



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

GABRIEL CAETANO DE SOUZA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE
AÇÃO ANTICÂNCER DE QUINONA CONTENDO DOIS CENTROS REDOX
(ENSJ-1135) ATRAVÉS DE ABORDAGENS *IN SILICO***

FORTALEZA

2024

GABRIEL CAETANO DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO
ANTICÂNCER DE QUINONA CONTENDO DOIS CENTROS REDOX (ENSJ-1135)
ATRAVÉS DE ABORDAGENS *IN SILICO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Área de conhecimento: Ciências Biológicas II

Orientador (a): Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa

Coorientador (a): Profa. Dra. Cristiana Libardi
Miranda Furtado

Fortaleza

2024

FICHA CATALOGRÁFICA

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)

S238c

Souza, Gabriel Caetano de.

Caracterização molecular e investigação de mecanismos de ação anticâncer de quinona contendo dois centros redox (ENSJ-1135) através de abordagens in silico : Predições farmacológicas in silico / Gabriel Caetano de Souza. – 2024.

79 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2024.

Orientação: Prof. Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

Coorientação: Prof. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado.

1. Câncer. 2. Quinona. 3. In silico. 4. Drug target prediction. 5. Docking molecular. I. Título.

CDD 615.1

GABRIEL CAETANO DE SOUZA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE AÇÃO
ANTICÂNCER DE QUINONA CONTENDO DOIS CENTROS REDOX (ENSJ-1135)
ATRAVÉS DE ABORDAGENS *IN SILICO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito para a
obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Área de conhecimento: Ciências Biológicas II

Aprovado em: __/__/____

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra. Claudia do Ó Pessoa (Orientadora)

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado (Coorientadora)

Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Prof. Dr. José Antonio Fernandes de Macedo

Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Roner Ferreira da Costa

Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)

A **todos** os meus familiares (em especial, **Bil**, meu tio e padrinho), amigos (em especial, **Breno**, meu querido velho amigo) e inúmeros colegas e conhecidos **que vi partirem desta vida cedo demais**: muito obrigado por, mesmo que da pior forma, me fazerem entender que esta vida é curta demais para não dar tudo de mim antes que ela se esgote sem que eu perceba.

“(...) Honrando cada irmão a sete palmas

Pra um dia ouvir mais de sete mil palmas

Pra talvez salvar mais de sete mil almas

Pra eu me curar dos meus sete mil traumas (...)”

(Djonga - Santa ceia)

Aos que me serviram de inspiração e sangraram para que eu pudesse sorrir: Meus pais e meus avós;

Aos que quero inspirar: Anne, Isaac e Dante;

À minha amada esposa: Ana Beatriz.

“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre o ombro de gigantes.” - Isaac Newton;

Obrigado!

“(...) Quem só sentia a dor e a revolta

Trouxe a melhora pra dentro de casa (...)

E senti muita raiva

Quantas vezes o crime me chamou?

Quantas vezes a depressão chamou?

Mas preferi voltar pra minha casa

E ser o exemplo de dentro de casa

Saí pra enfrentar os perigos da rua

Desculpa, mano, não posso morrer agora

Porquê da família eu que sou a casa (...)”

(Kyan - O menino que virou Deus)

“Occupavi te, Fortuna, atque cepi; omnesque aditus tuos interclusi, ut ad me aspirare non posses.”

- Metrodoro

AGRADECIMENTOS

Antes de mais nada, quero deixar explícito que, apesar de eu não crer em nada metafísico e não seguir nenhuma religião, acredito que seja impossível calcular com exatidão a probabilidade de ter verdadeiros anjos como vocês em minha vida, me ajudando dia após dia a suportar o peso da minha própria existência e alcançar meus sonhos (talvez seja um exemplo do que costumam chamar de milagre).

Primeiramente, **Mãe e Pai, Antônio da Glória e Ginaldo** (por ordem alfabética, pois sabem que em meu coração, dividem o mesmo compartimento). Muito obrigado por sempre darem tudo de si em prol da minha felicidade, e assim, me ensinarem a ser um Homem, no sentido Rousseauiano da palavra, me fazendo entender que minha autenticidade e naturalidade eram qualidades e não defeitos, como eu acreditava; me ensinarem a buscar autossuficiência e entender que sou dono das minhas próprias atitudes, e também das consequências; me mostrarem que os valores da minha honestidade e empatia deveriam ser inestimáveis; alimentarem de maneira incansável a minha curiosidade e mostrarem que eu sou capaz de alcançar meus sonhos; me mostrarem que as quedas são inevitáveis e fazem parte de todos os processos da vida, ressaltando a importância de levantar e tentar de novo. Obrigado por além de me conceberem à essa vida, lutarem com unhas e dentes pela continuação de sua existência, até mesmo nas horas em que eu mesmo não era mais a favor.

Mãe, desejo um dia conseguir ser um exemplo de força ao meu filho, assim como você é pra mim. Obrigado por me ensinar uma das lições mais difíceis dessa vida: “Meu filho, você precisa levantar dessa cama. Saudade a gente tem que matar de fome”. Obrigado por ser meu ombro quando eu chorava de dor e de medo (principalmente nas horas em que eu não aguentava mais ser interrompido por barulho de tiro enquanto eu estudava pra conseguir ingressar no mestrado);

Pai, obrigado por me ensinar a diferença entre gostar e amar: “Quando você ama, é porque você é capaz de dar sua vida pelo outro”. Ainda lembro do brilho nos seus olhos ao me deixar na UFC pela primeira vez e ver que eu trabalhava ajudando a salvar outras vidas, coincidentemente próximo ao hospital em que vocês quase me viram definhando de meningite há anos atrás. Espero um dia ser um exemplo de brilhantismo e resiliência ao meu filho, assim como você é pra mim.

Meus irmãos, **Marcelo, Isaac e Anne**, me desculpem por eu ser um irmão ausente. Mas saibam que sempre estão e estarão em meus pensamentos, pois vos amo com todo meu coração.

Ana Beatriz, meu amor, muito obrigado por ser minha esposa e melhor amiga. Me suportar durante as crises de impostor ou de sobrevivente; me ensinar que apesar de saber viver bem estando sozinho, poder partilhar a vida com você é bem mais leve e gracioso (um jeito mais romântico de te explicar que você é minha mitocôndria. Eu poderia escolher ser um procaríoto e evoluir sozinho, mas ser um eucarioto e viver em simbiose com você é bem mais prazeroso); foi contigo que descobri o significado do ‘eterno retorno’ de Nietzsche. Muito obrigado por me dar o presente mais precioso da minha vida e me amar simplesmente por eu ser quem eu sou.

Dante, meu filho, escolhi teu nome me inspirando no homem que foi capaz de sair do inferno e chegar ao paraíso, achando que eu seria o Virgílio da tua história e te orientar pelos caminhos áridos dessa vida. Mas saiba que, nesse caso, a história foi diferente. Quando eu hei o bom caminho abandonado e achei-me numa selva tenebrosa, lá onde o sol se cala e a luz me nega, foste tu que me guiou de volta à verdadeira estrada.

Agradeço também às minhas professoras e **Cláudia Pessoa** e **Cristiana Libardi**, que desde o início da minha jornada no ambiente acadêmico, sempre depositaram confiança na minha capacidade e no meu trabalho, até mesmo quando minhas ideias pareciam muito abstratas para se encaixar em nossas linhas de pesquisa. Muito obrigado por fazerem sempre o possível para que nós, alunos, tivéssemos as melhores condições possíveis para a execução de nossos trabalhos. Adicionalmente, agradeço aos demais professores que com muito zelo me repassaram conhecimentos essenciais para o desenvolvimento da minha carreira científica.

Conjuntamente, também agradeço aos meus colegas de trabalho do Laboratório de Oncologia Experimental, que com muita paciência me repassaram conhecimentos indispensáveis para que eu pudesse ser capaz de executar meus trabalhos (**Fernanda Madrid**, **Nathaly**, **Bruno**, **Sarah Sant'Anna**, **Dave**, **Silvana** e todos os outros demais colegas). Em especial, **Melqui** e principalmente **Eduardo** (amigo pessoal e padrinho do meu filho, obrigado por todas **aquelas** palavras) que gentilmente se dispuseram a me ajudar em trabalhos que se estenderam até horários fora de expediente (fossem os de bancada ou os computacionais), e que continuaram a me auxiliar e incentivar mesmo quando os experimentos davam errado.

Dedico um agradecimento especial a **todos os funcionários do Núcleo de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM)**, especialmente às senhoras **Marta** e **Dalva**. Obrigado por toda a gentileza e atenção sempre prestada a nós, integrantes do NPDM, tornando o nosso trabalho mais fácil e mais leve!

Agradeço à minha **banca de qualificação** e **defesa** por todo o tempo dedicado a colaborar com o enriquecimento deste trabalho. Obrigado por todas sugestões e correções, que serviram não só em prol deste trabalho, mas também para o meu crescimento como cientista.

Ademais, gostaria também de agradecer aos meus amigos pessoais (em especial, **aqueles**) e demais familiares, que mesmo que indiretamente, contribuíram para o meu sucesso nessa jornada, fossem com palavras ou com uma simples noite jogando, me servindo como válvula de escape.

Agradeço também ao meu médico **Dr. Ivan Moura Fé**, por toda humanidade prestada durante esses anos de tratamento, principalmente nos momentos em que a minha bolsa não era o suficiente para arcar com o tratamento e o senhor humildemente continuou a me tratar sem pedir nada em troca.

Por fim, agradeço a **todos os cientistas que lutam e colaboram em prol da divulgação científica de maneira gratuita**. Minhas madrugadas de trabalho tiveram sucesso, muitas vezes, por conta de pessoas que se dispõem de maneira solidária a **tornar a educação e a ciência algo democrático e não elitizado**. Obrigado!

Caracterização molecular e investigação de mecanismos de ação anticâncer de quinona contendo dois centros redox (ENSJ-1135) através de abordagens *in silico*

Resumo

O câncer, caracterizado pela proliferação descontrolada de células neoplásicas, representa um dos maiores desafios da saúde global. A heterogeneidade tumoral e os efeitos colaterais associados aos tratamentos convencionais impulsionam a busca por novas terapias mais eficazes e menos tóxicas. A identificação de alvos moleculares específicos é fundamental para o desenvolvimento de fármacos com maior seletividade e eficácia. Dessa forma, as abordagens computacionais têm se mostrado como ferramentas valiosas para acelerar o processo de descoberta de drogas, oferecendo alternativas mais rápidas e econômicas aos métodos experimentais tradicionais. O *virtual screening* e o *target fishing* são exemplos de técnicas computacionais que permitem a triagem de grandes bibliotecas de compostos químicos em busca de moléculas com potencial terapêutico. Neste estudo, utilizou-se ferramentas computacionais para caracterizar e prever as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas da molécula ENSJ-1135 (20b). Através de plataformas de predição como *SwissADME* e *ProTox-3*, foram avaliados os parâmetros farmacocinéticos da molécula, como absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade. Em seguida, empregou-se a técnica de *target fishing* para identificar potenciais alvos terapêuticos, que consiste na análise de diferentes bancos de dados de interação proteína-ligante, posteriormente um conjunto de critérios foram estabelecidos para filtrar os alvos mais promissores para o presente estudo. Os alvos selecionados foram então submetidos a experimentos de *docking* molecular para avaliar a interação entre a molécula e seus alvos proteicos. Os resultados obtidos neste estudo demonstram a aplicabilidade da abordagem computacional empregada para a identificação de potenciais alvos terapêuticos para quimioterápicos em fase de desenvolvimento. No entanto, é importante ressaltar que os resultados *in silico* devem ser validados experimentalmente através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, pois, a validação experimental é fundamental para confirmar a interação da molécula com os alvos preditos e avaliar sua atividade biológica e toxicidade.

Palavras-chave: Câncer, quinona, *in silico*, *drug target prediction*, *docking* molecular

Molecular characterization and investigation of anticancer mechanisms of a quinone containing two redox centers (ENSJ-1135) through in silico approaches

Abstract

Cancer, characterized by uncontrolled proliferation of neoplastic cells, represents one of the greatest global health challenges. Tumor heterogeneity and the side effects associated with conventional treatments drive the search for new, more effective, and less toxic therapies. The identification of specific molecular targets is fundamental for the development of drugs with greater selectivity and efficacy. In this way, computational approaches have proven to be valuable tools to accelerate the drug discovery process, offering faster and more cost-effective alternatives to traditional experimental methods. Virtual screening and target fishing are examples of computational techniques that allow for the screening of large libraries of chemical compounds in search of molecules with therapeutic potential. In this study, computational tools were used to characterize and predict the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of the molecule ENSJ-1135 (20b). Through prediction platforms such as SwissADME and ProTox-3, the molecule's pharmacokinetic parameters, such as absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity, were evaluated. Subsequently, the target fishing technique was employed to identify potential therapeutic targets, which consists of analyzing different protein-ligand interaction databases, followed by the establishment of a set of criteria to filter the most promising targets for this study. The selected targets were then subjected to molecular docking experiments to evaluate the interaction between the molecule and its protein targets. The results obtained in this study demonstrate the applicability of the computational approach employed for the identification of potential therapeutic targets for anticancer drugs under development. However, it is important to emphasize that in silico results must be validated experimentally through in vitro and in vivo assays, as experimental validation is essential to confirm the molecule's interaction with the predicted targets and to evaluate its biological activity and toxicity.

Keywords: Cancer, quinone, *in silico*, drug target prediction, molecular docking

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais características do câncer.....	17
Figura 2. Ranking internacional das principais causas de morte em indivíduos com menos de 70 anos de idade em 2019.....	18
Figura 3. Estrutura básica de quinonas e seus principais derivados.....	19
Figura 4. Mecanismos anticâncer já descrito de quinonas.....	21
Figura 5. Quinonas e derivados atuando como quelantes de metais.....	21
Figura 6. Estrutura química bidimensional da quinona ENSJ-1135 (20b)	22
Figura 7. Desenho experimental da pesquisa.....	25
Figura 8. Representação gráfica em barras demonstrando os resultados do cálculo do Índice de Tanimoto entre a molécula teste e o fármaco quimioterápico utilizado como controle.....	30
Figura 9. Comparação entre os parâmetros ADME gerados via <i>SwissADME</i>	31
Figura 10. Comparação entre os parâmetros toxicidade gerados via <i>ProTox-3.0</i>	33
Figura 11. Ilustração da distribuição dos alvos considerados aptos para seguir aos testes posteriores.....	38
Figura 12. Resultados detalhados dos experimentos de <i>docking</i> molecular.....	40
Figura 13. Detalhamento das reações em que os complexos proteína/ligante afetaram sítios críticos das proteínas em pelo menos 70% das vezes.....	41
Figura 14. Detalhes das energias de interação formadas nos complexos escolhidos como mais prováveis.....	42
Figura 15. Interação complexo proteína-ligante entre AURKA (PDBID-5DN3) e ENSJ-1135	42
Figura 16. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 8P4Z, correspondente à cristalização da proteína quinase CDK7.....	45
Figura 17. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 3G33, correspondente à cristalização da proteína quinase CDK4.....	47

Figura 18. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 4X7Q, correspondente à cristalização da proteína quinase PIM2.....	49
Figura 19. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 3LXP, correspondente à cristalização da proteína quinase TYK2.....	51
Figura 20. Comparação entre as sequências de aminoácidos das estruturas cristalizadas de proteínas classificadas como fosfatases e fosfoproteínas.....	52
Figura 21. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 1CWS, correspondente à cristalização da fosfatase MPIP2.....	53
Figura 22. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 2QYK, correspondente à cristalização da fosfoproteína PDE4A.....	54
Figura 23. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 1W0E, correspondente à cristalização da enzima CP3A4.....	56
Figura 24. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 5EA2, correspondente à cristalização da enzima NQO1.....	57
Figura 25. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 3KCZ, correspondente à cristalização da transferase PARP2.....	58
Figura 26. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 1U6D, correspondente à cristalização da proteína KEAP1.....	60
Figura 27. Complexo resultante entre o <i>docking</i> da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 6OB7, correspondente à cristalização da proteína transportadora B2CL1.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características químicas estruturais e conversão a código SMILE da molécula teste e o quimioterápico de referência utilizado como controle positivo.....	26
Tabela 2. Parâmetros padronizados para a realização dos experimentos de <i>docking</i> cego.....	28
Tabela 3. Predições de toxicidade sistêmica detalhada da droga doxorrubicina obtidas através da plataforma ProTox3.0.....	33
Tabela 4. Predições de toxicidade sistêmica detalhada da molécula ENSJ-1135 obtidas através da plataforma ProTox3.0.....	35

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
1.1.	Câncer: Aspectos gerais	19
1.2.	Tratamentos anticâncer	20
1.3.	Quinonas	21
1.3.1.	Quinonas anticâncer.....	22
1.3.2.	Quinonas sintéticas.....	24
1.4.	Experimentos in silico no desenvolvimento de novas drogas	25
1.4.1.	Target Fishing.....	25
2.	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	26
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1.	Desenho experimental	26
3.2.	Experimentos <i>in silico</i>	27
3.2.1.	Avaliação de parâmetros farmacocinéticos.....	27
3.2.2.	Predição de alvos através da abordagem de <i>Target Fishing</i>	28
3.2.3.	<i>Docking</i> molecular.....	29
4.	RESULTADOS	31
4.1.	Comparação estrutural entre a molécula teste e o fármaco quimioterápico referência a ser utilizado como controle positivo	31
4.2.	Predições farmacocinéticas	33
4.3.	<i>Target Fishing</i>	39
4.4.	<i>Docking</i> Molecular	40
4.4.1.	Quinases.....	43
4.4.2.	Fosfatases e fosfoproteínas.....	54
4.4.3.	Oxidoreductases.....	57
4.4.4.	Transferases.....	60

4.4.5.	Reguladores de transcrição.....	61
4.4.6.	Outras proteínas.....	62
5.	DISCUSSÃO.....	65
6.	CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS.....	71
	REFERÊNCIAS.....	71
	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

%: Porcentagem

Å: Angstrom

µL: Microlitros

µM: Micromolar

°C: Graus célsius

ΔG: Energia livre de Gibbs

ADP: Adenosina di-fosfato

ADMET: Parâmetros de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade

AKT: Proteína quinase B

ATP: Adenosina tri-fosfato

AURKA: Aurora Kinase A

AURKB: Aurora Kinase B

AURKC: Aurora Kinase C

BCR-ABL: Quinase BCR-ABL

BCRJ: Banco de Células do Rio de Janeiro

CDDI: *Cortellis Drug Discovery Intelligence*

CDK: Quinase dependente de ciclina

CI₅₀: Concentração inibitória média

cm²: Centímetros quadrados

c-MET: Proto-oncogene tirosina quinase receptor do fator de crescimento de hepatócito

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EROs: Espécies reativas do oxigênio

E.P.M: Erro padrão da média

FANCC: Proteína do grupo C da anemia de Fanconi

kg: Quilogramas

LD₅₀: Dose letal média

IC: Intervalo de confiança

MYC: Proteína proto-oncogene Myc

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

mTOR: Quinase alvo da rapamicina em mamíferos

mg: miligramas

mL: Mililitros

MMFF94: Campo de força molecular de Merck 94

NQO1: NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1

NQO2: NAD(P)H: quinona oxidoreductase 2

nm: Nanometros

nTPM: Transcritos por milhão normalizados

PTEN: Supressor de tumor fosfatase homóloga à tensina

PDB: *Protein Data Bank*

pH: Potencial Hidrogeniônico

PLK1: Proteína Polo-Quinase 1

PI3K: Fosfoinosítideo 3-quinase

PIM1: Proto-oncogene proteína pro-inflamatória de macrófagos 1

PIM2: Proto-oncogene proteína pro-inflamatória de macrófagos 2

QSAR: Relação estrutura-atividade quantitativa

RAS: Proto-oncogene RAS

RMSD: Raiz quadrada do desvio quadrático médio

RPMI: Meio de cultura *Gibco Roswell Park Memorial Institute*

RPM: Rotações por minuto

SBF: Soro fetal bovino

THPA: *The Human Protein Atlas*

TPSA: Área de superfície polar topológica

TYK2: Tirosina Quinase 2

STAT3: Sinal ativador de transdução e transcrição 3

UFC: Universidade Federal do Ceará

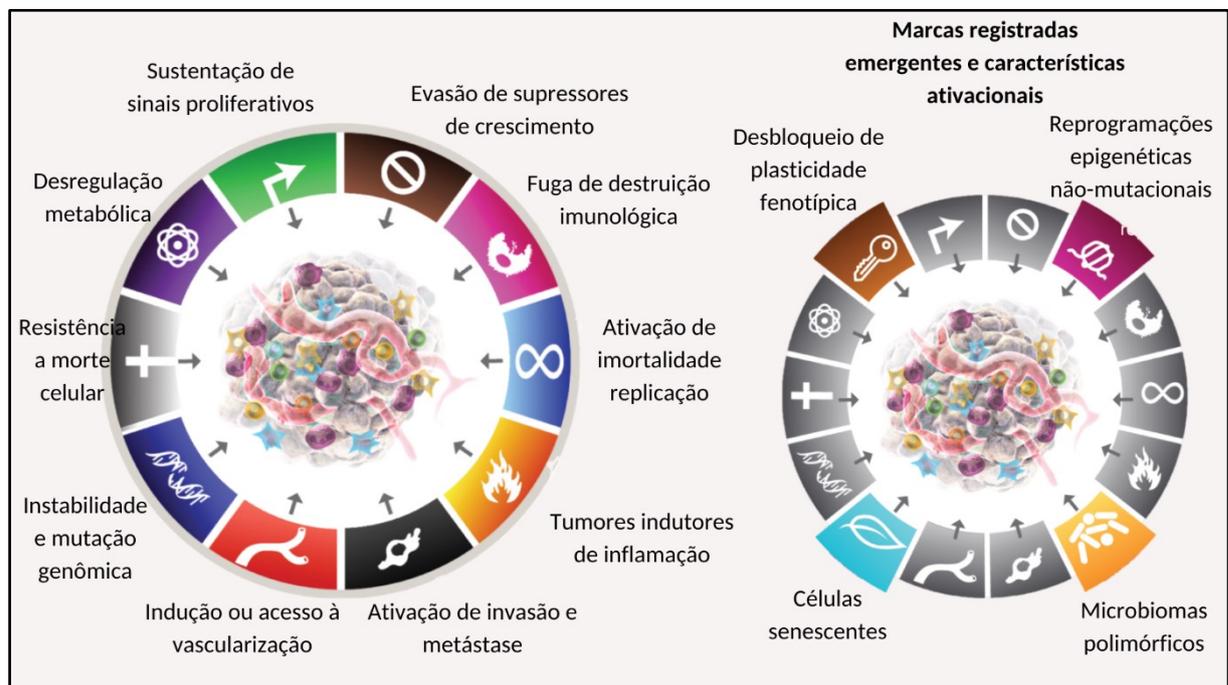
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

1. Introdução

1.1. Câncer: Aspectos gerais

O câncer é caracterizado por um crescimento anormal de células neoplásicas, que por sua vez adquirem capacidades de formarem um tecido maligno, como melhor ilustrado na Figura 1. Tais habilidades desenvolvidas pelas células cancerosas são conhecidas na literatura como *Hallmarks of Cancer* (Marcas registradas do câncer), onde atualmente são agrupadas 10 capacidades essenciais para o desenvolvimento tumoral: 1) Sinalização de manutenção proliferativa, 2) evasão de supressores de crescimento, 3) fuga do sistema imunológico, 4) ativação de imortalidade replicativa, 5) promoção de inflamação tumoral, 6) características de invasão e metástase, 7) indução/acesso à vascularização, 8) resistência à morte celular, 9) instabilidade genômica e mutações e 10) reprogramação de metabolismo energético. Além do mais, pesquisas recentes mostram que quatro características potencialmente venham a integrar esse grupo futuramente, sendo elas: Capacidade de plasticidade fenotípica, células senescentes, reprogramação epigenética não mutacional e microbiomas polimórficos (Hanahan, 2022).

Figura 1. Principais características do câncer

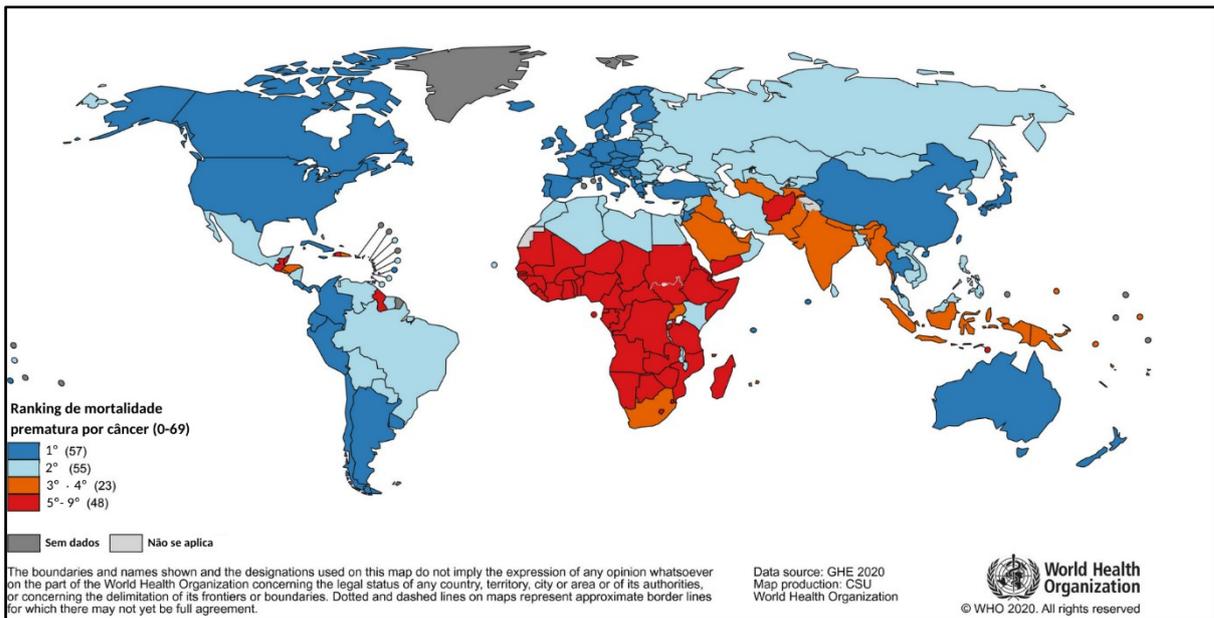


Fonte: Adaptado de Hanahan, 2022.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os números de incidência e mortalidade do câncer estão rapidamente aumentando conforme o passar dos anos, afetando pessoas de diversas faixa etárias em todos os países do mundo, tornando-se um dos maiores obstáculos a serem enfrentados para o crescimento da estimativa de vida populacional. No ano

de 2019, as estimativas da OMS mostraram que em 61% dos países do mundo, o câncer ocupa a primeira ou segunda colocação entre as causas de morte a indivíduos com menos de 70 anos de idade. Além do mais, estima-se que no ano de 2020, cerca de 19.3 milhões de novos casos da doença tenham sido notificados, além de causar quase 10 milhões de mortes no mesmo ano. Ademais, os números de relatos anuais tendem a continuar crescendo, onde espera-se que no ano de 2040 sejam notificados quase 29 milhões de novos casos (Sung et al., 2021).

Figura 2. Ranking internacional das principais causas de morte em indivíduos com menos de 70 anos de idade em 2019



Fonte: Adaptado de Sung et al., 2021.

1.2. Tratamentos anticâncer

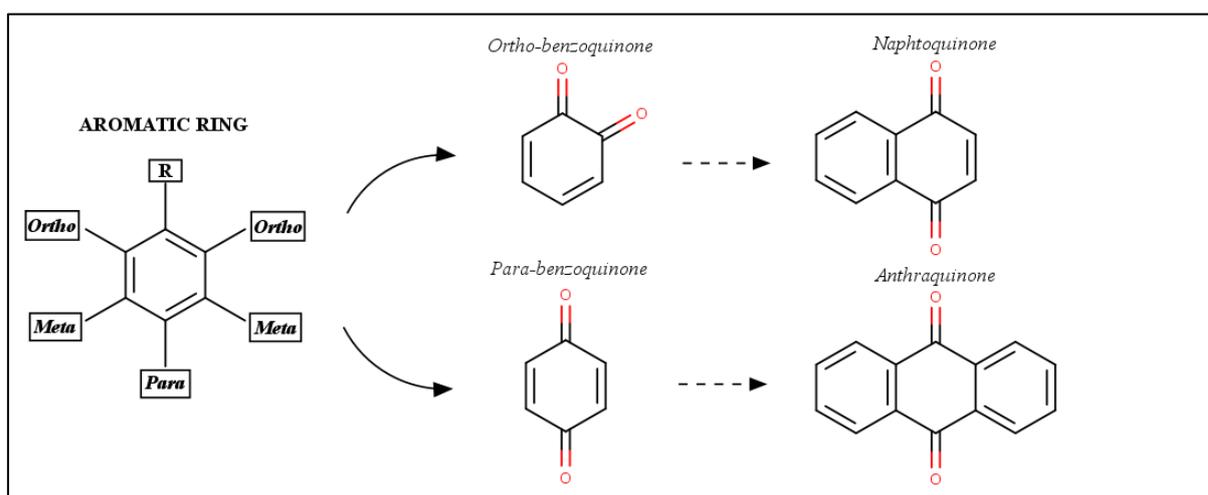
Desde a aprovação da mecloretetamina, o primeiro quimioterápico aprovado, muitos programas foram criados para explorar a possibilidade de encontrar novas moléculas anticancerígenas, e essa mudança de perspectiva no ambiente farmacológico tem estimulado uma corrida contra o tempo para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos. Atualmente, apesar de haver muitos medicamentos disponíveis para o tratamento do câncer, a heterogeneidade de cada tumor e os efeitos colaterais da quimioterapia são os dois principais problemas que estimulam novas pesquisas em busca de medicamentos com melhor eficácia e menos efeitos negativos. Apesar de possuírem mecanismos secundários em outros alvos, os quimioterápicos podem ser classificados em quatro grupos, de acordo com seus mecanismos principais: agentes antimicrotúbulos, inibidores de topoisomerase, agentes alquilantes e antimetabólitos. Por exemplo, o grupo das quinonas, como doxorrubicina e daunorrubicina, e seus derivados epirrubicina e idarrubicina, cujo principal papel

anticancerígeno é caracterizado pela inibição da topoisomerase e quebras de DNA de fita dupla. No entanto, elas também são responsáveis por causar aumentos nas espécies reativas de oxigênio (EROs) e induzir a despolarização mitocondrial, resultando na morte celular (Tilsed et al., 2022a).

1.3. Quinonas

As quinonas são uma classe de grupos químicos orgânicos que engloba uma ampla gama de compostos obtidos tanto por extração de produtos naturais quanto por métodos sintéticos. Essa diversidade estrutural oferece inúmeras possibilidades para aplicações biológicas, influenciando uma ampla variedade de processos biológicos. Com uma extensa lista de compostos, as quinonas não apenas exibem uma variedade impressionante de estruturas moleculares, mas também demonstram um potencial significativo em pesquisa e desenvolvimento em diversos campos biológicos e farmacêuticos. Esse grupo possui uma estrutura química comum como padrão: um núcleo aromático com uma ligação dupla a um oxigênio na posição *R*, mais outra ligação dupla com um oxigênio na posição *orto* ou *para* do núcleo aromático. Assim, essa estrutura básica pode adquirir mais mudanças químicas e aumentar sua complexidade, gerando moléculas maiores como naftoquinonas e antraquinonas (El-Najjar et al., 2011), conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3. Estrutura básica de quinonas e seus principais derivados



Fonte: Adaptado de El-Najjar et al., 2011. Criado com MarvinSketch.

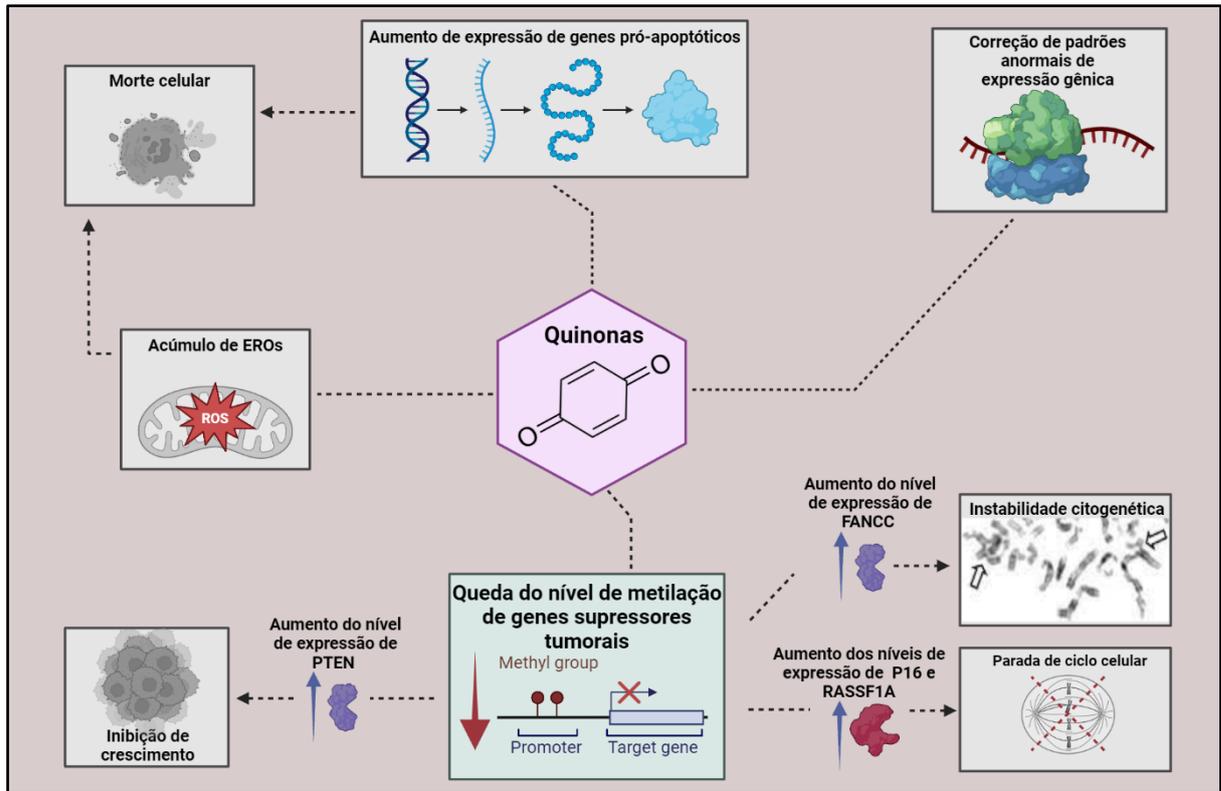
Ao longo de várias décadas, as quinonas naturais, semissintéticas e seus derivados têm recebido significativa atenção no âmbito da pesquisa farmacêutica. Esses estudos têm explorado a síntese, modificações e caracterização desses compostos, enquanto simultaneamente avaliam seus mecanismos multifacetados, principalmente seus mecanismos

anticancerosos. O composto beta-lapachona, atualmente em ensaios clínicos, é um dos fármacos em desenvolvimento que mais chama atenção, especialmente para o tratamento de tumores com expressão elevada da proteína NAD(P)H: quinona oxidoreductase 1 (NQO1). A interação da beta-lapachona com tais tumores está associada à indução de uma resposta pronunciada ao estresse oxidativo e subsequente morte celular apoptótica. No entanto, a pronunciada hidrofobicidade do composto representa um obstáculo primário para sua utilidade clínica. Consequentemente, investigações em curso estão direcionadas ao desenvolvimento de derivados de beta-lapachona capazes de contornar essa limitação (Lima et al., 2021a). Embora os pesquisadores tenham predominantemente explorado o papel farmacológico das quinonas como transportadoras de elétrons, é importante observar que esta classe química exibe uma variedade diversificada de atividades biológicas, tornando-as candidatas promissoras para aplicações em terapias anticancerígenas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias (Franza & Gaudu, 2022).

1.3.1. Quinonas anticâncer

Entre os principais mecanismos antitumorais das quinonas, como ilustrado na Figura 4, se destacam diversos mecanismos epigenéticos, como induzir aumento de expressão de genes supressores de tumor como *PTEN* e *FANCC*, intercalação de DNA, quebra de dupla fita, indução de clivagem de DNA por Topoisomerase I e II e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), quando metabolizadas por enzimas redutoras que atuam através de mecanismos de transporte de elétrons, por exemplo, NQO1, NQO2 e redutases do citocromo P450. Essa amplitude de atuação se dá por conta da estrutura química privilegiada presente nas quinonas, que possuem oxigênios atuando como heteroátomos e anéis aromáticos ricos em elétrons que podem atuar em processos de substituições eletrofilicas. Além disso, algumas quinonas possuem adição de grupos azóis, estruturas químicas ricas em nitrogênio, que as tornam mais estáveis e também podem atuar como heteroátomos.

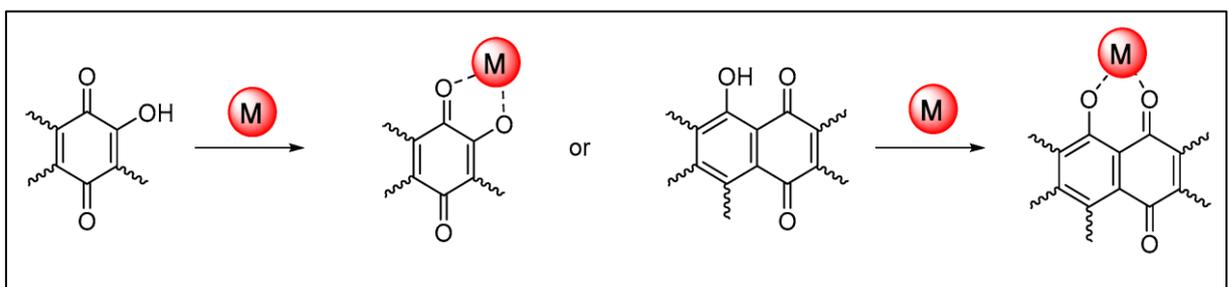
Figura 4. Mecanismos anticâncer já descrito de quinonas



Fonte: Adaptada de El Omari et al., 2021 e Zen et al., 2011. Criada com Biorender.com.

Entre as variáveis de quinonas como benzoquinonas, naftoquinonas e antraquinonas, as que possuem grupos hidroxila em posições *orto* ou adjacentes ao grupo carbonil, são de extremo interesse farmacológico por possuírem a capacidade de formarem um complexo quelante de metal altamente estável, dessa forma, podendo influenciar diretamente em alterações de estruturas proteicas e atuarem em sítios de reconhecimento, ligação e catálise, como ilustrado na Figura 5 (Dahlem Junior et al., 2022; El Omari et al., 2021; Zen et al., 2011).

Figura 5. Quinonas e derivados atuando como quelantes de metais



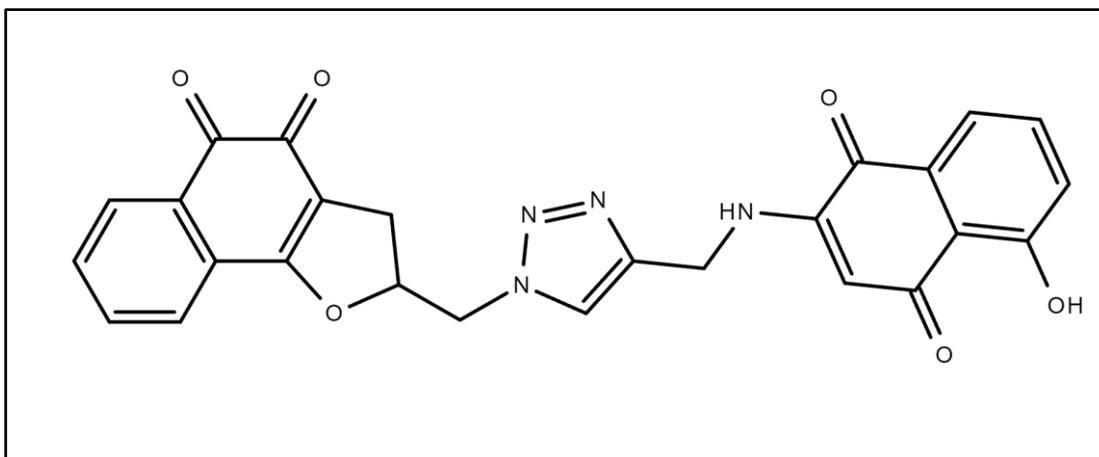
Fonte: Dahlem Junior et al., 2022.

1.3.2. Quinonas sintéticas

Os mecanismos multialvos das quinonas estimulam a procura de novas variações moleculares que possam aperfeiçoar os seus potenciais farmacológicos e ao mesmo tempo reduzir os seus efeitos adversos. Como por exemplo, quinonas híbridas com átomos de bromo e selênio, sintetizadas a partir de reações de *click chemistry* (Jardim et al., 2018).

Entre as diversas variações moleculares, quinonas contendo dois centros redox interligadas por um grupo azol demonstram toxicidade e seletividade contra linhagens celulares cancerosas, como reportado por LIMA e colaboradores (2021), quinonas até 51 vezes mais seletivas à linhagem celular cancerosa HCT-116, quando comparada com a linhagem não-tumoral L-929 (Lima et al., 2021b). Após os resultados positivos relatados, o mesmo grupo sintetizou outras variáveis de quinonas com dois centros redox, entre elas, a molécula ENSJ-1135 (20b), ilustrada na Figura 6. Por mostrar um alto nível de citotoxicidade e ter um dos melhores níveis de seletividade às linhagens cancerosas quando comparada à linhagem não-tumoral L-929 (Oliveira et al., 2023), a molécula foi selecionada para o estudo de *Target fishing*.

Figura 6. Estrutura química bidimensional da quinona ENSJ-1135 (20b)



Fonte: Oliveira et al., 2023. Molécula desenhada através da plataforma *ChemSpider*

Portanto, diante da sua variedade de aplicações biológicas e sua composição estrutural bastante diversificada, quinonas naturais, semissintéticas e seus derivados têm recebido atenção considerável, com foco na síntese, modificação e caracterização desses compostos. O destaque que as quinonas apresentam na pesquisa de compostos com mecanismos multialvos, incentiva a busca de novas moléculas com potenciais farmacológicos aprimorados e de efeitos adversos minimizados, características atrativas no desenvolvimento de novos tratamentos antineoplásicos.

1.4. Experimentos *in silico* no desenvolvimento de novas drogas

A identificação de alvos de compostos bioativos é uma etapa essencial para o desenvolvimento de novas drogas, contribuindo ativamente no entendimento de potenciais aplicações clínicas e possíveis efeitos colaterais indesejáveis. Porém, os métodos convencionais de identificação de alvos, como análises de expressões gênicas, demandam muito tempo e um alto custo monetário. Dessa forma, abordagens computacionais capazes de realizar triagens de alvos farmacológicos se tornam alternativas promissoras, a fim de acelerar processos e reduzir custos.

Entre as principais abordagens *in silico* estão o *virtual screening* e o *Target fishing*. Enquanto o *virtual screening* realiza pesquisas baseadas em uma extensa biblioteca de moléculas pré-estabelecidas e calcula predições a partir do grau de similaridade entre as moléculas químicas, o processo de *Target fishing* consiste em realizar o processo reverso, baseando-se em alvos mais promissores à molécula fornecida como teste (Galati et al., 2021).

1.4.1. Target Fishing

Por se tratar de uma metodologia que tem como referência os alvos em potencial de atuação de uma determinada molécula, a abordagem de *Target fishing* também é capaz de realizar predições de possíveis efeitos adversos, possíveis poli farmacologias e reposicionamento de drogas. Essa metodologia pode ser dividida em duas categorias principais, variando de acordo com o tipo de dados utilizados como referência, podendo ser baseadas no ligante ou baseadas nos receptores.

Abordagens focadas no ligante são as mais vantajosas em estudos de larga escala, visto que possuem um custo computacional menor, alta flexibilidade e melhores possibilidades de aplicação de aprendizado de máquina. Em contraste, as abordagens focadas nos receptores, apesar de possuírem um custo computacional maior, são capazes de realizar predições tridimensionais de espaços químicos ainda não explorados. Dessa forma, a associação de ambas estratégias é capaz de fornecer triagens com qualidade mais refinada, a fim de direcionar melhor os estudos de desenvolvimento de drogas (Galati et al., 2021).

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Caracterizar e realizar predições farmacocinéticas e farmacodinâmicas da molécula ENSJ-1135 (20b) através de experimentos *in silico*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente e avaliar parâmetros farmacocinéticos via as plataformas *in silico* *SwissADME* e *ProTox-3.0* e comparar os resultados obtidos com um quimioterápico de referência utilizado clinicamente;
- Identificar os alvos mais prováveis através da metodologia de *Target Fishing* utilizando os bancos de dados de análise estrutura-atividade *STarFish*, *TargetNetEnsemble*, *SwissTargetPrediction* e *Cortellis Drug Discovery Intelligence* (CDDI);
- Executar experimentos de *docking* molecular nos alvos selecionados a fim de propor os possíveis mecanismos de ação da molécula teste;
- Comparar e discutir as predições obtidas com resultados já relatado na literatura.

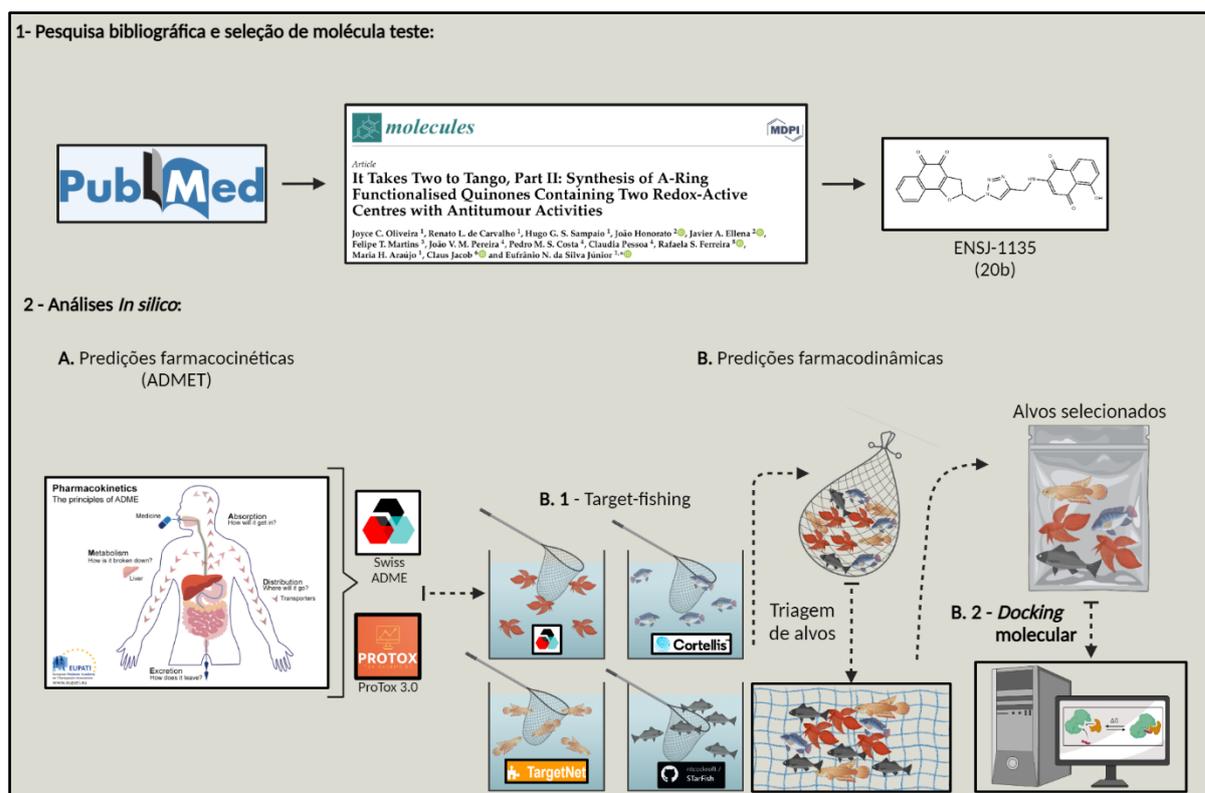
3. Materiais e métodos

3.1. Desenho experimental

Conforme ilustrado na Figura 7, o desenho experimental inicia-se através de extensas pesquisas bibliográficas sobre a variedade estrutural de moléculas quinonas de origem natural e sintética prospectadas. A molécula ENSJ-1135, desenvolvida por Oliveira e colaboradores (2021), foi selecionada como objeto de estudo, a fim de realizar predições de seus parâmetros farmacocinéticos e possíveis atuações farmacodinâmicas. Dessa forma, o objeto de estudo foi submetido primeiramente às plataformas de predições farmacocinéticas e posteriormente, predições farmacodinâmicas.

Assim, a metodologia de *Target fishing* foi o primeiro procedimento de predição farmacodinâmica a ser aplicado. Posteriormente, os dados obtidos foram submetidos a critérios de exclusão estabelecidos a fim de focar o estudo em mecanismos anticâncer da molécula teste. Após a realização da triagem, os alvos seguiram para experimentos de *docking* molecular, a fim de obter um refinamento melhor dos alvos previstos.

Figura 7. Desenho experimental da pesquisa



Fonte: Própria. Criada com Biorender.com

3.2. Experimentos *in silico*

3.2.1. Avaliação de parâmetros farmacocinéticos

Como primeiro passo, foram realizadas pesquisas bibliográficas a fim de encontrar um fármaco já utilizado clinicamente para ser utilizado como controle positivo durante as análises farmacocinéticas. Assim, o quimioterápico doxorrubicina foi selecionado como controle positivo, visto que o mesmo já foi utilizado como controle positivo no estudo de referência que relatou a síntese da molécula alvo do presente estudo e ambas fazem parte do mesmo grupo químico.

Dessa forma, após escolher o fármaco a ser utilizado como controle positivo, realizou-se uma análise de comparação estrutural por meio da metodologia de Índice de Tanimoto (Todeschini et al., 2012). As estruturas químicas das moléculas (teste e controle positivo) foram convertidas em códigos SMILES (Tabela 1) e em seguida foram submetidas a um script criado em linguagem de programação *Python*, utilizando a biblioteca *RDKit* e executado na plataforma *Google Colab*, a fim de calcular o nível de similaridade química entre elas. O código a seguir demonstra a implementação da função '*Tanimoto_calc*':

```

import numpy as np
!pip install rdkit
import rdkit
from rdkit import Chem
from rdkit.Chem import AllChem
from rdkit import DataStructs

def tanimoto_calc(smi1, smi2):
    mol1 = Chem.MolFromSmiles(smi1)
    mol2 = Chem.MolFromSmiles(smi2)

    fp1 = AllChem.GetMorganFingerprintAsBitVect(mol1, 3, nBits=2048)
    fp2 = AllChem.GetMorganFingerprintAsBitVect(mol2, 3, nBits=2048)

    s = round(DataStructs.TanimotoSimilarity(fp1, fp2), 3)

    return s

```

Tabela 1. Características químicas estruturais e conversão a código SMILE da molécula teste e o quimioterápico de referência utilizado como controle positivo

Composto	Fórmula molecular	Peso molecular (g/mol)	SMILE
ENSJ-1135	C ₂₆ H ₁₈ N ₄ O ₆	482.44	OC1=C2C(=O)C=C(NC3=CN(CC4CC5=C(O4)C4=C(C=CC=C4)C(=O)C5=O)N=N3)C(=O)C2=CC=C1
Doxorrubicina	C ₂₇ H ₂₉ NO ₁₁	543.5	CC1C(C(CC(O1)OC2C(C(C3=C2C(=C4C(=C3O)C(=O)C5=C(C4=O)C(=CC=C5)OC)O)(C(=O)CO)O)N)O

Fonte: Própria, adaptado de informações obtidas através da plataforma online *PubChem*

Após a seleção do quimioterápico controle positivo, os perfis farmacocinéticos foram elaborados contendo predições dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolização, excreção e toxicidade (ADMET). O servidor online *SwissADME* foi utilizado para avaliar todos os parâmetros citados, com exceção da toxicidade, avaliada pela plataforma *ProTox-3.0*.

3.2.2. Predição de alvos através da abordagem de *Target Fishing*

Tendo em vista que quinonas possuem muitos mecanismos em potencial, a estratégia de *Target Fishing* tornou-se ideal para iniciar a busca por possíveis alvos da molécula ENSJ-1135, dado ao fato de que é capaz de prever uma ampla gama de alvos candidatos de maneira fácil, rápida, organizada e econômica. Geralmente, o Índice de Tanimoto é a metodologia comumente escolhida para os cálculos de comparações estruturais, e a partir disso, as probabilidades são

calculadas utilizando fatores bidimensionais e tridimensionais, gerando resultados de relação estrutura-atividade quantitativa ou QSAR (do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationship*). Para executar a abordagem, quatro plataformas foram selecionadas: *SwissTargetPrediction*, *STarFish* e *TargetNetEnsemble* três entre as principais plataformas de acesso aberto capazes de executar esse procedimento (Galati et al., 2021). Conjuntamente, também se utilizou a plataforma *Cortellis Drug Discovery Intelligence (CDDI)*, desenvolvida pela empresa *Clarivate Analytics*, a fim de enriquecer o escopo do estudo com plataformas que não são de acesso aberto.

A fim de refinar ao máximo a confiabilidade dos alvos que seriam selecionados para os testes de *docking* molecular, três critérios de exclusão foram estabelecidos. O primeiro critério de exclusão estabelecido foi a presença em apenas uma única plataforma de predição, portanto, apenas proteínas que se repetiram em duas ou mais plataformas foram consideradas aptas a seguirem para o próximo critério de exclusão. A primeira triagem resultou em um grupo contendo proteínas humanas e não humanas, porém, apenas proteínas humanas eram de interesse para o estudo. Portanto, o segundo critério de exclusão consistiu em eliminar todas as proteínas não pertencentes à espécie *Homo sapiens*. Considerando que o objetivo principal do estudo se tratava de avaliar mecanismos anticâncer da molécula, o terceiro critério de exclusão estabelecido foi responsável por retirar proteínas não atuantes de maneira direta ou indireta em neoplasias.

3.2.3. *Docking* molecular

Para os testes de *docking* molecular, o primeiro passo necessário a ser realizado foi a escolha das estruturas ideais para a realização das predições. Para a execução dessa etapa, o banco de dados *UniProt* foi utilizado para realizar a pesquisa sobre sequência de aminoácidos das estruturas proteicas e para localizar o código de suas estruturas depositadas na plataforma *Protein Data Bank*. Com o objetivo de realizar testes com maior confiabilidade, apenas estruturas de proteínas sem mutação e obtidas meio de difração de raio-x foram selecionadas para prosseguirem aos experimentos de *docking* molecular.

Após selecionar e adquirir os arquivos em extensão *.PDB*, as estruturas que não se encontravam em forma de monômero foram editadas via *PyMol Molecular Graphics System – Version 3.0.3 (Schrodinger, LLC)*, padronizando todas as estruturas em forma monomérica. Entre as proteínas selecionadas, oito delas não tinham suas devidas estruturas sem mutações e

obtidas por meio de difração de raio-x depositadas no *Protein Data Bank*, portanto, para manter o esquema de padronização intacto, optou-se por excluir as proteínas citadas.

A molécula ENSJ-1135 teve sua estrutura química desenhada de maneira bidimensional através do *software MarvinSketch – Chemaxon Ltd.*, e depois transformada em arquivo de extensão *.SDF*. Antes da realização dos experimentos de *docking* molecular, o composto teste foi submetido ao *software OpenBabel – Version 3.1.0*, tendo sua estrutura devidamente adequada ao pH de 7,4 (pH fisiológico), visando simular condições fisiológicas de uma melhor maneira e não ser afetado por nenhum viés ocasionado por diferentes condições de protonação.

Estando em posse dos arquivos necessários, devidamente adequados para a realização do teste, os arquivos foram submetidos à plataforma online brasileira *DockThor – Version 2.0* (disponível através do link <https://dockthor.lncc.br/v2/>), que realiza experimentos virtuais através do Supercomputador SDumont, localizado no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC), Petrópolis – Rio de Janeiro – Brasil.

As configurações foram estabelecidas de acordo com o manual disponibilizado pela plataforma, onde as proteínas foram submetidas, enviadas e automaticamente padronizadas de acordo com os parâmetros *MMFF94* (do inglês, *Merck Molecular Force Field 94*). Nas etapas de adição de cofatores e moléculas de água, por não haver disponibilidade de cofatores em algumas das proteínas adquiridas, optou-se por realizar todos os testes ausentes da influência de água e cofatores. Em seguida, o arquivo contendo a molécula teste gerado pelo *software OpenBabel* foi submetido como ligante e realizou-se procedimento de *docking* cego, seguindo sempre o mesmo padrão de parâmetros (parâmetros selecionados de acordo com a capacidade máxima oferecida pela plataforma) para todas as proteínas, conforme ilustrado na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros padronizados para a realização dos experimentos de *docking* cego

Parâmetro	Valor
Dimensão da caixa XYZ	40
Discretização	0,42
Número de avaliações	1.000.000
Tamanho populacional	750
Número de corridas	24

Fonte: Própria, elaborada conforme os critérios pré-estabelecidos no manual instruções da plataforma utilizada

Ao coletar os resultados, as estruturas proteicas antes do procedimento foram utilizadas para servir de comparação para avaliar o nível de modificação estrutural gerada pela molécula teste em complexo com a proteína, e as 10 reações mais prováveis foram selecionadas para

análises posteriores, a fim de escolher qual posição mais adequada para utilizar como resultado do experimento. Para realizar a análise dos resultados, as estruturas proteicas foram visualizadas através do *software Discovery Studio Visualizer – Version 21.1* onde foram separadas por *clusters* e tiveram sua posição mais provável escolhida a partir da variação de poses em cada *cluster* e associações entre valores de energia total (quanto menor, mais estável a reação), energia de interação (soma das energias de Coulomb e Van der Waals) e energia livre de Gibbs (ΔG).

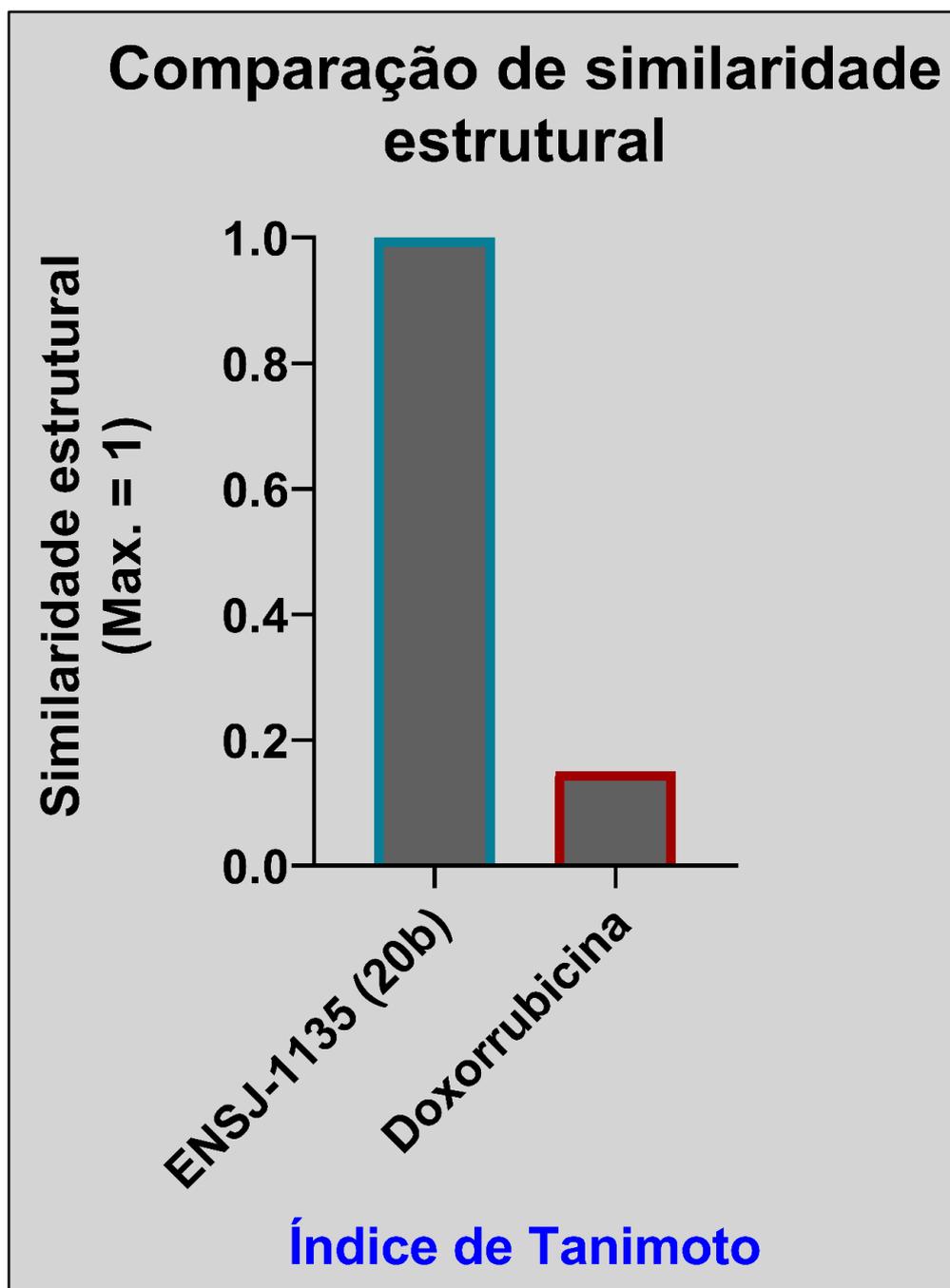
Após a escolha das melhores posições entre a molécula teste e cada proteína alvo, os complexos proteína-ligante foram montados utilizando o *software PyMol* e foram salvos em arquivos em extensão *.PDB*. Posteriormente, os complexos melhores ranqueados de acordo com as associações citadas no parágrafo anterior, foram explorados para criação de figuras, a fim de ilustrar as melhores interações. Tais figuras e análises adicionais foram realizadas a partir dos *softwares PyMol* e *Maestro V.14.1.138 – Schrödinger Inc*, considerando interações em até 5Å de distância.

4. Resultados

4.1. Comparação estrutural entre a molécula teste e o fármaco quimioterápico referência a ser utilizado como controle positivo

Através da metodologia de execução *in silico* do cálculo do Índice de Tanimoto, já descrita anteriormente, os dados de semelhanças estruturais foram calculados, e o fármaco doxorrubicina foi escolhido como controle, visto que, além de ser amplamente utilizado clinicamente e também fazer parte do grupo químico das quinonas, foi também utilizado como controle positivo nos testes de citotoxicidade no artigo em que a molécula ENSJ-1135 foi publicada. Apesar de ambos compostos serem classificados como quinonas, o valor obtido foi 0,15 (equivalente a 15% de semelhança estrutural), não demonstrando um alto grau de similaridade. Para ter certeza que o teste foi realizado de maneira correta, a própria molécula ENSJ-1135 foi utilizada como estrutura controle, a fim de demonstrar o valor máximo, demonstrado na Figura 8.

Figura 8. Representação gráfica em barras demonstrando os resultados do cálculo do Índice de Tanimoto entre a molécula teste e o fármaco quimioterápico utilizado como controle

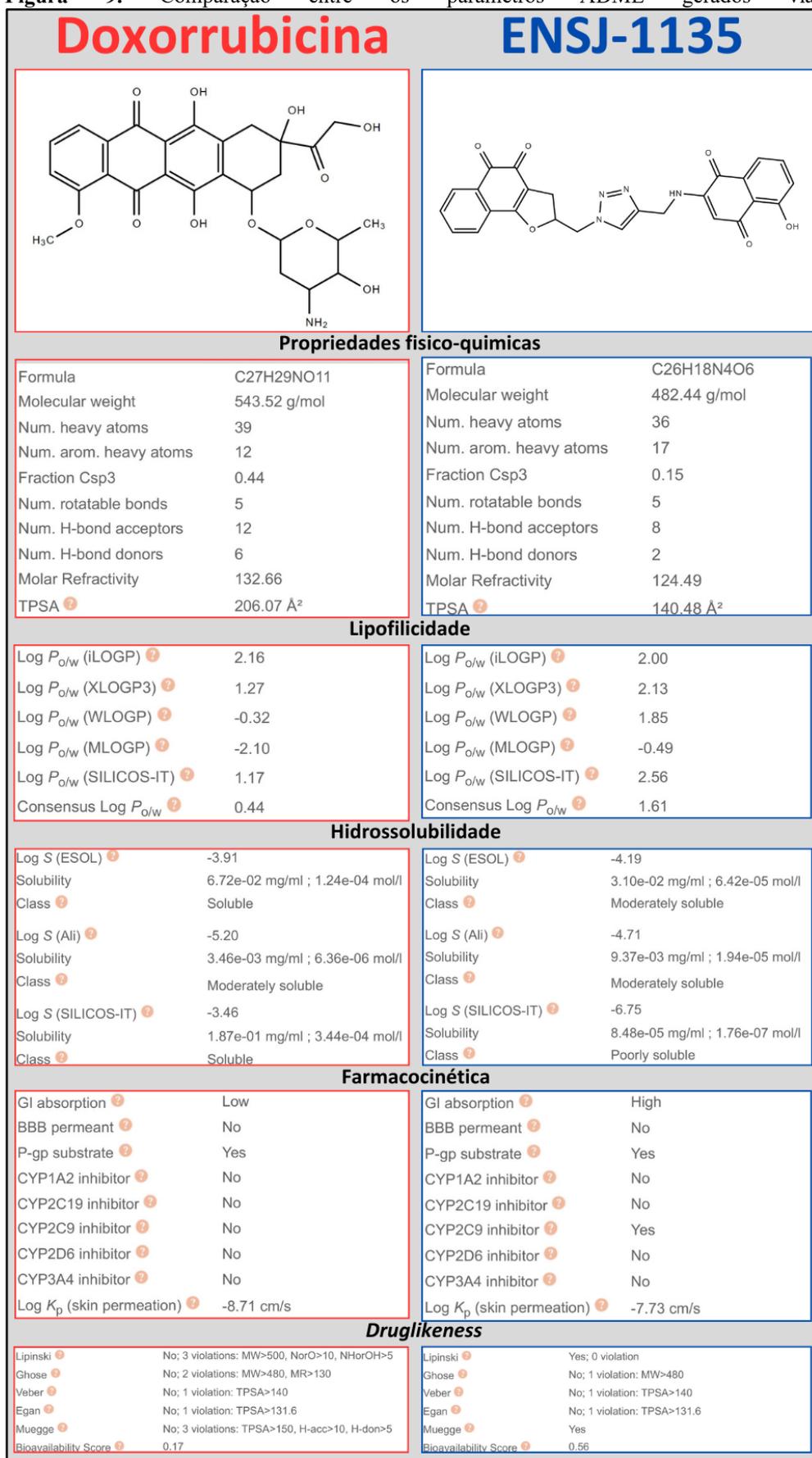


Fonte: Representação gráfica realizada através do software *GraphPad Prism - version 8.0*

4.2. Predições farmacocinéticas

Os parâmetros de ADME foram adquiridos a partir da submissão das estruturas SMILES na plataforma *SwissADME*, que realizou os devidos cálculos necessários para prever os valores fornecidos na Figura 9.

Figura 9. Comparação entre os parâmetros ADME gerados via SwissADME



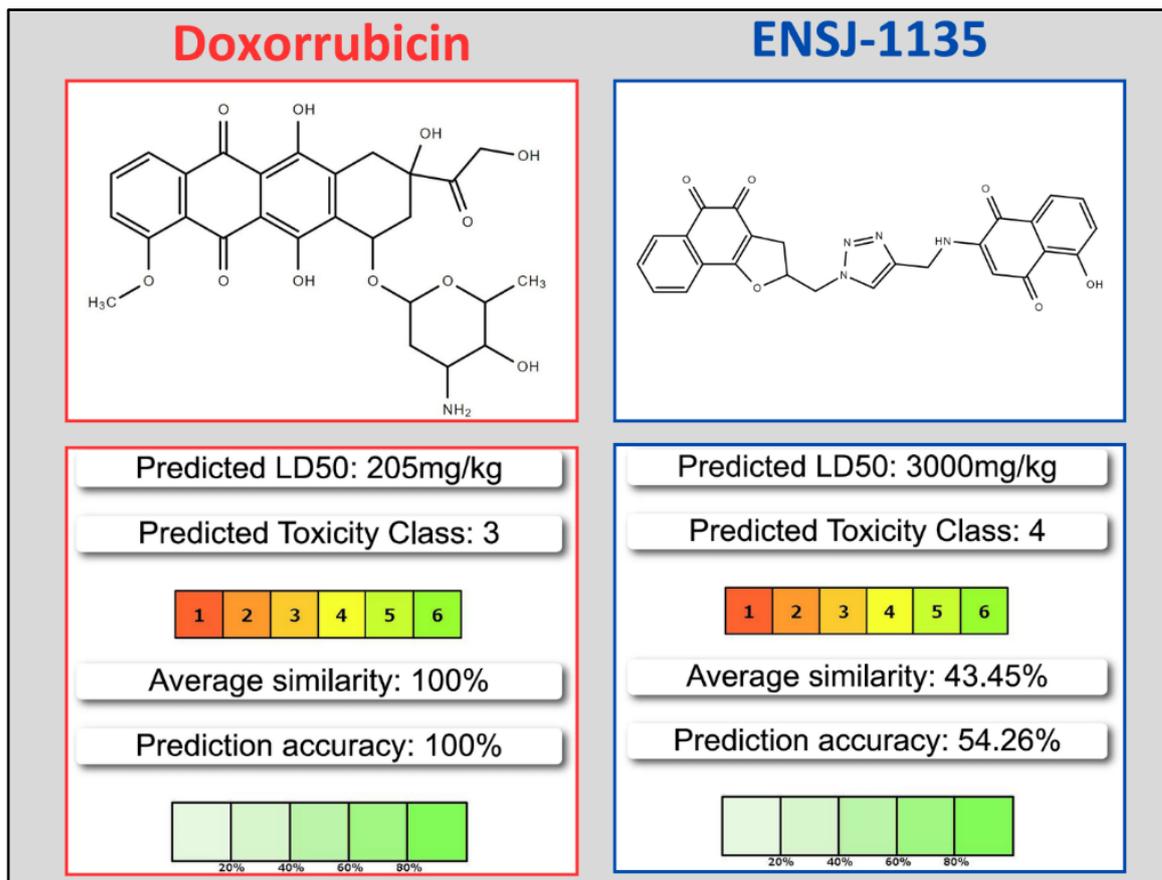
Fonte: Adaptado de resultados obtidos através da plataforma SwissADME

Os cálculos mostraram que os parâmetros farmacocinéticos tendem a possuir grandes divergências entre a molécula teste e o fármaco controle positivo. Começando por critérios de solubilidade e absorção, a doxorrubicina possui um maior valor de área de superfície polar topológica (TPSA, do inglês, *Topological Polar Surface Area*) quando comparada com a molécula ENSJ-1135, que é um fator essencial para a determinação de absorções avaliadas posteriormente. Ambas possuem um valor de TPSA alto o suficiente para torna-las impermeáveis à barreira hematoencefálica, porém, ainda assim possuem grandes divergências entre seus valores. O valor mais alto favorece com que o fármaco doxorrubicina tenha uma solubilidade maior em água, porém, sua alta polaridade se torna um fator limitante em relação à sua absorção tecidual. Dessa forma, o composto ENSJ-1135, por possuir um menor valor de TPSA, possui uma maior facilidade em ser absorvido pelo sistema gastrointestinal, é mais lipossolúvel e menos hidrossolúvel, quando comparado ao controle positivo (Daina et al., 2017).

Em relação a metabolismo e interações, a doxorrubicina não inibe nenhuma das principais enzimas do citocromo P450, enquanto a droga ENSJ-1135 inibe a CYP2C9, podendo resultar em interações farmacológicas. Enquanto os parâmetros utilizados para predição de *druglikeness*, que avalia características desejáveis a fármacos em desenvolvimento como permeabilidade e biodisponibilidade, a doxorrubicina não mostrou valores promissores nos parâmetros de absorção e biodisponibilidade. Em contra partida, o composto ENSJ-1135 apesar de ter reprovado em três dos cinco parâmetros utilizados, apresenta uma biodisponibilidade classificada como boa, sendo três vezes maior do que os valores obtidos pela doxorrubicina (Daina et al., 2017).

A predição de parâmetros de toxicidade obtidos a partir da submissão das estruturas moleculares na plataforma *ProTox-3.0*, ilustrado na Figura 10, realizou uma classificação variável entre os níveis de 1 a 6, onde quanto mais próximo do nível 1, mais tóxico é o composto. A doxorrubicina foi considerada um composto de classe 3, com uma dose letal média (LD50, do inglês, *lethal dose*) de 205mg/kg, enquanto o composto ENSJ-1135 foi classificado como classe 4, com uma LD50 prevista em 3000mg/kg.

Figura 10. Comparação entre os parâmetros toxicidade gerados via *ProTox-3.0*



Além de realizar a predição toxicológica contendo dose letal média, a plataforma também foi capaz de gerar resultados de toxicidade sistêmica de maneira detalhada, conforme ilustrada nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3. Predições de toxicidade sistêmica detalhada da droga doxorubicina obtidas através da plataforma *ProTox3.0*

Classificação	Alvo	Predição	Probabilidade
Metabolismo	CYP2C9	Inativo	0,73
Metabolismo	CYP2D6	Inativo	0,92
Metabolismo	CYP2C19	Inativo	0,97
Metabolismo	CYP3A4	Inativo	0,98
Metabolismo	CYP1A2	Inativo	0,99
Metabolismo	CYP2E1	Inativo	0,99
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor beta do hormônio tireoidiano(THR β)	Inativo	0,78
Eventos de Iniciação Molecular	Acetilcolinesterase (AChE)	Inativo	0,86
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor alfa do hormônio tireoidiano (THR α)	Inativo	0,90

Eventos de Iniciação Molecular	Receptor de glutamato N-metil-D-aspartato(NMDAR)	Inativo	0,92
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor Pregnano X(PXR)	Inativo	0,92
Eventos de Iniciação Molecular	Canais de sódio regulados por voltagem(VGSC)	Inativo	0,95
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor GABA(GABAR)	Inativo	0,96
Eventos de Iniciação Molecular	Transtiretrina (TTR)	Inativo	0,97
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato(AMPA)	Inativo	0,97
Eventos de Iniciação Molecular	NADH-quinona oxidoreductase(NADHOX)	Inativo	0,97
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor de rianodina(RYR)	Inativo	0,98
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor constitutivo de androstano (CAR)	Inativo	0,98
Eventos de Iniciação Molecular	Simportador Na ⁺ /I-(NIS)	Inativo	0,98
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor cainato(KAR)	Inativo	0,99
Toxicidade orgânica	Cardiotoxicidade	Ativo	0,64
Toxicidade orgânica	Neurotoxicidade	Ativo	0,74
Toxicidade orgânica	Nefrotoxicidade	Ativo	0,80
Toxicidade orgânica	Toxicidade respiratória	Ativo	0,91
Toxicidade orgânica	Hepatotoxicidade	Inativo	0,86
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Aromatase	Ativo	0,52
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Domínio de Ligação ao Ligante do Receptor de Andrógeno (AR-LBD)	Inativo	0,55
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor de Estrogênio Alfa(ER)	Inativo	0,73
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Domínio de Ligação ao Ligante do Receptor de Estrogênio(ER-LBD)	Inativo	0,74
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor de hidrocarboneto de arila(AhR)	Inativo	0,92

Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma(PPAR-Gamma)	Inativo	0,97
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor de andrógeno (AR)	Inativo	0,99
Vias de respostas a estresse Tox21	Fosfoproteína (supressor de tumor)p53	Ativo	0,52
Vias de respostas a estresse Tox21	Potencial de membrana mitocondrial(MMP)	Inativo	0,56
Vias de respostas a estresse Tox21	Proteína 5 contendo o domínio AAA da família ATPase (ATAD5)	Inativo	0,63
Vias de respostas a estresse Tox21	Fator nuclear (2 derivado de eritróide) semelhante a 2/elemento responsivo a antioxidantes (nrf2/ARE)	Inativo	0,98
Vias de respostas a estresse Tox21	Elemento de resposta do fator de choque térmico(HSE)	Inativo	0,98
Pontos finais de toxicidade	Toxicidade clínica	Ativo	0,84
Pontos finais de toxicidade	Citotoxicidade	Ativo	0,94
Pontos finais de toxicidade	Mutagenicidade	Ativo	0,98
Pontos finais de toxicidade	Imunotoxicidade	Ativo	0,99
Pontos finais de toxicidade	Ecotoxicidade	Inativo	0,58
Pontos finais de toxicidade	Toxicidade nutricional	Inativo	0,69
Pontos finais de toxicidade	Carcinogenicidade	Inativo	0,90
Pontos finais de toxicidade	Barreira hemato-encefálica	Inativo	1

Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos na plataforma *ProTox3.0*

Tabela 4. Predições de toxicidade sistêmica detalhada da molécula ENSJ-1135 obtidas através da plataforma *ProTox3.0*

Classificação	Alvo	Predição	Probabilidade
Metabolismo	CYP2C9	Inativo	0,61
Metabolismo	CYP2D6	Inativo	0,61
Metabolismo	CYP3A4	Inativo	0,69
Metabolismo	CYP2C19	Inativo	0,78
Metabolismo	CYP1A2	Inativo	0,83
Metabolismo	CYP2E1	Inativo	0,97
Eventos de Iniciação Molecular	Acetilcolinesterase (AChE)	Ativo	0,56
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor beta do hormônio tireoidiano(THR β)	Inativo	0,78

Eventos de Iniciação Molecular	Receptor alfa do hormônio tireoidiano (THR α)	Inativo	0,90
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor de glutamato N-metil-D-aspartato(NMDAR)	Inativo	0,92
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor Pregnano X(PXR)	Inativo	0,92
Eventos de Iniciação Molecular	Canais de sódio regulados por voltagem(VGSC)	Inativo	0,95
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor GABA(GABAR)	Inativo	0,96
Eventos de Iniciação Molecular	Transtiretrina (TTR)	Inativo	0,97
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionato(AMPAR)	Inativo	0,97
Eventos de Iniciação Molecular	NADH-quinona oxidoreductase(NADHOX)	Inativo	0,97
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor de rianodina(RYR)	Inativo	0,98
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor constitutivo de androstano (CAR)	Inativo	0,98
Eventos de Iniciação Molecular	Simportador Na ⁺ /I ⁻ (NIS)	Inativo	0,98
Eventos de Iniciação Molecular	Receptor cainato(KAR)	Inativo	0,99
Toxicidade orgânica	Hepatotoxicidade	Ativo	0,56
Toxicidade orgânica	Nefrotoxicidade	Ativo	0,57
Toxicidade orgânica	Toxicidade respiratória	Ativo	0,73
Toxicidade orgânica	Neurotoxicidade	Inativo	0,57
Toxicidade orgânica	Cardiotoxicidade	Inativo	0,82
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor de hidrocarboneto de arila(AhR)	Inativo	0,81
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor de Estrogênio Alfa(ER)	Inativo	0,87
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Aromatase	Inativo	0,92
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Domínio de Ligação ao Ligante do Receptor de Andrógeno (AR-LBD)	Inativo	0,94

Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Domínio de Ligação ao Ligante do Receptor de Estrogênio(ER-LBD)	Inativo	0,95
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor gama ativado por proliferador de peroxissoma(PPAR-Gamma)	Inativo	0,96
Vias de sinalização do receptor nuclear Tox21	Receptor de andrógeno (AR)	Inativo	0,97
Vias de respostas a estresse Tox21	Potencial de membrana mitocondrial(MMP)	Inativo	0,74
Vias de respostas a estresse Tox21	Fosfoproteína (supressor de tumor)p53	Inativo	0,89
Vias de respostas a estresse Tox21	Fator nuclear (2 derivado de eritróide) semelhante a 2/elemento responsivo a antioxidantes (nrf2/ARE)	Inativo	0,90
Vias de respostas a estresse Tox21	Elemento de resposta do fator de choque térmico(HSE)	Inativo	0,90
Vias de respostas a estresse Tox21	Proteína 5 contendo o domínio AAA da família ATPase (ATAD5)	Inativo	0,91
Pontos finais de toxicidade	Carcinogenicidade	Ativo	0,51
Pontos finais de toxicidade	Toxicidade nutricional	Ativo	0,54
Pontos finais de toxicidade	Mutagenicidade	Ativo	0,58
Pontos finais de toxicidade	Toxicidade clínica	Ativo	0,61
Pontos finais de toxicidade	Imunotoxicidade	Ativo	0,97
Pontos finais de toxicidade	Barreira hemato-encefálica	Inativo	0,54
Pontos finais de toxicidade	Ecotoxicidade	Inativo	0,62
Pontos finais de toxicidade	Citotoxicidade	Inativo	0,63

Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos na plataforma *ProTox3.0*

4.3. Target Fishing

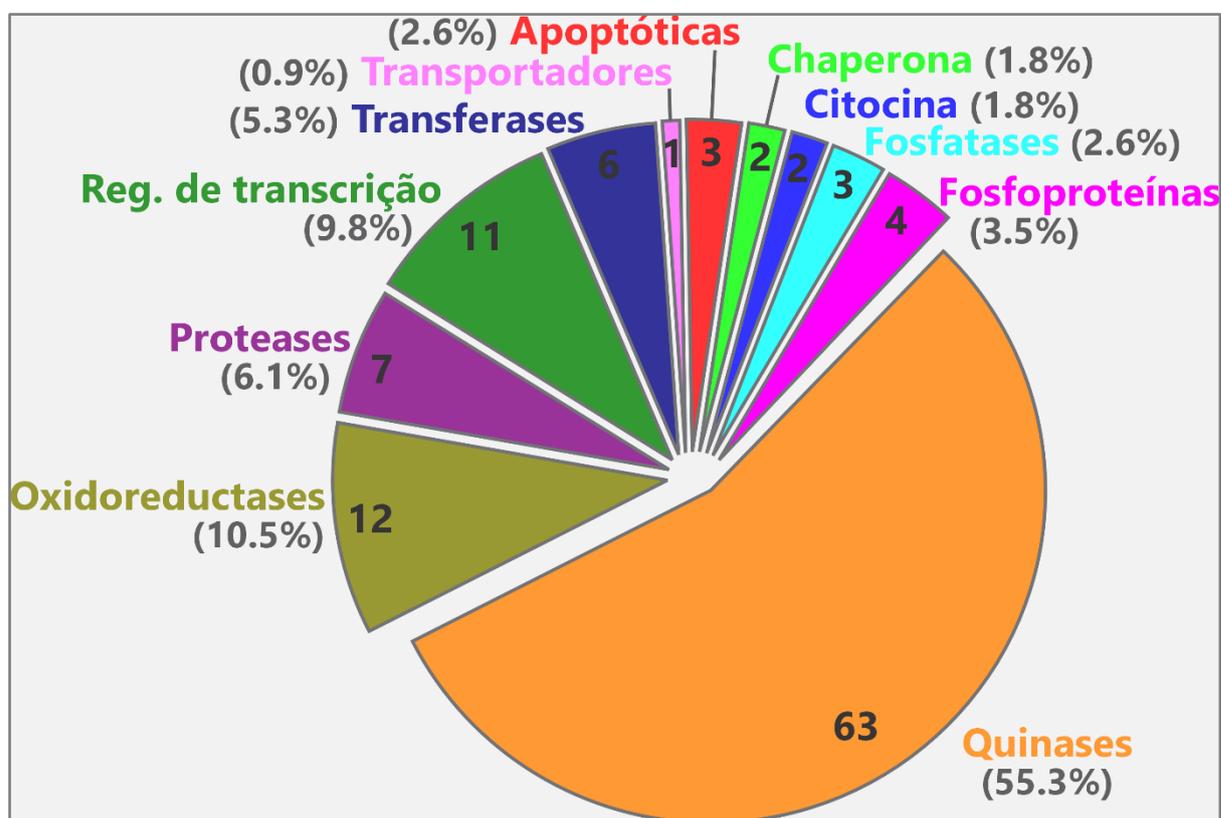
Ao todo, mais de 1900 proteínas foram captadas como potenciais alvos, e sequencialmente foram submetidas aos critérios de exclusão estabelecidos e já relatados anteriormente na metodologia. Como resultado da primeira triagem, restaram 249 proteínas humanas e não humanas, que posteriormente foram reduzidas a 224 proteínas humanas com probabilidade de serem afetadas pela molécula ENSJ-1135. Porém, apenas 123 dessas proteínas estavam relacionadas diretamente ou indiretamente ao desenvolvimento de neoplasias,

resultando em proteínas com funções variadas aptas a seguirem às etapas posteriores de preparação para a realização dos experimentos de *docking* molecular.

4.4. *Docking* Molecular

Durante as etapas de obtenção de estruturas proteicas obtidas por cristalografia de raios disponíveis na plataforma *Protein Data Bank*, oito proteínas não tinham suas estruturas devidamente encaixadas nos critérios de exclusão e inclusão estabelecidos, resultando em exclusão destas aos experimentos de *docking* molecular. Dessa forma, conforme melhor ilustrado e detalhado na Figura 11, 114 estruturas foram consideradas aptas a prosseguir ao experimento.

Figura 11. Ilustração da distribuição dos alvos considerados aptos para seguir aos testes posteriores

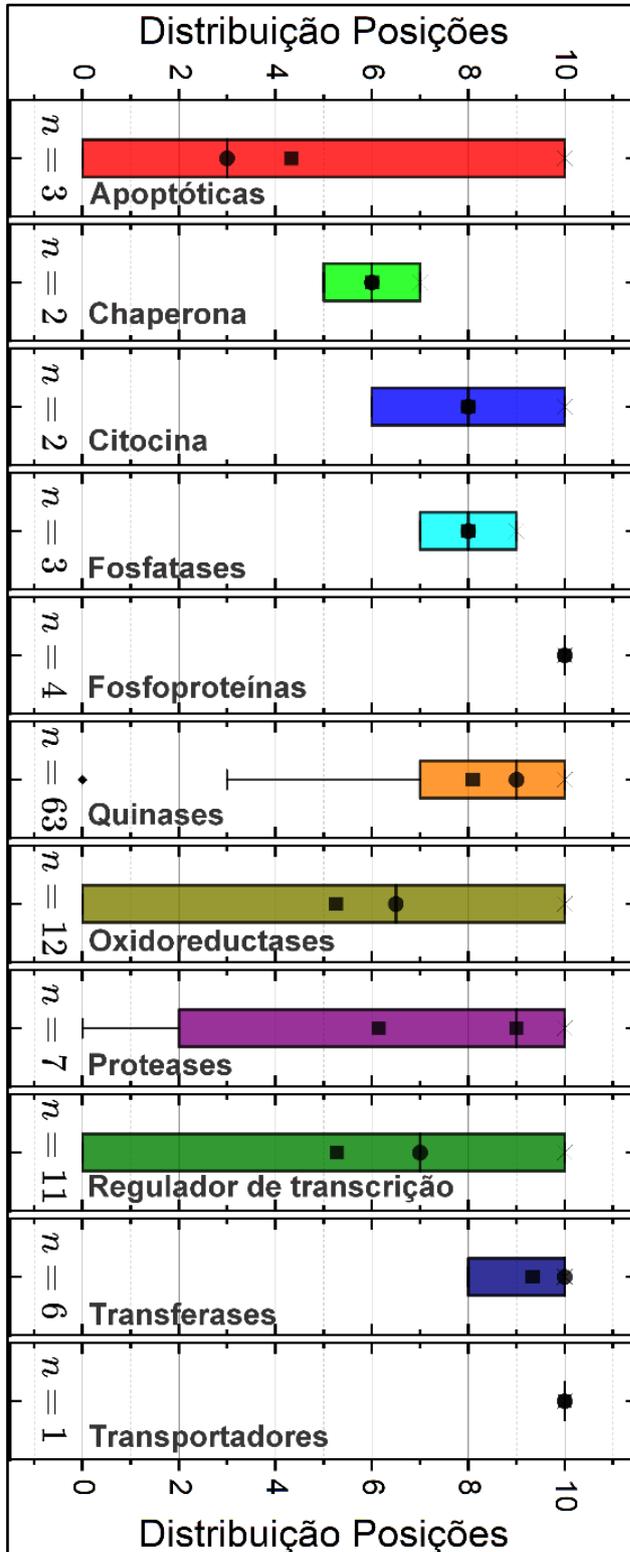


Fonte: Própria

Considerando as 10 poses mais prováveis resultadas dos experimentos de *docking* molecular cego entre a molécula ENSJ-1135 e as proteínas alvos, em pelo menos 70% das vezes o complexo proteína/ligante afetou sítios críticos ao funcionamento de 85 entre as 114 proteínas selecionadas para o experimento, tendo a distribuição de alvos detalhada na Figura 12. Após o detalhamento amplo da distribuição do número de poses em que a molécula alvo ocupou um sítio crítico ao funcionamento da proteína alvo, reduziu-se o escopo de avaliação a fim de

analisar de forma qualitativa as reações formadas em cada complexo e determinar os alvos mais prováveis da molécula teste. Assim como ilustrado na Figura 13, o foco foi direcionado aos complexos em que a molécula ENSJ-1135 ocupou sítios essenciais dos alvos em pelo menos 7 das 10 reações mais prováveis preditas pelos experimentos de *docking* molecular. Após a redução do escopo do estudo, voltando-se a abordar as reações mais prováveis, optou-se por detalhar cada reação de maneira qualitativa, analisando as naturezas de ligações químicas estabelecidas entre o ligante e o alvo, conforme melhor ilustrado na Figura 14, a fim de estabelecer quais os alvos mais promissores. Por conta da extensa quantidade de dados, os resultados completos serão implementados como material suplementar.

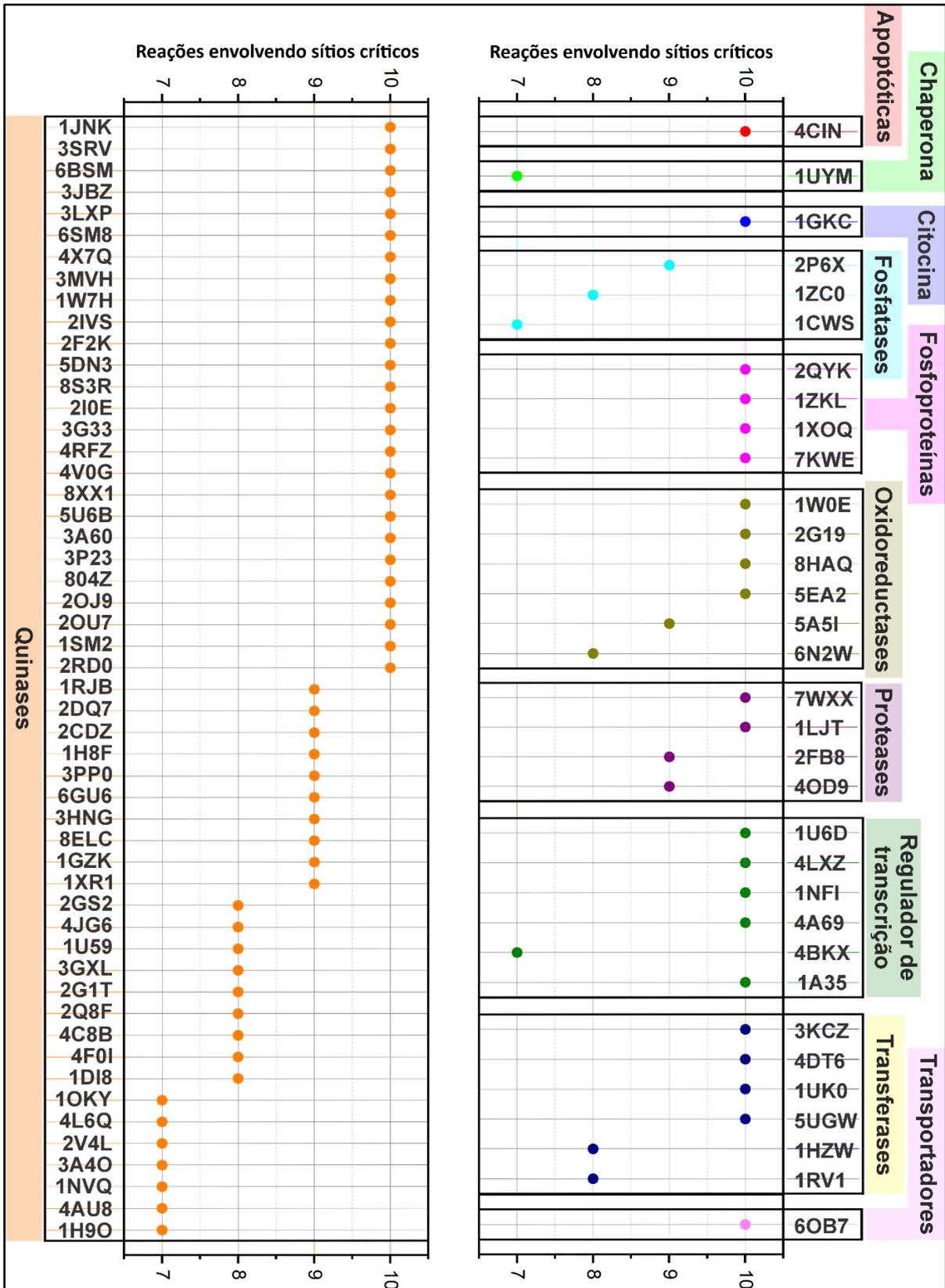
Figura 12. Distribuição entre as classes de proteínas submetidas ao experimento, contendo dados numéricos de proteínas em cada grupo e posições envolvendo regiões consideradas críticas ao funcionamento das proteínas durante a formação do complexo com o ligante



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

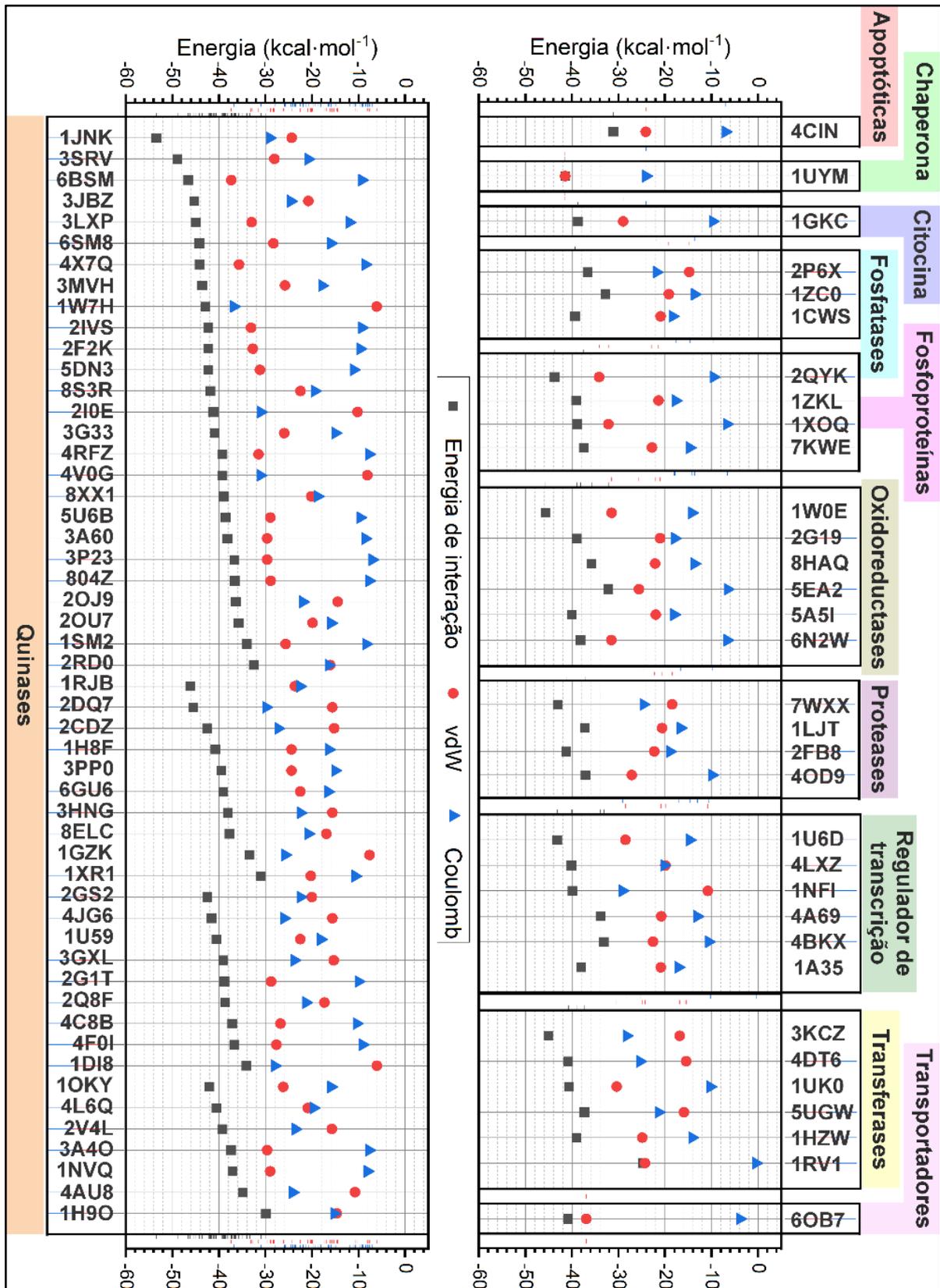
* — Máximo; ** ⊗ 99%; *** ■ Média; **** ● Mediana; ***** ⊗ 1%; ***** — Mínimo

Figura 13. Detalhamento das reações em que os complexos proteína/ligante afetaram sítios críticos das proteínas em pelo menos 70% das vezes, contendo os códigos *.PDB* das estruturas escolhidas e o número de reações consideradas críticas



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Figura 14. Detalhes das energias de interação formadas nos complexos escolhidos como mais prováveis, resultantes da soma das energias de Van der Waals (hidrofóbicas) e Coulomb (cargas elétricas)



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

* □ Máximo; ** ⊠ 99%; *** ■ Média; **** ● Mediana; ***** ⊠ 1%; ***** □ Mínimo.

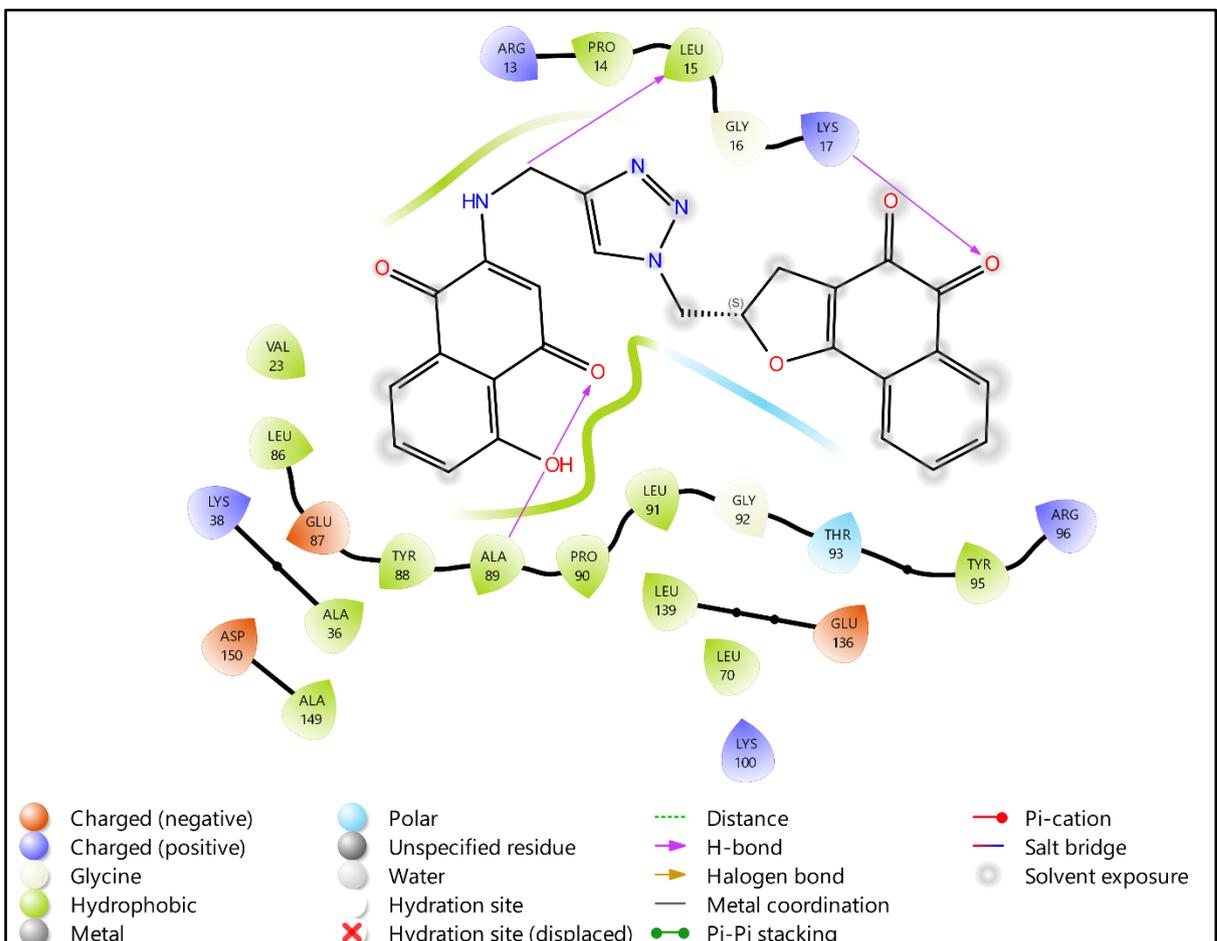
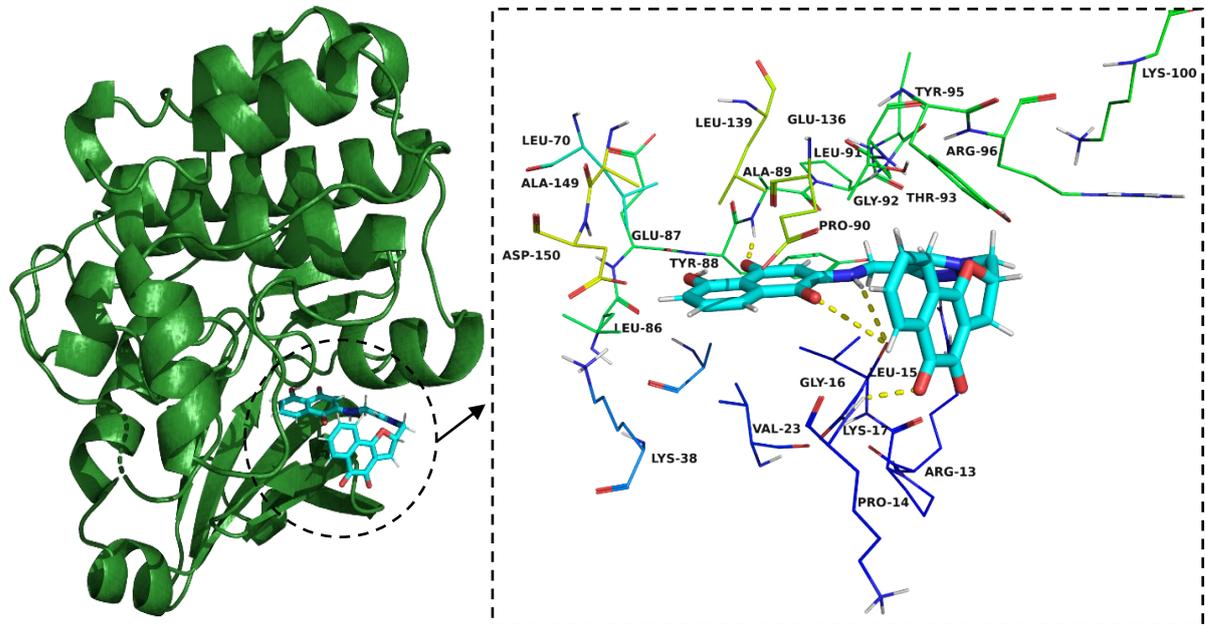
4.4.1. Quinases

Os resultados de *docking* molecular mostraram que apesar da quinona ENSJ-1135, assim como outras quinonas, possuir atração pelo sítio catalítico das enzimas NQO1 e NQO2, potencialmente gerando radicais livres, esse não parece ser o seu principal mecanismo de ação. A molécula mostrou padrões de ligações seletivos, fortes e estáveis aos sítios de ATP em maioria das proteínas quinases testadas, principalmente em proteínas reguladoras de ciclo celular, como AURKA (PDBID: 5DN3), CDKs 1, 2, 4, 5 e 7 (PDBIDs: 6GU6, 1DI8, 3G33, 4AU8 e 8P4Z, respectivamente) e TYK2 (PDBID: 3LXP).

O complexo formado entre a molécula teste e a proteína AURKA está entre uma das melhores reações obtidas no presente estudo. Formando o sexto complexo mais estável entre todos os obtidos, conforme ilustrado na Figura 13 e 14, todas as possíveis poses tiveram atração competitiva ao sítio de ATP, formando diversas ligações de hidrogênio, reações Pi e *Van der Waals*.

Figura 15. (A) Interação complexo proteína-ligante entre AURKA (PDBID-5DN3) e ENSJ-1135; (B) Cartoon mostrando o cristal 5DN3 complexado com o ATP em seu sítio catalítico; (C) Proteína demonstrada em forma de superfície, destacando seu bolsão contendo o *redocking* da molécula de ATP e o *docking* da molécula ENSJ-1135

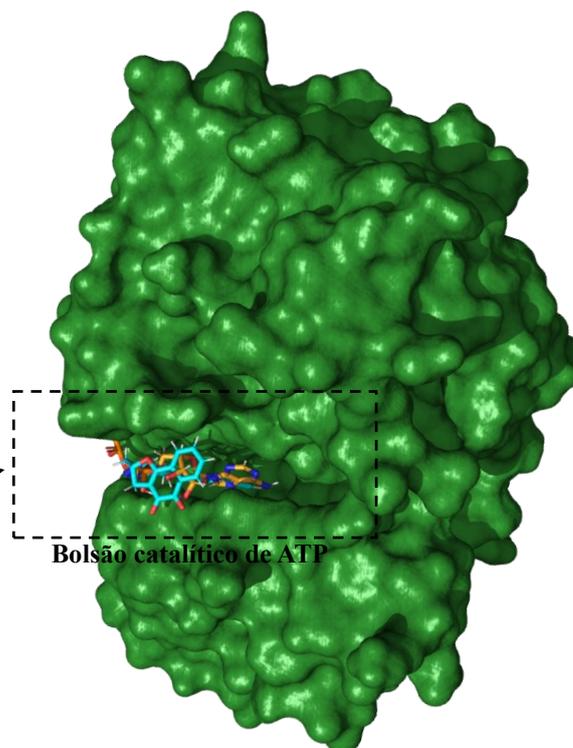
A.



B.



C.



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Como ilustrado na Figura 15A, os aminoácidos participaram de diferentes maneiras, de acordo com os átomos presentes em seus resíduos. Os anéis aromáticos da molécula ENSJ-1135 foram alvos de interação dos tipos *Pi-Sigma* e *Pi-Alkyl*, que são interações de nuvens de cargas eletrônicas, tais reações envolveram resíduos de carbono presentes nos aminoácidos Val23, Ala36 e Leu139. Enquanto que as partes de hidroxila, dupla-O e nitrogênios no restante da molécula formaram importantes interações de hidrogênio, que contribuíram de maneira ativa para garantir uma ótima energia de interação e estabilidade do complexo. Através da visualização bidimensional através do *software Maestro V.14.1.138 – Schrödinger Inc.*, um dos átomos de hidrogênio da Lys17 formou ligação de hidrogênio com o oxigênio na extremidade da molécula teste, assim como também ocorreu envolvendo os resíduos de aminoácidos da Leu15 e Ala89, formando ligações de hidrogênio com os átomos nitrogênio e oxigênio na outra extremidade do anel azol da molécula teste. Além disso, vários aminoácidos adjacentes agiram de maneira positiva ao redor do complexo através de interações de Van der Waals. Na Figura 15B, o cristal 5DN3 é demonstrado contendo a molécula de ATP (ilustrada contendo seus átomos de carbono de cor laranja) originalmente complexada no bolsão catalítico.

Posteriormente, a Figura 15C ilustra que os complexos formados através do *docking* com o composto ENSJ-1135 e *redocking* da molécula de ATP ocupam o mesmo bolsão da proteína.

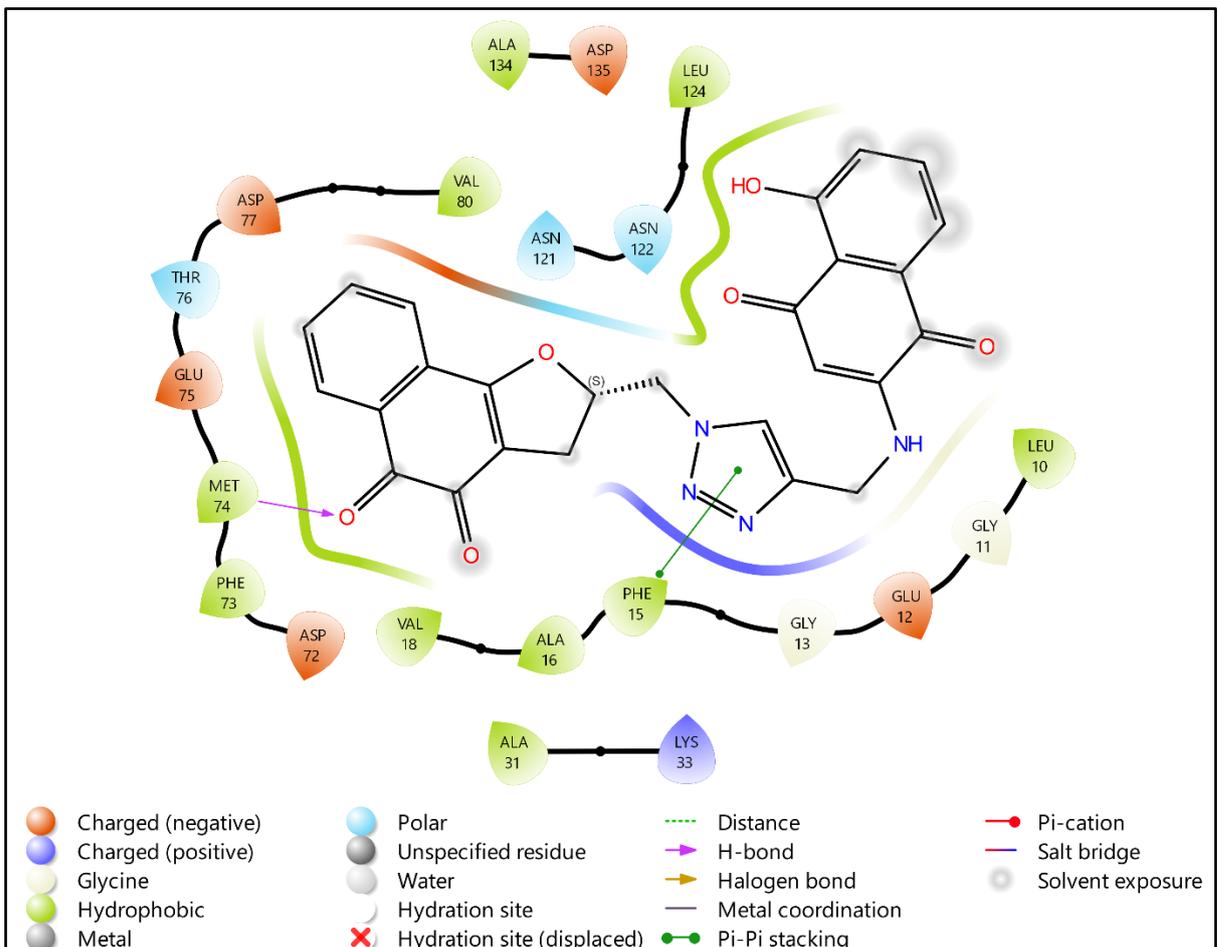
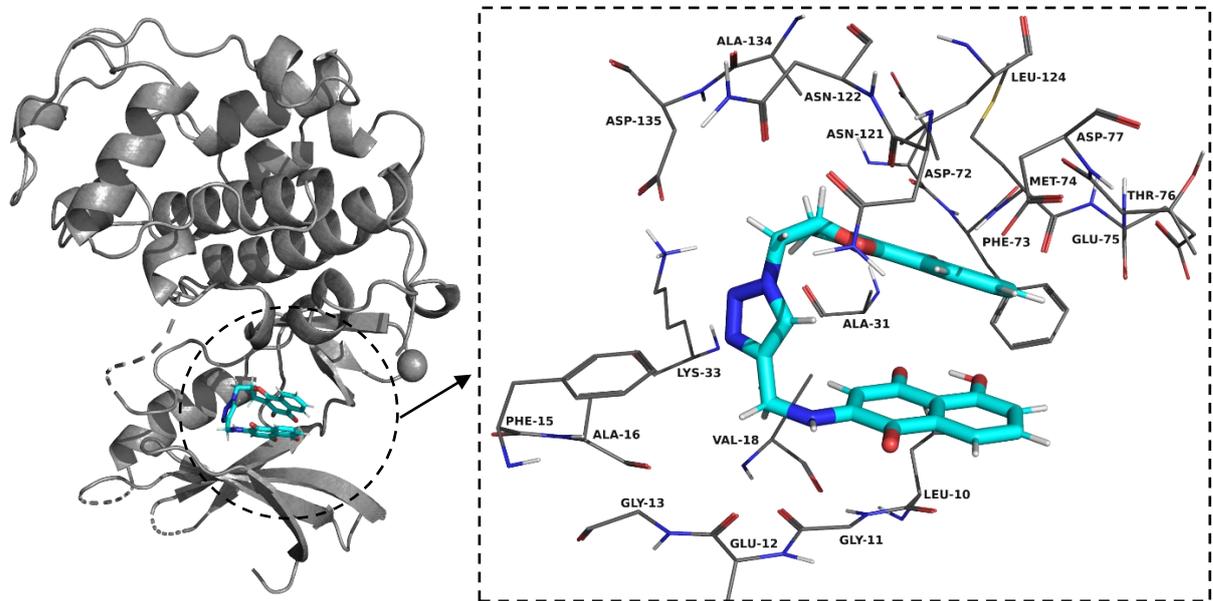
Outras duas proteínas quinases essenciais que também tiveram ótimos resultados no experimento *in silico* realizado foram as proteínas CDK7 e CDK4. A molécula teste, assim como na proteína AURKA, atuou de maneira seletiva e efetiva no sítio de ATP em todas as 10 melhores poses do experimento. Em ambas (ilustrados nas Figuras 16 e 17), com ligações fortes e estáveis, contendo ligações de hidrogênio e interações do tipo Pi.

Assim como na proteína AURKA, a influência de interações entre átomos de carbono presentes nos resíduos de aminoácidos no sítio de ATP sobre os anéis aromáticos em ambas extremidades da molécula teste se mostrou de extrema importância para garantir força de interação e estabilidade do complexo. Os aminoácidos Leu10, Gly11 formaram importantes interações Pi nos anéis aromáticos mais próximos ao N1 da molécula, enquanto a Val18 concomitantemente atua no anel aromático para-quinona e no anel azol responsável por conectar os dois centros redox. Enquanto isso, os átomos de carbono da Leu124 também formam interações Pi com os anéis aromáticos do outro centro redox. Além de interações Pi, ligações de hidrogênios foram formados entre o átomo de oxigênio do resíduo Glu12 e o átomo de hidrogênio ligado a N1. Mais ligações de hidrogênio ocorrem no anel azol, entre um dos nitrogênios do centro da molécula teste e os dois hidrogênios do resíduo Lys33. Na outra extremidade de centro redox, o resíduo Asn122 forma ligações de hidrogênio com o O3 da quinona, enquanto o O4 também é alvo de ligação de hidrogênio com o resíduo Met74. Além disso, várias interações de *Van der Waals* contribuem com a estabilidade e força de interação ao redor do complexo.

Seguindo o mesmo padrão das outras duas quinases relatadas no presente estudo, o complexo proteína-ligante foi formado no sítio de ATP em todas as 10 melhores posições previstas pelo experimento. Nesse complexo em específico, o anel azol da molécula, ao formar interações Pi com o resíduo Arg135, que ao mesmo tempo também gera ligação de hidrogênio com o O6 da molécula, chama atenção por permitir uma torção que garantiu uma grande flexibilidade à molécula. Essa torção resultou na proximidade espacial entre os dois centros redox, facilitando a formação de mais sete ligações de hidrogênio ao complexo, onde 5 delas ocorre no centro redox contendo o O4 e O5 e envolvem os resíduos de aminoácidos Ala166, Leu167, Thr168 e Pro169, enquanto as outras duas ligações de hidrogênio envolvem os resíduos Arg159 e Ser162 e os átomos O1 e O2 da quinona. Seguindo o padrão dos outros complexos,

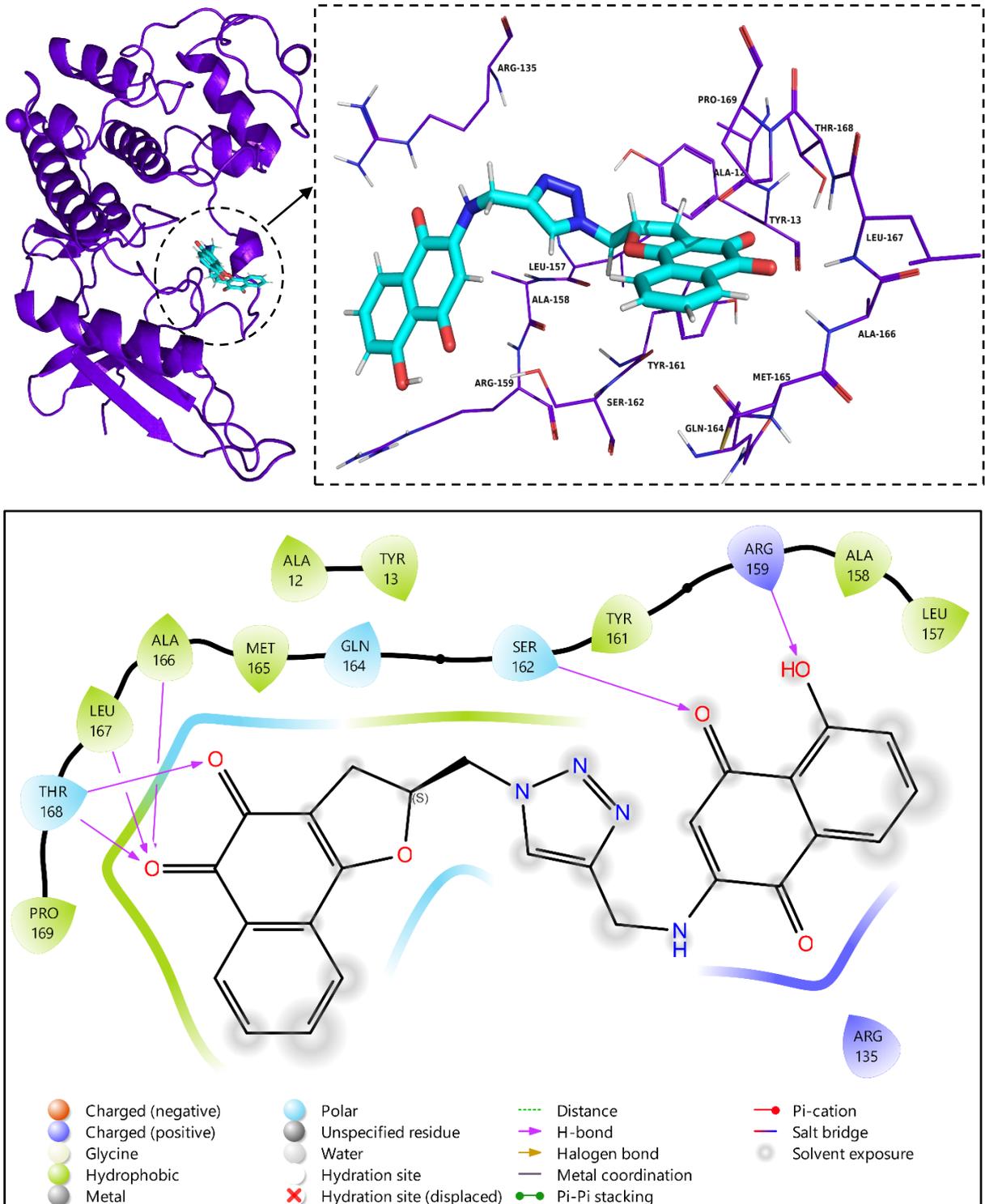
interações do tipo Pi também afetaram ambos os anéis aromáticos da molécula ENSJ-1135, sendo os aminoácidos Ala158, Met165 e Pro169.

Figura 16. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 8P4Z, correspondente à cristalização da proteína quinase CDK7.



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Figura 17. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 3G33, correspondente à cristalização da proteína quinase CDK4

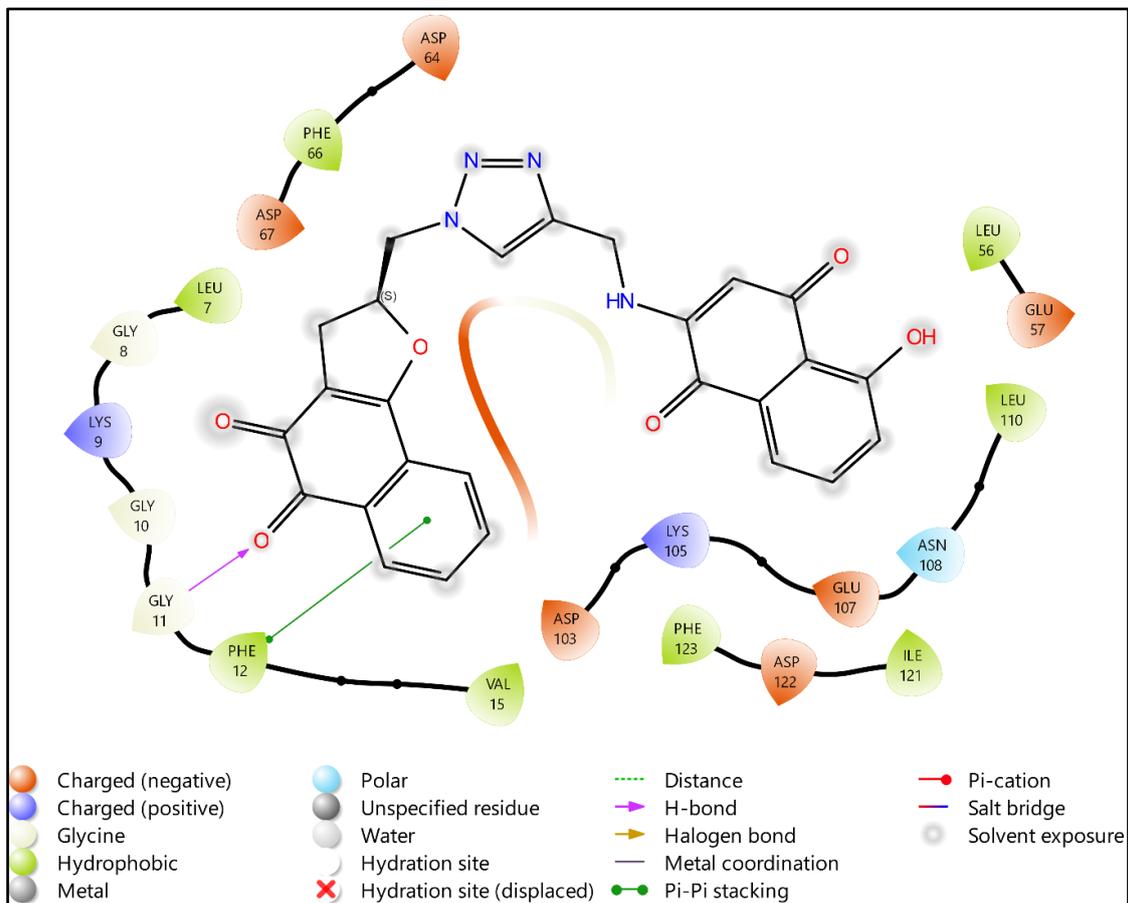
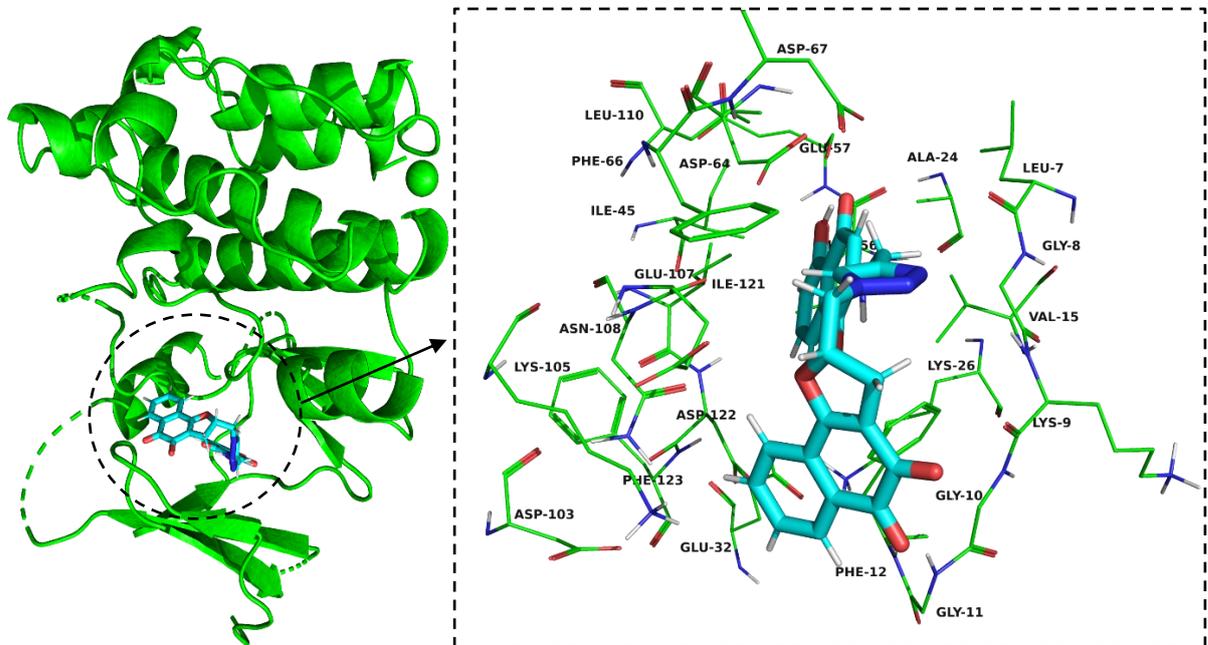


Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Entre os resultados de destaque envolvendo os experimentos de *docking* molecular com proteínas quinases, destaca-se o resultado obtido a partir da reação com a proteína PIM2 (ilustrado na Figura 18), uma quinase classificada no grupo das serina/treonina quinases e está

diretamente relacionada a processos de fosforilação de vários proto-oncogenes, incluindo o MYC (Zhang et al., 2018).

Figura 18. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 4X7Q, correspondente à cristalização da proteína quinase PIM2

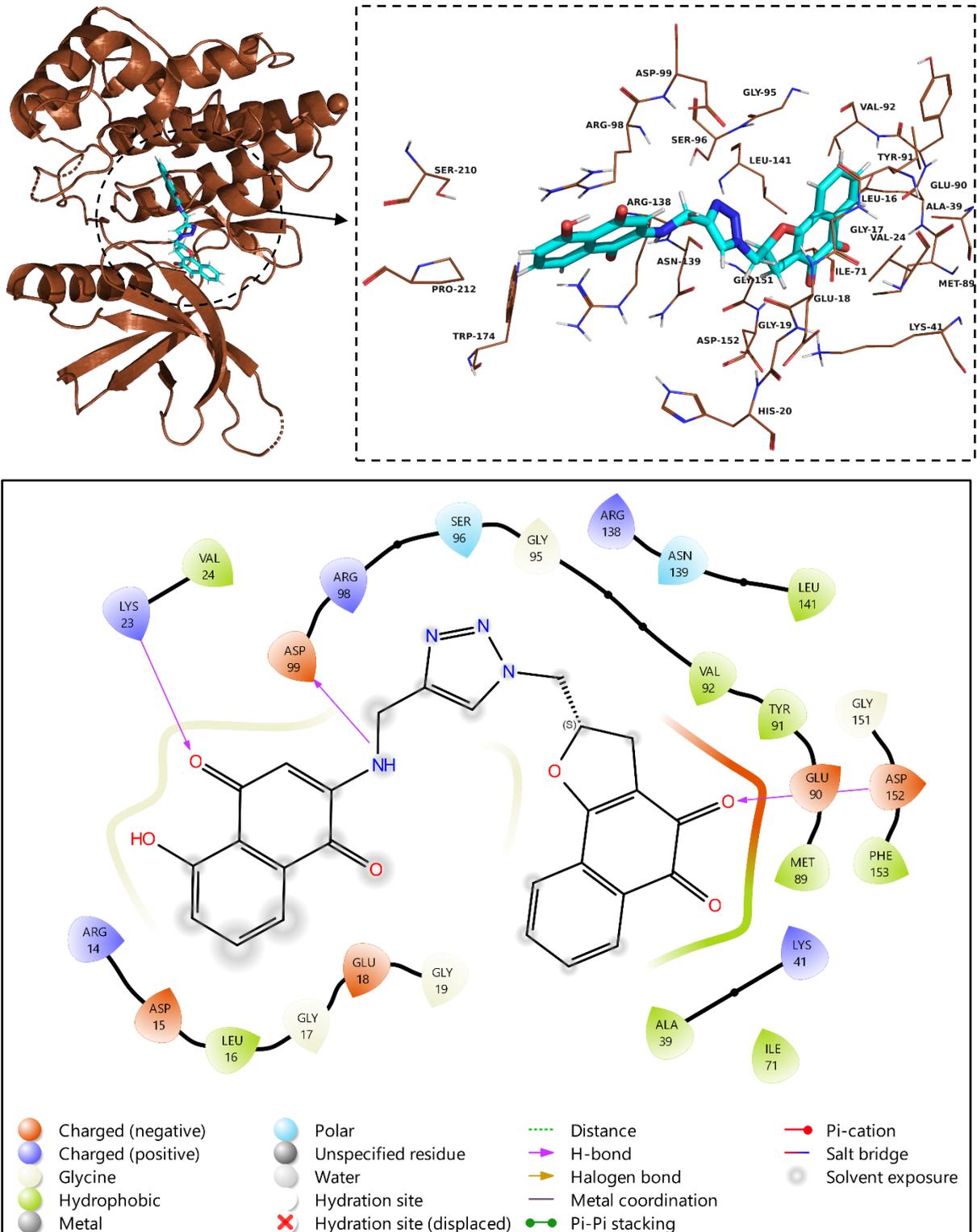


Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Assim como os outros complexos relatados, novamente ambos os centros redox da molécula ENSJ-1135 foi alvo de interações dos tipos Pi, porém, com uma maior variedade entre esses tipos de interação. O centro redox contendo paraquinona e hidroxila realizou interações do tipo Pi-*Sigma* e Pi-Pi *T-shaped* com átomos de carbono presentes nos resíduos de aminoácido Val15, Lys26, Leu56 e Ile121, enquanto o centro redox da outra extremidade, além de formar ligações de tipo Pi-*Sigma* com o anel aromático do resíduo Phe12, também formou interações Pi-Cátion com a porção NH3 da Lys105, enquanto o anel azol formou interação Pi-Ânion com oxigênios dos resíduos Asp64 e Asp67 e ponte de hidrogênio também com o resíduo Asp64. Ligações de hidrogênio também foram formados entre o átomo O4 da molécula ENSJ-1135 e o resíduo Gly11 e em mais outros três átomos no centro da molécula, envolvendo os resíduos Glu107, Gly8 e Leu7.

A tirosina quinase TYK2, conhecidamente responsável por estimular processos de crescimento e migração celular também teve resultados que foram selecionados para destaque, conforme ilustrado na Figura 19.

Figura 19. Complexo resultante entre o docking da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 3LXP, correspondente à cristalização da proteína quinase TYK2



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

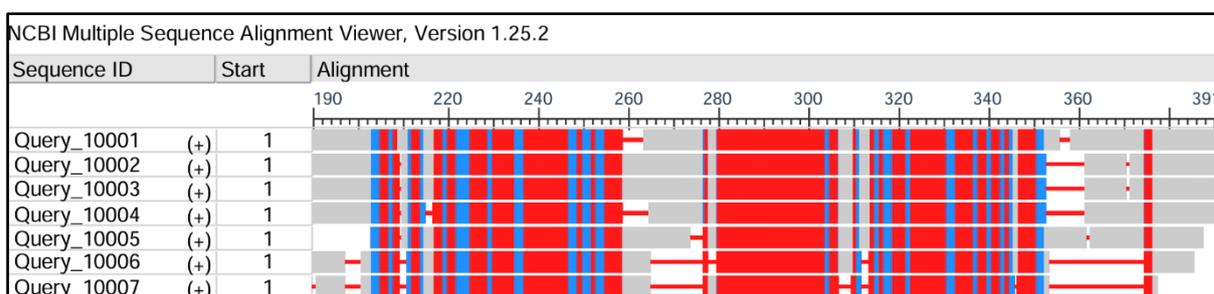
Nesse complexo relatado, nota-se a presença de interações do tipo Pi-Cátion envolvendo os anéis aromáticos do centro redox contendo a estrutura paraquinona e o resíduo de aminoácido Arg98, enquanto o átomo O6 da molécula realiza ponte de hidrogênio com o aminoácido

Arg138. Enquanto o centro da molécula, incluindo partes do anel azul também realiza ligações de hidrogênio com a estrutura proteica, corroborando em sua energia de interação e estabilidade. Por fim, o centro redox oposto é novamente alvo de diversas interações do tipo Pi, envolvendo resíduos de carbono dos aminoácidos Leu16, Val24 e Leu141.

4.4.2. Fosfatases e fosfoproteínas

A fim de otimizar a compactação e coerência do presente trabalho, realizou-se um agrupamento de proteínas que partilhavam semelhança entre suas estruturas e funções. Dessa forma, visto que fosfatases e fosfoproteínas possuem atração por grupo fosfato, as sequências de aminoácidos das estruturas proteicas cristalizadas foram analisadas através da plataforma online *BLAST-COBALT* (disponível através do link <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/cobalt/cobalt.cgi>). Conforme demonstrado na Figura 20, as proteínas mostram regiões conservadas em grande parte de suas estruturas cristalizadas, portanto, optou-se por apresentá-las conjuntamente no mesmo tópico.

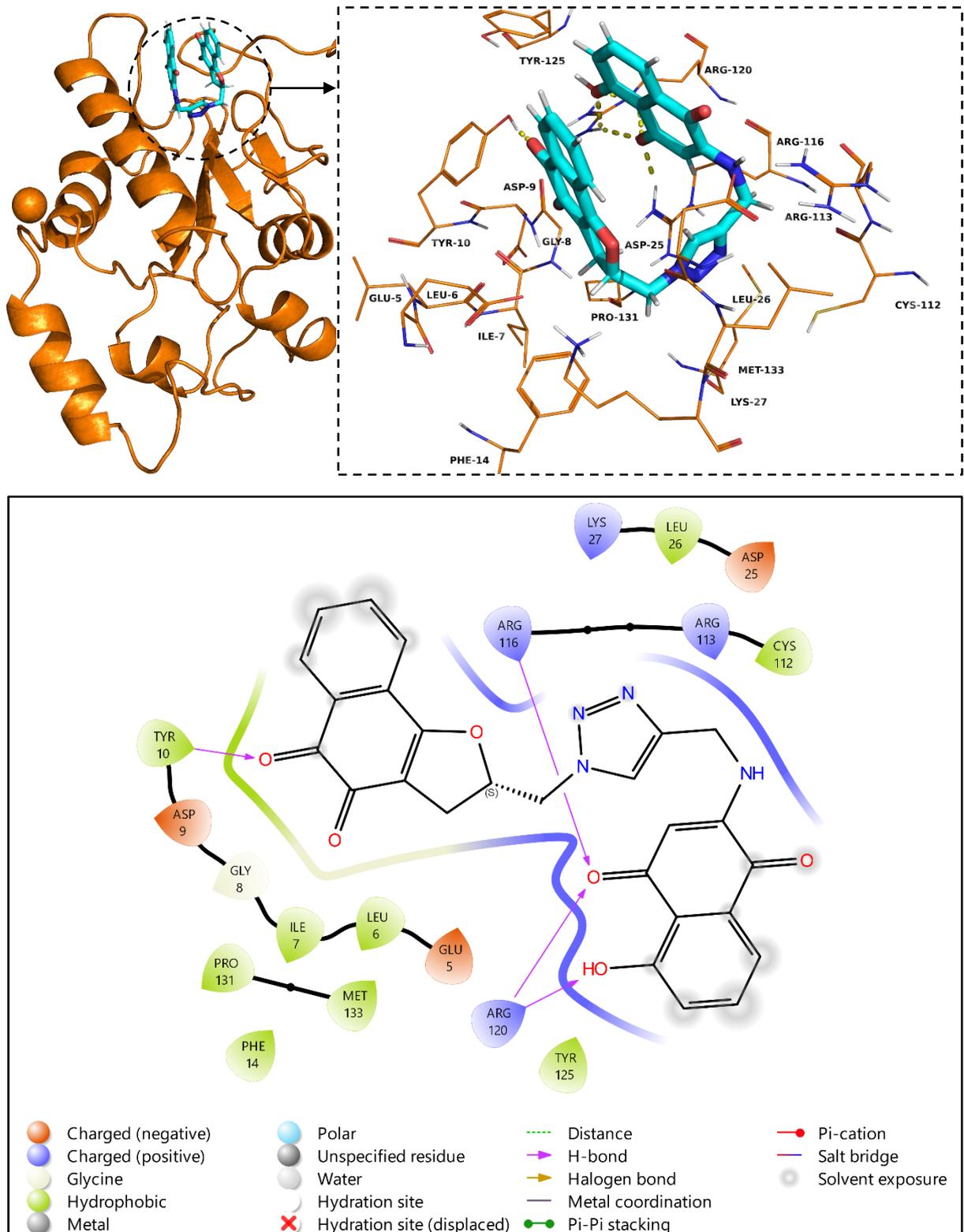
Figura 20. Comparação entre as sequências de aminoácidos das estruturas cristalizadas de proteínas classificadas como fosfatases e fosfoproteínas



Fonte: Própria, obtida através da plataforma *BLAST – COBALT*;

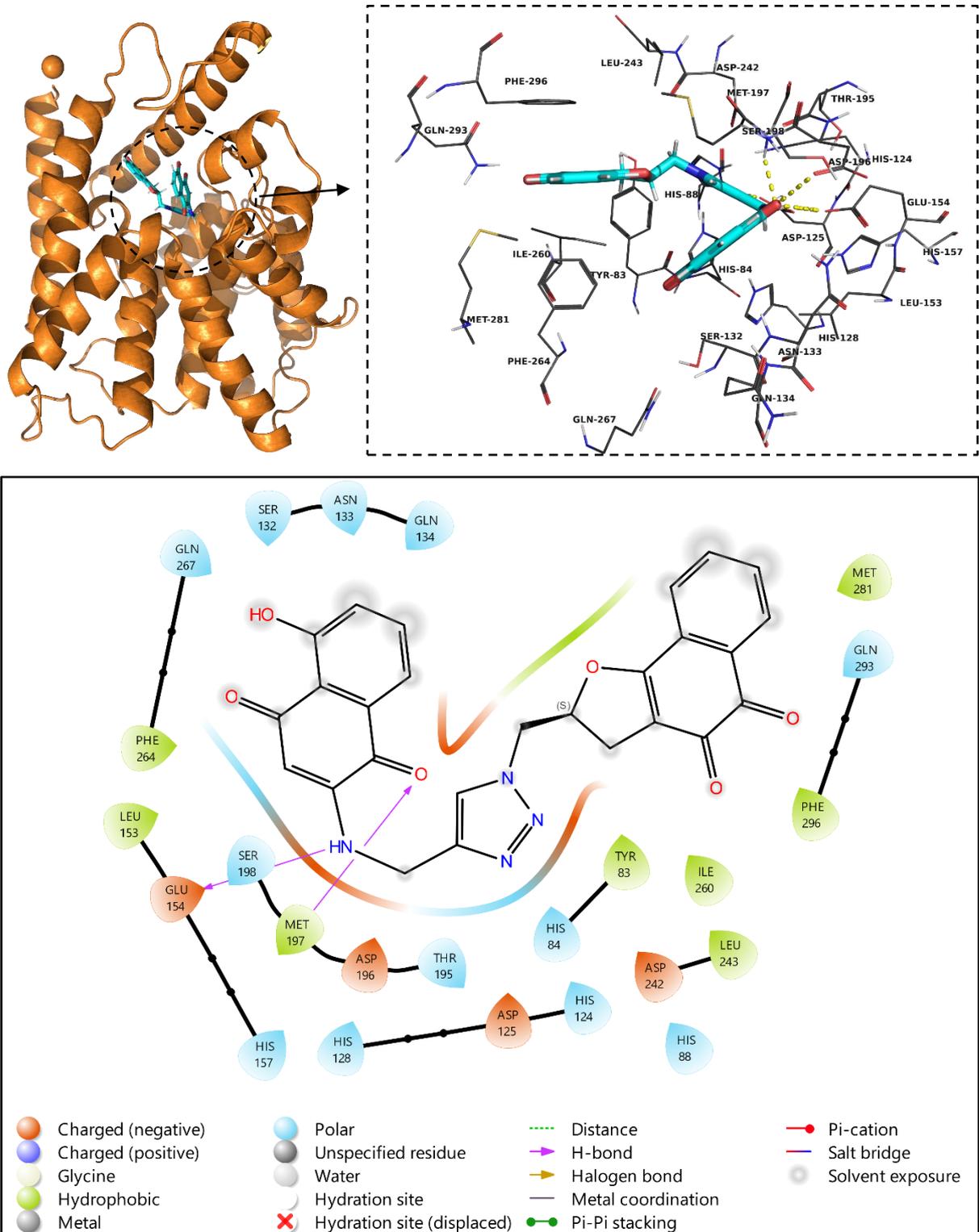
Para demonstrar os padrões de ligações observados nesses grupos proteicos, selecionou-se as estruturas que obtiveram os melhores resultados nos experimentos *docking* realizados. Portanto, as estruturas 1CWS e 2QYK foram detalhados nas Figuras 21 e 22, representando as fosfatases e fosfoproteínas, respectivamente.

Figura 21. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 1CWS, correspondente à cristalização da fosfatase MPIP2



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Figura 22. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 2QYK, correspondente à cristalização da fosfoproteína PDE4A



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Através de uma análise detalhada a partir da associação entre as diferentes formas de visualização relacionadas das interações obtidas durante os experimentos de *docking* molecular nas

duas proteínas, é possível perceber que o anel azol, localizado no centro da molécula é responsável por gerar uma intensa influência na energia e estabilidade das interações do complexo.

Iniciando a análise com a reação envolvendo a estrutura 1CWS, nota-se uma intensa ação de cargas eletrônicas positivas do receptor agindo em regiões carregadas negativamente da quinona. Onde os resíduos Arg116 e Arg120 além de realizar interações de hidrogênio com os hetero átomos da molécula, também geram nuvens carregadas positivamente, juntamente com os Cys112, Arg113 e Tyr125, que atraem a porção *para* da quinona, que por sua vez é carregada negativamente. Além disso, os resíduos Glu5, Leu6, Ile7, Gly8, Asp9 e Tyr10 realizam interações hidrofóbicas na outra extremidade da molécula, o que contribui aumentando a força de interação no complexo.

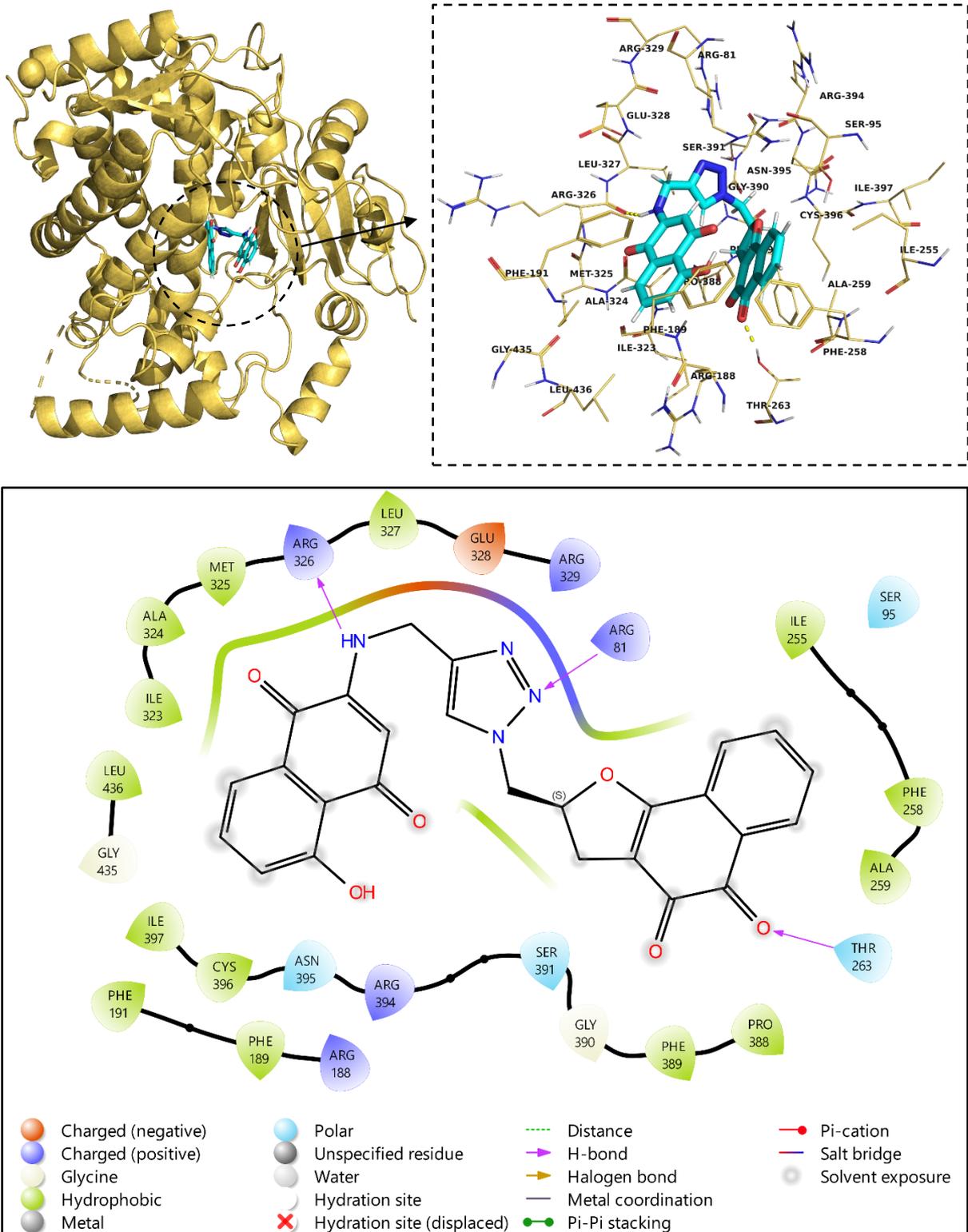
Ao analisar o complexo formado com a proteína 2QYK, o mesmo padrão de ligação se repete, onde interações hidrofóbicas interagem na porção *orto* da quinona, enquanto reações envolvendo cargas eletrônicas e ligações de hidrogênio acontecem com frequência na outra extremidade da molécula, incluindo o anel azol, conforme observado nitidamente na ilustração bidimensional, onde as linhas destacam as energias polares e negativamente carregadas em forma de linha.

4.4.3. Oxidoreductases

Conforme já abordado durante o tópico de introdução do presente trabalho, conhecidamente as moléculas quinonas potencialmente são metabolizadas por enzimas redutoras, conseqüentemente, gerando radicais livres. Assim, optou-se por destacar um tópico específico a fim de abordar as enzimas responsáveis por catalisar essas reações e que foram submetidas ao experimento de *docking* molecular. Dessa forma, os complexos proteína/ligante em que apresentaram os melhores resultados experimentais, derivados das estruturas 1W0E e 5EA2, foram selecionados como modelos representativos das enzimas CP3A4 e NQO1 para ilustrar as reações de maneira mais detalhada nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

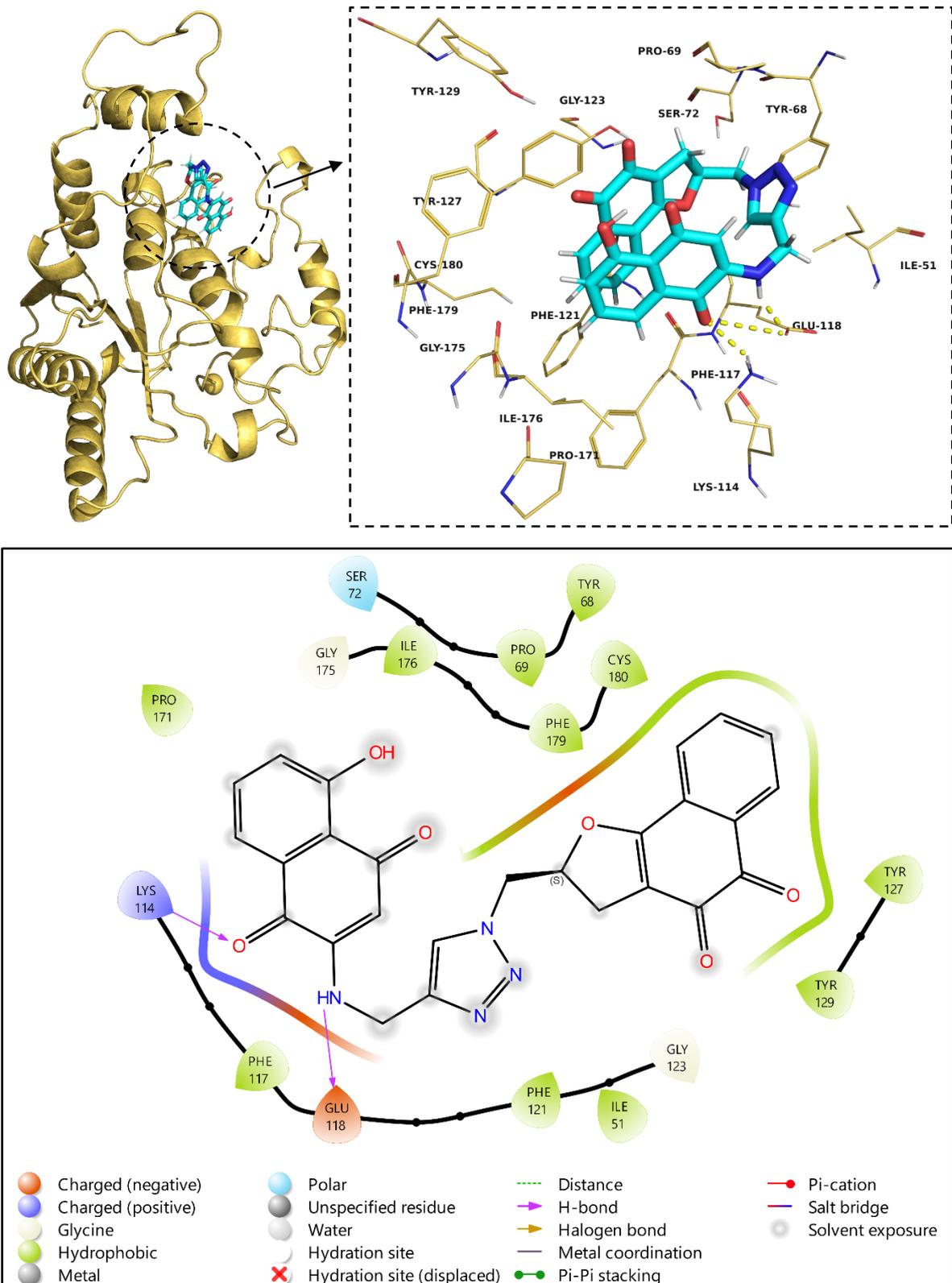
Em ambos os experimentos a molécula ENSJ-1135 alocou-se nos sítios ativos das proteínas alvos, indicando que a molécula possui o potencial de gerar radicais livres se metabolizada, assim como várias outras quinonas. Ao analisar detalhadamente as interações formadas no complexo proteína/ligante, nota-se um grande número de reações hidrofóbicas em ambas extremidades da molécula, enquanto a parte central, incluindo o anel azol e alguns hetero átomos de oxigênio, foi extremamente atraído por ligações eletrônicas positivas e negativas.

Figura 23. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 1W0E, correspondente à cristalização da enzima CP3A4



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

Figura 24. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 5EA2, correspondente à cristalização da enzima NQO1

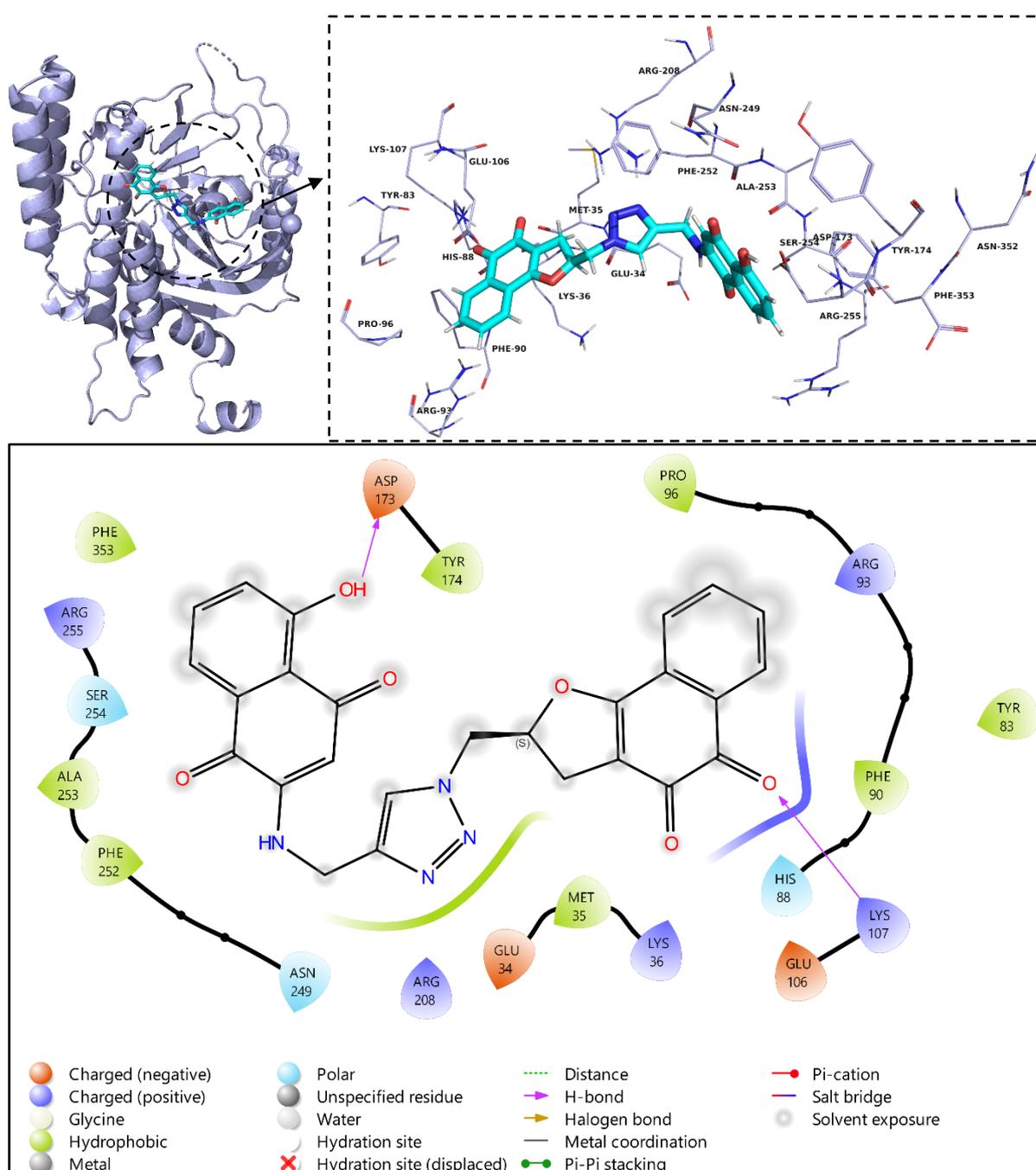


Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

4.4.4. Transferases

Todas as seis enzimas transferases que foram selecionadas para os experimentos de *docking* molecular tiveram no mínimo 80% das reações mais prováveis resultadas em ligação da molécula ENSJ-1135 ocupando sítios críticos ao seu funcionamento. A estrutura 3KCZ (estrutura representativa da transferase PARP2) foi selecionada como exemplo demonstrativo das interações previstas no complexo proteína/ligante, ilustrado na Figura 25.

Figura 25. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 3KCZ, correspondente à cristalização da transferase PARP2



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

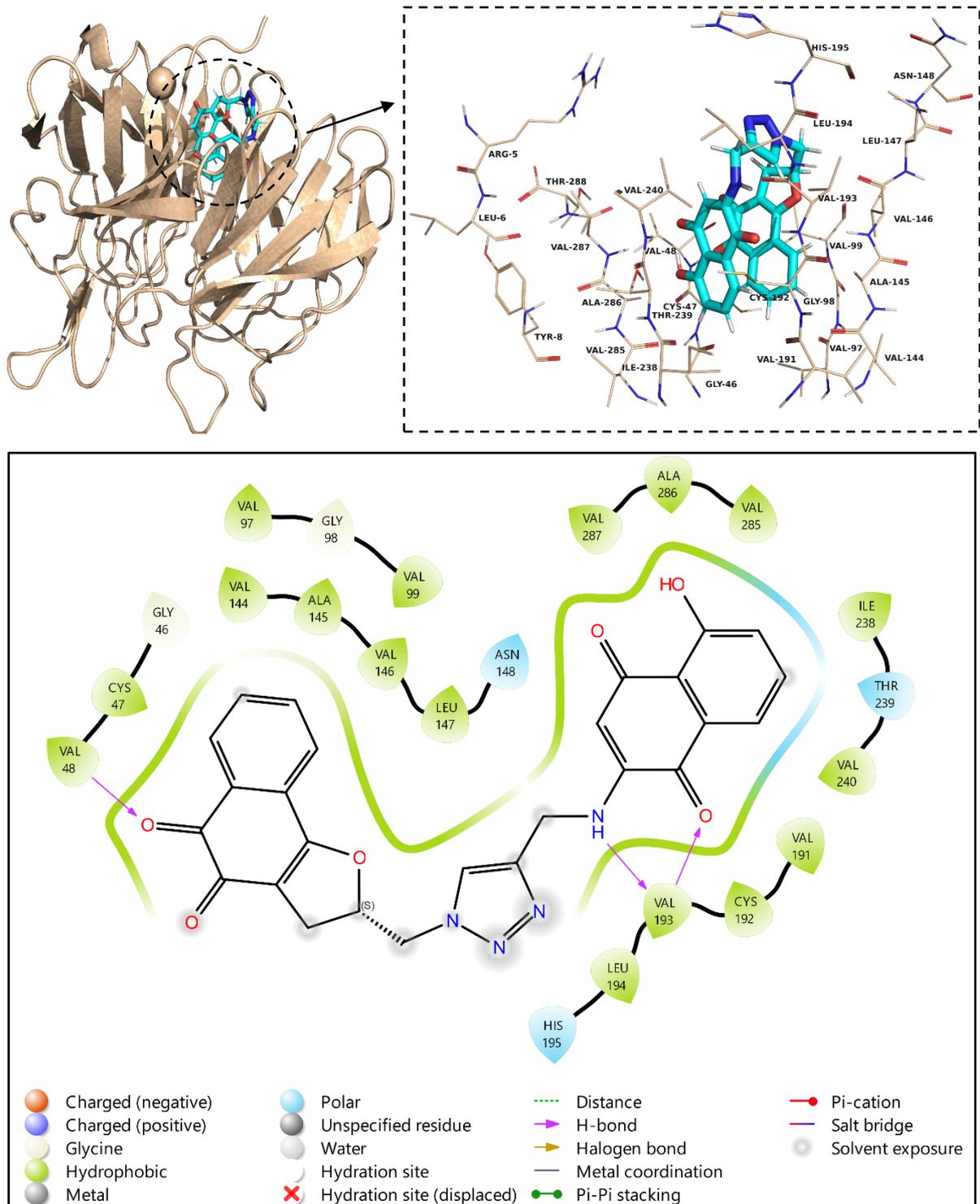
Assim como as demais outras reações detalhadas no presente estudo, reações envolvendo hidrofobicidade e polaridade são muito presentes no complexo proteína/ligante ilustrado. Porém, é importante ressaltar que a ilustração bidimensional do complexo mostra que a molécula possui parte de seu centro e suas ambas extremidades contendo anéis aromáticos com alertas de exposição a solvente. Assim, indicando que há grandes possibilidades de a interação ser influenciada de acordo com a natureza do solvente presente.

4.4.5. Reguladores de transcrição

Conforme já mostrado na Figura 13, os experimentos de *docking* molecular resultaram em complexos proteína/ligante ocupando sítios críticos para o funcionamento de 6 proteínas reguladoras de transcrição em 70% ou mais das reações mais prováveis. Entre os complexos formados, o experimento realizado com a estrutura 1U6D (estrutura *.PDB* escolhida como modelo representante da proteína KEAP1) destacou-se como o segundo complexo mais estável entre todos os desenvolvidos durante o presente estudo, além de concomitantemente possuir uma alta energia de interação, conforme melhor demonstrado na Figura 26.

A partir da análise dos detalhes do complexo proteína/ligante, é notável o aumento de resíduos hidrofóbicos interagindo ao redor do ligante, enquanto nota-se também uma pequena porção de reações polares próximo à extremidade *para* da molécula, juntamente com ligações de hidrogênio envolvendo hetero átomos de nitrogênio e oxigênio da molécula e o resíduo Val193 da proteína alvo. Importante ressaltar a importância de outro resíduo de Valina (Val48) que também formou uma ponte de hidrogênio com o oxigênio *orto* na outra extremidade da quinona, ao mesmo tempo que ajudou a formar uma região extremamente hidrofóbica juntamente com os resíduos Cys47 e Gly46, aumentando ainda mais a estabilidade do complexo.

Figura 26. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 1U6D, correspondente à cristalização da proteína KEAP1



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

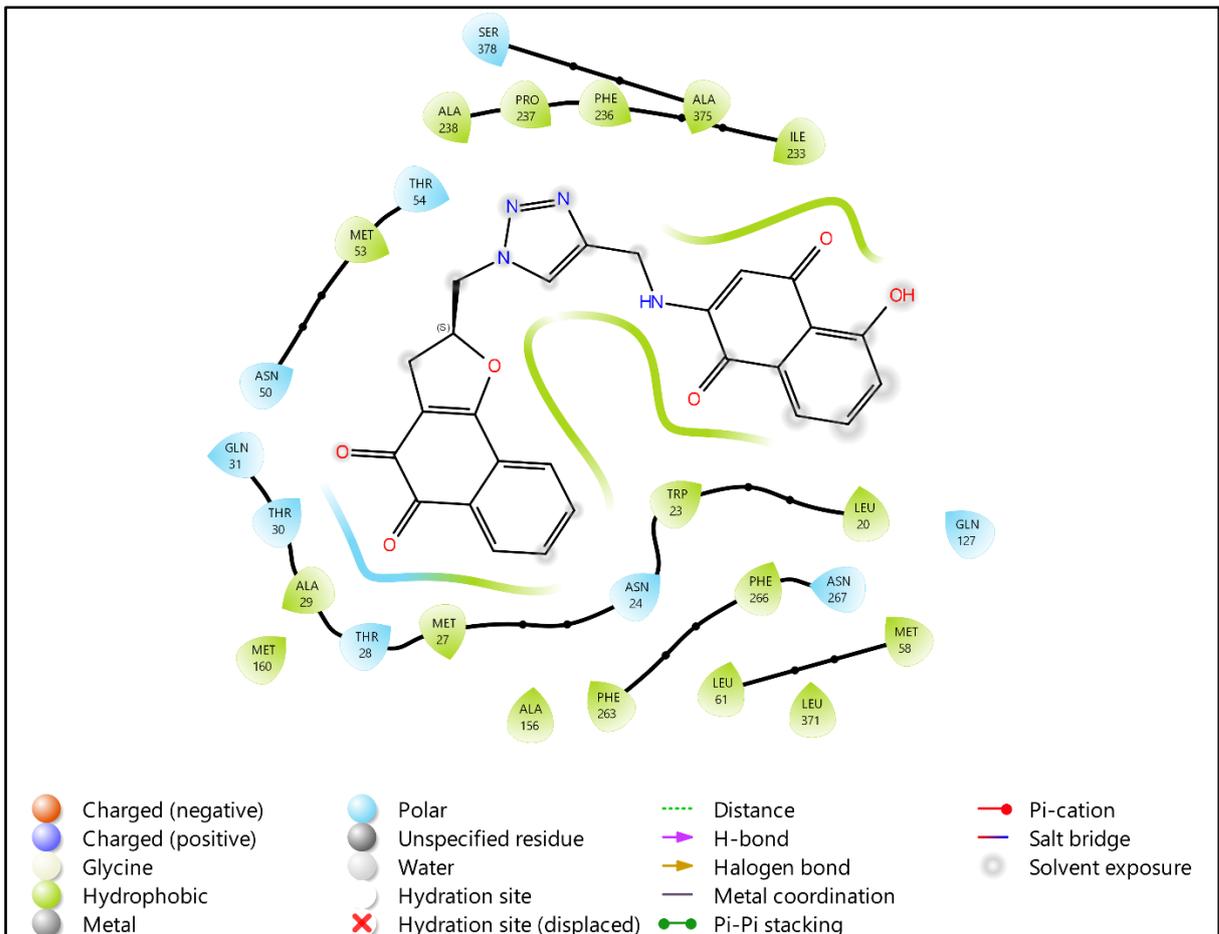
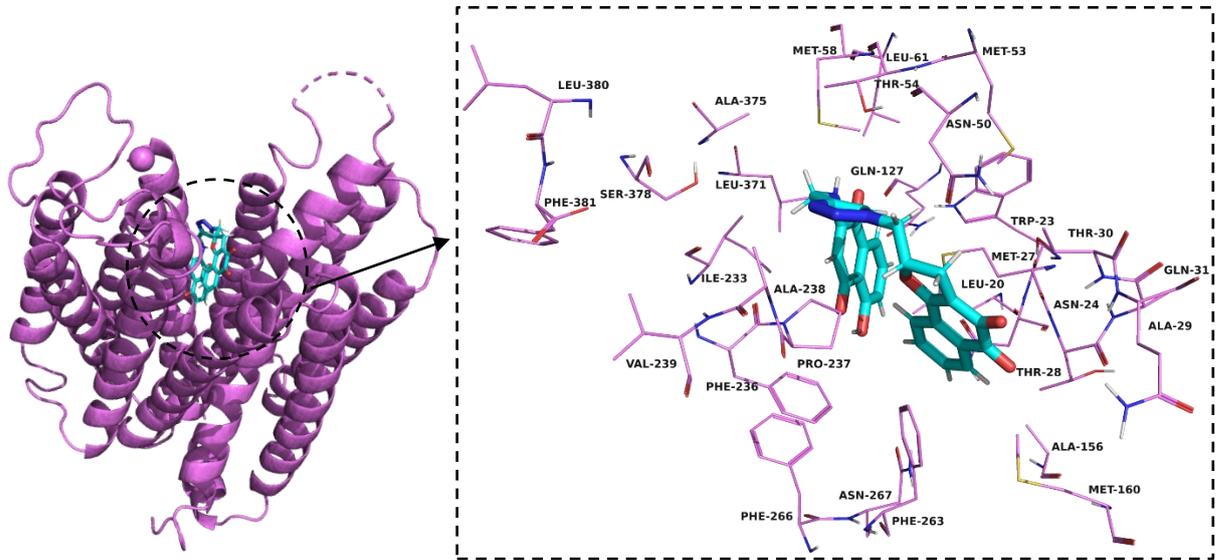
4.4.6. Outras proteínas

Além dos agrupamentos abordados nos tópicos anteriores, outras 4 estruturas resultaram em complexos proteína/ligante envolvendo sítios essenciais para a execução de suas respectivas

funções em pelo menos 70% das vezes. Porém, por se tratarem de um número pequeno de estruturas pertencentes a grupos totalmente distintos, optou-se em agrupá-las conjuntamente, sendo elas 4CIN, 1UYM, 1GKC e 6OB7 (estruturas representantes das proteínas B2CL1, HS90B, MMP9 e S29A1, respectivamente). Portanto, a fim de demonstrar ao menos um complexo detalhadamente, optou-se por detalhar os resultados mais promissores, que foram obtidos tendo a estrutura 6OB7 como alvo, ilustrados na Figura 27.

A partir da estrutura ilustrada é possível notar que o ligante é cercado por estruturas em alfa-hélice, que são estruturas altamente hidrofóbicas, dessa forma, ao detalhar as interações de maneira bidimensional é possível ver que as interações hidrofóbicas foram mais uma vez, assim como a maioria dos complexos relatados no presente estudo, um fator determinante para a estabilidade e força da interação, atuando principalmente nos hetero átomos de oxigênio, nitrogênio e no anel azol. Além disso, interações polares agindo na extremidade *orto* da molécula também contribuíram para fortalecer as energias do complexo.

Figura 27. Complexo resultante entre o *docking* da molécula ENSJ-1135 e a estrutura PDBID 6OB7, correspondente à cristalização da proteína transportadora B2CL1



Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

5. Discussão

Um dos principais fatores limitantes de quimioterápicos como a doxorubicina, além de seus fortes efeitos colaterais, está na absorção do fármaco, tendo em vista que a sua biodisponibilidade é menor que 1% quando administrada de maneira oral, essa limitação é driblada através de administração intravenosa, para então se distribuir aos demais tecidos (Lee et al., 2020). Os resultados das predições farmacocinéticas mostraram que a molécula ENSJ-1135 possui um maior nível de absorção oral quando comparada com a doxorubicina. Essa predição pode ser explicada através dos valores de TPSA de ambas as moléculas, visto que a molécula ENSJ-1135 possui um valor de TPSA igual 140.48\AA^2 , enquanto a doxorubicina possui um valor igual a 206.07\AA^2 . O valor de TPSA reflete cargas da molécula, aumentando uniformemente conforme a polaridade, assim, visto que a doxorubicina possui um nível maior de polaridade, tende a possuir menos capacidade de ser absorção pelo tecido gastrointestinal. O valor de TPSA também indica que a molécula provavelmente não ultrapasse a barreira hematoencefálica, o que a torna segura para propósitos terapêuticos com intuito de preservar o sistema nervoso central de possíveis danos causados por quimioterapias. Além disso, se mostra inibidor de apenas uma enzima do citocromo P450, o que gera pequenas probabilidades de interação com outros fármacos metabolizados por esse grupo de enzimas. Ressalta-se também que a predição realizada classificou a molécula ENSJ-1135 como substrato da glicoproteína P, a principal proteína que contribui ao crescimento de resistência à múltiplas drogas, atuando como transportadora de membrana e impedindo o acúmulo de drogas dentro de células cancerosas, o que reflete em uma maior possibilidade de tumores resistirem à essa droga (Daina et al., 2017; Sui & Li, 2012).

Como já mencionado, a intensa busca farmacológica por novas drogas anticâncer consiste no objetivo de encontrar drogas mais efetivas, seletivas e com menos efeitos colaterais. Como ilustrado na Figura 10, os resultados fornecidos pela plataforma *ProTox-3.0* mostram que enquanto a doxorubicina trata-se de um fármaco com toxicidade sistêmica de classe 3, possuindo uma dose letal média de 205mg/kg, a plataforma foi capaz de predizer um indicativo com uma acurácia de 54.26%, que a molécula ENSJ-1135 possui uma toxicidade sistêmica de nível 4 e uma dose letal média de 3000mg/kg. Porém, vale ressaltar que os dados complementares fornecidos posteriormente na tabela 4 são essenciais para o entendimento completo das predições. Ao mesmo tempo que a molécula teste mostra uma toxicidade geral menor do que o fármaco controle, a nível sistêmico, ambas são nefrotóxicas e também apresentam toxicidade pulmonar. Adicionalmente, ainda a nível de toxicidade a órgãos

específicos, a droga teste também é capaz de causar toxicidade hepática. Já a nível sistêmico, além de indicar com um pouco mais de 50% de acurácia ser uma substância carcinogênica e mutagênica, os dados mostram um risco de 97% de gerar toxicidade imunológica. Como último ponto a ser ressaltado, a plataforma afirma com 57% de acurácia de a droga não ser neurotóxica, porém, paradoxalmente indica com 56% de acurácia que a droga pode afetar a enzima acetilcolinesterase (AChE)(Banerjee et al., 2024). Esses resultados mostram-se alarmantes, visto que a enzima AChE é essencial para manter a homeostase do sistema nervoso e problemas em seu funcionamento está associado a doenças neurológicas como doença de Parkinson, déficit de atenção, transtornos de hiperatividade e esquizofrenia (De Vos et al., 2000).

Após os experimentos de predições farmacocinéticas e toxicidade, o estudo se dedicou a explorar aspectos farmacodinâmicos da molécula, a fim de propor possíveis alvos que pudessem explicar a atividade citotóxica já relatada da molécula. Dessa forma, a utilização da metodologia de *Target fishing* foi essencial para selecionar os principais prováveis alvos, e a partir dos critérios de exclusão utilizados como triagem, o número inicial de alvos que era próximo a dois mil, foi reduzido a 122 alvos aptos para os testes mais refinados e complexos, como os experimentos de *docking* molecular. Os alvos selecionados sabidamente são essenciais para processos de mecanismos de regulação de ciclo celular, metabolismo e expressão gênica (El Omari et al., 2021).

As proteínas quinases consistiram na primeira classe a ser abordada no presente estudo, e os resultados mostraram que apesar do sítio de ATP dessas proteínas ser altamente conservado, alguns sítios se tornam mais suscetíveis à inibição direcionada pela quinona ENSJ-1135, enquanto outras quinases possuem resultados totalmente contrários. A começar pelas proteínas do grupo Aurora que consiste em 3 integrantes (Aurora Quinase A, B e C), pertencentes à família das serina/treonina quinases. Suas três isoformas são essenciais pro processo de ciclo celular, onde cada uma atua em uma determinada fase. Essas três isoformas possuem alta conservação em suas regiões C-terminal, porém, se diferem de acordo com o seguimento em direção ao N-terminal e isso determina as especificidades de cada proteína. A isoforma AURKA, que foi um dos destaques do estudo, participa ativamente na formação dos centrossomos e do fuso mitótico, isso faz com que seu nível seja baixo na fase G1/S e que aumente conforme o desenvolvimento do ciclo celular, atingindo o seu nível máximo durante a fase M. Por outro lado, a isoforma AURKB participa de complexos reguladores cromossômicos e também é essencial para o processo de replicação celular, principalmente nos processos de telófase e citocinese, atingindo seu nível de concentração máximo na fase G2/M. Os resultados

mostraram uma alta seletividade à isoforma AURKA, enquanto apenas 50% das 10 reações mais prováveis ocupavam o sítio de ATP na isoforma AURKB, e as reações que indicaram a possível formação do complexo possuíam uma energia de interação bem abaixo quando comparado às demais reações, além de não possuírem bons níveis de estabilidade. Isso se torna chamativo, pois vai de encontro a outros estudos com moléculas quinonas que também já relataram ação mais seletiva à isoforma AURKA, que é expressa em concentração aumentada em diversos tipos de câncer, sendo considerada um alvo promissor para drogas anticâncer (Furqan et al., 2022). Linfomas de alto risco são um exemplo de neoplasias em que a AURKA está envolvida diretamente, juntamente com a quinase PLK1, estando associadas à fosforilação de outras proteínas que promovem o crescimento e sobrevivência celular, como o oncogene MYC (Murga-Zamalloa et al., 2019).

Como já mencionado, moléculas estruturalmente variadas de quinonas possuem um amplo espectro farmacológico, dessa forma, resultados já relatados na literatura envolvendo a susceptibilidade de diversas CDKs serem inibidas por quinonas serve como um fator reforçador aos resultados obtidos no presente estudo. Como exemplo, algumas timoquinonas de origem natural estão relacionadas a indução de parada de ciclo celular, através de inibição de mecanismos chaves para a progressão da replicação, como as CDKs 2, 4 e 6. Esse fato corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, que ao realizar experimentos de *docking* molecular com as CDKs 1, 2, 4, 5 e 7, todas mostraram resultados prováveis, porém, a seletividade da molécula ENSJ-1135 foi notavelmente maior nas CDKs 7 e 4, como ilustrado nas Figuras 16 e 17, respectivamente. Onde além de se ligarem em 100% das 10 melhores poses avaliadas, tiveram altos níveis de força de interação, alta estabilidade e também causou modificações conformacionais das proteínas, como relatado nos dados de RMSD na Tabela 1 do material complementar (Gomathinayagam et al., 2020).

Outras proteínas quinases importantes a serem destacadas a partir dos resultados obtidos como PIM e TYK quinases. As proteínas PIM1 e PIM2, realizam fosforilações nos resíduos Thr58, Ser62 e Ser329 do MYC, resultando no aumento de sua estabilidade e estimulando a ação de MYC sobre E2F2 e nucleoninas. Portanto, a inibição dessas quinases resulta em perdas outrora essenciais para o desenvolvimento e manutenção do câncer (Zhang et al., 2018). Enquanto a TYK2 atua em processos de sinalização celular, consequentemente gerando eventos como replicação celular. Além do mais, está diretamente relacionada à ativação da proteína STAT3, uma proteína transdutora de sinal envolvida em processos de proliferação, sobrevivência, diferenciação e angiogênese, que por sua vez já tem sua inibição como alvo de

outras terapias anticâncer, como imunoterápicos. Como exemplo, pode-se citar modelos xenográficos afetados por linfoma que quando tratados com terapias inibidoras de STAT3 mostraram um aumento de apoptose e queda do nível de proliferação celular (Rani et al., 1999; Zou et al., 2020). Ademais, ressalta-se que o melhor resultado obtido no presente estudo foi tendo como alvo a estrutura *PDB* 1JNK, representante da quinase MAPK10, essencial para diversos processos celulares como proliferação, diferenciação, regulação transcricional e desenvolvimento, que conhecidamente, quando super expresso contribui para a progressão em alguns tipos de tumores, como os de câncer gástrico (Gao et al., 2021).

Os resultados de predição de inibição de fosfatases indicados no presente estudo vai diretamente de encontro a outros resultados já relatados envolvendo outras moléculas quinonas atuando da mesma maneira. Conforme ilustrado na Figura 21, o complexo formado entre a molécula ENSJ-1135 e a estrutura 1CWS (estrutura utilizada a fim de representar a proteína MPIP2) durante os experimentos de *docking* molecular, exhibe a possibilidade de molécula em estudo inibir essa fosfatase, que por sua vez não é a primeira quinona a mostrar tal seletividade. A proteína MPIP2, codificada pelo gene *CDC25B*, faz parte de um grupo de enzimas altamente conservadas (*CDC25A*, *CDC25B* e *CDC25C*), que possuem funções essenciais durante o regulamento de ciclo celular e são super expressos em diversas doenças malignas, incluindo câncer gastrointestinal. A super expressão do gene *CDC25B* é responsável por inibir a morte celular e promover uma proliferação excessiva em diversas neoplasias de tecidos epiteliais, portanto, ao ser inibido pela molécula quinona menadiona em modelos *in vitro* e *in vivo*, é capaz de prevenir a proliferação, invasão e migração celular (Ribeiro et al., 2022). Além da proteína MPIP2, outras duas fosfatases foram alvos do presente estudo, sendo elas PTPN7 e PTPN22. A proteína PTPN22 trata-se de uma fosfatase não receptora expressa preferencialmente em células hematopoiéticas que conhecidamente é capaz de gerar ações imunossupressoras em linfócitos Treg, além de que estudos mostram que sua deleção é capaz de melhorar os efeitos de terapias anti-PD-L1, dessa forma, sua inibição trata-se de um alvo capaz de potencializar terapias que necessitam de imunidade mediada por células T. Estudos que buscam desenvolver terapias utilizando pequenas moléculas a fim de inibir essa proteína já foram realizados, porém, durante a presente pesquisa nenhuma outra quinona foi encontrada realizando esse mecanismo de ação (Schlicher et al., 2023). Apesar de o presente estudo abordar apenas 3 fosfatases como potenciais alvos, ressalta-se que conhecidamente outras quinonas são capazes de exercer mecanismos anticâncer em outras fosfatases, como a proteína fosfatase alcalina (Xiong et al., 2024).

Entre o grupo das fosfoproteínas, todos os alvos consistiram em enzimas fosfodiesterases, sendo PDE3A, PDE4D, PDE4A e PDE7A. Na reação ilustrada na Figura 22, utilizou-se a estrutura 2QYK (estrutura utilizada para representar a proteína PDE4A), que conhecidamente possui ação antiapoptótica, sendo alvo de vários estudos que utilizam inibidores de PDEA4 como rolipram e roflumilast a fim de alcançar efeitos anticâncer. Tal achado potencialmente pode corroborar em estudos futuros a fim de validar esse possível mecanismo de ação anticâncer da molécula ENSJ-1135 de maneiras experimentais (Abdel-Wahab et al., 2021; Siegmund et al., 2001).

Os resultados preditos na presente pesquisa relataram primeiramente, através de predições farmacocinéticas via plataforma *SwissADME*, que a molécula não é capaz de agir inibindo funções das principais enzimas do citocromo P450, com exceção da CYP2C9 (enzima que também foi um alvo previsto através da metodologia de *target fishing*). Porém, vale ressaltar que isso não é um fator determinante para que a molécula não possa agir como substrato das enzimas do devido complexo. Dessa forma, ao analisar os resultados envolvendo enzimas oxidoreductases, a molécula ENSJ-1135 foi atraída ao sítio ativo da estrutura *PDBID* 1W0E (estrutura modelo referente à enzima CYP3A4) em 100% das 10 reações mais prováveis (Figura 23), mostrando que há grandes possibilidades que o composto atue como substrato dessa enzima. E o mesmo acontece com a enzima NQO1, oxidoreductase também relatada no estudo, ilustrada na Figura 24, onde os experimentos de *docking* molecular resultaram em 100% das 10 posições mais prováveis da molécula teste sendo utilizada como substrato da enzima, porém com energia de interações mais fracas e menos estáveis quando comparada às reações envolvendo a enzima CYP3A4. Tais resultados seguem de acordo com os achados da literatura, que mostram que as oxidoreductases possuem capacidade de metabolizar uma ampla gama de quinonas, conseqüentemente, gerando radicais livres e potencialmente ocasionar morte celular, assim, também funcionando como um possível fator explicativo à alta citotoxicidade da molécula (Ross & Siegel, 2021; Tsuchiya et al., 2005).

Enquanto as diversas transferases abordadas no presente estudo, destacaram-se os resultados obtidos em experimentos envolvendo a proteína de reparo de DNA PARP-2, que conhecidamente é alvo de vários medicamentos que visam realizar a inibição desta enzima (inibidores de PARP-1 e 2). Porém, de acordo com as pesquisas bibliográficas realizadas com o intuito de comparação estrutural, nenhum dos medicamentos aprovados atualmente pelo FDA que visam essa inibição, possuem estruturas quinonas (Bhamidipati et al., 2023). A demais, o único estudo encontrado em que relacionou medicamento estruturalmente relacionado com a

molécula ENSJ-1135 e que está associado a resultados com a proteína PARP-2, trata-se de um estudo *in vitro* avaliando genes envolvidos em mecanismos de reparo de DNA dupla-fita após a administração da quinona quimioterápica mitomicina C, utilizando as linhagens cancerosas C-33A e SiHa como modelo. Onde após avaliar através de técnicas de *western blot* e espectrometria de massas, detectou alterações nos padrões de regulação homeostático das células tratadas, incluindo aumento de fragmentos de PARP-2, porém, o estudo não explica por qual mecanismo isso está sendo induzido (Kang et al., 2010).

Ao analisar os resultados obtidos nas proteínas classificadas como reguladoras de transcrição, encontram-se resultados que indicam um possível papel dúbio da molécula ENSJ-1135, podendo atuar contra e a favor do câncer simultaneamente. Conforme ilustrado na Figura 26, o complexo proteína/ligante formado entre a molécula teste e a estrutura *PDBID* 1U6D (modelo representante da proteína KEAP1), é o complexo com a melhor força de interação e maior estabilidade quando comparado com as demais proteínas reguladoras de transcrição. A proteína KEAP1, conhecidamente, trata-se de um supressor tumoral, responsável por promover cascatas de ferroptose ao detectar indícios de peroxidação lipídica, impedindo que a célula prossiga viva na presença de radicais livres, estando suscetível a alterações que podem ocasionar malignidades. Como exemplo de sua importância como supressor tumoral, pode-se citar o alto índice de KEAP1 deficiente ou mutante em células de câncer pulmonar (Koppula et al., 2022). Além disso, ressalta-se que a molécula ENSJ-1135 também formou complexos proteína/ligante em 100% dos casos entre as 10 posições mais prováveis nas predições realizadas com a estrutura *PDBID* 1A35 (estrutura modelo representante da proteína topoisomerase 1), seguindo um padrão já bem estabelecido como outras quinonas já utilizadas clinicamente, como doxorubicina e daunorrubicina (Tilsed et al., 2022b).

A demais, um tópico adicional será direcionado a detalhar os resultados obtidos a partir dos experimentos envolvendo o grupo das HDACs, que por sua vez, tiveram 5 diferentes proteínas que foram captadas através da metodologia de *target fishing* e posteriormente submetidas a ensaios de *docking* molecular, sendo elas HDAC1, 2, 3 e 8 (HDACs de classe 1) e HDAC6 (HDAC de classe 2b) (Delcuve et al., 2012). Os resultados provenientes dos experimentos de *docking* molecular foram capazes de mostrar que reações envolvendo as HDACs 6 e 8 são potencialmente improváveis, como detalhado na Tabela 1 do material complementar, onde apresentaram 10% e 0%, respectivamente, de possíveis posições ocupando sítios críticos ao funcionamento das devidas estruturas proteicas. Porém, apesar de pertencerem à mesma classe que a proteína HDAC8, os resultados envolvendo as HDACs 1, 2 e 3 foram

promissores, porém, de maneiras particularmente diferentes. Iniciando a análise de detalhes de sítios de ligação no processo de formação dos complexos proteína/ligante, notou-se que a na proteína HDAC2, a molécula ENSJ-1135 possui um mecanismo similar ao medicamento vorinostat, já utilizado clinicamente, onde ocupa o sítio ativo da proteína responsável por capturar o grupo acetila do alvo (Lauffer et al., 2013). Porém, ao analisar as reações envolvendo as HDACs 1 e 3, respectivamente representadas pelas estruturas *PDBID* 4BKX e 4A69, a molécula ENSJ-1135 o sítio de inositol tetrafosfato, que ao se ligar na proteína executa uma função de *corepressor*, alterando diretamente aspectos da expressão gênica (Millard et al., 2013). Porém, ressalta-se que através dos experimentos aplicados, não é possível indicar se ao se ligar no mesmo sítio que o inositol tetrafosfato, ambos irão agir da mesma forma, portanto, se faz necessário a produção de mais estudos a fim de detectar os possíveis impactos na expressão gênica do indivíduo.

No último grupo de proteínas abordado no presente estudo optou-se por abordar a proteína B2CL1, que se trata de uma proteína apoptótica que é alvo direto de medicamento já utilizados clinicamente, como navitoclax e venetoclax, que a partir de sua inibição, direcionam a célula ao processo de morte celular (Souers et al., 2013). Os resultados obtidos que predizem a inibição dessa proteína através da quinona ENSJ-1135 vai de encontro com estudos já desenvolvidos anteriormente e encontrados na literatura, que relatam quinonas atuando diretamente e indiretamente na atividade da proteína B2CL1 e sua isoforma (Bax) e contribuindo para a inibição do crescimento tumoral. A molécula naftoquinona shiconina, através da inativação da proteína AKT, indiretamente induziu as linhagens cancerosas A549 e NCI-H1437 a processo de morte celular por apoptose (Jeung et al., 2016). Adicionalmente, Liang e colaboradores (2020), utilizando a também naftoquinona plumbagina, extraída a partir de *Plumbago zeylanica* L. (*Plumbaginaceae*), ao iniciar o estudo de triagem de alvos através de plataformas virtuais, de maneira semelhante, porém menos robusta quando comparada ao presente estudo, obteve predições de que a molécula provavelmente atuaria em proteínas essenciais para o desenvolvimento tumoral, entre elas, a proteína BCL2L1. Posteriormente, através de estudos *in vitro*, as linhagens tumorais HCT116 e SW480 foram submetidas ao tratamento pré-estabelecido e então seguiram aos ensaios de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qPCR). Que apesar de não ser descrita diretamente em ensaios posteriores, foi sugerida como um potencial marcador de câncer colorretal (Liang et al., 2020).

6. Conclusão e perspectivas futuras

Os dados obtidos indicaram que a metodologia de caracterização molecular buscando predições farmacocinéticas e posteriormente farmacodinâmicas através da técnica de *target fishing* seguida por experimentos de *docking* molecular mostram resultados homogêneos e consistentes em relação às predições, onde aproximadamente 70% das moléculas selecionadas através da metodologia de *target fishing* obtiveram 70% ou mais de interações mais prováveis envolvendo sítios críticos ao funcionamento das proteínas estabelecidas como alvo da molécula ENSJ-1135. Ademais, a partir do presente estudo foi possível propor quais os alvos mais promissores a serem explorados como objetos de estudos posteriores, que apesar de indicar possíveis mecanismos multialvos, mostrou que a molécula possui particularidades que influenciam diretamente sua atração aos sítios de ATP de proteínas quinases essenciais para a progressão tumoral, o que pode ser capaz de justificar seu efeito citotóxico já previamente observado em estudos anteriores.

Porém, ressalta-se que outras análises *in silico* mais sofisticadas como *ensemble docking* e ensaios de dinâmica molecular podem sofisticar ainda mais as predições realizadas no presente estudo, além de acentuar a necessidade da realização de ensaios *in vitro* posteriormente às predições realizadas *in silico*, a fim de realizar a validação dos alvos pré-estabelecidos.

7. Referência bibliográfica

- Abdel-Wahab, B. A., Walbi, I. A., Albarqi, H. A., Ali, F. E. M., & Hassanein, E. H. M. (2021). Roflumilast protects from cisplatin-induced testicular toxicity in male rats and enhances its cytotoxicity in prostate cancer cell line. Role of NF- κ B-p65, cAMP/PKA and Nrf2/HO-1, NQO1 signaling. *Food and Chemical Toxicology*, 151, 112133. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2021.112133>
- Banerjee, P., Kemmler, E., Dunkel, M., & Preissner, R. (2024). ProTox 3.0: A webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 52(W1), W513–W520. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae303>
- Bhamidipati, D., Haro-Silerio, J. I., Yap, T. A., & Ngoi, N. (2023). PARP inhibitors: enhancing efficacy through rational combinations. In *British Journal of Cancer* (Vol. 129, Issue 6, pp. 904–916). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02326-7>
- Dahlem Junior, M. A., Nguema Edzang, R. W., Catto, A. L., & Raimundo, J. M. (2022). Quinones as an Efficient Molecular Scaffold in the Antibacterial/Antifungal or Antitumoral Arsenal. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 22). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms232214108>

- Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7. <https://doi.org/10.1038/srep42717>
- De Vos, F., Santens, P., Vermeirsch, H., Dewolf, I., Dumont, F., Slegers, G., Dierckx, R. A., & De Reuck, J. (2000). Pharmacological evaluation of [¹¹C]donepezil as tracer for visualization of acetylcholinesterase by PET. *Nuclear Medicine and Biology*, 27(8), 745–747. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(00\)00166-9](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(00)00166-9)
- Delcuve, G. P., Khan, D. H., & Davie, J. R. (2012). Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: Emerging paradigms from studies with inhibitors. In *Clinical Epigenetics* (Vol. 4, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1868-7083-4-5>
- El Omari, N., Bakrim, S., Bakha, M., Lorenzo, J. M., Rebezov, M., Shariati, M. A., Aboulaghras, S., Balahbib, A., Khayrullin, M., & Bouyahya, A. (2021). Natural bioactive compounds targeting epigenetic pathways in cancer: A review on alkaloids, terpenoids, quinones, and isothiocyanates. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu13113714>
- El-Najjar, N., Gali-Muhtasib, H., Ketola, R. A., Vuorela, P., Urtti, A., & Vuorela, H. (2011). The chemical and biological activities of quinones: Overview and implications in analytical detection. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 353–370. <https://doi.org/10.1007/s11101-011-9209-1>
- Franza, T., & Gaudu, P. (2022). Quinones: more than electron shuttles. In *Research in Microbiology* (Vol. 173, Issues 6–7). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2022.103953>
- Furqan, M., Fayyaz, A., Firdous, F., Raza, H., Bilal, A., Saleem, R. S. Z., Shahzad-ul-Hussan, S., Wang, D., Youssef, F. S., Al Musayeib, N. M., Ashour, M. L., Hussain, H., & Faisal, A. (2022). Identification and Characterization of Natural and Semisynthetic Quinones as Aurora Kinase Inhibitors. *Journal of Natural Products*, 85(6), 1503–1513. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.1c01222>
- Galati, S., Di Stefano, M., Martinelli, E., Poli, G., & Tuccinardi, T. (2021). Recent Advances in In Silico Target Fishing. *Molecules*, 26(17), 5124. <https://doi.org/10.3390/molecules26175124>
- Gao, Y., Wang, Y., Wang, X., Zhao, C., Wang, F., Du, J., Zhang, H., Shi, H., Feng, Y., Li, D., Yan, J., Yao, Y., Hu, W., Ding, R., Zhang, M., Wang, L., Huang, C., & Zhang, J. (2021). miR-335-5p suppresses gastric cancer progression by targeting MAPK10. *Cancer Cell International*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01684-z>
- Gomathinayagam, R., Ha, J. H., Jayaraman, M., Song, Y. S., Isidoro, C., & Dhanasekaran, D. N. (2020). Chemopreventive and Anticancer Effects of Thymoquinone: Cellular and Molecular Targets. *Journal of Cancer Prevention*, 25(3), 136–151. <https://doi.org/10.15430/JCP.2020.25.3.136>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. In *Cancer Discovery* (Vol. 12, Issue 1, pp. 31–46). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

- Jardim, G. A. M., Da Cruz, E. H. G., Valença, W. O., Lima, D. J. B., Cavalcanti, B. C., Pessoa, C., Rafique, J., Braga, A. L., Jacob, C., & Da Silva, E. N. (2018). Synthesis of selenium-quinone hybrid compounds with potential antitumor activity via Rh-Catalyzed C-H bond activation and click reactions. *Molecules*, *23*(1). <https://doi.org/10.3390/molecules23010083>
- Jeung, Y. J., Kim, H. G., Ahn, J., Lee, H. J., Lee, S. B., Won, M., Jung, C. R., Im, J. Y., Kim, B. K., Park, S. K., Son, M. J., & Chung, K. S. (2016). Shikonin induces apoptosis of lung cancer cells via activation of FOXO3a/EGR1/SIRT1 signaling antagonized by p300. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, *1863*(11), 2584–2593. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.07.005>
- Kang, Y. H., Lee, K. A., Kim, J. H., Park, S. G., & Yoon, D. Y. (2010). Mitomycin C modulates DNA-double strand break repair genes in cervical carcinoma cells. *Amino Acids*, *39*(5), 1291–1298. <https://doi.org/10.1007/s00726-010-0568-5>
- Koppula, P., Lei, G., Zhang, Y., Yan, Y., Mao, C., Kondiparthi, L., Shi, J., Liu, X., Horbath, A., Das, M., Li, W., Poyurovsky, M. V., Olszewski, K., & Gan, B. (2022). A targetable CoQ-FSP1 axis drives ferroptosis- and radiation-resistance in KEAP1 inactive lung cancers. *Nature Communications*, *13*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-29905-1>
- Lauffer, B. E. L., Mintzer, R., Fong, R., Mukund, S., Tam, C., Zilberleyb, I., Flicke, B., Ritscher, A., Fedorowicz, G., Vallero, R., Ortwine, D. F., Gunzner, J., Modrusan, Z., Neumann, L., Koth, C. M., Kaminker, J. S., Heise, C. E., & Steiner, P. (2013). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(37), 26926–26943. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.490706>
- Lee, J. B., Zhou, S., Chiang, M., Zang, X., Kim, T. H., & Kagan, L. (2020). Interspecies prediction of pharmacokinetics and tissue distribution of doxorubicin by physiologically-based pharmacokinetic modeling. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, *41*(4–5), 192–205. <https://doi.org/10.1002/bdd.2229>
- Liang, Y., Zhou, R., Liang, X., Kong, X., & Yang, B. (2020). Pharmacological targets and molecular mechanisms of plumbagin to treat colorectal cancer: A systematic pharmacology study. *European Journal of Pharmacology*, *881*. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.173227>
- Lima, D. J. B., Almeida, R. G., Jardim, G. A. M., Barbosa, B. P. A., Santos, A. C. C., Valença, W. O., Scheide, M. R., Gatto, C. C., de Carvalho, G. G. C., Costa, P. M. S., Pessoa, C., Pereira, C. L. M., Jacob, C., Braga, A. L., & da Silva Júnior, E. N. (2021a). It takes two to tango: synthesis of cytotoxic quinones containing two redox active centers with potential antitumor activity. *RSC Medicinal Chemistry*, *12*(10), 1709–1721. <https://doi.org/10.1039/d1md00168j>
- Lima, D. J. B., Almeida, R. G., Jardim, G. A. M., Barbosa, B. P. A., Santos, A. C. C., Valença, W. O., Scheide, M. R., Gatto, C. C., de Carvalho, G. G. C., Costa, P. M. S., Pessoa, C., Pereira, C. L. M., Jacob, C., Braga, A. L., & da Silva Júnior, E. N. (2021b). It takes two to tango: synthesis of cytotoxic quinones containing two redox active centers with

- potential antitumor activity. *RSC Medicinal Chemistry*, 12(10), 1709–1721.
<https://doi.org/10.1039/d1md00168j>
- Millard, C. J., Watson, P. J., Celardo, I., Gordiyenko, Y., Cowley, S. M., Robinson, C. V., Fairall, L., & Schwabe, J. W. R. (2013). Class I HDACs share a common mechanism of regulation by inositol phosphates. *Molecular Cell*, 51(1), 57–67.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.020>
- Murga-Zamalloa, C., Inamdar, K. V., & Wilcox, R. A. (2019). The role of aurora A and polo-like kinases in high-risk lymphomas. *Blood Advances*, 3(11), 1778–1787.
<https://doi.org/10.1182/bloodadvances.2019000232>
- Oliveira, J. C., de Carvalho, R. L., Sampaio, H. G. S., Honorato, J., Ellena, J. A., Martins, F. T., Pereira, J. V. M., Costa, P. M. S., Pessoa, C., Ferreira, R. S., Araújo, M. H., Jacob, C., & da Silva Júnior, E. N. (2023). It Takes Two to Tango, Part II: Synthesis of A-Ring Functionalised Quinones Containing Two Redox-Active Centres with Antitumour Activities. *Molecules*, 28(5). <https://doi.org/10.3390/molecules28052222>
- Rani, M. R. S., Leaman, D. W., Han, Y., Leung, S., Croze, E., Fish, E. N., Wolfman, A., & Ransohoff, R. M. (1999). Catalytically active TYK2 is essential for interferon- β -mediated phosphorylation of STAT3 and interferon- α receptor-1 (IFNAR-1) but not for activation of phosphoinositol 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 32507–32511. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32507>
- Ribeiro, H. F., Sant' Anna, C. de C., Kato, V. de J. O., de Sousa Brasil, R. M., Bona, A. B., da Costa, D. F., Lima, I. K., Soares, P. C., Guimarães, A. P. A., de Assumpção, P. P., & Burbano, R. R. (2022). CDC25B Inhibition by Menadione: A Potential New Therapeutical Approach. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 22(17), 2927–2932. <https://doi.org/10.2174/1871520622666220418131935>
- Ross, D., & Siegel, D. (2021). The diverse functionality of NQO1 and its roles in redox control. In *Redox Biology* (Vol. 41). Elsevier B.V.
<https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.101950>
- Schlicher, L., Green, L. G., Romagnani, A., & Renner, F. (2023). Small molecule inhibitors for cancer immunotherapy and associated biomarkers – the current status. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 14). Frontiers Media SA.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1297175>
- Siegmund, B., Welsch, J., Loher, F., Meinhardt, G., Emmerich, B., Endres, S., & Eigler, A. (2001). Phosphodiesterase type 4 inhibitor suppresses expression of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in B-CLL cells and induces caspase-dependent apoptosis. In *Leukemia* (Vol. 15). www.nature.com/leu
- Souers, A. J., Levenson, J. D., Boghaert, E. R., Ackler, S. L., Catron, N. D., Chen, J., Dayton, B. D., Ding, H., Enschede, S. H., Fairbrother, W. J., Huang, D. C. S., Hymowitz, S. G., Jin, S., Khaw, S. L., Kovar, P. J., Lam, L. T., Lee, J., Maecker, H. L., Marsh, K. C., ... Elmore, S. W. (2013). ABT-199, a potent and selective BCL-2 inhibitor, achieves antitumor activity while sparing platelets. *Nature Medicine*, 19(2), 202–208.
<https://doi.org/10.1038/nm.3048>

- Sui, H., & Li, Q. (2012). Signal Transduction Pathways and Transcriptional Mechanisms of ABCB1/Pgp-mediated Multiple Drug Resistance in Human Cancer Cells. In *The Journal of International Medical Research* (Vol. 40).
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2022a). Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317>
- Tilsed, C. M., Fisher, S. A., Nowak, A. K., Lake, R. A., & Lesterhuis, W. J. (2022b). Cancer chemotherapy: insights into cellular and tumor microenvironmental mechanisms of action. In *Frontiers in Oncology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.960317>
- Todeschini, R., Consonni, V., Xiang, H., Holliday, J., Buscema, M., & Willett, P. (2012). Similarity coefficients for binary chemoinformatics data: Overview and extended comparison using simulated and real data sets. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 52(11), 2884–2901. <https://doi.org/10.1021/ci300261r>
- Tsuchiya, Y., Nakajima, M., & Yokoi, T. (2005). Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human. *Cancer Letters*, 227(2), 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.10.007>
- Xiong, L.-H., Yang, L., Geng, J., Tang, B. Z., & He, X. (2024). All-in-One Alkaline Phosphatase-Response Aggregation-Induced Emission Probe for Cancer Discriminative Imaging and Combinational Chemodynamic–Photodynamic Therapy. *ACS Nano*, 18(27), 17837–17851. <https://doi.org/10.1021/acsnano.4c03879>
- Zen, P. R. G., Nora De Moraes, F., Fabiano, R. R., Graziadio, C., & Paskulin, G. A. (2011). *Características clínicas de pacientes com anemia de Fanconi Clinical characteristics of patients with Fanconi anemia.*
- Zhang, X., Song, M., Kundu, J. K., Lee, M.-H., & Liu, Z.-Z. (2018). PIM Kinase as an Executional Target in Cancer. *Journal of Cancer Prevention*, 23(3), 109–116. <https://doi.org/10.15430/jcp.2018.23.3.109>
- Zou, S., Tong, Q., Liu, B., Huang, W., Tian, Y., & Fu, X. (2020). Targeting stat3 in cancer immunotherapy. *Molecular Cancer*, 19(1), 1–19. <https://doi.org/10.1186/s12943-020-01258-7>

Material suplementar

Tabela 1. Detalhamento dos resultados de experimentos de *docking* molecular contendo os alvos em que a molécula ENSJ-1135 obteve pelo menos 70% de atração a sítios de interesse

Uni Prot ID	Nome	Classe proteica	PDB ID	Atração a sítios de interesse (%)	E. de interação	vdW	Coul.	ΔG	E. total	RMSD (Å)
P53779	MK10	Quinase	1JNK	100	-53.44	-24.38	-29.05	-8,69	34,1	33.69
P43405	KSYK	Quinase	3SRV	100	-48.89	-28.11	-20.78	-9,18	39,0	45.14
P13497	BMP1	Quinase	6BSM	100	-46.61	-37.37	-9.24	-9,67	39,1	17.03
P08684	CP3A4	Oxido reductase	1W0E	100	-45.69	-31.51	-14.18	-9,05	36,7	29.43
P42345	MTOR	Quinase	3JBZ	100	-45.33	-20.81	-24.52	-9,17	39,9	32.93
Q9UGN5	PARP2	Transferase	3KCZ	100	-45.09	-16.84	-28.24	-7,6	41,7	22.83
P29597	TYK2	Quinase	3LXP	100	-44.96	-33.02	-11.94	-9,45	44,2	25.2
P23458	JAK1	Quinase	6SM8	100	-44.20	-28.32	-15.88	-8,15	43,8	79.38
Q9P1W9	PIM2	Quinase	4X7Q	100	-44.19	-35.70	-8.49	-9,34	42,1	38.99
P27815	PDE4A	Fosfo-proteína	2QYK	100	-43.72	-34.19	-9.52	-9,61	42,9	16.55
P31749	AKT1	Quinase	3MVH	100	-43.62	-25.83	-17.78	-8,28	44,0	24.67
Q14145	KEAP1	Reg. de transcrição	1U6D	100	-43.16	-28.50	-14.65	-9,18	34,1	16.32
P09237	MMP7	Protease	7WX X	100	-43.09	-18.47	-24.61	-8,74	41,1	20.35
Q16539	MK14	Quinase	1W7H	100	-42.92	-6.153	-36.77	-7,26	39,6	35.20
P07949	RET	Quinase	2IVS	100	-42.34	-33.11	-9.22	-9,04	42,4	25.52
P15121	ALDR	Quinase	2F2K	100	-42.32	-32.72	-9.60	-10,13	41,4	31.51
O14965	AURK A	Quinase	5DN3	100	-42.25	-31.25	-11.00	-9,33	39,6	25.99
O00329	PK3CD	Quinase	8S3R	100	-41.85	-22.48	-19.37	-8,44	45,7	46.01
P05771	KPCB	Quinase	2I0E	100	-41.17	-10.20	-30.97	-6,89	45,0	21.06
P11802	CDK4	Quinase	3G33	100	-40.96	-26.00	-14.95	-8,72	43,7	29.40
Q99808	S29A1	Transportadores	6OB7	100	-40.85	-36.94	-3.907	-10,2	40,8	38.72
P06730	IF4E	Transferase	4DT6	100	-40.79	-15.44	-25.35	-8,12	44,4	52.71
P09874	PARP1	Transferase	1UK0	100	-40.66	-30.429	-10.23	-9,62	46,1	36.39
Q92769	HDAC2	Reg. de transcrição	4LXZ	100	-40.11	-19.91	-20.19	-8,52	45,1	38.22
Q04206	TF65	Reg. de transcrição	1NFI	100	-39.91	-10.81	-29.10	-7,44	47,7	50.16

Q06187	BTK	Quinase	4RFZ	100	-39.25	-31.51	-7.736	-8,52	44,2	28.09
P52333	JAK3	Quinase	4V0G	100	-39.21	-8.11	-31.10	-9,18	44,8	23.97
Q13946	PDE7A	Fosfo- proteína	1ZKL	100	-39.10	-21.41	-17.68	-8,82	47,5	38.81
Q9GZT 9	EGLN1	Oxido reductase	2G19	100	-38.98	-21.09	-17.88	-7,63	44,8	33.08
P49137	MAPK2	Quinase	8XX1	100	-38.97	-20.15	-18.81	-8,43	47,3	28.39
Q08499	PDE4D	Fosfo- proteína	1XOQ	100	-38.86	-32.17	-6.69	-9,37	42,0	36.18
P14780	MMP9	Citocina	1GKC	100	-38.73	-29.01	-9.71	-9,14	45,4	14.93
P30530	UFO	Quinase	5U6B	100	-38.60	-28.97	-9.62	-8,98	46,4	33.34
P23443	KS6B1	Quinase	3A60	100	-38.16	-29.64	-8.51	-8,62	47,0	25.63
P11387	TOP1	Reg. de transcrição	1A35	100	-38.04	-20.93	-17.11	-8,3	44,7	28.41
Q14432	PDE3A	Fosfo- proteína	7KW E	100	-37.50	-22.83	-14.67	-8,22	40,7	33.73
O14746	TERT	Transferase	5UG W	100	-37.29	-15.92	-21.37	-7,48	41,3	13.36
P14174	MIF	Protease	1LJT	100	-37.26	-20.64	-16.61	-8,24	47,5	16.86
O75460	ERN1	Quinase	3P23	100	-36.66	-29.64	-7.027	-8,6	45,1	22.34
P50613	CDK7	Quinase	8P4Z	100	-36.59	-28.91	-7.678	-8,61	41,3	39.73
P08069	IGF1R	Quinase	2OJ9	100	-36.37	-14.47	-21.90	-7,48	44,4	29.51
P53350	PLK1	Quinase	2OU7	100	-35.79	-19.89	-15.89	-7,62	45,6	22.58
P12931	SRC	Oxido reductase	8HAQ	100	-35.78	-22.14	-13.64	-8,08	46,8	21.16
Q08881	ITK	Quinase	1SM2	100	-34.00	-25.63	-8.368	-9,09	47,5	26.52
O15379	HDAC3	Reg. de transcrição	4A69	100	-33.88	-20.80	-13.07	-7,92	47,6	37.33
P42336	PK3CA	Quinase	2RD0	100	-32.51	-16.11	-16.39	-7,51	44,7	35.44
P15559	NQO1	Oxido reductase	5EA2	100	-32.18	-25.62	-6.561	-8,9	45,6	30.47
Q07817	B2CL1	Apoptóticas	4CIN	100	-31.09	-24.14	-6.950	-8,33	45,8	23.31
P36888	FLT3	Quinase	1RJB	90	-46.19	-23.65	-22.53	-7,48	42,5	21.24
P06241	FYN	Quinase	2DQ7	90	-45.51	-15.64	-29.86	-8,3	43,6	28.91
O96013	PAK4	Quinase	2CDZ	90	-42.52	-15.25	-27.26	-7,68	42,6	32.46
P15056	BRAF	Protease	2FB8	90	-41.22	-22.30	-18.92	-8,4	46,5	31.25
P49841	GSK3B	Quinase	1H8F	90	-40.74	-24.41	-16.33	-8,34	43,7	28.55
P11712	CP2C9	Oxido reductase	5A5I	90	-40.04	-21.99	-18.04	-8,24	44,8	35.72
P04626	ERBB2	Quinase	3PP0	90	-39.43	-24.43	-15.00	-7,79	43,6	34.33
P06493	CDK1	Quinase	6GU6	90	-39.07	-22.55	-16.52	-7,79	45,3	34.92
P17948	VGFR1	Quinase	3HNG	90	-38.10	-15.63	-22.47	-7,52	42,5	14.97
P45984	MK09	Quinase	8ELC	90	-37.73	-16.93	-20.80	-7,38	46,4	22.43
P07339	CATD	Protease	4OD9	90	-37.09	-27.19	-9.895	-8,85	47,1	26.13

Q9Y2R 2	PTN22	Fosfatase	2P6X	90	-36.63	-14.81	-21.81	-7,1	41	40.85
P31751	AKT2	Quinase	1GZK	90	-33.39	-7.65	-25.73	-6,62	45,8	28.10
P11309	PIM1	Quinase	1XR1	90	-30.98	-20.29	-10.69	-7,56	46,6	25.92
P00533	EGFR	Quinase	2GS2	80	-42.51	-20.07	-22.44	-8,5	45,3	32.93
P51812	KS6A3	Quinase	4JG6	80	-41.61	-15.64	-25.96	-7,96	46,4	34
P43403	ZAP70	Quinase	1U59	80	-40.57	-22.51	-18.05	-8,74	42,7	30.51
P36897	TGFR1	Quinase	3GXL	80	-39.07	-15.33	-23.73	-7,64	46,5	32.10
P04818	TYSY	Transferase	1HZ W	80	-39.04	-24.91	-14.13	-8,66	44,3	22.63
P00519	ABL1	Quinase	2G1T	80	-38.82	-28.81	-10.01	-8,6	45,3	26.3
Q15118	PDK1	Quinase	2Q8F	80	-38.61	-17.37	-21.24	-7,69	44,1	31.36
P09917	LOX5	Oxido reductase	6N2W	80	-38.14	-31.53	-6.610	-9,27	47,5	42.97
O43353	RIPK2	Quinase	4C8B	80	-37.17	-26.81	-10.36	-8,88	48,3	35.26
P04629	NTRK1	Quinase	4F0I	80	-36.74	-27.65	-9.083	-8,2	45,6	21.11
P24941	CDK2	Quinase	1DI8	80	-34.12	-6.08	-28.03	-6,78	47,8	28.59
P35236	PTN7	Fosfatase	1ZC0	80	-32.80	-19.20	-13.59	-8,1	47,7	17.21
Q00987	MDM2	Transferase	1RV1	80	-24.76	-24.31	-0.452	-8,41	52,5	17.84
O15530	PDPK1	Quinase	1OKY	70	-42.06	-26.18	-15.88	-9,52	45,1	30.83
P08238	HS90B	Chaperona	1UY M	70	-41.49	-24.10	-17.39	-8,42	46,3	26.53
O75116	ROCK2	Quinase	4L6Q	70	-40.56	-20.89	-19.66	-7,46	44,2	49.73
P30305	MPIP2	Fosfatase	1CWS	70	-39.34	-20.99	-18.35	-7,64	40,9	16.75
P48736	PK3CG	Quinase	2V4L	70	-39.25	-15.72	-23.52	-7,67	43,8	35.60
P07948	LYN	Quinase	3A4O	70	-37.41	-29.68	-7.735	-9,52	47,1	22.36
O14757	CHK1	Quinase	1NVQ	70	-37.06	-29.02	-8.040	-9,23	47,8	28.55
Q00535	CDK5	Quinase	4AU8	70	-34.90	-10.77	-24.12	-7,14	42,8	59.73
Q13547	HDAC1	Reg. de transcrição	4BKX	70	-33.15	-22.57	-10.58	-8,26	47,7	22.16
P09619	PGFRB	Quinase	1H9O	70	-29.92	-14.72	-15.20	-7,24	47,5	29.1
P49759	CLK1	Quinase	6R8J	60	-38.68	-17.68	-20.99	-7,95	44,5	28.10
Q05397	FAK1	Quinase	3BZ3	60	-36.08	-14.91	-21.16	-7,24	47,2	28.61
O60674	JAK2	Quinase	2B7A	60	-34.93	-8.62	-26.30	-6,68	49,0	75.60
P01375	TNFA	Citocina	2AZ5	60	-32.12	-20.01	-12.10	-8,34	51,9	7.27
P07900	HS90A	Chaperona	2YE5	50	-41.87	-21.23	-20.63	-8,28	45,1	26.62
O14920	IKKB	Quinase	4KIK	50	-34.99	-13.31	-21.68	-7,47	45,4	29.85
Q96GD 4	AURKB	Quinase	4AF3	50	-32.26	-20.98	-11.27	-8,19	48,6	22.80
P16083	NQO2	Oxido reductase	3O73	50	-29.94	-22.35	-7.58	-8,67	47,6	28.01
P08581	MET	Quinase	2RFS	40	-45.30	-22.98	-22.38	-8,66	39,4	23.90
P11362	FGFR1	Quinase	1AG W	40	-38.98	-23.24	-15.72	-8,27	43,7	26.17
P08473	NEP	Protease	1R1H	30	-41.60	-24.46	-17.14	-8,39	40,8	42.47

P10415	BCL2	Apoptóticas	4LVT	30	-39.70	-27.89	-11.80	-9,48	45,8	19.66
P45983	MK08	Quinase	3ELJ	30	-34.45	-14.45	-19.97	-7,11	46,2	20.06
P78536	ADA17	Protease	3B92	20	-39.70	-18.70	-21.00	-8,61	45,0	29.47
Q9UBN 7	HDAC6	Reg. de transcrição	5EDU	10	-29.63	-12.20	-17.43	-7,28	51,2	27.45
P12268	IMDH2	Oxido reductase	1B3O	10	-28.25	-15.25	-13.00	-7,94	48,9	25.8
Q5S007	LRRK2	Quinase	2ZEJ	00	-43.11	-15.86	-27.25	-7,77	38,0	10.8
Q07820	MCL1	Apoptóticas	3MK8	00	-42.69	-16.28	-26.40	-7,7	45,5	23.08
P23219	PGH1	Oxido reductase	6Y3C	00	-42.23	-33.65	-8.58	-9,36	42,0	42.06
O14672	ADA10	Protease	6BDZ	00	-40.66	-24.50	-16.16	-8,36	44,7	24.78
P16435	P450R	Oxido reductase	1B1C	00	-39.79	-23.65	-16.13	-8,28	48,3	15.61
Q16665	HIF1A	Reg.de transcrição	1H2K	00	-37.37	-19.78	-17.58	-7,68	43,8	37.42
Q15059	BRD3	Reg. de transcrição	2NXB	00	-35.57	-23.59	-11.98	-9,01	48,4	20.96
P55263	ADK	Quinase	4O1L	00	-35.26	-19.97	-15.29	-8,27	48,7	65.89
Q9BY4 1	HDAC8	Reg.de transcrição	1T69	00	-33.49	-24.29	-9.20	-8,43	50,8	12.58
O60885	BRD4	Reg.de transcrição	7WW Z	00	-33.48	-22.24	-11.24	-8,07	50,0	17.2
P05177	CP1A2	Oxido reductase	2HI4	00	-32.41	-23.77	-8.64	-8,4	45,9	35.09
P20839	IMDH1	Oxido reductase	1JCN	00	-32.04	-19.79	-12.25	-7,91	45,4	51.46
Q14680	MELK	Quinase	5TVT	00	-31.25	-20.73	-10.52	-7,9	46,6	32.51
Q9NR9 6	TLR9	Imunológica s								
Q9Y243	AKT3	Quinase								
O15111	IKKA	Quinase								
Q05655	KPCD	Quinase								
Q02156	KPCE	Quinase								
Q06418	TYRO3	Quinase								
P35916	VGFR3	Quinase								
P25105	PTAFR	Reg.de transcrição								

Fonte: Própria, adaptada de dados obtidos através de experimentos via plataforma *DockThor*;

*Grifadas em vermelho: Proteínas que foram excluídas do estudo por não possuir estruturas aptas ou disponíveis.