



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

UBIRAJARA MOREIRA PAZ JÚNIOR

**DETECCÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
SELETIVA-INIBITÓRIA DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO NA ISOFORMA DA AKT-1
HUMANA**

FORTALEZA

2024

UBIRAJARA MOREIRA PAZ JÚNIOR

DETECÇÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
SELETIVA-INIBITÓRIA DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO NA ISOFORMA DA AKT-1
HUMANA

Dissertação de Pesquisa de Mestrado
apresentado ao Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Bioquímica. Área de concentração:
Bioquímica Vegetal

Orientador: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta

FORTALEZA

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P368d Paz Júnior, Ubirajara Moreira.

Detecção de compostos fitoquímicos com potencial atividade seletiva-inibitória dos sítios de ligação na isoforma da AKT-1 humana / Ubirajara Moreira Paz Júnior. – 2024.
65 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dr. Geancarlo Zanatta.

1. Compostos de origem vegetal. 2. Prospecção de inibidores proteicos. 3. Proteína AKT. 4. Câncer. I.
Título.

CDD 572

UBIRAJARA MOREIRA PAZ JÚNIOR

DETECÇÃO DE COMPOSTOS FITOQUÍMICOS COM POTENCIAL ATIVIDADE
SELETIVA-INIBITÓRIA DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO NA ISOFORMA DA AKT-1
HUMANA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará como requisito para a obtenção do grau de mestre em bioquímica. Área de concentração: Bioquímica Vegetal

Aprovado em: 29/02/2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Geancarlo Zanatta (Orientador)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Cleverson Diniz Teixeira de Freitas

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Jaqueline Carletti

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

A Deus
À minha família
À Ciência

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por auxiliar, proteger e mostrar os caminhos necessários para que eu conseguisse chegar a esta etapa valiosa da vida de um cientista.

À Natália, pela paciência, motivação, inspiração e auxílio em todos os momentos, inclusive nos mais difíceis.

Ao meu filho por me inspirar a ser cada vez mais um ser humano melhor.

Aos meus pais, em especial meu pai que partiu no início desta trajetória.

Agradeço principalmente ao Prof. Dr. Geancarlo Zanatta, pela paciência, educação, ensinamentos e vivências inspiradoras. A sua orientação foi uma bússola para mostrar a direção necessária nesta jornada intelectual. Este trabalho só foi possível de ser iniciado e trilhado graças ao senhor.

Ao grupo de estudos do Laboratório de biologia computacional, em especial à Francisca Fernanda, pelo acompanhamento nas técnicas aplicadas.

Ao meu compadre Neto e família, pela motivação, material de estudos, correção, ideias e impulsionamento. Por mim eu já colocaria obrigado pelo mestrado.

A todos os membros do programa de Bioquímica Vegetal da UFC.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro durante parte do mestrado.

À Universidade Federal do Ceará pelas oportunidades de desenvolvimento acadêmico e científico.

RESUMO

A proteína AKT está envolvida em diversos processos celulares metabólicos, em especial no processo de regulação de sobrevivência celular. Em sua forma ativa, promove a fosforilação de diversas proteínas envolvidas em fatores de multiplicação celular e inibe outras relacionadas com a apoptose. Quando hiper ativada, sobrecarrega a via de proliferação celular e pode produzir tumores. Ações como essas podem aumentar a resistência de diversos compostos que atuam na inibição do crescimento celular, como os quimioterápicos, tornando essa proteína um importante alvo terapêutico no desenvolvimento de tratamentos para o câncer. Este trabalho se debruça na análise específica da proteína AKT, em especial na isoforma 1 (AKT1), pois das três isoformas conhecidas é a mais explorada e está relacionada diretamente com neoplasias. Com o intuito de descobrir potenciais moléculas de origem vegetais que se liguem ao sítio ativo e promovam a inibição competitiva, avaliamos mecanismos existentes ao buscar dados cristalográficos relacionados com a AKT1 e produzimos modelos de boa resolução para testes com ferramentas computacionais diversas. Utilizamos softwares para identificar os estados conformacionais da proteína, comparamos todas as estruturas encontradas com as posições dos ligantes nos sítios catalíticos e a fim de descobrir os melhores modelos representativos para essa proteína, produzimos atracamento molecular simples e cruzado (*Self-Docking* e *Cross-Docking*). Encontramos 3 principais sítios de interação na AKT1: Sítio de homologia à plectrina (Sítio PH), sítio principal de atividade cinase (Sítio 1) e o sítio de interação proteína (Sítio 2). Os modelos que apresentaram melhor resultado de energia e de distância dos ligantes (RMSD) com os dados cristalográficos, seguiram para a etapa de triagem *Virtual*. Nessa etapa, utilizamos aproximadamente 1800 compostos de origem vegetal (COVs) depositados no banco de dados de produtos naturais brasileiros (NuBBEDB). Em suma, os resultados dos testes foram promissores, demonstrando ligações fortes e persistentes entre as moléculas estudadas. Encontramos 8 principais compostos, dentre flavonoides e terpenos, que possuíam as melhores energias de interações entre -11.7kCal e -10.9kCal. Esses compostos compartilham características com outras moléculas utilizadas em tratamentos de diversas patologias, que possuem baixo potencial tóxico. Portanto, a utilização das moléculas encontradas neste trabalho para testes mais específicos, podem favorecer o desenvolvimento de novos fármacos relacionados com a inibição competitiva do sítio ativo da AKT1.

Palavras-chave: câncer; prospecção de inibidores proteicos; compostos de origem vegetal.

ABSTRACT

The AKT protein is involved in various metabolic cellular processes, especially in the regulation of cell survival. In its active form, it promotes the phosphorylation of various proteins involved in cell multiplication factors and inhibits others related to apoptosis. When hyperactivated, it overloads the cell proliferation pathway and can produce tumors. Actions such as these can increase resistance to various compounds that act to inhibit cell growth, such as chemotherapy drugs, making this protein an important therapeutic target in the development of cancer treatments. This work focuses on the specific analysis of the AKT protein, especially isoform 1 (AKT1), since of the three known isoforms it is the most explored and is directly related to neoplasms. In order to discover potential molecules of plant origin that bind to the active site and promote competitive inhibition, we evaluated existing mechanisms by searching for crystallographic data related to AKT1 and produced models with good resolution for testing with various computational tools. We used software to identify the conformational states of the protein, compared all the structures found with the positions of the ligands in the catalytic sites and in order to discover the best representative models for this protein, we produced simple and cross molecular *Docking* (*Self-Docking* and *Cross-Docking*). We found 3 main interaction sites in AKT1: the pleckstrin homology site (PH site), the main kinase activity site (Site 1) and the protein interaction site (Site 2). The models that showed the best energy and ligand distance (RMSD) results with the crystallographic data went on to the *Virtual Screening* stage. At this stage, we used approximately 1800 compounds of plant origin (COVs) deposited in the Brazilian Natural Products Database (NuBBEDB). In short, the test results were promising, showing strong and persistent bonds between the molecules studied. We found 8 main compounds, including flavonoids and terpenes, which had the best interaction energies between -11.7kCal and -10.9kCal. These compounds share characteristics with other molecules used in the treatment of various pathologies, which have low toxic potential. Therefore, the use of the molecules found in this work for more specific tests may favor the development of new drugs related to the competitive inhibition of the AKT1 active site.

Keywords: cancer; prospecting for protein inhibitors; compounds of plant origin.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1	Estrutura da proteína AKT	11
2.2	Função e regulação da proteína AKT	12
2.3	Alterações da proteína AKT e o câncer	15
2.4	Bioinformática estrutural na prospecção de compostos com potencial anticâncer ..	16
3	OBJETIVOS	18
3.1	OBJETIVO GERAL	18
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4	ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	19
4.1	Obtenção das estruturas proteicas.....	20
4.2	Preparação das estruturas proteicas.....	21
4.3	Preparação para o <i>Docking Molecular</i>	22
4.4	<i>Self-Docking e Cross-Docking</i>	24
4.5	Triagem virtual	25
4.6	Análise estrutural dos resultados	26
5	MANUSCRITO DE ARTIGO	27
6	DISCUSSÃO DE RESULTADOS	49
7	CONCLUSÃO	51
8	PERSPECTIVAS	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A proliferação celular é regulada por diversas vias de sinalização, uma delas sendo a via PI3K-AKT-mTOR. Dentro desta via a Proteína Kinase B (PKB), também chamada de AKT ou Rac-Alpha possui papel de inibição da apoptose e de indução da multiplicação celular (YANG; PI; WANG, 2018). Sua ativação é mediada por dois distintos mecanismos de fosforilações na cauda C terminal. O primeiro envolve a fosforilação da serina 473 pela mTORC2, que induz uma interação entre a cauda C-terminal e o domínio PH-cinase, desalojando o domínio PH do domínio cinase e ativando a proteína. A segunda forma de ativação envolve a fosforilação dupla da serina 477 e treonina 479 por Cdk2/cyclinA, alterando sua forma por meio da interação com a alça de ativação e o domínio PH. Ambas as formas de ativação expõem sua região catalítica (sítio 1) e seu sítio de interação com proteínas (sítio 2), como a FOXO, BAD, TSC2, Mtor e AS160. A região catalítica está envolvida no processo de cinase, já as proteínas que interagem com o sítio 2 estão relacionadas diretamente com o processo de sinalização do glicogênio e crescimento ou morte celular. (CHU et al., 2018)

Sem fosforilações na cauda C, seu estado típico é na conformação auto inibida, onde os domínios PH e cinase interagem intramolecularmente. Existem 3 isoformas que apresentam grade homologia, entretanto, podemos observar a isoforma 3 mais relacionada com tecidos nervosos (CORRE et al., 2024). As AKT1 e AKT2 apresentam grande atividade em células principalmente as musculares, a grande diferença está na localização mais membranar da AKT2, envolvida com mecanismos de ativação de proteínas ligadas a insulina (ZHENG; CARTEE, 2016). A isoforma 1 está presente na maior parte das neoplasias (KRZEŚLAK; POMORSKI; LIPÍŃSKA, 2011; YANG; PI; WANG, 2018). Apesar destes mecanismos ainda não serem completamente compreendidos, a ativação da AKT está amplamente relacionada com crescimento celular e inibição da apoptose, uma vez que sua interação está diretamente conjugada a fatores de crescimento e sua presença abundante de forma ativa é encontrada em neoplasias, principalmente no câncer de mama. (GEORGE et al., 2022; HINZ; JÜCKER, 2019; PASCUAL; TURNER, 2019).

Em sua forma ativa, promove a fosforilação de diversas proteínas envolvidas em fatores de multiplicação celular e inibe outras relacionadas com a apoptose. Quando hiper ativada, sobrecarrega a via de proliferação celular e pode produzir tumores (CHEN et al., 2024). Ações como essas podem aumentar a resistência de diversos compostos que atuam na inibição do crescimento celular, como os quimioterápicos, tornando essa proteína um importante alvo terapêutico no desenvolvimento de tratamentos para o câncer. Inibidores da proteína AKT

demonstraram indução a apoptose de células tumorais após a regulação da via hiperativada (LI et al., 2023). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2020 foram diagnosticados cerca de 19,3 milhões de novos casos de câncer e ocorreram 10 milhões de mortes relacionadas à doença em todo o mundo (OMS, 2021). No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima-se que ocorrerão 625.000 novos casos de câncer em 2022 no país, sendo 298.000 em homens e 327.000 em mulheres. Além disso, a previsão é que ocorram cerca de 248.000 óbitos relacionados à doença no mesmo ano (INCA, 2021).

Diversos estudos se concentram no desenvolvimento de inibidores da AKT como possíveis agentes antitumorais (UKO et al., 2020). Infelizmente, até o presente momento, há apenas dois inibidores aprovados e eles apresentam limitações que comprometem a sua eficácia terapêutica. O Ipatasertib não possui uma especificidade e uma farmacocinética satisfatória, e o Capivasertib tem eficácia limitada pela resistência desenvolvida pelas células cancerígenas (LUBOFF; DEREMER, 2024).

Na busca por novas substâncias para que possam atuar como inibidores dessas enzimas, é interessante explorar fontes alternativas de baixo custo, visto que os inibidores conhecidos são na sua grande maioria de difícil acesso. Os produtos naturais surgem como uma fonte de diversas moléculas para o tratamento de patologias (LUBOFF; DEREMER, 2024). Pesquisadores ao redor do mundo já identificaram vários compostos de origem vegetal (COV), armazenando-os em bancos de dados (SALDÍVAR-GONZÁLEZ et al., 2019). Esses compostos são bastante diversificados, podendo oferecer arcabouços químicos com diversas atividades farmacológicas. Eles representam uma fonte promissora na busca por moléculas terapêuticas, possibilitando a descoberta de agentes mais eficazes e com menor toxicidade (MERESMAN; GÖTTE; LASCHKE, 2021). A exploração desses compostos vegetais abre caminho para a identificação de candidatos farmacológicos inovadores, contribuindo assim para avanços na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos.

Uma forma de prospectar moléculas com potenciais inibitórios é utilizando o atracamento molecular (*Molecular Docking*), ao tentar encaixar diversas moléculas depositadas em bancos de dados à proteína de interesse (SAIKIA; BORDOLOI, 2019). A utilização desta técnica para a busca de moléculas com afinidade ao sítio ativo da AKT, pode desvendar possíveis COV com potencial para ser utilizado em terapias contra o câncer. Na qual as moléculas com alta afinidade teórica de ligação com o alvo estudado são selecionadas por meio de análises *in silico*. Esta abordagem acelera o processo de descoberta de novos fármacos, uma vez que somente os compostos que apresentam bons resultados nas análises computacionais

seguem para as etapas de testes *in vitro* ou *in vivo* e, eventualmente testes clínicos (MUEGGE; BENTZIEN; GE, 2024).

Sabendo disto, este trabalho visa analisar as informações disponíveis da AKT1, que é a isoforma mais relacionada com os diversos tipos de câncer, e encontrar a partir de bancos de dados de origem vegetal, potenciais moléculas que tenham afinidade nos sítios da AKT1. Para tanto, foi utilizada a técnica de triagem *Virtual* com conjuntos conformacionais do alvo (em inglês, “ensemble *Docking*”), para testar os compostos de origem vegetal presentes no banco de dados de produtos naturais derivados de plantas e microrganismos nativos do Brasil - NuBBE (Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais) (PILON et al., 2017).

Discutiremos alguns detalhes da proteína AKT, como funções, regulação, estrutura, papéis metabólicos em processos celulares e sua desregulação associada a indivíduos com câncer. Além de ter sido investigado possíveis compostos promissores destinados à terapia direcionada na desregulação da proteína AKT.

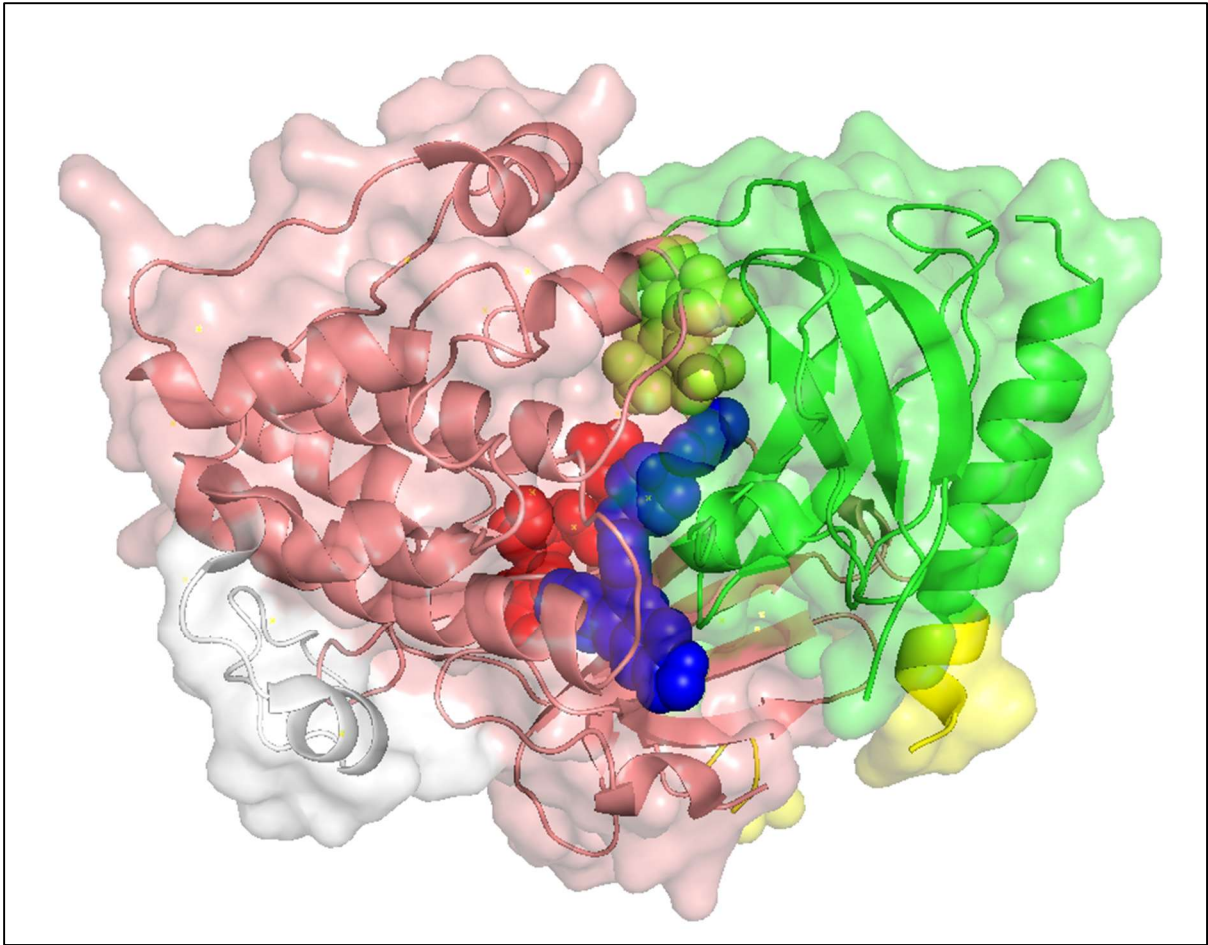
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estrutura da proteína AKT

Inicialmente a proteína AKT foi catalogada como uma estrutura relacionada ao retrovírus *Akhute Thymome*, AKT8 (Staal; Hartley, 1988). Pesquisas antigas já demonstravam preocupação relacionada a tumores envolvendo os genes ligados a AKT (Staal, 1987). Em seres humanos encontramos 3 isoformas dessa proteína, AKT1, AKT2 E AKT3 (Haslinger et al., 2013). Essas isoformas possuem homologia de sequência e estruturas de domínio semelhantes. Entretanto, suas funções são distintas, tendo suas concentrações em determinados locais relacionadas com funções específicas, como a AKT3 que se encontra em maior quantidade em tecidos nervosos (Corre et al., 2024). As AKT1 e AKT2 são encontradas principalmente em células musculares, onde a isoforma 2 tende a se comunicar com proteínas intermembranares ligas a via de sinalização da insulina, a grande diferença está na localização membranar da AKT2, envolvida com mecanismos de ativação de proteínas ligadas a insulina (ZHENG; CARTEE, 2016). Estudos de detecção proteica de tumores relatam presença persistente da AKT1 de forma ativa (KRZEŚLAK; POMORSKI; LIPÍŃSKA, 2011; YANG; PI; WANG, 2018). Sua ativação está relacionada com crescimento celular e inibição da apoptose, através da via metabólica da PI3K-AKT-mTOR e sua presença abundante de forma ativa é encontrada em neoplasias, principalmente no câncer de mama. (GEORGE et al., 2022; HINZ; JÜCKER, 2019; PASCUAL; TURNER, 2019).

A proteína AKT1 possui 3 três sítios de interação: um no domínio de homologia de pleckstrina (PH) N-terminal; um sítio cinase principal e um sítio de interação com outras proteínas (Gabel et al., 2003). O domínio PH se liga a lipídios do tipo fosfatidilinositol-3-fosfato (PIP3), facilitando a translocação de AKT para a membrana plasmática. O sítio cinase contém a atividade catalítica da proteína e o sítio regulador possui afinidade em interagir com proteínas que regulam a atividade AKT1 (Jiang et al., 2019). Na figura 1 encontramos a proteína AKT1 em sua conformação auto inibida, cada domínio recebe uma cor específica que os diferencia, além de poder identificar ligantes de cores diferentes representando cada um dos 3 sítios.

Figura 1 - Proteína AKT1, com seus 4 diferentes domínios.



Fonte: PDB-3O96, 4EKL, 1H10, alterado pelo autor.

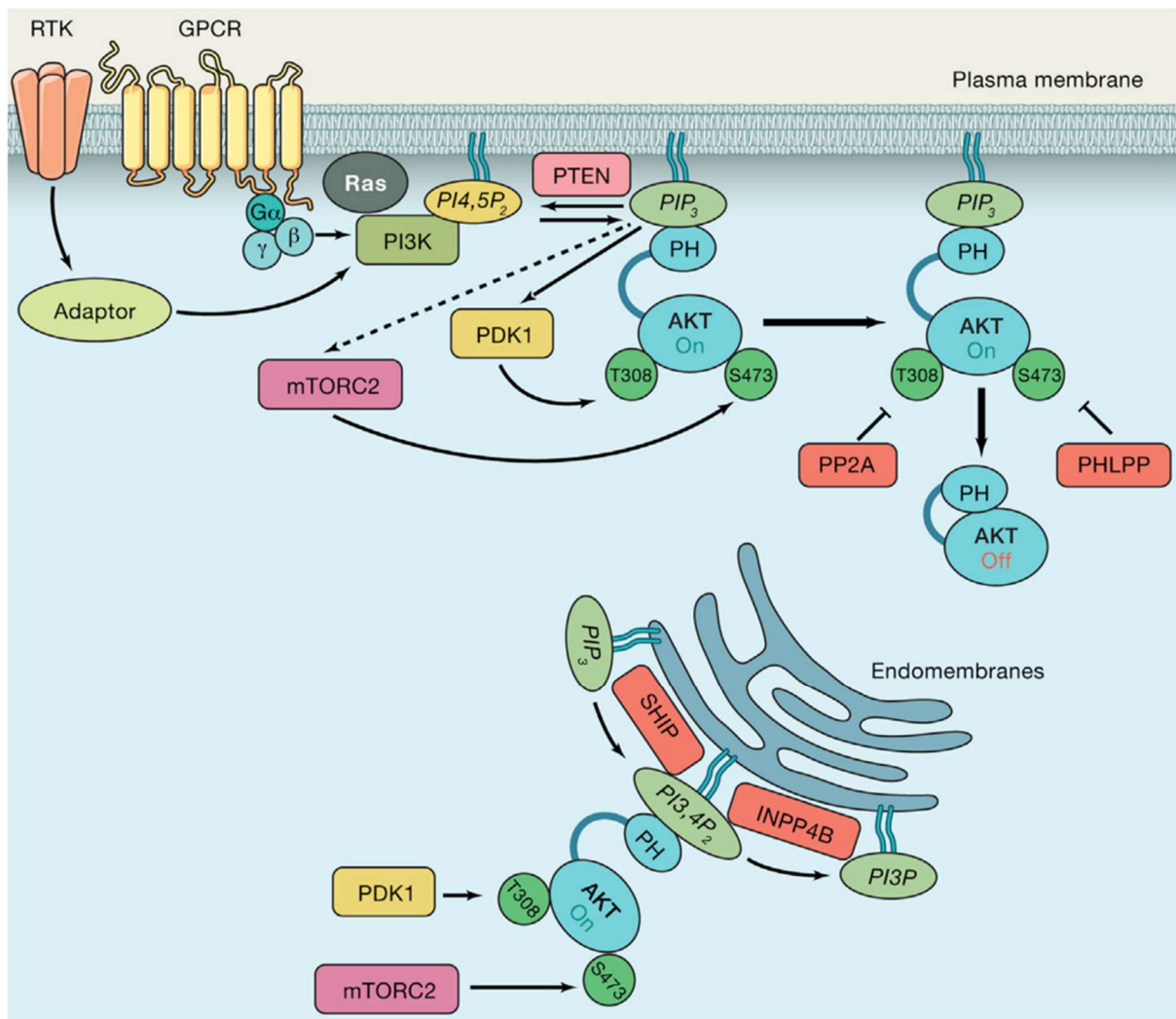
A proteína AKT possui uma grande especificidade em suas ligações e dependendo das condições, pode ter uma crescente complexidade na sinalização celular (Frame; Cohen; Biondi, 2001). Essas características a tornam complexa devido à especificidade variável de interação proteína-proteína, possuindo ação cinase para diferentes alvos proteicos quando ativa. No contexto celular em que a fosforilação ocorre, a AKT influencia a sinalização de diversas rotas metabólicas e de crescimento celular (Manning; Toker, 2017).

2.2 Função e regulação da proteína AKT

A atividade da proteína AKT na célula, bem como sua relação com outras proteínas, acontece em sua forma ativa. Sua relação com vias de multiplicação celular acontece após a fosforilação do resíduo de Ser473 da sua cauda C-terminal pela mTORC2, ou por fosforilação dupla em Ser477 e THR479 pela CDK2 (Alessi et al., 1997). As proteínas que regulam a

ativação sofrem influência de estímulos extracelulares, como fatores de crescimento, citocinas e hormônios. A ativação inicia por fatores de crescimento celular conectados à superfície da célula as quais promovem uma sinalização Upstream, com a ativação de receptores que sofrem auto fosforilação, levando ao segundo mecanismo de sinalização, o recrutamento de moléculas de sinalização a jusante, ou Downstream (Manning; Toker, 2017). A figura 2, demonstra mecanismos de ativação da proteína AKT e proteínas envolvidas no processo, todas ligadas a membranas plasmáticas (parte superior da imagem) ou em endomembranas (parte inferior). A direita encontramos proteínas envolvidas na inativação da proteína AKT.

Figura 2: Via metabólica da AKT.

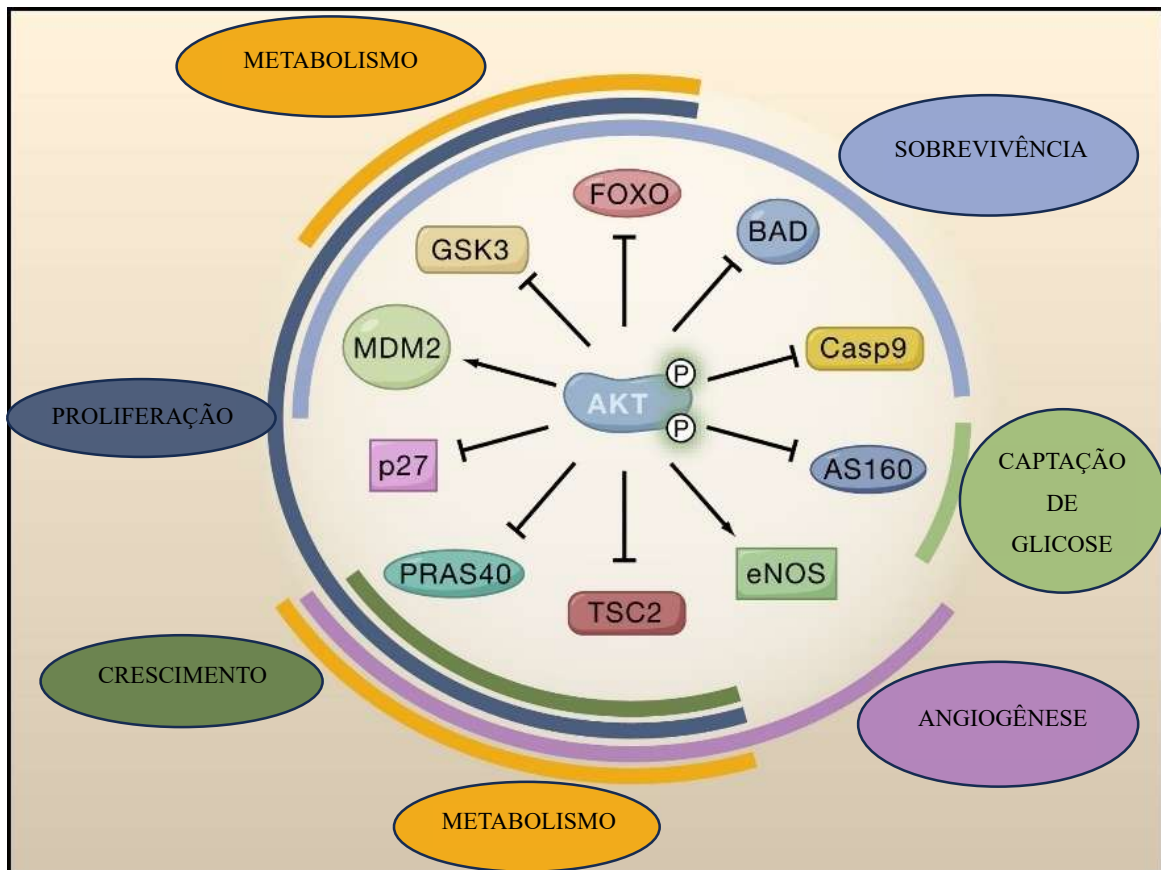


Fonte: Manning & Toker, 2017.

A enzima fosfoinositídeo 3 cinase (PI3K), influenciada pela sinalização membranar, converte moléculas membranares de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) em

fosfatidilinositol trifosfato (PIP3). O aumento da presença de PIP3 na membrana, atrai diversas proteínas para a região, através da sinalização dos domínios PH presentes em diversas proteínas (Manning; Toker, 2017a). Entre as proteínas que possuem este domínio, a PDK1 e a AKT se desloca para a margem da célula. Uma vez na membrana plasmática, a PDK1 se auto fosforila e após, fosforila a AKT em Thr308 ativando-a parcialmente. Outra proteína chamada de mTORC2 executa uma fosforilação adicional em Ser473 levando à sua ativação total. (Manning; Cantley, 2007). A proteína AKT relaciona-se com diversos alvos proteicos e essa relação tem envolvimento com funções celulares diversas, o diagrama na Figura 3, demonstra a AKT com duas fosforilações (indicadas por "P"). O diagrama ilustra como a ativação da AKT pode promover a sobrevivência celular, o crescimento, a proliferação, entre outros processos. Podemos ver que cada círculo representa uma função e sua cor qual substrato proteico a AKT se relaciona, se tiver uma seta, temos uma ativação, caso seja um traço no fim da linha uma inibição.

Figura 3: Diagrama de correlação da proteína AKT



Fonte: Adaptado de Manning; Cantley, 2007.

Sua ativação permite que alvos celulares sejam fosforilados e inibidos, demonstrados na imagem por linhas com barra horizontal na ponta ou ativados, observado pela presença das setas na figura 3. Um dos mecanismos de ação da AKT, está em seu envolvimento com a enzima glicogênio sintase cinase 3 (GSK3), fosforilando-a e conseqüentemente inibindo sua função na via da glicose. Essa inibição favorece a síntese de glicogênio e da disponibilidade de glicose nas células, acarretando numa maior taxa de sobrevivência e multiplicação celular (Montori-Grau et al., 2013). Outro exemplo de funcionamento da AKT, está em seu envolvimento com a proteína, disponibilizando fosforilação do complexo 2 da esclerose tuberosa (TSC2) inibe sua atividade, promovendo a ativação de mTORC1 e posteriormente a síntese de proteínas e o crescimento celular (Manning; Toker, 2017)

2.3 Alterações da proteína AKT e o câncer

A mutação da proteína AKT tem sido associada a diversos tipos de cânceres, incluindo os de mama, ovário, próstata, pulmão, pâncreas e colorretal (Engelman, 2009; Ogino et al., 2009). A ativação anormal da via de sinalização de AKT, que ocorre devido a mutações, tem sido implicada no crescimento e na sobrevivência de células tumorais, bem como na resistência à terapia (Smilkou et al., 2024).

Mutações no gene PIK3CA, as quais codificam a proteína PI3K, super ativam na, conseqüentemente o aumento de PIP3 membranar recruta as proteínas envolvidas na ativação da AKT1. Essa ativação anormal, promove um aumento significativo na sinalização da AKT1. Essas proteínas alteradas podem ter implicações negativas em prognósticos oncológicos. Por exemplo, uma mutação específica em AKT1 (E17K) está localizada no domínio PH da proteína. Essa, por sua vez, ativa a AKT1 sem que haja a necessidade de movimentação para a membrana ou na ausência de estímulos de crescimento celular. Ambas as variações foram encontrada em pacientes com câncer de mama triplo negativo e sua expectativa de tratamento e evolução da doença foram consideradas as piores possíveis (Dong et al., 2021). Além disso, a presença de mutações em AKT1 tem sido associada a uma menor sobrevida em pessoas com câncer colorretal metastático (Han et al., 2008).

A importância das mutações em AKT1 como alvo terapêutico tem sido progressivamente reconhecida. Estudos pré-clínicos têm demonstrado que inibidores de AKT1 podem ser eficazes no tratamento de cânceres com mutações em AKT1 e/ou na via de sinalização de PI3K/AKT/mTOR (Donia et al., 2024). Atualmente, há uma grande procura por

inibidores de AKT1, alguns já estão em processo de teste clínico para o tratamento oncológico combinado (Zhang et al., 2024).

Além dessas mutações específicas, como R273A e S473A, que demonstram uma hiperativação da proteína (Tsai et al., 2019), estudos têm mostrado que a ativação anormal da via de sinalização da AKT1 é comum em vários tipos de câncer, e pode ocorrer através de diversas vias de sinalização celular (Manning; Toker, 2017a). Por exemplo, a ativação da AKT1 pode ocorrer através da inativação do supressor de tumor PTEN, ou através da ativação de receptores de crescimento celular, como o receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Lin et al., 2021).

2.4 Bioinformática estrutural na prospecção de compostos com potencial anticâncer

A Bioinformática estrutural tornou-se uma ferramenta fundamental no diagnóstico e tratamento de doenças. Ela permite identificar alvos moleculares e auxilia no desenvolvimento de novos fármacos, além de prever a eficácia de terapias e personalizar tratamentos para pacientes com base em suas características genéticas.

O processo de identificação de moléculas capazes de se ligar a uma proteína, conhecido como atracamento molecular (do inglês, *Docking*), é uma das principais técnicas utilizadas para avaliar a interação entre proteínas e seus ligantes. O *Docking* pode ser aplicado em grande escala para identificar potenciais candidatos a fármacos e para analisar a especificidade de ligação de moléculas já conhecidas.

Além disso, o uso de ferramentas computacionais na biologia molecular tem permitido a identificação de compostos de origem natural com potencial terapêutico. Por meio da técnica de Ensemble-based *Virtual Screening* (EbVS), é possível calcular diversas possíveis interações entre moléculas e proteínas de interesse. Essa triagem consiste em utilizar um banco de dados robusto cheio de moléculas potenciais e programas de *Docking* molecular para avaliar a capacidade de interação a uma proteína alvo, permitindo a identificação de compostos com potencial terapêutico para uma determinada doença (Kontoyianni, 2017). Esta ferramenta proporciona a utilização de bancos de dados para a execução de análises da interação de várias conformações e posições de moléculas com uma proteína alvo. Isto favorece a investigação de eficiência e especificidade de determinados compostos a sítios de ligações. Em suma o EbVS melhora nossas avaliações quantitativas das interações ligante-receptor, além de identificar novos modos de ligação e inibição de ligantes (Amaro; Li, 2010), facilitando no

desenvolvimento de compostos promissores para inibição ou ativação de determinadas vias celulares.

Além disso, a biologia computacional tem permitido a integração de diferentes tipos de dados biológicos em uma única análise, o que pode fornecer informações mais precisas e completas sobre um determinado processo biológico. Por exemplo, a integração de dados de sequenciamento genético, expressão gênica e proteômica pode fornecer informações valiosas sobre a regulação gênica e as vias de sinalização em uma célula.

Neste trabalho analisamos moléculas de origem vegetal para a terapia direcionada na desregulação da isoforma da AKT1, buscando energias de interação, resíduos chaves e ligações que a proteína pode fazer com moléculas disponíveis em um banco de dados de origem vegetal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar estruturalmente por ferramentas de bioinformática a proteína AKT1 e prospectar possíveis inibidores seletivos de origem vegetal, por meio de triagem *Virtual*, para o sítio de ligação 1 da isoforma 1 da proteína AKT.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar as conformações proteicas adequadas para a prospecção *Virtual* entre estruturas experimentais disponíveis da AKT1;
- Analisar os resíduos mais relevantes que interagem entre os ligantes encontrados no sítio 1 da AKT1, que é o de ligação ao ATP;
- Identificar Compostos Orgânicos Vegetais (COVs) com potencial inibitório e avaliar as interações entre proteína-ligante.

4 ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL

Esta etapa foi dividida em seis grandes momentos, sendo:

I. Identificação das informações estruturais da proteína AKT presentes no Protein Data Bank (PDB) disponível em: (<https://www.rcsb.org/>).

II. Análise das proteínas de AKT isoforma 1 depositadas, bem como a completude dos resíduos, ligantes e interação entre eles. Essa etapa finda na modelagem computacional de forma a completar átomos faltantes nos dados experimentais.

III. Preparação dos modelos moleculares, protonando, convertendo, separando as proteínas dos ligantes e a partir disto, foi construído os parâmetros para a técnica de *Self* e *Cross-Docking*.

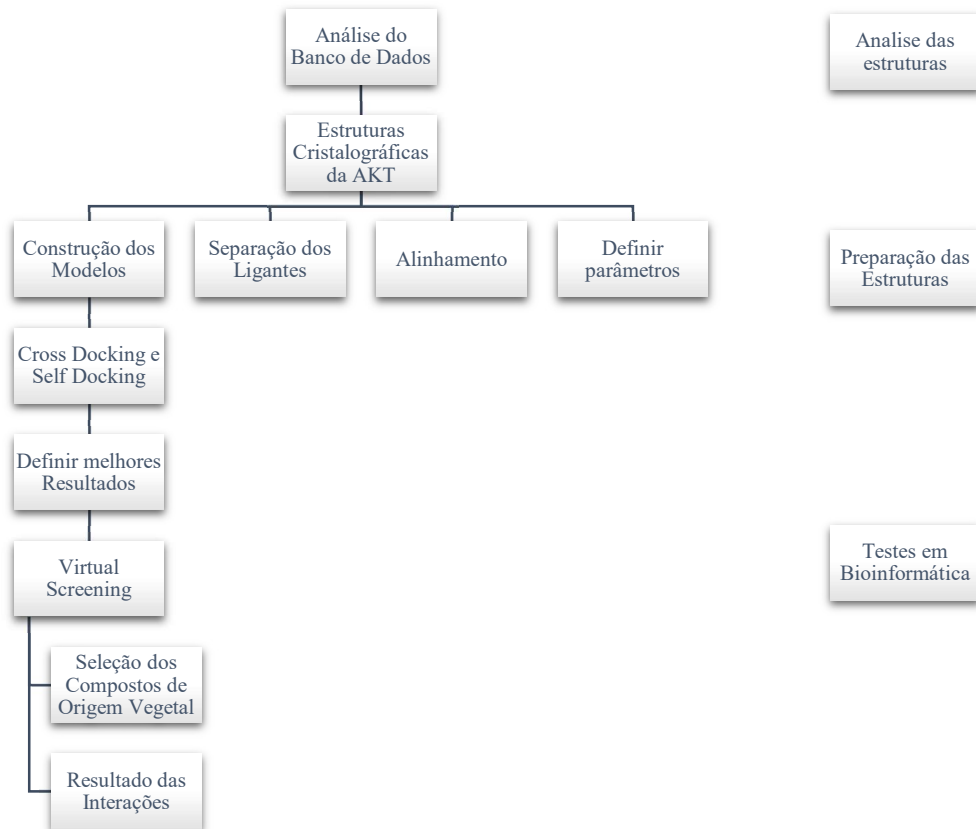
IV. Validação dos modelos através das técnicas de *Self-Docking* e *Cross-Docking* a partir do *Docking* Molecular e escolha dos melhores modelos para os testes de EbVS.

V. A partir dos resultados da validação, foram selecionados os melhores modelos de proteínas e os submetidos a análise dos compostos de origem vegetal (COVs) a partir do banco de dados NuBBE.

VI. Filtragem e análise dos COVs resultantes do EbVS, com base em sua energia e interação com os resíduos pertencentes ao sítio ativo 1 da AKT1.

O Fluxograma a seguir, exemplificado na figura 4, demonstra como as etapas experimentais foram organizadas.

Figura 4: Fluxograma da estratégia experimental.



Fonte: Criado pelo Autor

As 6 etapas deste trabalho podem ser organizadas em 3 principais momentos, como mostrado na figura 4, o primeiro é o levantamento das informações disponíveis nos bancos de dados. Nesse momento pode-se desenvolver o melhor entendimento sobre a proteínas, conhecendo suas características, principais mutações e estudos relacionados com sua expressão em algumas patologias. A segunda etapa é caracterizada pelo uso das ferramentas de bioinformática para a preparação das estruturas, ligantes e produção dos protocolos que sejam mais seguros e confiáveis. Por último temos a etapa de cálculo estatístico de interação, caracterizado pelo uso dos programas de *Docking Molecular*.

4.1 Obtenção das estruturas proteicas

Inicialmente, as proteínas resgatadas para os estudos, foram pesquisadas no banco de dados digitais de estruturas cristalográficas do Protein Data Bank (PDB). Esse banco de dados é um repositório público de dados estruturais de proteínas, nele podemos encontrar informações digitais de experimentos *in vitro*. Para encontrar a proteína de interesse, foi feito uma busca na

aba de pesquisa utilizando palavras que correspondia a AKT1. Os termos utilizados foram "AKT1", "RAC-alpha serine/threonine-protein kinase", "Protein Kinase B isoform 1". Após a realização da busca, foi necessário filtrar os resultados obtidos, selecionando apenas os cristais de proteínas da AKT1 com resolução estrutural adequada para a análise, geralmente com resolução de 3 Å ou menos. Além disso, a qualidade dos dados disponíveis foi verificada, detectando algum possível resíduo faltante, presença de artefatos na estrutura além da proteína ou ligações muito distantes.

4.2 Preparação das estruturas proteicas

Uma vez selecionados os cristais de proteínas da AKT com qualidade estrutural adequada, foi possível utilizar ferramentas computacionais de modelagem molecular, como o SwissModel (Waterhouse et al., 2018), para a construção de modelos para as testagens ou apenas para reparar possíveis erros encontrados na cristalização. Ao resgatar informações dos bancos de dados, alguns resíduos podem não estar presentes na informação do banco de dados, para contornar essa situação, utilizamos a cadeia de aminoácidos da variedade selvagem como template para a construção dos modelos e reparo de possíveis erros tridimensionais.

Após modelagem, as proteínas passaram pelo processo de protonação no servidor APBS-PDB2PQR (<https://server.poissonboltzmann.org/>), obtendo-as em formato PQR (atomic partial charge-Q and radius-R) a pH 7,4 (Dolinsky et al., 2004). De posse da molécula em PQR, o próximo passo foi o ajuste dos hidrogênios. Por meio da ferramenta AutoDock Tools (Morris et al., 2009), foi realizado o ajuste de hidrogênios, com a fusão dos hidrogênios não polares, para salvamento da estrutura em formato PDBQT. Além disso, a caixa de ancoragem molecular, foi definida pelas coordenadas que delimitam o sítio ativo da proteína, foi configurada de modo a abranger completamente o local de interação.

A preparação para a etapa seguinte, foi definir a orientação das escolhas de conformações representativas entre os dados cristalográficos da proteína AKT. Foram selecionados os cristais de AKT modelados que cumpriram com determinados critérios específicos, como os quatro domínios completos, na forma monomérica e com um ligante. Para o estudo, foram selecionadas as seguintes proteínas (Códigos PDB): 1H10 com o ligante inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate (Thomas et al., 2002), 1UNQ com o ligante inositol-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate (MILBURN et al., 2003), 2UVM com o ligante benzene-1,2,3,4-tetrayl tetrakis(dihydrogen (phosphate)) (Mills et al., 2007), 3O96 com o ligante 1-(1-(4-(7-phenyl-1H-imidazo(4,5-g)quinoxalin-6-yl)benzyl)piperidin-4-yl)-1H-benzo(d)imidazol-2(3H)-one

(Wu et al., 2010), 4GV1 com o ligante 4-amino-N-((1S)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl)-1-(7H-pyrrolo(2,3-d)pyrimidin-4-yl) piperidine-4-carboxamide (Addie et al., 2013), 2UZS com o ligante INOSITOL-(1,3,4,5)-tetrakisphosphate (Carpten et al., 2007), 4EKK com o ligante phosphoaminophosphonic acid-adenylate ester (Lin et al., 2012), 4EJN com o ligante N-(4-(5-(3-(acetylamino)phenyl)-2-(2-aminopyridin-3-yl)-3H-imidazo(4,5-b)pyridin-3-yl)benzyl)-3-fluorobenzamide (Ashwell et al., 2012), 4EKL com o ligante (2S)-2-(4-chlorophenyl)-1-(4-((5R,7R)-7-hydroxy-5-methyl-6,7-dihydro-5H-cyclopenta(d) pyrimidin-4-yl) piperazin-1-yl)-3-(propan-2-ylamino)propan-1-one (Lin et al., 2012), 5KCV com o ligante 3-(3-(4-(1-azanylcyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-imidazo(4,5-b)pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (Lapierre et al., 2016), 6CCY com o ligante (5R)-4-(4-(4-(4-fluoro-3-(trifluoromethyl)phenyl)-1-(2-(pyrrolidin-1-yl)ethyl)-1H-imidazol-2-yl)piperidin-1-yl)-5-methyl-5,8-dihydropyrido(2,3-d)pyrimidin-7(6H)-one (Parthasarathy et al., 2018), 6HHF com o ligante Borussertib (Weisner et al., 2019), 6HHG com o ligante (N)-(2-chloranyl-5-((1-((4-(5-oxidanylidene-3-phenyl-6-(H)-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl)methyl)piperidin-4-yl) carbamoylamino) phenyl) propanamide (Uhlenbrock et al., 2019), 6HHH com o ligante (N)-(4-(4-((4-(5-oxidanylidene-3-phenyl-6-(H)-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl)methyl)piperazin-1-yl) phenyl) propanamide (Uhlenbrock et al., 2019), 6HHI com o ligante (N)-(1-((4-(5-oxidanylidene-3-phenyl-6-(H)-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl)methyl)piperidin-4-yl)-3-(propanoylamino)benzamide (Uhlenbrock et al., 2019), 6HHJ com o ligante (N)-(1-methyl-2-oxidanylidene-3-(1-((4-(5-oxidanylidene-3-phenyl-6-(H)-1,6-naphthyridin-2-yl)phenyl)methyl)piperidin-4-yl)benzimidazol-5-yl)propanamide (Uhlenbrock et al., 2019), 6S9W com o ligante (N)-(3-(1-((4-(5-methyl-6-oxidanylidene-3-phenyl-1-(H)-pyrazin-2-yl)phenyl)methyl)piperidin-4-yl)-2-oxidanylidene-1-(H)-benzimidazol-5-yl)propanamide (Quambusch et al., 2019), 6S9X com o ligante (N)-(3-(1-((4-(5-((4-hydroxyphenyl)methyl)-6-oxidanylidene-2-phenyl-1-(H)-pyrazin-3-yl)phenyl)methyl) piperidin-4-yl)-2-oxidanylidene-1-(H)-benzimidazol-5-yl) propanamide (Quambusch et al., 2019), 7NH4 com o ligante (N)-(3-(1-((4-(5-(hydroxymethyl)-3-phenylpyridin-2-yl)phenyl)methyl)piperidin-4-yl)-2-oxidanylidene-1-(H)-benzimidazol-5-yl) propanamide (Quambusch et al., 2021) e por fim a proteína 7NH5 com o ligante (N)-methyl-6-(4-((4-(2-oxidanylidene-6-(propanoylamino)-3-(H)-benzimidazol-1-yl)piperidin-1-yl)methyl)phenyl)-5-phenyl-pyridine-3-carboxamide (Sementino et al., 2018).

4.3 Preparação para o *Docking Molecular*

A etapa de Simulações de *Cross-Docking* foi realizada para orientar a escolha de conformações representativas entre os dados cristalográficos da proteína AKT. Nessa etapa, após a retirada de cada ligante, o *Docking* molecular foi realizado com cada estrutura cristalográfica para que possa ser feito o acoplamento com cada um dos ligantes encontrados. As proteínas utilizadas foram apenas as AKT modelados que cumpriram com determinados critérios específicos, como os quatro domínios completos, na forma monomérica e com um ligante. Para o estudo, foram selecionadas as seguintes proteínas (Códigos PDB): 1H10, 1UNQ, 2UVM, 3O96, 4GV1, 2UZS, 4EKK, 4EJN, 4EKL, 5KCV, 6CCY, 6HHF, 6HHG, 6HHH, 6HHI, 6HHJ, 6S9W, 6S9X, 7NH4, 7NH5. Os parâmetros de encaixe, incluindo posição e dimensão da caixa da grade foram ajustados para obter melhores resultados, tendo a melhor eficiência em bioinformática sem perda de informação. A caixa de grade foi configurada com tamanhos de 20x20x20 (X, Y, Z) para cada um dos sítios estudados. Os centros dos sítios de ligações foram: no sítio PH centro_x= 3.826 centro_y= -17.556 centro_z= 17.194; no sítio 1 centro_x= 20.095 centro_y= 2.583 centro_z= 21.361; no sítio 2 centro_x= 8.944 centro_y= -7.278 centro_z= 14.139. Todos os atracamentos tiveram o parâmetro de tentativa de encaixa, *exhaustiveness*, de 16, cada encaixe foi repetido 10 vezes. Os dados resultantes foram analisados a fim de identificar estruturas capazes de acoplar ligantes cristalográficos dentro de 3 angstroms de suas geometrias experimentais. Além disso, a caixa de ancoragem molecular, definida pelas coordenadas que delimitam o sítio ativo da proteína, foi configurada de modo a abranger completamente o local de interação. O *Cross-Docking* serviu para avaliar e validar os protocolos de *Docking* molecular, para posterior triagem *Virtual*(Thomas; Parrill; Baker, 2022).

Diversos resultados foram encontrados e pela quantidade de informações desta etapa, houve o refinamento das informações para avaliar qual melhor sítio poderíamos escolher para dedicar nossos esforços neste trabalho. Para isto, foi feito um levantamento bibliográfico para desvendar qual sítio ativo melhor se encaixa para prospecção de compostos. O sítio PH demonstrou parentesco com outras proteínas como por exemplo a CDK (Okuda; Nishimura, 2023), envolvida na ativação da AKT, ambas proteínas de membrana. Logo este sítio, demonstrou pouca exclusividade de ligação para que seja testado moléculas para a proteína AKT. O sítio 2 é o local onde há a interação com outras proteínas, podendo variar bastante por não ter uma exclusividade de ligação a uma proteína. Já o sítio 1 é o sítio catalítico onde localiza-se a molécula de ATP, na conformação ativa. Principalmente por estas razões focamos este trabalho no sítio 1. Das proteínas resgatadas, foram selecionados 4 que participaram do sítio 1, de acordo com os códigos PDB são elas: 4EKK, 4EKL, 4GV1 E 6CCY.

4.4 *Self-Docking e Cross-Docking*

O *Self-Docking* consiste em retirar o ligante da proteína e, em seguida, ancorá-lo novamente com o auxílio do software de ancoragem molecular, buscando reproduzir a conformação original ligante-receptor. Já o *Cross-Docking* consiste em fazer ancoragem molecular com os outros ligantes das proteínas que foram selecionadas do banco de dados e analisar quais proteínas terão o melhor resultado.

Para que seja feito o *Self-Docking*, utilizamos o *Docking* molecular da proteína conhecida com o seu próprio ligante, a fim de testar a confiabilidade do modelo criado. Já no *Cross-Docking* o atracamento molecular foi realizado com os ligantes das outras proteínas. Os melhores resultados foram selecionados para o teste de *Virtual Screening*.

Uma variável comumente empregada para avaliar a qualidade do *Docking* é o RMSD (*Root Mean Square Deviation*), que quantifica as diferenças entre as duas estruturas: a original e a resultante do processo de ancoragem (Maia et al., 2020). O cálculo do RMSD (*Root Mean Square Deviation*) é uma etapa crucial na avaliação da qualidade da ancoragem molecular. Ele é obtido através da sobreposição das estruturas do ligante resultante do *Docking* e a do cristal, permitindo obter uma medida da distância média entre os átomos correspondentes. É esperado que valores de RMSD de até 3 Å sejam obtidos para a pose de menor energia, o que indica uma boa reprodução da conformação original da proteína cristalizada. No entanto, valores acima de 3 Å são considerados fortes indícios de que a ancoragem falhou, sugerindo que a estrutura da molécula de ligação não foi adequadamente reproduzida durante o processo de *Docking* (Antunes et al., 2018; Shen et al., 2020).

Abordagem de *Self-Docking* foi adotada para ancorar cada ligante à sua proteína de origem, refletindo as condições cristalinas conhecidas. Isso envolveu a proteína 4EKK com o ligante ANP, a proteína 4EKL com o ligante ORF, a proteína 4GV1 com o ligante 0XZ e a proteína 6CCY com o ligante EX4. Este procedimento serve como uma etapa de calibração, essencial para validar a precisão do algoritmo de *Docking* utilizado, assegurando que o software é capaz de reproduzir a pose do ligante observada nas estruturas cristalinas.

Através da preparação das estruturas, foi removido moléculas de água e íons não essenciais, preenchendo lacunas nas cadeias de aminoácidos e adicionando hidrogênios, assegurou-se que as proteínas e ligantes estivessem em um estado ideal para a simulação. Os sítios de ligação foram então meticulosamente definidos, baseando-se na configuração cristalina conhecida, garantindo que o contexto estrutural das interações proteína-ligante fosse mantido.

Cross *Docking* foi realizado com o intuito de explorar a capacidade de diferentes ligantes de se associarem com proteínas distintas das suas originais. Esse processo é fundamental para elucidar a seletiva e a afinidade de ligantes em relação a uma variedade de proteínas. O Cross *Docking* expande o entendimento das interações proteína-ligante além das configurações cristalinas conhecidas, possibilitando a descoberta de novas interações potenciais, que poderiam ser cruciais para o design racional de fármacos e para a compreensão mais profunda da dinâmica biomolecular. Após estas etapas, submetemos as proteínas à triagem *Virtual*, utilizando como parâmetro para detectar os melhores COVs na triagem *Virtual* os resultados de RMSD e de energia.

4.5 Triagem virtual

O Ensemble-based *Virtual Screening* (EbVS), ou também chamado de triagem *Virtual* de compostos, foi feito a partir de um banco de dados obtidos a partir de organismos vegetais presentes no Banco de Dados de Ecofisiologia e Biossíntese de Produtos Naturais (NuBBE). No cenário brasileiro, a biodiversidade que possuímos nos oferece um grande reservatório de moléculas orgânicas que tem um potencial terapêutico ainda não testado ou explorado. O NuBBE foi o primeiro banco de dados criado com moléculas vegetais brasileiras e oferece acesso a um acervo abrangente de informações validadas sobre compostos naturais, incluindo descrições químicas, origens botânicas, localizações geográficas, dados espectroscópicos e propriedades farmacológicas. Este banco de dados é particularmente valioso para o design de novos medicamentos, permitindo que pesquisadores explorem a biodiversidade única do Brasil de forma eficiente e direcionada (Pilon et al., 2017).

Das moléculas existente no banco de dados, selecionamos as de origem vegetal disponível, totalizando 1749 compostos para as tentativas de ancoragem molecular. Essas moléculas foram salvas no formato “.mol2” e em seguida, realizou-se a protonação dos ligantes com o software OpenBabel no pH 7.4 (O’Boyle et al., 2011), o mesmo pH das proteínas. Os arquivos então foram salvos em PDBQT usando o software Raccoon do pacote MGLTools 1.5.6. Cada um dos COVs foram testados na ancoragem molecular dez vezes para cada proteína do sítio 1 e dos resultados, selecionamos os compostos que possuíam uma variação de 10% da menor energia livre de Gibbs (ΔG). Dentre os compostos que estavam nos parâmetros estabelecidos, seguiram para avaliação de interação 8 potenciais inibidores.

A realização do *Docking* Molecular foi feita por meio do software AutoDock Vina (Trott & Olson, 2010), uma ferramenta amplamente utilizada para estudos de interação entre moléculas.

Todas estas análises foram realizadas nos computadores do laboratório de pesquisa em bioinformática, localizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS.

Os parâmetros de encaixe, incluindo posição e dimensão da caixa da grade e exhaustiveness, foram ajustados para obter melhores resultados, tendo a melhor eficiência em bioinformática sem perda de informação. A caixa de grade foi configurada com tamanhos de 20x20x20 (X, Y, Z) para cada um dos sítios estudados. Os centros dos sítios de ligações foram: no sítio PH centro_x= 3.826 centro_y= -17.556 centro_z= 17.194; no sítio 1 centro_x= 20.095 centro_y= 2.583 centro_z= 21.361; no sítio 2 centro_x= 8.944 centro_y= -7.278 centro_z= 14.139. Todos os atracamentos tiveram exhaustiveness (parâmetro importante a ser considerado no processo de atracamento molecular, pois determina a quantidade de poses diferentes são geradas para que seja avaliado a interação de 8 na área de acoplagem e foi repetida 10 vezes e com uma distância de 1.000 angstrom.

4.6 Análise estrutural dos resultados

As estruturas foram analisadas utilizando diversos softwares, incluindo PyMol (PyMol Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC, www.pymol.org), Avogadro e Discovery Studio, cada molécula escolhida foi comparada com os resultados do *Cross-Docking*, em critérios que vão desde energia de interação, encaixe no sítio de ligação, distância entre as moléculas que estão interagindo e quais resíduos participaram da ligação. Um dos principais indicadores de estabilidade do complexo é a energia total de interação entre ligante e proteína, que também foi analisado a partir do cálculo do AutoDock Vina.

5 MANUSCRITO DE ARTIGO

IDENTIFICATION OF PHYTOCHEMICAL COMPOUNDS WITH POTENTIAL INHIBITORY ACTIVITY AGAINST THE ATP-BINDING SITE OF THE HUMAN AKT1 ISOFORM

Ubirajara Moreira Paz Junior¹, Francisca Fernanda Souza¹ and Geancarlo Zanatta^{1,2*}

1 – Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

2 – Department of Biophysics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

* Corresponding author

ABSTRACT

Activation of AKT promotes cell proliferation, inhibits apoptosis, and increases chemotherapy resistance, making it a significant therapeutic target in cancer treatment. In this study, computational tools were employed to predict new AKT inhibitors among approximately 1800 Brazilian plant-derived compounds. Our analysis focused in the blockade of AKT isoform 1 and indicated that compounds Genetin-E, Amentoflavone, Kaempferol-3-O- α -L(4-Z-p-coumaroyl)-rhamnoside, α -Amyrin cinnamate, 2-(2-O-trans-cinnamoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone and Conodurine have potential to form a stable binding with residues in the the ATP-binding pocket. For Genetin-E, the compound with the greatest interaction, the AKT1 residues that interacted at distances of up to 3.5 Angstrom were Lys158, Thr160, Glu191, Thr195, Glu 198, Glu234, Asn279 and Asp439. The other compounds also interacted with several residues, such as Leu156, Thr160, Phe161, Glu191, His194, Glu198, Tyr, 229, Ala230, Glu234, Lys276, Glu278, Asn279, Asp292 among others. The energies found between the compounds and the protein were between -11.7 and -10.6. This research provides insights into possible inhibitors that interacted well in silico with the AKT1 protein and the residues of this interaction are similar to those found in proteins of the family crystallized with inhibitors. This work aids in discovering new chemical entities with potential for molecular enhancement through rational development of AKT site-based inhibitors.

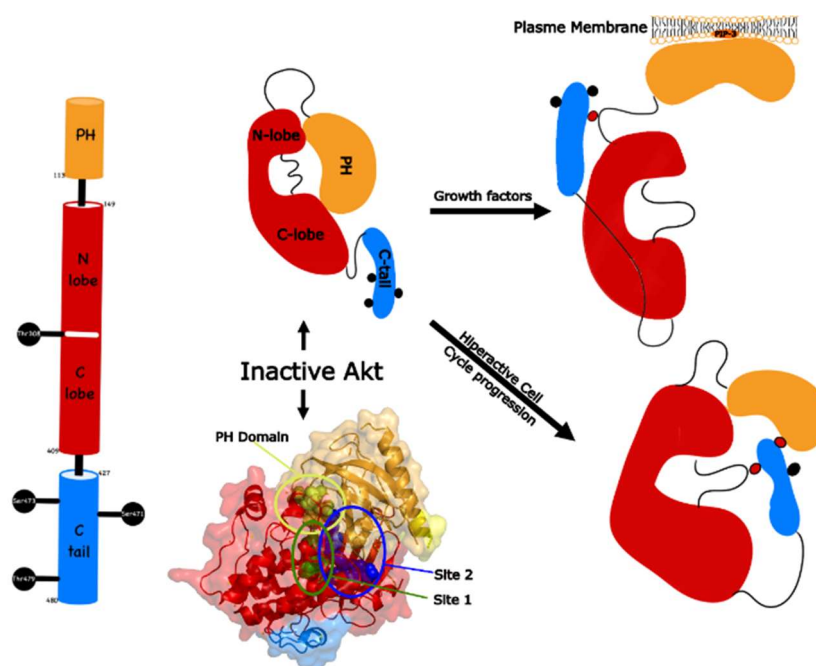
Keywords: conformational ensemble-based *virtual* screening, cancer, antitumor activity.

1 INTRODUCTION

Protein Kinase B (PKB), also known as AKT or Rac-Alpha, is a member of the AGC (PKA/PKG/PKC) family of serine/threonine kinases. The three mammals AKT isoforms (AKT1, AKT2, and AKT3) share a high degree of sequence homology and structural similarities. Structurally, AKT has three distinct domains, as shown in figure 1. The first is called the pleckstrin homology domain (PH Domain), and is located in the N-terminal portion. The PH domain binds to phosphatidylinositol-3-phosphate lipids, facilitating the translocation of AKT to the plasma membrane. The second is the kinase domain, comprised by the catalytic site of the protein, responsible by transferring the phosphate group from an ATP molecule to the target proteins. And finally, the regulatory domain has sites of protein-protein interaction, which function as regulators, activating or inhibiting, depending on the protein that AKT is related to (Chu et. al., 2018).

When growth factors bind to plasma membrane receptors, the upstream signaling initiates through the activation of a phosphoinositide 3-kinase protein, which will catalyse the formation of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate (PIP3). The presence of PIP3 on membrane will then attract proteins with the pleckstrin domain, such as PDK1 and AKT1. Following, the activation of AKT1 will occur through two distinct activation mechanisms via phosphorylations on the C-terminal tail. The first involves the phosphorylation of Ser473 by mTORC2, triggering the interaction between the C-terminal tail and the PH-kinase domain (Manning and Cantley, 2017). The second activation occurs through the dual phosphorylation of Ser477 and Thr479 by Cdk2/cyclinA. Both activations expose the catalytic site (site 1) and the protein interaction site, allowing the interaction with proteins such as FOXO, BAD, TSC2, mTOR, and AS160 (Chu et al., 2018). In the absence of C-tail phosphorylations, AKT remains autoinhibited, with the PH and kinase domains interacting intramolecularly (Testa et al., 2018). The illustration in figure 1 of AKT1 in the inactive and active states. Left panel depicts, detailing its various domains and three ligands aligned to their respective binding sites (left). Adjacent, a schematic illustrates the protein's conformation in the autoinhibited state, its domains, and the key amino acids that are phosphorylated.

Figure 1 – Protein AKT representation.



Source – Prepared by the author

AKT isoforms are distributed throughout the body in distinct patterns, with their concentrations being associated with specific functions (Gonzalez and McGraw, 2009). Among them, AKT1 is part of the PI3K/AKT/mTOR pathway which abnormal activation promotes cell growth, apoptosis inhibition and chemotherapy resistance (Shi et al., 2020; Guo et al., 2020; Yang et al., 2020), being associated with various cancers, including breast, ovarian, prostate, lung, pancreatic and colorectal cancers (Chen et al., 2019; Engelman, 2009; Yuan et al., 2018; Brendan et al., 2017). Given its role in many cancer types, AKT1 is a important target for drug development (Brendan et al., 2007), with inhibitors currently being tested in clinical against different types of cancer (Yang et al., 2020).

In this work, we leverage the power of ensemble-based *Virtual Screening* (EbVS) technique to screen a large Brazilian database of plant-based compounds against the ATP-binding pocket of Atk1. This approach identified eight new compounds with stronger binding interactions to the catalytic binding site of AKT1, opening up new opportunities for the rational development of new anticancer agents. Natural compounds are being used in cell compromise therapies, obtaining satisfactory results (Liu *et al.*, 2023). They are Phenylpropanoids, xanthenes and Terpenoids, the same class of compounds found in this work.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Structural data

Experimental coordinates of AKT1 containing ATP-binding site ligands (PDB Ids: 4EKK, 4EKL, 4GV1 and 6CCY) were retrieved from the Protein Data Bank (Addie *et al.*, 2013; Lin *et al.*, 2012; Parthasarathy *et al.*, 2018). Missing atoms were modeled using SwissModel (WATERHOUSE *et al.*, 2018), followed by protonation at pH 7.4 using the APBS-PDB2PQR server (<https://server.poissonboltzmann.org/>) (DOLINSKY *et al.*, 2004). A list of analysed structures is shown in supplementary table 1. Following, two-dimensional structure of 1749 plant-derived compounds (PDCs) were extracted from the NUBBE database (Pilon *et al.*, 2017). PDCs were protonated at pH 7.4 and energy minimized using Openbabel code (O'Boyle *et al.*, 2011).

2.2 Docking simulations

AutoDock Tools tool (MORRIS *et al.*, 2009) was employed to set atomic charges to both, protein and compound structures. we performed a hydrography adjustment, excluding non-polar hydrographies, and saved the structure in PDBQT format. Autodock Vina (Trott & Olson, 2010) was employed to perform *Docking* simulations using exhaustiveness 4 and 10 run per testing molecule. Gridbox size was set to 20x20x20 (X, Y and Z) and centered at position 20.095, 2.583 and 21.361 (X,Y and Z).

2.3 Conformational ensemble generation

Self- and *cross-Docking* simulation were performed to tailor the *Docking* procedure and to identify, among AKT-1 structures, those capable of reproduce crystallographic geometry of ligands within a threshold of 3 Angstroms. Structures able to reproduce the majority of crystallographic geometries of ligands were added to the conformational ensemble.

2.4 Ensemble-based *Virtual Screening* (EbVS)

EbVS was performed using Autodock Vina set with the same parameters employed during *Self-* and *cross-Docking* simulations. At total, 1749 PDCs were tested against the ATP-binding site of AKT1.

2.5 Structural analysis

PyMol and Discovery Studio were employed to analyse *Docking* results and generate images. In house python scripts were employed for EbVs and the analysis of results. Inkscape was employed to compose final figures.

3 RESULTS AND DISCUSSION

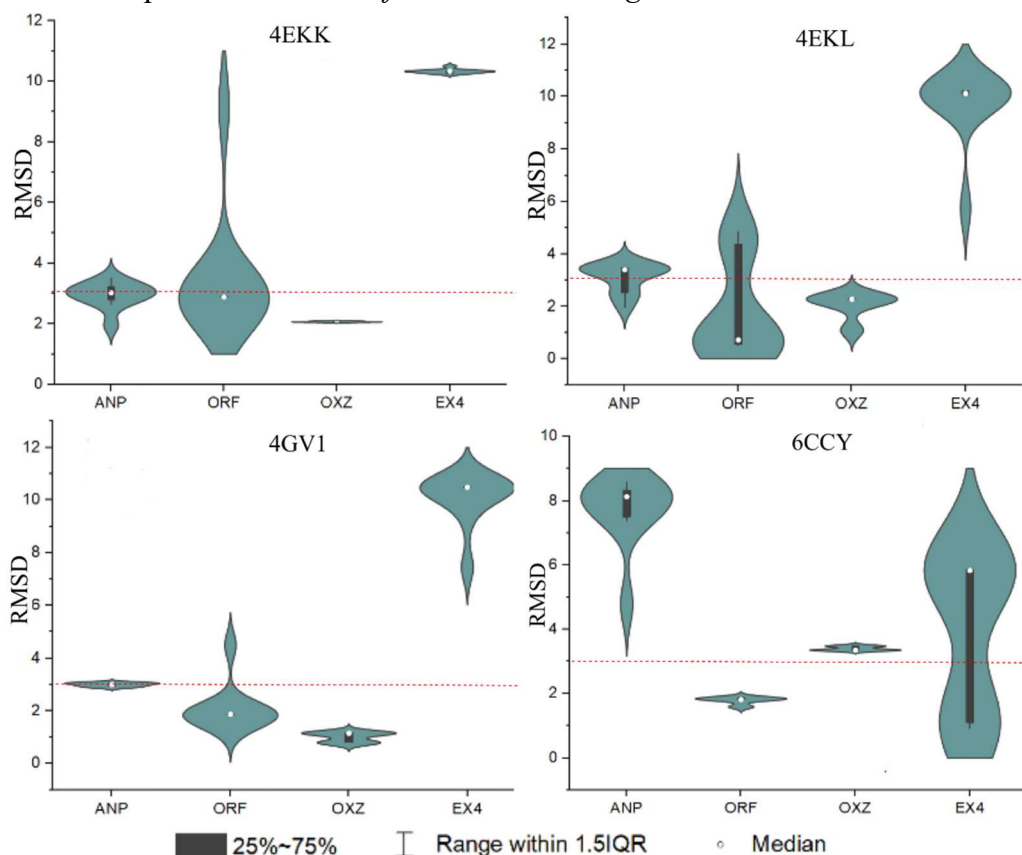
Ensemble generation

As shown in the supplementary table 1, four crystallographic structures containing monomeric representations of AKT1 bound only to a organic ligand were retrieved from the Protein Data Bank. *Self-Docking* and *cross-Docking* techniques were employed to assess the ability of each structure to reproduce crystallographic structural data using our *Docking* approach. While *Self-Docking* assessed the efficiency of our protocol to rebuild protein-ligand complexes with the same or similar geometry than experimental data, *cross-Docking* expands the understanding of protein-ligand interactions beyond the known crystalline configurations by examines the efficiency of distinct crystallographic structures to binding a set of known crystallographic ligands (Shamsara, 2016). In these simulations, low RMSD values indicate that the binding geometry obtained through the *Docking* procedure is very similar to the experimental geometry of the same structure indicating a precise interaction between the ligand and the protein (Kitchen DB et al., 2004).

As shown in figure 2, crystallographic structures 4EKK, 4EKL and 4GV1 were able to reproduce close geometries of ligands ANP, ORF and OXZ with RMSD below 3Å. On the other hand, structure 6CCY didn't show good results for those three ligands, but was the only structure able to obtain a close geometry for ligand EX4. Therefore, despite the rate of recovery of EX4 geometry obtained using structure 6CCY was low (with a RMSD distribution ranging from zero to 10), this structure was kept in the ensemble for later use during *Virtual Screening* simulations. Among results, the crystallographic molecule EX4 showed a binding energy of -10.34 kcal/mol, interacting mainly with residues Thr211, Glu228, Ala230 and Glu234. Molecule OXZ bond with an energy of -8.95 kcal/mol, interacting mainly with residues Glu228, Ala230, Glu234 and Glu278. The molecule with the third larger interaction energy (-8.84 kcal/mol) was ORF, which interacts with residues Glu228, Ala230, Glu234, Glu278.

These interactions demonstrate good stability in the protein-binding complex, by mainly maintaining the binding pattern of amino acids in the same active site. For example, there is a repeat interaction of different molecules with the same residues of Glu228, Ala230 and Glu234 for the three molecules studied so far. ANP molecule showed a binding energy of -8.51 kcal/mol, interacting mainly with residues Lys158, Lys179, Glu228, Ala230, Glu234, Glu278, Thr291 and Asp292. Interestingly, there is a conserved interaction pattern in all four structures, reinforcing the critical role of these residues in ligand recognition and affinity. The original geometries of experimental structures used in this step are shown in the supplementary figure 1, while the binding energies obtained during the *Self-* and *cross-Docking* are shown in supplementary figure 2.

Figure 2 – Violin plots of RMSD *Self* and *cross-Docking*.



Source – Prepared by the author

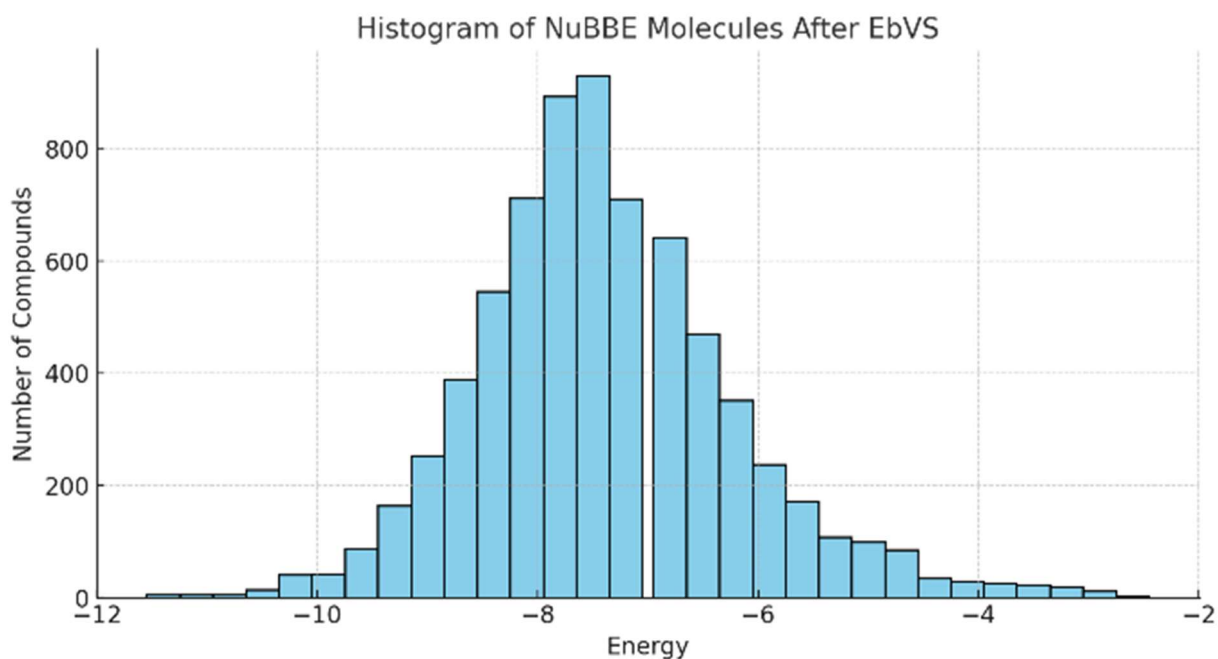
The figure 2 represents violin plots representing *Self-Docking* and *cross-Docking* results. Values in Y-axis represent the RMSD obtained for each ligand as represented in X-axis. Panels A, B, C and D depict results when analysing 4EKK, 4EKL, 4GV1 and 6CCY structures, respectively.

Ensemble-based *Virtual Screening* (EbVS)

In the past decades, computational tools have been widely used to accelerate the drug discovery process. By using the ensemble-based *Virtual Screening* (EbVS) technique it is possible to accelerate the *Screening* of a large number of compounds and assess their ability to bind to a target protein, allowing the identification of compounds with therapeutic potential for a particular disease. (KONTOYIANNI, 2017). Indeed, EbVS allows the quantitative assessments of ligand-receptor interactions and helps identifying new possibilities for ligand binding and inhibition (Amaro RE and Li WW, 2010), facilitating the development of new pharmacological agents, able to modulate relevant cellular signaling pathways.

In this work, EbVS technique was employed to investigate the binding of 1745 plant-derived compounds (PDCs) on the ATP-binding site of AKT1. The investigation of plant-derived compounds selected from NUBBE database aligns with the current trend of exploring natural biodiversity in search of new bioactive molecules, given its vast chemodiversity and the historical success of natural products as sources of new medicines (Newman & Cragg, 2020). As observed in figure 5, few compounds with strong binding energy were identified, while the majority of tested molecules bound to AKT1 with interaction energies ranging from -8.0 to -6.0 kcal/mol, which is similar to the calculated binding energy observed for the crystallographic ligands which underwent *Self-* and *cross-Docking* simulations (see supplementary figure 1). In order to select a subset of PDCs with higher binding energy, the adopted cutoff criteria was 10% of the top energy. This criteria ensured that only eight compounds with small differences in binding energies (ranging from -11.7 to -10.9) were selected for further analysis. Limiting the selection of compounds to very close binding energies tends to lead to compound with similar biological activity (Meng et. al., 2011).

Figure 3 – Histogram of NuBBE Molecules after EbVS



Source – Prepared by the author

Histogram depicting the distribution of the binding energies produced from EbVS. X axis shows a energy range from -2.0 to -12.0 kcal/mol, with its maximum (minimal) peak at -11.7 (-2.6). The PDCs found with the best energies are found in the table below.

Table 1 – The best energies compounds with AKT1

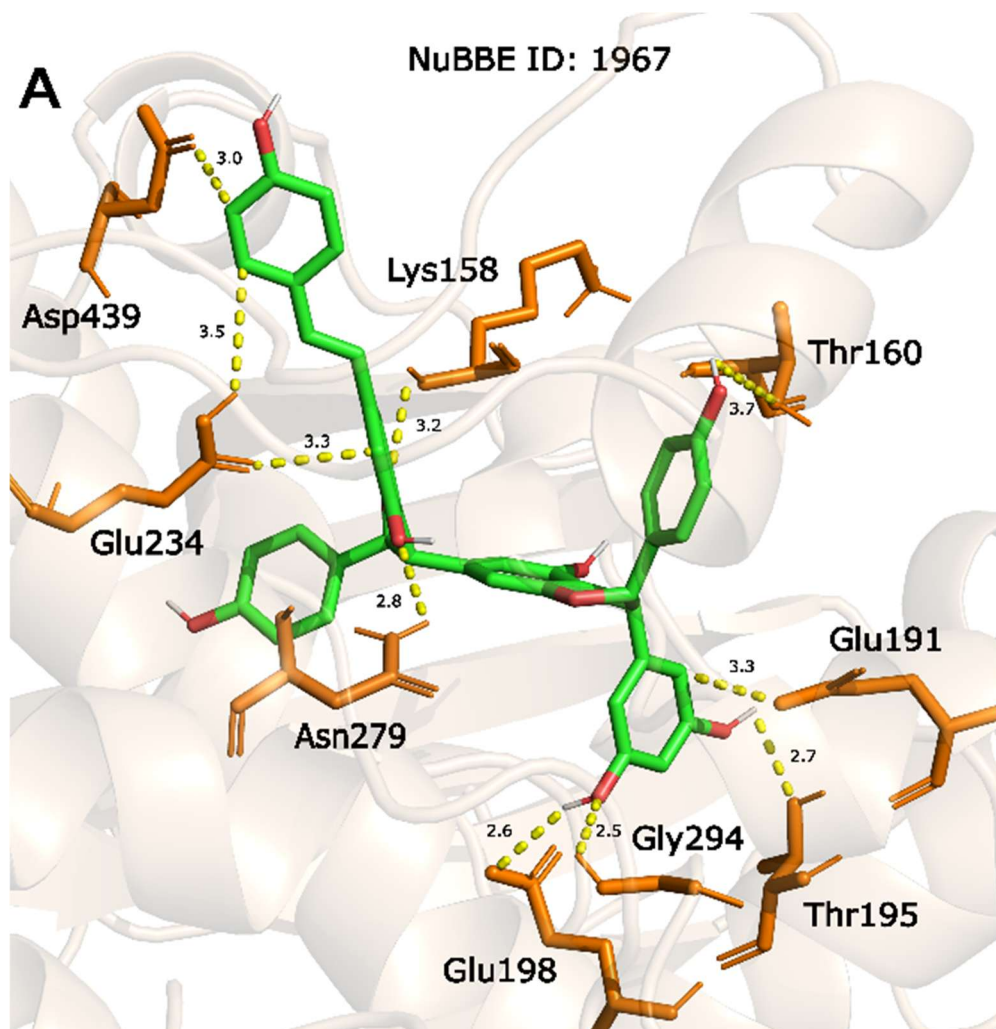
Target structure	NuBBE ID	NuBBE compound name	E_{dock}
4GV1	1967	Genetin-E	-11.7
4EKL	200	Amentoflavone	-11.3
4EKL	558	Kaempferol-3-O- α -L-(4"-Z-p-coumaroyl)-rhamnoside	-11.3
4EKK	438	α -Amyrin cinnamate	-11.1
4EKL	557	Kaempferol-3-O- α -L-(4"-E-p-coumaroyl)-rhamnoside	-11.1
4EKK	368	2-(2'-O-trans-cinnamoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone	-11.0

4EKK	367	2-(2'-O-trans-caffeoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone	-11.0
4EKK	369	2-(2'-O-transcoumaroyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone	-10.9
6CCY	2410	Conodurine	-10.6

Source – Prepared by the author

The Best results found from EbVS between AKT1 proteins and molecules of plant origin deposited in NuBBE. The first column shows the test protein, followed by the ID and the typical name given to the molecule, finally we have the amount of energy of the interaction.

Figure 4 – Ligand in AKT1 bind-site.



Source – Prepared by the author

Proteins after EbVS, all with the same ligand NuBBE ID: 1967. In figure 4A we find Protein 4GV1, with several residues interacting with the molecule, among them we have

Thr195 (2.7 Å), Glu198 (2.6 Å), Glu234 (3.5 Å), Asn270 (2.8 Å), Gly294 (2.5 Å), Asp439 (3.0 Å). In figure 4B we have the 4EKK protein with closer interactions, despite a slightly lower interaction energy. The amino acid residues and the molecule distance to them are: Lys158 (2.5 Å), Gly159 (1.7 Å), Glu191 (2.8 Å), Thr160 (2.5 Å), Thr195 (2.4 Å), Glu234 (2.7 Å). In this first analysis of distance between molecules we ended with Figure 4C, using as a reference the 4EKL protein with the following residues interacting with the molecules: Thr160 (2.7 Å), Glu278 (1.9 Å), Lys276 (2.4 Å), Asn279 (2.1 Å), Glu441 (2.3 Å). All proteins with at least 5 residues interacting with a distance of less than 3 Å, except 4GV1, which has two interactions that are between 3 and 3.5 Å.

Compound 1967 (Genetin-E) stands out among others with binding energy of -11.7 kcal/mol. The consistence of the binding energy and geometries of this compound with different protein structures (4GV1, 4EKL and 4EKK) reinforces the consistency and robustness of this interaction despite structural differences in the target pocket. Genetin-E is a phenylpropanoid found in the species of *Gnetum schwackeanum* and *Gnetaceae Gnetum leybodii*, popularly known as Melinjo, and present in the Amazon region, but with incidences in other countries such as India and the Pacific islands (Lins et al., 1982; Tani et al., 2020). Above we see the position of the PDC found in these plants interacting with the AKT1 protein varieties in this study. Each ligand reacts with at least 5 residues and with a distance of up to 3.5 Å, which demonstrates a good interaction, demonstrating significant and more specific contact points than those found in crossDocking. The compounds found are part of the phenylpropanoid group. These molecules are found in the literature assimilated to anti-rheumatic (SUN et al., 2020), anti-inflammatory (YANG et al., 2021) functions and recent work demonstrates apoptotic activity in the pathway PI3K/AKT/mTOR metabolism (QI et al., 2021).

Some residues that interact with the ligand are critical for the regulation of the protein, as they are part of site 1, where an ATP molecule is located in its active form. The amino acid Thr195 participates in the activation loop of the AKT protein (Hill and Hemmings, 2002) and the amino acids Glu198 and Glu234 are amino acids that normally involve metal cations, essential for the stabilization of ATP at the binding site (Mingyu Li et al., 2021).

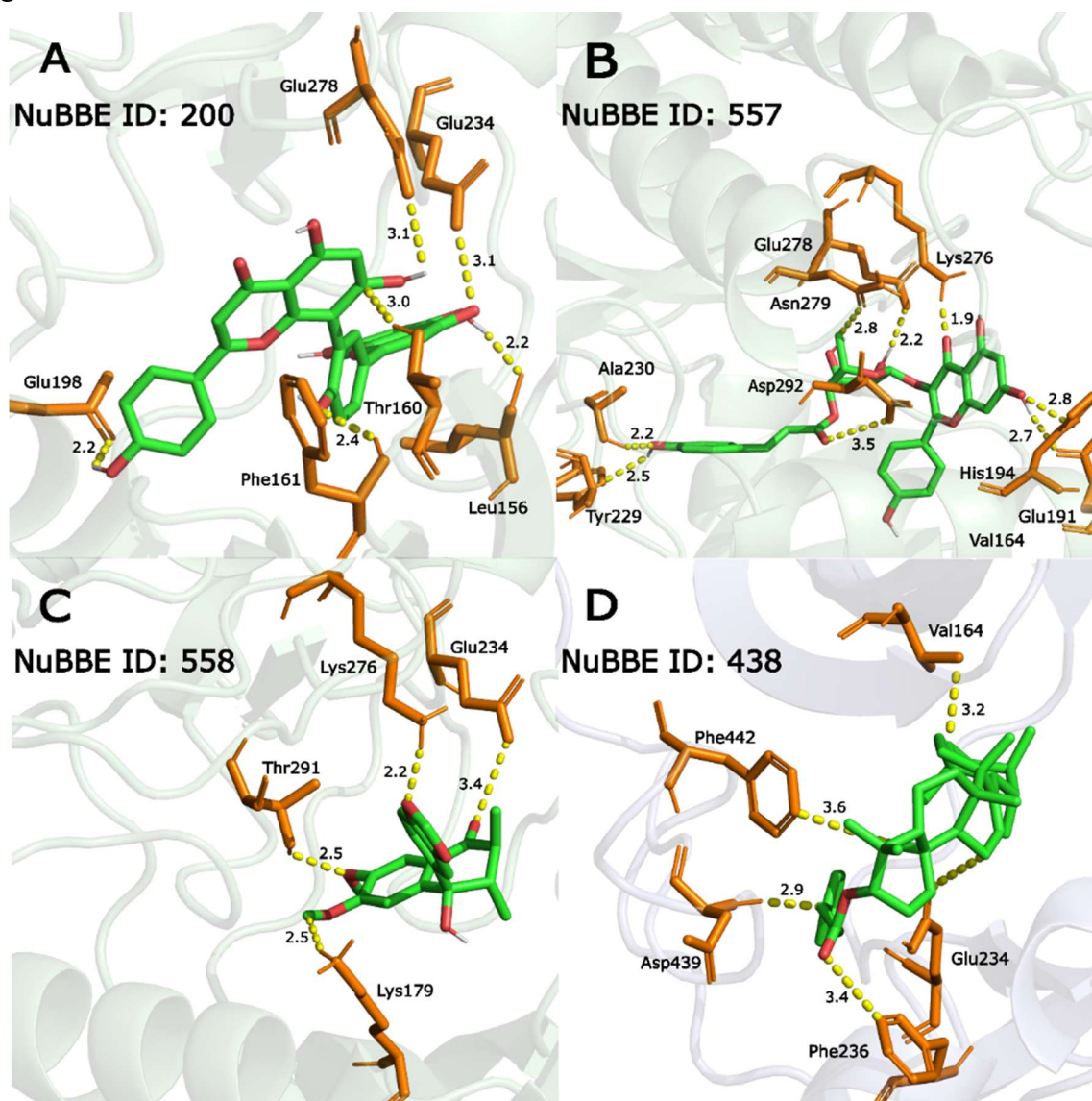
The Asn and Gly residues in several kinases have been shown to be an important part for the structure and formation of a binding space for ATP, somehow orienting and leaving the cavity formed more selectively (Vulpetti et al., 2004). In the case of AKT, we found these aforementioned residues interacting with the PDCs at position Asn270 and Gly294. Which indicates an interesting interaction for a possible inhibitor of this studied site, in addition to the fact that the aforementioned molecule had a better binding energy with the protein and

presented a closer distance when compared to the proteins that participated in the *Self-* and *cross-Docking*.

We emphasize that this plant ligand maintains a connection with some of the same residues found binding to molecules rescued from the crystallized PDB. We take as an example the ANP ligand, which maintains a close interaction mainly with the residues Lys158, Glu234 and Glu278, which are also interacting with the COV found. The residues that interact in common between PDC and the ligands 0RF and 0XZ are Glu234 and Glu278, but with a much lower RMSD in the plant compound. Finally, compared to Ligand EX4, COV shows a similarity in the interaction with residues Glu28, Ala230 and Glu234.

The second stronger molecule is compound 200, which shows interaction with a maximum distance of 3.1 Å at the residue of Glu234 and Glu278. Its other close interactions are with the residues Leu156, 2.2Å away, the amino acid Thr160, interacting 3Å away, Phe161, 2.4Å away and the amino acid Glu198, 2.2Å away. Comparing with the *Self-Docking* results, only residues Glu234 and Glu278 also interact with known crystallized molecules. This molecule is known as Amentoflavone, a biflavonoid found in *Ouratea multiflora*, a plant endemic to the Brazilian Atlantic forest. (Carbonezi et. al., 2007). The next compounds, we can see in figure 5, the proteins after EbVS, with PDCs of energy varying between -11.3 to -10.9, except compound 1967 which interacts with the 4EKL protein. In image 5A we find the molecule NuBBE ID: 200, with six interactions that vary between 2.2 and 3.1 Å. Below we find image 5B with molecule 557 with 8 interactions, all with a proximity of less than 2.9 Å, and the compound's bond with Ly276 has the shortest space found of 1.9 Å. To the right of the image 5C, we can find molecule 558 to its right with 4 well-established interactions, and only one above 3Å. In the 5D image, we can find five bonds that vary between 2.9 and 3.6Å, of the molecules found, these are the largest distances.

Figure 5 – Proteins after EbVS, with four PDCs.



Source – Prepared by the author

The compounds NuBBE Id: 557 and 558, are obtained from the same plant species *Qualea grandiflora* and are diastereoisomeric, the first compound is known as Kaempferol-3-O- α -L-(4"-E-p-coumaroyl)-rhamnoside and the second, called Kaempferol-3-O- α -L-(4"-Z-p-coumaroyl)-rhamnoside. These flavonoids have binding energies of -11.1 and -11.3 respectively. The EbVS result of these compounds brings curious information as their interactions with the protein residues are completely different from the other identified compounds, despite being very similar chemically and interacting with a similar energy. We obtained interactions between compound 557 and the AKT1 protein mainly through the residues Glu191 with a distance of 2.7Å, Hist194 interacting at 2.8Å, Tyr229 with 2.5Å, Ala230 with a space of 2.2Å, Lys276 having the shortest distance of 1.9Å, Glu278 with 2.2Å and

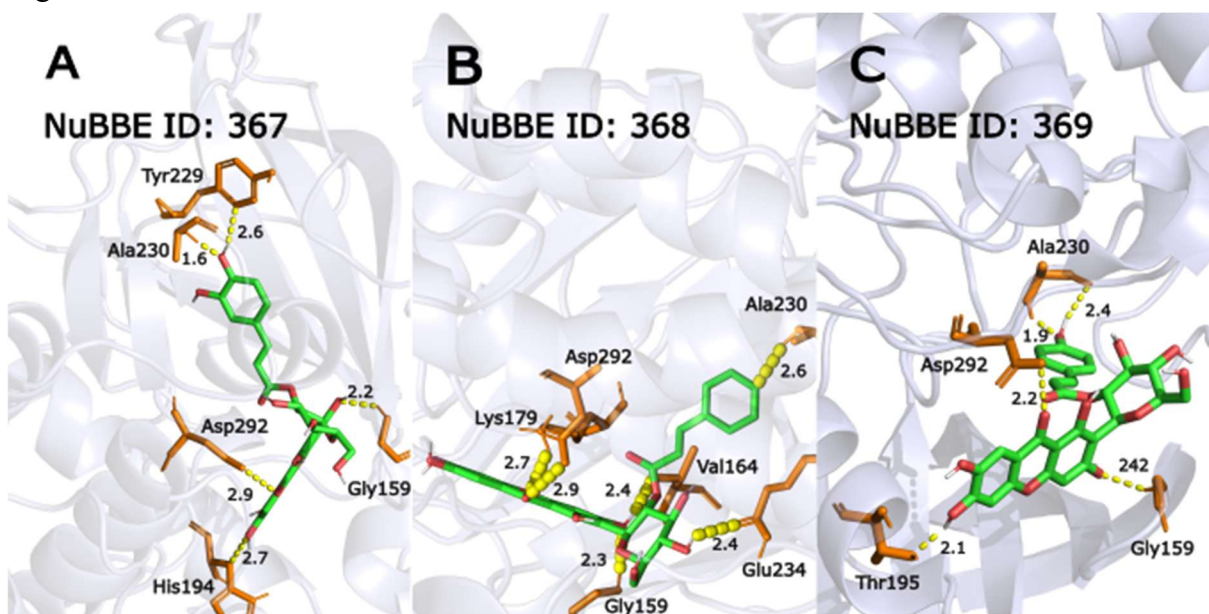
Aps292 delivering the smallest distance between these bonds, of 3.5Å. When comparing with the *crossDocking* results, we noticed that residues Ala230 and Glu278 are repeated motifs present in several results, but the other amino acids that relate to this compound are exclusive.

Flavonoid 558 interacts with some residues at distances of up to 3.4Å and the amino acids that bind to it are Lys179 (2.2Å), Glu234 (3.4Å), Lys276 (2.2Å), Thr291 (2.5Å). In this comparative stage, we identified residues in common with those analyzed in *crossDocking*, demonstrating a greater similarity with the ANP ligand that interacts with the amino acids Lys179, Glu234 and Thr291. These interactions suggest that PDC may imitate the function of the compound that inhibits the AKT1 protein or compete for the same binding site, causing a change in enzymatic modulation.

Our fourth PDC in energy and fifth mentioned so far in this work, is found after the EbVS process with an energy of -11.1 and has NuBBE Id: 438. It is extracted from *Himatanthus sucuuba*, a plant native to the Amazon also known as *sucuúba*. This molecule belongs to the terpene class, and its specificity is a triperpenoid called α -Amyrin cinnamate (Silva et. al., 1998). Their connection, despite being among the most energetic, presents a greater distance than the results discussed so far. The interacting residues are: Val164 (3.2Å), Phe236 (3.4Å), Glu234 (3.6Å), Asp439 (2.9Å) and Phe442 (3.6Å). Look at the last residues that are diluted in the C-Cterminal tail, which may demonstrate an interaction of this compound with the molecule in a different way than those found so far.

Molecules after the EbVS process derived from *Arrabidaea samydoides*. Figure 6A is the NuBBE compound ID 367 that has five bonds very close to known residues of the AKT1 protein. We noticed that one residue in particular is very close to the molecule, being only 1.6Å away, demonstrating a very strong interaction. In Figure 6B, the compound is its isomer NuBBE ID 368, it interacts by making 6 bonds with a distance of less than 2.9 Å, which also suggests a very important interaction. The last image is figure 6C, which shows the molecule NuBBE Id 369, in it we notice 4 amino acid residues and 5 bonds, all with a maximum distance of 2.8 Å.

Figure 6 – Molecules after the EbVS.



Source – Prepared by the author

The last molecules analyzed in this work have NuBBE Id: 367, 368 and 369. All with very similar energy, the first two with -11 and the last with -10.9. These molecules are found in *Arrabidaea samydoides*, a plant from southeastern Brazil. The molecules extricated from this plant are called 2-(2'-O-trans-caffeoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxanthone, 2-(2'-O-trans-cinnamoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxanthone and 2-(2'-O-transcoumaroyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxanthone, all These molecules belong to the Xanthone class of Aromatic derivatives.

The residues that are part of the interaction with compound 367 are Gly159 (2.2Å), His194 (2.7Å), Tyr229 (2.6Å), Ala230 (1.6Å) and Asp292 (2.9Å). The ligand is very close to Alanine residue 230, which may be indicative of a favorable interaction at the binding site. This amino acid appears to be a key residue for the binding of ATP and other molecules, as it is present in all proteins crystallized in the PDB, binding to the competitive inhibitor. As the 367 molecule also makes this connection and has a very short space, it could be a good candidate to also become a competitive inhibitor. Apart from Ala230, this compound has no bonds in common with those found in the crossdocking validation, which could mean that this compound binds in a slightly different way and could induce the formation of another conformation of the protein, which could result in alternative inhibitions. to those known.

The NuBBE Id 368 molecule has several close bonds with residues of the AKT1 protein after the use of EbV. Their interactions are favorable to protein-ligand stability because

the distance between them is very small. The interactions are with Gly159 (2.3Å), Val163 (2.4Å), Lys179 (2.7Å), Ala230 (2.6Å), Glu234 (2.4Å) and Asp292 (2.9Å). Like the previous compound, it has interactions with residues of Gly159 and Asp292, which could mean a strong interaction as an inhibitor of this protein, as these amino acids are located forming the active site pocket of the AKT1 kinase. Residues Lys179 and Glu234 are amino acids that have already interacted with crystal molecules, therefore, this reinforces that compound 368 has a similar connection to compounds that have already been experimentally validated and these residues are often involved in connections with the AKT protein, mainly because it is found close to metal cations, such as Mn⁺ found in the 4EKK protein (Lin et. al., 2012).

Finally Compound the last compound selected for analysis and discussion in this work was NuBBE id 369. Like its isomers, some interactions are similar, for example the bond with the amino acids Gly159, Asp292 and Ala230. The first two are part of the binding pocket and the third was present in all crystals covered in this research. The distance of the amino acid Gly159 was 2.4Å, that of Asp292 was 2.4Å and interestingly with the Ala230 residue we found two interactions. The first bond with this amino acid had a short space of 1.9 Å and the second interaction in the carbonyl moiety had 2.4 Å of space. In addition to the residues mentioned, it also makes a connection with Thr195 at a distance of 2.1 Å.

4 CONCLUSIONS

This work explore the available conformational diversity of AKT1 to identify, among compound of plant origin, molecules with ability to strongly bind to the catabilitic site of AKT. Ensemble-based *Virtual Screening* approach identified the flavonoid compound Genetin-E (NuBBE ID: 1967), found in the Amazonian species of *Gnetum schwackeanum* and *Gnetaceae Gnetum leyboldii*, the biflavonoid Amentoflavone (NuBBE ID: 200), the compounds Kaempferol-3-O- α -L-(4"-E-p-coumaroyl)-rhamnoside (NuBBE ID: 557), Kaempferol-3-O- α -L-(4"-Z-p-coumaroyl)-rhamnoside (NuBBE ID: 558), α -Amyrin cinnamate (NuBBE ID: 558) and the isomeres 2-(2'-O-trans-cinnamoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone (NuBBE ID: 367), 2-(2'-O-trans-caffeoyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone(NuBBE ID: 368), 2-(2'-O-transcoumaroyl)-C- β -D-glucopyranosyl-1,3,6,7-tetrahydroxyxanthone(NuBBE ID: 369) as a promising ATP competitors. These results shed light on the pharmacological advantages ofered among the vast chemodiversity available in natural compoud databases, and open up new possibilities for the rational design of new AKT inhibitors.

REFERENCES

ADDIE, M. et al. Discovery of 4-Amino- *N*-((1*S*)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl)-1-(7-*H*-pyrrolo(2,3-*d*)pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an Orally Bioavailable, Potent Inhibitor of AKT Kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 2059–2073, 14 mar. 2013.

AGGARWAL, R. et al. Single-dose ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 followed by maintenance pembrolizumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: an open-label, dose-expansion, phase 1 trial. **The Lancet Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1266–1276, 1 nov. 2023.

ALZHRANI, W. M. et al. Investigating a Library of Flavonoids as Potential Inhibitors of a Cancer Therapeutic Target MEK2 Using in Silico Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, 1 mar. 2023.

ARTHUR, A. et al. A CT-based radiomics classification model for the prediction of histological type and tumour grade in retroperitoneal sarcoma (RADSARC-R): a retrospective multicohort analysis. **The Lancet Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1277–1286, 1 nov. 2023.

ASHWELL, M. A. et al. Discovery and Optimization of a Series of 3-(3-Phenyl-3-*H*-imidazo(4,5-*b*)pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: Orally Bioavailable, Selective, and Potent ATP-Independent AKT Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5291–5310, 14 jun. 2012.

AYRES, M. C. C. et al. químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: atribuição dos dados de RMN de dois flavonóides glicosilados acilados diastereoisoméricos. **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1481–1484, 2008.

BENCSIK, J. R. et al. Discovery of dihydrothieno- and dihydrofuropyrimidines as potent pan AKT inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 23, p. 7037–7041, dez. 2010.

CARPEN, J. D. et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 439–444, 4 jul. 2007.

CARTLIDGE, R. A. et al. The tRNA methylase METTL1 is phosphorylated and inactivated by PKB and RSK in vitro and in cells. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 9, p. 1696–1705, 5 abr. 2005.

CHAKRABORTY, S. et al. Targeting Dynamic ATP-Binding Site Features Allows Discrimination between Highly Homologous Protein Kinases. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 6, p. 1249–1259, 21 jun. 2019.

CHENG, S.; NIV, M. Y. Molecular Dynamics Simulations and Elastic Network Analysis of Protein Kinase B (AKT/PKB) Inactivation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 9, p. 1602–1610, 27 set. 2010.

CHU, N. et al. AKT Kinase Activation Mechanisms Revealed Using Protein Semisynthesis. **Cell**, v. 174, n. 4, p. 897- 907.e14, 9 ago. 2018.

DU, K.; TSICHLIS, P. N. Regulation of the AKT kinase by interacting proteins. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7401–7409, 14 nov. 2005.

FREEMAN-COOK, K. D. et al. Design of Selective, ATP-Competitive Inhibitors of AKT. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4615–4622, 24 jun. 2010.

GAMA, S. M. et al. AKT inhibition interferes with the expression of immune checkpoint proteins and increases NK-induced killing of HL60-AML cells. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 21, p. eAO0171, 2023.

HILL, M. M.; HEMMING, B. A. Inhibition of protein kinase B/AKT. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 2–3, p. 243–251, fev. 2002.

KALLAN, N. C. et al. Discovery and SAR of spirochromane AKT inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, p. 2410–2414, abr. 2011.

LAPIERRE, J.-M. et al. Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3 *H*-imidazo(4,5- *b*)pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6455–6469, 14 jul. 2016.

LIN, K. et al. An ATP-Site On-Off Switch That Restricts Phosphatase Accessibility of AKT. **Science Signaling**, v. 5, n. 223, 8 maio 2012.

LINS, A. P. et al. Gnetins: Resveratrol Oligomers From Gnetum Species. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 6, p. 754–761, 1 nov. 1982.

LIU, T. et al. Advances of phytotherapy in ischemic stroke targeting PI3K/AKT signaling. **Phytotherapy Research**, v. 37, n. 12, p. 5509–5528, 28 dez. 2023.

LIPPA, B. et al. Synthesis and structure based optimization of novel AKT inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 11, p. 3359–3363, jun. 2008.

MCHARDY, T. et al. Discovery of 4-amino-1-(7H-pyrrolo(2,3-d)pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamides as selective, orally active inhibitors of protein kinase B (AKT). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 2239–2249, 11 mar. 2010.

MILBURN, C. C. et al. Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. **Biochemical Journal**, v. 375, n. 3, p. 531–538, 1 nov. 2003.

MILLS, S. J. et al. Novel Inositol Phospholipid Headgroup Surrogate Crystallized in the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B α . **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 242–246, abr. 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019**. **Journal of Natural Products**American Chemical Society, , 27 mar. 2020.

PARTHASARATHY, S. et al. Discovery of chiral dihydropyridopyrimidinones as potent, selective and orally bioavailable inhibitors of AKT. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 10, p. 1887–1891, jun. 2018.

PAULETTI, P. M. et al. New Antioxidant C -Glucosylxanthones from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384–1387, 1 out. 2003.

PILON, A. C. et al. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7215, 3 ago. 2017.

QUAMBUSCH, L. et al. Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve AKT Isoform-Selectivity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 52, p. 18823–18829, 19 dez. 2019.

QUAMBUSCH, L. et al. Cellular model system to dissect the isoform-selectivity of AKT inhibitors. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 5297, 6 set. 2021.

SCOTT, S. E. et al. Future cancer risk after urgent suspected cancer referral in England when cancer is not found: a national cohort study. **The Lancet Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1242–1251, 1 nov. 2023.

SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand *Docking* and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417–422, 2010.

SHAMSARA, J. CrossDocker: a tool for performing cross-*Docking* using Autodock Vina. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 344, 17 dez. 2016.

SILVA, J. R. DE A. et al. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sucuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, v. 21, n. 6, p. 702–704, nov. 1998.

TANI, H. et al. Structural Studies on Stilbene Oligomers Isolated from the Seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). **ACS Omega**, v. 5, n. 21, p. 12245–12250, 2 jun. 2020.

THE LANCET ONCOLOGY. **Cancer caught in the crossfire. The Lancet Oncology** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2023.

THOMAS, C. C. et al. High-Resolution Structure of the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B/AKT Bound to Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate. **Current Biology**, v. 12, n. 14, p. 1256–1262, jul. 2002.

TRUEBESTEIN, L. et al. Structure of autoinhibited AKT1 reveals mechanism of PIP₃-mediated activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 33, 17 ago. 2021.

UHLENBROCK, N. et al. Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase AKT. **Chemical Science**, v. 10, n. 12, p. 3573–3585, 2019.

VULPETTI, A.; BOSOTTI, R. Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. **Il Farmaco**, v. 59, n. 10, p. 759–765, out. 2004.

WEISNER, J. et al. Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in *KRAS*-Mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 9, p. 2367–2378, 1 maio 2019.

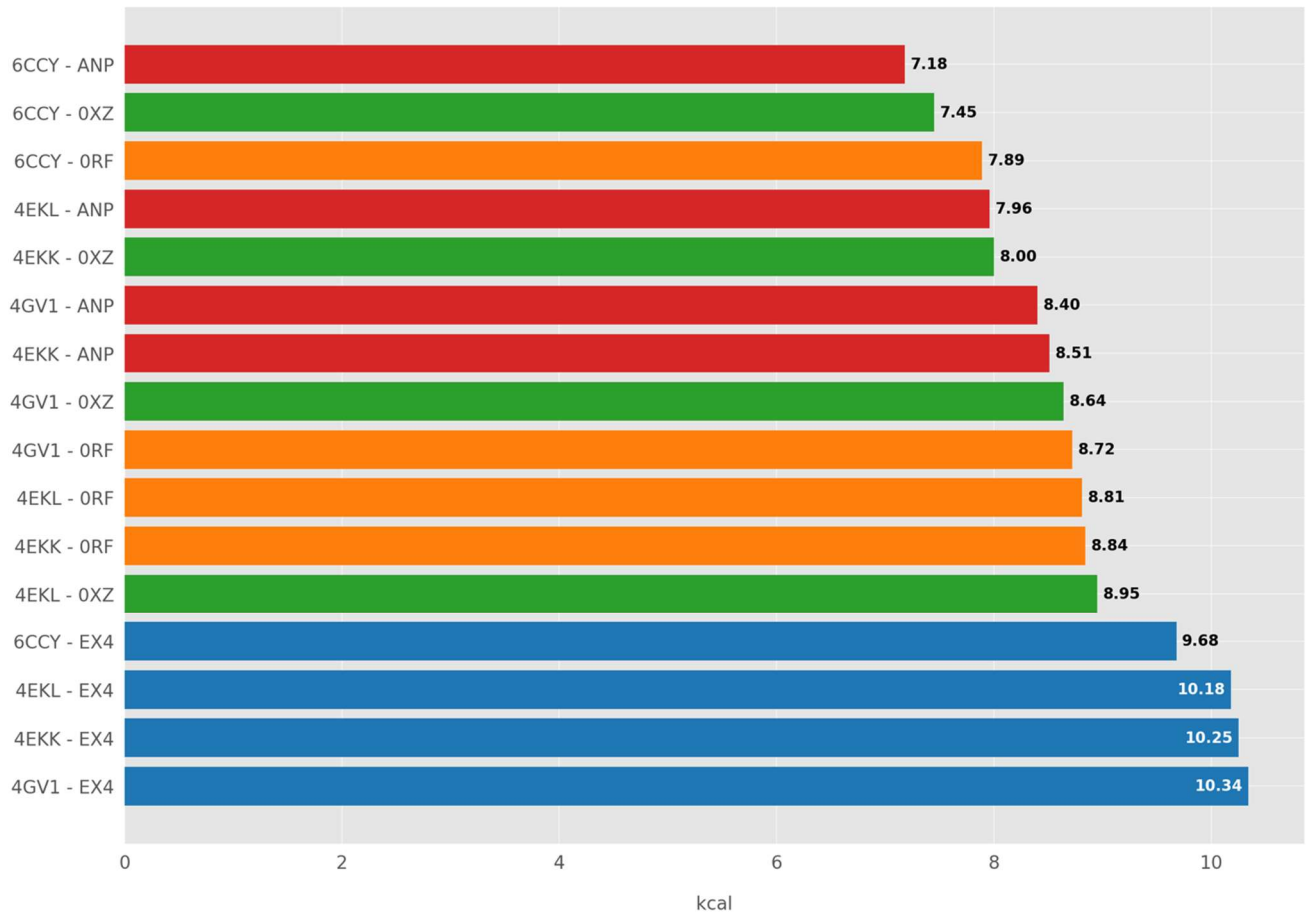
WILKINSON, L.; GATHANI, T. **Understanding breast cancer as a global health concern. British Journal of Radiology** British Institute of Radiology, , 2022.

WU, W.-I. et al. Crystal Structure of Human AKT1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12913, 23 set. 2010.

XU, R. et al. Discovery of spirocyclic sulfonamides as potent AKT inhibitors with exquisite selectivity against PKA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, p. 2335–2340, abr. 2011.

In the following scheme we identify schematic representations of protein-ligand interactions, prioritizing the main interactions that can stabilize the complex such as hydrogen bonds, salt bridges and fundamental non-covalent forces. The representation of hydrogen bonds is indicated by blue dashed lines, suggesting the presence of specific spatial complementarity between the ligand and the amino acid side chains capable of donating or accepting hydrogen atoms. These interactions are crucial for the specificity of ligand binding and are typically observed at a distance of approximately 2-3 Ångströms. The presence of salt bridges, represented by red dashed lines, is indicative of electrostatic complementarity between charged groups, which often contributes to the binding free energy of the complex. The color coding of amino acid residues provides immediate insight into the chemical nature of the binding site: green for polar, red and pink for charged, white for nonpolar, and yellow for aromatic residues. These residues are positioned to suggest their involvement in ligand binding through several types of interactions: polar and charged residues are involved in electrostatic interactions and hydrogen bonding, while nonpolar and aromatic residues are likely involved in hydrophobic S-stacking interactions and π , respectively.

Supplementary figure 2 – Bar graph of the interaction energy of proteins recovered from the PDB and their ligands, after removal of the ligands and in silico rebinding.



Source – Prepared by the author

Note that each color refers to a specific ligand, on the left we have the 4 main proteins used in this research. Each bar brings one of the ligands found next to the crystal corresponding to the recovered protein. The 4 best energies vary between -9 and -10.5 and are from the same EX4 ligand that was found next to the 6CCY protein.

6 DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta pesquisa, abordam técnicas de estudo no campo da bioinformática e da bioquímica vegetal. A grande quantidade de dados tratados refere-se em especial a identificação de compostos de origem vegetal, naturais e de plantas oriundas do Brasil, com potencial terapêutico contra a hiperativação de uma proteína relacionada a diversos câncer (Sementino et al., 2018). Destaca-se que os protocolos de validação e os cuidados com o tratamento dos dados foram prioridade no desenvolvimento deste trabalho, abrangendo desde a seleção das proteínas do Protein Data Bank (PDB), protonação, conversão de moléculas, modelagem, validação e análises. Os *Docking* moleculares foram feitos várias vezes até conseguir ter eficiência na produção dos dados deste trabalho. Se faz necessário cumprir esses protocolos para que possa ser mimetizado o mais próximo possível estados orgânicos (Xia, 2017).

A aplicação do Ensemble-based *Virtual Screening* (EbVS) para avaliar aproximadamente 1800 compostos de origem vegetal destaca-se como uma estratégia eficaz, pois a descoberta de novas ações e funcionalidades de moléculas, por vezes esquecidas em banco de dados, nos dar uma relevância social e científica. Esta técnica não permite identificar apenas um composto promissor, com potencial inibitório, mas também demonstra a relevância de diversos compostos ao mesmo tempo em um sítio específico (Amaro; Li, 2010).

Análises mais detalhadas de conformações, interações com resíduos e suas distancias foram feitas com o software PyMol, que com o auxílio humano, pode detalhar melhor como as ligações são feitas (Dilip et al., 2016). Entre os resultados mais promissores encontramos um flavonoide, de nome Genetin-E (NuBBE ID: 1967), como um composto de alta afinidade pela proteína AKT1. Foram encontradas energias de ligação de -11.7kCal deste composto, apresentando uma interação favorável em múltiplas conformações estudadas. Dentre as 10 melhores energias, ele apareceu três vezes.

Este composto pode ser encontrado em espécies associadas a florestas de terra firme como a Amazônia. Plantas trepadeiras, de pequeno a médio porte, nativas do Brasil, mas com parentesco direto a plantas do sul do continente africano. As principais espécies que possuem o composto Genetin-E são *Gnetum schwackeanum* e *Gnetum leyboldii*. O composto apresentou boas ligações com resíduos chaves no sítio ativo da proteína cinase AKT1, podendo ser considerado um potencial alvo inibidor competitivo deste sítio. O Aminoácido Thr195, é conhecido por participar da alça de ativação, os resíduos Glu198 e Glu234 estão envolvidos em

interações com cátions metálicos, auxiliando na estabilização do ATP e o flavonoide mimetiza bem as interações com uma distância menor que 3Å. Isto demonstra que ele pode ser um inibidor competitivo, potencialmente ao interferir na fosforilação da proteína. Sabe-se que sem fosforilação a proteína não tem eficiência e pode retornar à conformação auto inibida.

Além do Genetin-E, temos o biflavonoide Amentoflavone (NuBBE ID: 200) que apresenta boas interações nas distancias de suas ligações e mais próximas ainda com os resíduos Glu234 e Glu278 que estão envolvidos no sítio de ativo da proteína. Outro flavonoide que aparece em conformações diastereoisoméricas (NuBBE Ids: 557 e 558), apresenta ligações diferenciadas com a mesma proteína, sugerindo que há outras possibilidades de inibições. Este trabalho pode ser chave para que sejam descobertas novas formas de inibições e encontrados inibidores da proteína AKT1, explorando principalmente as diferentes interações feitas com os compostos estudados. O triterpenoide (NuBBE ID: 438) se relacionou com resíduos presentes na cauda C-terminal, demonstrando uma alternativa diferente das formas conhecidas de inibição. As moléculas derivadas da *Arrabidaea samydoidea* (NuBBE IDs: 367, 368 e 369) pertencem à classe de derivados aromáticos de xantonas. Essas moléculas apesar de muito similares apresentam uma diversidade no complexo produzido entre proteína-ligante.

A classe de compostos que mais apareceu nos resultados foi a dos flavonoides, englobando as moléculas NuBBE ID: 1967, 200, 557 e 558. Além dos flavonoides, encontramos um triterpenoide, ambos caracterizados por possuírem compostos fenólicos em sua estrutura e serem sintetizadas pela via fenilpropanoide em diversas plantas (Vogt, 2010). Essas moléculas são encontradas na literatura assimiladas a funções anti-reumáticas (Sun et al., 2020), anti-inflamatória (Yang et al., 2021) e trabalhos recentes demonstram atividade apoptótica em vias relacionadas a proteína de estudo deste trabalho (Qi et al., 2021). Os fenilpropanoides já são alvos de pesquisas em células vivas em diversas condições, uma pesquisa recente demonstra um composto desta classe com ações neurotróficas (Qin et al., 2021) e ligadas a potenciais tratamentos a Alzheimer (Abouelela et al., 2020; Kolaj; Imindu Liyanage; Weaver, 2018). Isso demonstra que os compostos dessa classe já estão sendo utilizados em pesquisas terapêuticas diversas, sem demonstrar tantos danos às células.

Afunilando as informações sobre a classe de compostos nos próprios flavonoides, encontram-se pesquisas aplicadas a via de sinalização da AKT1, com alguns resultados em animais. Em ratos o flavonoide da planta alcaçuz induz a apoptose das células de úlcera gástrica induzida por álcool (Guo et al., 2024) e o flavonoide da leguminosa *Pueraria sp.* induz a autofagia das células de lipose hepática em ratos obesos (Sun et al., 2023). Em porcos o

flavonoide Deguelin diminui significativamente a motilidade do espermatozoide sem causar danos consideráveis às células (Lee et al., 2023). Esses trabalhos elucidam que há potencial terapêutico para o uso de flavonoides, sem que ajam danos significativos às células. Em seres humanos utilizaram o composto retirado da planta *Chamisa sp.* e obtiveram inibições da via PI3K/AKT em células de melanomas, indicando que já há resultados clínicos de compostos com células cancerígenas.

Nesse contexto, as moléculas encontradas neste trabalho se tornam cada vez mais promissoras, justamente pelo seu potencial inexplorado. Ao buscar dados sobre o Genetin-D, melhor composto que interage com a proteína AKT1, não foram encontradas informações que relacionadas a vias metabólicas ou pesquisas envolvendo cultura de células. Esta lacuna de informações sugere que haja espaço para o desenvolvimento de pesquisas mais aprofundadas sobre o assunto. Finda-se que, pelo espaço e utilização específica deste composto na interação com AKT1, esta pesquisa mostra-se precursora e pioneira na possível utilização desses compostos como alvos terapêuticos em células cancerígenas.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho explora a diversidade conformacional disponível da AKT1 para identificar, entre compostos de origem vegetal, moléculas com capacidade de se ligarem fortemente ao sítio catalítico da AKT. A pesquisa ressaltou a importância da seleção de um sítio específicos da proteína AKT para a investigação, conduzindo a uma análise que permitiu identificar oito compostos de origem vegetal com valores de energia de ligação promissores, variando entre -11.7 a -10.9 kcal/mol. As técnicas utilizadas foram para detectar bons protocolos a fim de conseguir encaixar diversas possíveis moléculas no sítio estudado.

A abordagem de triagem *Virtual* baseada em conjunto identificou o composto flavonóide Genetina-E (NuBBE ID: 1967), encontrado nas espécies amazônicas de *Gnetum schwackeanum* e *Gnetaceae Gnetum leyboldii*, o biflavonóide Amentoflavona (NuBBE ID: 200), os compostos Kaempferol-3-O- α -L-(4"-E-p-coumaroil)-ramnosídeo (NuBBE ID: 557), Kaempferol-3-O- α -L-(4"-Z-p-coumaroil)-ramnosídeo (NuBBE ID: 558) , cinamato de α -amirina (NuBBE ID: 558) e os isômeros 2-(2'-O-trans-cinamoil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona (NuBBE ID: 367) , 2-(2'-O-trans-cafeoil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona (NuBBE ID: 368), 2-(2'-O-transcumaroil)-C- β -D-glucopiranosil-1,3,6,7-tetrahidroxixantona (NuBBE ID: 369) como um concorrente promissor do ATP.

Estes resultados esclarecem as vantagens farmacológicas oferecidas entre a vasta quimiodiversidade disponível em bases de dados de compostos naturais e abrem novas possibilidades para o desenho racional de novos inibidores de AKT.

8 PERSPECTIVAS

- Explorar com mais detalhes as interações proteína-ligante por meio de Dinâmica e cálculos quânticos. A fim de conhecer os movimentos entre as moléculas nos complexos livres.
- Continuar estudos de *Docking* e Dinâmica molecular para saber se a molécula pode interagir com proteínas da mesma via.
- Estudos de farmacocinética e farmacodinâmica para detectar a absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos compostos encontrados.
- Avaliação de compostos complementares como potencializador da interação.
- Desenvolver projeto de Doutorado com avaliações *in vitro* das interações a partir dos resultados encontrados.

REFERÊNCIAS

- ABOUELELA, M. E. et al. Anti-Alzheimer's flavanolignans from *Ceiba pentandra* aerial parts. **Fitoterapia**, v. 143, p. 104541, jun. 2020.
- ADDIE, M. et al. Discovery of 4-Amino- *N* -[(1 *S*)-1-(4-chlorophenyl)-3-hydroxypropyl]-1-(7 *H* -pyrrolo[2,3- *d*]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamide (AZD5363), an Orally Bioavailable, Potent Inhibitor of AKT Kinases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 5, p. 2059–2073, fev. 2013.
- AGGARWAL, R. et al. Single-dose ¹⁷⁷Lu-PSMA-617 followed by maintenance pembrolizumab in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer: an open-label, dose-expansion, phase 1 trial. **The Lancet Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1266–1276, 1 nov. 2023.
- AHMAD, Z.; SOMANATH, P. R. AKT Isoforms in the Immune Response in Cancer. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 436, p. 349–366, 2022.
- AI, K. et al. AKT1/mTORC1 signaling modulates adaptive immune response of Nile tilapia by promoting lymphocyte activation and proliferation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 119, p. 104042, 1 jun. 2021.
- ALESSI, D. R. et al. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . **Current Biology**, v. 7, n. 4, p. 261–269, 1997.
- ALTOMARE, D. A. et al. Human and mouse mesotheliomas exhibit elevated AKT/PKB activity, which can be targeted pharmacologically to inhibit tumor cell growth. **Oncogene**, v. 24, n. 40, p. 6080–6089, 8 set. 2005.
- ALZHRANI, W. M. et al. Investigating a Library of Flavonoids as Potential Inhibitors of a Cancer Therapeutic Target MEK2 Using in Silico Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, 1 mar. 2023.
- AMARO, R.; LI, W. Emerging Methods for Ensemble-Based *Virtual Screening*. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 1, p. 3–13, 1 jan. 2010.
- ANANDAPADAMANABAN, M. et al. Architecture of human Rag GTPase heterodimers and their complex with mTORC1. **Science**, v. 366, n. 6462, p. 203–210, fev. 2019.
- ANTUNES, D. A. et al. General Prediction of Peptide-MHC Binding Modes Using Incremental *Docking*: A Proof of Concept. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 4327, 12 mar. 2018.
- ARTHUR, A. et al. A CT-based radiomics classification model for the prediction of histological type and tumour grade in retroperitoneal sarcoma (RADSARC-R): a retrospective multicohort analysis. **The Lancet Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1277–1286, 1 nov. 2023.

- ASHWELL, M. A. et al. Discovery and Optimization of a Series of 3-(3-Phenyl-3 *H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)pyridin-2-amines: Orally Bioavailable, Selective, and Potent ATP-Independent AKT Inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5291–5310, fev. 2012.
- BAE, H. et al. PH domain-mediated autoinhibition and oncogenic activation of AKT. **eLife**, v. 11, fev. 2022.
- BANERJEE, S. et al. Hepatitis C Virus Core Protein Upregulates Serine Phosphorylation of Insulin Receptor Substrate-1 and Impairs the Downstream AKT/Protein Kinase B Signaling Pathway for Insulin Resistance. **Journal of Virology**, v. 82, n. 6, p. 2606–2612, 15 mar. 2008.
- BENCSIK, J. R. et al. Discovery of dihydrothieno- and dihydrofuropyrimidines as potent pan AKT inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 23, p. 7037–7041, fev. 2010.
- BLAKE, J. F. et al. Discovery of pyrrolopyrimidine inhibitors of AKT. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 19, p. 5607–5612, fev. 2010.
- BOTTEGONI, G. et al. Systematic Exploitation of Multiple Receptor Conformations for *Virtual Ligand Screening*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e18845, 17 mai. 2011.
- BROWN, J. S.; BANERJI, U. Maximising the potential of AKT inhibitors as anti-cancer treatments. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 172, p. 101–115, abr. 2017.
- CARBONEZI, C. A. et al. Bioactive flavone dimers from *Ouratea multiflora* (Ochnaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 319–324, set. 2007.
- CARPTEN, J. D. et al. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. **Nature**, v. 448, n. 7152, p. 439–444, fev. 2007.
- CARTLIDGE, R. A. et al. The tRNA methylase METTL1 is phosphorylated and inactivated by PKB and RSK in vitro and in cells. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 9, p. 1696–1705, 5 abr. 2005.
- CHAKRABORTY, S. et al. Targeting Dynamic ATP-Binding Site Features Allows Discrimination between Highly Homologous Protein Kinases. **ACS Chemical Biology**, v. 14, n. 6, p. 1249–1259, 21 jun. 2019.
- CHEN, T. et al. AKT1 phosphorylation of cytoplasmic ME2 induces a metabolic switch to glycolysis for tumorigenesis. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 686, 23 jan. 2024.
- CHENG, S.; NIV, M. Y. Molecular Dynamics Simulations and Elastic Network Analysis of Protein Kinase B (AKT/PKB) Inactivation. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 50, n. 9, p. 1602–1610, 27 set. 2010.
- CHU, N. et al. AKT Kinase Activation Mechanisms Revealed Using Protein Semisynthesis. **Cell**, v. 174, n. 4, p. 897–907, fev. 2018.

- CHU, N. et al. The structural determinants of ph domain-mediated regulation of AKT revealed by segmental labeling. **eLife**, v. 9, p. 1–23, 1 ago. 2020.
- CORRE, E. et al. Differential prognostic values of the three AKT isoforms in acute myeloid leukemia. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 7070, 25 mar. 2024.
- CROWLEY, L. C. et al. Quantitation of Apoptosis and Necrosis by Annexin V Binding, Propidium Iodide Uptake, and Flow Cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 11, p. pdb.prot087288, nov. 2016.
- DAI, C. et al. MiR-206 inhibits epithelial ovarian cancer cells growth and invasion via blocking c-Met/AKT/mTOR signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 104, p. 763–770, ago. 2018.
- DEL RE, M. et al. The amount of activating EGFR mutations in circulating cell-free DNA is a marker to monitor osimertinib response. **British Journal of Cancer**, v. 119, n. 10, p. 1252–1258, 6 nov. 2018.
- DILIP, A. et al. Ligand-based *Virtual Screening* interface between PyMOL and LiSiCA. **Journal of Cheminformatics**, v. 8, n. 1, p. 46, 7 dez. 2016.
- DOLINSKY, T. J. et al. PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. Web Server, p. W665–W667, 1 jul. 2004.
- DONG, C. et al. Activation of PI3K/AKT/mTOR Pathway Causes Drug Resistance in Breast Cancer. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 15 mar. 2021.
- DONIA, T. et al. Synergistic anticancer efficacy of polydatin and sorafenib against the MCF-7 breast cancer cell line via inhibiting of PI3K/AKT/mTOR pathway and reducing resistance to treatment. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 739, p. 150972, 20 dez. 2024.
- DU, K.; TSICHLIS, P. N. Regulation of the AKT kinase by interacting proteins. **Oncogene**, v. 24, n. 50, p. 7401–7409, 14 nov. 2005.
- DÜRR, L. et al. High-Content *Screening* Pipeline for Natural Products Targeting Oncogenic Signaling in Melanoma. **Journal of Natural Products**, v. 85, n. 4, p. 1006–1017, 22 abr. 2022.
- ENGELMAN, J. A. Targeting PI3K signalling in cancer: opportunities, challenges and limitations. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 8, p. 550–562, ago. 2009.
- ERSAHIN, T.; TUNCBAG, N.; CETIN-ATALAY, R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. **Molecular bioSystems**, v. 11, n. 7, p. 1946–1954, 1 jul. 2015.
- FRAME, S.; COHEN, P.; BIONDI, R. M. A Common Phosphate Binding Site Explains the Unique Substrate Specificity of GSK3 and Its Inactivation by Phosphorylation. **Molecular Cell**, v. 7, n. 6, p. 1321–1327, jun. 2001.

FREEMAN-COOK, K. D. et al. Design of Selective, ATP-Competitive Inhibitors of AKT. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4615–4622, fev. 2010.

GAMA, S. M. et al. AKT inhibition interferes with the expression of immune checkpoint proteins and increases NK-induced killing of HL60-AML cells. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 21, p. eAO0171, 2023.

GASSEL, M. et al. Mutants of Protein Kinase A that Mimic the ATP-binding Site of Protein Kinase B (AKT). **Journal of Molecular Biology**, v. 329, n. 5, p. 1021–1034, jun. 2003.

GEORGE, B. et al. AKT1 Transcriptomic Landscape in Breast Cancer Cells. **Cells**, v. 11, n. 15, p. 2290, 25 jul. 2022.

GOMES-DA-SILVA, J. et al. Brazilian Flora 2020: Leveraging the power of a collaborative scientific network. **TAXON**, v. 71, n. 1, p. 178–198, 17 fev. 2022.

GONZALEZ, E.; MCGRAW, T. E. Insulin-modulated AKT subcellular localization determines AKT isoform-specific signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 17, p. 7004–7009, 28 abr. 2009a.

GONZALEZ, E.; MCGRAW, T. E. The AKT kinases: Isoform specificity in metabolism and cancer. **Cell Cycle**, v. 8, n. 16, p. 2502–2508, 15 ago. 2009b.

GUERAU-DE-ARELLANO, M.; PIEDRA-QUINTERO, Z. L.; TSICHLIS, P. N. AKT isoforms in the immune system. **Frontiers in immunology**, v. 13, 23 ago. 2022.

GUO, Y. et al. Licorice flavonoid ameliorates ethanol-induced gastric ulcer in rats by suppressing apoptosis via PI3K/AKT signaling pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 325, p. 117739, maio. 2024.

HAN, Z. et al. AKT1/protein kinase B α is involved in gastric cancer progression and cell proliferation. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, n. 7, p. 1801–1810, 1 jul. 2008.

HANADA, M.; FENG, J.; HEMMINGS, B. A. Structure, regulation and function of PKB/AKT - A major therapeutic target. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1697, n. 1–2, p. 3–16, 11 mar. 2004.

HASLINGER, P. et al. AKT isoforms 1 and 3 regulate basal and epidermal growth factor-stimulated sghpl-5 trophoblast cell migration in humans. **Biology of Reproduction**, v. 88, n. 3, 2013.

HAYAKAWA, Y. et al. Nerve Growth Factor Promotes Gastric Tumorigenesis through Aberrant Cholinergic Signaling. **Cancer Cell**, v. 31, n. 1, p. 21–34, jan. 2017.

HELL, T. et al. Flavonoids from *Ericameria nauseosa* inhibiting PI3K/AKT pathway in human melanoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 156, p. 113754, dez. 2022.

- HENNESSY, B. T. et al. Outcome After Pathologic Complete Eradication of Cytologically Proven Breast Cancer Axillary Node Metastases Following Primary Chemotherapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9304–9311, 20 dez. 2005.
- HILL, M. M.; HEMMING, B. A. Inhibition of protein kinase B/AKT. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 93, n. 2–3, p. 243–251, fev. 2002.
- HINZ, N.; JÜCKER, M. Distinct functions of AKT isoforms in breast cancer: a comprehensive review. **Cell Communication and Signaling**, v. 17, n. 1, p. 154, 21 dez. 2019.
- HOLLINGSWORTH, S. A.; DROR, R. O. Molecular Dynamics Simulation for All. **Neuron**, v. 99, n. 6, p. 1129–1143, set. 2018.
- JANSEN, V. M.; MAYER, I. A.; ARTEAGA, C. L. Is There a Future for AKT Inhibitors in the Treatment of Cancer? **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 11, p. 2599–2601, 1 jun. 2016.
- JIANG, Y. et al. MERTK mediated novel site AKT phosphorylation alleviates SAV1 suppression. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1515, 3 abr. 2019.
- KALLAN, N. C. et al. Discovery and SAR of spirochromane AKT inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, p. 2410–2414, fev. 2011.
- KANDEL, E. S.; HAY, N. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase AKT/PKB. **Experimental Cell Research**, v. 253, n. 1, p. 210–229, 25 nov. 1999.
- KE, Q. et al. Effects of thermostats/barostats on physical properties of liquids by molecular dynamics simulations. **Journal of Molecular Liquids**, v. 365, p. 120116, nov. 2022.
- KITCHEN, D. B. et al. *Docking and scoring in Virtual Screening for drug discovery: methods and applications*. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 11, p. 935–949, 1 nov. 2004.
- KOLAJ, I.; IMINDU LIYANAGE, S.; WEAVER, D. F. Phenylpropanoids and Alzheimer's disease: A potential therapeutic platform. **Neurochemistry International**, v. 120, p. 99–111, nov. 2018.
- KONTOYIANNI, M. *Docking and Virtual Screening in Drug Discovery*. p. 255–266. **Methods Mol Biol**. 2017.
- KRZEŚLAK, A.; POMORSKI, L.; LIPÍŃSKA, A. Expression, Localization, and Phosphorylation of AKT1 in Benign and Malignant Thyroid Lesions. **Endocrine Pathology**, v. 22, n. 4, p. 206–211, 6 dez. 2011.
- KUMARI, R.; KUMAR, R.; LYNN, A. *g_mmpbsa* —A GROMACS Tool for High-Throughput MM-PBSA Calculations. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 54, n. 7, p. 1951–1962, 28 jul. 2014.
- LAN, C.-Y. et al. Quercetin facilitates cell death and chemosensitivity through RAGE/PI3K/AKT/mTOR axis in human pancreatic cancer cells. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 27, n. 4, p. 887–896, out. 2019.

- LAPIERRE, J.-M. et al. Discovery of 3-(3-(4-(1-Aminocyclobutyl)phenyl)-5-phenyl-3 *H*-imidazo[4,5-*b*]pyridin-2-yl)pyridin-2-amine (ARQ 092): An Orally Bioavailable, Selective, and Potent Allosteric AKT Inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 13, p. 6455–6469, fev. 2016.
- LAZAR, I. M.; KONTOYIANNI, M.; LAZAR, A. C. (EDS.). **Proteomics for Drug Discovery**. New York, NY: Springer New York, v. 1647. 2017.
- LEE, W.-J. et al. The natural flavonoid compound deguelin suppresses sperm (*Sus Scrofa*) functions through abnormal activation of the PI3K/AKT pathway. **Reproductive Toxicology**, v. 120, p. 108426, set. 2023.
- LI, S. et al. Plasminogen activator inhibitor-1 in cancer research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 105, p. 83–94, set. 2018.
- LI, Y. et al. AKT inhibition sensitizes acute leukemia cells to S63845-induced apoptosis. **Hematology**, v. 28, n. 1, 31 dez. 2023.
- Lin K, Lin J, Wu WI, Ballard J, Lee BB, Gloor SL, Vigers GP, Morales TH, Friedman LS, Skelton N, Brandhuber BJ. An ATP-Site On-Off Switch That Restricts Phosphatase Accessibility of AKT. **Sci Signal**. v. 5, n. 223, maio. 2012.
- LIN, W. et al. RUNX1/EGFR pathway contributes to STAT3 activation and tumor growth caused by hyperactivated mTORC1. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 23, p. 387–401, 17 dez. 2021.
- LINS, A. P. et al. Gnetins: Resveratrol Oligomers From Gnetum Species. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 6, p. 754–761, 1 nov. 1982.
- LINTON, M. F.; MOSLEHI, J. J.; BABAEV, V. R. AKT Signaling in Macrophage Polarization, Survival, and Atherosclerosis. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 11, 1 jun. 2019.
- LIPPA, B. et al. Synthesis and structure based optimization of novel AKT inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, n. 11, p. 3359–3363, fev. 2008.
- LIU, T. et al. Advances of phytotherapy in ischemic stroke targeting PI3K/AKT signaling. **Phytotherapy Research**, v. 37, n. 12, p. 5509–5528, 28 dez. 2023.
- LU, X. et al. Quercetin reverses docetaxel resistance in prostate cancer via androgen receptor and PI3K/AKT signaling pathways. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 7, p. 1121–1134, 2020.
- LUBOFF, A. J.; DEREMER, D. L. Capivasertib: A Novel AKT Inhibitor Approved for Hormone-Receptor-Positive, HER-2-Negative Metastatic Breast Cancer. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 58, n. 12, p. 1229–1237, 2 dez. 2024.

- LUO, X. et al. Femtosecond laser micro-nano structured Ag SERS substrates with unique sensitivity, uniformity and stability for food safety evaluation. **Optics & Laser Technology**, v. 139, p. 106969, jul. 2021.
- MAIA, E. H. B. et al. Structure-Based *Virtual Screening*: From Classical to Artificial Intelligence. **Frontiers in Chemistry**, v. 8, 28 abr. 2020.
- MANNING, B. D.; CANTLEY, L. C. AKT/PKB Signaling: Navigating Downstream. **Cell**, v. 129, n. 7, p. 1261–1274, 29 jun. 2007.
- MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 20 abr. 2017.
- MAZURAKOVA, A. et al. Significance of flavonoids targeting PI3K/AKT/HIF-1 α signaling pathway in therapy-resistant cancer cells – A potential contribution to the predictive, preventive, and personalized medicine. **Journal of Advanced Research**, v. 55, p. 103–118, jan. 2024.
- MCHARDY, T. et al. Discovery of 4-amino-1-(7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)piperidine-4-carboxamides as selective, orally active inhibitors of protein kinase B (AKT). **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 5, p. 2239–2249, 11 mar. 2010.
- MERESMAN, G. F.; GÖTTE, M.; LASCHKE, M. W. Plants as source of new therapies for endometriosis: a review of preclinical and clinical studies. **Human Reproduction Update**, v. 27, n. 2, p. 367–392, 19 fev. 2021.
- MILBURN, C. C. et al. Binding of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate to the pleckstrin homology domain of protein kinase B induces a conformational change. **Biochemical Journal**, v. 375, n. 3, p. 531–538, fev. 2003.
- MILLS, S. J. et al. Novel Inositol Phospholipid Headgroup Surrogate Crystallized in the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B α . **ACS Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 242–246, fev. 2007.
- Molecular Cell, Vol. 7, 1321–1327, June, 2001, Copyright ©2001 by Cell Press. [s.d.].
- MONTORI-GRAU, M. et al. Glucose dependence of glycogen synthase activity regulation by GSK3 and MEK/ERK inhibitors and angiotensin-(1–7) action on these pathways in cultured human myotubes. **Cellular Signalling**, v. 25, n. 5, p. 1318–1327, 1 maio. 2013.
- MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated *Docking* with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 27 dez. 2009.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.

MUEGGE, I.; BENTZIEN, J.; GE, Y. Perspectives on current approaches to *Virtual Screening* in drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 19, n. 10, p. 1173–1183, 2 out. 2024.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019**. **Journal of Natural Products**American Chemical Society, , 27 mar. 2020.

O'BOYLE, N. M. et al. Open Babel: An open chemical toolbox. **Journal of Cheminformatics**, v. 3, n. 1, p. 33, 7 dez. 2011.

OGINO, S. et al. *PIK3CA* Mutation Is Associated With Poor Prognosis Among Patients With Curatively Resected Colon Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 9, p. 1477–1484, 20 mar. 2009.

OKUDA, M.; NISHIMURA, Y. Structural polymorphism of the PH domain in TFIIH. **Bioscience Reports**, v. 43, n. 7, 26 jul. 2023.

PARTHASARATHY, S. et al. Discovery of chiral dihydropyridopyrimidinones as potent, selective and orally bioavailable inhibitors of AKT. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 10, p. 1887–1891, fev. 2018.

PASCUAL, J.; TURNER, N. C. Targeting the PI3-kinase pathway in triple-negative breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 30, n. 7, p. 1051–1060, jul. 2019.

PAULA-GOMES, S. et al. Insulin Suppresses Atrophy- and Autophagy-related Genes in Heart Tissue and Cardiomyocytes Through AKT/FOXO Signaling. **Hormone and Metabolic Research**, v. 45, n. 12, p. 849–855, 11 jun. 2013.

PAULETTI, P. M. et al. New Antioxidant C -Glucosylxanthones from the Stems of *Arrabidaea samydoides*. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 10, p. 1384–1387, 1 out. 2003.

PILON, A. C. et al. NuBBEDB: an updated database to uncover chemical and biological information from Brazilian biodiversity. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7215, 3 ago. 2017.

POLI, G. et al. Application of MM-PBSA Methods in *Virtual Screening*. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1971, 23 abr. 2020.

PRONK, S. et al. GROMACS 4.5: a high-throughput and highly parallel open source molecular simulation toolkit. **Bioinformatics**, v. 29, n. 7, p. 845–854, 1 abr. 2013.

QI, S.-Z. et al. Phenylpropanoid-conjugated pentacyclic triterpenoids from the whole plants of *Leptopus lolonum* induced cell apoptosis via MAPK and AKT pathways in human hepatocellular carcinoma cells. **Bioorganic Chemistry**, v. 111, p. 104886, jun. 2021.

QIAN, Z. et al. Decrotonylation of AKT1 promotes AKT1 phosphorylation and activation during myogenic differentiation. **Journal of Advanced Research**, v. 50, p. 117–133, 1 ago. 2023.

- QI-LIN, X.; LI, Z.; XIAO-GENG, T. Ultrafast thermomechanical responses of a copper film under femtosecond laser trains: a molecular dynamics study. **Proceedings of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences**, v. 471, n. 2184, p. 20150614, 8 dez. 2015.
- QIN, F. et al. The neurotrophic and antineuroinflammatory effects of phenylpropanoids from *Zanthoxylum nitidum* var. *tomentosum* (Rutaceae). **Fitoterapia**, v. 153, p. 104990, set. 2021.
- QUAMBUSCH, L. et al. Covalent-Allosteric Inhibitors to Achieve AKT Isoform-Selectivity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 58, n. 52, p. 18823–18829, fev. 2019.
- QUAMBUSCH, L. et al. Cellular model system to dissect the isoform-selectivity of AKT inhibitors. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 5297, fev. 2021.
- RAAIJMAKERS, M. I. G. et al. Co-existence of *BRAF* and *NRAS* driver mutations in the same melanoma cells results in heterogeneity of targeted therapy resistance. **Oncotarget**, v. 7, n. 47, p. 77163–77174, 22 nov. 2016.
- REN, J. et al. Assessing the performance of the *g_mmpbsa* tools to simulate the inhibition of oseltamivir to influenza virus neuraminidase by molecular mechanics Poisson–Boltzmann surface area methods. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 67, n. 1, p. 46–53, 21 jan. 2020.
- REVATHIDEVI, S.; MUNIRAJAN, A. K. AKT in cancer: Mediator and more. **Seminars in Cancer Biology**, v. 59, p. 80–91, 1 dez. 2019.
- ROOCK, W. DE et al. KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. **The Lancet Oncology**, v. 12, n. 6, p. 594–603, jun. 2011.
- SAIKIA, S.; BORDOLOI, M. Molecular *Docking*: Challenges, Advances and its Use in Drug Discovery Perspective. **Current Drug Targets**, v. 20, n. 5, p. 501–521, 5 mar. 2019.
- SALDÍVAR-GONZÁLEZ, F. I. et al. Chemical Space and Diversity of the NuBBE Database: A Chemoinformatic Characterization. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 59, n. 1, p. 74–85, 28 jan. 2019.
- SCHÄFER, S. C. et al. Antascomicin B stabilizes FKBP51-AKT1 complexes as a molecular glue. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 104, p. 129728, fev. 2024.
- SCOTT, S. E. et al. Future cancer risk after urgent suspected cancer referral in England when cancer is not found: a national cohort study. **The Lancet Oncology**, v. 24, n. 11, p. 1242–1251, 1 nov. 2023.
- SEELIGER, D.; DE GROOT, B. L. Ligand *Docking* and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 24, n. 5, p. 417–422, 2010.

SEMENTINO, E. et al. Inactivation of *Tp53* and *Pten* drives rapid development of pleural and peritoneal malignant mesotheliomas. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 11, p. 8952–8961, 15 nov. 2018.

SHAMSARA, J. CrossDocker: a tool for performing cross-*Docking* using Autodock Vina. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 344, 17 dez. 2016.

SHARMA, M.; DEY, C. S. AKT ISOFORMS-AS160-GLUT4: The defining axis of insulin resistance. **Reviews in endocrine & metabolic disorders**, v. 22, n. 4, p. 973–986, 1 dez. 2021.

SHEN, C. et al. From machine learning to deep learning: Advances in scoring functions for protein–ligand *Docking*. **WIREs Computational Molecular Science**, v. 10, n. 1, 27 jan. 2020.

SMILKOU, S. et al. Multiplex detection of ten ESR1 mutations and AKT1 E17K in breast cancer using digital PCR. **The Journal of Liquid Biopsy**, v. 5, p. 100154, 1 set. 2024.

SMIT, D. J.; JÜCKER, M. AKT Isoforms as a Target in Cancer and Immunotherapy. **Current topics in microbiology and immunology**, v. 436, p. 409–436, 2022.

STAAL, S. P. Molecular cloning of the AKT oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 14, p. 5034–5037, jul. 1987.

STAAL, S. P.; HARTLEY, J. W. Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. **The Journal of experimental medicine**, v. 167, n. 3, p. 1259–1264, 1 mar. 1988.

SUI, X. et al. Baicalin Induces Apoptosis and Suppresses the Cell Cycle Progression of Lung Cancer Cells Through Downregulating AKT/mTOR Signaling Pathway. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, 28 jan. 2021.

SUN, C. et al. Induction of autophagy via the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway by Pueraria flavonoids improves non-alcoholic fatty liver disease in obese mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 157, p. 114005, jan. 2023.

SUN, Y. et al. Anti-rheumatoid arthritis effects of flavonoids from *Daphne genkwa*. **International Immunopharmacology**, v. 83, p. 106384, jun. 2020.

SUVARNA, V.; GUJAR, P.; MURAHARI, M. Complexation of phytochemicals with cyclodextrin derivatives – An insight. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 1122–1144, abr. 2017.

TANI, H. et al. Structural Studies on Stilbene Oligomers Isolated from the Seeds of Melinjo (*Gnetum gnemon* L.). **ACS Omega**, v. 5, n. 21, p. 12245–12250, 2 jun. 2020.

THAPA, N.; HORN, H. T.; ANDERSON, R. A. Phosphoinositide spatially free AKT/PKB activation to all membrane compartments. **Advances in Biological Regulation**, v. 72, p. 1–6, 1 maio. 2019.

THE LANCET ONCOLOGY. **Cancer caught in the crossfire. The Lancet Oncology** Elsevier Ltd, , 1 nov. 2023.

THOMAS, B. N.; PARRILL, A. L.; BAKER, D. L. *Self-Docking and cross-Docking simulations of G protein-coupled receptor-ligand complexes: Impact of ligand type and receptor activation state. Journal of Molecular Graphics and Modelling*, v. 112, p. 108119, 1 maio. 2022.

THOMAS, C. C. et al. High-Resolution Structure of the Pleckstrin Homology Domain of Protein Kinase B/AKT Bound to Phosphatidylinositol (3,4,5)-Trisphosphate. **Current Biology**, v. 12, n. 14, p. 1256–1262, fev. 2002.

TIMMERMAN, L. M. et al. Identification of a novel conserved signaling motif in CD200 receptor required for its inhibitory function. **PLoS ONE**, v. 16, n. 3 March, 1 mar. 2021.

TOWBIN, H.; GORDON, J. Immunoblotting and dot immunobinding — Current status and outlook. **Journal of Immunological Methods**, v. 72, n. 2, p. 313–340, set. 1984.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of *Docking* with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 30 jan. 2010.

TRUEBESTEIN, L. et al. Structure of autoinhibited AKT1 reveals mechanism of PIP₃ - mediated activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 33, fev. 2021.

TSAI, D.-Y. et al. Regulatory mechanisms of B cell responses and the implication in B cell-related diseases. **Journal of Biomedical Science**, v. 26, n. 1, p. 64, 1 dez. 2019.

TURNER, N. et al. Ipatasertib plus paclitaxel for PIK3CA/AKT1/PTEN-altered hormone receptor-positive HER2-negative advanced breast cancer: primary results from cohort B of the IPATunity130 randomized phase 3 trial. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 191, n. 3, p. 565–576, 3 fev. 2022.

UHLENBROCK, N. et al. Structural and chemical insights into the covalent-allosteric inhibition of the protein kinase AKT. **Chemical Science**, v. 10, n. 12, p. 3573–3585, 2019.

UKO, N. E. et al. AKT Pathway Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 10, p. 883–900, 19 maio. 2020.

VOGT, T. Phenylpropanoid Biosynthesis. **Molecular Plant**, v. 3, n. 1, p. 2–20, jan. 2010.

VOLLER, A.; BARTLETT, A.; BIDWELL, D. E. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. **Journal of Clinical Pathology**, v. 31, n. 6, p. 507–520, 1 jun. 1978.

VULPETTI, A.; BOSOTTI, R. Sequence and structural analysis of kinase ATP pocket residues. **Il Farmaco**, v. 59, n. 10, p. 759–765, out. 2004.

WANG, W.; GÓMEZ-BOMBARELLI, R. Coarse-graining auto-encoders for molecular dynamics. **npj Computational Materials**, v. 5, n. 1, p. 125, 18 dez. 2019.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WATSON, K. L.; MOOREHEAD, R. A. Loss of AKT1 or AKT2 delays mammary tumor onset and suppresses tumor growth rate in MTB-IGFIR transgenic mice. **BMC Cancer**, v. 13, 7 ago. 2013.

WEISNER, J. et al. Preclinical Efficacy of Covalent-Allosteric AKT Inhibitor Borussertib in Combination with Trametinib in *KRAS* -Mutant Pancreatic and Colorectal Cancer. **Cancer Research**, v. 79, n. 9, p. 2367–2378, fev. 2019.

WILKINSON, L.; GATHANI, T. **Understanding breast cancer as a global health concern. British Journal of Radiology** British Institute of Radiology, , 2022.

WU, W.-I. et al. Crystal Structure of Human AKT1 with an Allosteric Inhibitor Reveals a New Mode of Kinase Inhibition. **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. e12913, fev. 2010.

XIA, C.-X. et al. Flavonoids from Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) mimic neurotrophic functions in inducing neurite outgrowth in cultured neurons: Signaling via PI3K/AKT and ERK pathways. **Phytomedicine**, v. 115, p. 154832, jul. 2023.

XIA, X. Bioinformatics and Drug Discovery. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 15, p. 1709–1726, 26 abr. 2017.

XIANG, C. et al. Network Pharmacology and Molecular *Docking* to Elucidate the Potential Mechanism of Ligusticum Chuanxiong Against Osteoarthritis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 14 abr. 2022.

XU, R. et al. Discovery of spirocyclic sulfonamides as potent AKT inhibitors with exquisite selectivity against PKA. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, p. 2335–2340, fev. 2011.

YANG, H. et al. Mechanisms of mTORC1 activation by RHEB and inhibition by PRAS40. **Nature**, v. 552, n. 7685, p. 368–373, fev. 2017.

YANG, J.; PI, C.; WANG, G. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR pathway by apigenin induces apoptosis and autophagy in hepatocellular carcinoma cells. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 699–707, jul. 2018.

YANG, L. et al. Anti-inflammatory effect of phenylpropanoids from *Dendropanax dentiger* in TNF- α -induced MH7A cells via inhibition of NF- κ B, AKT and JNK signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 94, p. 107463, maio. 2021.

YU, H.; LITTLEWOOD, T.; BENNETT, M. AKT isoforms in vascular disease. **Vascular pharmacology**, v. 71, p. 57–64, 1 ago. 2015.

ZANATTA, G. et al. L-asparagine crystals with wide gap semiconductor features: Optical absorption measurements and density functional theory computations. **The Journal of Chemical Physics**, v. 140, n. 12, 28 mar. 2014.

ZHANG, Y. et al. The efficacy and safety of PI3K and AKT inhibitors for patients with cancer: A systematic review and network meta-analysis. **European Journal of Pharmacology**, v. 983, p. 176952, 15 nov. 2024.

ZHENG, X.; CARTEE, G. D. Insulin-induced Effects on the Subcellular Localization of AKT1, AKT2 and AS160 in Rat Skeletal Muscle. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 39230, 14 dez. 2016.