. The main content area shows the entry for 'Structure of porcine class pi glutathione s-transferase' (ID: 2GSR). It includes a 'Primary Citation' section with the following text: 'Refined crystal structure of porcine class Pi glutathione S-transferase (pGST P1-1) at 2.1 Å resolution. Dirr, H., Reinemer, P., Huber, R. Journal: (1994) J. Mol. Biol. 243: 72-92'. To the right of the text, there is a 3D ribbon diagram of the protein structure, labeled 'Biological Assembly'.

4.2 BLAST: Alinhamento e Análise de Sequências Proteicas

O alinhamento e análise das estruturas proteicas utilizadas na realização deste trabalho foram feitos através do BLAST (do inglês, **B**asic **L**ocal **A**lignment **S**earch **T**ool) que é uma ferramenta do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI) e está entre as mais usadas para análise de sequências (Figura 6). Existem vários tipos de BLAST para comparar todas as combinações de nucleotídeos ou proteínas. Consiste em uma heurística que, além de realizar alinhamentos, fornece informações estatísticas para ajudar a decifrar a significância biológica do alinhamento realizado (MCGINNIS & MADDEN, 2004).

Figura 6: Interface da ferramenta Protein BLAST, disponibilizada no site do NCBI. Link para acesso: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

O BLAST utiliza o método de “blocos de identidades” para selecionar regiões de alinhamento mais promissoras, procurando apenas por matches exatos de certo comprimento em alinhamentos de seqüências. Procura unicamente blocos de identidade (semelhança) perfeita. A matriz utilizada por defeito em BLAST é a BLOSUM62 (*BLOCKS SUBSTITUTION Matrix* at 62%), uma matriz de logaritmos de probabilidades derivada das substituições de aminoácidos entre segmentos de seqüências de identidade inferior a 62% (ROCHA, 2001).

4.3 Planejamento do Inibidor

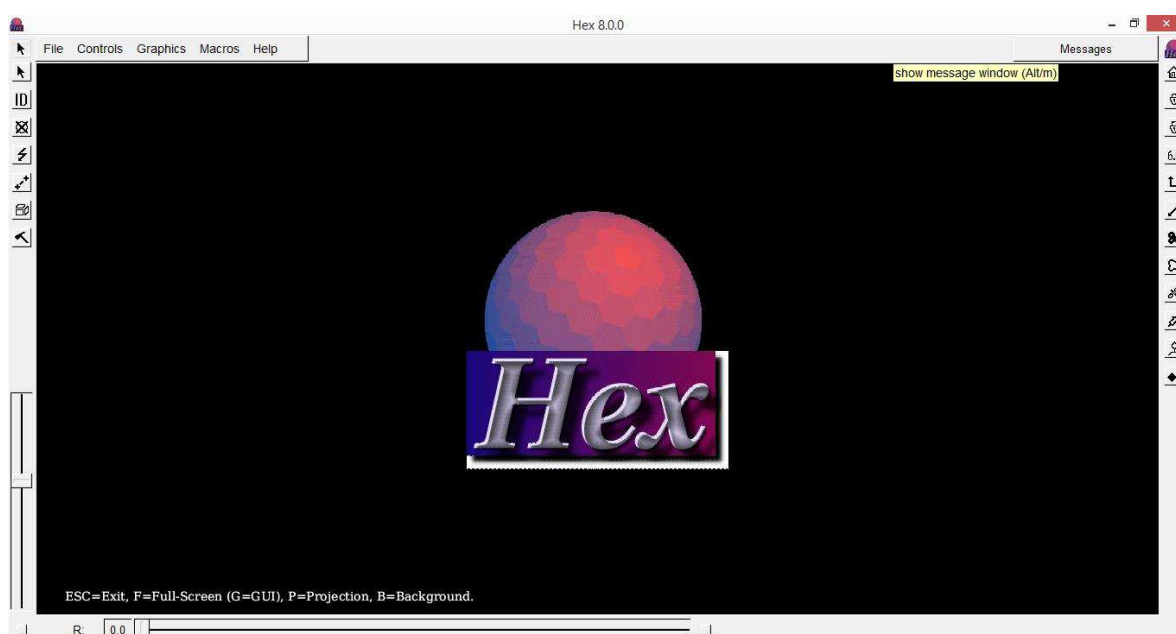
O inibidor foi projetado através de estruturas previamente depositadas no PDB que foram recortadas para atenderem características topológicas dos receptores.

O planejamento de ligantes utiliza informações de topologia de superfície do receptor, neste caso das proteínas GSTP e MDK, bem como informações de ligantes já caracterizados estruturalmente. Os ligantes utilizados como modelos foram: 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol e o albendazol.

4.4 Docking Molecular

Os testes de docking molecular foram realizados através do software Hex 8.0 (Figura 7) que é um programa de superposição molecular e encaixe interativo de proteínas, que realiza uma simulação onde ligante pode ser considerado um corpo rígido, sem liberdade de girar os ângulos de torção (*dock* rígido), ou pode girar seus ângulos de torção (*dock* flexível).

Figura 7: Interface do programa Hex 8.0. Link para download: <http://hex.loria.fr>



O problema da simulação de docking é um problema de otimização computacional, onde temos que reproduzir computacionalmente a posição de um ligante na estrutura de uma proteína (receptor) (RITCHIE & KEMP, 2000; RITCHIE *et al.*, 2008). A riqueza de estruturas tridimensionais disponíveis tem sido de grande valor para testes de ligações entre moléculas. Há vários programas desenvolvidos para testes de docking molecular, entre eles está o *Hex* de download disponível livremente através da internet.

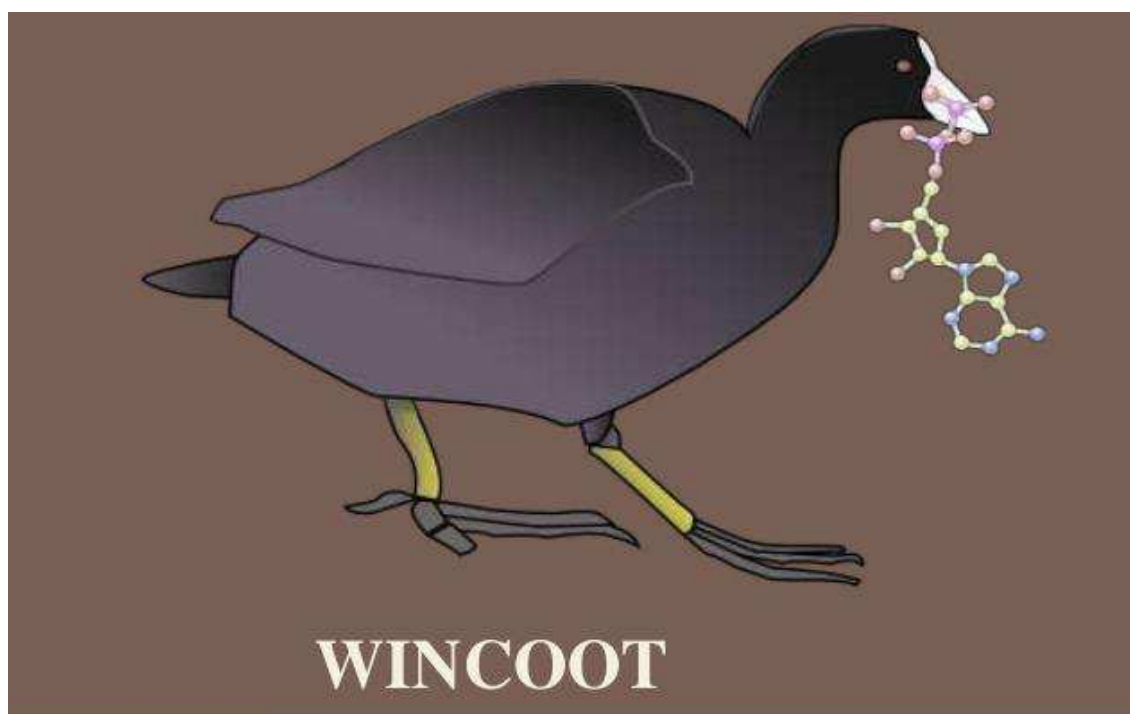
Docking (“encaixe”, em português) molecular é uma simulação computacional para prever a conformação de um complexo receptor-ligante, em que o receptor é geralmente uma proteína ou uma molécula de ácido nucléico (DNA ou RNA) e o ligante é uma pequena molécula ou uma proteína. Também pode ser definida como uma simulação em que a posição de um ligante é estimada em um sítio de ligação predito ou pré-definido (DIAS & DE AZEVEDO, 2008).

Simulações de docking molecular podem ser usadas para reproduzir dados experimentais através de algoritmos de validação de interações, onde as conformações proteína-ligante ou proteína-proteína, para uma proteína obtida *in silico* e comparar com estruturas obtidas a partir de cristalografia de raios X ou ressonância nuclear magnética (RMN). Além disso, o docking é uma das principais ferramentas para “screenings” virtuais, onde uma biblioteca de vários compostos pode ser usada para docking contra uma droga marcada, resultando na melhor conformação (conformação certa) (DIAS & DE AZEVEDO, 2008).

4.5 Interações Intermoleculares

As interações de hidrogênio e hidrofóbicas presentes nos complexos obtidos foram identificadas através do software WinCoot 0.7.1 (Figura 8).

Figura 8: Interface do programa WinCoot) 0.7.1.



As moléculas da vida (DNA, RNA, proteínas etc.) são mantidas em suas estruturas tridimensionais através de interações intra e intermoleculares. Outro fato importante é que todos os processos vitais estão envolvidos com o reconhecimento intra e intermolecular. Esses processos podem ser definidos como interações fracas, usualmente reversíveis e altamente

seletivas entre moléculas (intermolecular) ou numa mesma molécula biológica (intramolecular) (ROCHA, 2001).

A formação de um complexo ligante-receptor (inibidor-proteína) se inicia através do processo de reconhecimento molecular, em que o receptor precisa conhecer as propriedades do ligante que se aproxima para realizar uma interação forte e específica (SILVA, 2008).

Existem vários tipos de relações intermoleculares que podem manter um complexo fármaco-receptor, entre elas: interações iônicas, interações de hidrogênio, interações de van der Waals, dipolo-dipolo, íon dipolo e interações hidrofóbicas (HOLJTE *et al.*, 2003; PATRICK, 2005 apud SILVA 2008).

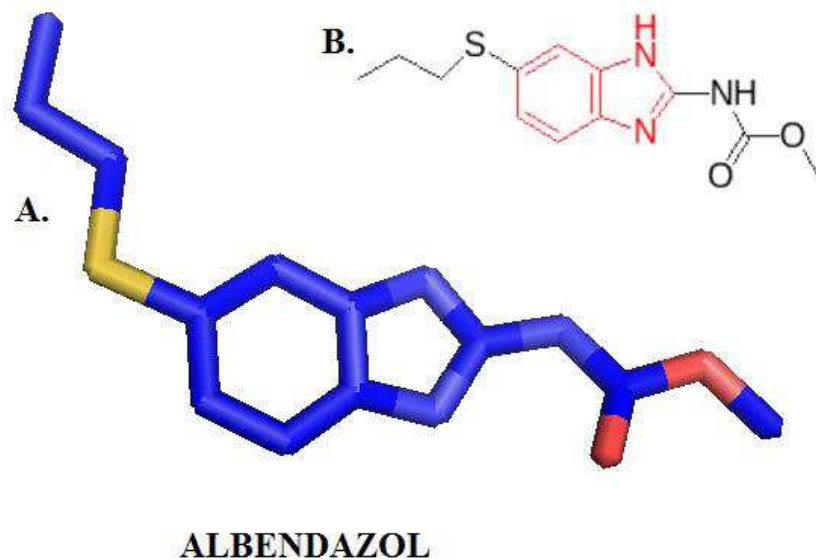
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Inibidor desenvolvido

Para o desenvolvimento do inibidor foram analisados possíveis modelos como o albendazol ou (5-propiltio-1H-benzimidazol-2-il) carbamato e o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX).

O albendazol é um medicamento que pertence à classe de anti-helmínticos benzimidazólicos (Figura 9). O referido fármaco, de uso bastante disseminado, está na lista de medicamentos essenciais da Organização Mundial da Saúde (OMS) desde 1990.

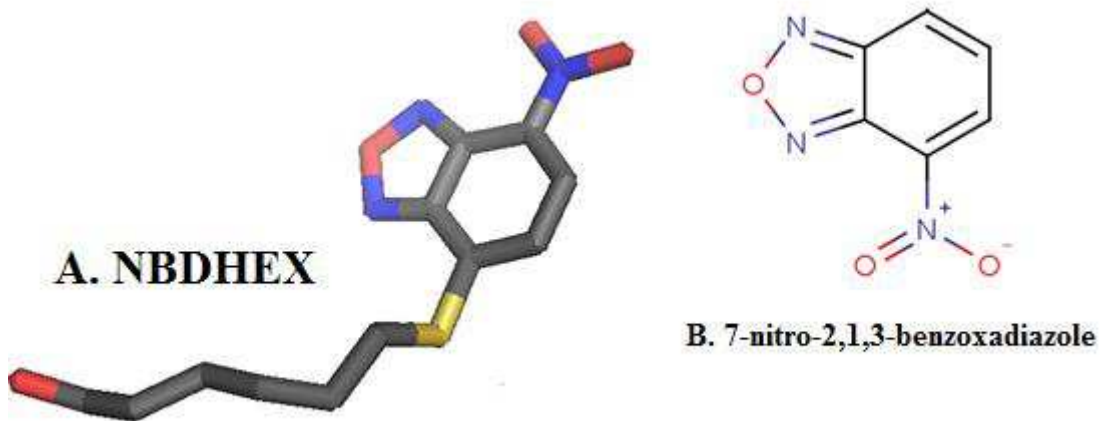
Figura 9: Estrutura tridimensional (A) e estrutura química (B) do fármaco albendazol. O núcleo benzimidazólico encontra-se destacado de vermelho na estrutura química.



O antiparasita anteriormente citado tem uma vantagem exclusiva em relação aos outros medicamentos pertencentes ao mesmo grupo, ele é o único a atravessar a barreira hematoencefálica. Essa característica permite que o albendazol seja utilizado no tratamento de infecções parasitárias que afetam o sistema nervoso central e pode ser aproveitada, potencialmente, para atingir metástases cerebrais (PATEL, 2011). Diversos trabalhos demonstraram que o anti-helmíntico anteriormente citado apresenta atividade em diversos tipos de câncer (Králová *et al.* 2013 apud NYGREN *et al.* 2013). Com base nessas informações a molécula do albendazol foi utilizada como um dos modelos para o desenvolvimento de um inibidor.

O NBDHEX pertence a uma classe de inibidores não peptidomiméticos de GSTs de humano que foi baseado em derivados da anel 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (Figura 10).

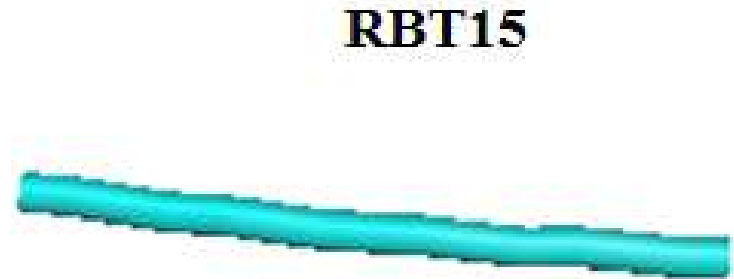
Figura 10: A. Estrutura tridimensional do inibidor 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX), B. Estrutura química do anel 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole.



Foi demonstrado que esta molécula inibe isoformas de GSTs em quantidades micro e submicromolares e que induz apoptose em diversas linhagens de células tumorais através da dissociação do complexo JNK/GSTP1. Além disso, o referido inibidor supera a glicoproteína-P, uma proteína expressa na superfície celular que está relacionada com a resistência a diversas drogas utilizadas no tratamento de tumores, o que sugere que este inibidor pode ser utilizado para tratar diversos tipos de câncer combinado com outras drogas (FEDERICI, 2009).

As características estruturais do Albendazol e do NBDEHEX foram usadas como para a elaboração de um inibidor. Um tripeptídeo formado pelos resíduos de aminoácidos [REDACTED], [REDACTED] e [REDACTED] (RBT15) foi racionalizado com o intuito de impedir as atividades desenvolvidas tanto pela midkina e quanto pela GSTP1 nas células cancerígenas. O RBT15 foi retirado de proteínas ativas não passando por nenhum processo de modelagem molecular (Figura 11).

Figura 11: Estrutura tridimensional do tripeptídeo desenvolvido.



A aplicação de proteínas e peptídeos como moléculas terapêuticas é muito importante para o tratamento de várias doenças, devido a fatores como a alta especificidade e atividade em pequenas concentrações, quando comparadas com os medicamentos convencionais (Wang 1999 apud Melo, 2012). A utilização desses tipos de moléculas para uso nos pacientes com câncer pode possibilitar um tratamento com menos efeitos colaterais, melhorando a qualidade de vida dessas pessoas.

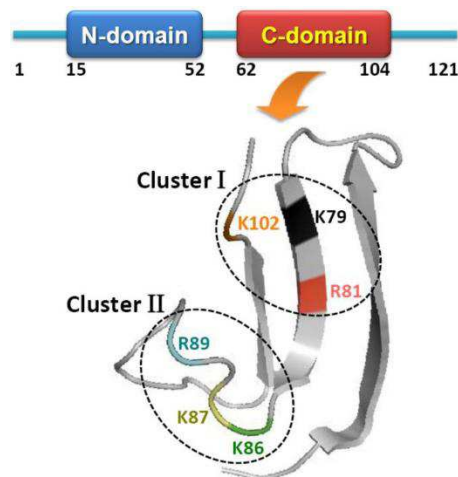
O presente inibidor pode representar uma excelente estratégia no desenvolvimento de um fármaco anticancerígeno. Nos últimos anos, houve um aumento exponencial na descoberta de peptídeos bioativos. Diversos medicamentos antifúngicos, antibacterianos, anti-inflamatórios utilizados na medicina contemporânea são bioativos (PICCHI, 2009). Além dessas aplicações, atualmente vários estudos têm sido realizados buscando desenvolvimento de fármacos peptídeos com ação anti-hipertensiva e anticancerígena (MEDEIROS, 2011).

5.2 Midkina

5.2.1 Estrutura

A midkina é uma proteína composta por dois domínios, um N-terminal e um C-terminal, flanqueados por pontes dissulfeto. Cada domínio apresenta três fitas β antiparalelas. No domínio C-terminal, o qual retém as atividades biológicas, foram identificados dois sítios de ligação à heparina, são eles: sítio I (K79, K102 e R81) e sítio II (K86, K87 e R89) (JUNO, 2010) (Figura 12). Os aminoácidos que compõem o sítio I estão localizados em duas fitas β distintas, K79 e R81 estão localizados na β C2 e K 102 está na β C3.

Figura 12: Estrutura tridimensional do domínio C-terminal da midkina mostrando em destaque os sítios de ligação à heparina.



Os dois sítios de ligação à heparina do domínio C-terminal da midkina foram utilizados como alvo do inibidor desenvolvido, de maneira a inibir a atividade da referida proteína que está relacionada com a capacidade de progressão de vários tipos de tumores malignos.

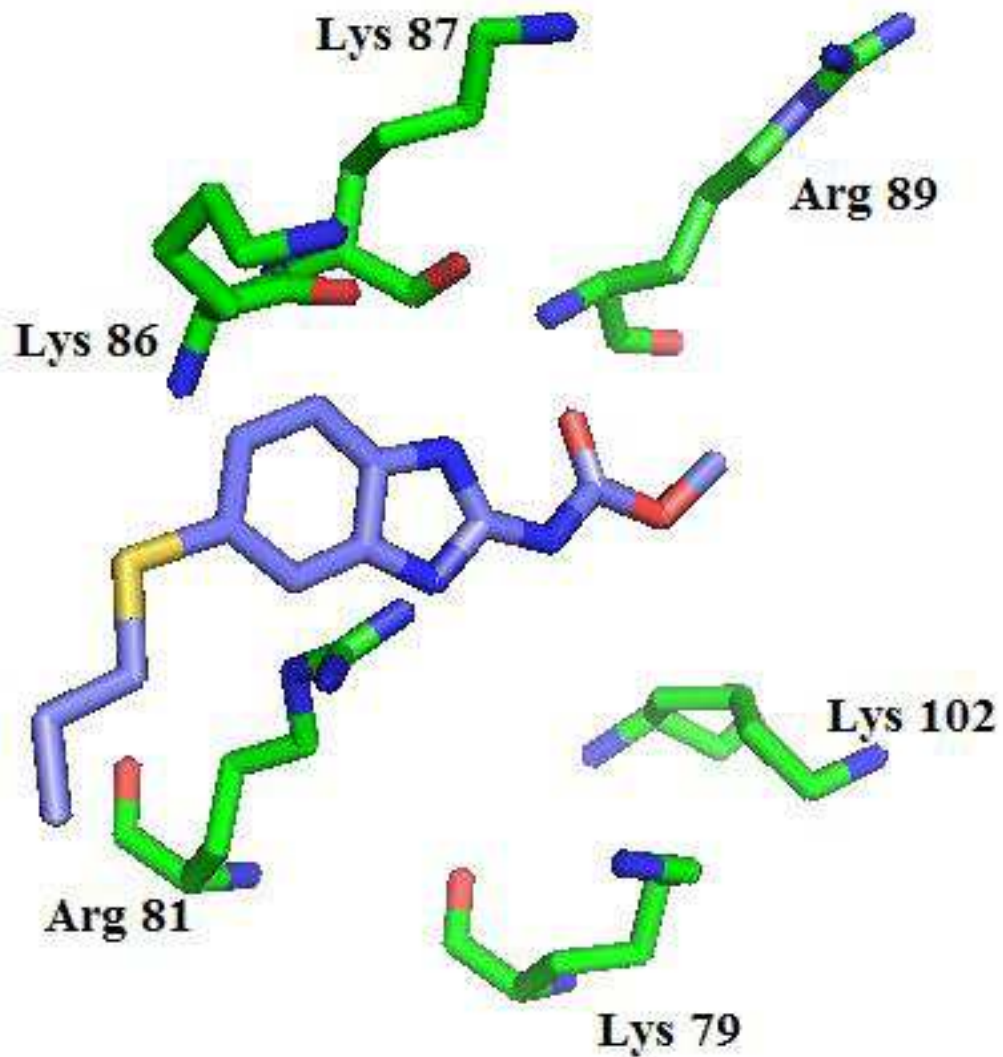
Ao se ligar aos receptores da membrana celular, a MDK consequentemente ativa as vias de sinalização PI3 quinase (PI3K) e MAP, essas vias induzem a proliferação celular e favorecem atividades angiogênicas e antiapoptóticas das células cancerígenas (HAO, 2013). Com a inibição da MDK ocorre a impossibilidade desta exercer qualquer uma das referidas atividades biológicas por ela desenvolvida.

5.2.2 Docking molecular da MK com o albendazol

Os resultados obtidos no docking molecular foram analisados em função da melhor energia de interação com os sítios ativos previamente definidos, sítio I (K79, K102 e R81) e sítio II (K86, K87 e R89), bem como a energia de ativação necessária para a sua ocorrência.

O docking molecular realizado demonstrou que a solução com energia de ativação de -193,95 apresentou o melhor encaixe nos sítios ativos da midkina. A visualização do complexo, realizada pelo programa PyMol, mostrou que o albendazol interagiu lateralmente ao sítio de interesse (Figura 13).

Figura 13: Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o albendazol (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em verde) que compõem os dois sítios de interesse



De acordo com as interações intermoleculares identificadas, o albendazol apresentou interação hidrofóbica e ligação de hidrogênio com o resíduo Arg 81, que compõe o sítio I, e hidrofóbica com a Lys 86, que compõe o sítio II (Tabela 1). Os demais resíduos que compõem o sítio ativo de interesse da proteína em questão não apresentaram interações com o ligante.

Tabela 1: Interações intermoleculares identificadas no complexo formado entre a MDK e o albendazol.

Resíduos da MDK	Interação Intermolecular	Distância (Å)
Asn 68	Hidrofóbica	-
Phe 66	Hidrofóbica	-
Arg81	Hidrofóbica	-
Lys 86	Hidrofóbica	-
Ala 88	Hidrofóbica	-
Tyr 90	Hidrofóbica	-
Lys 63	Hidrofóbica	-
Lys 65	Hidrofóbica	-
Tyr 64	Ligação de Hidrogênio	3,39
Arg 81	Ligação de Hidrogênio	2,44
Ala 88	Ligação de Hidrogênio	3,21

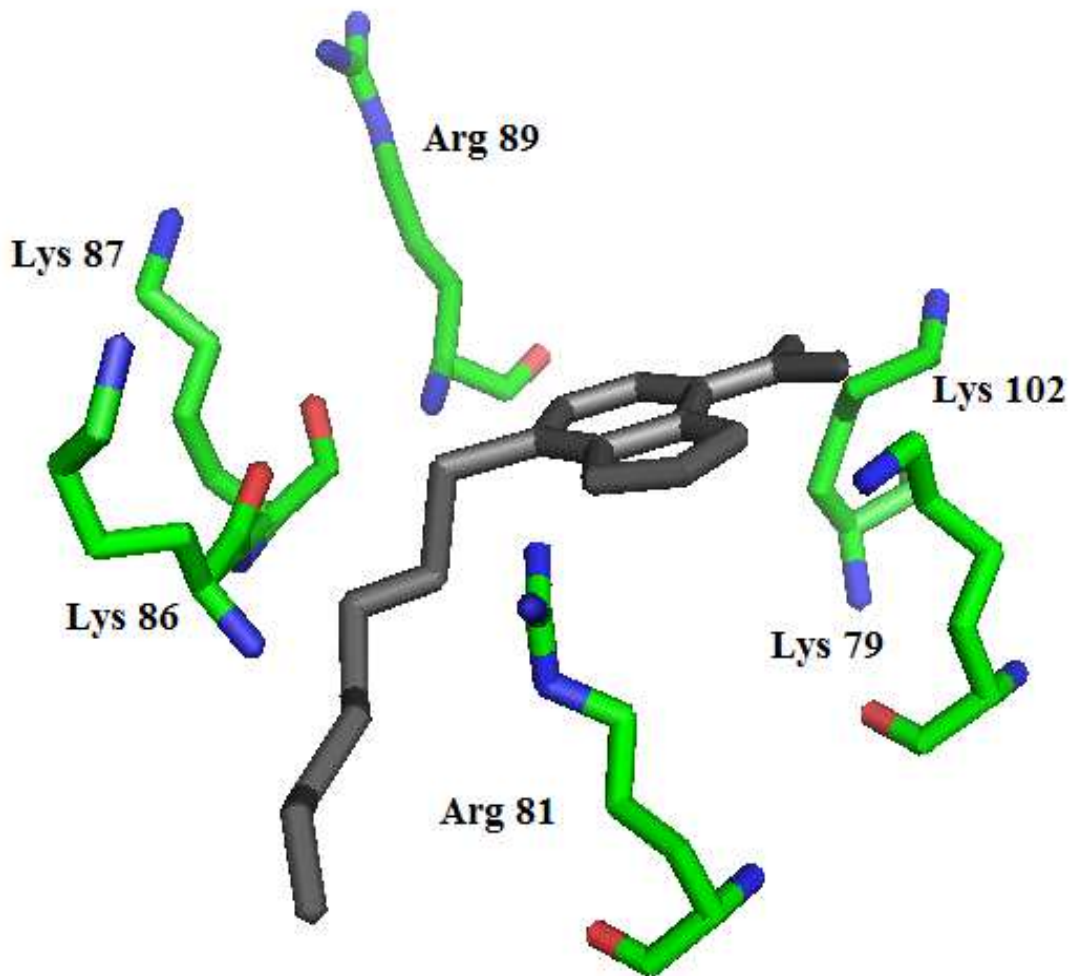
Foram determinadas as distâncias apresentadas entre os resíduos que formaram ligações de hidrogênio.

Os resultados obtidos comprovam que o albendazol apresenta interação fraca com a MDK, porém isso se deve ao número reduzido de interações com resíduos importantes para a inibição da MDK. As características de interação do albendazol com a MDK são dados importantes para o desenvolvimento de um inibidor potencial da midkina.

5.2.3 Docking molecular da MDK com 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX)

O NBDHEX é referido na literatura como inibidor de GSTP1. Porém, suas características estruturais não são tão distantes do albendazol podendo também ser utilizado para a inibição da MDK. O docking molecular realizado com este ligante mostrou que ele também interage com a midkina e apresentou como o complexo de melhor solução o com energia de -202,59. A visualização do complexo mostra que o ligante se direciona apenas para os resíduos que compõem o sítio I, K79, K102 e R81 (Figura 14).

Figura 14: Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-ylthio) Hexanol (em cinza) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em verde) que compõem os dois sítios de interesse



O referido ligante demonstrou interações intermoleculares, hidrofóbicas e de hidrogênio com os resíduos Lys 79 e Arg 81, pertencentes ao sítio I. Porém, o NBDHEX não demonstrou possuir interação com nenhum dos resíduos pertencentes ao sítio II de ligação à heparina (Tabela 2).

Tabela 2: Interações intermoleculares identificadas no complexo formado entre a MDK e o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol.

Resíduos da MDK	Interação Intermolecular	Distância (Å)
Asn 68	Hidrofóbica	-
Phe 66	Hidrofóbica	-
Arg81	Hidrofóbica	-
Tyr 64	Hidrofóbica	-
Trp 69	Hidrofóbica	-
Lys 79	Hidrofóbica	-
Lys 65	Hidrofóbica	-
Thr 84	Hidrofóbica	-
Trp 69	Ligação de Hidrogênio	2,92
Asn 68	Ligação de Hidrogênio	2,55
Gly 70	Ligação de Hidrogênio	3,85
Lys 79	Ligação de Hidrogênio	2,80
Arg 81	Ligação de Hidrogênio	2,92
Phe 66	Ligação de Hidrogênio	3,03

Foram determinadas as distâncias apresentadas entre os resíduos que formaram ligações de hidrogênio.

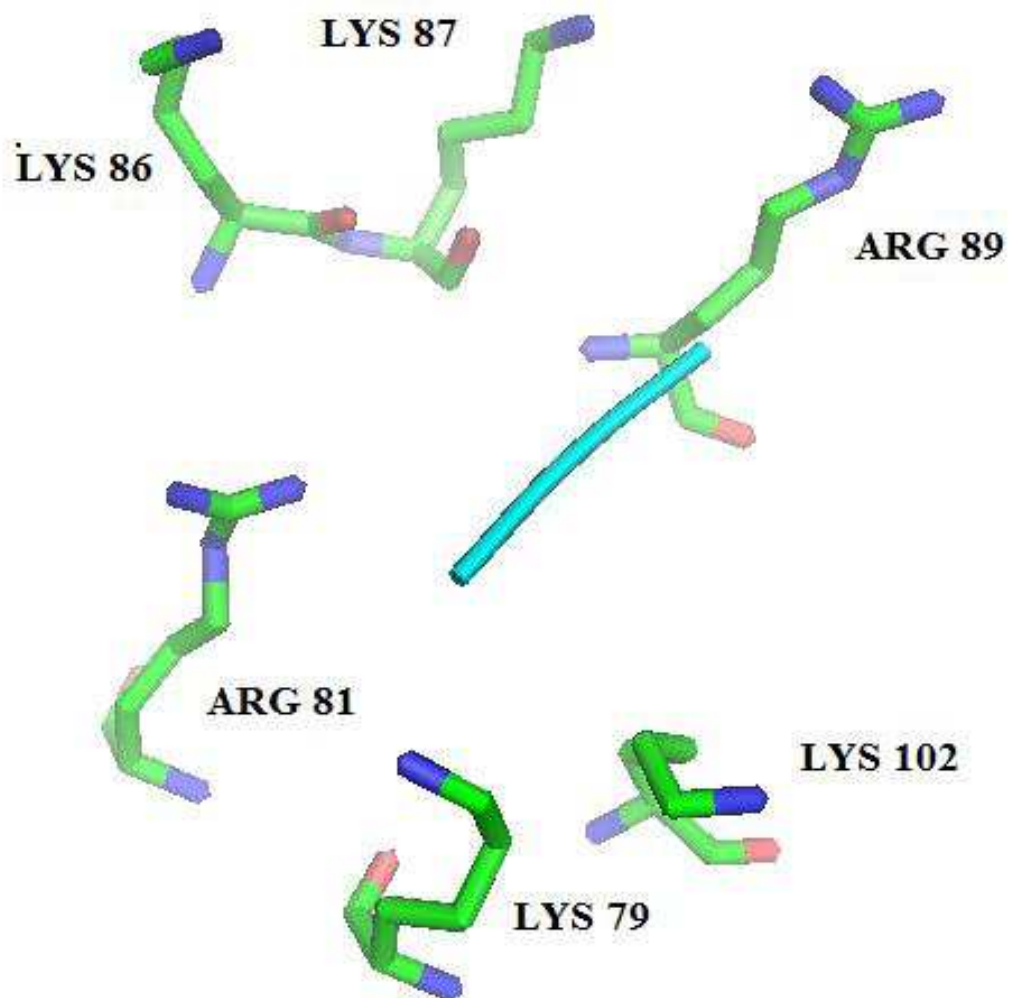
Os resultados mostram que o NBDHEX interage apenas com um dos sítios de interesse da midkina, podendo servir como modelo de partida para a elaboração de uma molécula que interaja com resíduos pertencentes aos dois sítios ativos da proteína.

5.2.4 Docking molecular entre a MDK com o inibidor desenvolvido (RBT15)

O complexo receptor-ligante que apresentou melhor encaixe nos locais de interesse foi a interação MK/RBT15 com energia de ativação mais negativa, equivalente a -281,27. Pode se verificar que o RBT15 interagiu com os dois sítios de interesse e apresentou uma energia favorável para o encaixe, pois quanto maior a negatividade para a energia de ativação

mais favorável é a ocorrência da ligação, representando que esta molécula pode vir a ser uma importante estratégia para a inibição das atividades relacionadas com a midkina no desenvolvimento do câncer (Figura 15).

Figura 15: Visualização do docking molecular realizado pelo programa Hex 8.0 entre o inibidor desenvolvido (em azul) e a midkina. Em destaque estão os seis resíduos (em verde) que compõem os dois sítios de interesse



As interações intermoleculares formadas pela interação entre o inibidor e a proteína foram analisadas. Houve identificação de ligações hidrofóbicas envolvendo os resíduos de interesse do sítio I (Arg81 e Lys102) e do sítio II (Lys 86 e Arg89). Além destas, foram observadas ligações de hidrogênio envolvendo Arg81 e Lys86 (Tabela 3).

Tabela 3: Interações intermoleculares apresentadas no complexo obtido no docking molecular entre o inibidor RBT15 e a midkina

Resíduos do RBT15	Resíduos da MDK	Interação Intermolecular	Distância (Å)
■	Ala88	Ligação de Hidrogênio	3,46
	Tyr90	Ligação de Hidrogênio	3,31
	Arg89	Hidrofóbica	-
	Tyr90	Hidrofóbica	-
■	Lys86	Ligação de Hidrogênio	3,45
	Arg81	Ligação de Hidrogênio	3,08
	Ala88	Ligação de Hidrogênio	2,32
	Tyr90	Hidrofóbica	-
	Arg81	Hidrofóbica	-
	Lys86	Hidrofóbica	-
■	Ala71	Ligação de Hidrogênio	3,15
	Gly70	Ligação de Hidrogênio	3,34
	Gly70	Hidrofóbica	-
	Ala71	Hidrofóbica	-
	Pro103	Hidrofóbica	-
	Lys102	Hidrofóbica	-
	Trp69	Hidrofóbica	-
	Cys72	Hidrofóbica	-

Foram calculadas apenas as distâncias entre os resíduos que apresentam ligações de hidrogênio

As interações moleculares encontradas no complexo enfatizam a ligação do RBT15 desenvolvido nos sítios de interesse da proteína. Além disso, as várias relações apresentadas representam uma estabilização entre as estruturas envolvidas, pois para que ocorra a dissociação entre as duas moléculas é necessário que todas as múltiplas interações fracas sejam rompidas ao mesmo tempo.

Entre os inibidores analisados, o ligante RBT15 foi o que apresentou melhor interação com a MK. Além disso, a energia de ativação apresentada foi mais favorável que as apresentadas pelo albendazol e pelo NBDHEX demonstrando que o RBT15 pode vir a ser uma eficiente estratégia para a inibição da MDK.

5.3 Glutationas S-transferase P1 (GST P1-1)

5.3.1 Estruturas

As proteínas pertencentes à classe Pi de glutathiona s-transferase são dímeros que possuem entre 199 e 244 resíduos de aminoácidos em suas estruturas primárias, que são encontradas em grandes concentrações em células tumorais e estão relacionadas com a capacidade destas células adquirirem resistência a fármacos, inclusive aos medicamentos utilizados em quimioterapias (HUBER, 2008).

O aumento da expressão de GSTP1-1 tem tido sido observado em muitos tipos de cânceres. Membros dessa classe catalisam a conjugação de glutathiona a eletrófilos no processo de desintoxicação. Recentemente foi demonstrado que a mesma é altamente expressa em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) e é frequentemente superexpressa em tumores cerebrais, mamários, do ovário, do esôfago, do estômago, pâncreas, cólon, rim, pulmão, ductos biliares, bexiga e sistemas linfático e hematopoiético. Como tal, GSTP1 tem sido considerada de interesse clínico como marcador tumoral e como alvo terapêutico (MUTTALIP, 2010).

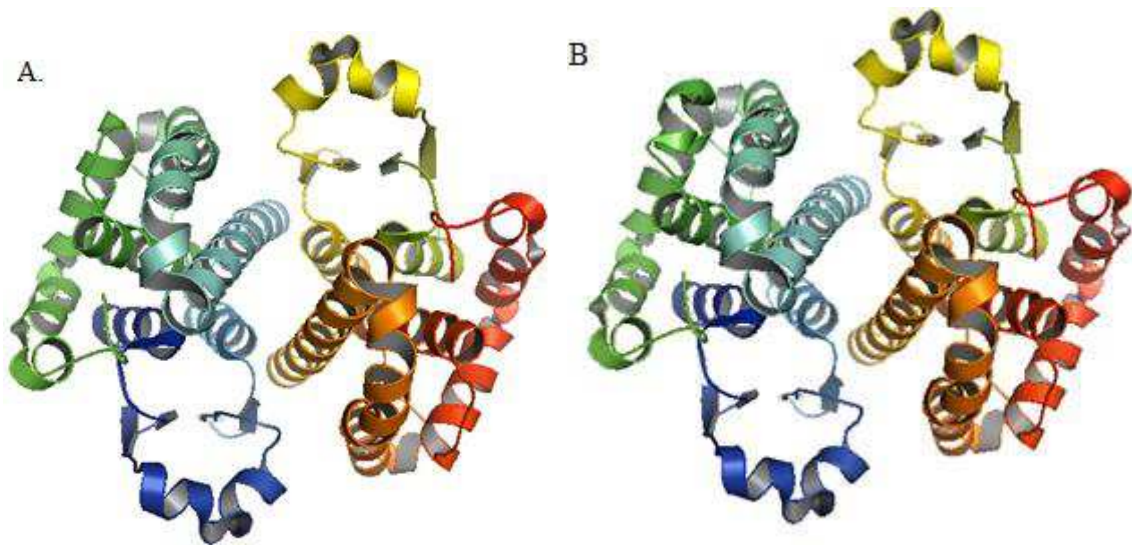
Estudos apontam que a GSTP1 em células cancerosas, podem beneficiá-las contra o estresse oxidativo induzido por drogas quimioterápicas, que combatem o crescimento e a multiplicação celular, inibindo a apoptose e favorecendo o crescimento tumoral (ROCHA, 2010).

As subunidades de GSTs apresentam uma zona N-terminal, de domínio α/β , que forma a zona de ligação da glutathiona, e uma região C-terminal, de domínio α -hélice, que forma a zona de ligação do substrato electrofílico. Estas enzimas são capazes de metabolizar a biotransformação de vários substratos com diferentes grupos funcionais (COSTA, 2011). Assim, o sítio ativo das glutathionas S-transferases possuem dois subsítios de ligação, um específico para glutathiona (sítio G) e o outro de ligação a substratos hidrofóbicos (sítio H).

O interesse desse trabalho foi avaliar o modo como o inibidor desenvolvido interage com o sítio ativo das GSTs, impedindo a ligação das mesmas com a glutiona e/ou substratos, conseqüentemente inibindo a atividade da referida enzima. O sítio G da classe Pi é composto pelos resíduos Arg13, Trp 38, Lys44, Pro53, Gln 51, Leu 52, Gln 64, Ser65 e Asn 66 o sítio H (H: hidrofóbico) é formado pelos resíduos Tyr7, Phe8, Val10, Val35, Gln39, Ile104 (Ala104) e Tyr108, Gly 205.

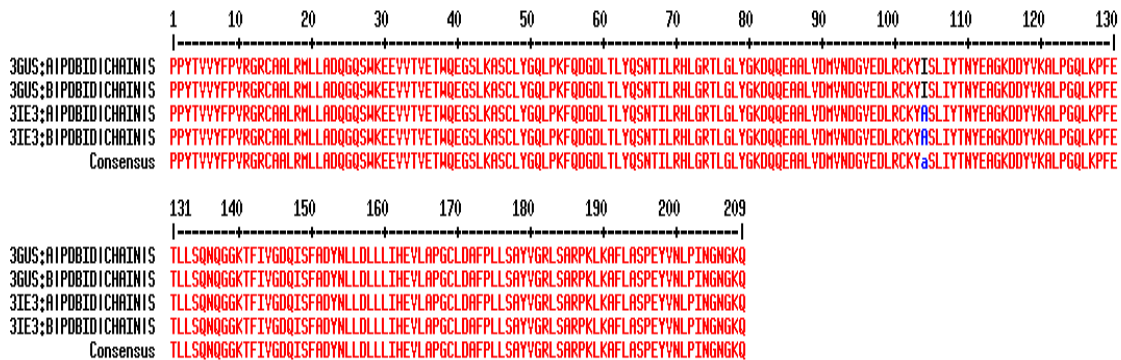
Para esta pesquisa foram utilizadas duas proteínas GST P1-1, ambas com a estrutura cristalográfica definida (PDB ID 3GUS e 3IE3) (Figura 16).

Figura 16: Estruturas tridimensionais das Glutonas s-transferases PDB ID 3GUS (A) e 3IE3 (B).



As isoformas estudadas diferem em apenas um único resíduo de aminoácido, sendo uma GST humana do tipo selvagem, com Isoleucina na posição 104 (PDB 3GUS) e a outra, com uma mutação, que apresenta Alanina no referido local (PDB 3IE3) (Figura 17).

Figura 17: Alinhamento de duas sequências de glutathione S-transferase da classe Pi, PDB 3GUS e 3IE3 que diferem apenas no resíduo da posição 104



A escolha destas referidas isoformas ocorreu devido ao fato de enzimas pertencentes à classe GSTP1-1 serem abundantes em diversos tipos de cânceres humanos e por contribuírem para a resistência celular a múltiplos fármacos através da conjugação de quimioterápicos. Além disso, esta mesma classe é considerada um alvo promissor para o tratamento farmacêutico (FEDERICI, 2009).

5.3.2 Docking molecular da GSTP1-1

Um inibidor potente da GSTP1-1 provoca o rompimento do complexo entre esta enzima e a via c-Jun N-terminal Kinase (JNK) provocando a apoptose em células cancerígenas. A ativação desta via pode significar uma promissora estratégia na busca de novos medicamentos para o tratamento de câncer (TREGNO, 2009).

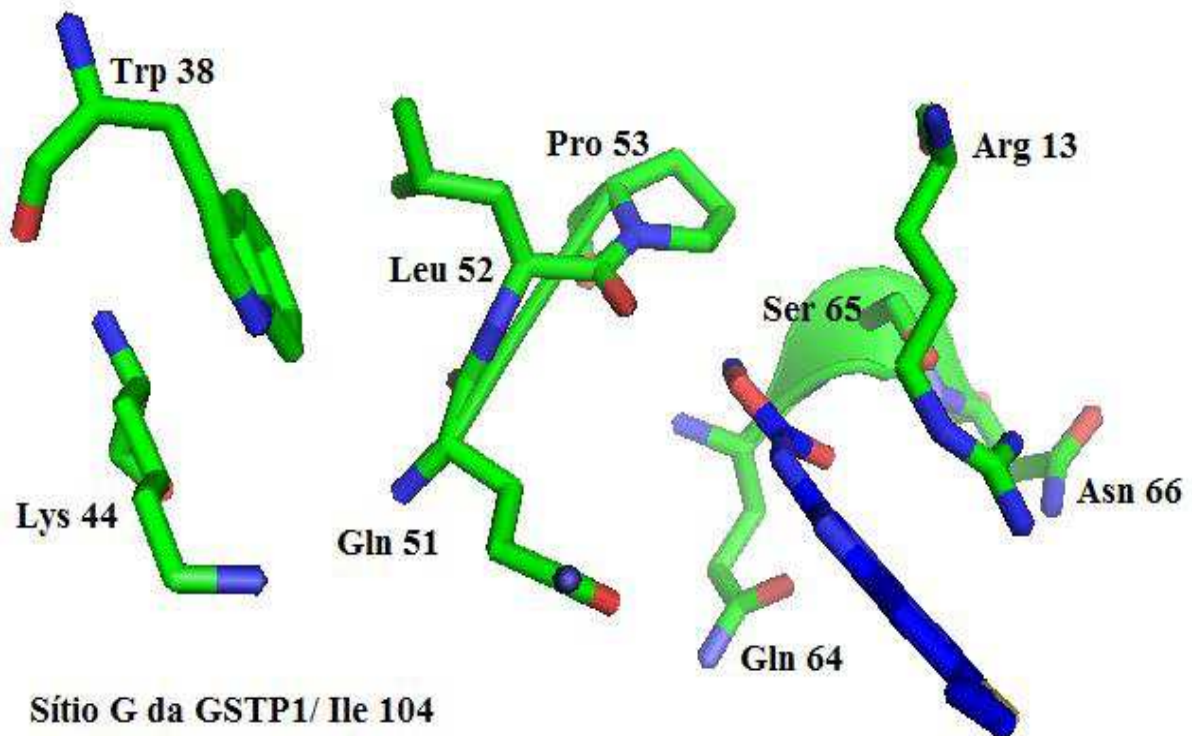
O potencial inibidor desenvolvido neste trabalho foi realizado com a intenção de interagir com o sítio ativo das GSTP1 de maneira a impedir a atividade biológica desenvolvida por essas proteínas.

Foram analisadas as soluções apresentadas pelos testes de docking molecular no sítio ativo da cadeia B de dois exemplares de GSTP1 com o albendazol, com o NBDHEX e com o inibidor desenvolvido. Serão mostrados os resultados de melhor solução de cada uma das estruturas. Foi selecionado o complexo proteína/inibidor que melhor interage com os resíduos que compõem o sítio ativo.

5.3.2.1 Docking molecular entre a GSTP1-1/Ile104 e o albendazol

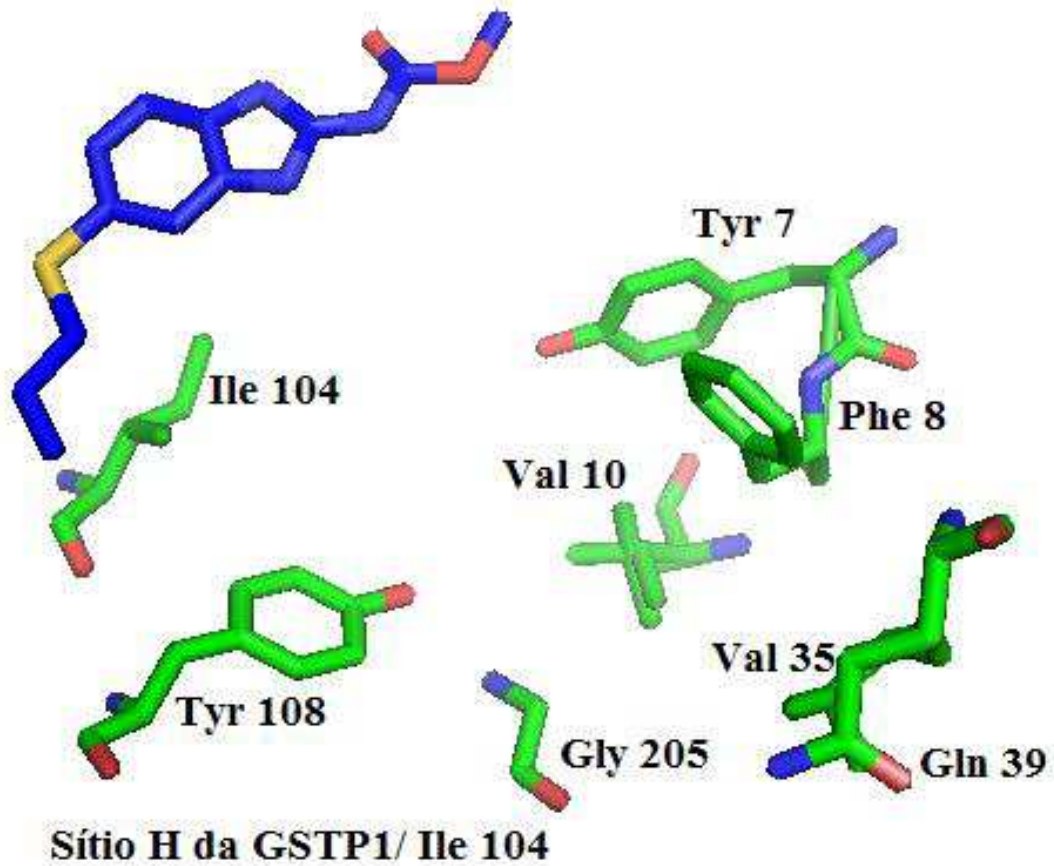
A realização do docking molecular entre o albendazol e GSTP1/ Ile 104 resultou como complexo de melhor solução o com energia de ativação de -205, 28. A visualização da interação obtida revela que o ligante se direcionou lateralmente ao sítio G da enzima, limitando a sua interação com os resíduos do referido local (Figura 18).

Figura 18: Interação do albendazol (em azul) com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile 104.



A imagem obtida do complexo obtido entre o albendazol e os resíduos que formam o subsítio H da GSTP1/ Ile 104 revela que o inibidor em questão se posiciona lateralmente interagindo com a Ile 104, justamente o aminoácido que sofre mutação para o processo de desenvolvimento das células cancerígenas (Figura 19).

Figura 19: Interação do albendazol (em azul) com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ile 104.



As interações intermoleculares observadas mostram que apresentam ligação hidrofóbica os resíduos Arg 13, Pro 53, Gln 64 e Ile 104. As ligações de hidrogênio foram formadas por Gln 64, Ser 65 e Arg 13. Dentre todos estes, apenas a Ile 104 pertence ao subsítio H, os demais são componentes do subsítio G (Tabela 4).

Tabela 4: Interações intermoleculares apresentadas no complexo obtido pelo docking molecular entre o albendazol e a GSTP1/ Ile 104

Resíduos da GSTP1/Ile 104	Interação Intermolecular	Distância (Å)
Arg 13	Hidrofóbica	-
Ser 105	Hidrofóbica	-
Ile 104	Hidrofóbica	-
Cys 101	Hidrofóbica	-
Glu 97	Hidrofóbica	-
Asp 98	Hidrofóbica	-
Pro 53	Hidrofóbica	-
Gln 64	Hidrofóbica	-
Gln 64	Ligação de Hidrogênio	3,45
Ser 65	Ligação de Hidrogênio	3,05
Leu 52	Ligação de Hidrogênio	3,19
Arg 13	Ligação de Hidrogênio	2,93

Foram calculadas apenas as distâncias entre os resíduos que apresentam ligações de hidrogênio

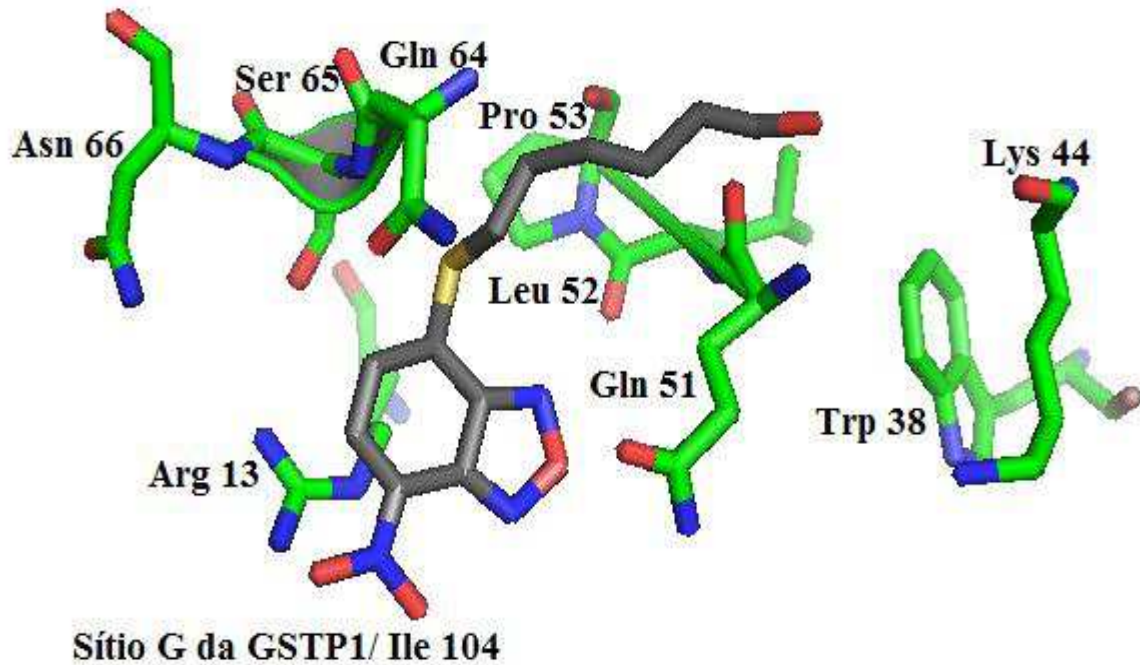
Os dados obtidos revelam que o albendazol interage com a GSTP1/Ile 104. Porém, sua interação é praticamente limitada a alguns resíduos do sítio G. A sua relação entre os resíduos que formam o sítio H é limitada a aminoácido Ile 104, que sofre mutação para Ala 104 durante o processo de desenvolvimento de células com crescimento exagerado.

5.3.2.2 Docking molecular entre a GSTP1-1/Ile104 e o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX)

O complexo de melhor solução obtido nos testes de docking molecular realizado entre 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX) e a GSTP1/ Ile 104

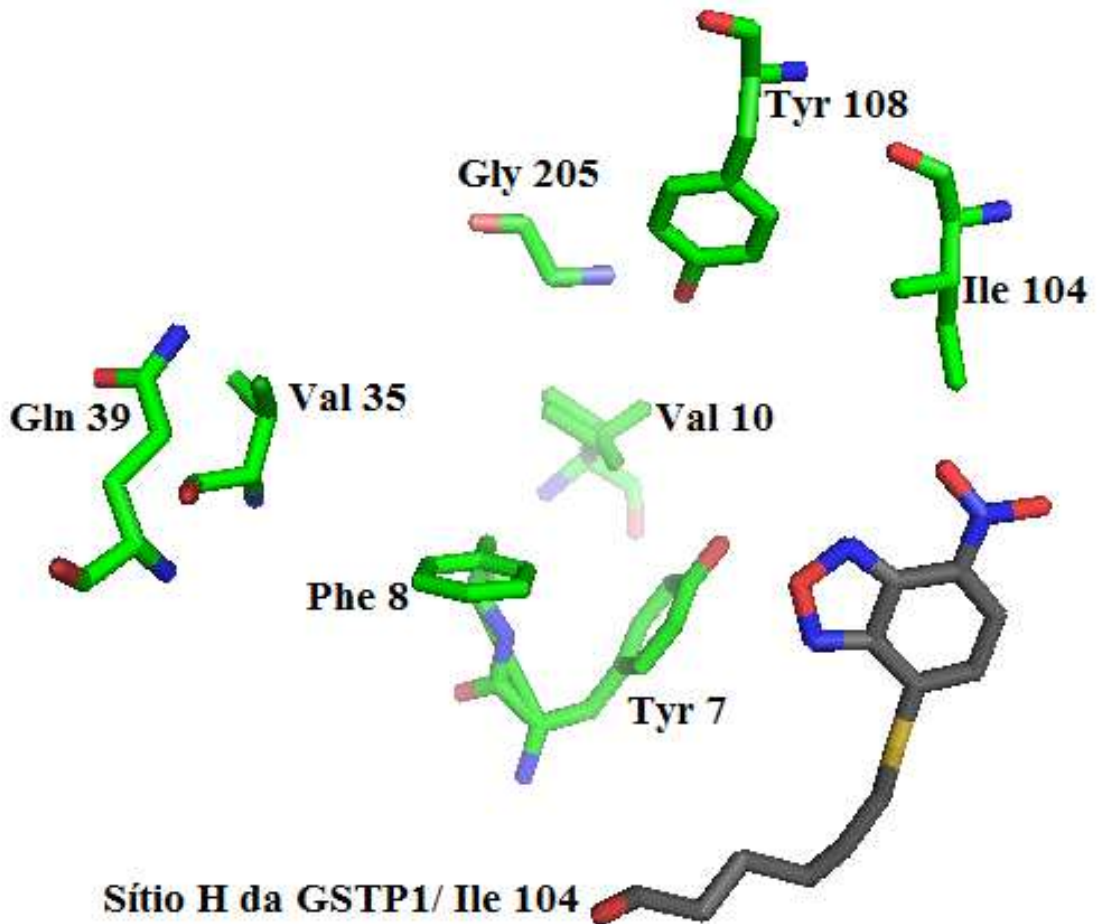
apresentou energia de ativação de $-202,40$. A visualização deste revela que o inibidor se posiciona praticamente no centro do subsítio G (Figura 20).

Figura 20: Interação do 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol ou NBDHEX (em cinza) com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile 104.



Quando observado o posicionamento do inibidor em relação aos resíduos do subsítio H nota-se que o mesmo se localiza bem lateralmente ao sítio H da GSTP1/Ile 104 o que limita a sua interação com os aminoácidos em questão (Figura 21).

Figura 21: Interação entre 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol ou NBDHEX (em cinza) com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile 104.



Os aminoácidos Arg 13, Leu 52 e Pro 53 apresentam interação intermolecular do tipo hidrofóbica. Além disso, Arg 13, Gln 64 e Ser 65 formam ligações de hidrogênio com o NBDHEX. Todos os resíduos citados fazem parte do subsítio G, local específico de ligação à proteína glutatona (Tabela 5).

Tabela 5: Interações intermoleculares apresentadas no complexo obtido pelo docking molecular entre o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol ou NBDHEX e a GSTP1/Ile 104

Resíduos da GSTP1/Ile 104	Interação Intermolecular	Distância (Å)
Arg 13	Hidrofóbica	-
Asp 98	Hidrofóbica	-
Glu 97	Hidrofóbica	-
Tyr 49	Hidrofóbica	-
Leu 52	Hidrofóbica	-
Tyr 63	Hidrofóbica	-
Cys 47	Hidrofóbica	-
Pro 53	Hidrofóbica	-
Glu 97	Ligação de Hidrogênio	3,26
Cys 101	Ligação de Hidrogênio	3,33
Arg 13	Ligação de Hidrogênio	2,76
Gln 51	Ligação de Hidrogênio	2,65
Ser 65	Ligação de Hidrogênio	3,03
Gln 64	Ligação de Hidrogênio	3,14
Leu 48	Ligação de Hidrogênio	3,16
Gly 50	Ligação de Hidrogênio	3,40
Cys 47	Ligação de Hidrogênio	3,43

Foram calculadas apenas as distâncias entre os resíduos que apresentam ligações de hidrogênio

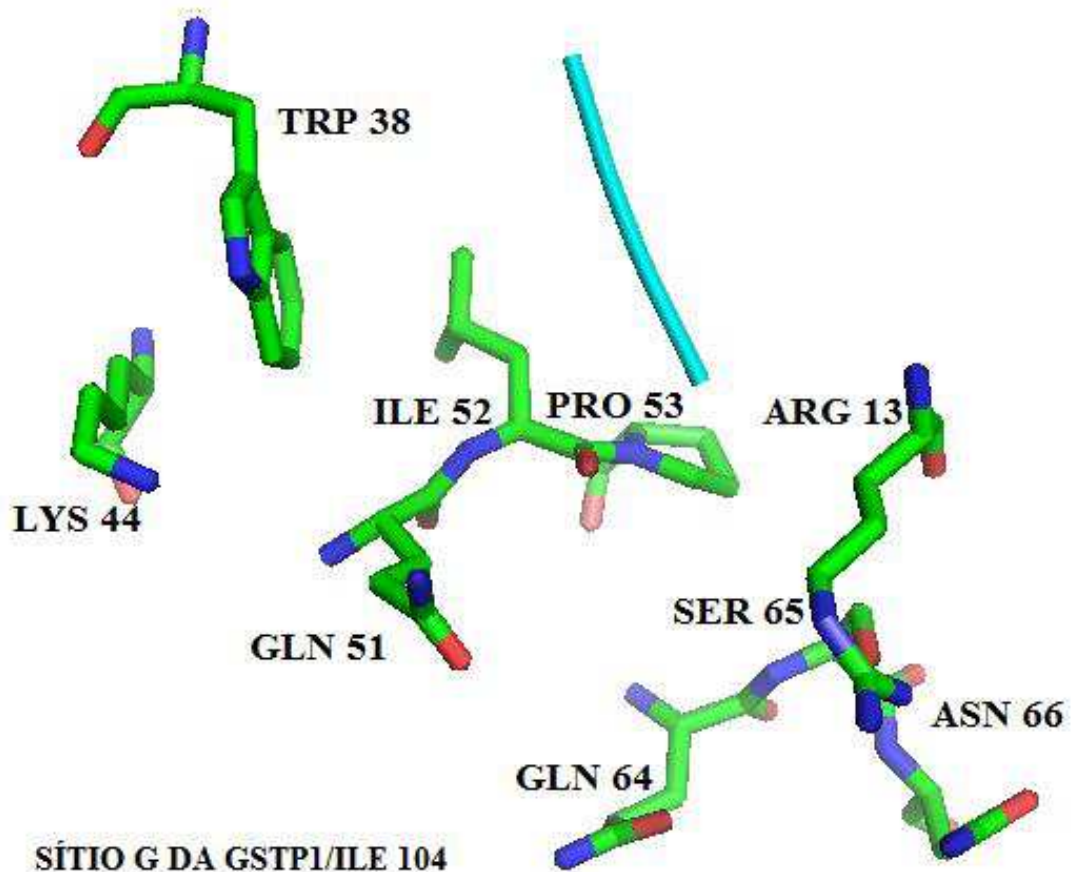
Os testes com o NBDHEX revelaram que este inibidor de fato interage com a GSTP1/Ile 104, mas que a sua atuação se limita aos resíduos componentes do sítio G. As interações intermoleculares observadas evidenciam o exposto. Este fato comprova que o NBDHEX pode servir de base para o desenvolvimento de uma ligante mais eficaz na inibição das atividades desenvolvidas pelas GSTP1/Ile 104. Concordando com o relato de Federici (2009), ele afirma que a porção hexanol do NBDHEX é fracamente envolvida na proteína

receptora e sugere modificações na mencionada parte da molécula com o intuito de possibilitar uma forte interação com os resíduos do último sítio citado.

5.3.2.3 Docking molecular entre a GSTP1-1/Ile104 e o inibidor RBT15

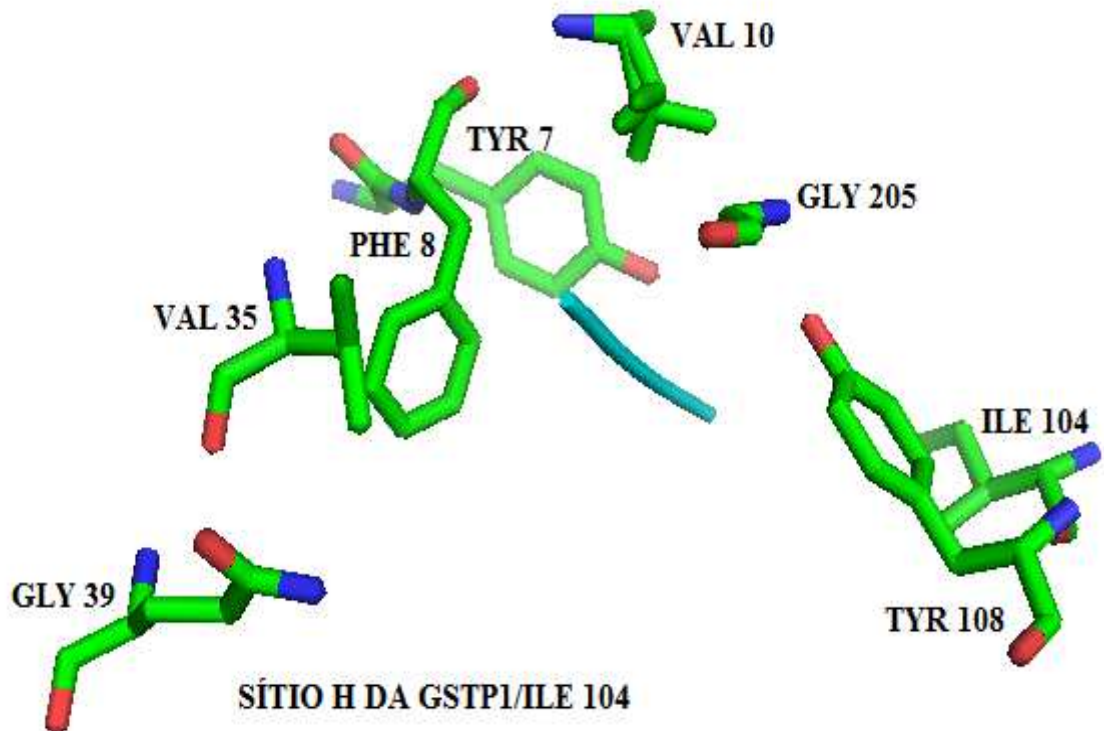
O complexo de melhor solução obtido entre a GSTP1/Ile 104 e o inibidor RBT15 apresentou energia de ativação de -311,32. O RBT15 modelado se posicionou centralmente aos resíduos que compõe o sítio G (Figura 22).

Figura 22: Interação do inibidor RBT15 (em azul) com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ile104.



O tripeptídeo planejado neste estudo, diferentemente dos dois inibidores anteriormente mencionadas, se direcionou no centro do subsítio H da GSTP1/ Ile 104 o que permite a interação deste inibidor com os resíduos formadores deste sítio (Figura 23).

Figura 23: Interação do inibidor desenvolvido (em azul) com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ile104.



Pode-se perceber que o ligante desenvolvido interagiu com resíduos que compõem o sítio ativo da GSTP1/Ile 104. Dessa maneira, é possível que a estrutura desenvolvida possa ser eficaz na inibição das atividades desta enzima nas células do câncer.

As interações intermoleculares observadas mostraram que os aminoácidos Arg 13, Trp 38, Gln 51, componentes do subsítio G, Tyr 7, Phe 8, Val 10, Val 35, Ile 104 e Tyr 108, pertencentes ao subsítio H, formam ligações hidrofóbicas com o ligante em questão. Assim como, resíduos do subsítio G (Arg 13, Trp 38, Gln 51) e do subsítio H (Tyr 7, Tyr 108 e Gly 205) formam ligações de hidrogênio com este inibidor (Tabela 6). Essas informações observadas evidenciam a relação do tripeptídeo desenvolvido com os aminoácidos que compõem os dois subsítios da GSTP1/ Ile 104.

Tabela 6: Interações intermoleculares apresentadas pelo complexo entre o inibidor RBT15 e a GSTP1/Ile 104

Resíduos do inibidor	Resíduos da GSTP1/Ala 104	Interação Intermolecular	Distância (Å)
■	Gly 205*	Hidrofóbica	-
	Phe 8*	Hidrofóbica	-
	Pro 202	Hidrofóbica	-
	Val 10*	Hidrofóbica	-
	Val 35*	Hidrofóbica	-
	Asn 204	Hidrofóbica	-
	Tyr 108*	Ligação de Hidrogênio	3,42
	Gly 205*	Ligação de Hidrogênio	4,34
■	Trp 38*	Hidrofóbica	-
	Phe 8*	Hidrofóbica	-
	Gln 51*	Hidrofóbica	-
	Tyr 7*	Hidrofóbica	-
	Gln 51*	Ligação de Hidrogênio	4,33
	Leu 52*	Ligação de Hidrogênio	4,4
	Trp 38	Ligação de Hidrogênio	3,87
■	Arg 13*	Hidrofóbica	-
	Ile 104*	Hidrofóbica	-
	Arg 100	Hidrofóbica	-
	Tyr 108*	Hidrofóbica	-
	Asn 204	Hidrofóbica	-
	Arg 100	Hidrofóbica	-
	Tyr 7*	Hidrofóbica	-
	Arg 13*	Ligação de Hidrogênio	2,63
	Tyr 108*	Ligação de Hidrogênio	4,45
	Tyr 7*	Ligação de Hidrogênio	4,27

* Resíduos que formam o subsítio G ou H da GSTP1/Ile 104

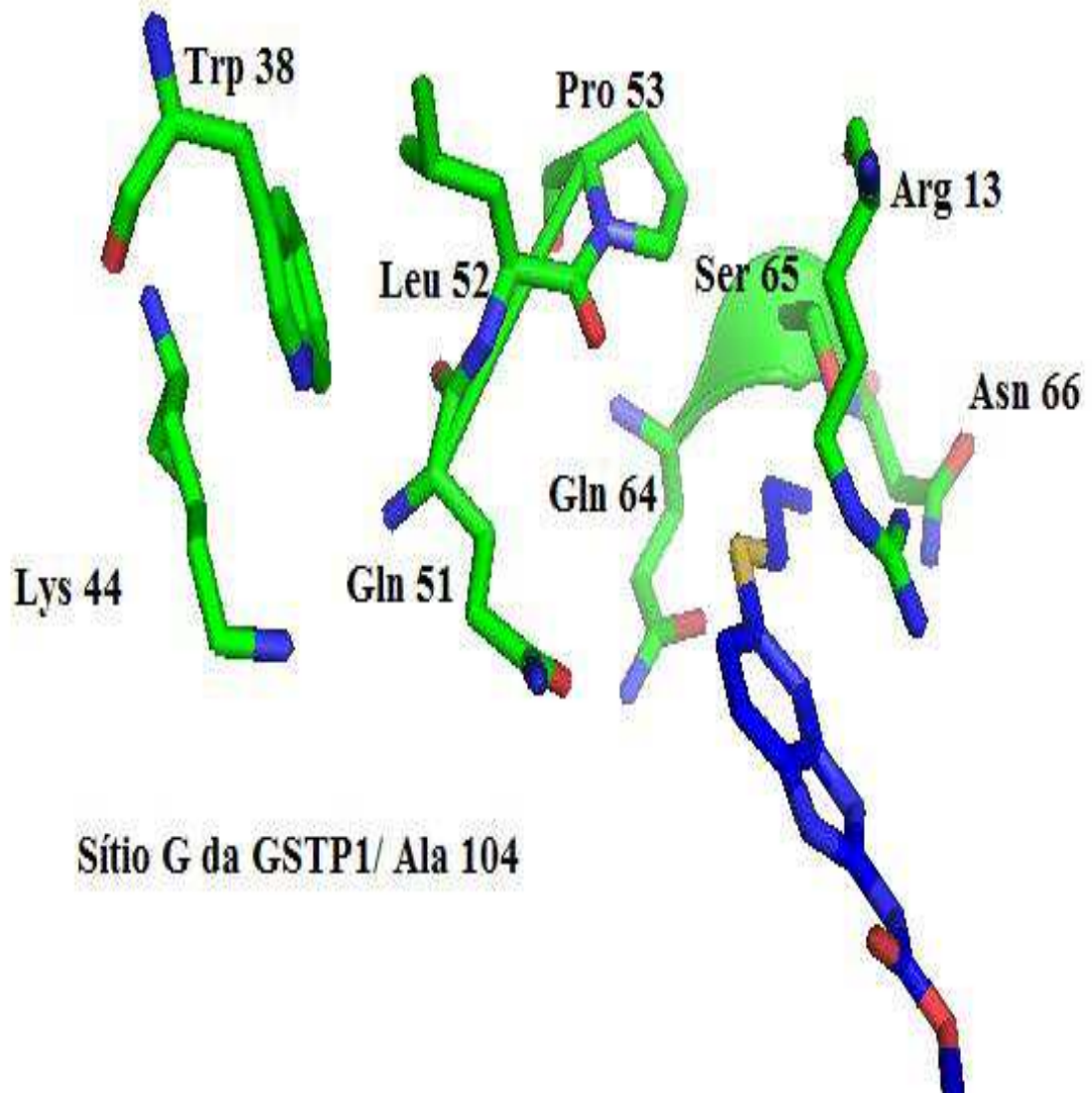
Foram calculadas apenas as distâncias entre os resíduos que apresentam ligações de hidrogênio

Os dados analisados evidenciam que o tripeptídeo desenvolvido interage de maneira mais promissora com a GSTP1/Ile 104 que os outros dois inibidores investigados. Dessa forma, o RBT15 ligante se mostra mais promissor no intuito de causar inibição desta enzima que está relacionada com a resistência de células a quimioterápicos.

5.3.2.4 Docking Molecular entre a GSTP1 Ala 104 e o albendazol

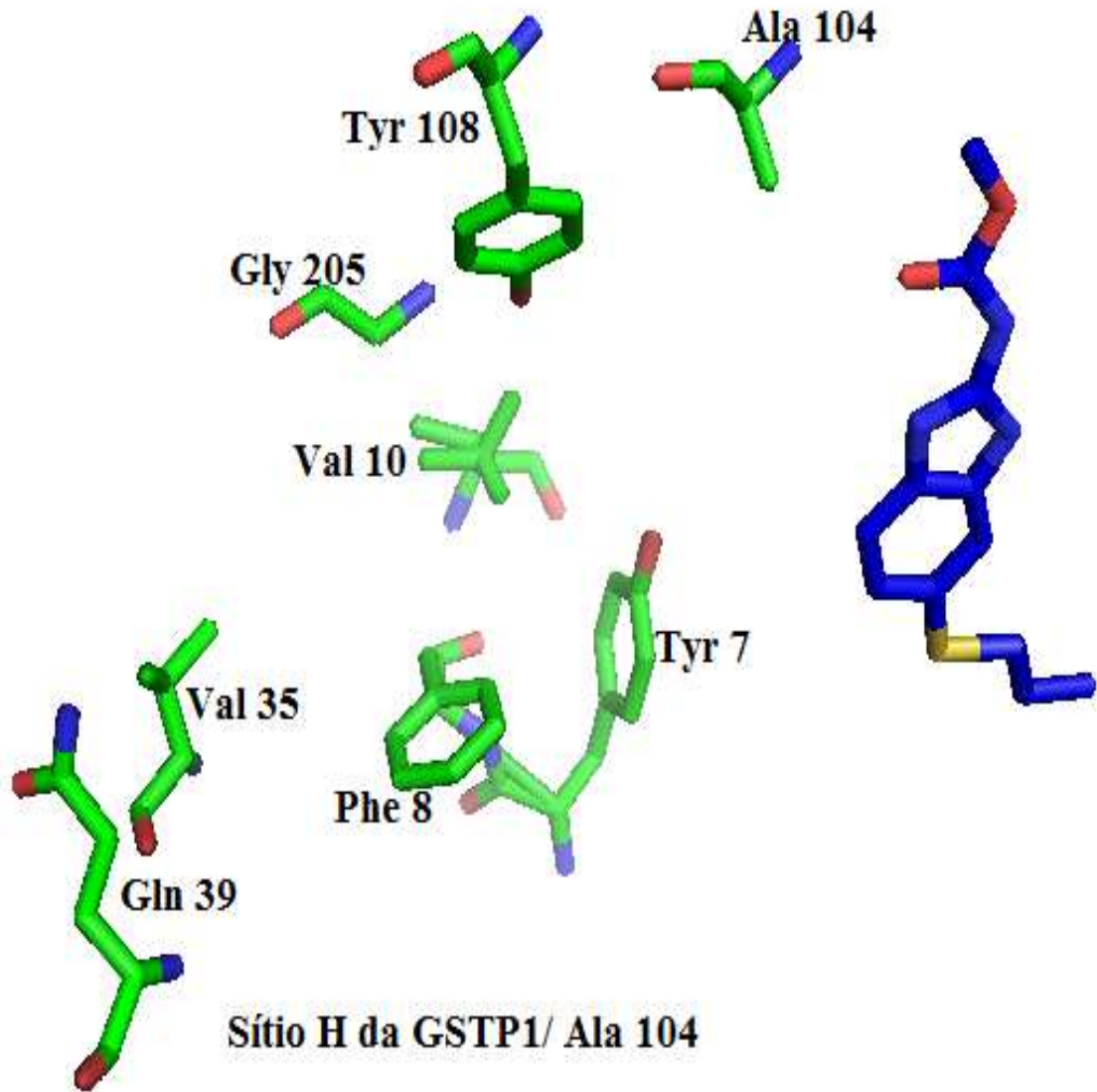
O docking molecular realizado entre o albendazol e a GSTP1/ Ala 104 resultou no complexo com energia de -195,31 como o de melhor solução. A observação da interação mostra que o albendazol se posiciona lateralmente e interage apenas com resíduos pertencentes ao sítio G (Figura 24).

Figura 24: Interação do abendazol (em azul) com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ala 104.



Analisando a imagem da interação do ligante com os resíduos que compõem o sítio H das GSTP1/ Ala 104 observa-se que o albendazol se direciona lateralmente ao sítio e não demonstra interagir com nenhum dos resíduos pertencentes a este local (Figura 25).

Figura 25: Interação do albendazol (em azul) com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104.



As interações intermoleculares identificadas comprovam que dentre os resíduos pertencentes aos subsítios G e H, que compõem o sítio ativo das GSTP1/Ala 104, o albendazol interagiu com os resíduos Arg 13, Gln 51, Gln 64, Ser 65 e Asn 66, todos pertencentes ao sítio G da GSTP1. Todos os aminoácidos citados apresentaram interação do tipo hidrofóbica com a proteína. Além disso, Arg 13 e Gln 64 também proporcionaram ligação de hidrogênio (Tabela 7).

Tabela 7: Interações intermoleculares identificadas no complexo formado entre a GSTP1/ Ala 104 e o albendazol.

Resíduos da GSTP1/ Ala 104	Interação Intermolecular	Distância (Å)
Cys 101	Hidrofóbica	-
Arg 13	Hidrofóbica	-
Ser 65	Hidrofóbica	-
Gln 64	Hidrofóbica	-
Asp 98	Hidrofóbica	-
Gln 51	Hidrofóbica	-
Asn 66	Hidrofóbica	-
Glu 97	Hidrofóbica	-
Glu 97	Ligação de hidrogênio	3,07
Arg 13	Ligação de hidrogênio	3,40
Cys 101	Ligação de hidrogênio	2,40
Gln 64	Ligação de hidrogênio	3,34

Foram calculadas apenas as distâncias entre os resíduos que apresentam ligações de hidrogênio

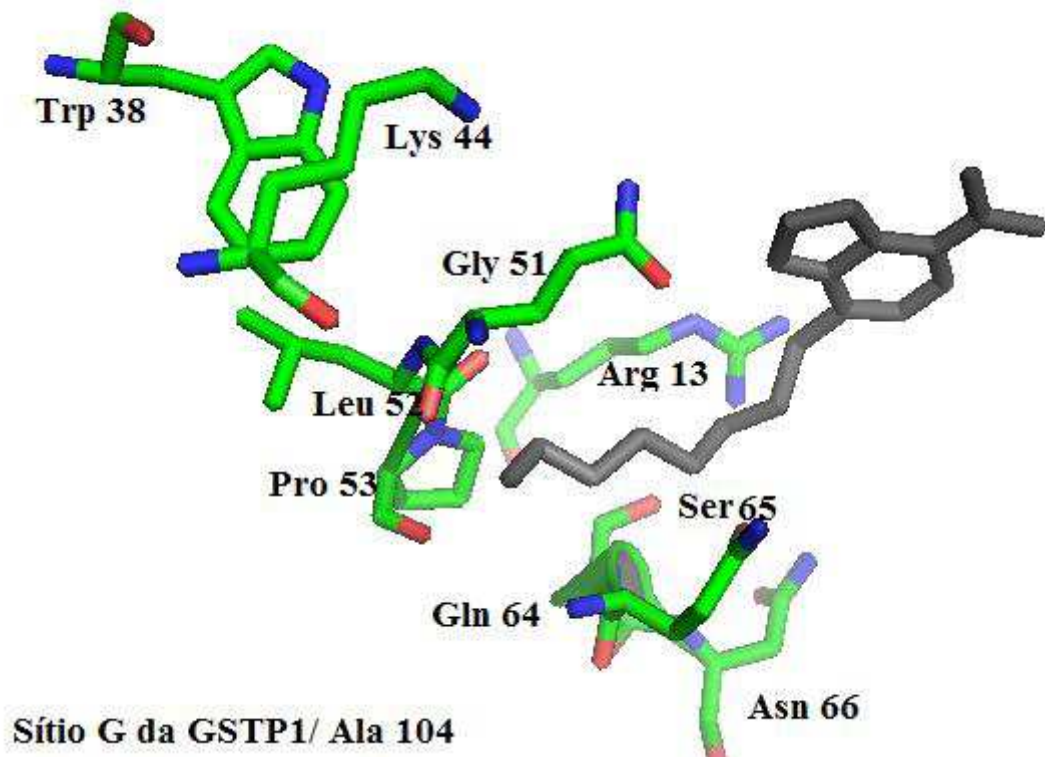
Apesar do ligante em questão apresentar relação com a referida enzima, o mesmo interage apenas com alguns resíduos do sítio G da GSTP1/Ala 104. Os aminoácidos que compõem o sítio H não demonstram ligação com o albendazol. Dessa forma, essa molécula pode servir de modelo para o desenvolvimento de estruturas mais eficazes na inibição da atividade biológica desenvolvida por esta proteína no desenvolvimento de células cancerígenas.

5.3.2.5 Docking Molecular entre a GSTP1 Ala 104 e o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX)

O Docking efetivado entre GSTP1 Ala 104 com o NBDHEX resultou em um complexo com energia de -197,98 como o de melhor solução. O ligante se direcionou de

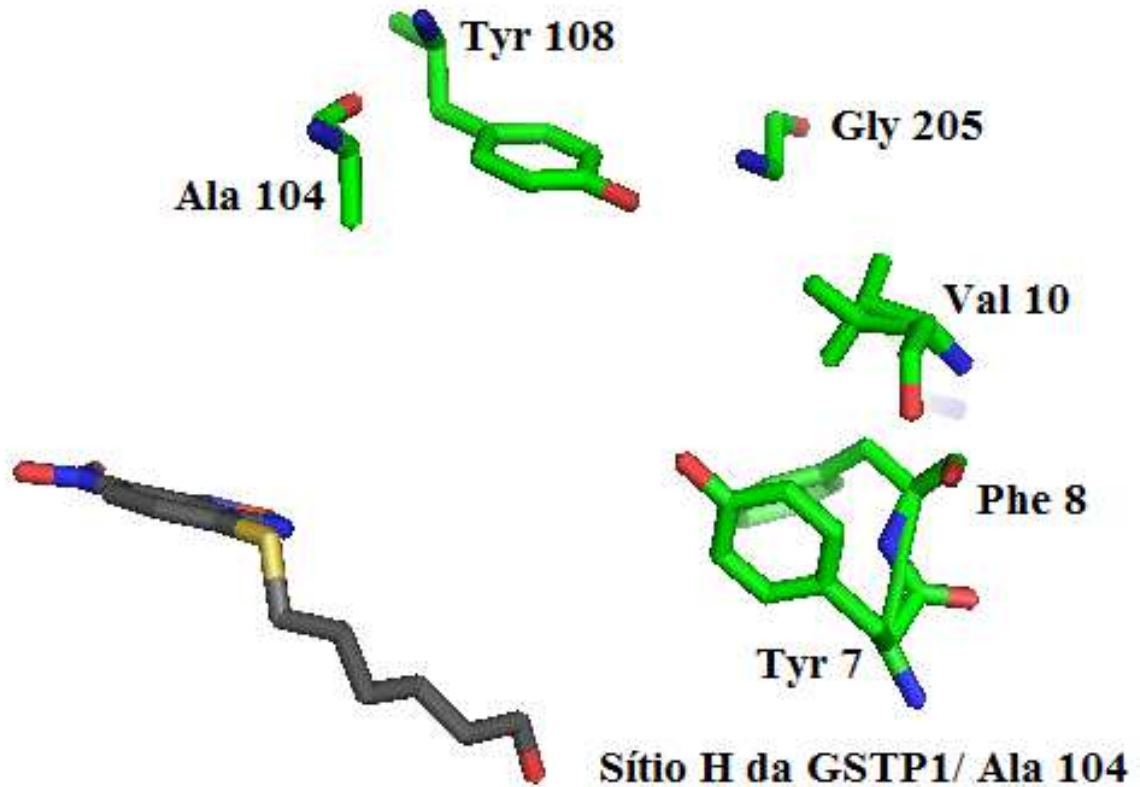
forma a permitir pouca interação do anel 7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole com os resíduos do subsítio G do receptor (Figura 26).

Figura 26: Interação do NBDHEX (em cinza) com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104.



O inibidor se posicionou de maneira relativamente distante dos aminoácidos que arranjam o sítio H, sugerindo não apresentar atividade inibitória sobre este local de interação da enzima com diversas substâncias tóxicas para o organismo humano (Figura 27).

Figura 27: Interação do NBDHEX (em cinza) com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104



Os aminoácidos Pro 53, Gln 64 e Ser 65 apresentaram interação do tipo hidrofóbica com o inibidor. Além desta, apresentaram ligação de hidrogênio Arg 13, Gln 51, Leu 52, Pro 53 e Gln 64. Todos os resíduos mencionados pertencem ao subsítio G, local específico de ligação desta enzima com a glutathiona (Tabela 8).

Tabela 8: Interações intermoleculares identificadas no complexo formado entre a GSTP1/ Ala 104 e o 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio) Hexanol (NBDHEX).

Resíduos da GSTP1/ Ile 104	Interação Intermolecular	Distância (Å)
Cys 101	Hidrofóbica	-
Lys 102	Hidrofóbica	-
Asp 98	Hidrofóbica	-
Gln 64	Hidrofóbica	-
Ser 65	Hidrofóbica	-
Pro 53	Hidrofóbica	-
Arg 13	Ligação de hidrogênio	2,98
Gln 51	Ligação de hidrogênio	3,40
Glu 67	Ligação de hidrogênio	3,43
Asp 98	Ligação de hidrogênio	3,11
Lys 102	Ligação de hidrogênio	3,29
Leu 52	Ligação de hidrogênio	3,20
Gln 64	Ligação de hidrogênio	3,38
Pro 53	Ligação de hidrogênio	2,48

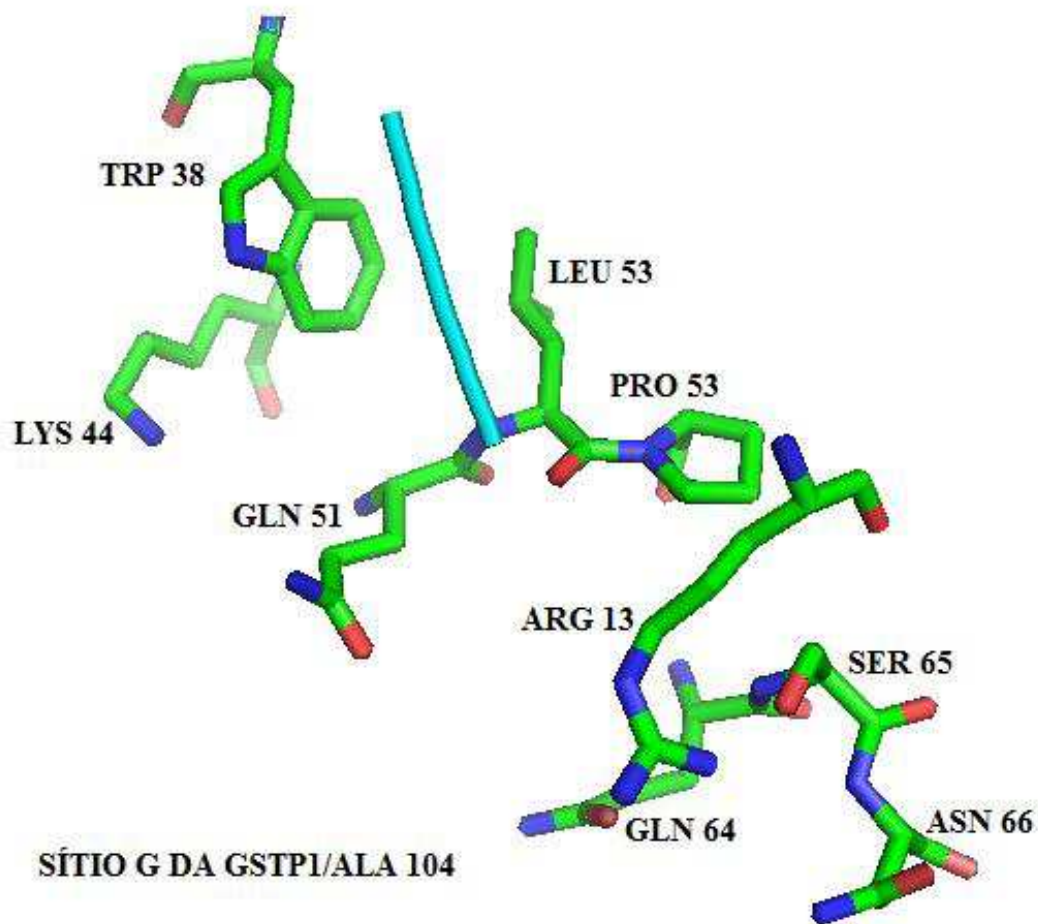
Foram calculadas apenas as distâncias entre os resíduos que apresentam ligações de hidrogênio

Apesar do NBDHEX apresentar interação com a GSTP1/Ala 104, os dados obtidos mostram que o ligante interage apenas com resíduos do sítio G. O referido inibidor não demonstra se relacionar com os resíduos do sítio H. Conforme Federici (2009), quando afirma que a mutação na GSTP1 Ile104Ala é suficiente para causar uma alteração considerável na posição do NBDHEX dentro do sítio H. Como também, o mesmo autor menciona que a afinidade diferencial deste ligante por diferentes isoformas das GSTs pode ser utilizada para o desenvolvimento racional de novas moléculas com aumento da afinidade e especificidade para GSTP1-1.

5.3.2.6 Docking Molecular entre a GSTP1 Ala 104 e o inibidor RBT15

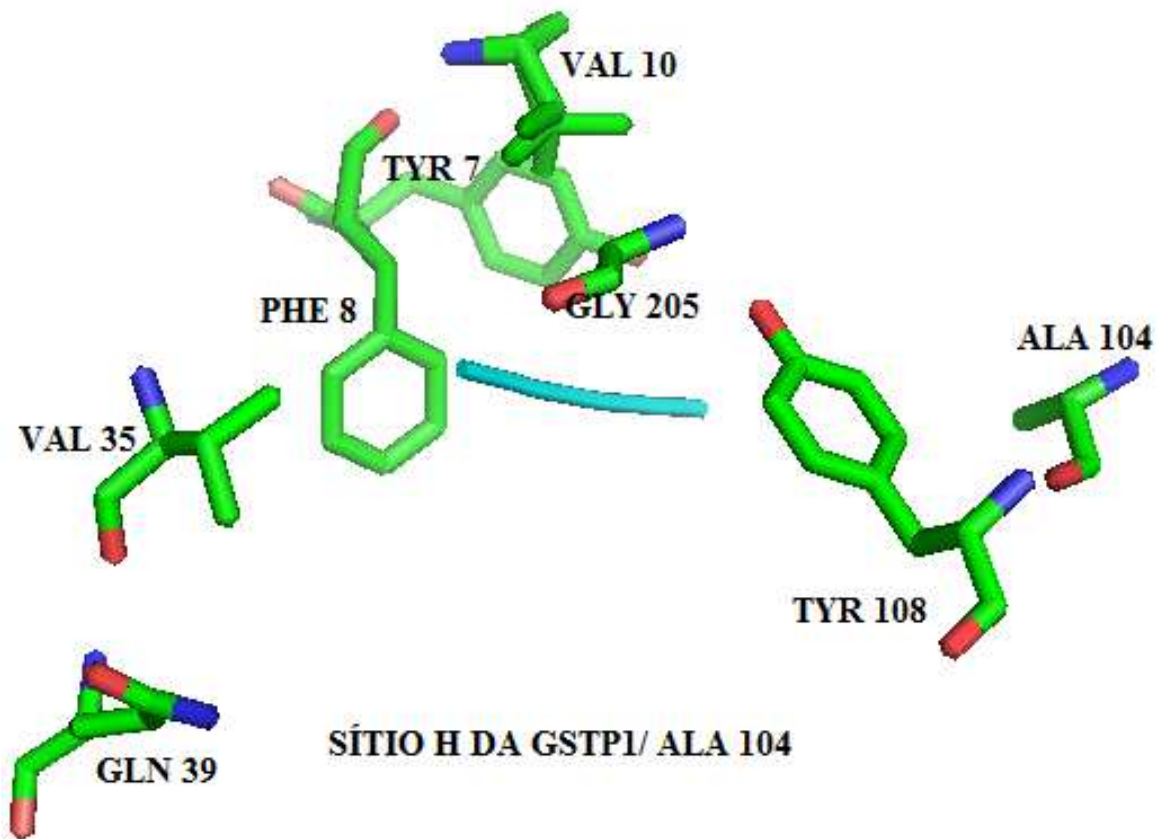
O docking entre o RBT15 e a GSTP mutada por alanina na posição 104 apresentou como melhor solução o complexo de energia livre de -319,07. Foi observado que o posicionamento do inibidor permite interação com os resíduos que formam o sítio G desta proteína (Figura 28).

Figura 28: Interação do inibidor (em azul) com os resíduos do sítio G da GSTP1/Ala 104.



A visualização do complexo obtido mostra que o RBT15 se coloca em situação que permitir a interação do mesmo com aminoácidos que compõem o sítio H da GSTP1/ Ala 104 (Figura 29).

Figura 29: Interação do inibidor (em azul) com os resíduos do sítio H da GSTP1/Ala 104.



As relações intermoleculares observadas mostram que os aminoácidos Arg 13, Trp 38, Gln 51 (componentes do subsítio G), Tyr 7, Phe 8, Val 10, Val 35, Ala 104, Tyr 108 e Gly 205 (resíduos do sítio H) apresentam interações hidrofóbicas com o presente inibidor. Além disso, apresentam ligação de hidrogênio com o tripeptídeo: Tyr 7 (único pertencente ao sítio H), Arg 13, Gln 51, Leu 52 e Pro 53 (Tabela 9).

Tabela 9: Interações intermoleculares apresentadas no complexo obtido no docking molecular entre o inibidor e a GSTP1/ Ala 104

Resíduos do inibidor RBT15	Resíduos da GSTP1/Ala 104	Interação Intermolecular	Distância (Å)
■	Gly 205*	Hidrofóbica	-
	Pro 9	Hidrofóbica	-
	Phe 8*	Hidrofóbica	-
	Pro 202	Hidrofóbica	-
	Val 10*	Hidrofóbica	-
	Val 35*	Hidrofóbica	-
	Leu 52*	Ligação de Hidrogênio	2,39
	Pro 53*	Ligação de Hidrogênio	3,03
	Cys 47	Ligação de Hidrogênio	3,07
	Tyr 49	Ligação de Hidrogênio	2,44
■	Tyr 108*	Hidrofóbica	-
	Trp 38*	Hidrofóbica	-
	Phe 8*	Hidrofóbica	-
	Gln 51*	Hidrofóbica	-
	Tyr 7*	Hidrofóbica	-
	Gln 51*	Ligação de Hidrogênio	2,89
	Leu 52*	Ligação de Hidrogênio	3,32
	Tyr 7*	Ligação de Hidrogênio	3,3
■	Arg 13*	Hidrofóbica	-
	Ala 104*	Hidrofóbica	-
	Arg 100	Hidrofóbica	-
	Cys 101	Hidrofóbica	-
	Lys 102	Hidrofóbica	-
	Arg 180	Hidrofóbica	-
	Arg 13*	Ligação de Hidrogênio	2,3
	Leu 52*	Ligação de Hidrogênio	4,38
	Gln 51*	Ligação de Hidrogênio	4,46

* Resíduos dos subsítios G ou H da GSTP1.

Foram especificadas apenas as distâncias das ligações de hidrogênio.

As interações intermoleculares observadas evidenciam que o inibidor interage com resíduos dos dois subsítios da GSTP1/Ala 104. Demonstrando que o tripeptídeo pode ser capaz de coibir a atividade biológica exercida por esta enzima.

A molécula desenvolvida, diferentemente dos outros inibidores estudados, apresentou interação com os dois subsítios que compõem o sítio ativo da GSTP1/ Ala 104. O que evidencia que o RBT15 deve ser mais eficiente para inativar as funções desta enzima relacionadas com a resistência de células a quimioterápicos usados para tratamento do câncer.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O inibidor RBT15 desenvolvido neste trabalho é um tripeptídeo composto por [REDACTED], [REDACTED] e [REDACTED]. Desenvolvido em configuração nativa a partir de proteínas ativas, portanto não sofrendo nenhum processo de modelagem molecular.

Os testes de docking molecular realizado com as três proteínas, midkina, GSTP1-1/Ile 104 e GSTP1-1/Ala 104, evidenciaram que o inibidor planejado RBT15 é energeticamente mais favorável que os outros dois inibidores analisados, o albendazol e o NBDHEX, que serviram de molde para elaboração do peptídeo.

O ligante RBT15 demonstrou interação com um maior número de resíduos que compõem os sítios ativos tanto da MK quanto das GSTP1 quando comparado com os outros dois ligantes analisados.

Os dados obtidos sugerem que a molécula desenvolvida neste trabalho pode vir a ser um potencial inibidor das proteínas Mk e GSTP1-1. Sendo, por esse motivo, uma promissora molécula para o desenvolvimento de fármacos mais eficazes e menos danosos para o tratamento de vários tipos de tumores.

O desenvolvimento de um tripeptídeo para o tratamento do câncer é uma estratégia bastante promissora para a indústria farmacêutica. Porém, testes estudos adicionais são necessários para certificar o real potencial inibitório da molécula projetada.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D. J. X-ray crystallography and drug design. In: Perun, T. J. & Propst, C. L. (eds) **Computer-aided drug nodelign: methods and applications**. Marcel Dekker, New York. 1989.
- ALMEIDA, J. *Estudos de modelagem molecular e relação estrutura-atividade da acetilcolinesterase e inibidores em Mal de Alzheimer*. (2011). Dissertação de mestrado (Mestrado em Física Biológica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto, 2011.
- ALMEIDA, S. M. V. *et. al.* Compostos coordenados híbridos de platina no tratamento do câncer. *Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada*, n.35, v.3, p. 337-345. 2014.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYRERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410. 1990.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389–3402. 1997.
- ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOOP, J.; SCHWEDEL, T. The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modeling. **Bioinformatics**, v. 22, p. 195-201. 2006.
- BARREIRO, E. J.; RODRIGUES, C. R. ALBUQUERQUE, M. G.; SANT’ANA, C. M. R.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem molecular: uma ferramenta para o planejamento racional de fármacos em química medicinal. **Química Nova**, v. 20. 1997.
- BATES, P.; KELLEY, L.; MACCALLUM, R.; STERNBERG, M. Enhancement of Protein Modelling by Human Intervention in Applying the Automatic Programs 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 45, p. 39-46. 2001.
- BERG, J. M; TYMOCZKO, J. L; STREYER L. tradução de Biochemistry, 6ed. [reimpr] – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1113 p. 2010.
- BERMAN, H. M. The Protein Data Bank: a historical perspective. **Acta cryst.** v. A64, p. 88-95. 2008.
- BERMAN, H. M.; KLEYWEGT, G. J.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. The future of the protein data bank. **Biopolymers**. v. 99(3), p. 218-22. 2012.
- BERMAN, H. M.; KLEYWEGT, G. J.; NAKAMURA, H.; MARKLEY, J. L. The Protein Data Bank at 40: reflecting on the past to prepare for the future. **Structure**. v. 20(3), p. 391-6. 2012.

- BUTS, L.; DAO-THI, M. H.; LORIS, R.; WYNS, L.; ETZLER, M.; HAMELRYCK, T. Weak protein–protein interactions in lectins: The crystal structure of a vegetative lectin from the legume *Dolichos biflorus*. **J. Mol. Biol.**v. 309, p. 193–201. 2001.
- CAPELOZZI, V. L. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. v. 35, n. 4, p. 375-382. 2009.
- COLOMBO, J. & RAHAL P. Alterações genéticas de câncer de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 55, n. 2, p. 165-174. 2009.
- COSTA, R. R. S. A. (2011). *Influência dos polimorfismos das glutathione s-transferases, nos genes gsta1 e gstp1, na resposta à terapia do cancro da mama*. 76 f. Dissertação (Mestrado em Oncologia) - Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto – IPOPORTO. 2011.
- DEVES, Candida (2013). *Caracterização bioquímica da enzima timidina fosforilase humana como alvo para o desenvolvimento racional de novos candidatos a fármacos para a quimioterapia do câncer*. 166f. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre. 2013.
- DIAS, R. & DE AZEVEDO JR, W. F. Molecular Docking Algorithms. **Current Drug Targets**. v.9, p. 1040-1047, 2008.
- DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. Crystallization of Nucleic Acids and Proteins (A Practical Approach). **Oxford University Press**. 1992.
- FEDERICI, L. *et al.* Structural Basis for the Binding of the Anticancer Compound 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio)Hexanol to Human Glutathione S-Transferases. *Cancer Res*. v. 69, n. 20, p. 8025-8034, outubro. 2009.
- FEDERICI, L.; STERZO C. L. *et al.* Structural Basis for the Binding of the Anticancer Compound 6-(7-Nitro-2,1,3-Benzoxadiazol-4-Ylthio)Hexanol to Human Glutathione S-Transferases. *Cancer Res*, v. 69, p. 8025-8034. 2009
- FIGUEIREDO, J. E. F.; ROCHA, W. D.; BENEDITO, V. A.; COELHO, V. T. S. **Estudos de modelagem molecular por homologia para análise genômica funcional**. Comunicado técnico – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Sete Lagoas, MG. Novembro de 2005.
- FONTES, A. P. S.; CÉSAR, E.T.; BERALDO H. A Química Inorgânica na Terapia do Câncer. *Cadernos Temáticos da Química Nova na Escola*. n.6, p.13-17, julho. 2005.
- FREITAS, L. C. G. Prêmio Nobel de Química 1998. **Química Nova na Escola**, n. 8, p. 3-6, 1998.
- GATÁS, J. F. G.; MARCO, S.; FILHO, V. W. Genética, biologia molecular e ética: as relações trabalho e saúde. *Ciência e Saúde Coletiva*, v. 7, p. 159-167, 2002.

- GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. Editores responsáveis Joel G. Hardman, Lee E. Limbird; editor-consultor, Alfred Goodman Gilman; (tradução da 10 ed. Original, Carla de Mello Voesace, et al. revisão técnica, Almir Lorenço da Fonseca) – Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.
- GUEX, N. & PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714–2723. 1997.
- GUNGOR, C.; et. al. Notch Signaling Activated by Replication Stress–Induced Expression of Midkine Drives Epithelial–Mesenchymal Transition and Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Cancer Res*, v. 71. p. 5009–5019. 2011
- HAO H.; Maeda Y.; Fukazawa T. et. Al. Inhibition of the Growth Factor MDK/Midkine by a Novel Small Molecule Compound to Treat Non-Small Cell Lung Cancer. *Japão: National Cancer Center*, v. 8, p. 1-8. 2013.
- HAYES, J. D.; FLANAGAN, J. U.; JOWSEY, I. R. Glutathione Transferases. *Revista de Pharmacologia e Toxicologia*, v. 45, p.51-88. 2005.
- HENDERSON, C. J. ; et. al. Increased Skin Papilloma Formation in Mice Lacking Glutathione Transferase GSTP. *Cancer Research*, 71(22),p. 7048-7060. 2011
- HONG, Y. C; et al. Gene-Smoking Interaction on Ischemic Stroke: Case-Control Study of Glutathione S-Transferase Polymorphism. *Coreia: Korean J Stroke*, v. 14, p. 67-73. 2012
- INCA (Instituto Nacional de Câncer). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2014.
- JANKOVA, L.; et. al. Glutathione S-transferase Pi expression predicts response to adjuvant chemotherapy for stage C colon cancer: a matched historical control study. *BMC Cancer*, 12:196, p. 2- 9. 2012.
- JARDIM, B. V. (2011). *Avaliação da glutathione e suas enzimas como marcadores prognósticos e preditivos do câncer*. 92f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. 2011.
- JEMAL, A; BRAY, F. *et. al.* Global Cancer Statistics. *Atlanta: a Cancer Journal for Clinicians*, v. 61, nº 2, p. 69-90, 2011.
- JOHANSSON, A. S.; STENBERG, G. *et. al.* Structure Activity Relationships and Thermal Stability of Human Glutathione Transferase P1-1 Governed by the H-site Residue 105. *Uppsala: J. Mol. Biol.* v. 278, p. 687 – 698. 1998
- KADOMATSU, K. The midkine family in cancer, inflammation And neural development. *Nagoya: J. Med. Sci.*, p. 67. 71 ~ 82. 2005
- KADOMATSU, K.; MURAMATSU, T. Midkine: an emerging target of drug development for treatment of multiple diseases. *British Journal of Pharmacology*, v. 171, n. 4, p. 811-813. 2014.
- KANWAL, R.; et. al. Protection Against Oxidative DNA Damage and Stress in Human Prostate by Glutathione S-Transferase P1. *MOLECULAR CARCINOGENESIS*, v. 53p. 8 – 18. 2014

- KENDREW, J.C.; BODO, G.; DINTZIS, H. M.; PARRISH, R. G.; WYCKOFF, H.; PHILLIPS, D. C. A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. **Nature**. v. 181, p. 662-6. 1958..
- KIEFER, F.; KONSTANTIN, A.; KÜNZLI M.; BORDOLI L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 387-392. 2009.
- KISHIDA, S.; KADOMATSU, K. Involvement of midkine in neuroblastoma tumorigenesis. Nagoya: *British Journal of Pharmacology*, v. 171. p.896–904. 2013
- KISHIDA, S.; et al. Midkine Promotes Neuroblastoma through Notch2 Signaling. *Cancer Res*, v. 73 n°. 4, p. 1318-1327. 2013
- KOH, W. P.; et al. Glutathione S-transferase (GST) gene polymorphisms, cigarette smoking and colorectal cancer risk among Chinese in Singapore. *Carcinogenesis*, vol.32 n°.10, p.1507–1511. 2011
- KOSUGI, T; SATO, W. Midkine and the kidney: health and diseases. *Nephrol Dial Transplant*, v. 27, p. 16–21. 2012
- LAJUS, T. B. P. A utilização de inibidores de PARP na profilaxia e no tratamento do câncer de mama deficiente no gene BRCA1. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*. v. 9. n. 3, p. 252-256. 2010.
- LEITE, C. A. V. G. *et al.* Receptores tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. *Revista Brasileira de Oncologia Clínica*. v. 8, n. 29, p. 130-142, jul./set. 2012.
- LEONEL, C; et al. Expression of glutathione, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase pi in canine mammary tumors. *BMC Veterinary Research*, v. 49, p. 2-10. 2014
- LIM, J; et. al. Structure–function analysis of full-length midkine reveals novel residues important for heparin binding and zebrafish embryogenesis. *Singapura: Biochem. J.*, v. **451**, p. 407–415. 2013
- MCGINNIS, S.; MADDEN, T. L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v. 32, p. W20-W25, 2004.
- MEDEIROS, k. A. (2011). *Desenvolvimento e testes in vitro de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais*. 76 f. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Biologia Animal) – Universidade de Brasília. Brasília-DF. 2011.
- MELO, C. S. *et al.* Formas farmacêuticas poliméricas para a administração de peptídeos e proteínas terapêuticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. v. 33, n. 4, p. 469-477. 2012.
- MOREIRA, G.; PINTO, L.; CONCEIÇÃO, F. **Predição comparativa da estrutura tridimensional da lectina BVL-I**. XIX Congresso de Iniciação Científica, XII Encontro de Pós-Graduação, II Mostra Científica da UFPel. Pelotas- RS, 2010.

MURAMATSU, T. Midkine in Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine p. 2086-2088. John Wiley & Sons., Inc. New York, USA. 2002.

MURAMATSU, T. Midkine, a heparin-binding cytokine with multiple roles in development, repair and diseases Japão: Proc. Jpn. Acad, v. 86, p. 410-425. 2010

MUTALLIP, M.; NOHATA, N. *et al.* Glutathione S-transferase P1 (GSTP1) suppresses cell apoptosis and its regulation by *miR-133a* in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). Kagoshima: International Journal Of Molecular Medicine, v. 27, p. 345-352. 2011

NYGREN, P. *et al.* Repositioning of the anthelmintic drug mebendazole for the treatment for colon câncer. *Journal Cancer Res Clin Oncol*, v. 139, p. 2134-2140. 2013

OLIVEIRA, K. M. *et al.* Lapachol: um ligante versátil na síntese de novos potenciais metalofármacos fosfínicos de Ru(II). In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA (SBQ). 36. 2013.

OLIVEIRA, L. G; GOZZO, A. J; *et al.* Inibidores das proteases encontrados em sementes de *Caesalpinia echinata* (pau-brasil) – isolamento e caracterização do inibidor de tripsina.

PEREIRA, Elen Gomes. Estudo estrutural e termodinâmico de mutantes da proteína c- Abl resistentes ao Imatinib. Petrópolis, RJ: Laboratório Nacional de Computação Científica, 156 p. 2009.

PERES, L. A. B.; JÚNIOR, A. D. C. Nefrotoxicidade aguda da cisplatina: Mecanismos moleculares. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, v. 35, n. 4, p. 332-340. 2013.

PERUTZ, M. F.; ROSSMANN, M. G.; CULLIS, A. F.; MUIRHEAD, H.; WILL, G.; NORTH, A. C. Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. **Nature**. v. 185, p. 416-422. 1960.

PETER, K. *et al.* Albendazole sensitizes cancer cells to ionizing radiation. *Radiation Oncology*. v. 6, n. 160, p. 1-7. 2011.

PICCHI, D. G. *et al.* Peptídeos cíclicos de biomassa vegetal: características, diversidade, biossíntese e atividades biológicas. *Química Nova*, v. 32, n. 5, p. 1262-1277. 2009.

PINTO, L.; NAGANO, C.; OLIVEIRA, T.; MOURA, T.; SAMPAIO, A.; DEBRAY, H.; PINTO, V.; DELLAGOSTIN, O.; CAVADA, B. Purification and molecular cloning of a new galactose-specific lectin from *Bauhinia variegata* seeds. **Journal of Biosciences**, v.33, p. 355–363, 2008.

RAMALHINHO, A. C. M.; *et al.* Positive Association of Polymorphisms in Estrogen Biosynthesis Gene, CYP19A1, and Metabolism, GST, in Breast Cancer Susceptibility. *DNA AND CELL BIOLOGY*: v. 31, nº 6. 2012

RAZA, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: implications in oxidative stress, toxicity and disease. *Al Ain: The febs journal*, v. 278, p. 4243–425. 2011

RITCHIE, D. W. & KEMP, G. J. L. Protein docking using spherical polar Fourier correlations. **Proteins: Struct. Func. Genet.** v. 39, p. 178-194, 2000.

RITCHIE, D. W.; KOZAKOV, D.; VAJDA, S. Accelerating and Focusing Protein-Protein Docking Correlations Using Multi-Dimensional Rotational FFT Generating Functions. **Bioinformatics.** p. 1-10, 2008.

ROCHA, D. R.(2010) *Determinação do Polimorfismo da Enzima GSTP1 em Trabalhadores Expostos à Sílica e Associação com Silicose.* 78 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz. 2010.

ROCHA, W.R. Interações Intermoleculares. *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola*, n. 4, p. 31-36, maio. 2001.

ROST, B. Twilight zone of protein sequence alignments. **Protein Eng.**, v. 12, p. 85–94, 1999.

SANT'ANNA, C. M. R. Glossário de termos usados no planejamento de fármacos (recomendações da iupac para 1997). *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 505-512. 2002.

SANTOS, M. H. H. Detecção de Cardiotoxicidade Subclínica Induzida por Trastuzumabe em Portadoras de Câncer de Mama. *Sociedade Brasileira de Cardiologia*, v. 101, n. 1, p.2-3. 2013.

SANTOS, M.; SILVA, D. A. C.; PARANHOS, F. R. L. Conflito de interesses em ensaios clínicos iniciais envolvendo pacientes com neoplasia de pulmão. *Revista Bioética*, v. 22, n. 3, p. 500-508. 2014.

SAWADA, O. N. et. al. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. *Revista Escola Enfermagem USP*, Ribeirão Preto, v. 43, n. 3, p. 581-587. 2009.

SCOTTI, L.; et.al. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, vol. 43, n. 2, abr./jun. 2007.

SILVA, E. C. S.; et. al. Câncer de mama e qualidade de vida durante o tratamento radioterápico. *Cadernos de Graduação: Ciências Biológicas e da Saúde*, Recife, v. 1, n.3, p. 85-93, julho. 2014.

STEVANATTO, K. B. (2008). *Conflito de interesses em ensaios clínicos iniciais envolvendo pacientes com neoplasia de pulmão.* 72 f. Dissertação (Mestrado em Física Biomolecular) – Universidade de São Paulo – USP, São Carlos. 2008.

TAKAGAKI, T. Y. Avanços no tratamento do câncer pulmonar. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 31, n. 6, p. 6. 2005.

VALASTYAN, S; WEINBERG, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. *Cell 147*, Cambridge, 14 de outubro. 2011.

WESTBROOK , J.; FENG, Z.; CHEN, L.; YANG, H.; BERMAN, H. M. The Protein Data Bank and structural genomics. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, p. 489–491, 2003.

YU, L; FAN, Y.; *et. al.* Suppression of metastasis of human pancreatic cancer cells to the liver by small interfering RNA-mediated targeting of the midkine gene. *Oncology letters*, v. 6, p. 1338-1342. 2013

ANEXOS

ANEXOS

Estruturas tridimensionais das moléculas planejadas e analisadas até chegar ao tripeptídeo desenvolvido.

