



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



“Modelagem por homologia da tubulina do *Plasmodium falciparum* e
o estudo de lignanas ariltetralônicas antimaláricas por
docking molecular”

DENIS DA SILVA CORRÊA

São Carlos

2015

Denis da Silva Corrêa

Modelagem por homologia da tubulina do *Plasmodium falciparum* e o estudo de lignanas ariltetralônicas antimaláricas por *docking* molecular

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Prof^a. Dr^a. Ignez Caracelli
Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector
Orientadores

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C824m Corrêa, Denis da Silva
 Modelagem por homologia da tubulina do Plasmodium
 falciparum e o estudo de lignanas ariltetralônicas
 antimaláricas por docking molecular / Denis da Silva
 Corrêa. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
 141 p.

 Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
 Carlos, 2015.

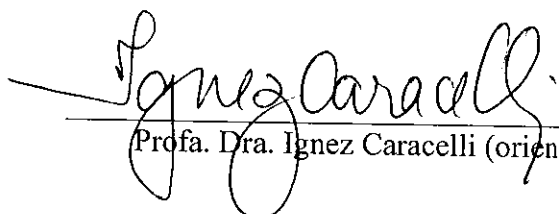
 1. Malária. 2. Plasmodium falciparum. 3.
 Tubulina. 4. Modelagem molecular por homologia. 5.
 Docking. I. Título.

Denis da Silva Correa

Tese de Doutorado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia, da
Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Doutor em
Biotecnologia

Aprovado em: 16/06/2015


BANCA EXAMINADORA



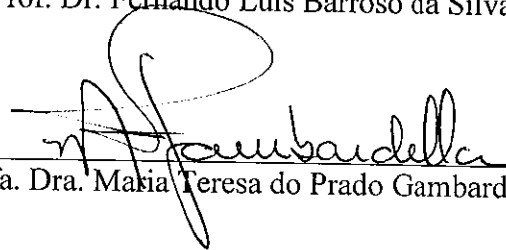
Prof.a. Dra. Ignez Caracelli (orientadora)



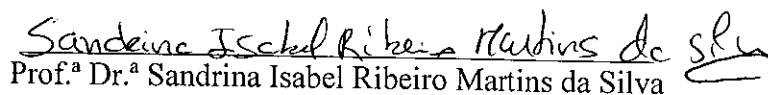
Prof.a. Dra. Lucia Maria Xavier Lopes



Prof. Dr. Fernando Luís Barroso da Silva



Prof.a. Dra. Maria Teresa do Prado Gambardella



Prof.^a Dr.^a Sandrina Isabel Ribeiro Martins da Silva

*Dedico este trabalho aos meus pais Alaor e
Elaine e à minha mulher Carol*

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Alaor e Elaine, pela dedicação à educação e formação de seus filhos. Nunca mediram esforços para iluminar os caminhos para que cada um pudesse traçar sua trajetória de sucesso.

À minha mulher, Carol, pela compreensão e apoio nos momentos mais desafiadores, que não foram poucos ao longo desses anos de estudo.

Aos meus orientadores, Prof^a. Dr^a. Ignez Caracelli e Prof. Dr. Julio Zukerman Schpector, que me acompanham desde o início da carreira científica e foram fundamentais para minha formação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação, pela oportunidade de aprendizado e troca de experiências.

Aos companheiros do BioMat e do LaCrEMM.

Meus agradecimentos...

RESUMO

A malária é uma doença febril aguda causada por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Plasmodium*, sendo a espécie *P. falciparum* a responsável pela maioria das formas severas e mortes pela doença. Estes parasitas desenvolveram resistência aos fármacos comumente utilizados e, portanto, existe a necessidade de se desenvolver novos agentes antimaláricos. Lignanaril tetralônicas são compostos que apresentam atividade antiplasmodial *in vitro* contra o *P. falciparum*, porém seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido. Neste trabalho, conseguimos postular o modo de ação de algumas lignanaril tetralônicas e, a partir dos resultados obtidos, sugerimos modificações nestes compostos de modo a obter uma melhoria na sua atividade biológica. Para isso, primeiramente foi realizada uma busca por compostos químicos semelhantes, cujos alvos macromoleculares eram conhecidos. A partir dos resultados obtidos, selecionou-se a tubulina do *P. falciparum* como potencial alvo para estas lignanaril tetralônicas. Como não há estrutura tridimensional determinada experimentalmente para esta proteína, foi realizada a modelagem molecular por homologia da tubulina do *P. falciparum*, selecionando como molde a estrutura da tubulina bovina complexada com colchicina. A partir da análise do modelo construído, verificou-se que a estrutura tridimensional da tubulina do *Plasmodium* é conservada em relação à tubulina bovina e que ocorrem algumas substituições importantes na região do sítio de ligação da colchicina: Ala250B por Ser248B, Ala316B por Cys314B e Ile318B por Met316B. Em seguida, foi realizado o *docking* molecular das lignanaril tetralônicas, da colchicina e da podofilotoxina na tubulina do *P. falciparum*. Os resultados do *docking* permitiram concluir primeiramente que, embora ocorram algumas substituições de aminoácidos no sítio, o modo de ligação da colchicina na tubulina do *P. falciparum* é exatamente o mesmo ao já descrito na literatura para a tubulina bovina. Já para a podofilotoxina, foi obtido um modo de ligação diferente do descrito na literatura para a tubulina bovina, devido à substituição da Ala250B pela Ser248B e da Val318B pela Met316B. Para as lignanaril tetralônicas estudadas, foram obtidos três modos de ligação diferentes: um exibido pelos compostos **1**, **2** e **3**, outro para **4** e **6** e um terceiro modo exclusivo para **5**. As lignanaril tetralônicas **1**, **2** e **3** orientam-se de modo que o anel C, que contém o grupo dimetóxi ou metilenodióxi, se posiciona na mesma região do sítio obtida para o anel contendo o grupo trimetóxi da **colchicina** e da **podofilotoxina**, realizando uma interação C–H... π com a Leu246B. As lignanaril tetralônicas **4** e **6** orientam-se com o anel aromático C entre a Ala180A e a Leu246B, sendo mantido nesta posição por interações C–H... π . No caso da lignana **5**, esta se orienta com o anel aromático C entre a Leu246B e Leu253B, realizando interações C–H... π com estes resíduos, semelhante ao que foi obtido para a **colchicina** neste sítio. Assim, o mecanismo provável de ação das lignanaril tetralônicas aqui estudadas passaria pela sua ligação ao mesmo sítio de ligação da colchicina na proteína tubulina do *P. falciparum* e, com isso, interrompendo as divisões e outras funções celulares.

Palavras-chave: 1. Malária. 2. *Plasmodium falciparum*. 3. Tubulina. 4. Modelagem molecular por homologia. 5. *Docking*. 6. Lignanaril tetralônicas.

ABSTRACT

Malaria is an acute febrile disease caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, being the species *P. falciparum* responsible for the most severe forms and deaths caused by the disease. These parasites have developed resistance to commonly used drugs and therefore there is a need to develop new antimalarial agents. Aryltetralone lignans are compounds that show antiplasmodial activity *in vitro* against *P. falciparum*, but its mechanism of action is still not fully understood. In this work, we postulate a plausible mode of action of some aryltetralone lignans and according to the obtained results we suggest modifications to the ligands for a better biological activity. In order to achieve our objectives we first performed a search for similar chemical compounds, for which their macromolecular targets were known. From the results obtained, *P. falciparum* tubulin was selected as a potential target for these lignans. Since there is no experimentally determined three-dimensional structure for this protein, we performed a molecular homology modeling of *P. falciparum* tubulin and the structure of bovine tubulin complexed with colchicine was selected as template. The analysis of the obtained model showed that the three dimensional structure of *Plasmodium* tubulin is conserved in relation to the bovine tubulin with some important substitutions occurring in the colchicine binding site region: Ala250B by Ser248B, Ala316B by Cys314B and Ile318B by Met316B. Then, molecular docking of the aryltetralone lignans, colchicine and podophyllotoxin was performed in the modeled *P. falciparum* tubulin. The docking calculations results allowed to conclude firstly that, although the amino acid substitutions in the binding site, the colchicine binding mode in the *P. falciparum* tubulin is exactly the same as that already described in the literature for bovine tubulin. As for podophyllotoxin, a different binding mode from that described in the literature for bovine tubulin was obtained due to the replacement of Ala250B by Ser248B and the Val318B by Met316B. For the aryltetralone lignans studied, three different binding modes were obtained: one exhibited by compounds **1**, **2** and **3**, another by **4** and **6**, and a third one by **5**. The lignans **1**, **2** and **3** are oriented in a way so that the C ring containing the dimethoxy or methylenedioxy group is positioned in the same region obtained for the ring containing the trimethoxy group in the case of colchicine and podophyllotoxin, performing a C-H... π interaction with Leu246B. Lignans **4** and **6** orient themselves with the aromatic ring C between Ala180A and Leu246B and being held in this position by C-H... π interactions. Lignan **5** is oriented with the aromatic ring C between Leu246B and Leu253B, performing C-H... π interactions with these residues, in a similar way to what was obtained with colchicine in this site. So the likely mechanism of action of the aryltetralone lignans studied here would be their binding to the same colchicine binding site in the tubulin protein of *P. falciparum* and thereby interrupting the divisions and other cellular functions.

Keywords: 1. Malaria. 2. *Plasmodium falciparum*. 3. Tubulin. 4. Molecular homology modeling. 5. Docking. 6. Aryltetralone lignans.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 – Mapa com o panorama global de transmissão da malária – casos confirmados a cada 1.000 habitantes. Dados de 2013, adaptado de <i>World Malaria Report</i> (2014)..... | 20 |
| Figura 2 – Mapa com o panorama global de mortes por malária a cada 100.000 habitantes. Dados de 2013, adaptado de <i>World Malaria Report</i> (2014)..... | 20 |
| Figura 3 – Mapa com o panorama de transmissão da malária no continente americano – casos confirmados a cada 1.000 habitantes. Dados de 2013, adaptado de <i>World Malaria Report</i> (2014). | 22 |
| Figura 4 – Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> . A – injeção de esporozoítos no hospedeiro. B – invasão dos esporozoítos nos hepatócitos e posterior formação dos merozoítos. C – multiplicação assexuada dos merozoítos nos eritrócitos. D – diferenciação de parte dos merozoítos assexuados em gametócitos sexuados. E – fusão entre o macrogameta feminino e o microgameta masculino, formando o zigoto, com posterior desenvolvimento em oocisto. F – migração dos esporozoítos para a glândula salivar do mosquito, de onde poderá infectar novos indivíduos. Adaptado de Bousema et al., 2014..... | 23 |
| Figura 5 – Representação de alguns dos antimaláricos atualmente disponíveis. Adaptado de Ridley (2002). | 27 |
| Figura 6 – Passos essenciais na modelagem molecular por homologia. Adaptado de Martí-Renom et al. (2000). | 34 |
| Figura 7 – Lignananas ariltetralônicas. Adaptado de Andrade-Neto et al. (2007). | 37 |
| Figura 8 – Estrutura da lignana ariltetralônica 5 estudada e da podofilotoxina para efeito de comparação. | 37 |
| Figura 9 – A. Representação da estrutura tridimensional da tubulina bovina, código 1sal no PDB (PDB, s.d.; RAVELLI et al., 2004). O monômero α aparece em amarelo e o β em ciano. Em <i>stick</i> aparecem os nucleotídeos GDP e GTP (um em cada monômero), além do ligante podofilotoxina (seta). B. Esquema mostrando como os heterodímeros de α/β tubulina se associam para formar o microtúbulo. A parte B da figura foi adaptada de Dumontet e Jordan, 2010. | 38 |
| Figura 10 – Representação da estrutura tridimensional de heterodímeros de α/β tubulina alternados, com destaque para a localização de três sítios de ligação conhecidos: o sítio de ligação da colchicina localiza-se na interface intradímero, o sítio de ligação do taxol na subunidade β e, por fim, o sítio de ligação da vimblastina localiza-se na interface interdímeros. Adaptado de Tripathi et al. (2010). | 40 |
| Figura 11 – Estrutura bidimensional e SMILES de cada um dos ligantes utilizados para realizar a busca em diferentes bancos de dados..... | 45 |
| Figura 12 – Sequência FASTA das cadeias α e β da tubulina do <i>P. falciparum</i> , cepa 3D7, obtidas do UniProt sob os códigos Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002) e Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002), respectivamente. | 50 |
| Figura 13 – <i>Scripts</i> utilizados para realizar o alinhamento sequência-estrutura no MODELLER v.9.14. | 54 |

- Figura 14** – Alinhamento dos dímeros de tubulina bovina (4o2b) e do *P. falciparum* (“1pft”) utilizado para a construção do modelo estrutural no MODELLER v.9.14. 55
- Figura 15** – *Script* utilizado para gerar o modelo por homologia da tubulina do *P. falciparum* no MODELLER v.9.14. 56
- Figura 16** – Estruturas tridimensionais das lignanas ariltetralônicas obtidas por modelagem molecular. Os átomos de carbono são representados na cor cinza, os de oxigênio são representados em vermelho e os de hidrogênio na cor branca. 60
- Figura 17** – Domínios identificados para as cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* – sequências Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002) e Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002), respectivamente – utilizando o recurso *Conserved Domain Database*. 66
- Figura 18** – Sobreposição das estruturas de tubulina obtidas a partir do PDB (Tabela 7). 69
- Figura 19** – Alinhamento múltiplo, feito utilizando o Clustal Omega (CLUSTAL OMEGA, s.d.), entre as cadeias α das tubulinas do *P. falciparum* (Q6ZLZ9 no UniProt), humana (P68366 no UniProt), de boi (4O2B no PDB), de ovelha (3UT5 no PDB) e de javali (4ABO no PDB). Os asteriscos (“**”) indicam posições onde há resíduos totalmente conservados; dois-pontos (“:”) indicam a conservação entre grupos de propriedades fortemente similares; um ponto (“.”) indica a conservação entre grupos de propriedades fracamente similares. 74
- Figura 20** – Alinhamento múltiplo, feito utilizando o Clustal Omega (CLUSTAL OMEGA, s.d.), entre as cadeias β das tubulinas do *P. falciparum* (Q7KQL5 no UniProt), humana (P04350 no UniProt), de boi (4O2B no PDB), de ovelha (3UT5 no PDB) e de javali (4ABO no PDB). ... 75
- Figura 21** – Alinhamento global, realizado no BLAST, entre a cadeia α da tubulina do *P. falciparum* (PftubA) e da proteína molde (4o2b). Os resíduos não-conservados são destacados em vermelho. 76
- Figura 22** – Alinhamento global, realizado no BLAST, entre a cadeia β da tubulina do *P. falciparum* (PftubB) e da proteína molde (4o2b). Os resíduos não-conservados são destacados em vermelho. 77
- Figura 23** – Alinhamento entre a cadeia α da tubulina do *P. falciparum* (PFTuA) e a estrutura da proteína molde (4o2b), realizado no MODELLER v.9.14. 77
- Figura 24** – Alinhamento entre a cadeia β da tubulina do *P. falciparum* (PFTuB) e a estrutura da proteína molde (4o2b), realizado no MODELLER v.9.14. 78
- Figura 25** – A. Sobreposição dos nove dímeros gerados durante a modelagem por homologia, destacando suas estruturas secundárias. As hélices alfa são representadas em vermelho e as folhas beta em ciano. B. Destaque para a sobreposição dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio de ligação da colchicina. São exibidas as colchicinas dos modelos e os resíduos situados a até 3,5 Å dos ligantes. Não são mostrados átomos de hidrogênio. 79
- Figura 26** – Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo final da tubulina do *P. falciparum*. São mostrados também as estatísticas do gráfico de Ramachandran e a média do fator G. Adaptado do PDBsum (PDBSUM, s.d.). 81
- Figura 27** – Gráficos que exibem a avaliação da qualidade do gráfico Ramachandran (à esquerda) e o fator G global (à direita), em comparação com valores típicos. O quadrado em preto representa os valores obtidos para o modelo construído da tubulina do *P. falciparum*. Adaptado dos resultados obtidos no PDBsum. 82
- Figura 28** – Comparação entre o *z-score* obtido para as cadeias α (-9,6) e β (-10,18) e estruturas determinadas experimentalmente. O ponto preto indica o *z-score* das cadeias modeladas, as

regiões em azul claro indicam os valores típicos encontrados para estruturas determinadas por difração de Raios X e as regiões em azul escuro indicam os valores típicos encontrados para estruturas determinadas por NMR. Dados obtidos do servidor ProSA. 83

Figura 29 – *Score* médio 3D-1D por resíduo de aminoácido das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* obtida por modelagem por homologia. Obtido do servidor Verify_3D. 84

Figura 30 – Estrutura quaternária do modelo da tubulina do *P. falciparum*. A cadeia α está representada em amarelo e a cadeia β em ciano. São destacados os ligantes GTP, GDP e colchicina. 85

Figura 31 – Diagrama das estruturas secundárias das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* modelada. Adaptado do PDBsum. 86

Figura 32 – Estrutura tridimensional da tubulina do *P. falciparum* obtida por modelagem por homologia. As hélices alfa são representadas em vermelho e as fitas/folhas beta em ciano. Em destaque, os ligantes GTP, GDP e colchicina representados com superfície. 87

Figura 33 – A. Sobreposição entre a tubulina do *P. falciparum* modelada (vermelho) e a tubulina bovina experimental 4o2b (azul). As setas apontam para regiões de *loop* variáveis. B. Sobreposição do sítio de ligação da colchicina da tubulina modelada (átomos de carbono em verde) e da 4o2b (átomos de carbono em cinza). São mostrados os principais resíduos de aminoácido que compõem o sítio (todos da cadeia β), juntamente com a legenda (em vermelho para a tubulina do *P. falciparum* e em preto para a tubulina bovina). 88

Figura 34 – Diagramas das interações entre a colchicina e os resíduos de aminoácidos da tubulina do *P. falciparum* e da tubulina bovina (4o2b). Adaptado do PDBsum. 89

Figura 35 – A. Orientações obtidas para a colchicina no *redocking* na estrutura 4o2b. Os átomos de carbono da colchicina cristalográfica original estão representados em verde, enquanto que os átomos de carbono das colchicinas obtidas no *redocking* são representados em cinza. A linha pontilhada representa ligações de hidrogênio. B. Sítios de ligação da colchicina da 4o2b e da 1sa1 sobrepostos. Os carbonos alfa dos resíduos da 4o2b e das podofilotoxinas resultantes do *cross-docking* aparecem em verde, enquanto que os carbonos alfa da 1sa1, bem como de sua podofilotoxina cristalográfica complexada, aparecem em cinza. A Val318B na 4o2b é substituída pela Ile318B (legenda em vermelho) na 1sa1. 91

Figura 36 – Orientações obtidas no *docking* dos ligantes colchicina (átomos de carbono em amarelo), podofilotoxina (átomos de carbono em verde) e lignanas ariltetralônicas 1, 2, 3, 4, 5 e 6 (átomos de carbono em cinza) no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. A estrutura secundária da cadeia α da proteína é representada em amarelo e da cadeia β em ciano. Não são exibidos os átomos de hidrogênio. 93

Figura 37 – Orientações obtidas para a colchicina no *docking* (átomos de carbono em cinza) na tubulina do *P. falciparum* (estrutura secundária em amarelo) em comparação com a orientação da colchicina cristalográfica (átomos de carbono em verde) na tubulina bovina 4o2b (estrutura secundária em azul). Ligações de hidrogênio são representadas como linhas pontilhadas, enquanto que outros tipos de interações são representadas na forma de linhas contínuas. 94

Figura 38 – Principais interações entre a colchicina e resíduos de aminoácido do sítio de ligação da tubulina do *P. falciparum*. São exibidas as distâncias, em Å, entre os átomos envolvidos nas interações. Não são mostrados os átomos de hidrogênio. Para fins de comparação, os resíduos que são substituídos na 4o2b aparecem com os átomos de carbono em verde e legenda em vermelho. 95

- Figura 39** – A. Orientações obtidas para a podofilotoxina no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum* (*docking*, átomos de carbono em cinza), da tubulina bovina 4o2b (*cross-docking*, átomos de carbono em verde) e da tubulina bovina 1sa1 (cristalográfica, átomos de carbono em amarelo). Destaque para as interações C–H... π com a Leu246B e a ligação de hidrogênio com a Ser248B, substituída por Ala250B na proteína bovina. B. Outra visão das podofilotoxinas no sítio de ligação, mostrando as estruturas secundárias das tubulinas (*P. falciparum* em cinza, 4o2b em verde e 1sa1 em amarelo). Destaque para o resíduo Met316B na tubulina plasmodial, substituída por Ile318B na 4o2b e Val318B na 1sa1. 96
- Figura 40** – Interações entre a podofilotoxina e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. Os átomos de carbono da podofilotoxina são representados na cor verde. Não são exibidos átomos de hidrogênio. 97
- Figura 41** – Orientações obtidas para as lignanas ariltetralônicas 1, 2 e 3 no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*, em comparação com o obtido para a colchicina (átomos de carbono em amarelo) e para a podofilotoxina (átomos de carbono em verde) no mesmo sítio. A estrutura secundária da proteína também é representada. Destaque para as interações C–H... π com a Leu246B. 98
- Figura 42** – Interações entre o composto 1 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. 99
- Figura 43** – Interações entre o composto 2 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. 99
- Figura 44** – Interações entre o composto 3 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. 100
- Figura 45** – Interações exclusivas de 3 (carbonos em verde) em comparação com 1 e 2 (carbonos em amarelo), devido às diferenças na configuração dos estereocentros no anel B.... 101
- Figura 46** – Comparação do preenchimento do sítio pelo substituinte trimetóxi da podofilotoxina (carbonos em verde) e dos substituintes dimetóxi ou metilenodióxi das lignanas 1, 2 e 3 (carbonos em amarelo). São exibidos apenas os resíduos próximos a esta porção dos ligantes. Destaque para a interação C–H...O única da podofilotoxina com a Lys350 (linha contínua) e para as ligações de hidrogênio com a Ser248B obtidas para todos os ligantes. 102
- Figura 47** – Comparação da proximidade dos substituintes metila dos ligantes 2 (carbonos em verde) e 3 (carbonos em amarelo) com os resíduos Thr179A e Ala180A do sítio de ligação. Os átomos de hidrogênio são exibidos apenas para os ligantes. 103
- Figura 48** – Modo de ligação obtido para as lignanas 4 (carbonos em verde) e 6 (carbonos em amarelo) na tubulina do *P. falciparum*. São destacadas as ligações C–H... π que ocorrem com resíduos das duas cadeias da proteína. A estrutura secundária da cadeia α da tubulina é representada em dourado e da cadeia β em ciano. 104
- Figura 49** – Interações entre o composto 4 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. 105
- Figura 50** – Interações entre o composto 6 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. 105
- Figura 51** – Representação da proximidade entre as lignanas 4 (verde) e 6 (amarelo) e a Cys314B do sítio de ligação da tubulina do *P. falciparum*. 106
- Figura 52** – Modo de ligação obtido para a lignana 5 (verde) no sítio da tubulina do *P. falciparum*, em comparação com o obtido para a colchicina (amarelo) no mesmo sítio. São

destacadas as ligações C–H... π que ocorrem com resíduos da proteína. A estrutura secundária da cadeia α da tubulina é representada em dourado e da cadeia β em ciano..... 108

Figura 53 – Interações entre o composto 5 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. 108

LISTA DE TABELAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 – Data de introdução na prática clínica e primeiro relato de resistência aos principais fármacos antimaláricos. Adaptado de Wongsrichanalai et al. (2002) e Sinha, Medhi e Sehgal (2014)..... | 28 |
| Tabela 2 – Dados das sequências de aminoácidos selecionadas para a modelagem por homologia das cadeias α e β da tubulina do <i>P. falciparum</i> | 49 |
| Tabela 3 – Quantidade de compostos químicos obtidos nos bancos de dados a partir da busca por ligantes similares a cada uma das lignanas ariltetralônicas estudadas e à sua subestrutura (Fig. 11) | 61 |
| Tabela 4 – Principais ligantes obtidos, similares às lignanas ariltetralônicas, com alvo conhecido e atividade experimental determinada | 61 |
| Tabela 5 – Proteínas homólogas à cadeia α da tubulina do <i>P. falciparum</i> obtidas no BLAST e FASTA para a sequência Q7KQL5 | 67 |
| Tabela 6 – Proteínas homólogas à cadeia β da tubulina do <i>P. falciparum</i> obtidas no BLAST e FASTA para a sequência Q6ZLZ9..... | 68 |
| Tabela 7 – Relação das estruturas experimentais das tubulinas depositadas no PDB | 70 |
| Tabela 8 – Scores obtidos para os modelos gerados pelo MODELLER v9.14 | 79 |
| Tabela 9 – IC ₅₀ e IC ₉₀ das lignanas ariltetralônicas testadas no <i>P. falciparum</i> isolado BH26/86. Adaptado de Andrade-Neto et al. (2007)..... | 90 |
| Tabela 10 – Scores obtidos durante o <i>redocking</i> (colchicina) e <i>cross-docking</i> (podofilotoxina) na 4o2b | 91 |
| Tabela 11 – Scores obtidos durante o <i>docking</i> no sítio de ligação da colchicina da tubulina do <i>P. falciparum</i> obtida por modelagem por homologia | 93 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1sa1 | Código da estrutura da tubulina bovina depositada no PDB, contendo o ligante podofilotoxina |
| 4o2b | Código da estrutura da tubulina bovina (molde) depositada no PDB, contendo o ligante colchicina |
| ACTs | Terapias combinadas à base de artemisinina (<i>artemisinin-based combination therapies</i>) |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| GDP | Guanosina difosfato |
| GOLD | <i>Genetic Optimisation for Ligand Docking</i> |
| GTP | Guanosina trifosfato |
| molpdf | <i>molecular PDF</i> |
| NCBI | <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NMR | Ressonância magnética nuclear |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| <i>P. falciparum</i> | <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PDB | <i>Protein Data Bank</i> |
| PfTu | Dímero (cadeia α + cadeia β) da tubulina do <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfTuA | Cadeia α da tubulina do <i>Plasmodium falciparum</i> |
| PfTuB | Cadeia β da tubulina do <i>Plasmodium falciparum</i> |
| ProSA | <i>Protein Structure Analysis</i> |
| Q6ZLZ9 | Código da cadeia alfa da tubulina do <i>Plasmodium falciparum</i> no UniProtKB/TrEMBL |
| Q7KQL5 | Código da cadeia beta da tubulina do <i>Plasmodium falciparum</i> no UniProtKB/TrEMBL |
| RMSD | <i>Root-mean-square deviation</i> |
| SMILES | <i>Simplified Molecular Input Line Entry System</i> |
| UniProt | <i>Universal Protein Research</i> |

| Códigos de três letras e de uma letra dos aminoácidos | | |
|--------------------------------------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| Aminoácido | Código de três letras | Código de uma letra |
| Alanina | Ala | A |
| Arginina | Arg | R |
| Asparagina | Asn | N |
| Ácido aspártico | Asp | D |
| Ácido glutâmico | Glu | E |
| Cisteína | Cys | C |
| Glicina | Gly | G |
| Glutamina | Gln | Q |
| Histidina | His | H |
| Isoleucina | Ile | I |
| Leucina | Leu | L |
| Lisina | Lys | K |
| Metionina | Met | M |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Prolina | Pro | P |
| Serina | Ser | S |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Treonina | Thr | T |
| Triptofano | Trp | W |
| Valina | Val | V |

| Nomenclatura das lignanas ariltetralônicas | |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| Lignana | Nomenclatura |
| 1 | (7'R,8S,8'R)-4,5-Dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-2,7'-ciclolignan-7-ona |
| 2 | (7'R,8S,8'R)-3',4,4',5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona |
| 3 | (7'R,8R,8'S)-3',4,4',5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona |
| 4 | (7'R,8S,8'S)-3',4,4',5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona |
| 5 | (7'R,8S,8'S)-3',4'-Dimetoxi-4,5-metilenodioxi-2,7'-ciclolignan-7-ona |
| 6 | (7'R,8S,8'S)-4,5-Dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-2,7'-ciclolignan-7-ona |

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Revisão Bibliográfica | 19 |
| 1.1.1 A Malária | 19 |
| 1.1.1.1 Estimativas recentes do número de casos e mortes | 19 |
| 1.1.1.2 Transmissão e ciclo de vida do <i>P. falciparum</i> | 22 |
| 1.1.1.3 Sintomas da malária | 24 |
| 1.1.1.4 Tratamento e surgimento da resistência aos fármacos atuais | 25 |
| 1.1.2 Planejamento Racional de Fármacos | 29 |
| 1.1.2.1 Modelagem molecular por homologia | 31 |
| 1.1.2.2 Docking molecular | 35 |
| 1.1.3 Os Ligantes – As Lignanas Ariltetralônicas | 36 |
| 1.1.4 O Alvo – A Tubulina do <i>P. falciparum</i> | 38 |
| 1.2 Objetivos | 41 |
| 2. DESENVOLVIMENTO | 42 |
| 2.1 Materiais e Métodos | 42 |
| 2.1.1 Programas (<i>softwares</i>) utilizados | 42 |
| 2.1.2 Modelagem Molecular dos Ligantes | 43 |
| 2.1.3 Pesquisa em Bancos de Dados | 43 |
| 2.1.4 Modelagem Molecular por Homologia da Tubulina do <i>P. falciparum</i> | 49 |
| 2.1.5 <i>Docking</i> | 57 |
| 2.2 Resultados e Discussão | 59 |
| 2.2.1 A Estrutura Tridimensional das Lignanas Ariltetralônicas | 59 |
| 2.2.2 A Identificação do Alvo Biológico | 60 |
| 2.2.3 A Estrutura Tridimensional da Tubulina do <i>P. falciparum</i> | 64 |
| 2.2.3.1 <i>Proteínas homólogas à tubulina do P. falciparum</i> | 65 |
| 2.2.3.2 <i>Escolha do molde</i> | 69 |
| 2.2.3.3 <i>Alinhamento sequencial alvo-molde</i> | 76 |
| 2.2.3.4 <i>A construção do modelo por modelagem por homologia</i> | 78 |
| 2.2.3.5 <i>Avaliação do modelo obtido</i> | 80 |
| 2.2.3.6 <i>O modelo final da tubulina do P. falciparum</i> | 84 |
| 2.2.4 Predição do Mecanismo de Ação das Lignanas Ariltetralônicas Antiplasmódias | 89 |
| 2.2.4.1 <i>Redocking e cross-docking na tubulina bovina 4o2b</i> | 90 |
| 2.2.4.2 <i>Docking das lignanas ariltetralônicas, colchicina e podofilotoxina na tubulina do P. falciparum</i> | 92 |

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------|------------|
| 2.2.4.2.1 | Colchicina e podofilotoxina | 93 |
| 2.2.4.2.2 | Lignanas ariltetralônicas 1, 2 e 3 | 97 |
| 2.2.4.2.3 | Lignanas ariltetralônicas 4 e 6..... | 102 |
| 2.2.4.2.4 | Lignana ariltetralônica 5 | 106 |
| 3. | RESUMO E CONCLUSÕES..... | 109 |
| | REFERÊNCIAS | 113 |
| | APÊNDICE – Interações proteína-ligantes | 132 |

1. INTRODUÇÃO

Este trabalho se insere nas linhas de pesquisa do BioMat – Grupo de Física Teórica de Materiais e Biomoléculas do Departamento de Física – e foi desenvolvido em conjunto com o LaCrEMM – Laboratório de Cristalografia, Estereodinâmica e Modelagem Molecular do Departamento de Química –, ambos da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, onde têm sido desenvolvidos estudos com foco na determinação e/ou análise das estruturas tridimensionais e de interações intermoleculares. O estudo na área de doenças negligenciadas nestes grupos de pesquisa se iniciou com o problema da enfermidade de Chagas (PAULINO et al., 2002; VEGA-TEIJIDO, CARACELLI e ZUKERMAN-SCHPECTOR, 2006). Outro problema abordado tem sido o da malária. Neste caso, foram realizados estudos cristalográficos sobre compostos com atividade antimalárica, como por exemplo em Constantino et al. (1996). No BioMat, estudos de *docking* permitiram avaliar os complexos de possíveis inibidores com alvos biológicos (CORRÊA, 2007; RODRIGUES, 2008; CORRÊA, 2010), apoiados com Bolsa FAPESP (projetos IC: 2005/02775-3, IC: 2005/01338-9, MS: 2007/06125-9). Em 2009, o LaCrEMM e o BioMat receberam o apoio da CAPES (processo 808/2009: ReN²AMeD – Rede Nacional de Nanobiotecnologia Aplicada à Medicina e à Defesa), para o desenvolvimento do projeto “Desenvolvimento de agentes terapêuticos para biodefesa e desenvolvimento de novos e mais efetivos medicamentos para o tratamento de doenças negligenciadas tais com malária, enfermidade de Chagas, dengue e febre amarela”.

Esta tese está organizada em três capítulos: *Introdução*, *Desenvolvimento* e *Resumo e Conclusões*.

Neste capítulo de *Introdução* será apresentada uma revisão bibliográfica sobre o problema que deu origem à pesquisa e a forma de abordagem ao mesmo. Assim, será apresentado um panorama geral a respeito da malária – número de casos, forma de transmissão e tratamento – e do planejamento racional de fármacos, com destaque para as duas principais técnicas utilizadas neste trabalho – a modelagem molecular por homologia e o *docking* molecular. Após a abordagem das técnicas utilizadas, são discutidos os ligantes e o alvo biológico selecionados para a pesquisa: as lignanas ariltetralônicas com atividade antiplasmodial conhecida e a proteína tubulina do *Plasmodium falciparum*, respectivamente. Ao final do capítulo, é apresentado o objetivo do trabalho.

O capítulo de *Desenvolvimento* está dividido em duas partes. Na primeira, serão apresentados os materiais e métodos utilizados no trabalho: a modelagem molecular das lignanas

ariltetralônicas; a pesquisa em bancos de dados por ligantes estruturalmente semelhantes para a identificação do alvo molecular; a modelagem molecular por homologia da tubulina do *P. falciparum*; o *docking* molecular das lignanas ariltetralônicas no sítio de ligação da colchicina da proteína modelada. Já na segunda parte, serão apresentados os resultados obtidos a partir dos materiais e métodos empregados, bem como a discussão destes resultados.

Em *Resumo e Conclusões* será retomada a ideia principal do trabalho e consolidados os resultados obtidos, relacionando-os com os objetivos inicialmente estabelecidos. Após este capítulo há um apêndice onde estão listadas todas as interações intermoleculares dos complexos proteína-ligante apresentados ao longo do trabalho. Ao final, encontram-se as referências bibliográficas.

1.1 Revisão Bibliográfica

1.1.1 A Malária

A malária é uma doença febril aguda causada por protozoários parasitas pertencentes ao gênero *Plasmodium* e transmitida por meio da picada de mosquitos infectados do gênero *Anopheles*. Quatro espécies – *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie* e *P. ovale* – são responsáveis por quase todas as infecções humanas, sendo a espécie *P. falciparum* a responsável pela maioria das formas severas e mortes pela doença (WHO, s.d.; MAITLAND, BEJON e NEWTON, 2003; GREENWOOD et al., 2005; CRAWLEY et al., 2010; PRADO et al., 2014; WORLD MALARIA REPORT, 2014).

Os primeiros sintomas da doença incluem febre, dor de cabeça e vômitos e costumam aparecer entre 10 e 15 dias após a picada. Se não tratada, pode progredir para uma doença severa e levar à morte (WHO, s.d.; MAITLAND, BEJON e NEWTON, 2003; PRADO et al., 2014). Entretanto, em diversas partes do mundo os parasitas causadores da malária desenvolveram resistência aos fármacos utilizados para combatê-la (WHO, s.d.).

1.1.1.1 Estimativas recentes do número de casos e mortes

Estima-se, atualmente, que 3,2 bilhões de pessoas em 97 países ao redor do mundo estejam sob o risco de serem infectadas com o parasita e desenvolverem a malária. Deste total, 1,2 bilhão encontra-se sob alto risco, ou seja, com chance maior do que uma em mil de

contrair a doença no período de um ano (WORLD MALARIA REPORT, 2014). Aproximadamente metade da população mundial vive em regiões onde a malária é endêmica (BOUSEMA et al., 2014).

De acordo com as estimativas mais recentes, no ano de 2013 ocorreram cerca de 198 milhões de casos de malária no mundo (Fig. 1). Dentre esses casos, a doença levou a aproximadamente 584.000 mortes (Fig. 2), sendo 78% destas entre crianças com menos de cinco anos de idade (WORLD MALARIA REPORT, 2014).

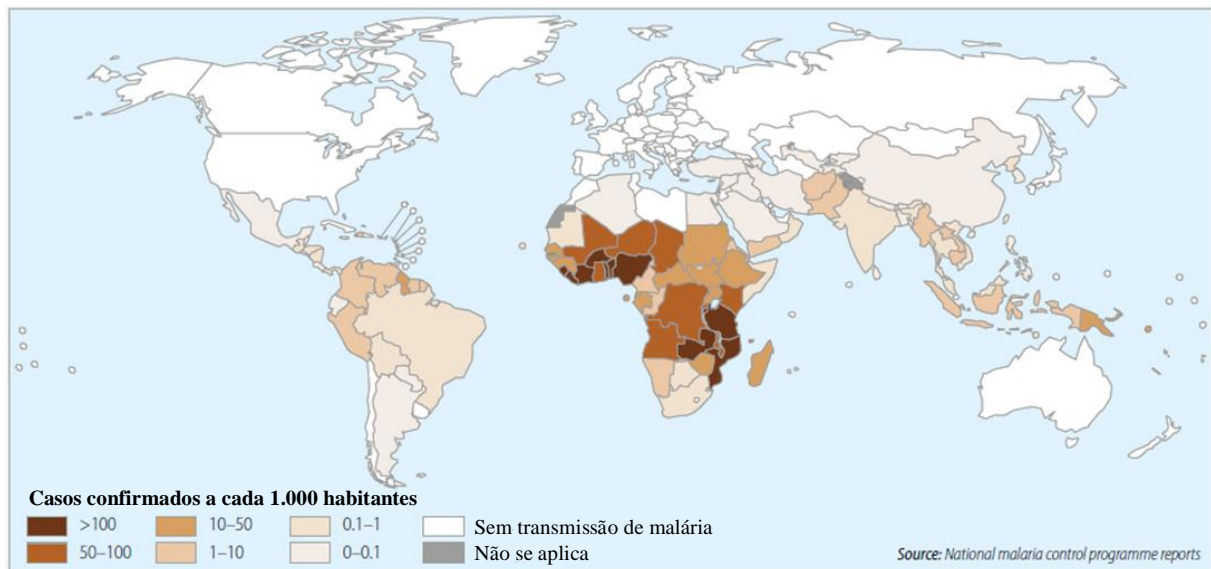


Figura 1 – Mapa com o panorama global de transmissão da malária – casos confirmados a cada 1.000 habitantes. Dados de 2013, adaptado de *World Malaria Report* (2014).

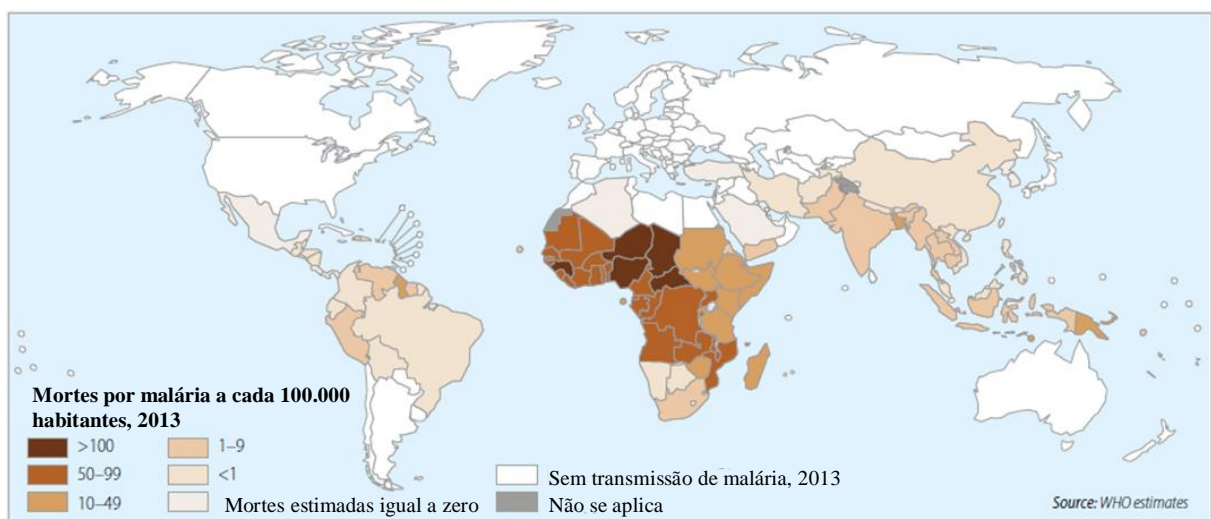


Figura 2 – Mapa com o panorama global de mortes por malária a cada 100.000 habitantes. Dados de 2013, adaptado de *World Malaria Report* (2014).

Como os sistemas de vigilância de alguns países não registram todos os casos e mortes por malária, os dados reportados à Organização Mundial da Saúde (OMS ou WHO – *World Health Organization*) por algumas regiões não são confiáveis e, portanto, é necessário estimar estas ocorrências para se chegar aos números globais apresentados (WORLD MALARIA REPORT, 2014). Estas estimativas feitas pela OMS dependem de estatísticas nacionais derivadas da detecção passiva de casos. Comparações demonstraram, por exemplo, que a escala de subnotificação por detecção passiva variou de uma diferença de três vezes no Brasil para até uma diferença de 1000 vezes no Paquistão (SNOW et al., 2005).

Avaliar com precisão o impacto da malária é difícil, uma vez que a maioria das mortes pela doença ocorre dentro das residências. Além disso, diversas outras doenças febris em áreas endêmicas apresentam sintomas semelhantes à malária e um diagnóstico parasitológico confirmatório geralmente ou não está disponível, ou não é confiável/imediato, especialmente em zonas rurais (BREMAN, 2001; GREENWOOD e MUTABINGWA, 2002). Com isso, estima-se que menos de 20% dos casos e mortes chegam ao conhecimento dos sistemas de saúde e, portanto, os efeitos debilitantes agudos e crônicos da doença acabam não sendo corretamente quantificados (BREMAN, 2001).

Com relação ao continente americano, estima-se que cerca de 120 milhões de pessoas em 21 países apresentam o risco de contrair malária, das quais 25 milhões encontram-se sob alto risco. Neste continente, o número de casos confirmados da doença em 2013 foi de aproximadamente 427.000. Somente no Brasil, as estimativas apontam que em 2013 mais de 40 milhões de pessoas estavam sob risco de contrair a doença, sendo mais de 4,5 milhões sob alto risco. Neste mesmo ano houveram 1.893.018 casos suspeitos no país, com 178.546 casos confirmados (Fig. 3) – 29.201 devido ao *P. falciparum* – e 41 mortes atribuídas à malária (WORLD MALARIA REPORT, 2014).

A cada ano, cerca de 25-30 milhões de viajantes de regiões não tropicais visitam países onde a malária é endêmica. Com isso, foram registrados cerca de 10.000 casos importados da doença em países ditos industrializados (PRADO et al., 2014), de modo que a malária representa a causa mais comum de infecções importadas sérias em áreas não-endêmicas. Aproximadamente 10% dos pacientes com malária importada decorrente do *P. falciparum* desenvolvem a forma severa da doença (MARKS et al., 2014), sendo a taxa de mortalidade aproximadamente 1% para estes casos (MARKS et al., 2014; PRADO et al., 2014).

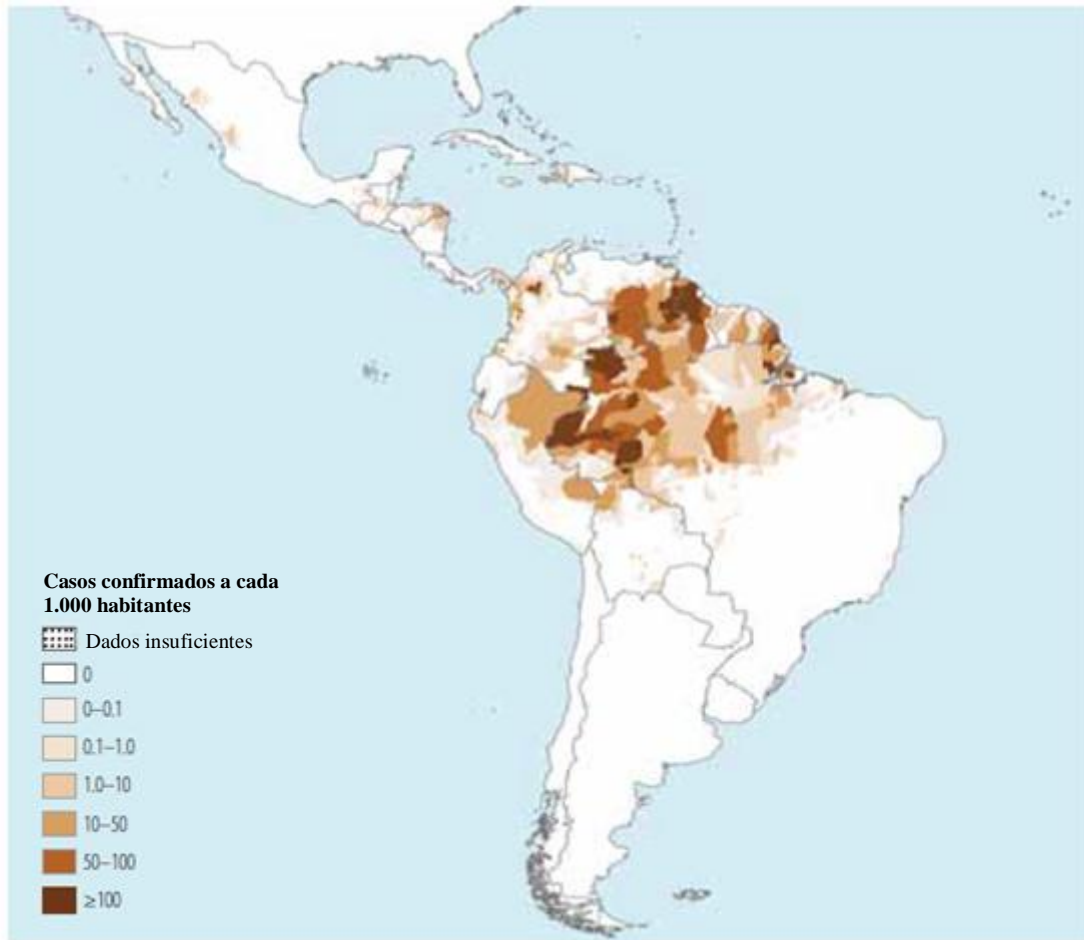


Figura 3 – Mapa com o panorama de transmissão da malária no continente americano – casos confirmados a cada 1.000 habitantes. Dados de 2013, adaptado de *World Malaria Report* (2014).

1.1.1.2 Transmissão e ciclo de vida do *P. falciparum*

Os parasitas do gênero *Plasmodium* apresentam um ciclo de vida complexo que envolve a transmissão entre um vetor (mosquito) e um hospedeiro (homem), bem como estágios de desenvolvimento sexuado e assexuado (BOUSEMA et al., 2014). Este ciclo está representado na Figura 4.

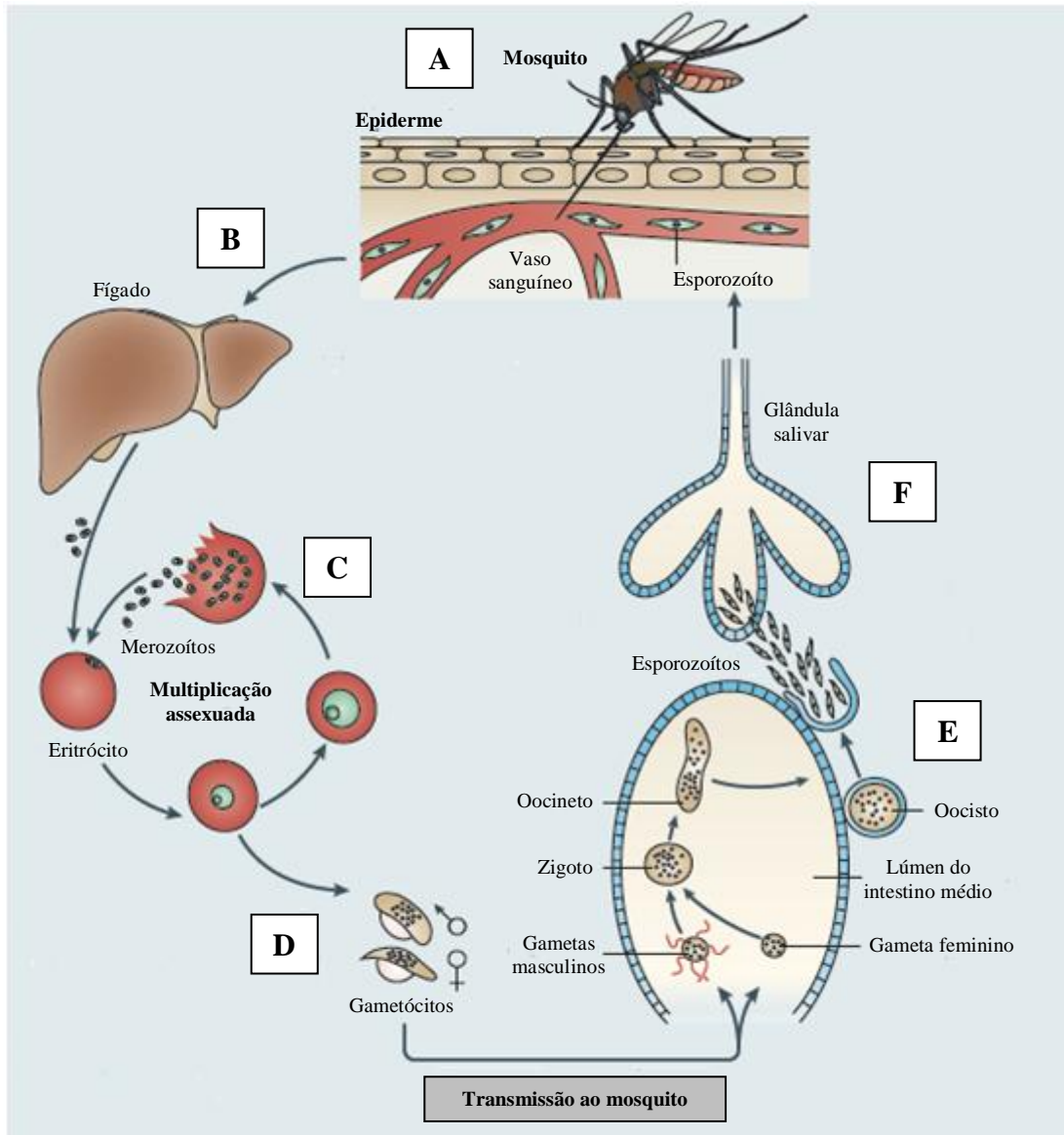


Figura 4 – Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. **A** – injeção de esporozoítos no hospedeiro. **B** – invasão dos esporozoítos nos hepatócitos e posterior formação dos merozoítos. **C** – multiplicação assexuada dos merozoítos nos eritrócitos. **D** – diferenciação de parte dos merozoítos assexuados em gametócitos sexuais. **E** – fusão entre o macrogameta feminino e o microgameta masculino, formando o zigoto, com posterior desenvolvimento em oocisto. **F** – migração dos esporozoítos para a glândula salivar do mosquito, de onde poderá infectar novos indivíduos. Adaptado de Bousema et al., 2014.

Geralmente, a infecção do hospedeiro humano inicia-se com a injeção de esporozoítos pela fêmea infectada de mosquitos do gênero *Anopheles* (A Fig. 4). Estes esporozoítos então são carregados pelo sangue para vários órgãos e tecidos do corpo; no fígado, invadem os hepatócitos e se multiplicam assexuadamente, formando dezenas de milhares de merozoítos por esporozoíto (B Fig. 4) (SHERMAN, 1979; MILLER et al., 2002; BOUSEMA et al., 2014) – estágio conhecido como desenvolvimento pré-eritrocítico. Para a espécie *P. falciparum* esta fase pré-eritrocítica é curta e os merozoítos são liberados na corrente sanguínea

após 6 a 8 dias, onde podem invadir os eritrócitos e iniciar um ciclo de multiplicação assexuada (BOUSEMA et al., 2014). No interior da célula sanguínea cada parasita cresce e se divide assexuadamente, produzindo um grande número de novos merozoítos; isto ocasiona a lise celular do eritrócito, liberando os merozoítos no sangue e possibilitando nova invasão de células sanguíneas (C Fig.4) – este desenvolvimento sincronizado da fase assexuada e a ruptura dos eritrócitos pelo parasita são marcados por ciclos periódicos de febre alta, que são a marca registrada das infecções por malária (SHERMAN, 1979; MARKS et al., 2014).

Uma parte dos merozoítos assexuados liberados se diferencia em estágios sexuados chamados de gametócitos (D Fig.4), os quais são a única forma do parasita capaz de ser transmitida do homem para os mosquitos vetores (SHERMAN, 1979; MILLER et al., 2002; BOUSEMA et al., 2014). Os gametócitos imaturos são sequestrados na medula óssea e apenas as formas maduras circulam no sangue periférico. Para o *P. falciparum*, o processo de amadurecimento do gametócito na medula óssea leva de 10 a 12 dias e os gametócitos maduros liberados no sangue periférico persistem na circulação por cerca de três a seis dias e meio. Durante este período, os gametócitos maduros podem ser “captados” pela fêmea do *Anopheles* ao se alimentar do sangue humano. Com isso, o mosquito torna-se apto a transmitir a infecção para o próximo indivíduo hospedeiro (BOUSEMA et al., 2014).

Após a ingestão pelo *Anopheles*, cada gametócito pode formar um macrogameta feminino ou até oito microgametas masculinos. No intestino do inseto ocorre a fusão dos gametas, produzindo um zigoto que se desenvolve em um oocineto móvel, que pode penetrar na parede do intestino e formar oocistos. Os gametócitos são, portanto, vitais à manutenção do ciclo de transmissão da malária. Dentro dos oocistos, milhares de esporozoítos são produzidos por multiplicação assexuada; após amadurecerem, o oocisto se rompe e os novos esporozoítos são liberados (E Fig.4). Os esporozoítos então migram para a glândula salivar do mosquito, de onde podem infectar os humanos durante a próxima refeição, completando o ciclo de vida do *P. falciparum* (F Fig.4) (SHERMAN, 1979; DRAKELEY et al., 2006; BOUSEMA et al., 2014; MARKS et al., 2014).

1.1.1.3 Sintomas da malária

As infecções por malária podem resultar em uma parasitemia assintomática, em malária clínica ou não complicada, malária severa e, por fim, levar à morte. Pode representar uma doença febril aguda (com danos cerebrais, anemia, dificuldade de respirar, hipoglicemia), trazer debilitação crônica (anemia, subnutrição, sequelas relacionadas ao sistema nervoso) e

complicações na gravidez (anemia, baixo peso ao nascimento, aumento na mortalidade infantil) (BREMAN, 2001).

A malária não complicada se apresenta como uma doença febril, com sintomas como dor de cabeça, dor muscular, vômitos, além da própria febre. Se não tratada, pode se desenvolver para a forma severa da doença (VAN VUGT et al., 2011).

A malária severa, por sua vez, é uma desordem que afeta diversos órgãos e tecidos e apresenta altos níveis de parasitemia. Geralmente se manifesta por um ou mais dos seguintes sintomas: acidose metabólica (com dificuldade para respirar), anemia severa, hipoglicemia, falência renal aguda e coma (na chamada malária cerebral) (MAITLAND, BEJON e NEWTON, 2003; VAN VUGT et al., 2011; PRADO et al., 2014). A acidose metabólica, geralmente profunda, tem sido reconhecida como a característica patofisiológica principal das síndromes clínicas clássicas da malária cerebral e anemia malárica severa. Além disso, uma das características do metabolismo do *P. falciparum* é sua habilidade em fazer as células sanguíneas infectadas se aderirem às paredes de pequenos vasos sanguíneos – isto pode causar a obstrução dos vasos e interromper a transmissão de sangue aos tecidos. Estes processos gerais afetam muitos tecidos, porém também podem focar em órgãos específicos em certas situações, como por exemplo no cérebro, na chamada malária cerebral, ou então na placenta, durante a malária na gravidez (MILLER et al., 2002). Sem um tratamento rápido e apropriado, pode progredir para a morte do paciente (VAN VUGT et al., 2011).

1.1.1.4 Tratamento e surgimento da resistência aos fármacos atuais

Nos últimos anos, o aumento do uso de redes tratadas com inseticidas nas residências, pulverizações no interior das casas e o tratamento rápido dos pacientes com terapias combinadas à base de artemisinina (*artemisinin-based combination therapies* ou ACTs) tem levado a um progresso na redução da mortalidade causada pelo *P. falciparum*. Com isso, existe atualmente um grande interesse na possibilidade de eliminação da doença. O grande obstáculo, no entanto, tem sido a habilidade do parasita em desenvolver resistência aos fármacos antimaláricos (CRAWLEY et al., 2010).

Durante boa parte do século 20, a malária foi tratada com os agentes cloroquina e pirimetamina-sulfadoxina, fármacos baratos e de ação rápida (FIDOCK, 2010). A cloroquina foi utilizada por muitas décadas devido a sua segurança, eficácia e baixo custo (SINHA, MEDHI e SEHGAL, 2014). A partir da década de 1960, no entanto, ocorreu o aparecimento e propagação da resistência a estes medicamentos em diversas partes do mundo (FIDOCK, 2010). Desde os

primeiros relatos de *P. falciparum* resistentes à cloroquina no sudeste da Ásia e na América do Sul há mais de 50 anos atrás, esta resistência aos fármacos tem sido um dos maiores problemas no controle da malária. Ao longo dos anos já foram relatadas, por exemplo, resistências à quinina, proguanil, mefloquina e atovaquona, além da própria cloroquina e pirimetamina-sulfadoxina já citadas (WONGSRICHANALAI et al., 2002; YEH, et al., 2004; KOKWARO, 2009). Esta crescente resistência aos tratamentos convencionais contra a doença se tornou uma grande preocupação, particularmente em países menos desenvolvidos, uma vez que estes antimaláricos eram facilmente acessíveis e, agora, estes países podem não serem capazes de adquirir agentes antimaláricos mais modernos e efetivos (MAITLAND, BEJON e NEWTON, 2003; KOENDERINK et al., 2010; VAN VUGT et al., 2011).

Atualmente, apenas um pequeno número de antimaláricos ainda eficazes está disponível e uma terapia contendo uma combinação de fármacos com diferentes modos de ação passou a ser a abordagem preferencial para o tratamento de malária, a fim de se inibir a emergência e disseminação de parasitas resistentes a um dos componentes da combinação. Isto levou a OMS a recomendar as ACTs para a maioria dos países que sofrem da doença causada pelo *P. falciparum*, de modo a assegurar um tratamento eficaz e prevenir um futuro surgimento de resistência (GREENWOOD et al., 2005; KOENDERINK et al., 2010; VAN VUGT et al., 2011; WORLD MALARIA REPORT, 2014). No final de 2013, as ACTs foram adotadas como política nacional para tratamento da malária em 79 dos 88 países onde o *P. falciparum* é endêmico. Enquanto isso, a cloroquina continua a ser utilizada em 10 países da América Central, onde ainda permanece eficaz (WORLD MALARIA REPORT, 2014). O maior obstáculo para o uso em larga escala das ACTs passou a ser seu custo: são até dez vezes mais caras do que as monoterapias atuais (GREENWOOD et al., 2005). A Figura 5 reúne alguns dos antimaláricos disponíveis atualmente.

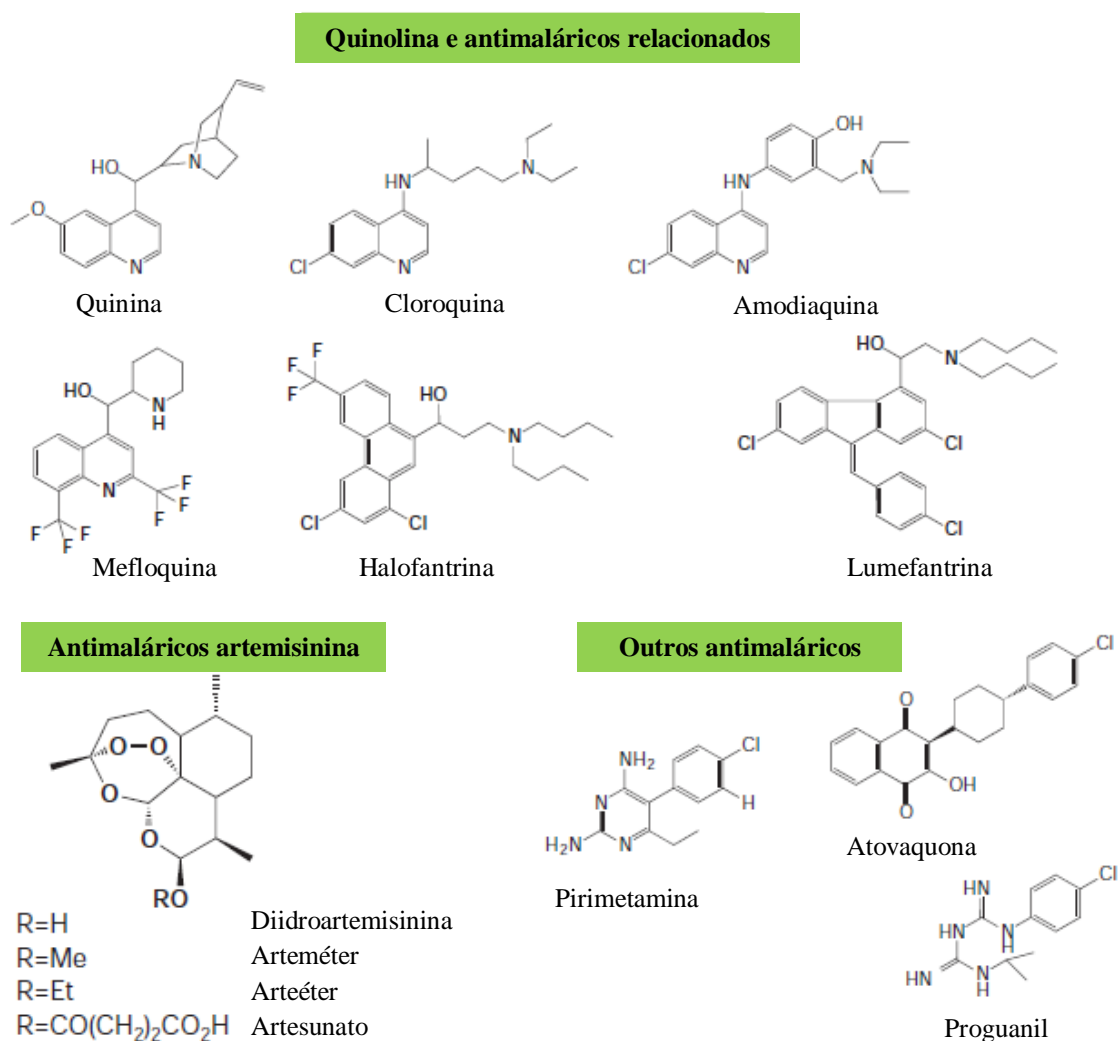


Figura 5 – Representação de alguns dos antimaláricos atualmente disponíveis. Adaptado de Ridley (2002).

Apesar do grande progresso nos últimos anos em se reduzir a taxa de mortalidade por malária devido a, entre outros fatores, introdução das ACTs, a confirmação da resistência à artemisinina pelo *P. falciparum* ameaça o sucesso obtido até o momento (VAN VUGT et al., 2011; SINHA, MEDHI e SEHGAL, 2014). Testes de susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* relataram a resistência a derivados de artemisinina (KOENDERINK et al., 2010). Também foi evidenciada a sobrevivência de alguns parasitas, mesmo após a administração de ACTs, próximo à fronteira entre a Tailândia e o Camboja (FIDOCK, 2010). Portanto, até mesmo a classe mais recente de fármacos eficientes, a das artemisininas, está comprometida pelo surgimento de cepas de *P. falciparum* com reduzida resposta clínica às combinações de medicamentos contendo esta classe de compostos (GAMO et al., 2010). Estudos de eficácia de fármacos detectaram resistência do *P. falciparum* às artemisininas em cinco países: Camboja, República Democrática Popular Lao, Mianmar, Tailândia e Vietnã. Em muitas áreas ao longo da fronteira Camboja-Tailândia, o

parasita *P. falciparum* se tornou resistente à maioria dos fármacos antimaláricos disponíveis (WORLD MALARIA REPORT, 2014). Com isso, a perspectiva de surgimento de resistência aos antimaláricos atuais ainda permanece (FIDOCK, 2010). A Tabela 1 apresenta a data de introdução na prática clínica e primeiro relato de resistência aos principais fármacos antimaláricos.

Tabela 1 – Data de introdução na prática clínica e primeiro relato de resistência aos principais fármacos antimaláricos. Adaptado de Wongsrichanalai et al. (2002) e Sinha, Medhi e Sehgal (2014)

| Fármaco antimalárico | Data de introdução | Primeiro relato de resistência |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Quinina | 1632 | 1910 |
| Proguanila | 1948 | 1949 |
| Cloroquina | 1945 | 1957 |
| Sulfadoxina-pirimetamina | 1967 | 1967 |
| Mefloquina | 1977 | 1982 |
| Halofantrina | 1988 | 1993 |
| Atovaquona | 1996 | 1996 |
| Artemisinina | 1971 | 1980 |
| Artesunato | 1975 | 2008 |
| Artesunato + mefloquina | 2000 | 2009 |

Esta resistência cada vez mais disseminada do *P. falciparum* a muitos fármacos antimaláricos diferentes, a dependência dos novos medicamentos às combinações com a artemisinina – para a qual a resistência também já surgiu – e os esforços mais recentes para se erradicar a malária colocam em evidência a necessidade de se desenvolver novos, eficientes e mais baratos agentes quimioterápicos, de preferência com novos mecanismos de ação (OLLIARO, 2001; RIDLEY, 2002; SARMA et al., 2003; OLLIARO e TAYLOR, 2008; DONDORP et al., 2009; GUIGUEMDE et al., 2010).

Atualmente, os antimaláricos atuam sobre um número limitado de alvos biológicos. Além disso, nenhuma nova classe química de antimaláricos foi introduzida na prática clínica desde 1996. Portanto, o próximo desafio é identificar novas classes de fármacos que irão atacar novos alvos moleculares (SINHA, MEDHI e SEHGAL, 2014). Para isso, é necessário aumentar nosso entendimento do “espaço químico” que pode ser trazido para o tratamento da malária. Resolver este problema requer o entendimento das relações entre a estrutura dos compostos ativos contra os parasitas causadores da malária e sua potência, seletividade e alvos

(GUIGUEMDE et al., 2010). Uma das abordagens possíveis para se identificar estes novos compostos é por meio da estratégia de planejamento racional de fármacos.

1.1.2 Planejamento Racional de Fármacos

Os fármacos são, em sua maioria, pequenas moléculas que tem a capacidade de se ligarem a uma proteína, modulando sua função. Desta forma, os métodos computacionais que permitem extrair informações contidas na estrutura tridimensional de um alvo protéico e/ou de complexos ligante-alvo – e que também permitem prever a afinidade de ligação da pequena molécula à proteína – tornaram-se centrais à nova estratégia de desenvolvimento de medicamentos: o planejamento racional de fármacos (JOSEPH-McCARTHY, 1999; GÜNTHER et al., 2003; JORGENSEN, 2010; HUNG e CHEN, 2014).

Tradicionalmente, fármacos eram descobertos por meio de tentativa e erro, sendo um processo trabalhoso, caro e demorado. Em um passado não tão distante, os efeitos dos fármacos nas doenças eram conhecidos apenas por meio de observações empíricas. Entretanto, dado o atual grande número de moléculas orgânicas conhecidas, este processo não poderia ficar reduzido ao simples método de “sintetizar e testar”. Sendo assim, um dos objetivos da pesquisa em biotecnologia tornou-se transformar o processo de desenvolvimento de um novo fármaco de uma operação empírica de tentativa e erro em um processo racional, baseado na estrutura tridimensional do alvo que se quer “atingir”. Isto reduziria significativamente tanto o tempo quanto os custos envolvidos na descoberta e otimização de compostos líderes e, conseqüentemente, no desenvolvimento de agentes farmacológicos promissores. E é neste contexto em que o planejamento racional de fármacos baseado na estrutura do receptor se insere, representando atualmente uma tecnologia bem estabelecida e uma ferramenta essencial em pesquisas pré-clínicas – as maiores companhias farmacêuticas e de biotecnologia do mundo utilizam ferramentas computacionais nesta etapa da pesquisa (RICHARDS, 1994; AMZEL, 1998; FARBER, 1999; DAVIS, TEAGUE e KLEYWEGT, 2003; GÜNTHER et al., 2003; SINGH, MALIK e SHARMA, 2006; MANDAL, MOUDGIL e MANDAL, 2009; JORGENSEN, 2010; GRINTER e ZOU, 2014; HUNG e CHEN, 2014).

O planejamento racional de fármacos visa utilizar o conhecimento do alvo biológico de interesse para se otimizar o processo de encontrar novos medicamentos (GRINTER e ZOU, 2014). Para se ter uma ideia, o chamado “espaço químico”, ou número total de moléculas orgânicas pequenas possíveis, é estimado em mais de 10^{60} . Isso significa que ao tentar desenvolver novas moléculas do “zero”, iremos nos deparar com quase infinitas possibilidades.

Portanto, a pesquisa de novos ligantes deve se restringir àqueles que apresentem certas características espaciais e eletrônicas que lhes permitam se ligar a uma proteína alvo de forma favorável (CAIN et al, 2014).

No planejamento racional de fármacos baseado em estrutura alguns passos são necessários, tais como:

- identificar uma macromolécula alvo que esteja envolvida com o problema em questão, baseado no conhecimento do metabolismo do organismo em estudo;
- determinar a estrutura tridimensional desta macromolécula, o que pode ser feito principalmente por meio de cristalografia de Raios X, ressonância magnética nuclear (NMR) ou modelagem molecular por homologia;
- simular o encaixe de ligantes a esta macromolécula utilizando ferramentas computacionais, possibilitando o estudo da estrutura do complexo formado e a caracterização dos tipos de interações entre as moléculas – um destes métodos é o *docking* molecular;
- estimar a afinidade destes ligantes ao alvo – também uma das finalidades dos *softwares* de *docking*;
- identificar um possível composto líder;
- planejar possíveis melhorias neste composto a partir resultados obtidos nas simulações (AMZEL, 1998; FARBER, 1999; JOSEPH-McCARTHY, 1999; LYNE, 2002; WIEMAN et al., 2004).

Neste tipo de planejamento, a estrutura do complexo ligante-alvo é utilizada para se aperfeiçoar o desenho de novos compostos, na esperança de se alcançar uma afinidade maior; o objetivo do planejamento baseado na estrutura do receptor, portanto, é se otimizar a potência de um dado ligante, melhorando suas propriedades e reduzindo os efeitos colaterais e toxicidade. Sendo assim, o estudo *in silico* permite identificar as melhores direções para a futura síntese de novos compostos bioativos, mais específicos – seleciona-se apenas um pequeno subgrupo de compostos mais promissores para ser sintetizado e testado experimentalmente. Além disso, permite ainda obter respostas mais rápidas quanto à eficácia e segurança de novos ligantes, uma vez que busca desenvolver compostos que se liguem fortemente a sítios receptores específicos, de modo que possam exercer seu efeito biológico em doses mais baixas e de forma seletiva à proteína alvo (AMZEL, 1998; FARBER, 1999; JOSEPH-McCARTHY, 1999; LYNE, 2002; DAVIS, TEAGUE e KLEYWEGT, 2003; SINGH, MALIK e SHARMA, 2006; SCHLOSSER e

RAREY, 2009; JORGENSEN, 2010; BHARATH, MANJULA e VIJAYCHAND, 2011; HUNG e CHEN, 2014; SLIWOSKI et al., 2014).

O custo-benefício de se utilizar ferramentas computacionais nesta fase de otimização de compostos é substancial. Isto porque o desenvolvimento de um novo medicamento pode custar algo entre 400 milhões a 2 bilhões de dólares, sendo que a síntese e testes dos análogos dos compostos líderes representam uma grande parcela deste valor. Ao se utilizar métodos *in silico* nesta etapa é possível reduzir o número de compostos a serem sintetizados e testados *in vitro*, excluindo aqueles menos promissores. Sendo assim, os relativamente baixos custos das ferramentas computacionais (comparado com a síntese química e caracterização biológica de compostos) tornam este método atrativo para focar, reduzir e diversificar o espaço químico a ser explorado no desenvolvimento de um novo fármaco.

O planejamento de fármacos auxiliado por métodos computacionais já foi utilizado no descobrimento de compostos que ultrapassaram a etapa de triagem clínica e se tornaram novos medicamentos no tratamento de diversas doenças, tais como: a dorzolamida, inibidor da anidrase carbônica, aprovada em 1995; captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina, aprovado em 1981 como um medicamento anti-hipertensivo; saquinavir (aprovado em 1995), ritonavir e indinavir (ambos aprovados em 1996), utilizados no tratamento da AIDS; por fim, tirofiban, um antagonista do fibrinogênio aprovado em 1998 (SLIWOSKI et al., 2014).

Como se pôde observar, uma das etapas de qualquer programa de planejamento de fármaco baseado na estrutura envolve identificar um alvo biológico adequado. No caso de uma doença causada por parasita, este alvo deve ser essencial à sua sobrevivência e exibir uma atividade que pode ser alterada por pequenas moléculas (CAIN et al, 2014; GRINTER e ZOU, 2014). Neste trabalho, as pequenas moléculas estudadas são as lignanas ariltetralônicas e a proteína-alvo selecionada foi a tubulina do *P. falciparum* causador da malária. Por não possuir estrutura tridimensional determinada experimentalmente, a proteína foi modelada a partir de técnicas de modelagem molecular por homologia. Para simular a formação do complexo entre o alvo e os ligantes, utilizou-se a técnica de *docking* molecular. Estas duas técnicas são abordadas nos próximos itens.

1.1.2.1 Modelagem molecular por homologia

Avanços em técnicas biofísicas, como cristalografia de Raios X e técnicas de NMR, têm levado a um aumento na disponibilidade de estruturas experimentais de proteínas, o que permite o uso de informações estruturais para guiar o descobrimento de fármacos

(SLIWOSKI et al., 2014). O *Protein Data Bank* (PDB, s.d.; BERMAN et al., 2000) é a principal fonte de estruturas tridimensionais de proteínas e outras macromoléculas biológicas conhecidas. Entretanto, para um grande número de novos alvos biológicos as estruturas cristalográficas experimentais não estão disponíveis e, para estes casos, é necessária a construção de um modelo comparativo baseado na estrutura de uma proteína relacionada (CAIN et al, 2014; SLIWOSKI et al., 2014).

A modelagem molecular por homologia (ou modelagem comparativa) é um método computacional que tem por objetivo construir um modelo tridimensional de uma proteína cuja estrutura é desconhecida (chamada de *alvo*) a partir de proteínas com estruturas já determinadas (chamadas de *moldes*), baseado na similaridade da sequência de aminoácidos entre estas macromoléculas. Desta forma, estruturas proteicas determinadas experimentalmente são utilizadas para se prever a conformação de uma outra proteína, desde que possuam sequências de aminoácidos similares (ŠALI, 1995; MARTÍ-RENOM et al., 2000; HILLISCH, PINEDA e HILGENFELD, 2004; GINALSKI, 2006). Devido aos avanços na biologia molecular e estrutural nos últimos 50 anos, muitas estruturas de proteínas estão disponíveis, permitindo a aplicação da modelagem por homologia para se prever as estruturas das proteínas desconhecidas (HUNG e CHEN, 2014). Esta aproximação tem se mostrado útil tanto na identificação/validação de alvos terapêuticos, quanto na identificação/otimização de compostos líderes (HILLISCH, PINEDA e HILGENFELD, 2004).

O método em questão se baseia na observação de que na natureza a conformação estrutural de uma proteína é, em geral, mais altamente conservada do que sua sequência – as estruturas tridimensionais dentro de uma mesma família de proteínas, por exemplo, são mais conservadas do que suas sequências polipeptídicas. Além disso, sabe-se que pequenas ou médias alterações na sequência de aminoácidos de uma proteína geralmente resultam em apenas pequenas alterações em sua estrutura tridimensional. Assim, se uma similaridade entre duas proteínas é observada ao nível sequencial, uma similaridade estrutural também pode ser, na maioria das vezes, assumida. Em alguns casos, até mesmo proteínas que não apresentam similaridade sequencial podem apresentar similaridade estrutural. Tipicamente, se esta identidade sequencial for superior a 30%, pode-se supor que exista homologia entre as proteínas: possivelmente apresentam um ancestral comum, são relacionadas evolutivamente e, provavelmente, compartilham de uma estrutura tridimensional comum (ŠALI, 1995; MARTÍ-RENOM et al., 2000; HILLISCH, PINEDA e HILGENFELD, 2004).

Os métodos de modelagem molecular por homologia consistem, basicamente, em quatro etapas sequenciais (Fig. 6):

1 – seleção de uma ou mais proteínas moldes adequadas. Nesta primeira etapa, identificam-se proteínas que apresentem estrutura tridimensional conhecida (estruturas molde) e que sejam relacionadas com a sequência polipeptídica da estrutura desconhecida (sequência-alvo); para isso, a sequência-alvo é utilizada para se fazer uma varredura em bancos de dados de estruturas de proteínas, utilizando-se algoritmos de busca por similaridade;

2 – alinhamento sequencial alvo-molde(s). Aqui, a sequência da(s) proteína(s) molde(s) é (são) alinhada(s) com a sequência-alvo, a fim de se identificar uma correlação ótima entre os resíduos de aminoácidos destas macromoléculas;

3 – construção do modelo, onde um modelo tridimensional da proteína alvo é construído a partir da substituição e/ou inserção/deleção de aminoácidos na estrutura tridimensional da(s) proteína(s) molde(s), baseando-se no alinhamento sequencial obtido na etapa anterior;

4 – avaliação do modelo, onde este é checado no que diz respeito a aspectos conformacionais e pode ser corrigido e/ou ter sua energia minimizada. Se o modelo final não for satisfatório, qualquer um destes passos pode ser repetido até que um adequado seja obtido. Para cada etapa, existem diversos métodos, *softwares* e/ou servidores *online* diferentes (MARTÍ-RENOM et al., 2000; HILLISCH, PINEDA e HILGENFELD, 2004; GINALSKI, 2006).

Essa mesma técnica já foi empregada, por exemplo, por Carpenter et al. (2006) para se construir modelos estruturais de 475 isotipos de tubulinas α e β de eucariontes (inclusive humanas), e por Noël et al. (2001) para se construir o modelo do dímero de tubulina do parasita *Trichomonas vaginalis*.

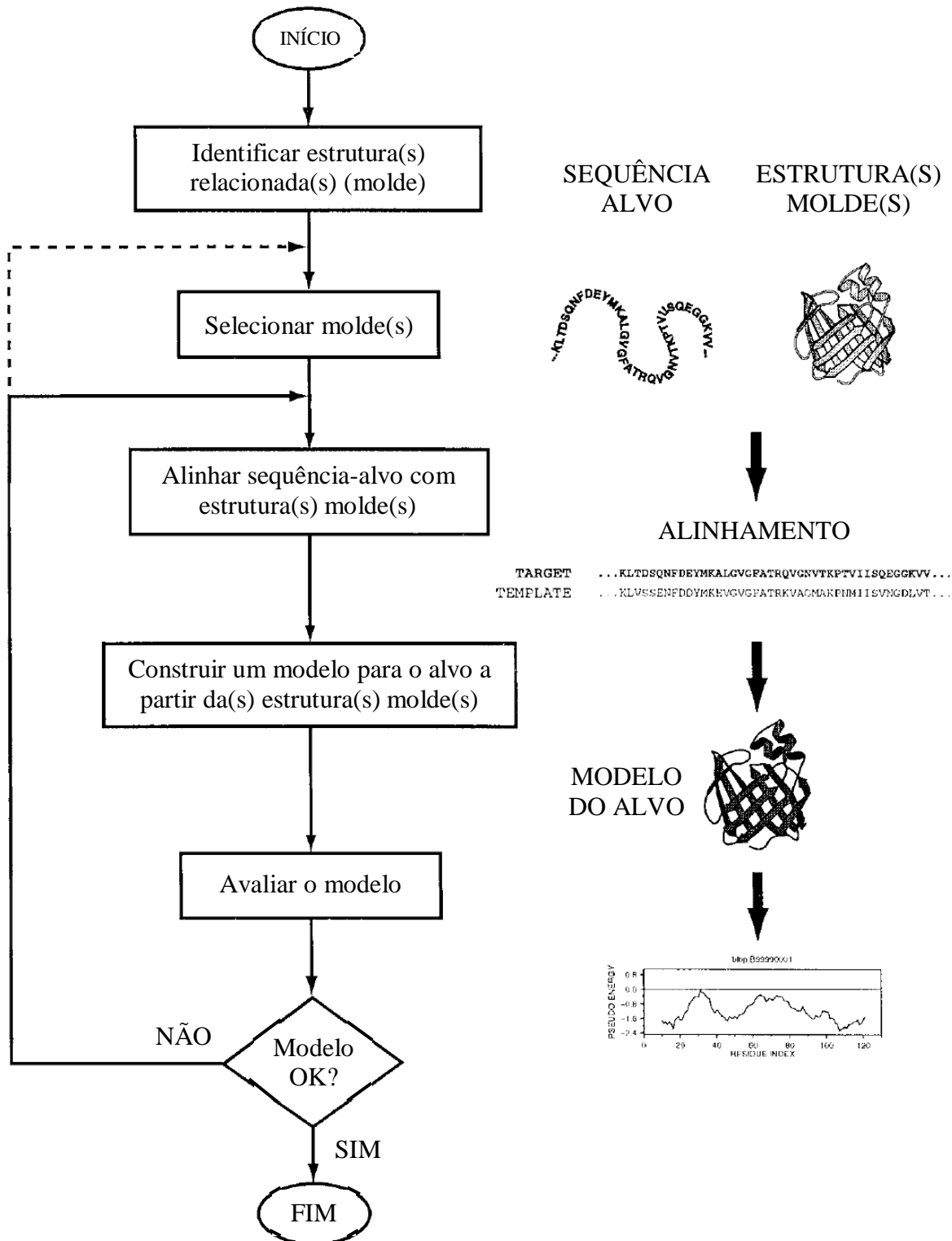


Figura 6 – Passos essenciais na modelagem molecular por homologia. Adaptado de Martí-Renom et al. (2000).

1.1.2.2 Docking molecular

Para que o planejamento racional de fármacos seja possível é necessário, no mínimo, ter à disposição a estrutura tridimensional da macromolécula alvo e ferramentas computacionais que permitam construir e examinar como pequenas moléculas se encaixam ao sítio receptor deste alvo (JORGENSEN, 2010). Uma destas ferramentas – e, portanto, uma importante etapa neste tipo de planejamento – é o *docking* molecular.

Docking é um termo utilizado para designar métodos computacionais que tentam encontrar o melhor “encaixe” entre duas moléculas, tipicamente um receptor e um ligante: dadas as coordenadas atômicas destas moléculas, tenta-se prever a associação entre elas. Resumidamente, tem por objetivo a identificação do modo de ligação (orientação + conformação) de uma pequena molécula (ligante) em um sítio de ligação de uma macromolécula (receptor), podendo formar um complexo estrutural estável (KUNTZ et al., 1982; EWING e KUNTZ, 1997; EWING et al., 2001; MOUSTAKAS et al., 2006; GRINTER e ZOU, 2014; HUNG e CHEN, 2014).

Sabe-se que a habilidade de uma molécula de interagir com uma proteína específica e exercer seu efeito biológico depende de sua capacidade de interagir favoravelmente com um sítio de ligação particular desta proteína. Moléculas que compartilham destas interações favoráveis irão exercer efeitos biológicos similares (SLIWOSKI et al., 2014). Sendo assim, os conhecimentos gerados na simulação de *docking* (mecanismos de interação receptor-ligante) podem ser utilizados para propor novos ligantes de forma a otimizar a interação com o sítio estudado da macromolécula alvo (KONTOYIANNI, McCLELLAN e SOKOL, 2004); quando a estrutura do complexo proteína-ligante é conhecida, a estrutura química inicial de um ligante pode ser modificada a fim de se melhorar a afinidade pelo mesmo sítio de ligação (HUNG e CHEN, 2014). Portanto, os métodos de *docking* permitem estimar de forma mais rápida a afinidade e modo de ligação de um ligante a uma proteína receptora de interesse, fornecendo subsídios para que compostos mais promissores sejam testados experimentalmente (RESTER, 2006; GRINTER e ZOU, 2014).

Esta técnica computacional tem sido utilizada com sucesso, pelo nosso grupo de pesquisa, tanto para facilitar as várias etapas da pesquisa farmacêutica, aumentando a velocidade na identificação e otimização de compostos líderes, como para criar modelos para explicar dados experimentais (CUNHA et al. 2006; STEFANI et al. 2012a, 2012b). O *docking* molecular tem uma longa e bem sucedida história de aplicações práticas, incluindo a descoberta de novos inibidores enzimáticos, antagonistas e agonistas de receptores, bloqueadores de canais iônicos,

bem como novos fármacos aprovados que foram desenvolvidos com o auxílio do planejamento de fármacos baseado na estrutura (GRINTER e ZOU, 2014). Além do *docking* proteína-ligante, esta técnica também tem sido aplicada a interações proteína-DNA, proteína-proteína (HUNG e CHEN, 2014) e em particular pelo nosso grupo para prever e explicar dados experimentais de interações complexos de coordenação-DNA (SENG et al. 2008, 2010).

Existe uma grande variedade de *softwares* de *docking* disponíveis. Os mais populares incluem DOCK, AutoDock, LUDI, FlexX, Glide, AutoDock Vina e GOLD (GRINTER e ZOU, 2014), sendo este último o melhor *software* de *docking* disponível atualmente (DAVIS, TEAGUE e KLEYWEGT, 2003).

Neste trabalho, será realizado o *docking* de lignanas ariltetralônicas no sítio de ligação da colchicina presente na tubulina do *P. falciparum*, causador da malária. Simulações de *docking* envolvendo inibidores da tubulina já foram empregadas, indicando um caminho interessante para fornecer novos agentes antitubulina (SOULÈRE, 2009).

1.1.3 Os Ligantes – As Lignanas Ariltetralônicas

Os compostos estudados no presente trabalho são as lignanas ariltetralônicas (Fig. 7) isoladas da planta *Holostylis reniformis* Duch., da família Aristolochiaceae (SILVA e LOPES, 2004; SILVA e LOPES, 2006; ANDRADE-NETO et al., 2007; MESSIANO et al., 2009). Essa planta já é utilizada na medicina tradicional brasileira para tratar a malária (SILVA e LOPES, 2004) e outras enfermidades; lignanas ariltetralônicas extraídas desta mostraram atividade antiplasmodial *in vitro* contra uma cepa de *P. falciparum* resistente à cloroquina, além de baixa toxicidade em células hepáticas (ANDRADE-NETO et al., 2007). Entretanto, seu mecanismo de ação ainda não é totalmente compreendido.

Estes compostos são estruturalmente semelhantes à podofilotoxina (Fig. 8). A podofilotoxina também é uma lignana, conhecida por se ligar à tubulina e, conseqüentemente, inibir a montagem de microtúbulos (IMBERT, 1998).

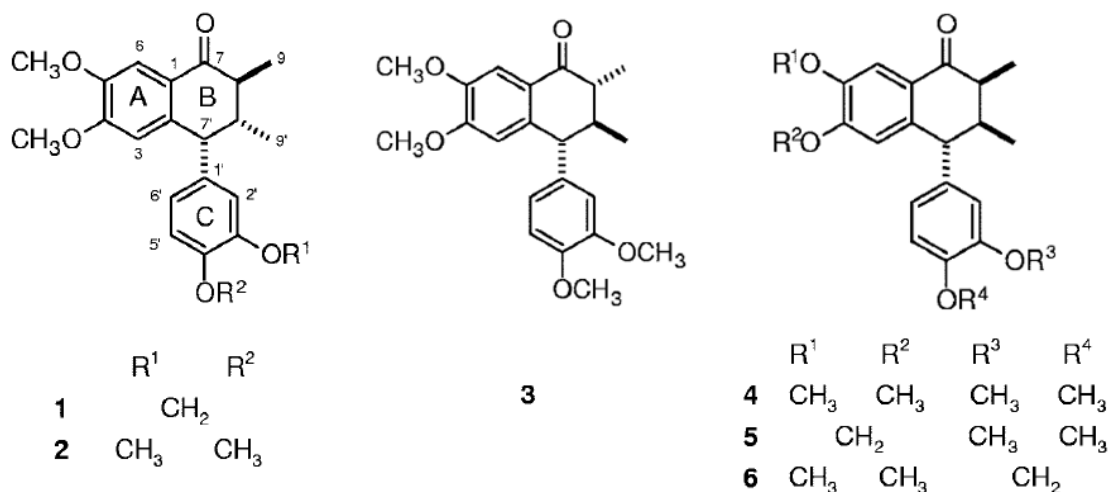


Figura 7 – Lignanas ariltetralônicas. Adaptado de Andrade-Neto et al. (2007).

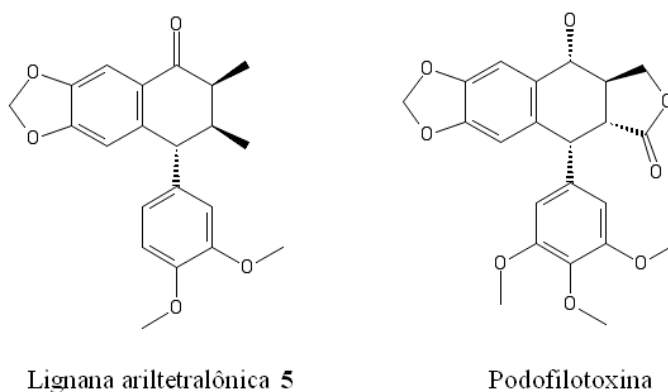


Figura 8 – Estrutura da lignana ariltetralônica **5** estudada e da podofilotoxina para efeito de comparação.

Além da podofilotoxina, são conhecidos outros agentes antimicrotúbulos retirados de plantas, como a colchicina, a esteganacina e a combretastatina. Todos estes compostos se ligam ao sítio da colchicina na cadeia β da tubulina e inibem a montagem (ou induzem a desmontagem) do microtúbulo (SACKETT, 1993).

Produtos naturais são excelentes fontes para o descobrimento e desenvolvimento de fármacos. Em particular, os inibidores mais potentes conhecidos de microtúbulos são produtos naturais ou derivados destes, sendo a maioria obtida de plantas superiores (HAMEL, 1996; BELL, 1998; ALTMANN e GERTSCH, 2007; DUMONTET e JORDAN, 2010; YUE, LIU e GUO, 2010). Além disso, muitos dos medicamentos antiparasitários são derivados diretos ou baseados em produtos naturais, o que mostra a importância destes no descobrimento de novos fármacos contra doenças causadas por parasitas (WATTS, TENNEY e CREWS, 2010).

1.1.4 O Alvo – A Tubulina do *P. falciparum*

A macromolécula biológica selecionada neste trabalho como alvo para as lignanas ariltetralônicas foi a tubulina do *P. falciparum*.

A tubulina é uma proteína heterodimérica formada por dois monômeros de cerca de 55 kDa, a tubulina α e a tubulina β , ligados de forma não covalente. Essas duas cadeias são estruturalmente muito similares, contendo cerca de 450 aminoácidos cada e formadas por um núcleo de duas folhas β rodeadas por hélices α (LITTLE e SEEHAUS, 1988; DESAI e MITCHISON, 1997; NOGALES, WOLF e DOWNING, 1998; DOWNING, 2000) (A Fig. 9). Uma repetição de heterodímeros α/β -tubulina em sequência, com monômeros de α e β tubulina alternados, constitui os microtúbulos, polímeros essenciais que compõem o citoesqueleto de todos os eucariontes (MANDELKOW e MANDELKOW, 1995; HAMEL, 1996; DESAI e MITCHISON, 1997; NOGALES, WOLF e DOWNING, 1998; NOGALES et al., 1999; NOGALES, 2000; LÖWE et al., 2001) (B Fig. 9).

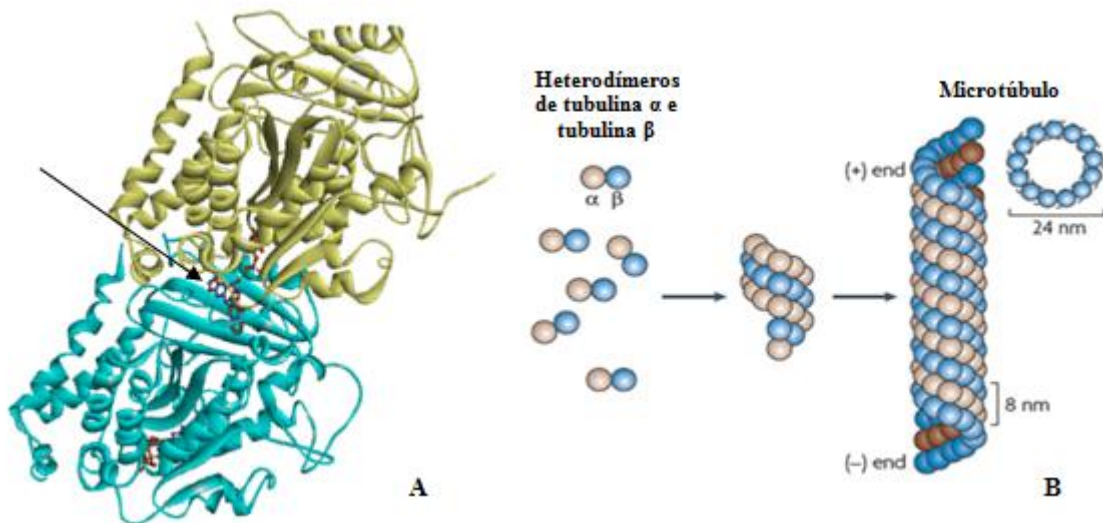


Figura 9 – **A.** Representação da estrutura tridimensional da tubulina bovina, código **1sa1** no PDB (PDB, s.d.; RAVELLI et al., 2004). O monômero α aparece em amarelo e o β em ciano. Em *stick* aparecem os nucleotídeos GDP e GTP (um em cada monômero), além do ligante podofilotoxina (seta). **B.** Esquema mostrando como os heterodímeros de α/β tubulina se associam para formar o microtúbulo. A parte **B** da figura foi adaptada de Dumontet e Jordan, 2010.

Os microtúbulos estão envolvidos em muitas funções essenciais em todo o ciclo celular, incluindo o transporte de materiais no interior da célula, a motilidade celular, o desenvolvimento e a manutenção do formato da célula, atuação como suporte para organelas e membranas, posicionamento do núcleo, organização e transporte de vesículas, secreção e

sinalização celular, absorção de nutrientes, determinação da polaridade da célula, além de servirem como o principal elemento estrutural de cílios e flagelos. De particular interesse, entretanto, é seu papel durante a divisão celular, quando toda a rede de microtúbulos se rearranja para formar o fuso mitótico, o qual é responsável pela segregação física das cromátides-irmãs, distribuindo com incrível precisão o genoma duplicado para as células filhas durante a divisão celular (LACEY, 1988; SACKETT, 1993; MANDELKOW e MANDELKOW, 1995; DESAI e MITCHISON, 1997; KOWALSKI, GIANNAKAKOU e HAMEL, 1997; DOWNING, 2000; KARSENTI e VERNOS, 2001; ALTMANN e GERTSCH, 2007; DUMONTET e JORDAN, 2010).

Muitas destas atividades essenciais estão associadas com a reestruturação dinâmica do microtúbulo. O microtúbulo é uma estrutura altamente dinâmica, podendo alternar entre fases de crescimento e de encurtamento (por meio da perda ou adição de heterodímeros de α/β tubulina em uma de suas extremidades), ou até mesmo podendo ocorrer sua completa desmontagem e reconstrução – este comportamento de não-equilíbrio é conhecido como instabilidade dinâmica e é fundamental para as funções microtubulares (SHEARWIN, PEREZ-RAMIREZ e TIMASHEFF, 1994; DESAI e MITCHISON, 1997; NOGALES et al., 1999; DOWNING, 2000; NOGALES, 2000; KARSENTI e VERNOS, 2001; ALTMANN e GERTSCH, 2007; VALIRON et al., 2010).

Nos últimos anos, tem sido descoberta uma grande variedade de fármacos antimitóticos que interagem com a tubulina e provocam alterações significativas nesta instabilidade dinâmica dos microtúbulos. Três classes principais destes fármacos foram identificadas: análogos da colchicina, alcaloides vinca e taxanos. Essas classes podem ser distinguidas por meio da ligação a diferentes partes da proteína, em diferentes sítios de ligação (Fig. 10). Funcionalmente, entretanto, estes ligantes antimitóticos podem ser divididos em apenas duas grandes categorias: compostos que inibem a montagem/polimerização e/ou desestabilizam os microtúbulos – “inibidores da polimerização da tubulina”, como os alcaloides vinca e análogos da colchicina –, e compostos que promovem a montagem/polimerização e/ou estabilizam os microtúbulos – “estabilizadores de microtúbulos”, como os taxanos (HAMEL, 1996; DESAI e MITCHISON, 1997; KOWALSKI, GIANNAKAKOU e HAMEL, 1997; DOWNING, 2000; NOGALES, 2000; ALTMANN e GERTSCH, 2007).

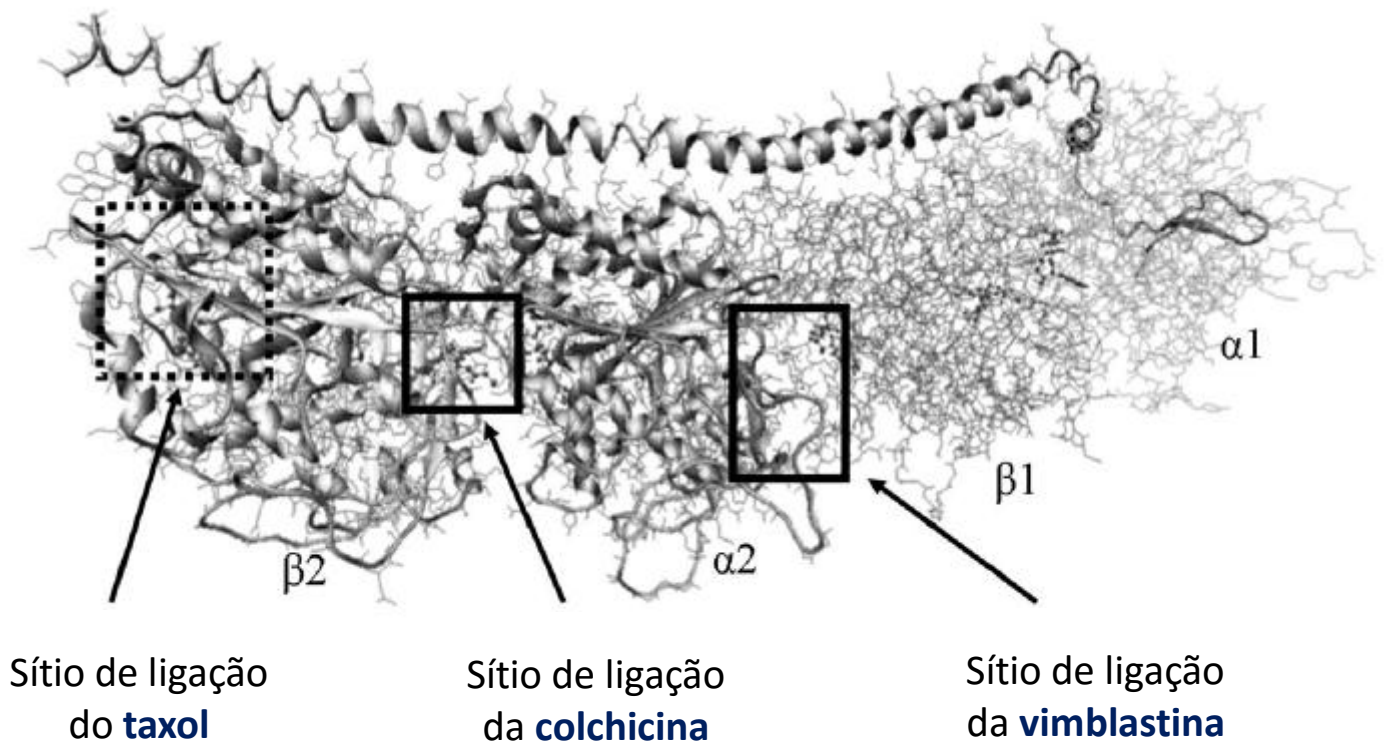


Figura 10 – Representação da estrutura tridimensional de heterodímeros de α/β tubulina alternados, com destaque para a localização de três sítios de ligação conhecidos: o sítio de ligação da colchicina localiza-se na interface intradímero, o sítio de ligação do taxol na subunidade β e, por fim, o sítio de ligação da vimblastina localiza-se na interface interdímeros. Adaptado de Tripathi et al. (2010).

A susceptibilidade a antimetabólitos já é bem conhecida para protozoários do gênero *Plasmodium*. Isto porque o ciclo de vida destes parasitas é caracterizado por inúmeras divisões nucleares e fases de diferenciação celular (Fig. 4), onde as estruturas microtubulares apresentam várias funções essenciais: são aparentemente necessárias para a divisão nuclear, citocinese, distribuição das organelas e citossol nos novos merozoítos formados, transporte intracelular, motilidade, integridade estrutural, estrutura do axonema, integridade/movimento flagelar e, por fim, durante a exflagelação dos gametócitos masculinos em gametas (WESSELING et al., 1989; MAESSEN et al., 1993; TILNEY e TILNEY, 1996; BEJON et al., 1997; SINOUE et al., 1998; FENNELL et al., 2003; NAUGHTON et al., 2008; FENNELL, AL-SHATR e BELL, 2008). Estudos indicam, ainda, que os microtúbulos presentes no *P. falciparum* também exercem um papel essencial durante o processo de invasão dos parasitas às hemácias do hospedeiro, já que estão envolvidos com a motilidade do protozoário (BEJON et al., 1997; FOWLER et al., 1998; FOWLER et al., 2001). Portanto, inibidores de microtúbulos podem ser considerados promissores para atuarem como agentes antimaláricos (BEJON et al., 1997; FENNELL et al., 2003; NAUGHTON et al., 2008).

Sabe-se que certos compostos anticancerígenos inibidores de microtúbulos apresentam potente atividade antimalárica em baixas concentrações – a colchicina, por exemplo, já foi utilizada como uma terapia adjunta no tratamento da malária. Entretanto, seu potencial para atuarem como fármacos antimaláricos é limitado devido sua alta toxicidade em células de mamíferos (SCHRÉVEL et al., 1994; POUVELLE et al., 1994; BEJON et al., 1997; SKINNER-ADAMS et al., 1997; BELL, 1998; SINOUE et al., 1998; FENNELL et al., 2003; FENNELL et al., 2006; NAUGHTON et al., 2008). Por outro lado, algumas classes de herbicidas antimitóticos (como as dinitroanilinas, entre elas a trifluralina) exibem baixa ou até mesmo indetectável citotoxicidade em mamíferos e atividade moderada contra o *P. falciparum*. São, portanto, compostos seletivos contra os parasitas, com maior afinidade pela tubulina do protozoário. Sendo assim, parece possível desenvolver um composto antimalárico, inibidor de microtúbulos, que combine a potência dos anticancerígenos com a seletividade dos herbicidas, como um resultado das sutis diferenças entre as estruturas das tubulinas do parasita e humana (WESSELING et al., 1989; BELL, 1998; TRAUB-CSEKO et al., 2001; DOW et al., 2002; FENNELL et al., 2003; FENNELL et al., 2006; MITRA e SEPT, 2006; FENNELL, AL-SHATR e BELL, 2008; NAUGHTON et al., 2008).

1.2 Objetivos

O objetivo principal deste trabalho é propor um mecanismo de ação para as lignanas ariltetralônicas com atividade antimalária conhecida, a fim de que este se torne um guia para a síntese de novos compostos mais eficazes. Para isso, é necessário:

- identificar o possível alvo biológico das lignanas ariltetralônicas;
- obter a estrutura tridimensional da tubulina do *P. falciparum* por métodos teóricos;
- elucidar o comportamento de lignanas ariltetralônicas no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*, por meio da formação de complexos proteína-ligante teóricos.

2. DESENVOLVIMENTO

Neste capítulo serão descritos, primeiramente, os materiais e métodos utilizados para se investigar o problema apresentado na introdução e se atingir os objetivos propostos. Em seguida, são discutidos os resultados obtidos no trabalho.

2.1 Materiais e Métodos

O primeiro passo do trabalho foi obter as coordenadas atômicas tridimensionais de seis lignanas ariltetralônicas (ligantes). Então, foi realizada uma busca em diferentes bancos de dados a fim de se identificar possíveis alvos biológicos para estes compostos. Selecionado o alvo – a tubulina do *P. falciparum* (macromolécula alvo) – realizou-se a modelagem molecular por homologia desta proteína. Tendo em mãos as coordenadas tridimensionais dos ligantes e do alvo, foram realizadas simulações da formação dos complexos entre estas moléculas, por meio da técnica de *docking* molecular. Finalmente, os complexos formados e os parâmetros obtidos nas simulações foram avaliados com o auxílio de *softwares* de visualização molecular. Cada uma destas etapas será descrita nas seções a seguir.

2.1.1 Programas (*softwares*) utilizados

Para a realização dos desenhos moleculares 2D foram utilizados os *softwares* MarvinSketch 14.12.15.0 (CHEMAXON, s.d.) e PubChem Sketcher V2.4 (PUBCHEM s.d., IHLENFELD, BOLTON e BRYANT, 2009). Todos os desenhos 3D de macromoléculas foram realizados utilizando o sistema Discovery Studio Visualizer 2.0 (DS Visualizer, s.d), exceto nos casos expressamente indicados.

Para a modelagem molecular 3D das lignanas ariltetralônicas foram utilizados os *softwares* MarvinSketch 14.12.15.0 (CHEMAXON, s.d.) e o sistema VegaZZ 3.0.5.12 (PEDRETTI, VILLA e VISTOLI, 2002).

A modelagem molecular por homologia da proteína estudada foi realizada utilizando o *software* MODELLER (ŠALI e BLUNDELL, 1993). Para a sobreposição estrutural utilizou-se o *software* Swiss-PDB Viewer v.4.1.0 (GUEx e PEITSCH, 1997).

Alguns outros programas de uso mais específico são descritos quando utilizados.

2.1.2 Modelagem Molecular dos Ligantes

Inicialmente, a estrutura bidimensional dos seis ligantes (Fig. 7) foi desenhada no MarvinSketch 14.12.15.0 e, em seguida, sua estrutura tridimensional foi gerada utilizando-se a função *Clean in 3D (Fine Build)*. Esta função calcula novas coordenadas tridimensionais para a molécula construindo os confôrmeros, dentre eles o de menor energia é mantido. A qualidade das estruturas é medida por uma função de energia simples, baseada no campo de força DREIDING (CHEMAXON, s.d.). O DREIDING é um campo de força genérico capaz de fornecer geometrias precisas de moléculas orgânicas e biológicas (MAYO, OLAFSON e GODDARD, 1990). Todos os átomos que compõem os ligantes estudados – C, H e O – estão parametrizados neste campo de força.

O MarvinSketch (CHEMAXON, s.d.) já foi utilizado para se preparar ligantes para simulações de *docking* molecular envolvendo inibidores da superóxido dismutase do *P. falciparum* (BERNHARDT, PINTO e PAI, 2010), inibidores da dihidrofolato redutase com potencial atividade anticancerígena (SAHU e NERKAR, 2014), antivirais contra a síndrome respiratória aguda grave ou SARS (VIRUPAKSHIAH et al., 2007) e inibidores da hsp90 para a terapia contra câncer de mama (MAHANTA, PILLA e PAUL, 2013).

Uma vez gerada a estrutura tridimensional dos compostos, a geometria inicial de cada um deles foi otimizada utilizando o programa de modelagem molecular AMMP implementado no VegaZZ 3.0.5.12. O método selecionado foi o *Conjugate-gradients*, com 3000 *minimization steps* (padrão do programa).

Como última etapa, foram realizados cálculos semi-empíricos com o MOPAC (STEWART, 1990), também implementado no VegaZZ 3.0.5.12, utilizando o método PM3. Neste método também estão parametrizados todos os átomos que compõem as lignanas.

Esta preparação das moléculas ligantes utilizando o AMMP e o MOPAC implementados no sistema VegaZZ já foi realizada, por exemplo, para estudos de *docking* de aril-aminopiridinas (ERÍĆ et al., 2012) e oxindol pentacíclico (KOZIELEWICZ et al., 2014) com diferentes proteínas envolvidas em processos cancerígenos.

2.1.3 Pesquisa em Bancos de Dados

A fim de se identificar o possível alvo biológico das lignanas ariltetralônicas no parasita *P. falciparum*, foi realizada uma busca por ligantes estruturalmente semelhantes em diferentes bancos de dados e, então, verificados os alvos conhecidos para estes ligantes.

Para isso, as estruturas bidimensionais das seis ariltetralonas descritas por Andrade-Neto et al. (2007) (Fig. 7) foram desenhadas no PubChem Sketcher V2.4, assim como a subestrutura que corresponde à estrutura mínima em comum presente em todas as moléculas estudadas.

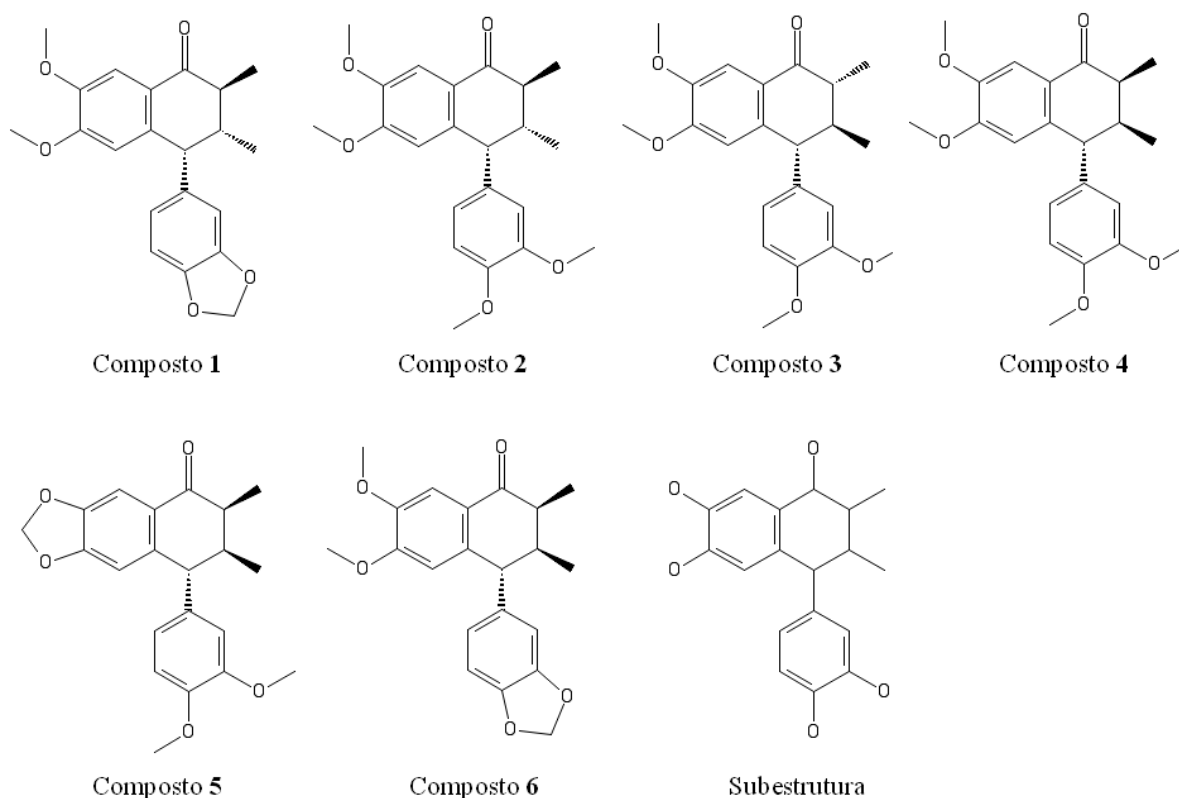
Neste mesmo editor foram gerados os códigos SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) para cada ligante, os quais foram utilizados nas ferramentas de busca dos bancos de dados. O SMILES é um sistema linear de notação química, desenvolvido especialmente para o uso computacional, onde estruturas moleculares são especificadas de forma única e precisa (WEININGER, 1988). A estrutura bidimensional e o código SMILES dos ligantes utilizados nas buscas nos bancos de dados são exibidos na Figura 11.

A seguir, são apresentados os bancos pesquisados e os parâmetros utilizados para a busca em cada um destes.

a. PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)

O PubChem é um repositório público de estruturas químicas de pequenas moléculas e suas propriedades/atividades biológicas (PUBCHEM, s.d.; BOLTON et al., 2008; LI et al., 2010). Em 2010, este repositório possuía mais de 25 milhões de estruturas de compostos químicos e 90 milhões de resultados de bioatividade, associados a milhares de alvos macromoleculares.

Por meio da opção *Structure Search* do PubChem foi realizada uma busca por similaridade (*Identity/Similarity*) aos seis compostos estudados. Selecionou-se um *threshold* maior ou igual a 80% (em uma escala onde o valor de 100% retorna somente a estrutura exata fornecida e 0% retorna todas as estruturas químicas presentes no banco) e foi adicionado um filtro para se exibir apenas compostos com bioatividade experimental. Além disso, também foi realizada uma busca por subestrutura (*Substructure/Superstructure*), utilizando a subestrutura apresentada na Figura 11, para esta não foram utilizados filtros adicionais.



| SMILES | |
|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| Composto 1 | <chem>C1=C(C(=CC2=C1C([C@H]([C@@H]([C@@H]2C3=CC=C4C(=C3)OCO4)C)C)=O)OC)OC</chem> |
| Composto 2 | <chem>C1=C(C(=CC2=C1C([C@H]([C@@H]([C@@H]2C3=CC=C(C(=C3)OC)OC)C)C)=O)OC)OC</chem> |
| Composto 3 | <chem>C1=C(C(=CC2=C1C([C@@H]([C@H]([C@@H]2C3=CC=C(C(=C3)OC)OC)C)C)=O)OC)OC</chem> |
| Composto 4 | <chem>C1=C(C(=CC2=C1C([C@H]([C@H]([C@@H]2C3=CC=C(C(=C3)OC)OC)C)C)=O)OC)OC</chem> |
| Composto 5 | <chem>C1=C4C(=CC2=C1C([C@H]([C@H]([C@@H]2C3=CC=C(C(=C3)OC)OC)C)C)=O)OCO4</chem> |
| Composto 6 | <chem>C1=C(C(=CC2=C1C([C@H]([C@H]([C@@H]2C3=CC=C4C(=C3)OCO4)C)C)=O)OC)OC</chem> |
| Subestrutura | <chem>C1=C(C(=CC2=C1C(C(C2C3=CC=C(C(=C3)O)O)C)C)O)O</chem> |

Figura 11 – Estrutura bidimensional e SMILES de cada um dos ligantes utilizados para realizar a busca em diferentes bancos de dados.

b. ChEMBL (<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>)

O ChEMBL (CHEMBL, s.d.; BENTO et al., 2014) é um banco de dados aberto, de bioatividade experimental, contendo informações extraídas em grande parte de forma manual da literatura de química medicinal, além de integrar dados de outros bancos públicos e informações sobre fármacos aprovados (BENTO et al., 2014). Este banco contém dados de mais de 59.000 publicações científicas, além de atualmente reunir estruturas de mais de 1,7 milhão de compostos, dados de mais de 13 milhões de bioatividades experimentais e mais de 10.000 alvos macromoleculares (CHEMBL, s.d.).

Utilizando a opção *Ligand Search* presente no ChEMBL realizou-se uma busca por similaridade (*Similarity*) fornecendo o SMILES de cada um dos seis ligantes. Considerou-se

um limiar de similaridade acima de 80%. Além disso, também foi realizada uma busca por subestrutura (*Substructure Search*), utilizando o SMILES da subestrutura apresentada na Figura 11.

c. *ChEBI* (<http://www.ebi.ac.uk/chebi/>)

O *Chemical Entities of Biological Interest* (ChEBI) é um dicionário de entidades moleculares focado em pequenas moléculas. Estas entidades são produtos naturais ou sintéticos utilizados para intervir nos processos dos organismos vivos. Atualmente, possui informações de mais de 42.000 compostos (CHEBI, s.d.; DEGTYARENKO et al., 2007).

Por meio da opção *Advanced Search* neste servidor, foi realizada uma busca por similaridade (*Find compounds which resemble this structure*), desenhando-se cada um dos seis ligantes no editor de moléculas do próprio *website*. O limiar de similaridade considerado também foi maior ou igual a 80%. Em seguida, foi realizada a busca utilizando como entrada a subestrutura dos compostos (*Find compounds which contain this structure*), apresentada na Figura 11.

d. *PDB* (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>)

O *Protein Data Bank*, PDB (PDB, s.d.; BERMAN et al., 2000), é um repositório aberto de informações sobre a estrutura tridimensional de macromoléculas biológicas, como proteínas e ácidos nucleicos, atualizado semanalmente. Existem atualmente cerca de 106.000 estruturas depositadas no PDB, entre as quais podemos encontrar mais de 17.000 ligantes diferentes complexados a estas macromoléculas.

A fim de se identificar ligantes semelhantes aos compostos estudados e que estejam complexados a macromoléculas biológicas com estrutura tridimensional conhecida, foi feita uma busca por similaridade no PDB utilizando o mecanismo *Search by Ligands*. Foram utilizados dois tipos de busca: *Similar* e *Substructure*. No primeiro, foram fornecidos os SMILES de cada ariltetralona e definido um limiar de similaridade de 80%; para o segundo, utilizou-se o SMILES da subestrutura (Fig. 11).

e. *PDBeChem* (<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/#>)

O PDBeChem (PDBECHEM, s.d.; DIMITROPOULOS, IONIDES e HENRICK, 2006) é um dicionário de componentes químicos (como ligantes, pequenas moléculas e monômeros) presentes nos arquivos do PDB, o qual fornece mecanismos de busca abrangentes a

fim de se permitir encontrar um componente em particular. Atualmente, este realiza a busca sobre mais de 19.000 ligantes.

Este banco de dados também foi explorado a fim de se buscar ligantes semelhantes aos estudados, complexados a alvos macromoleculares com estrutura determinada experimentalmente. Para isso, o SMILES da subestrutura das lignanas foi utilizado como entrada para o mecanismo de busca *Non-Stereo SMILES (Has Sub-Structure)* presente no PDBeChem. O PDBeChem não oferece a opção de se pesquisar por similaridade, apenas por componentes que contenham a subestrutura fornecida como entrada.

f. *ZINC* (<http://zinc.docking.org/>)

ZINC (ZINC, s.d.; IRWIN e SHOICHET, 2005; IRWIN et al., 2012) é um banco de dados público de compostos comercialmente disponíveis que contém a estrutura tridimensional de mais de 35 milhões de compostos, bem como algumas de suas propriedades físicas e biológicas.

Por meio da opção *Search by Structure* presente no ZINC, foi realizada uma busca por similaridade, acima do limiar de 80%, fornecendo-se os SMILES dos seis compostos estudados. Também foi realizada a busca utilizando a subestrutura como entrada e selecionando o mecanismo *Substructure*.

g. *GenomeNet* (<http://www.genome.jp/>)

O GenomeNet (GENOMENET, s.d.; HATTORI et al., 2010) é uma rede japonesa de bancos de dados e serviços computacionais para a pesquisa do genoma e áreas relacionadas das ciências biomédicas. Dois dos serviços computacionais disponíveis no GenomeNet são o SIMCOMP (*SIMilar COMPOund*) e o SUBCOMP (*SUBstructure matching of COMPOunds*), métodos de busca por estruturas químicas similares – por similaridade ou por subestrutura, respectivamente – disponíveis nos bancos de dados de compostos químicos.

Por meio da ferramenta *SIMCOMP Search* presente no GenomeNet foi realizada uma busca por similaridade aos seis compostos estudados. Para isso, utilizaram-se como entrada os SMILES destes compostos e a base de dados selecionada foi a *COMPOUND*. O *score* de similaridade definido foi de 0,8. Além disso, também foi realizada uma busca por subestrutura por meio da ferramenta *SUBCOMP Search*, utilizando o SMILES da subestrutura das lignanas como entrada.

h. BindingDB (<http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>)

O BindingDB (BINDINGDB, s.d ; LIU et al., 2007) é um banco de dados público de medidas experimentais de afinidades de ligação, focado principalmente nas interações entre proteínas consideradas como alvo terapêutico e pequenas moléculas semelhantes à fármaco. Esta base de dados contém atualmente mais de 1.000.000 de dados de afinidade, para quase 7.000 alvos proteicos e mais de 450.000 pequenas moléculas.

Por meio da opção *Search and Browse – Chemical Structure* presente no BindingDB, foi realizada uma busca por similaridade a partir dos SMILES das ariltetralonas (Fig. 11). Nesta, foi definida uma similaridade acima de 0,7 (70%). Em seguida, realizou-se uma busca do tipo *Substructure* utilizando o SMILES da subestrutura como entrada.

i. CARLSBAD (<http://carlsbad.health.unm.edu/carlsbad/>)

O *Confederated Annotated Research Libraries of Small molecule Biological Activity Data*, CARLSBAD (CARLSBAD, s.d.; MATHIAS et al., 2013), é um banco de dados desenvolvido como um recurso integrado a partir de um conjunto de diferentes bases de dados de bioatividade (compostos químicos testados sobre alvos selecionados), que são agregados e apresentados de maneira uniforme. Isto o torna adequado para o estudo das relações entre pequenas moléculas e seus alvos. Atualmente, estão disponíveis no banco mais de 930.000 atividades, cerca de 890.000 pares únicos de ligante-alvo, mais de 3.500 alvos e 435.000 estruturas únicas de ligantes.

Utilizando a ferramenta *Structures* presente no CARLSBAD, foram fornecidos como entrada os SMILES das lignanas e então realizou-se uma busca por similaridade acima de 0,8 (80%). Também foi realizada a busca utilizando a subestrutura como entrada, selecionando a opção *substructure* do servidor.

j. DrugBank (<http://www.drugbank.ca/>)

DrugBank (DRUGBANK, s.d.; LAW et al., 2014) é um banco de dados abrangente, contendo diversas informações bioquímicas e farmacológicas sobre fármacos, seus mecanismos de ação e seus alvos biológicos – combina dados detalhados dos fármacos com amplas informações sobre seus alvos. Atualmente contém mais de 7.700 fármacos, além de quase 4.300 sequências de proteínas não-redundantes relacionadas a estes compostos.

Neste trabalho, utilizou-se a ferramenta *ChemQuery Structure Search* presente no DrugBank Version 4.1 para realizar uma busca por fármacos semelhantes às lignanas ariltetralônicas. Para isso, primeiramente as seis lignanas estudadas foram desenhadas no editor

de moléculas do *website* e foi definido um *Similarity threshold* de 0,7 (ou 70%), além de uma busca desenhando-se a subestrutura dos compostos e selecionando a opção *Substructure*.

2.1.4 Modelagem Molecular por Homologia da Tubulina do *P. falciparum*

Como não estão disponíveis estruturas tridimensionais da tubulina do *P. falciparum* obtidas por métodos experimentais, foi necessário obtê-la por métodos teóricos. Para isso, foi realizada a modelagem molecular por homologia do dímero (cadeia α + cadeia β) desta proteína, seguindo os passos essenciais descritos por Martí-Renom et al. (2000) (Fig. 6).

As etapas da modelagem por homologia realizadas neste trabalho são descritas nos itens *a-g* a seguir. Seguindo as ideias de Carpenter et al. (2006) para se obter a estrutura de 475 isotipos de tubulinas α e β de eucariontes e por Noël et al. (2001) para se construir o modelo do dímero de tubulina do parasita *Trichomonas vaginalis*, o *software* MODELLER foi utilizado para a construção do modelo.

a. Obtenção da sequência de aminoácidos

O primeiro passo da modelagem por homologia consistiu em se obter a sequência de aminoácidos das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum*. Para isso, foi feita uma busca pelo termo “*plasmodium falciparum tubulin*” nos bancos de dados presentes no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (NCBI, s.d.) e no *Universal Protein Research – UniProt* (UNIPROT, s.d.).

Os dados das sequências selecionadas para as etapas seguintes da modelagem estão resumidos na Tabela 2 e suas sequências, em formato FASTA, são apresentadas na Figura 12.

Tabela 2 – Dados das sequências de aminoácidos selecionadas para a modelagem por homologia das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum*

| Informação | Cadeia alfa | Cadeia beta |
|-------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Organismo | <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 | <i>Plasmodium falciparum</i> 3D7 |
| GenBank^a | CAD51722.1 | AAN35282.1 |
| gi^b | 23504938 | 23494948 |
| UniProtKB/TrEMBL^c | Q6ZLZ9 (Q6ZLZ9_PLAF7) | Q7KQL5 (TBB_PLAF7) |
| Gene^d | PFI0180w | PF10_0084 |
| Referência | Hall et al. (2002) | Gardner et al. (2002) |

^a Número de acesso e versão da sequência proteica no NCBI;

^b Código único atribuído de forma consecutiva a cada nova entrada no NCBI;

^c Código da proteína no UniProtKB/TrEMBL;

^d Símbolo do gene da proteína em questão.

```

>tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7 Alpha tubulin OS=Plasmodium falciparum (isolate
3D7) GN=PF10180w PE=3 SV=1
MREVISIHVGQAGIQVGNACWELFCLEHGIQPDGQMP SDKASRANDDAFN TFFSETGAGK
HVPRCVFVDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTIGKEVIDVCLD
RIRKLADNCTGLQGFLMFSAVGGGTGSGFGCLMLERLSVDYGKSKLNFCCWPSQVSTA
VVEPYNSVLSTHSLLEHTDVAIMLDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLIAQVISSLTA
SLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFM LSSYAPVVS A EKAYHEQLSVSEITNSAFEPAN
MMAKCDPRHGKYM ACCLMYRGDVV PKDVNA AVATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYQPP
TVVPGGDLAKVMRAVCMISNSTAIAEVFSRMDQKFDLMYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSE
AREDLAALEKDYEEV GIESNEAEGEDEGEY EADY

>sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7 Tubulin beta chain OS=Plasmodium falciparum (isolate
3D7) GN=PF10_0084 PE=3 SV=1
MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPSGTYCGDSDLQLERVDVFYNEATGGRYV
PRAILMDLEPGTMDSVRAGPFGQLFRPDNFVFGQTGAGNNWAKGHYTEGAELIDAVLDVV
RKEAEGCDCLQGFI THSLGGGTGSGMG TLLISKIREEYPDRIMETFSVFPSPKVS DTVV
EPYNATLSVHQLVENADEVQVIDNEALYD ICFRTLKLTPTTYGDLNHLVSAAMSGVTCSL
RFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPRLHFFMIGFAPLTSRGSQQYRALTVP ELTQQMFDKNMM
CASDPRHGRYLTACAMFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSSYFVEWIPHNTKSSVCDI PPKG
LKMAVT FVGNSTAIQEMFKRVS DQFTAMFRRKAF LHWYTGE GMDMEFTEAESNMNDLVS
EYQQYQDATAEEEEGEFE EEEGDVEA

```

Figura 12 – Sequência FASTA das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum*, cepa 3D7, obtidas do UniProt sob os códigos Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002) e Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002), respectivamente.

b. Identificação de proteínas homólogas

Uma vez obtida a sequência de aminoácidos das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* (Fig. 12), o passo seguinte foi realizar uma busca por proteínas homólogas cujas estruturas tridimensionais experimentais estivessem disponíveis. Esta busca foi feita por meio dos servidores *online Basic Local Alignment Search Tool* – BLAST (BLAST, s.d.; ALTSCHUL et al., 1990) e FASTA (FASTA, s.d.; PEARSON e LIPMAN, 1988).

BLAST é uma ferramenta que busca regiões de similaridade local entre sequências. O programa compara a sequência de proteínas (ou nucleotídeos) com bancos de dados de sequências e calcula a significância estatística dos resultados – é a ferramenta mais utilizada para se calcular similaridade sequencial. Os parâmetros utilizados para a busca por proteínas homólogas à tubulina do *P. falciparum* no BLAST foram:

- *Algoritmo* – *blastp* (*protein-protein BLAST*) (ALTSCHUL et al., 1997; ALTSCHUL et al., 2005), o qual realiza uma varredura em bancos de dados de proteínas a partir de uma sequência proteica fornecida como entrada;
- *Sequência de entrada* – sequências FASTA Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002) para a cadeia α e Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002) para a cadeia β (Fig. 12), obtidas do UniProt como descrito na etapa anterior;

- *Banco de dados – Protein Data Bank proteins(pdb)*. Selecionou-se este banco pois contém 75499 sequências extraídas do PDB, com estruturas tridimensionais determinadas experimentalmente;
- *Matriz de substituição – BLOSUM62 (HENIKOFF e HENIKOFF, 1992)*. A matriz de substituição associa um *score* a cada par de resíduos alinhados, sendo a BLOSUM62 a matriz padrão do programa e recomendada para sequências com mais de 85 aminoácidos de extensão;
- *Penalidade dos gaps – Existence: 11 Extension: 1 (11,1)*, ou seja, há uma penalidade de -11 para cada *gap* existente no alinhamento, além de uma penalidade de -1 para cada resíduo de aminoácido no *gap*. Esses valores também são o padrão da ferramenta BLAST.

A pesquisa por proteínas homólogas também foi realizada utilizando o programa FASTA, o qual, assim como o BLAST, fornece uma busca por similaridade sequencial em bancos de dados de proteínas a partir de uma sequência de interesse (FASTA, s.d.; PEARSON e LIPMAN, 1988). Os parâmetros utilizados foram:

- *Algoritmo – FASTA*;
- *Sequência de entrada* – também foram utilizadas as sequências FASTA Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002) e Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002) (Fig. 12);
- *Banco de dados – Protein Structure Sequences*, que traz sequências de proteínas cujas estruturas tridimensionais são descritas no PDB;
- *Matriz de substituição – BLOSUM50*, matriz padrão do programa;
- *Penalidade dos gaps – -10 para gap open e -2 para gap extend*.

c. Obtenção das estruturas tridimensionais das proteínas homólogas

As estruturas tridimensionais das principais proteínas homólogas identificadas na etapa anterior foram obtidas do PDB. O critério para seleção destas estruturas foi possuir mais de 80% de identidade com as cadeias α e β da proteína do *P. falciparum* e ser uma tubulina de qualquer espécie.

d. Sobreposição estrutural e visualização molecular

A fim de se analisar e comparar as estruturas das proteínas homólogas candidatas a molde, foi realizada a sobreposição estrutural de todas as tubulinas obtidas no PDB, seguida da inspeção visual das mesmas. Como etapa preparatória, foi realizada a edição manual dos

arquivos no formato *.pdb*, mantendo-se apenas as cadeias α e β de cada tubulina, bem como os ligantes complexados à estas cadeias; as demais cadeias e ligantes, quando presentes, foram manualmente excluídas.

Para a sobreposição estrutural, utilizou-se a função *Iterative Magic Fit* disponível no *software* Swiss-PDB Viewer v.4.1.0. Com esta função, o programa compara as sequências primárias de duas proteínas, seleciona a melhor combinação entre os fragmentos de pares de aminoácidos e, baseado nesta, sobrepõe as moléculas. A sobreposição é então otimizada iterativamente pela minimização do *root-mean-square deviation* (RMSD) entre os carbonos α : as iterações são realizadas até que o RMSD não possa mais ser diminuído, mantendo o número de resíduos alinhados o mais alto possível (DEEVIEW USER GUIDE, 2001).

Para a análise e inspeção das estruturas das tubulinas obtidas do PDB e também das estruturas sobrepostas, utilizou-se o *software* de visualização molecular DS VISUALIZER 2.0 e o próprio Swiss-PDB Viewer v.4.1.0.

e. Alinhamentos sequenciais

Com o objetivo de se identificar quais são as substituições, inserções e deleções de aminoácidos que ocorrem na tubulina do *P. falciparum* em relação às proteínas homólogas de outros organismos, além de investigar quais são as regiões mais bem conservadas e as variáveis na tubulina, foi realizado o alinhamento sequencial múltiplo entre as sequências FASTA de tubulinas obtidas no PDB e as sequências Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002) e Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002) do *P. falciparum* (Fig. 12). Os alinhamentos sequenciais múltiplos são essenciais na maioria das análises bioinformáticas que envolvem comparar sequências homólogas (SIEVERS et al., 2011). Neste trabalho, o alinhamento múltiplo foi realizado por meio do servidor *online* Clustal Omega (CLUSTAL OMEGA, s.d.; SIEVERS et al., 2011), utilizando seus parâmetros padrões.

Também foram realizados alinhamentos *pairwise* globais entre as sequências de aminoácidos das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* (Fig. 12) e as mesmas cadeias da tubulina cuja estrutura experimental foi selecionada como molde para a modelagem por homologia: a tubulina bovina obtida no PDB sob o código **4o2b** (PROTA et al., 2014a). Um alinhamento *pairwise* global compara duas sequências de seu início até o seu final, alinhando cada “letra” em cada sequência apenas uma única vez. O alinhamento global foi realizado utilizando o BLAST, selecionando o algoritmo Needleman-Wunsch e seus parâmetros padrões.

f. Construção do modelo

Nesta etapa, foi realizada a construção do modelo da estrutura tridimensional do dímero da tubulina do *P. falciparum*, utilizando-se a estrutura da tubulina bovina sob o código PDB **4o2b** como molde e o *software* MODELLER v.9.14.

O MODELLER é o *software* utilizado para modelagem por homologia (ou comparativa) de estruturas tridimensionais de proteínas. A partir do alinhamento entre uma sequência de aminoácidos a ser modelada e estruturas relacionadas conhecidas, o programa calcula um modelo considerando uma série de restrições espaciais – tais como distâncias entre carbonos alfa, distâncias entre os átomos N–O da cadeia principal, ângulos diedro da cadeia principal e das cadeias laterais dos aminoácidos da proteína, além dos contatos entre átomos próximos obtidos de um campo de força da mecânica molecular (ŠALI e BLUNDELL, 1993; MARTÍ-RENOM et al., 2000). Os passos realizados neste trabalho para a construção do modelo no MODELLER v.9.14 são descritos a seguir.

Primeiramente, foi realizado o alinhamento da sequência de aminoácidos das cadeias da tubulina do *P. falciparum* com a estrutura da proteína-molde. Este é diferente do alinhamento sequência-sequência descrito no item anterior, pois se leva em consideração informações a respeito da estrutura da macromolécula. Aqui, aplica-se uma penalidade de modo que os *gaps* tendem a se localizar em regiões de *loop* e expostas ao solvente, fora de segmentos de estrutura secundária. Como resultado, os erros nos alinhamentos são reduzidos a aproximadamente um terço em relação àqueles que ocorrem nas técnicas de alinhamento sequenciais padrão (MODELLER DOCUMENTATION, s.d.).

Para realizar o alinhamento das sequências Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002) e Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002) (Fig. 12) do *P. falciparum* às cadeias α e β , respectivamente, da estrutura molde **4o2b**, criamos os *scripts* apresentados na Figura 13 e que foram rodados no MODELLER v.9.14.

Cadeia α

```

from modeller import *

env = environ()
aln = alignment(env)
mdl = model(env, file='4O2B', model_segment=('FIRST:A','LAST:A'))
aln.append_model(mdl, align_codes='4O2BA', atom_files='4O2B.pdb')
aln.append(file='PfTuA.ali', align_codes='PfTuA')
aln.align2d()
aln.write(file='PfTuA-4O2BA.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='PfTuA-4O2BA.pap', alignment_format='PAP')

```

Cadeia β

```

from modeller import *

env = environ()
aln = alignment(env)
mdl = model(env, file='4O2B', model_segment=('FIRST:B','LAST:B'))
aln.append_model(mdl, align_codes='4O2BB', atom_files='4O2B.pdb')
aln.append(file='PfTuB.ali', align_codes='PfTuB')
aln.align2d()
aln.write(file='PfTuB-4O2BB.ali', alignment_format='PIR')
aln.write(file='PfTuB-4O2BB.pap', alignment_format='PAP')

```

Figura 13 – *Scripts* utilizados para realizar o alinhamento sequência-estrutura no MODELLER v.9.14.

Nesses *scripts*, o termo “4O2B” corresponde à estrutura **4o2b** obtida no PDB e os termos “PfTuA” e “PfTuB” correspondem às sequências Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002) e Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002), respectivamente, obtidas no UniProt (Fig. 12).

Como neste trabalho planejou-se realizar o *docking* molecular das lignanas ariltetralônicas no sítio da colchicina, que se localiza na interface entre as cadeias α e β da tubulina (Fig. 10), o objetivo nesta etapa foi construir o dímero (cadeia α + cadeia β) da tubulina do *P. falciparum*, com a colchicina complexada neste sítio. Para isso, foram necessários alguns passos anteriores à geração do modelo. Primeiramente, o arquivo da estrutura **4o2b** foi editado manualmente, excluindo-se as cadeias C, D, E e F e mantendo-se apenas os ligantes GTP501 (guanosina trifosfato ligada à cadeia α), GDP501 (guanosina difosfato ligada à cadeia β) e LOC503 (colchicina ligada ao sítio da colchicina, na interface entre os monômeros) – os demais heteroátomos da estrutura também foram excluídos. Em seguida, o arquivo do alinhamento sequência-estrutura – gerado ao rodar o *script* apresentado na Figura 13 – foi editado manualmente para se considerar o dímero e estes três ligantes durante a geração do modelo estrutural. O alinhamento final encontra-se na Figura 14; neste, a sequência-alvo do parasita foi chamada de “lpft”.

```

>P1;4o2b
structureX:4o2b:.....:
MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYLEHGIQPDGQMP SDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGKHVPRAVFVDLEPTVI
DEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLDRIKRLADQCTGLQGFLVFHSHFGGGTGS GF
SLLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICCRRNLDIERPTYT
NLNRLISQIVSSITASLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
QMVKCDPRHGKYM ACCLLYRGDVVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTGFKVGINYPPTVVPGGDLAKVQRAV
CMLSNTTAIAEAWARLDHKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVDS /
MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTG SYHGSDLDQLERINVYNEATGNKYVPRAILVDLEPGTMS
VRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVVRKESESCDCLQGFQLTHSLGGGTGSGMGT
LISKIREEYPDRIMNTFSVMSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTTP TYGDL
NHLVSA TMSGVTTCLRFPGQLNADLRKLA VNMVFPRLHFFM PGFAPL-----QYRALTVPELTQQMFDSKNMM
AACDPRHG RYLTVAAIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNS SYFVEWI PNNVKTAVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQ
ELFKRISEQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDA...*

>P1;1pft
sequence:1pft:.....:
MREVISIHVGQAGIQVGNACWELFCLEHGIQPDGQMP SDKASRANDDAFNTFFSETGAGKHVPRCVFVDLEPTVV
DEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTIGKEVIDVCLDRIRKRLADNCTGLQGF LMFSAVGGGTGSGFG
CLMLERLSVDYGKSKLNFCCWSPQVSTAVVEPYNSVLSTHSLLEHTDVAIMLDNEAIYDICCRRNLDIERPTYT
NLNRLIAQVISL TASLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMLSSYAPVVS AEKAYHEQLSVSEITNSAFEPAN
MMAKCDPRHGKYM ACCLMYRGDVVPKDVNAAVATIKTKRTIQFVDWCPTGFKCGINYPPTVVPGGDLAKVMRAV
CMI SNSTAIAEVFSRMDQKFDL MYAKRA FVHWYV GEGMEEGEFSEAREDLA ALEKDYEEVGIES /
MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPSGTYCGSDLDQLERVDVFYNEATGGRYVPRAILMDLEPGTMS
VRAGPFGQLFRPDNFVFGQTGAGNNWAKGHYTEGAELIDAVLDVVRKEAEGCDCLQGFQITHSLGGGTGSGMGT
LISKIREEYPDRIMETFSVFPSPKVS DTVVEPYNATLSVHQLVENADEVQVIDNEALYDICFRTLKLTTP TYGDL
NHLVSAAMS GVTCSLRFPGQLNSDLRKLAVNLI PFPRLHFFMIGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMM
CASDPRHG RYLTA CAMFRGRMS TKEVDEQMLNVQNKNS SYFVEWI PHNTKSSVCDIPPKGLKMAVTFVGNSTAIQ
EMFKRVSDQFTAMFRRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVSEYQQYQDA...*

```

Figura 14 – Alinhamento dos dímeros de tubulina bovina (**4o2b**) e do *P. falciparum* (“1pft”) utilizado para a construção do modelo estrutural no MODELLER v.9.14.

As barras “/” indicam o término de uma cadeia e o início da outra, sinalizando a construção do modelo de um dímero (cadeia α + cadeia β). Os três pontos “...” ao final de cada sequência sinalizam que os três primeiros ligantes (grupo de heteroátomos) presentes no arquivo da estrutura-molde deverão ser considerados para a construção do modelo e incluídos na estrutura final modelada. Os últimos 14 resíduos de aminoácido da porção C-terminal da cadeia α e os últimos 17 da cadeia β foram manualmente excluídos do alinhamento estrutural, pois estas regiões não estão presentes na estrutura experimental **4o2b** e, além disso, localizam-se na superfície da proteína e distantes do sítio de ligação da colchicina; portanto, estas regiões não foram modeladas.

Uma vez preparado o arquivo contendo o alinhamento molde-alvo, no passo seguinte criamos um *script* para o MODELLER v.9.14 gerar o modelo tridimensional da tubulina do *P. falciparum* a partir deste alinhamento. Este *script* é apresentado na Figura 15.


```

from modeller import *
from modeller.automodel import *      # Load the automodel class

log.verbose()

class MyModel(automodel):
    def special_patches(self, aln):
        # Rename both chains and renumber the residues in each
        self.rename_segments(segment_ids=['A', 'B'],
                               renumber_residues=[1, 1])
        # Another way to label individual chains:
        self.chains[0].name = 'A'
        self.chains[1].name = 'B'

env = environ()
# directories for input atom files
env.io.atom_files_directory = ['.', '../atom_files']

# Read in HETATM records from template PDBs
env.io.hetatm = True

# Be sure to use 'MyModel' rather than 'automodel' here!
a = MyModel(env,
             alnfile = 'alignmen.ali' ,      # alignment filename
             knowns   = '4o2b',             # codes of the templates
             sequence = 'lpft')              # code of the target

a.starting_model= 2                        # index of the first model
a.ending_model  = 10                       # index of the last model
                                                    # (determines how many models to
calculate)
a.make()                                    # do homology modeling

```

Figura 15 – *Script* utilizado para gerar o modelo por homologia da tubulina do *P. falciparum* no MODELLER v.9.14.

O comando “env.io.hetatm = True” sinaliza que o programa deve considerar os heteroátomos do molde durante a construção do modelo; neste caso, os heteroátomos correspondiam aos ligantes GTP, GDP e colchicina. O termo “alignmen.ali” refere-se ao alinhamento apresentado na Figura 14, que serviu de base para a construção do modelo. A partir deste *script*, o MODELLER gerou nove modelos estruturais da tubulina do *P. falciparum*.

g. Avaliação do modelo

Como última etapa da modelagem por homologia, foram utilizados diferentes métodos para a avaliação/validação do modelo final gerado.

Primeiramente, foi realizado o *upload* do arquivo final do modelo em formato *pdb* no servidor PDBsum (LASKOWSKI et al., 1997), por meio da opção *PDBsum Generate*. Isto gerou uma vasta análise estrutural da proteína, como uma análise PROCHECK completa. O PROCHECK verifica a qualidade estereoquímica da estrutura da proteína, produzindo diversos

gráficos que analisam sua geometria geral e também resíduo por resíduo; é um programa útil para avaliar a qualidade de estruturas de proteínas modeladas a partir de estruturas conhecidas (LASKOWSKI et al., 1993).

Também foram gerados diagramas esquemáticos das estruturas secundárias que compõem as cadeias da tubulina por meio do programa PROMOTIF, o qual analisa um arquivo de coordenadas atômicas e fornece detalhes sobre os motivos estruturais na proteína (HUTCHINSON e THORNTON, 1996), além de diagramas das interações entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da tubulina por meio do programa LIGPLOT v.4.5.3 (WALLACE, LASKOWSKI e THORNTON, 1995).

O servidor ProSA (*Protein Structure Analysis*) (PROSA, s.d.; SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007) também foi utilizado para se avaliar a qualidade do modelo. Esta é uma ferramenta de diagnóstico bem estabelecida e frequentemente utilizada na validação de estruturas de proteínas; é baseada na análise estatística de todas as estruturas proteicas disponíveis e calcula um *score* global de qualidade para uma estrutura específica. Para isso, foi realizado o *upload* das cadeias α e β separadamente, gerando um *z-score* para cada uma.

Outra ferramenta utilizada para se inspecionar a qualidade do modelo gerado foi o servidor Verify_3D (UCLA MBI, s.d.; BOWIE, LÜTHY e EISENBERG, 1991; LÜTHY, BOWIE e EISENBERG, 1992). Este determina a compatibilidade entre o modelo atômico tridimensional e sua sequência de aminoácidos, por meio da atribuição de uma classe estrutural para cada resíduo – baseada na sua localização e ambiente – e comparação dos resultados com estruturas reconhecidamente de boa qualidade. Para isso, foi feito o *upload* do arquivo *pdb* do modelo no servidor, o qual gerou *scores* para todos os resíduos de aminoácidos do modelo.

Finalmente, também foi realizado o *upload* do modelo no servidor de avaliação de modelos *ModEval* (MODEVAL, s.d.). Esta é uma ferramenta para avaliação de modelos de estruturas de proteínas que fornece, entre outros dados, o valor do *score* GA341 – um *score* desenvolvido para se distinguir entre modelos com enovelamento correto ou incorreto (MELO e SALI, 2007; ERAMIAN et al, 2008).

2.1.5 Docking

Uma vez obtidas as coordenadas tridimensionais dos átomos das lignanas ariltetralônicas (por modelagem molecular) e da tubulina do *P. falcipaum* (por modelagem por homologia), o próximo passo foi realizar o *docking* molecular. Para esta simulação da formação dos complexos teóricos biomolécula-ligantes, foi utilizado o programa GOLD v.5.3.0 (*Genetic*

Optimisation for Ligand Docking), o qual faz uso de um algoritmo genético na busca por possíveis soluções (JONES, WILLETT e GLEN, 1995; JONES et al., 1997). Em estudo conduzido por Kontoyianni, McClellan e Sokol (2004), o GOLD foi o programa mais confiável para prever modos de ligação, entre cinco dos programas de *docking* mais utilizados. Uma revisão sobre algoritmos genéticos aplicados ao *docking* molecular e sobre o programa GOLD está disponível na dissertação de mestrado apresentada neste mesmo Programa de Pós-Graduação (CORRÊA, 2010).

Neste trabalho, foram realizados dois experimentos de *docking*, na sequência:

1 – *redocking* e *cross-docking* da colchicina e da podofilotoxina, respectivamente, na estrutura **4o2b**. O ligante colchicina foi extraído da própria **4o2b**, enquanto que a podofilotoxina foi extraída da estrutura **1sa1** (RAVELLI et al., 2004);

2 – *docking* da colchicina, da podofilotoxina e das lignanas ariltetralônicas na tubulina modelada do *P. falciparum*.

O primeiro experimento foi realizado na proteína molde (**4o2b**) com o objetivo de se validar os parâmetros a serem utilizados para o *docking* na proteína modelada (tubulina do *P. falciparum*).

Simulações de *docking* proteína-ligante geralmente não são aplicadas a toda a superfície da proteína. Ao invés disso, podem ser utilizadas informações biológicas sobre o alvo proteico para se determinar o sítio de ligação e, então, o *docking* subsequente fica restrito ao sítio de interesse (GRINTER e ZOU, 2014). Nos experimentos realizados neste trabalho, o sítio de ligação foi definido como sendo composto por todos os átomos da proteína presentes em até 6,0 Å ao redor do ligante colchicina.

A função *score* selecionada para os cálculos foi a ChemPLP, a qual tem se mostrado possuir maiores taxas de sucesso tanto para a predição do modo de ligação quanto para experimentos de *screening* virtual (LIEBESCHUETZ, COLE e KORB, 2012; GOLD USER GUIDE, 2014). Esta é a função padrão do GOLD v.5.3.0.

Para os parâmetros do algoritmo genético, foi selecionado o modo *Automatic*, no qual o próprio programa calcula automaticamente um número otimizado de operações genéticas (*crossover*, migração e mutação) dependendo das características do ligante (número de ligações rotacionáveis, volume do sítio de ligação, entre outras) (GOLD USER GUIDE, 2014). Os parâmetros evolucionários pré-definidos pelo GOLD v.5.3.0 em cada cálculo foram:

- Número de operadores genéticos aplicados em cada cálculo = entre 33500 e 48000;
- Tamanho da população (número de cromossomos na população) = 100;
- Pressão de seleção = 1.100;

- Número de ilhas = entre 3 e 4;
- Tamanho do nicho = 2;
- Pesos dados aos operadores = 95, 95 e 10 para cruzamento, mutação e migração, respectivamente.

2.2 Resultados e Discussão

Nesta seção, serão apresentados e discutidos os resultados obtidos no trabalho: a obtenção da estrutura tridimensional das lignanas ariltetralônicas por modelagem molecular; a identificação do potencial alvo macromolecular destes ligantes, por meio da pesquisa em diferentes bancos de dados; a obtenção da estrutura tridimensional da tubulina do *P. falciparum* por modelagem por homologia; por fim, a identificação do possível mecanismo de ação das lignanas por meio de *docking* molecular.

2.2.1 A Estrutura Tridimensional das Lignanas Ariltetralônicas

As lignanas ariltetralônicas estudadas, descritas por Andrade-Neto et al. (2007) e cujo mecanismo de ação não é compreendido, foram modeladas utilizando-se os *softwares* MarvinSketch 14.12.15.0 e VegaZZ 3.0.5.12 e suas estruturas tridimensionais são mostradas na Figura 16.

Como se pode observar, as estruturas tridimensionais dos compostos **1** a **6** são semelhantes, o que já era esperado uma vez que as únicas diferenças entre eles são os substituintes presentes nos anéis A e C, que podem ser um grupo dimetóxi ou um metilenodióxi, e a configuração dos estereocentros presentes no anel B (Fig. 7).

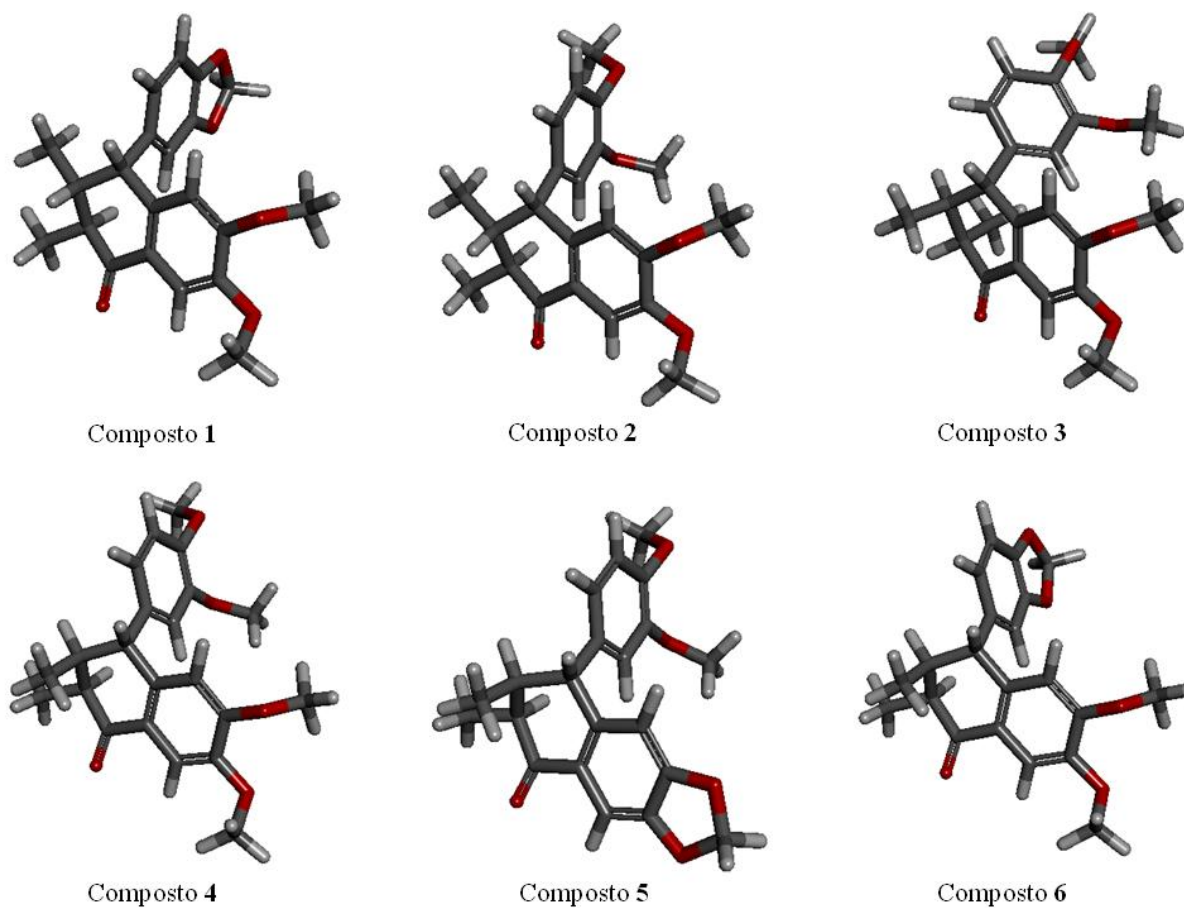


Figura 16 – Estruturas tridimensionais das lignanas ariltetralônicas obtidas por modelagem molecular. Os átomos de carbono são representados na cor cinza, os de oxigênio são representados em vermelho e os de hidrogênio na cor branca.

2.2.2 A Identificação do Alvo Biológico

Descobrir quais ligantes, dentre uma vasta biblioteca de compostos, são prováveis de se ligarem a uma proteína de interesse já está se tornando uma rotina na química computacional. O problema inverso, no entanto, ainda é uma questão difícil: a partir de um determinado composto, tentar descobrir seu alvo mais provável (PAUL et al., 2004). E este foi um dos pontos principais deste trabalho: identificar o possível alvo biológico das lignanas ariltetralônicas no organismo do *P. falciparum* causador da malária, a fim de se elucidar o mecanismo de ação destes compostos (ANDRADE-NETO et al., 2007). Para isso, foi realizada uma busca em diferentes bancos de dados por ligantes estruturalmente semelhantes às lignanas estudadas (Fig. 11).

Segundo Liu et al. (2007), uma das potenciais aplicações de um banco de dados de afinidades de ligação é a de elucidar o mecanismo de ação de uma molécula biológica: se

determinado composto químico de ocorrência natural inibe a proliferação celular, por exemplo, uma busca em bancos de dados por ligantes quimicamente similares pode revelar um composto semelhante que se liga a uma proteína conhecida por estar envolvida na regulação do ciclo celular – esta proteína seria, portanto, um possível alvo.

Os resultados quantitativos obtidos nesta pesquisa estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3 – Quantidade de compostos químicos obtidos nos bancos de dados a partir da busca por ligantes similares a cada uma das lignanas ariltetralônicas estudadas e à sua subestrutura (Fig. 11)

| Banco de dados | Compostos similares | | | | | | Subestrutura |
|----------------|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| PubChem | 1.150 | 2.008 | 2.008 | 2.008 | 1.150 | 1.150 | 3.386 |
| GenomeNet | 609 | 617 | 617 | 617 | 600 | 609 | 6 |
| ZINC | 251 | 197 | 197 | 197 | 282 | 251 | 560 |
| CARLSBAD | 43 | 78 | 78 | 78 | 38 | 43 | 30 |
| ChEMBL | 13 | 11 | 11 | 11 | 16 | 13 | 370 |
| BindingDB | 9 | 34 | 34 | 34 | 7 | 9 | 17 |
| ChEBI | 1 | 3 | 3 | 3 | 1 | 1 | 7 |
| PDB | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 3 |
| DrugBank | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| PDBChem | - | - | - | - | - | - | 3 |

O conjunto de ligantes obtido em cada um destes bancos foi explorado com o objetivo de se identificar seus alvos biológicos. Foi feita uma análise selecionando-se apenas os ligantes que possuíam atividade experimental descrita na literatura e alvo macromolecular conhecido. Os principais compostos químicos que atenderam a estes critérios são apresentados na Tabela 4, juntamente com sua estrutura, seus dados de atividade e alvo proteico.

Tabela 4 – Principais ligantes obtidos, similares às lignanas ariltetralônicas, com alvo conhecido e atividade experimental determinada

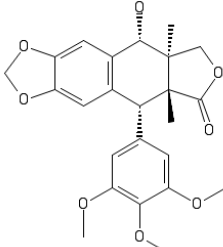
| Estrutura | Identificação ^a | Atividade ^b | Alvo proteico | Referência(s) |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|----------------|----------------------|
|  | Podofilotoxina CHEMBL: 61 CID: 10607 SID: 10316808 ZINC: 03861806 | IC₅₀: 0,35 μM | Tubulina suína | Prinz et al. (2011) |
| | | IC₅₀: 0,35 μM | Tubulina suína | Nickel et al. (2010) |
| | | IC₅₀: 0,35 μM | Tubulina suína | Surkau et al. (2010) |
| | | IC₅₀: 0,35 μM | Tubulina suína | Zuse et al. (2006) |

Tabela 4 (continuação) – Principais ligantes obtidos, similares às lignanas ariltetralônicas, com alvo conhecido e atividade experimental determinada

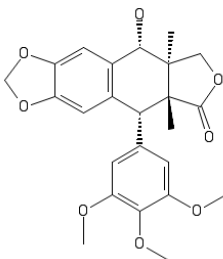
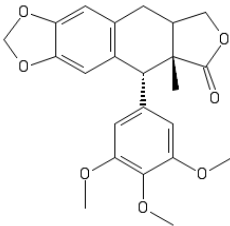
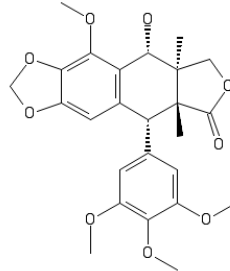
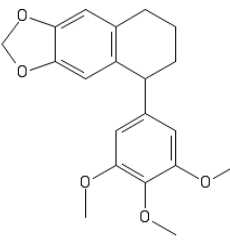
| Estrutura | Identificação^a | Atividade^b | Alvo proteico | Referência(s) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|------------------------|----------------------------|
|  <p>Podofilotoxina CHEMBL: 61 CID: 10607 SID: 10316808 ZINC: 03861806</p> | | IC₅₀: 0,35 μM | Tubulina suína | Prinz et al. (2003) |
| | | IC₅₀: 0,46 μM | Tubulina bovina | Hour et al. (2000) |
| | | IC₅₀: 0,46 μM | Tubulina de rato | Xia et al. (1998) |
| | | IC₅₀: 0,46 μM | Tubulina bovina | Li et al. (1994) |
| | | IC₅₀: 0,59 μM | Tubulina bovina | Zhang et al. (1999) |
| | | IC₅₀: 0,60 μM | Tubulina bovina | Song, Zhang e Chang (1994) |
| | | IC₅₀: 1,20 μM | Tubulina bovina | Goldbrunner et al. (1997) |
| | | IC₅₀: 1,30 μM | Tubulina bovina | Kuo et al. (1993) |
| | | IC₅₀: 1,40 μM | Tubulina suína | Morgan et al. (2008) |
| | | IC₅₀: 1,56 μM | Tubulina suína | Li et al. (2005) |
| | | IC₅₀: 1,65 μM | Tubulina suína | Zavala et al. (1980) |
| | | IC₅₀: 1,70 μM | Tubulina humana | Hallur et al. (2006) |
| | | IC₅₀: 1,70 μM | Tubulina bovina | Romagnoli et al. (2006) |
| | | IC₅₀: 3,00 μM | Tubulina de ovelha | Daley et al. (1998) |
| | IC₅₀: 4,00 μM | Tubulina bovina | Mahboobi et al. (2006) | |
| | IC₅₀: 23,35 μM | Tubulina de cabra | Liu et al. (2012) | |

Tabela 4 (continuação) – Principais ligantes obtidos, similares às lignanas ariltetralônicas, com alvo conhecido e atividade experimental determinada

| Estrutura | Identificação ^a | Atividade ^b | Alvo proteico | Referência(s) |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------|----------------------|
|  | Desoxipodofilotoxina CHEMBL: 149525 CID: 72434 SID: 103398721 ZINC: 01575139 | IC₅₀: 2,10 μM | Tubulina suína | Zavala et al. (1980) |
|  | 5-metoxipodofilotoxina CHEMBL: 292945 CID: 3035544 SID: 103258808 ZINC: 26182697 | IC₅₀: 5,00 μM | Tubulina suína | Zhang et al. (2007) |
|  | 5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[f][1,3]benzodioxole CHEMBL: 81233 CID: 15931564 SID: 103284240 ZINC: 26488608 | IC₅₀: 2,40 μM | Tubulina bovina | Huber et al. (1991) |

^a **CHEMBL:** CHEMBL ID do composto, atribuído pelo ChEMBL (CHEMBL, s.d.);
CID: *Compound Identifier*, identificador permanente atribuído pelo PubChem (PUBCHEM, s.d.);
SID: *Substance Identifier*, identificador permanente atribuído pelo PubChem (PUBCHEM, s.d.);
ZINC: código identificador atribuído pelo ZINC (ZINC, s.d.);

^b Atividade medida na forma de **IC₅₀** – concentração do composto necessária para 50% de inibição.

Como principal resultado obtido nesta etapa do trabalho, pode-se destacar que a podofilotoxina foi identificada em todos os bancos de dados pesquisados como estruturalmente semelhante às lignanas ariltetralônicas (Tabelas 3 e 4). Nestes mesmos bancos, foi possível extrair informações adicionais a respeito deste fármaco e, com isso, identificar seu modo de ação e alvos biológicos.

A podofilotoxina é também uma lignana e tem sua ação farmacológica classificada como “moduladora da tubulina”, ou seja, é um agente que interage com a tubulina para inibir ou promover a polimerização de microtúbulos (CHEBI, s.d.; PUBCHEM, s.d. – CID 10607 e SID 103168084). É um fármaco aprovado, utilizado no tratamento de condiloma acuminado ou verrugas genitais (CHEBI, s.d.; DRUGBANK, s.d.).

Foram encontrados diferentes trabalhos na literatura que descrevem a capacidade da podofilotoxina em se ligar e inibir a tubulina de diferentes organismos, com atividade

inibitória na ordem de micromolar (Tabela 4). Outro resultado expressivo foi obtido a partir da pesquisa nos bancos de dados de estruturas tridimensionais de macromoléculas biológicas PDB e PDBeChem, onde foi encontrada a estrutura tridimensional de código PDB **1sa1** (RAVELLI et al., 2004) que apresenta a podofilotoxina (sob o código de três letras *POD*) complexada ao sítio de ligação da colchicina em uma tubulina bovina.

Além da podofilotoxina, a desoxipodofilotoxina e a 5-metoxipodofilotoxina também foram identificadas nas buscas. Zavala et al. (1980) mostraram que a desoxipodofilotoxina inibe a polimerização da tubulina de forma competitiva à colchicina. Já Zhang et al. (2007) mostraram que a 5-metoxipodofilotoxina também exibe atividade antitubulina.

Por fim, o composto 5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[f][1,3]benzodioxole, semelhante aos compostos estudados, também inibe a tubulina bovina (HUBER et al., 1991).

Portanto, como foram identificados ligantes estruturalmente semelhantes às lignanas ariltetralônicas e que exibem afinidade experimental pela proteína tubulina de diferentes organismos, neste trabalho selecionou-se a tubulina do *P. falciparum* como possível alvo biológico destes compostos com atividade antiplasmodial conhecida (ANDRADE-NETO et al., 2007). Esta proteína plasmodial, no entanto, não possui estrutura tridimensional determinada experimentalmente, de modo que o passo seguinte do trabalho foi realizar sua modelagem molecular por homologia.

2.2.3 A Estrutura Tridimensional da Tubulina do *P. falciparum*

A cadeia α da tubulina do *P. falciparum*, cepa 3D7 (**PfTuA**), possui uma sequência de 453 aminoácidos, codificada pelo gene PFI0180w localizado no cromossomo 9 do parasita. Já a cadeia β da mesma proteína (**PfTuB**) possui uma sequência de 445 aminoácidos, codificada pelo gene PF10_0084 localizado no cromossomo 10 do *P. falciparum* (NCBI, s.d.). A primeira etapa para se modelar a estrutura tridimensional do dímero desta proteína (**PfTu**) foi encontrar proteínas homólogas a cada uma das cadeias, com estrutura conhecida.

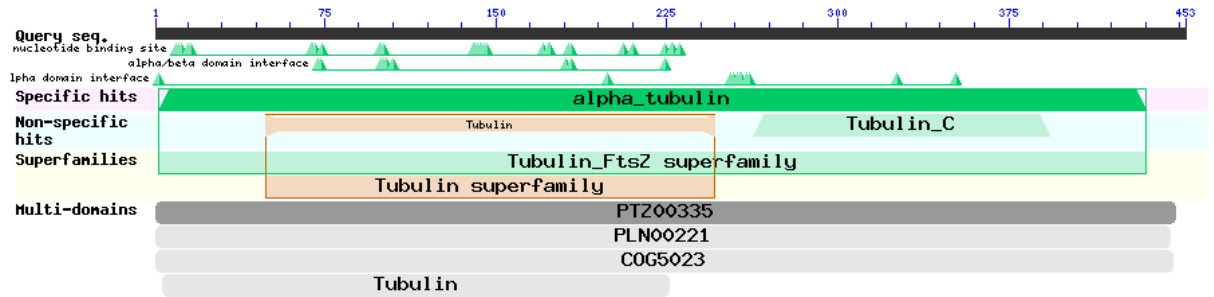
2.2.3.1 Proteínas homólogas à tubulina do *P. falciparum*

Em uma análise inicial das sequências de aminoácidos da **PfTuA** e da **PfTuB** utilizando o recurso *Conserved Domain Database* (CDD, s.d.; MARCHLER-BAUER et al., 2015), identificou-se que ambas possuem domínios reconhecidos como pertencentes à superfamília de proteínas tubulina (Fig. 17). O *Conserved Domain Database* é um recurso que descreve as unidades funcionais de proteínas. Neste, um *specific hit* representa uma associação de alta confiabilidade entre uma sequência proteica e um determinado domínio – consequentemente, uma alta confiabilidade a respeito da função inferida para a proteína em questão. Para cada *hit* é associado um *E-value*, parâmetro que descreve o número de resultados que se espera encontrar ao acaso; isto significa que quanto mais próximo de zero for este valor, mais significativo será o resultado.

Para a cadeia α , é possível observar que praticamente toda sua extensão (intervalo entre os resíduos 2-435) corresponde a um domínio de α tubulina (*specific hit*), com um *E-value* de $0e+00$; o mesmo ocorre para a cadeia β , a qual corresponde a um domínio de β tubulina (Fig. 17). Além disso, também foram identificados resíduos de aminoácidos envolvidos em sítios e características estruturais conservados, como os sítios de ligação de nucleotídeos e do taxol, além do domínio da interface alfa/beta – representados como triângulos verdes na Figura 17.

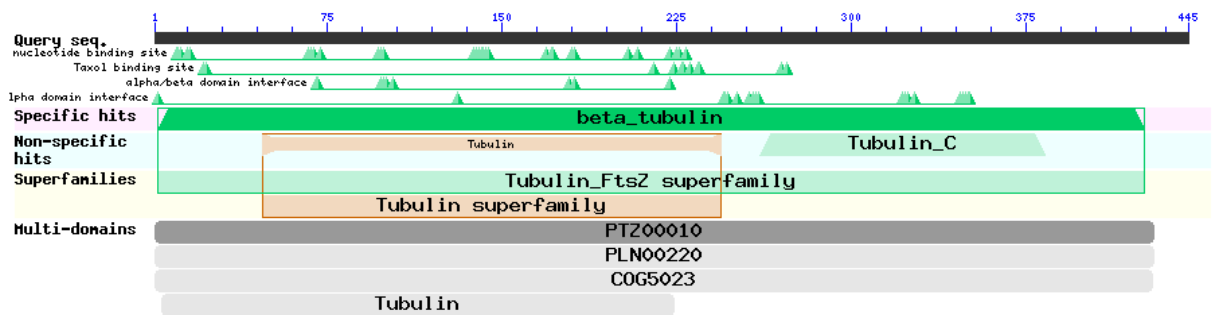
Ao realizar a busca por estruturas homólogas à **PfTuA** e **PfTuB** no BLAST e no FASTA foram encontradas sequências de proteínas com mais de 80% de identidade e com estrutura tridimensional determinada experimentalmente. A maioria destas corresponde a tubulinas de mamíferos. As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados com identidade acima de 80% obtidos para a **PfTuA** e **PfTuB**, respectivamente.

Nessas tabelas, os *scores* (tanto para o BLAST quanto para o FASTA) são valores numéricos que descrevem a qualidade do alinhamento: quanto maior o valor, maior a similaridade entre as sequências (a escala destes *scores* depende da matriz de substituição escolhida e das penalidades atribuídas aos *gaps* durante o alinhamento). Já o *E-value* representa o número de resultados que se espera encontrar ao acaso no banco de dados, de modo que quanto menor este valor, mais significativo é o resultado.



| + | Name | Accession | Description | Interval | E-value |
|-----|---------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| [+] | alpha_tubulin | cd02186 | The tubulin superfamily includes five distinct families, the alpha-, beta-, gamma-, delta-, ... | 2-435 | 0e+00 |
| [+] | Tubulin_C | pfam03953 | Tubulin C-terminal domain; This family includes the tubulin alpha, beta and gamma chains. ... | 263-393 | 1.46e-72 |
| [+] | Tubulin | smart00864 | Tubulin/FtsZ family, GTPase domain; This domain is found in all tubulin chains, as well as the ... | 49-246 | 2.94e-61 |
| [+] | PTZ00335 | PTZ00335 | tubulin alpha chain; Provisional | 1-448 | 0e+00 |
| [+] | PLN00221 | PLN00221 | tubulin alpha chain; Provisional | 1-446 | 0e+00 |
| [+] | COG5023 | COG5023 | Tubulin [Cytoskeleton] | 1-447 | 0e+00 |
| [+] | Tubulin | pfam00091 | Tubulin/FtsZ family, GTPase domain; This family includes the tubulin alpha, beta and gamma ... | 4-226 | 1.49e-64 |

Cadeia α



| + | Name | Accession | Description | Interval | E-value |
|-----|--------------|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|----------|
| [+] | beta_tubulin | cd02187 | The tubulin superfamily includes five distinct families, the alpha-, beta-, gamma-, delta-, ... | 2-426 | 0e+00 |
| [+] | Tubulin_C | pfam03953 | Tubulin C-terminal domain; This family includes the tubulin alpha, beta and gamma chains. ... | 261-383 | 4.03e-71 |
| [+] | Tubulin | smart00864 | Tubulin/FtsZ family, GTPase domain; This domain is found in all tubulin chains, as well as the ... | 47-244 | 1.38e-60 |
| [+] | PTZ00010 | PTZ00010 | tubulin beta chain; Provisional | 1-430 | 0e+00 |
| [+] | PLN00220 | PLN00220 | tubulin beta chain; Provisional | 1-430 | 0e+00 |
| [+] | COG5023 | COG5023 | Tubulin [Cytoskeleton] | 1-429 | 0e+00 |
| [+] | Tubulin | pfam00091 | Tubulin/FtsZ family, GTPase domain; This family includes the tubulin alpha, beta and gamma ... | 4-224 | 2.56e-61 |

Cadeia β

Figura 17 – Domínios identificados para as cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* – sequências Q7KQL5 (GARDNER et al., 2002) e Q6ZLZ9 (HALL et al., 2002), respectivamente – utilizando o recurso *Conserved Domain Database*.

Tabela 5 – Proteínas homólogas à cadeia α da tubulina do *P. falciparum* obtidas no BLAST e FASTA para a sequência Q7KQL5

| Código de acesso^a | Descrição | Score BLAST | Score FASTA | E-value BLAST | E-value FASTA | Identidade (%) | Positivos (%) |
|-------------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------|--------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| 1Z2B_A ^b | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 795 | 2634 | 0.0 | 8.2E-194 | 84.0 | 95.3 |
| 3HKB_A ^c | Cadeia α da tubulina (<i>Ovis aries</i>) | 791 | 2658 | 0.0 | 1.2E-195 | 84.2 | 96.0 |
| 4I4T_A ^d | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 790 | 2656 | 0.0 | 1.7E-195 | 84.0 | 96.0 |
| 3RYC_A ^e | Cadeia α da tubulina (<i>Ovis aries</i>) | 790 | 2656 | 0.0 | 1.7E-195 | 84.0 | 96.0 |
| 4DRX_A ^f | Cadeia α da tubulina (<i>Ovis aries</i>) | 788 | 2606 | 0.0 | 1.1E-191 | 84.7 | 96.3 |
| 3DU7_A ^g | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 788 | 2632 | 0.0 | 1.2E-193 | 83.5 | 95.1 |
| 1SA0_A ^h | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 786 | 2645 | 0.0 | 1.2E-194 | 83.8 | 95.8 |
| 1FFX_A ⁱ | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 785 | 2639 | 0.0 | 3.4E-194 | 83.6 | 95.6 |
| 3J6E_A ^j | Cadeia α da tubulina (<i>Sus scrofa</i>) | 783 | 2593 | 0.0 | 1.1E-190 | 84.1 | 95.9 |
| 1TUB_A ^k | Cadeia α da tubulina (<i>Sus scrofa</i>) | 783 | 2593 | 0.0 | 1.1E-190 | 84.1 | 95.9 |
| 1JFF_A ^l | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 783 | 2636 | 0.0 | 5.8E-194 | 83.6 | 95.6 |

^a Código da estrutura no PDB. Estruturas semelhantes são agrupadas em uma mesma saída, as quais são apresentadas nos próximos itens.

^b Estruturas no mesmo grupo: 1Z2B_C

^c Estruturas no mesmo grupo: 3HKB_C; 3HKC_A; 3HKC_C; 3HKD_A; 3HKD_C; 3HKE_A; 3HKE_C; 3N2G_A; 3N2G_C; 3N2K_A; 3N2K_C

^d Estruturas no mesmo grupo: 4I4T_C; 4I55_A; 4I55_C; 4IHJ_A; 4IHJ_C

^e Estruturas no mesmo grupo: 3RYC_C; 3RYF_A; 3RYF_C; 3RYH_A; 3RYH_C; 3RYI_A; 3RYI_C; 4F61_A; 4F61_C; 4F6R_A; 3UT5_A; 3UT5_C; 4EB6_A; 4EB6_C; 4I50_A; 4I50_C; 4IIJ_A; 4IIJ_C; 4HNA_A; 4O2A_A; 4O2A_C; 4O2B_A; 4O2B_C; 4O4H_A; 4O4H_C; 4O4I_A; 4O4I_C; 4O4J_A; 4O4J_C; 4O4L_A; 4O4L_C; 4TUY_A; 4TUY_C; 4TV8_A; 4TV8_C; 4TV9_A; 4TV9_C; 4LNU_A; 3J8X_A; 3J8Y_A; 4WBN_A; 4WBN_C

^f Estruturas no mesmo grupo: 4DRX_C

^g Estruturas no mesmo grupo: 3DU7_C; 3E22_A; 3E22_C

^h Estruturas no mesmo grupo: 1SA0_C; 1SA1_A; 1SA1_C; 3EDL_F

ⁱ Estruturas no mesmo grupo: 1FFX_C; 1IA0_A; 2HXF_A; 2HXH_A; 2P4N_A

^j Estruturas no mesmo grupo: 3J6E_C; 3J6F_A; 3J6F_C; 3J6G_A; 3J6G_C

^k Estruturas no mesmo grupo: 1TVK_A

^l Estruturas no mesmo grupo: 3EDL_A; 3DCO_A; 2WBE_A; 3IZ0_A; 4ABO_B; 4ABO_D; 3J1T_B; 3J1U_B; 3J2U_A; 3J2U_C; 4UXO_A; 4UXP_A; 4UXR_A; 4UXS_A; 4UXT_A; 4UXY_A; 4UY0_A; 3J7I_A; 3J6P_A

Tabela 6 – Proteínas homólogas à cadeia β da tubulina do *P. falciparum* obtidas no BLAST e FASTA para a sequência Q6ZLZ9

| Código de acesso ^a | Descrição | Score BLAST | Score FASTA | E-value BLAST | E-value FASTA | Identidade (%) | Positivos (%) |
|-------------------------------|---------------------------------------------------|-------------|-------------|---------------|---------------|----------------|---------------|
| 4DRX_B ^b | Cadeia α da tubulina (<i>Ovis aries</i>) | 798 | 2654 | 0.0 | 2.1E-177 | 88.6 | 97.7 |
| 4F61_B ^c | Cadeia α da tubulina (<i>Ovis aries</i>) | 798 | 2725 | 0.0 | 2.4E-182 | 88.3 | 97.5 |
| 3DU7_B ^d | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 798 | 2724 | 0.0 | 2.8E-182 | 88.3 | 97.5 |
| 4I4T_B ^e | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 797 | 2726 | 0.0 | 2.0E-182 | 88.3 | 97.5 |
| 1Z2B_B ^f | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 797 | 2723 | 0.0 | 3.3E-182 | 88.3 | 97.3 |
| 1FFX_B ^g | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 796 | 2703 | 0.0 | 8.2E-181 | 87.9 | 96.9 |
| 2XRP_A ^h | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 796 | 2723 | 0.0 | 3.3E-182 | 88.3 | 97.3 |
| 3RYC_B ⁱ | Cadeia α da tubulina (<i>Ovis aries</i>) | 795 | 2717 | 0.0 | 8.7E-182 | 87.9 | 97.3 |
| 4LNU_B | Cadeia α da tubulina (<i>Ovis aries</i>) | 794 | 2715 | 0.0 | 1.2E-181 | 87.4 | 97.3 |
| 1TUB_B ^j | Cadeia α da tubulina (<i>Sus scrofa</i>) | 791 | 2635 | 0.0 | 4.3E-176 | 88.8 | 97.4 |
| 4UY0_B | Cadeia α da tubulina (<i>Bos taurus</i>) | 788 | 2628 | 0.0 | 1.3E-175 | 88.7 | 97.4 |

^a Código da estrutura no PDB. Estruturas semelhantes são agrupadas em uma mesma saída, as quais são apresentadas nos próximos itens.

^b Estruturas no mesmo grupo: 4DRX_D

^c Estruturas no mesmo grupo: 4F61_D; 4HNA_B; 3J8X_B; 3J8Y_B

^d Estruturas no mesmo grupo: 3DU7_D; 3E22_B; 3E22_D; 3HKB_B; 3HKB_D; 3HKC_B; 3HKC_D; 3HKD_B; 3HKD_D; 3HKE_B; 3HKE_D; 3N2G_B; 3N2G_D; 3N2K_B; 3N2K_D

^e Estruturas no mesmo grupo: 4I4T_D; 4I50_B; 4I50_D; 4I55_B; 4I55_D; 4IIJ_B; 4IIJ_D; 4IHJ_B; 4IHJ_D; 4O2A_B; 4O2A_D; 4O2B_B; 4O2B_D; 4O4H_B; 4O4H_D; 4O4I_B; 4O4I_D; 4O4J_B; 4O4J_D; 4O4L_B; 4O4L_D; 4TUY_B; 4TUY_D; 4TV8_B; 4TV8_D; 4TV9_B; 4TV9_D; 4WBN_B; 4WBN_D

^f Estruturas no mesmo grupo: 1Z2B_D

^g Estruturas no mesmo grupo: 1FFX_D; 1JFF_B; 1IA0_B; 1SA0_B; 1SA0_D; 1SA1_B; 1SA1_D; 2HXF_B; 2HXH_B; 2P4N_B; 3EDL_B; 3EDL_G; 3DCO_B; 2WBE_B; 3IZ0_B; 4ABO_A; 4ABO_C; 3J2U_B; 3J2U_D; 4UXO_B; 4UXP_B; 4UXR_B; 4UXS_B; 4UXT_B; 4UXY_B; 3J7I_B; 3J6P_B

^h Estruturas no mesmo grupo: 2XRP_C; 4ATU_A; 4ATU_C; 4ATX_A; 4AQV_B; 4AQW_B; 4CK5_B; 4CK6_B; 4CK7_B

ⁱ Estruturas no mesmo grupo: 3RYC_D; 3RYF_B; 3RYF_D; 3RYH_B; 3RYH_D; 3RYI_B; 3RYI_D; 4F6R_B; 3UTR_B; 3UTR_D; 4EB6_B; 4EB6_D

^j Estruturas no mesmo grupo: 1TVK_B; 3J1T_C; 3J1U_C; 3J6E_B; 3J6E_D; 3J6F_B; 3J6F_D; 3J6G_B; 3J6G_D

Para um experimento de modelagem por homologia, a sequência-alvo deve apresentar ao menos 30% de identidade sequencial com um molde estrutural (MARTÍ-RENOM et al., 2000). Sendo assim, levando-se em conta apenas a identidade sequencial, qualquer uma das estruturas de tubulina apresentadas nas Tabelas 5 e 6 poderiam, a princípio, servir como molde neste trabalho – todas apresentam mais de 83% de identidade.

2.2.3.2 Escolha do molde

Como foram obtidas quase 50 proteínas homólogas, com uma faixa muito próxima de identidade, *score* e *E-value* (Tabelas 5 e 6), foi necessário realizar um estudo estrutural destas macromoléculas para se escolher o melhor molde para a construção do modelo. Para isso, todas as estruturas de tubulina com identidade maior do que 80% em relação à sequência-alvo foram extraídas do PDB, sobrepostas e analisadas. A partir da sobreposição estrutural (Fig. 18), identificou-se o sítio de ligação ocupado pelos ligantes de cada proteína candidata a molde.

A relação destas estruturas aparece na Tabela 7, bem como informações importantes para a escolha do molde, como: presença de ligante e seu respectivo sítio de ligação, resolução da estrutura, *R-value* e fonte.

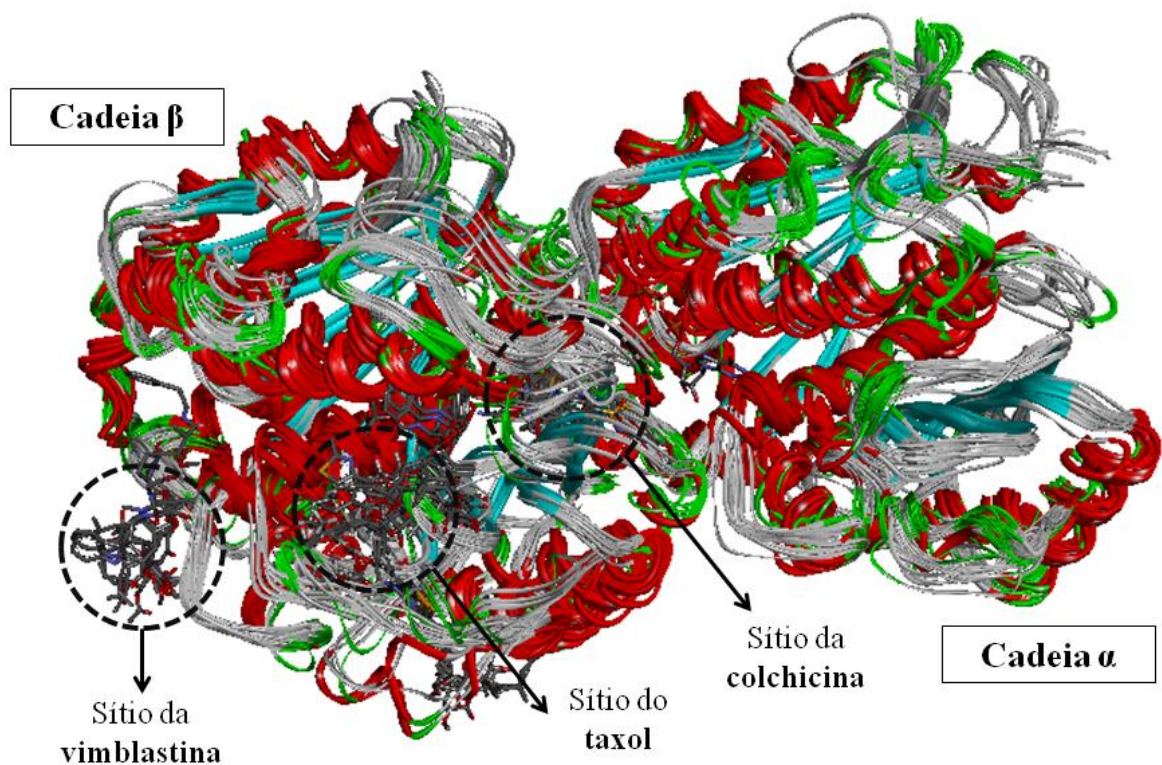


Figura 18 – Sobreposição das estruturas de tubulina obtidas a partir do PDB (Tabela 7).

Tabela 7 – Relação das estruturas experimentais das tubulinas depositadas no PDB

| Código^a | Ligante(s) | Sítio(s) | Método exp.^b | Res.^c (Å) | R-value (obs.) | Fonte | Referência |
|---------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------------------|-------------------|--------------------------------|
| 1ffx | - | - | RX | 3,95 | 0,267 | <i>Bos taurus</i> | Gigant et al. (2000) |
| 1ia0 | Docetaxel | Taxol | ME | 15,00 | - | <i>Sus scrofa</i> | Kikkawa et al. (2001) |
| 1jff | Taxol | Taxol | ME | 3,50 | - | <i>Bos taurus</i> | Löwe et al. (2001) |
| 1sa0 | Colchicina | Colchicina | RX | 3,58 | 0,233 | <i>Bos taurus</i> | Ravelli et al. (2004) |
| 1sa1 | Podofilotoxina | Colchicina | RX | 4,20 | 0,206 | <i>Bos taurus</i> | Ravelli et al. (2004) |
| 1tub | Docetaxel | Taxol | ME | 3,70 | - | <i>Sus scrofa</i> | Nogales, Wolf e Downing (1998) |
| 1tvk | Epotilona A | Taxol | ME | 2,89 | - | <i>Bos taurus</i> | Nettles et al. (2004) |
| 1z2b | Colchicina Vimblastina | Colchicina Vimblastina | RX | 4,10 | 0,212 | <i>Bos taurus</i> | Gigant et al. (2005) |
| 2hxf | Taxol | Taxol | ME | 10,00 | - | <i>Sus scrofa</i> | Kikkawa e Hirokawa (2006) |
| 2hxx | Taxol | Taxol | ME | 11,00 | - | <i>Sus scrofa</i> | Kikkawa e Hirokawa (2006) |
| 2p4n | Taxol | Taxol | ME | 9,00 | - | <i>Bos taurus</i> | Sindelar e Downing (2007) |
| 2wbe | Taxol | Taxol | ME | 9,40 | - | <i>Bos taurus</i> | Bodey, Kikkawa e Moores (2009) |
| 2xrp | - | - | ME | 8,20 | - | <i>Bos taurus</i> | Fourniol et al. (2010) |
| 3dco | Taxol | Taxol | ME | 11,00 | - | <i>Bos taurus</i> | Cochran et al. (2009) |
| 3du7 | Colchicina Fomopsina A | Colchicina Vimblastina | RX | 4,10 | 0,218 | <i>Bos taurus</i> | Cormier et al. (2008) |
| 3e22 | Colchicina Soblidotina | Colchicina Vimblastina | RX | 3,80 | 0,231 | <i>Bos taurus</i> | Cormier et al. (2008) |
| 3edl | Colchicina Taxol | Colchicina Taxol | ME | 28,00 | - | <i>Bos taurus</i> | Tan, Rice e Sosa (2008) |
| 3hkb | - | - | RX | 3,65 | 0,216 | <i>Ovis aries</i> | Dorléans et al. (2009) |
| 3hkc | E70 | Colchicina | RX | 3,80 | 0,206 | <i>Ovis aries</i> | Dorléans et al. (2009) |
| 3hkd | N16 | Colchicina | RX | 3,70 | 0,212 | <i>Ovis aries</i> | Dorléans et al. (2009) |

Tabela 7 (continuação) – Relação das estruturas experimentais das tubulinas depositadas no PDB

| Código ^a | Ligante(s) | Sítio(s) | Método exp. ^b | Res. ^c (Å) | R-value (obs.) | Fonte | Referência |
|---------------------|-----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------------------|
| 3hke | T13 | Colchicina | RX | 3,60 | 0,209 | <i>Ovis aries</i> | Dorléans et al. (2009) |
| 3iz0 | Taxol | Taxol | ME | 8,60 | - | <i>Bos taurus</i> | Alushin et al. (2010) |
| 3n2g | G2N | Colchicina | RX | 4,00 | 0,211 | <i>Ovis aries</i> | Barbier et al. (2010) |
| 3n2k | K2N | Colchicina | RX | 4,00 | 0,225 | <i>Ovis aries</i> | Barbier et al. (2010) |
| 3ryc | - | - | RX | 2,10 | 0,172 | <i>Ovis aries</i> | Nawrotek, Knossow e Gigant (2011) |
| 3ryf | - | - | RX | 2,52 | 0,170 | <i>Ovis aries</i> | Nawrotek, Knossow e Gigant (2011) |
| 3ryh | - | - | RX | 2,80 | 0,168 | <i>Ovis aries</i> | Nawrotek, Knossow e Gigant (2011) |
| 3ryi | - | - | RX | 2,40 | 0,169 | <i>Ovis aries</i> | Nawrotek, Knossow e Gigant (2011) |
| 3ut5 | Colchicina Ustilotoxin D | Colchicina Vimblastina | RX | 2,73 | 0,186 | <i>Ovis aries</i> | Ranaivoson et al. (2012) |
| 4abo | - | - | ME | 8,60 | - | <i>Sus scrofa</i> | Maurer et al. (2012) |
| 4drx | - | - | RX | 2,22 | 0,161 | <i>Ovis aries</i> | Pecqueur et al. (2012) |
| 4eb6 | Vimblastina | Vimblastina | RX | 3,47 | 0,215 | <i>Ovis aries</i> | Ranaivoson et al. (2012) |
| 4f61 | - | - | RX | 4,17 | 0,242 | <i>Ovis aries</i> | Mignot et al. (2012) |
| 4f6r | - | - | RX | 2,64 | 0,178 | <i>Ovis aries</i> | Mignot et al. (2012) |
| 4i4t | Zampanolida | Taxol | RX | 1,80 | 0,173 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2013a) |
| 4i50 | Epotilona A | Taxol | RX | 2,30 | 0,193 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2013a) |
| 4i55 | - | - | RX | 2,20 | 0,169 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2013a) |
| 4ihj | - | - | RX | 2,00 | 0,170 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2013b) |

Tabela 7 (continuação) – Relação das estruturas experimentais das tubulinas depositadas no PDB

| Código ^a | Ligante(s) | Sítio(s) | Método exp. ^b | Res. ^c (Å) | R-value (obs.) | Fonte | Referência |
|---------------------|-----------------------------|-------------------|--------------------------|-----------------------|----------------|--------------------------|-----------------------------|
| 4ijj | - | - | RX | 2,60 | 0,199 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2013b) |
| 4o2a | BAL27862 | Colchicina | RX | 2,50 | 0,196 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014a) |
| 4o2b | Colchicina | Colchicina | RX | 2,30 | 0,183 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014a) |
| 4o4h | Laulimalida | Único | RX | 2,10 | 0,194 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014b) |
| 4o4i | Laulimalida Epotilona A | Único Taxol | RX | 2,40 | 0,190 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014b) |
| 4o4j | Pelorusida A | Único | RX | 2,20 | 0,203 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014b) |
| 4o4l | Pelorusida A Epotilona A | Único Taxol | RX | 2,20 | 0,188 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014b) |
| 4tuy | Rizoxina | Único | RX | 2,10 | 0,186 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014c) |
| 4tv8 | Maitansina | Único | RX | 2,10 | 0,191 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014c) |
| 4tv9 | PM060184 | Único | RX | 2,00 | 0,182 | <i>Bos taurus</i> | Prota et al. (2014c) |

^a Código da estrutura no PDB.

^b Método experimental para obtenção da estrutura tridimensional: difração de Raios X (RX) ou microscopia eletrônica (ME);

^c Resolução da estrutura.

O primeiro item analisado para a escolha da tubulina-molde para o trabalho de modelagem foi a presença de ligantes na proteína. Para a composição da Tabela 7, foram considerados como “ligantes” apenas os inibidores da tubulina, excluindo, portanto, moléculas como o GDP, GTP e outros compostos oriundos do processo de cristalização. Foi observado, por meio da sobreposição estrutural, que a maioria destes ligantes ocupa um dos três sítios de ligação conhecidos para a tubulina: sítio do taxol, da colchicina ou da vimblastina (Fig. 18). Sete ligantes, no entanto, encaixam-se em regiões diferentes da proteína, as quais foram tratadas como “sítio único” (Tabela 7).

Segundo Fiser e Šali (2003), o critério para se selecionar um molde deve estar relacionado com o objetivo do modelo: se o objetivo for construir um modelo proteína-ligante, por exemplo, a escolha de um molde que contenha um ligante similar é, possivelmente, mais importante do que a própria resolução da estrutura. Grinter e Zou (2014) também sugerem que selecionar um molde baseado na ocupação do ligante no sítio de interesse pode produzir um modelo mais adequado para estudos de *docking* do que escolher baseado apenas na identidade sequencial. Com base neste critério, mantiveram-se como candidatas a molde apenas as estruturas de tubulina experimentais contendo ligantes complexados ao sítio da colchicina (Tabela 7) – sítio onde será realizado o *docking* molecular das lignanas ariltetralônicas neste trabalho.

Com relação à qualidade estrutural, a resolução e o *R-value* das proteínas também foram itens considerados para a seleção do molde. Cada estrutura experimental apresenta uma

resolução, que é uma medida da qualidade dos dados coletados do cristal da proteína. Estruturas com resolução igual ou superior a 3 Å são consideradas de baixa resolução. Como regra geral, quanto menor este valor, mais confiável é a localização dos átomos na estrutura. Para cada estrutura determinada por difração de Raios X também há um *R-value* associado. O *R-value* é a medida da qualidade do modelo atômico obtido a partir dos dados cristalográficos: um grupo totalmente aleatório de átomos gera um *R-value* de cerca de 0,63, enquanto que um resultado “perfeito” geraria um valor de 0; normalmente, estes valores são aproximadamente 0,20. Sendo assim, dentre as tubulinas contendo ligantes no sítio da colchicina, considerou-se aquelas que apresentavam menores valores de resolução e *R-value*.

O último item analisado para a escolha do molde foi a fonte das tubulinas. Foram obtidas proteínas de três organismos diferentes: boi (*Bos taurus*), javali (*Sus scrofa*) e ovelha (*Ovis aries*). A fim de se verificar as diferenças sequenciais entre as proteínas destes mamíferos, foi realizado o alinhamento múltiplo entre as sequências FASTA das cadeias α e β de cada organismo. Para fins de comparação, as sequências da tubulina do *P. falciparum* e humana foram incluídas nesses alinhamentos (Figs. 19 e 20). Como resultado, pode-se observar que não há uma diferença significativa entre as sequências de boi, javali ou ovelha, de modo que a fonte da tubulina, portanto, não foi adotada como um critério para seleção do molde.

Por possuir um ligante complexado no sítio de interesse – colchicina ligada no sítio da colchicina – e, além disso, apresentar características estruturais (resolução e *R-value*) mais adequadas do que as demais tubulinas com ligantes no mesmo sítio, a estrutura **4o2b** (PROTA et al., 2014a), em destaque na Tabela 7, foi a selecionada como molde para a modelagem por homologia da tubulina do *P. falciparum*. A **4o2b** corresponde à estrutura tridimensional da tubulina bovina (*Bos taurus*) determinada por difração de Raios X, com resolução de 2,30 Å.

```

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      MREVISIHVQGAGIQVGNACWELFCLEHGIQPDGQMPSDKASRANDDAFNTFFSETGAGK
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      MRECISIVHVGQAGVQMGNACWELCYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE MRECISIHVQGAGVQIGNACWELCYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE MRECISIHVQGAGVQIGNACWELCYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE MRECISIHVQGAGVQIGNACWELCYCLEHGIQPDGQMPSDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK
*** *:*****:*.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      HVPRCVFVDLEPTVVDEVRTGTYRQLFHPEQLISGKEDAANNFARGHYTIGKEVIDVCLD
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      HVPRAVFVDLEPTVIDEIRNGPYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDPVLD
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE HVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLD
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE HVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLD
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE HVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLD
****.*****:*.** *****:*****:*****:*****:*****:*** **

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      RIRKLADNCTGLQGFLMFSAVGGGTGSGFGCLMLERLSVDYGKSKLNFCCWPSQVSTA
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      RIRKLSQDCTGLQGLVLFHFSFGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTA
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RIRKLADQCTGLQGLVLFHFSFGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTA
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RIRKLADQCTGLQGLVLFHFSFGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTA
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RIRKLADQCTGLQGLVLFHFSFGGTGSGFTSLLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTA
*****:*.***** :* :.***** .*:*****:*. :*:*****

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      VVEPYNSVLSTHSLEHTDVAIMLDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLLIAQVISSLTA
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      VVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLLISQIVSSITA
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE VVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLLISQIVSSITA
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE VVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLLISQIVSSITA
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE VVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLLIGQIVSSITA
*****:*.***: ***:* *:*****:*****:*****:*****:*****:***

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      SLRFDGALNVDVTEFQTNLVPYPRIHFMSSYAPVVSAAEKAYHEQLSVSEITNSAFEPAN
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      SLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE SLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE SLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRIHFPPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE SLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYPRGHFPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPAN
*****:*****:***** ** *:*****:*****:*****:*****:*****

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      MMAKCDPRHGKYMACLMLYRGDVPKDVNAAVATI KTKRTIQFVDWCPTGFKGGINYQPP
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      QMVKCDPRHGKYMACLMLYRGDVPKDVNAIAAIKTKRSIQFVDWCPTGFKGGINYQPP
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE QMVKCDPRHGKYMACLMLYRGDVPKDVNAIAIATIKTKRSIQFVDWCPTGFKGGINYQPP
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE QMVKCDPRHGKYMACLMLYRGDVPKDVNAIAIATIKTKRSIQFVDWCPTGFKGGINYQPP
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE QMVKCDPRHGKYMACLMLYRGDVPKDVNAIAIATIKTKRTIQFVDWCPTGFKGGINYQPP
* .*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      TVVPGDLAKVMRAVCMSNSTAIAEAFVSRMDQKFDLMAKRAFVHWYVGEEMEEGEFSE
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      TVVPGDLAKVQRAVCMSNSTAIAEAWARLDHKFDLMAKRAFVHWYVGEEMEEGEFSE
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE TVVPGDLAKVQRAVCMSNSTAIAEAWARLDHKFDLMAKRAFVHWYVGEEMEEGEFSE
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE TVVPGDLAKVQRAVCMSNSTAIAEAWARLDHKFDLMAKRAFVHWYVGEEMEEGEFSE
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE TVVPGDLAKVQRAVCMSNSTAIAEAWARLDHKFDLMAKRAFVHWYVGEEMEEGEFSE
*****:***** ***:**:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****

tr|Q6ZLZ9|Q6ZLZ9_PLAF7      AREDLAALEKDYEEVGVDSVEEGEEGEEY
sp|P68366|TBA4A_HUMAN      AREDMAALEKDYEEVGVDSYEDEGE-----
3UT5:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE AREDMAALEKDYEEVGVDSVEEGEEGEEY--
4O2B:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE AREDMAALEKDYEEVGVDSVEEGEEGEEY--
4ABO:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE AREDMAALEKDYEEVGVDSVEEGEEGEEY--
****.*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

```

Figura 19 – Alinhamento múltiplo, feito utilizando o Clustal Omega (CLUSTAL OMEGA, s.d.), entre as cadeias α das tubulinas do *P. falciparum* (Q6ZLZ9 no UniProt), humana (P68366 no UniProt), de boi (4O2B no PDB), de ovelha (3UT5 no PDB) e de javali (4ABO no PDB). Os asteriscos (“*”) indicam posições onde há resíduos totalmente conservados; dois-pontos (“:”) indicam a conservação entre grupos de propriedades fortemente similares; um ponto (“.”) indica a conservação entre grupos de propriedades fracamente similares.

```

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPSGTYCGDSDLQLERVDVVFYNEATGGRYV
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    MREIVHLQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGTYHGSDQLQLERINVYNEATGGNYV
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDQLQLERINVYNEAAGNKYV
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDQLQLERINVYNEATGNKYV
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDQLQLERINVYNEATGNKYV
*****:*****:*****:*. * *****:*. *:*****:*. * **

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      PRAILMDLEPGTMDSVRAGFFGQIFRPDNFVFGQGTGAGNNWAKGHYTEGAEILIDAVLDVV
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    PRAVLVDLEPGTMDSVRSRGGFFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAEILVDAVLDVV
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE PRAILVDLEPGTMDSVRSRGGFFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAEILVDSVLDVV
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE PRAILVDLEPGTMDSVRSRGGFFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAEILVDSVLDVV
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE PRAILVDLEPGTMDSVRSRGGFFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAEILVDSVLDVV
***:*. *:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*. *****

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      RKEAEGCDCLQGFIQTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMTFSVFPSPKVS DTVV
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    RKEAESCDCLQGFIQTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEFPDRIMTFSVFPSPKVS DTVV
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RKESES CDCLQGFIQTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMTFSVFPSPKVS DTVV
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RKESES CDCLQGFIQTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMTFSVFPSPKVS DTVV
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RKESES CDCLQGFIQTHSLGGGTGSGMGTLISKIREEYPDRIMTFSVFPSPKVS DTVV
**:*.* *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      EPYNATLSVHQLVENADEVQVIDNEALYDICFRTLKLTPTYGDLNHLVSAAMSGVTTCSL
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCL
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCL
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCL
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCL
*****:*****:*. * *****:*****:*****:*****:*****

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      RFPGQLNSDLRKLAVNLIFFPRLHFFMIGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMM
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    RFPGQLNADLRKLAVNMVFPFRLHFFMIPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMM
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RFPGQLNADLRKLAVNMVFPFRLHFFMIPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDAKNMM
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RFPGQLNADLRKLAVNMVFPFRLHFFMIPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDKSNMM
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE RFPGQLNADLRKLAVNMVFPFRLHFFMIPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDKSNMM
*****:*****:*. * ***** *****:*****:*****

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      CASDPRHGRYLTACAMFRGRMSTKEVDEQMLNVQNKNSYFVVEWIPHNKTSVCDIPPKG
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLSVQSKNSYFVVEWIPNNVKTAVCDIPPRG
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVVEWIPNNVKTAVCDIPPRG
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE AACDPRHGRYLTVAIFRGRMSMKEVDEQMLNINQNKNSYFVVEWIPNNVKTAVCDIPPRG
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE AACDPRHGRYLTVAAI FRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSYFVVEWIPNNVKTAVCDIPPRG
.* *****:*. * ***** *****:*. * *****:*. * *:*****:*. *

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      LKMAVTFVGNSTAIQEMFKRVS DQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESNMNDLVS
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    LKMAATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESNMNDLVS
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESNMNDLVS
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE LKMSSTFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESNMNDLVS
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF LHWYT GEGMDEMEFTEAESNMNDLVS
***:*. ** *****:*****:*****:*****:*****:*****:*****

sp|Q7KQL5|TBB_PLAF7      EYQQYQDATAEEEGEFEEEEGDVEA
sp|P04350|TBB4A_HUMAN    EYQQYQDATAE-EGEFEEEAEEVA
4ABO:A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE EYQQYQDATADEQGEFEEEGEDEA
3UT5:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE EYQQYQDATADEQGEFEEEGEDEA
4O2B:B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE EYQQYQDATADEQGEFEEEGEDEA
*****:*. *****:*. *

```

Figura 20 – Alinhamento múltiplo, feito utilizando o Clustal Omega (CLUSTAL OMEGA, s.d.), entre as cadeias β das tubulinas do *P. falciparum* (Q7KQL5 no UniProt), humana (P04350 no UniProt), de boi (4O2B no PDB), de ovelha (3UT5 no PDB) e de javali (4ABO no PDB).

2.2.3.3 Alinhamento sequencial alvo-molde

Para se construir um modelo, os *softwares* de modelagem por homologia se baseiam em uma lista de equivalência estrutural entre os resíduos de aminoácidos da proteína alvo e do molde. Esta lista é definida pelo alinhamento das suas sequências. O alinhamento global entre a cadeia α da tubulina do *P. falciparum* e a mesma cadeia da tubulina **4o2b** selecionada como molde é mostrado na Figura 21; por sua vez, a Figura 22 exibe o alinhamento global obtido para a cadeia β .

Os alinhamentos podem ser melhorados ao se incluir informações estruturais da proteína molde (FISER e ŠALI, 2003). Portanto, além dos alinhamentos apresentados (Figs. 21 e 22), foi realizado também um alinhamento entre a sequência de aminoácidos das cadeias da **PfTu** e a estrutura da proteína-molde **4o2b**. Diferente do anterior, este alinhamento considera as informações estruturais do molde, reduzindo-se possíveis erros (MODELLER DOCUMENTATION, s.d.). Os resultados destes novos alinhamentos são mostrados nas Figuras 23 e 24.

| Score | NW | Identidade | Positivos | Gaps |
|-------------------|----|--------------------------------------------------------------------------------------|---------------|------------|
| 2071 | | 379/453 (84%) | 421/453 (92%) | 2/453 (0%) |
| 4o2b:A 1 | | MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMPDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK | | 60 |
| PftubA 1 | | ... V I.V F ASRAN .. A | | 60 |
| 4o2b:A 61 | | HVPRAVFVDLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPEQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLD | | 120 |
| PftubA 61 | | C V S F V.VC .. | | 120 |
| 4o2b:A 121 | | RIRKLADQCTGLQGFLVFHSGGGTSGGFTSLMERLSVDYGKSKLEFSIYPAPQVSTA | | 180 |
| PftubA 121 | | N M.SAV GC.ML N.CCW.S | | 180 |
| 4o2b:A 181 | | VVEPYNSILTHTTLEHSDCAFMDNEAIYDICRRNLDIRPTYTNLNRLLISQIVSSITA | | 240 |
| PftubA 181 | | V.S .. SL .. T.V.I.L A.VI .. L .. | | 240 |
| 4o2b:A 241 | | SLRFDGALNVDLTEFQTNLVPYRIHFPLATYAPVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPAN | | 300 |
| PftubA 241 | | V M.SS V S SA | | 300 |
| 4o2b:A 301 | | QMVKCDPRHGKYMACL LLYRGDVPKDVNAAIATIKTKRSIQFVDWCPTGFKVGIN YQPP | | 360 |
| PftubA 301 | | M.A M V T C | | 360 |
| 4o2b:A 361 | | TVVPGGDLAKVQRAVCMLSN TTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRAFVHWYVGE GMEEGEFSE | | 420 |
| PftubA 361 | | M I .. S VFS.M.Q | | 420 |
| 4o2b:A 421 | | AREDMAALEKDYEEVGVDSVEGEGEEGEE--Y | 451 | |
| PftubA 421 | | L IE.N.A .. D .. Y.AD .. | 453 | |

Figura 21 – Alinhamento global, realizado no BLAST, entre a cadeia α da tubulina do *P. falciparum* (PftubA) e da proteína molde (4o2b). Os resíduos não-conservados são destacados em vermelho.

| Score | NW | Identidade | Positivos | Gaps |
|------------|----|---------------------------------------------------------------|---------------|------------|
| 2130 | | 393/445 (88%) | 424/445 (95%) | 0/445 (0%) |
| 4o2b:B 1 | | MREIVHIQAGQCGNQIGAKFEWVISDEHGIDPTGSYHGSDSLQLERINVYNEATGNKYV | | 60 |
| PftubB 1 | |S.T.C.....VD.F.....GR.. | | 60 |
| 4o2b:B 61 | | PRAILVDLEPGTMDSVRSRSGPFQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAELVDSVLDVV | | 120 |
| PftubB 61 | |M.....A.....L.....T.....I.A..... | | 120 |
| 4o2b:B 121 | | RKESESCDCLQGFLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFVSPKVSQSDTVV | | 180 |
| PftubB 121 | | ...A.G.....I.....E.....F..... | | 180 |
| 4o2b:B 181 | | EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRTLKLTPTTYGDLNHLVSATMSGVTTCL | | 240 |
| PftubB 181 | |A.VQV.....A.....CS. | | 240 |
| 4o2b:B 241 | | RFPGQLNADLRKLAVMNVPFRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPPELTQQMFDKSNMM | | 300 |
| PftubB 241 | |S.....LI.....I.....A..... | | 300 |
| 4o2b:B 301 | | AACDPRHGRYLTVAAIFRGRMSMKEVDEQMLNVQKNSSYFVEWIPNNVKTAVCDIPPRG | | 360 |
| PftubB 301 | | C.S.....AC.M.....T.....H.T.SS.....K. | | 360 |
| 4o2b:B 361 | | LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFLHWYTGEGMDEMEFTEAESNMNDLVS | | 420 |
| PftubB 361 | | ...AV..V.....M...V.D..... | | 420 |
| 4o2b:B 421 | | EYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA | 445 | |
| PftubB 421 | |E.E.....DV.. | 445 | |

Figura 22 – Alinhamento global, realizado no BLAST, entre a cadeia β da tubulina do *P. falciparum* (PftubB) e da proteína molde (4o2b). Os resíduos não-conservados são destacados em vermelho.

| | | | | | | |
|----------|-----------------------------------------------------|----------------------------|----------|------------|-------|-------|
| _aln.pos | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 4O2BA | MRECISIHVGQAGVQIGNACWELYCLEHGIQPDGQMP | SDKTIGGGDDSFNTFFSETGAGK | HVPRAV | FV | | |
| PfTuA | MREVISIHVGQAGIQVGNACWELFCLEHGIQPDGQMP | SDKASRANDDAFNTFFSETGAGK | HVP | CVFV | | |
| _consvd | *** | ***** | * | ***** | ***** | *** |
| _aln.p | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 130 |
| 4O2BA | DLEPTVIDEVRTGTYRQLFHPQLITGKEDAANNYARGHYTIGKEIIDLVLD | DRIRKLADQCTGLQGFL | | | | |
| PfTuA | DLEPTVVDVVRTGTYRQLFHPQLISGKEDAANNFARGHYTIGKEVIDVCL | DRIRKLADNCTGLQGFL | | | | |
| _consvd | ***** | ***** | ***** | ***** | ** | ***** |
| _aln.pos | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 200 |
| 4O2BA | VFHSFGGGTSGGFTSLLMERLSVDYGGKSKLEFSIYPAPQVSTAVVEP | YNSILTHTTLEHSDCAF | MV | | | |
| PfTuA | MFSAVGGGTSGGFGLMLERLSVDYGGKSKLNFCCWSPQVSTAVVEP | YNSVLSHSLLEHTDVAIML | | | | |
| _consvd | * | ***** | * | ***** | * | *** |
| _aln.pos | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 270 |
| 4O2BA | DNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLLISQIVSSITASLRFDGALNVDL | TEFQTNLVPYPR | IHFPLATY | | | |
| PfTuA | DNEAIYDICRRNLDIERPTYTNLNRLLIAQVISSLTASLRFDGALNVDV | TEFQTNLVPYPR | IHFMLSSY | | | |
| _consvd | ***** | ***** | * | ** | ***** | * |
| _aln.pos | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 340 |
| 4O2BA | APVISA EKAYHEQLSVAEITNACFEPANQMVKCDPRHGKYM | ACCLLYRGD | VVPKDVNA | AIATIKTKRS | | |
| PfTuA | APVVS AEKAYHEQLSVSEITNSAFEPANMMAKCDPRHGKYM | ACCLMYRGD | VVPKDVNA | AVATIKTKRT | | |
| _consvd | *** | ***** | ***** | * | ***** | ***** |
| _aln.pos | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| 4O2BA | IQFVDWCPTGFKVGINYQPPTVPPGGDLAKVQRAVCM | LSNTTAIAEAWARLDHKFDLMYAKRA | FVHWY | | | |
| PfTuA | IQFVDWCPTGFKCGINYQPPTVPPGGDLAKVMRAVCM | ISNSTAIAEVFSRMDQKFDLMYAKRA | FVHWY | | | |
| _consvd | ***** | ***** | ***** | ** | ***** | ***** |
| _aln.p | 410 | 420 | 430 | 440 | 450 | |
| 4O2BA | VGEGMEEGEFSEAREDMAALEKDYEEVGVD | ----- | | | | |
| PfTuA | VGEGMEEGEFSEAREDLA | ALEKDYEEVGIESNEAEGE | DEGEY | EADY | | |
| _consvd | ***** | ***** | * | | | |

Figura 23 – Alinhamento entre a cadeia α da tubulina do *P. falciparum* (PfTuA) e a estrutura da proteína molde (4o2b), realizado no MODELLER v.9.14.

| | | | | | | |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>_aln.pos</i> | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 |
| 4O2BB | MREIVHIQAGQCQNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDSLQLERINVYNEATGNKYVPRAILVDL | | | | | |
| PfTuB | MREIVHIQAGQCQNQIGAKFWEVISDEHGIDP SGTYCG SDSLQLER VDVFY NEAT GGRY VPRAI MDL | | | | | |
| <i>_consvd</i> | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| <i>_aln.p</i> | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 |
| 4O2BB | EPGTMDSVRS G PFPGQIFRPDNFVFGQSGAGNNWAKGHYTEGAE L VDSVLDVVRKESESCDCLQGFQLT | | | | | |
| PfTuB | EPGTMDSVR AG PFPGQ L FRPDNFVFGQ T GAGNNWAKGHYTEGAE LID AVLDVVRKE AEG CDCLQGFQ IT | | | | | |
| <i>_consvd</i> | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| <i>_aln.pos</i> | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 |
| 4O2BB | HSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIMNTFSVMPSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVENTDETYCIDN | | | | | |
| PfTuB | HSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPDRIM ET FSV F PSPKVSDTVVEPYNATLSVHQLVEN ADEVQ VIDN | | | | | |
| <i>_consvd</i> | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| <i>_aln.pos</i> | 210 | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 |
| 4O2BB | EALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSATMSGVTTCLRFPQGQLNADLRKLA N MVFPRLHFFMPGFAP | | | | | |
| PfTuB | EALYDICFRTLKLTTPTYGDLNHLVSA AM SGV TCS LRFPQGQL NS DLRKLAVN LI PFPRHLHFFM IG FAP | | | | | |
| <i>_consvd</i> | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| <i>_aln.pos</i> | 280 | 290 | 300 | 310 | 320 | 330 |
| 4O2BB | L-----QYRALTVPELTQQMFDSKNMMAACDPRHGRYLTVAAIFRGRMSMKEVDEQMLNVQNKNSSY | | | | | |
| PfTuB | LTSRGSQ YRALTVPELTQQMF DA KNNM CAS DPRHGRYLT ACAM FRGRMS T KEVDEQMLNVQNKNSSY | | | | | |
| <i>_consvd</i> | * | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| <i>_aln.pos</i> | 350 | 360 | 370 | 380 | 390 | 400 |
| 4O2BB | FVEWIPNNVKTAVCDIPPRGLKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRRKAF L HWYTGE G MD E MEF | | | | | |
| PfTuB | FVEWIP HN T KSS VCDIP P KGLK MA V T FVGNSTAI QEM FKR VSD QFTAMFRRKAF L HWYTGE G MD E MEF | | | | | |
| <i>_consvd</i> | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |
| <i>_aln.p</i> | 410 | 420 | 430 | 440 | | |
| 4O2BB | TEAESNMNDLVSEYQQYQDA----- | | | | | |
| PfTuB | TEAESNMNDLVSEYQQYQDA TAE EEGE F EEEE G D VEA | | | | | |
| <i>_consvd</i> | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** | ***** |

Figura 24 – Alinhamento entre a cadeia β da tubulina do *P. falciparum* (PfTuB) e a estrutura da proteína molde (4o2b), realizado no MODELLER v.9.14.

É possível observar que o alinhamento entre a sequência e a estrutura refletiu o alinhamento sequência-sequência. Alguns pontos a se destacar, no entanto, são que tanto a cadeia α quanto a cadeia β da estrutura **4o2b** determinada experimentalmente não apresentam alguns resíduos de aminoácidos na porção C-terminal da proteína; por isso, os últimos 14 resíduos da cadeia α (Fig. 23) e os 17 últimos da cadeia β (Fig. 24) foram desconsiderados para a construção do modelo. Além disso, existe na cadeia β da **4o2b** uma região contendo seis resíduos de aminoácidos que não foi resolvida experimentalmente, gerando um *gap* no alinhamento no trecho entre os resíduos 274 e 279 (Fig. 24).

2.2.3.4 A construção do modelo por modelagem por homologia

A partir dos alinhamentos apresentados nas Figuras 23 e 24 e utilizando a estrutura **4o2b** como molde, foi construído o modelo por homologia do dímero (cadeia α + cadeia β) da tubulina do *P. falciparum*, contendo os ligantes GTP, GDP e colchicina.

Nesta etapa, o programa MODELLER v.9.14 gerou nove modelos (Fig. 25), cujos *scores* são apresentados na Tabela 8. O *molecular PDF* ou *molpdf* é a função *score* padrão do MODELLER v.9.14 e representa a soma de todas as restrições espaciais. Este *score* é utilizado para ranquear os modelos calculados a partir de um mesmo alinhamento e, desta forma, a escolha pelo melhor modelo gerado pode ser feita selecionando-se aquele que apresenta o menor valor de *molpdf* (MODELLER DOCUMENTATION, s.d.).

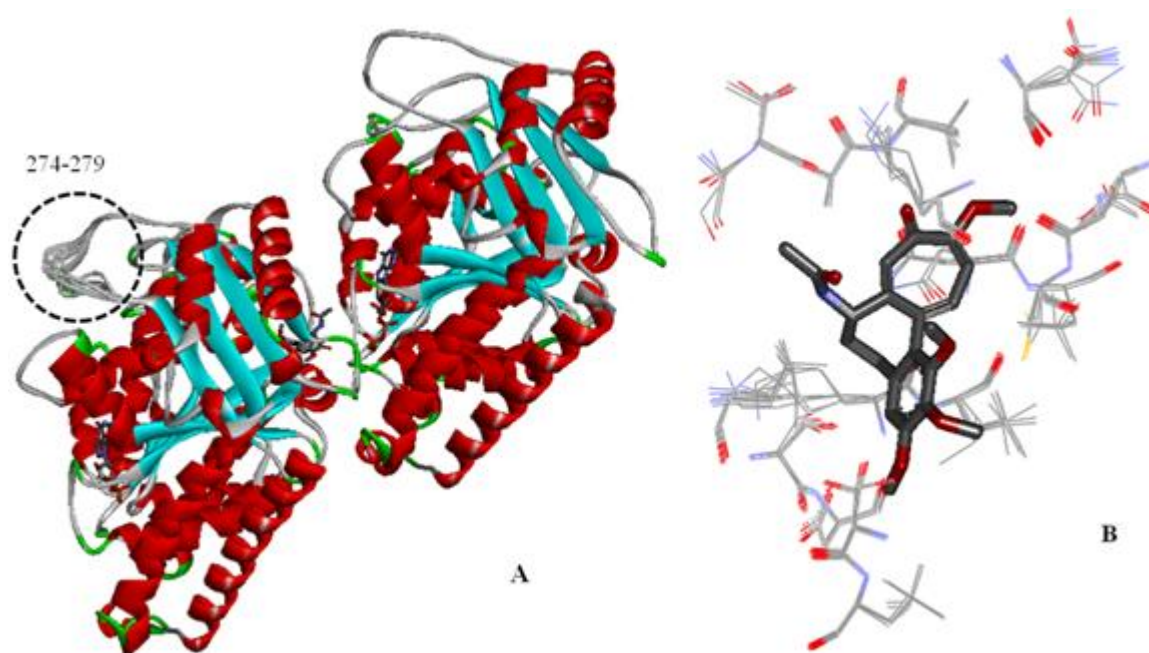


Figura 25 – **A.** Sobreposição dos nove dímeros gerados durante a modelagem por homologia, destacando suas estruturas secundárias. As hélices alfa são representadas em vermelho e as folhas beta em ciano. **B.** Destaque para a sobreposição dos resíduos de aminoácidos que compõem o sítio de ligação da colchicina. São exibidas as colchicinas dos modelos e os resíduos situados a até 3,5 Å dos ligantes. Não são mostrados átomos de hidrogênio.

Tabela 8 – *Scores* obtidos para os modelos gerados pelo MODELLER v9.14

| Estrutura | Score (molpdf) |
|------------------|-----------------------|
| Modelo 1 | 4954.9214 |
| Modelo 2 | 5149.4922 |
| Modelo 3 | 5241.8896 |
| Modelo 4 | 5116.3315 |
| Modelo 5 | 5166.6875 |
| Modelo 6 | 5171.4980 |
| Modelo 7 | 5658.9526 |
| Modelo 8 | 5501.9297 |
| Modelo 9 | 4962.5327 |

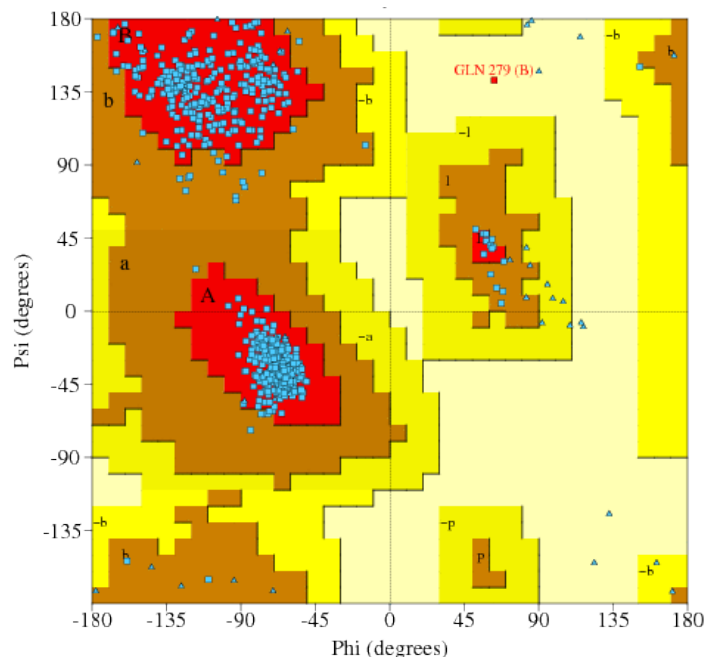
É possível observar que os nove modelos gerados foram semelhantes, com suas estruturas secundárias bem sobrepostas (A Fig. 25). A única exceção ficou por conta de um *loop* localizado na superfície da cadeia β da proteína. Este *loop* corresponde exatamente ao segmento dos resíduos de aminoácidos 274-279, que não estavam presentes na estrutura cristalográfica **4o2b** que serviu como molde (Fig. 24). Para o sítio de ligação da colchicina, observa-se que não há diferença significativa na orientação das cadeias laterais dos aminoácidos que ficam próximos ao ligante (B Fig. 25). Sendo assim, devido à grande semelhança estrutural entre os modelos gerados, o **Modelo 1** foi o selecionado para os estudos de *docking* por possuir o melhor *score* (Tabela 8).

2.2.3.5 Avaliação do modelo obtido

Um dos principais problemas na biologia estrutural é a identificação de erros em modelos experimentais e teóricos de estruturas de proteínas (WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007). À medida que os métodos de determinação de estruturas tridimensionais de proteínas foram sendo desenvolvidos, verificar se o modelo proteico final está correto se tornou um problema recorrente (LÜTHY, BOWIE e EISENBERG, 1992). Por isso, uma vez construído o modelo da **PfTu** por modelagem por homologia, este foi avaliado utilizando-se diferentes ferramentas.

A Figura 26 exibe o gráfico de Ramachandran gerado a partir da análise PROCHECK (PDBSUM, s.d.; LASKOWSKI et al., 1993) do modelo construído. Este gráfico mostra os ângulos de torção *phi-psi* para todos os resíduos de aminoácido na estrutura; apenas os resíduos de glicina são identificados separadamente por triângulos, pois sua cadeia lateral é formada por um átomo de hidrogênio e, com isso, não ficam restritos às regiões do gráfico apropriadas para os outros tipos de cadeias laterais.

No gráfico de Ramachandran, diferentes cores representam diferentes regiões: as áreas mais escuras (vermelho) correspondem às regiões que representam as combinações mais favoráveis dos valores dos ângulos *phi-psi*. A porcentagem de resíduos nestas regiões é um dos melhores indicadores de qualidade estereoquímica da proteína: espera-se que um modelo de boa qualidade apresente mais de 90% de seus resíduos nas regiões mais favoráveis (PDBSUM, s.d.; MORRIS et al., 1992). No modelo construído, 95,4% dos resíduos localizam-se nestas regiões, ou seja, acima do valor mínimo considerado para estruturas de boa qualidade (Fig. 26). O único resíduo presente em região não permitida do gráfico – a Gln279B (Fig. 26) – localiza-se em um *loop* situado na superfície da proteína (A Fig. 25), cuja região não estava presente na proteína utilizada como molde.



Estadísticas do gráfico de Ramachandran

| | | No. de resíduos | Porcentagem |
|------------------------------------|---------------|--------------------|-------------|
| | | ----- | ----- |
| Regiões mais favoráveis | [A,B,L] | 724 | 95.4% |
| Regiões adicionalmente permitidas | [a,b,l,p] | 34 | 4.5% |
| Regiões generosamente permitidas | [~a,~b,~l,~p] | 0 | 0.0% |
| Regiões não-permitidas | [XX] | 1 | 0.1%* |
| | | ---- | ----- |
| Resíduos não-glicina e não-prolina | | 759 | 100.0% |
| Resíduos finais (exc. Gly and Pro) | | 7 | |
| Resíduos de glicina | | 66 | |
| Resíduos de prolina | | 38 | |
| | | ---- | ----- |
| Número total de resíduos | | 870 | |

Fatores G

| Parâmetro | Score | Score médio |
|---------------------------------------------|-------|----------------|
| ----- | ----- | ----- |
| Ângulos diedro:- | | |
| Distribuição phi-psi | 0.26 | |
| Distribuição chi1-chi2 | -0.16 | |
| Apenas chi1 | 0.06 | |
| Chi3 & chi4 | 0.53 | |
| Omega | -0.11 | |
| | | 0.08 |
| | | ===== |
| Forças covalentes da cadeia principal:- | | |
| Comprimentos de ligação da cadeia principal | -0.03 | |
| Ângulos de ligação da cadeia principal | -0.16 | |
| | | -0.11 |
| | | ===== |
| MÉDIA GLOBAL | | 0.01 |
| | | ===== |

Figura 26 – Gráfico de Ramachandran obtido para o modelo final da tubulina do *P. falciparum*. São mostrados também as estatísticas do gráfico de Ramachandran e a média do fator G. Adaptado do PDBsum (PDBSUM, s.d.).

Para esse mesmo modelo obteve-se também uma média geral do fator G de 0,01 (Fig. 26). Para este parâmetro, são considerados valores não-usuais aqueles abaixo de -0,5 (PDBSUM, s.d.).

Outros gráficos gerados na análise PROCHECK indicam que os valores obtidos para o modelo com relação à qualidade do gráfico de Ramachandran e ao fator G superam os valores típicos encontrados para uma estrutura experimental de 2,0 Å de resolução (Fig. 27).

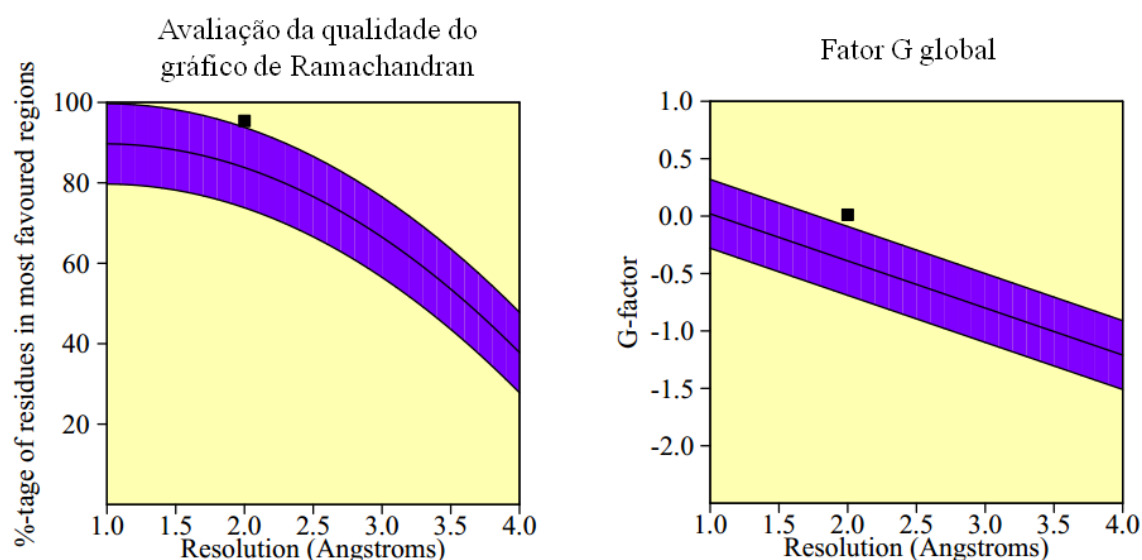


Figura 27 – Gráficos que exibem a avaliação da qualidade do gráfico Ramachandran (à esquerda) e o fator G global (à direita), em comparação com valores típicos. O quadrado em preto representa os valores obtidos para o modelo construído da tubulina do *P. falciparum*. Adaptado dos resultados obtidos no PDBsum.

Outro indicador utilizado para se avaliar o modelo da tubulina foi o *z-score*, obtido a partir do servidor ProSA (PROSA, s.d.; SIPPL, 1993; WIEDERSTEIN e SIPPL, 2007). Esta é uma medida que indica a qualidade global do modelo. O *z-score* obtido para as cadeias α e β da proteína modelada foram -9,6 e -10,18, respectivamente. A Figura 28 compara estes valores com o *z-score* obtido para cadeias de proteínas determinadas experimentalmente e depositadas no PDB. É possível observar que os valores encontrados para as cadeias do modelo estão dentro dos valores observados para proteínas nativas de tamanho similar, determinadas por difração de Raios X.

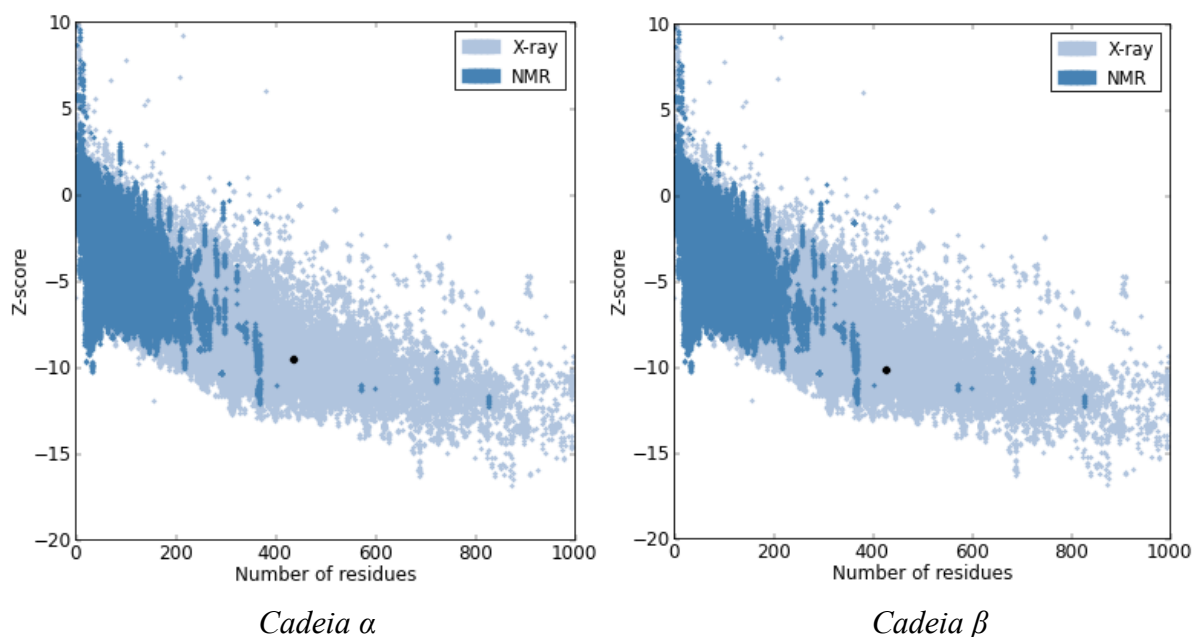


Figura 28 – Comparação entre o *z-score* obtido para as cadeias α (-9,6) e β (-10,18) e estruturas determinadas experimentalmente. O ponto preto indica o *z-score* das cadeias modeladas, as regiões em azul claro indicam os valores típicos encontrados para estruturas determinadas por difração de Raios X e as regiões em azul escuro indicam os valores típicos encontrados para estruturas determinadas por NMR. Dados obtidos do servidor ProSA.

Já na inspeção da estrutura realizada utilizando o Verify_3D (UCLA MBI, s.d.; BOWIE, LÜTHY e EISENBERG, 1991; LÜTHY, BOWIE e EISENBERG, 1992), obteve-se que 95,56% – o valor considerado bom é de pelo menos 80% – dos resíduos apresentaram um *score* 3D-1D médio maior ou igual a 0,2. A Figura 29 exhibe a distribuição do *score* médio 3D-1D por resíduo para as cadeias α e β do modelo construído por homologia.

Por fim, ao submeter as duas cadeias da proteína modelada ao servidor ModEval (MODEVAL, s.d.), obteve-se um valor para o *score* GA341 igual a 1,0 para ambas. Este é um *score* que mede a confiabilidade de um modelo: o modelo é predito como confiável quando seu *score* é maior do que 0,7. Considera-se um modelo confiável aquele que apresenta uma probabilidade maior do que 95% de seu enovelamento estar correto.

Portanto, a estrutura tridimensional da **PfTu** modelada submetida a quatro ferramentas de análise estrutural diferentes – PROCHECK, ProSA, Verify_3D e ModEval – pode ser considerada validada e adequada para as simulações de *docking* molecular.

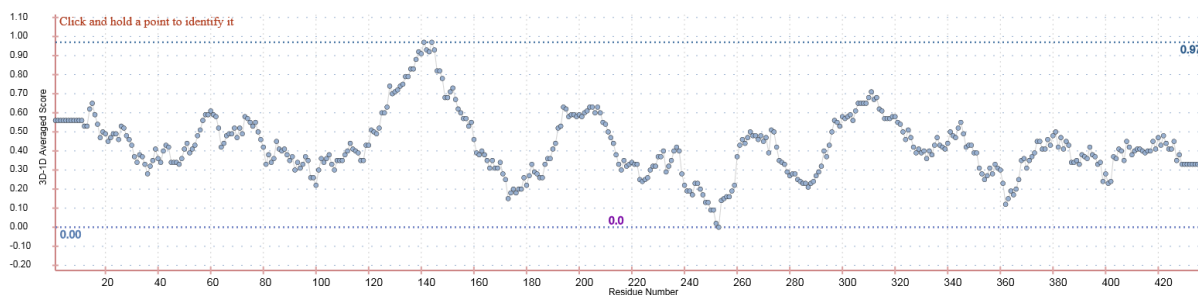
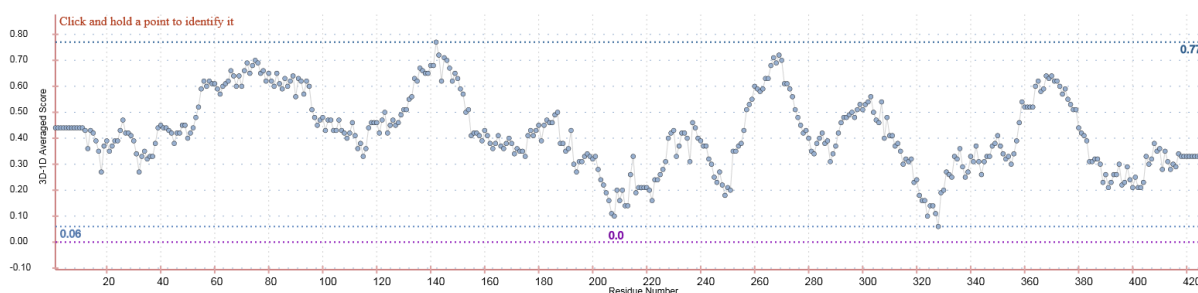
Cadeia α Cadeia β

Figura 29 – Score médio 3D-1D por resíduo de aminoácido das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* obtida por modelagem por homologia. Obtido do servidor Verify_3D.

2.2.3.6 O modelo final da tubulina do *P. falciparum*

A estrutura quaternária da proteína **PfTu** obtida por modelagem por homologia aparece na Figura 30, destacando o posicionamento dos ligantes GTP, GDP e colchicina. É possível observar que estes ligantes localizam-se na interface entre as cadeias α e β , embora a colchicina e o GDP interajam predominantemente com a cadeia β , enquanto que o GTP interage predominantemente com a cadeia α (Fig. 30).

A forma como a sequência linear de aminoácidos se organiza em estruturas secundárias na proteína – hélices alfa e folhas beta – pode ser conferida no diagrama esquemático apresentado na Figura 31, gerado pelo PROMOTIF (HUTCHINSON e THORNTON, 1996). Este mesmo diagrama destaca os resíduos de aminoácido envolvidos em contatos com os ligantes (GTP, GDP ou tubulina).

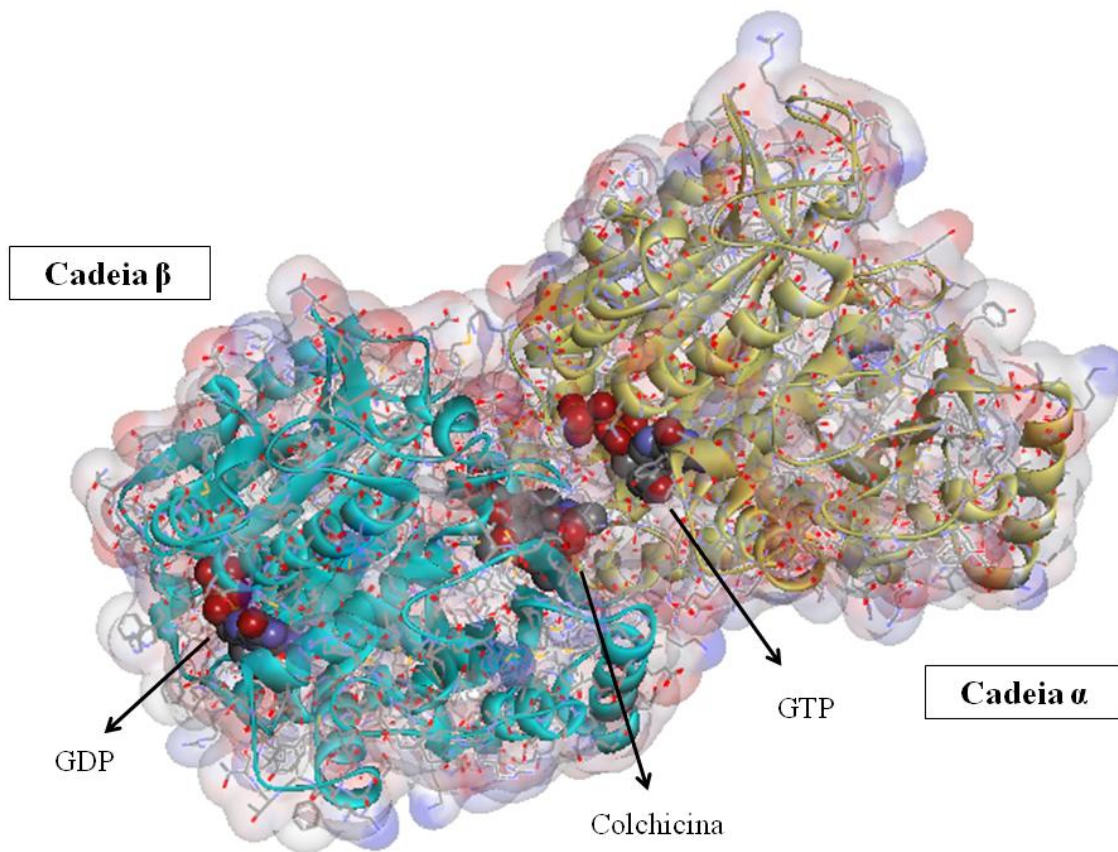
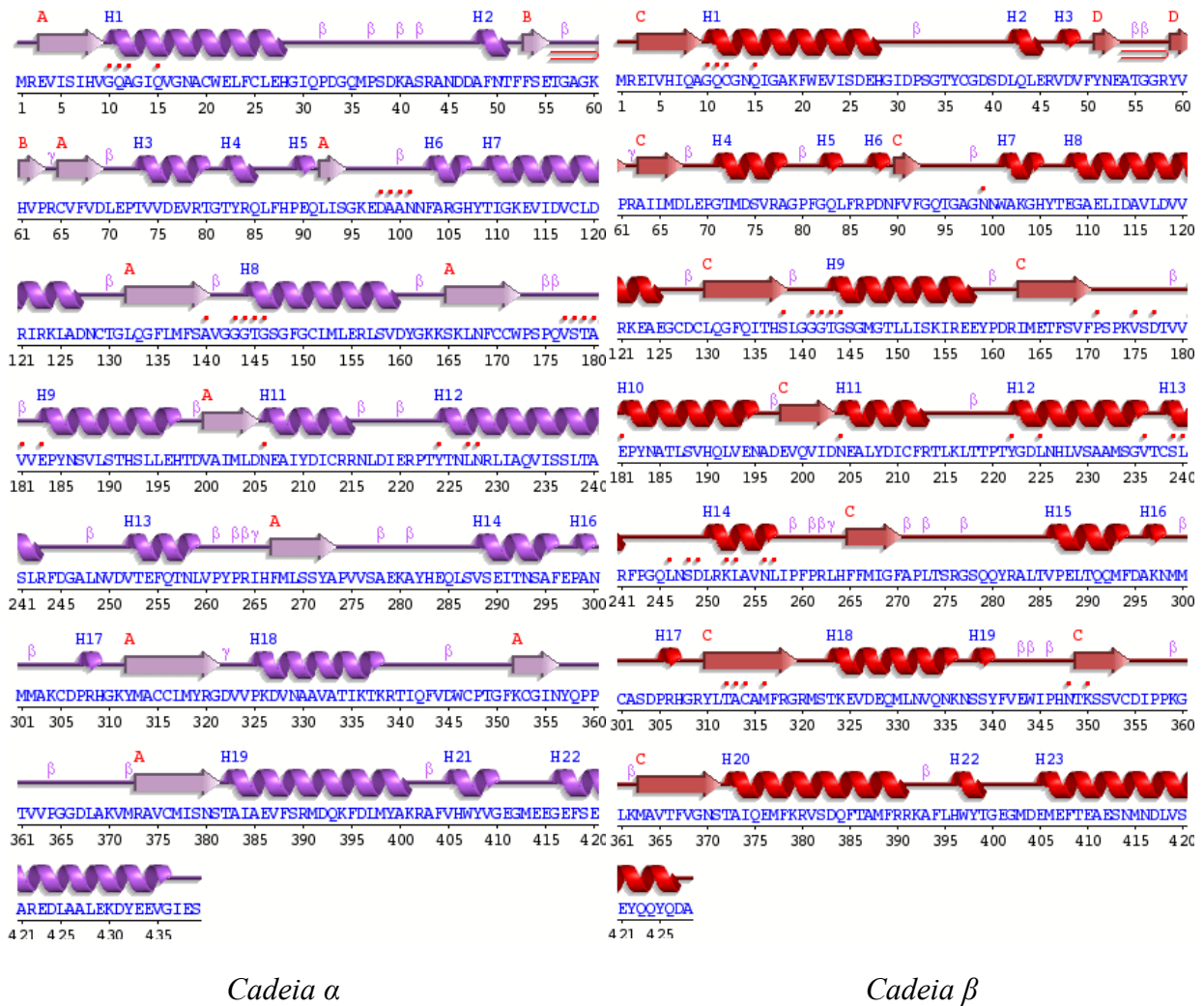


Figura 30 – Estrutura quaternária do modelo da tubulina do *P. falciparum*. A cadeia α está representada em amarelo e a cadeia β em ciano. São destacados os ligantes GTP, GDP e colchicina.

Analisando o diagrama das estruturas secundárias (Fig. 31) e a estrutura tridimensional da proteína modelada (Fig. 32), é possível concluir que tanto a cadeia α quanto a cadeia β da **PfTu** são formadas por duas folhas β centrais (totalizando 10 fitas paralelas), rodeadas por cerca de 22 hélices α . Observa-se que as duas cadeias do dímero são estruturalmente semelhantes. Isto está de acordo com outros trabalhos que descrevem a tubulina como sendo composta por duas cadeias estruturalmente muito similares, contendo cerca de 450 aminoácidos cada e formadas por um núcleo de duas folhas β rodeadas por hélices α (LITTLE e SEEHAUS, 1988; DESAI e MITCHISON, 1997; NOGALES, WOLF e DOWNING, 1998; DOWNING, 2000).

**Legenda:**

Estrutura secundária: As hélices são nomeadas H1, H2, ... e as fitas por suas folhas A, B, ...

Hélice Fita

Motivos: beta turn gamma turn beta hairpin

Contatos dos resíduos de aminoácidos: com o ligante (GTP, GDP ou colchicina)

Figura 31 – Diagrama das estruturas secundárias das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* modelada. Adaptado do PDBsum.

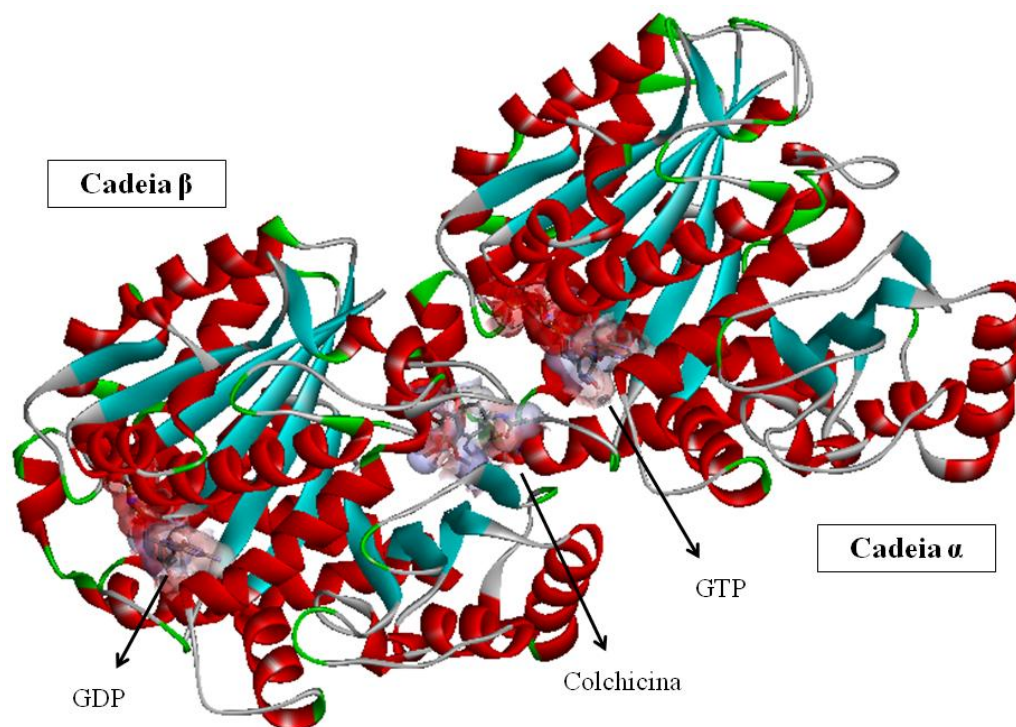


Figura 32 – Estrutura tridimensional da tubulina do *P. falciparum* obtida por modelagem por homologia. As hélices alfa são representadas em vermelho e as fitas/folhas beta em ciano. Em destaque, os ligantes GTP, GDP e colchicina representados com superfície.

A Figura 33A representa a sobreposição das estruturas da **PfTu** em vermelho (modelo) e da tubulina bovina **4o2b** em azul (molde). É possível concluir que as estruturas secundárias destas proteínas são conservadas e bem sobrepostas; nota-se variação apenas nas regiões de *loop* localizadas na superfície das proteínas (setas).

A partir desta sobreposição, foi possível analisar as alterações que ocorrem no sítio de ligação da colchicina entre a **PfTu** modelada e a tubulina bovina (Fig. 33B). Como principais substituições, podemos destacar que na **PfTu** há a Ser248B (em substituição à Ala250B na **4o2b**), cuja hidroxila interage com a colchicina; a Ala250B não interage com o ligante na **4o2b**, por possuir cadeia lateral menos volumosa. O mesmo ocorre na substituição da Ala316B da **4o2b** pela Cys314B na tubulina do parasita, na qual o enxofre deste resíduo interage com a colchicina – interação esta que não ocorre na proteína bovina. O enxofre da Met316B da tubulina do parasita também interage com a colchicina; esta substitui a Ile318B da **4o2b** que, também por possuir uma cadeia lateral menos volumosa, não interage com o ligante. Embora a estrutura tridimensional experimental da tubulina humana não esteja disponível, pelo alinhamento realizado neste trabalho (Figs. 19 e 20) pode-se inferir que o sítio da colchicina na forma humana seja muito semelhante ao da tubulina bovina, uma vez que a única diferença entre

elas nesta região é a substituição da Ile318B da proteína bovina por uma valina na mesma posição.

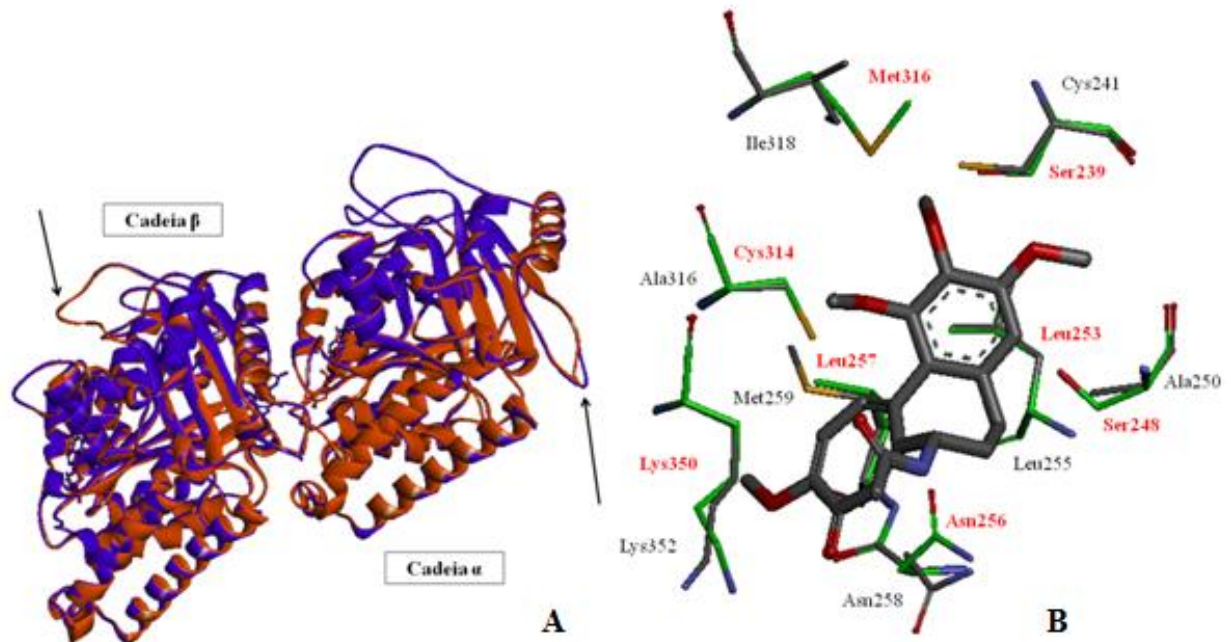


Figura 33 – **A.** Sobreposição entre a tubulina do *P. falciparum* modelada (vermelho) e a tubulina bovina experimental **4o2b** (azul). As setas apontam para regiões de *loop* variáveis. **B.** Sobreposição do sítio de ligação da colchicina da tubulina modelada (átomos de carbono em verde) e da **4o2b** (átomos de carbono em cinza). São mostrados os principais resíduos de aminoácido que compõem o sítio (todos da cadeia β), juntamente com a legenda (em vermelho para a tubulina do *P. falciparum* e em preto para a tubulina bovina).

A Figura 34 apresenta diagramas esquemáticos da colchicina nos sítios da **PfTu** e da tubulina bovina-molde (**4o2b**), gerados pelo LIGPLOT (WALLACE, LASKOWSKI e THORNTON, 1995). É possível observar que a ligação de hidrogênio entre o ligante e a Val181 da cadeia α é mantida entre as duas formas da proteína. O resíduo Val181A também é conservado na tubulina humana (Fig. 19), portanto sugere-se que esta ligação de hidrogênio também deva ocorrer entre a colchicina e a proteína humana.

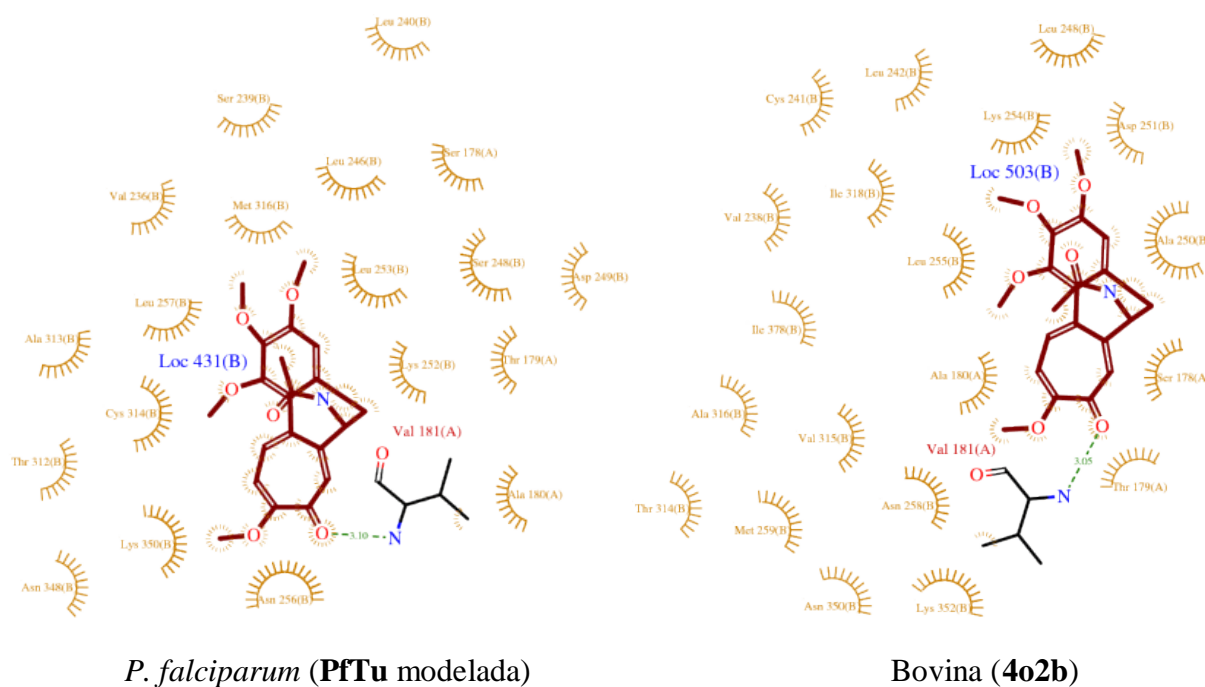


Figura 34 – Diagramas das interações entre a colchicina e os resíduos de aminoácidos da tubulina do *P. falciparum* e da tubulina bovina (**4o2b**). Adaptado do PDBsum.

2.2.4 Predição do Mecanismo de Ação das Lignanais Ariltetralônicas Antiplasmodiais

Após ter obtido a estrutura tridimensional das lignanas ariltetralônicas por modelagem molecular, ter identificado a tubulina do *P. falciparum* como possível alvo biológico destes compostos por meio da busca em bancos de dados e ter obtido a estrutura tridimensional da **PfTu** por modelagem por homologia, a última etapa para se elucidar o provável mecanismo de ação destas lignanas foi posicioná-las no sítio de ligação da colchicina da **PfTu** e analisar as interações que estes compostos realizam com a proteína. Isto foi possível por meio de estudos de *docking* molecular, cujos resultados serão discutidos nesta seção.

Os dados experimentais de atividade antiplasmodial destas ariltetralonas, obtidos por Andrade-Neto et al. (2007), estão reunidos na Tabela 9.

Tabela 9 – IC₅₀ e IC₉₀ das lignanas ariltetralônicas testadas no *P. falciparum* isolado BH26/86. Adaptado de Andrade-Neto et al. (2007)

| Lignana | Nomenclatura | IC ₅₀ (μM) ^a | IC ₉₀ (μM) ^b |
|---------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1 | (7'R,8S,8'R)-4,5-Dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-2,7'-ciclolignan-7-ona | 0,26 ± 0,08 | 3,35 ± 0,12 |
| 2 | (7'R,8S,8'R)-3',4,4',5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona | 0,32 ± 0,11 | 4,60 ± 0,30 |
| 3 | (7'R,8R,8'S)-3',4,4',5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona | 0,20 ± 0,09 | 3,00 ± 0,15 |
| 4 | (7'R,8S,8'S)-3',4,4',5-Tetrametoxi-2,7'-ciclolignan-7-ona | 0,63 ± 0,20 | 2,61 ± 0,06 |
| 5 | (7'R,8S,8'S)-3',4'-Dimetoxi-4,5-metilenodioxi-2,7'-ciclolignan-7-ona | 8,00 ± 0,65 | 19,70 ± 0,42 |
| 6 | (7'R,8S,8'S)-4,5-Dimetoxi-3',4'-metilenodioxi-2,7'-ciclolignan-7-ona | >140,00 | >140,00 |

^a Concentração inibitória para 50% de inibição;

^b Concentração inibitória para 90% de inibição.

No **Apêndice** disponível ao final deste trabalho estão reunidas as tabelas contendo as interações entre todos os ligantes estudados e o sítio receptor da tubulina, obtidas nos resultados de *docking*.

2.2.4.1 Redocking e cross-docking na tubulina bovina 4o2b

Os métodos de *docking* são utilizados para se predizer o modo como um determinado composto se liga a uma proteína receptora (SUTHERLAND et al., 2007). O chamado *redocking* consiste em se reproduzir um complexo cristalográfico proteína-ligante com um *root-mean-square deviation* (RMSD) menor do que 2 Å (NISSINK et al., 2002; VERDONK et al., 2003; KANG et al., 2009): o ligante é extraído da estrutura cristalográfica e então reposicionado no sítio por meio de *docking* molecular. Uma forma mais realística de se avaliar a capacidade do programa de *docking* em reproduzir um resultado cristalográfico, no entanto, é o *cross-docking*, no qual se utiliza a estrutura proteica de um complexo contendo um ligante diferente do utilizado na simulação (SUTHERLAND et al., 2007).

Assim, neste trabalho primeiramente foi realizado o *redocking* da **colchicina** e o *cross-docking* da **podofilotoxina** no sítio de ligação da colchicina da estrutura cristalográfica

4o2b, como uma forma de se validar os parâmetros utilizados nos cálculos de *docking*. Considerando que o sítio de ligação da colchicina da **4o2b** é estruturalmente semelhante ao mesmo sítio da **PfTu** modelada (B Fig. 33), uma vez validados os parâmetros do *docking* na **4o2b** estes podem ser extrapolados para os experimentos de *docking* das lignanas ariltetralônicas na **PfTu**.

Para o *redocking*, o ligante cristalográfico **colchicina** foi extraído da própria estrutura **4o2b**, enquanto que para o *cross-docking* a **podofilotoxina** cristalográfica foi extraída de outra estrutura de tubulina bovina, sob o código PDB **1sa1** (RAVELLI et al., 2004). Os resultados do *redocking* e do *cross-docking* na **4o2b** são mostrados na Figura 35. Os *scores* obtidos neste primeiro experimento são apresentados na Tabela 10.

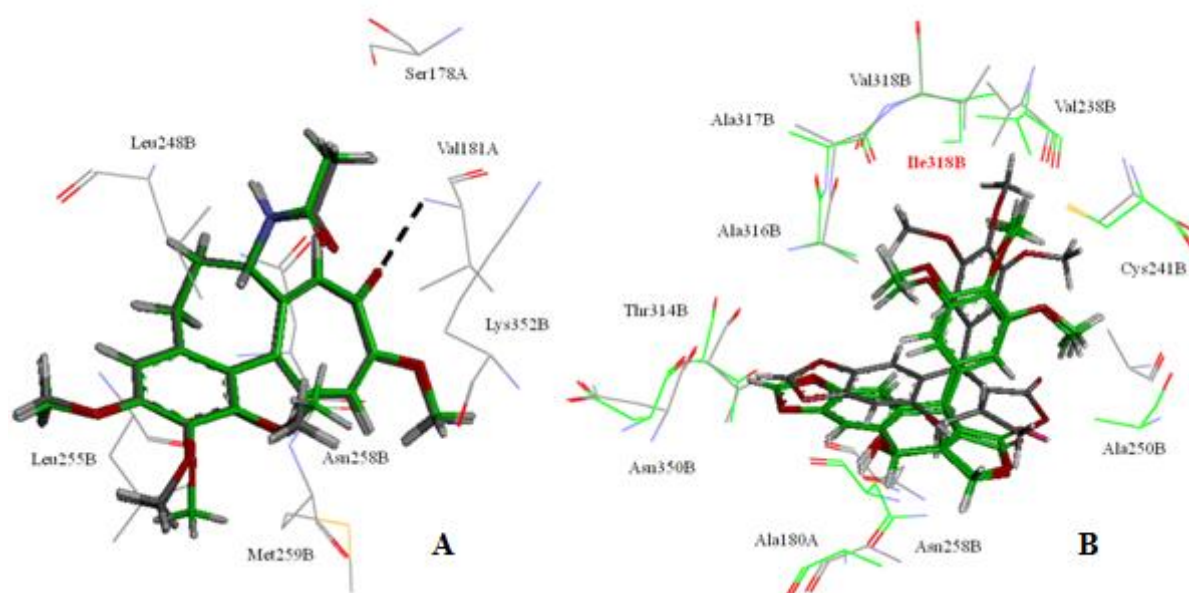


Figura 35 – **A.** Orientações obtidas para a **colchicina** no *redocking* na estrutura **4o2b**. Os átomos de carbono da colchicina cristalográfica original estão representados em verde, enquanto que os átomos de carbono das colchicinas obtidas no *redocking* são representados em cinza. A linha pontilhada representa ligações de hidrogênio. **B.** Sítios de ligação da colchicina da **4o2b** e da **1sa1** sobrepostos. Os carbonos alfa dos resíduos da **4o2b** e das **podofilotoxinas** resultantes do *cross-docking* aparecem em verde, enquanto que os carbonos alfa da **1sa1**, bem como de sua podofilotoxina cristalográfica complexada, aparecem em cinza. A Val318B na **4o2b** é substituída pela Ile318B (legenda em vermelho) na **1sa1**.

Tabela 10 – *Scores* obtidos durante o *redocking* (colchicina) e *cross-docking* (podofilotoxina) na **4o2b**

| Ligante | <i>Score</i> (média) ^a |
|-----------------------|-----------------------------------|
| <i>Redocking</i> | |
| Colchicina | 81,62 |
| <i>Cross-docking</i> | |
| Podofilotoxina | 68,60 |

^a Dado pela função *score* ChemPLP.

É possível observar que as orientações geradas para a **colchicina** durante o *redocking* ficaram sobrepostas à orientação cristalográfica deste ligante (A Fig. 35). Inclusive a ligação de hidrogênio entre a **colchicina** e a Val181A da tubulina bovina experimental (Fig. 34) foi recriada durante a simulação computacional (A Fig. 35). O RMSD obtido entre uma das poses do *redocking* e a colchicina co-cristalizada foi de 0,4132 Å, sendo que para um experimento de *redocking* ser considerado bem-sucedido este valor deve ser inferior a 2,0 Å (NISSINK et al., 2002; VERDONK et al., 2003; KANG et al., 2009). Assim, foi possível recriar a orientação cristalográfica do ligante **colchicina** na estrutura experimental **4o2b** por meio de *docking* molecular, utilizando o programa GOLD.

Já no experimento de *cross-docking*, considerando esta mesma estrutura **4o2b**, obteve-se uma pose para a **podofilotoxina** semelhante à pose deste mesmo ligante co-cristalizado com a tubulina bovina sob o código PDB **1sa1**: o anel com substituinte trimetóxi orientando-se próximo à Cys241B e a porção contendo o metilenodióxi orientando-se próximo à Thr314B (B Fig. 35). A Figura 35B mostra os sítios de ligação da colchicina das estruturas **4o2b** (carbonos em verde) e **1sa1** (carbonos em cinza) sobrepostos, onde o RMSD entre a **podofilotoxina** co-cristalizada à **1sa1** e uma das poses do *cross-docking* obtidas para a **4o2b** foi de 1,8733 Å. Experimentos de *cross-docking* também são considerados bem-sucedidos ao se obter RMSD inferior a 2,0 Å; devido às incertezas resultantes da sobreposição das proteínas, alguns estudos utilizam inclusive o limiar de 2,5 Å para se determinar a eficácia dos resultados do *cross-docking* (SUTHERLAND et al., 2007). Assim, também foi possível reproduzir na estrutura **4o2b** a orientação do ligante **podofilotoxina** co-cristalizado em outra estrutura cristalográfica (**1sa1**), utilizando os métodos de *docking* molecular implementados no programa GOLD.

Como se obteve êxito no *redocking* da **colchicina** e no *cross-docking* da **podofilotoxina** na tubulina bovina **4o2b**, os mesmos parâmetros utilizados nestes experimentos também foram para o *docking* molecular das lignanas ariltetralônicas na **PfTu**.

2.2.4.2 Docking das lignanas ariltetralônicas, colchicina e podofilotoxina na tubulina do *P. falciparum*

Utilizando os mesmos parâmetros do *redocking* e *cross-docking* na **4o2b**, realizou-se o *docking* das **lignanas ariltetralônicas**, da **colchicina** e da **podofilotoxina** no sítio de ligação da colchicina na **PfTu** obtida por modelagem por homologia. As orientações obtidas para

estes ligantes na proteína são apresentadas na Figura 36 e os *scores* associados a cada uma aparecem na Tabela 11.

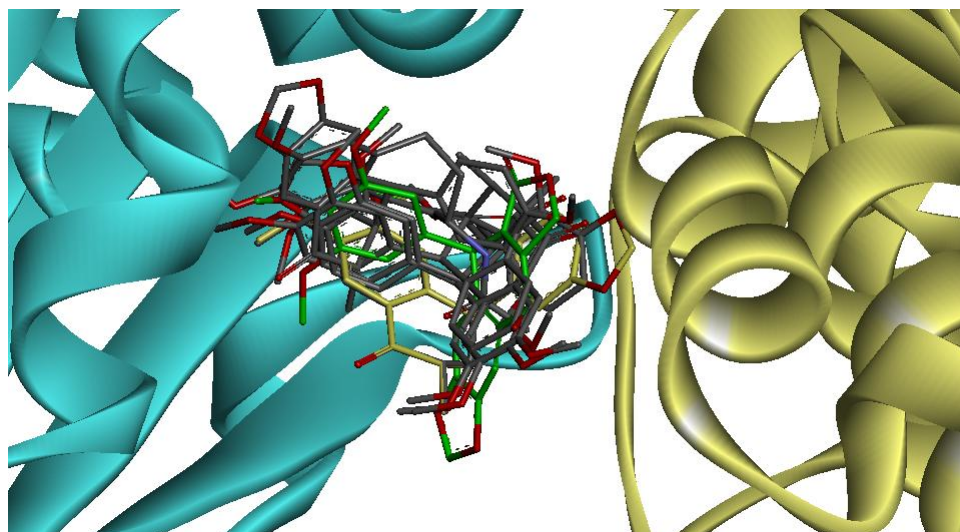


Figura 36 – Orientações obtidas no *docking* dos ligantes **colchicina** (átomos de carbono em amarelo), **podofilotoxina** (átomos de carbono em verde) e lignanas ariltetralônicas **1, 2, 3, 4, 5 e 6** (átomos de carbono em cinza) no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. A estrutura secundária da cadeia α da proteína é representada em amarelo e da cadeia β em ciano. Não são exibidos os átomos de hidrogênio.

Tabela 11 – *Scores* obtidos durante o *docking* no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum* obtida por modelagem por homologia

| Ligante | Score ^a | Ligante | Score ^a |
|----------|--------------------|-----------------------|--------------------|
| 1 | 48,46 | 5 | 50,10 |
| 2 | 51,13 | 6 | 47,48 |
| 3 | 49,41 | Colchicina | 60,76 |
| 4 | 53,80 | Podofilotoxina | 42,28 |

^a Dado pela função *score* ChemPLP. Exibido apenas o *score* da pose selecionada para cada ligante.

Pode-se observar que todos os ligantes estudados ocupam uma mesma região do sítio de ligação da colchicina, localizado na interface entre as cadeias α e β da tubulina (Fig. 36). A seguir, são discutidos os resultados obtidos para cada um destes ligantes.

2.2.4.2.1 Colchicina e podofilotoxina

A primeira etapa do estudo de *docking* molecular na **PfTu** consistiu em descrever o modo de ligação da **colchicina** – um conhecido inibidor da tubulina de diversas espécies. A orientação obtida para este ligante no sítio de ligação da colchicina é apresentada na Figura 37.

Pode-se observar que, embora ocorram algumas substituições de aminoácidos nesta região, o modo de ligação da **colchicina** na tubulina do parasita é o mesmo que na tubulina bovina cristalográfica: o anel aromático do ligante é mantido entre os resíduos Leu246B e Leu253B por meio de interações C–H... π , além de ocorrer uma ligação de hidrogênio N–H...O entre seu átomo de oxigênio e a Val181A. O RMSD obtido entre a **colchicina** co-cristalizada à **4o2b** e uma das poses obtidas no *docking* deste mesmo ligante à **PfTu** foi de 0,4694 Å, o que também indica a equivalência no modo de ligação deste composto nestas duas proteínas.

É possível observar também que a estrutura secundária na região do sítio de ligação da colchicina é conservada entre as duas proteínas, assim como os resíduos Val181A, Leu246B e Leu253B que mantêm a colchicina na posição indicada por meio de suas interações com o ligante (Fig. 37). Pela análise do alinhamento múltiplo realizado (Figs. 19 e 20), verifica-se que estes resíduos também são conservados na forma humana da tubulina.

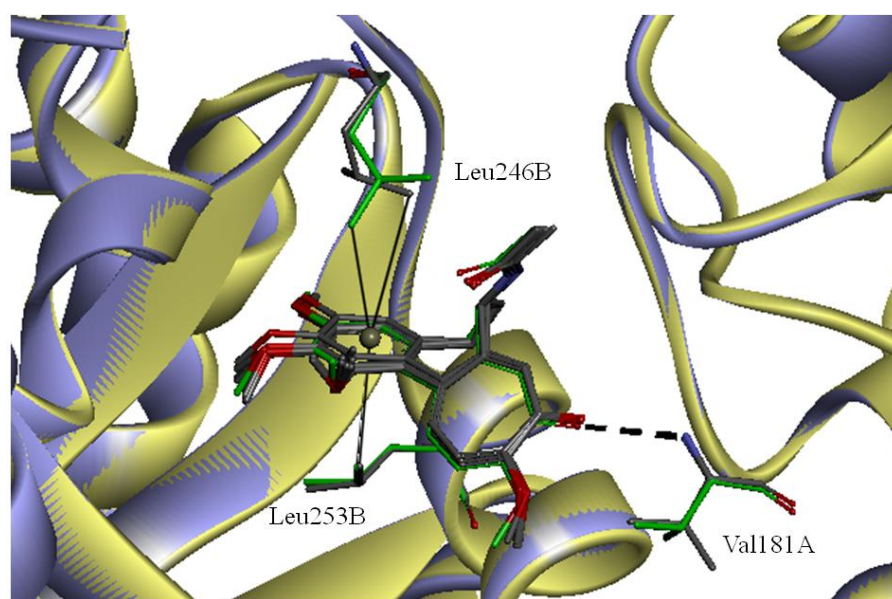


Figura 37 – Orientações obtidas para a **colchicina** no *docking* (átomos de carbono em cinza) na tubulina do *P. falciparum* (estrutura secundária em amarelo) em comparação com a orientação da **colchicina** cristalográfica (átomos de carbono em verde) na tubulina bovina **4o2b** (estrutura secundária em azul). Ligações de hidrogênio são representadas como linhas pontilhadas, enquanto que outros tipos de interações são representadas na forma de linhas contínuas.

As principais interações que a **colchicina** faz com a proteína **PfTu** estão representadas na Figura 38. Comparando-se com o complexo cristalográfico entre a **colchicina** e a tubulina bovina **4o2b**, algumas destas interações ocorrem apenas na forma plasmodial da proteína, tais como:

- interação C–H...O com a hidroxila da Ser248B; na **4o2b** este resíduo é substituído pela Ala250B, que não possui este grupo funcional em sua cadeia lateral;
- interação S–H...O com o grupo tiol da Cys314B; o resíduo é substituído pela Ala316B na correspondente bovina;
- interação entre um dos oxigênios do ligante e o enxofre da Met316B; este resíduo é substituído pela Ile318B na **4o2b**.

Além destas interações únicas, há outras interações importantes que também ocorrem para a tubulina bovina, como as já citadas interações C–H... π com Leu246B e Leu253B e ligação de hidrogênio com a Val181A, e as interações C–H...O com a Thr179A, Val181A, Ser248B e Asn256B (Fig. 38).

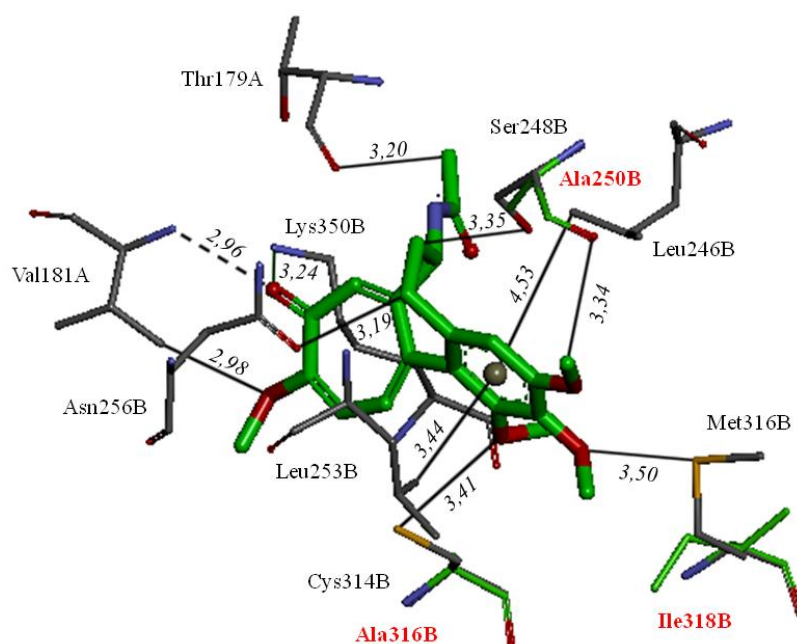


Figura 38 – Principais interações entre a **colchicina** e resíduos de aminoácido do sítio de ligação da tubulina do *P. falciparum*. São exibidas as distâncias, em Å, entre os átomos envolvidos nas interações. Não são mostrados os átomos de hidrogênio. Para fins de comparação, os resíduos que são substituídos na **4o2b** aparecem com os átomos de carbono em verde e legenda em vermelho.

Entre os ligantes estudados nos experimentos de *docking* na **PfTu** neste trabalho, a **colchicina** foi a que obteve os melhores *scores* (Tabela 11).

Para a **podofilotoxina**, outro conhecido inibidor de tubulinas de diferentes organismos (Tabela 4), foi obtido que na **PfTu** seu anel aromático contendo o substituinte trimetóxi orienta-se em uma posição semelhante ao obtido para a **podofilotoxina** co-cristalizada na **1sa1** e também semelhante ao obtido no *cross-docking* na **4o2b**. Esta posição do anel seria

mantida principalmente pela interação C–H... π com a Leu246B, conservada nestas três tubulinas (A Fig. 39) – interação esta que também ocorre com a **colchicina** (Fig. 35).

O restante da molécula, no entanto, ocupa uma posição diferente no sítio em relação ao observado para a **1sa1** (cristalográfica) e **4o2b** (*cross-docking*). Essa diferença pode ser devido à substituição da Ala250B na forma bovina pela Ser248B na tubulina plasmoidal, de modo que o composto se desloca para que ocorra uma ligação de hidrogênio O–H...O entre a hidroxila deste resíduo e um dos grupos metóxi do anel aromático da **podofilotoxina** (A Fig. 39 e Fig. 40). Com este deslocamento do anel contendo o trimetóxi, o restante da molécula ocupa uma posição distinta no sítio, a fim de se evitar choques estéricos principalmente com a Asn256B.

Além disso, vemos na posição 316B (ou 318B na forma bovina) uma substituição de resíduos com cadeias laterais cada vez mais volumosas: Val318B (menos volumosa) na **1sa1**, Ile318B (volume intermediário) na **4o2b** e Met316B (mais volumosa) na **PfTu** (B Fig. 39). Essas diferenças no volume das cadeias laterais também podem ter contribuído para o deslocamento gradual da **podofilotoxina** no sítio: quanto mais volumosa a cadeia lateral do resíduo nesta posição, mais afastada a **podofilotoxina** se encontra em relação a este resíduo (B Fig. 39). Para fins de comparação, na tubulina humana temos uma valina nesta posição (Fig. 20).

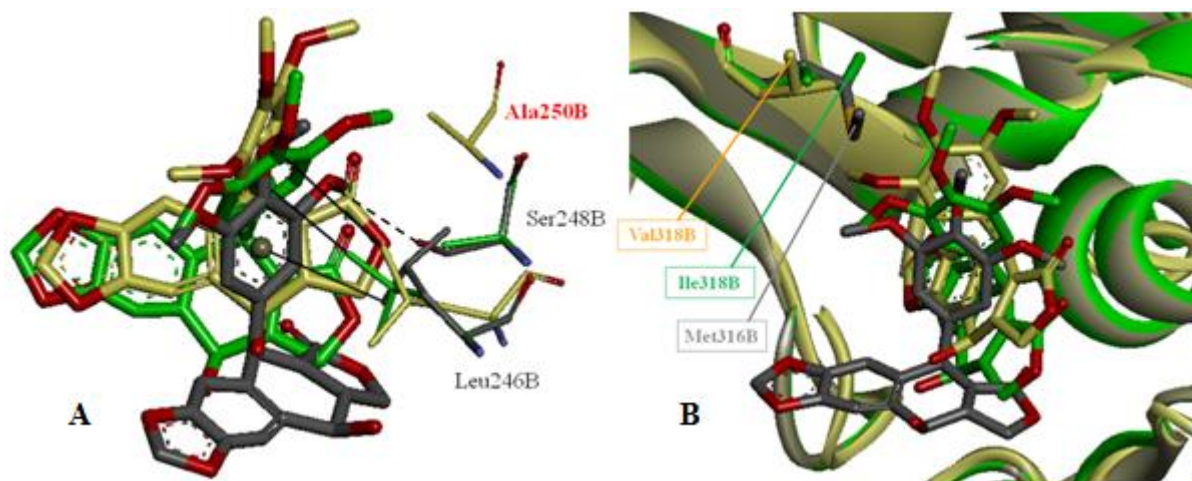


Figura 39 – **A.** Orientações obtidas para a **podofilotoxina** no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum* (*docking*, átomos de carbono em cinza), da tubulina bovina **4o2b** (*cross-docking*, átomos de carbono em verde) e da tubulina bovina **1sa1** (cristalográfica, átomos de carbono em amarelo). Destaque para as interações C–H... π com a Leu246B e a ligação de hidrogênio com a Ser248B, substituída por Ala250B na proteína bovina. **B.** Outra visão das **podofilotoxinas** no sítio de ligação, mostrando as estruturas secundárias das tubulinas (*P. falciparum* em cinza, **4o2b** em verde e **1sa1** em amarelo). Destaque para o resíduo Met316B na tubulina plasmoidal, substituída por Ile318B na **4o2b** e Val318B na **1sa1**.

Além destas interações citadas, a **podofilotoxina** realiza, ainda, outras importantes interações com a **PfTu**. De acordo com o resultado obtido no *docking*, este ligante realiza seis ligações de hidrogênio com a proteína (Fig. 40):

- N–H...O com Asn101A (duas ligações), Asn256B e Ser351B;
- O–H...O com Ser178A e Ser248B (já citada anteriormente).

Ainda, há uma interação C–H...O entre um de seus grupos metóxi e a Lys350B (Fig. 40).

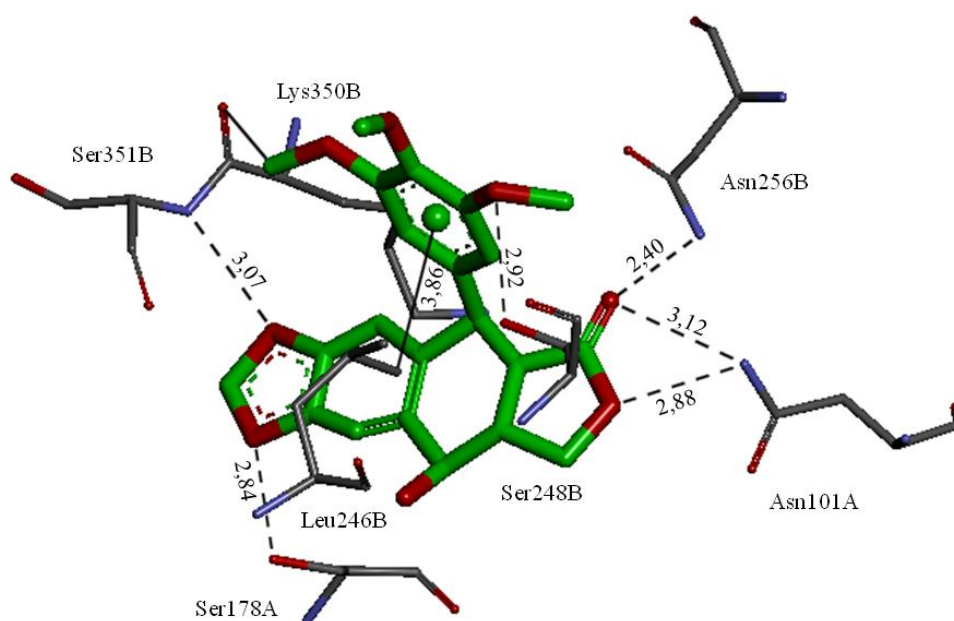


Figura 40 – Interações entre a **podofilotoxina** e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*. Os átomos de carbono da **podofilotoxina** são representados na cor verde. Não são exibidos átomos de hidrogênio.

Dentre os ligantes estudados, a **podofilotoxina** foi a que apresentou piores *scores* nos experimentos de *docking* (Tabela 11).

2.2.4.2.2 Lignanas ariltetralônicas **1**, **2** e **3**

Para as lignanas ariltetralônicas **1**, **2**, **3**, **4**, **5** e **6**, foram obtidos *scores* intermediários entre a **colchicina** (maior *score*) e a **podofilotoxina** (menor *score*) (Tabela 11).

Os resultados obtidos no *docking* molecular indicam que as lignanas **1**, **2** e **3** (Tabela 9) apresentam um mesmo modo de ligação no sítio da colchicina da **PfTu** (Fig. 41). Neste, o anel C dos ligantes (Tabela 9) orienta-se na mesma região do sítio obtida para o anel

contendo os substituintes metoxila da **colchicina** e da **podofilotoxina**, realizando uma interação C–H... π com a Leu246B – assim como o obtido para os conhecidos inibidores já apresentados. Pode-se observar, inclusive, que este anel C se sobrepõe ao anel contendo o trimetóxi da **podofilotoxina** (Fig. 41). Estas lignanas apresentaram valores próximos de *score* (Tabela 11), além de atividades experimentais semelhantes (Tabela 9) (ANDRADE-NETO et al., 2007).

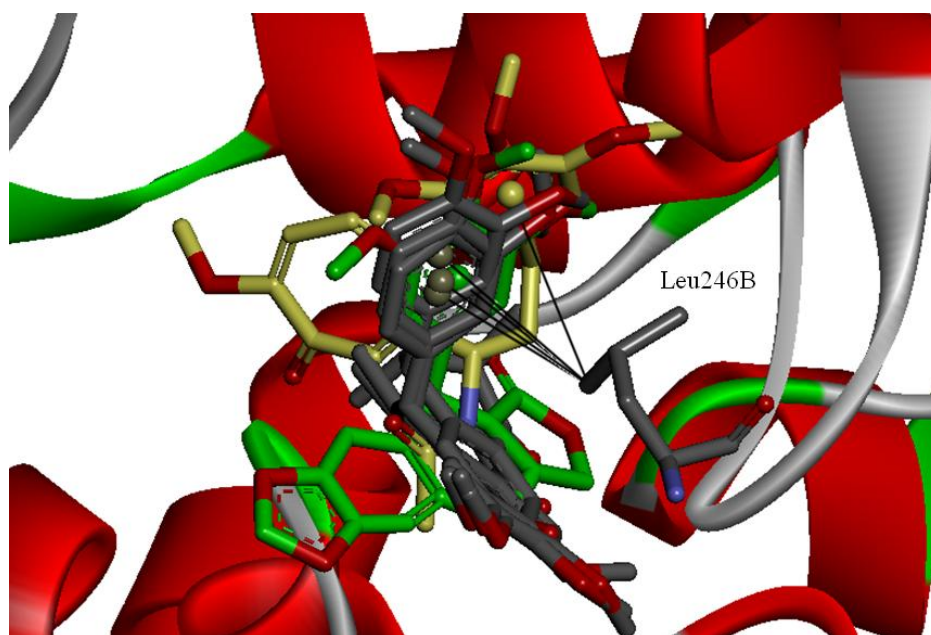


Figura 41 – Orientações obtidas para as lignanas ariltetralônicas **1**, **2** e **3** no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*, em comparação com o obtido para a **colchicina** (átomos de carbono em amarelo) e para a **podofilotoxina** (átomos de carbono em verde) no mesmo sítio. A estrutura secundária da proteína também é representada. Destaque para as interações C–H... π com a Leu246B.

As principais interações que os ligantes **1**, **2** e **3** realizam com a proteína são (Figs. 42, 43 e 44, respectivamente):

- três interações C–H... π , sendo duas com a Leu246B (uma com o anel A e outra com o anel C dos ligantes) e uma com a Ser178A. Como já citado, interação C–H... π com a Leu246B também foi obtida para os conhecidos inibidores **colchicina** (Fig. 38) e **podofilotoxina** (Fig. 40);
- duas ligações de hidrogênio O–H...O, sendo uma com a hidroxila da Ser178A e a outra com o mesmo grupo funcional da Ser248B. Estas duas ligações de hidrogênio, com estes mesmos resíduos, também foram obtidas para a **podofilotoxina** neste sítio (Fig. 40);
- uma ligação de hidrogênio N–H...O com a Gln245B;
- interações C–H...O com a Thr179A, Asn256B e Ser351B. Este mesmo tipo de interação com Thr179A e Asn256B também foi obtido para a **colchicina** (Fig. 38).

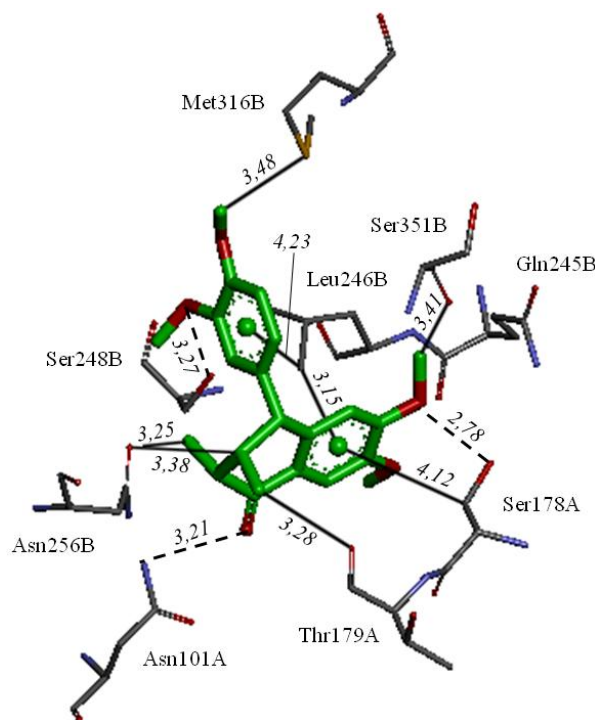


Figura 44 – Interações entre o composto **3** e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*.

Embora o composto **1** possua um substituinte diferente no anel C – um metilenodióxi, ao invés do dimetóxi que ocorre em **2** e **3** (Tabela 9) – a principal interação desta porção dos ligantes com o sítio de ligação é mantida: uma ligação de hidrogênio O–H...O com a hidroxila da Ser248B (Fig. 42), também obtida para a **podofilotoxina** (Fig. 40). Isto é possível pois, embora os substituintes sejam diferentes, os átomos de oxigênio do metilenodióxi e do dimetóxi ficam sobrepostos, podendo manter esta ligação de hidrogênio nas duas situações.

Para o composto **3**, foi obtida uma ligação de hidrogênio N–H...O com a Asn101A que não ocorre para os demais ligantes (Fig. 44); ligações de hidrogênio deste tipo, com este resíduo, também foram encontradas para a **podofilotoxina** no mesmo sítio (Fig. 40). Isto é devido a uma configuração diferente dos estereocentros no anel B de **3** (Tabela 9), que permite que o ligante se aproxime deste resíduo (Fig. 45); a proximidade de um dos grupos metila dos ligantes **1** e **2** com a Ala180A não permite que estes ligantes se orientem de modo a ocorrer esta ligação de hidrogênio com a Asn101A como ocorre para **3**. Além disso, esta configuração única dos estereocentros de **3** permite que somente para este ligante ocorra uma interação C–H...O adicional com a Asn256B (Fig. 45) – interação deste tipo também foi encontrada para a **colchicina** (Fig. 38). Também foi obtida unicamente para o ligante **3** uma interação C–H...S com a Met316B (Fig. 44); para a **colchicina**, foi obtido que um de seus oxigênios interage com o enxofre deste mesmo resíduo.

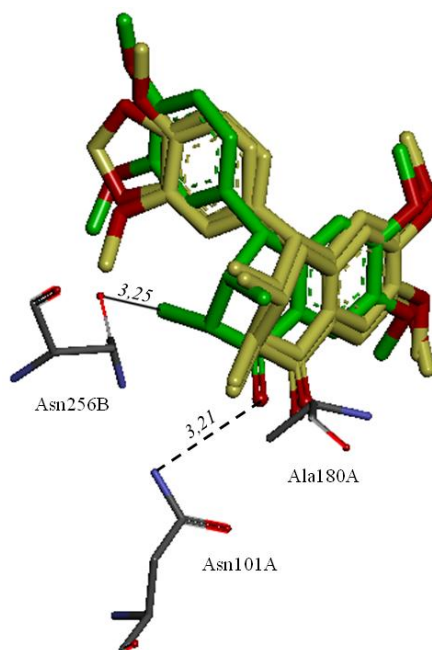


Figura 45 – Interações exclusivas de **3** (carbonos em verde) em comparação com **1** e **2** (carbonos em amarelo), devido às diferenças na configuração dos estereocentros no anel B.

É importante destacar que a Ser248B e a Met316B ocorrem apenas na forma plasmoidal da proteína, em comparação com as tubulinas humana e bovina. A Ser248B é substituída por uma alanina e a Met316B por uma valina ou isoleucina nas tubulinas de mamífero estudadas (Fig. 20). Portanto, interações com estes resíduos são importantes para se buscar inibidores mais seletivos à proteína do parasita (maior afinidade pela tubulina do *Plasmodium* do que pelas tubulinas de mamíferos).

Com base no modo de ligação obtido para as lignanas **1**, **2** e **3**, sugere-se que para se melhorar a atividade destes compostos seja considerada a adição de mais um grupo metóxi ao anel C, de modo a formar um substituinte trimetóxi semelhante à **colchicina** e à **podofilotoxina**. Isto permitiria um melhor preenchimento do sítio de ligação, inclusive possivelmente realizando uma interação C–H...O com a Lys350B, como foi obtido para a **podofilotoxina** – cujo anel aromático se sobrepõe aos anéis C de **1**, **2** e **3** neste mesmo sítio (Fig. 46).

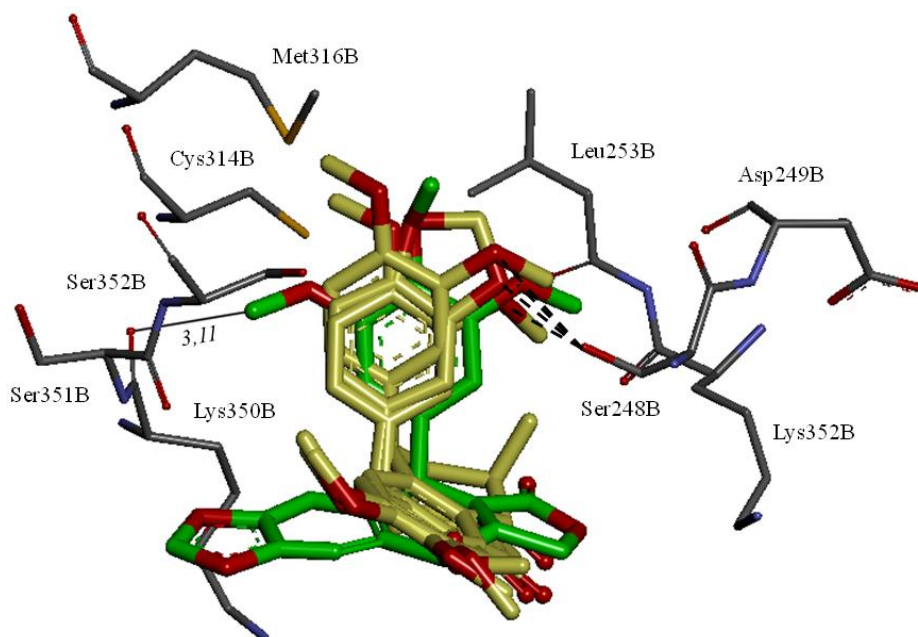


Figura 46 – Comparação do preenchimento do sítio pelo substituinte trimetóxi da **podofilotoxina** (carbonos em verde) e dos substituintes dimetóxi ou metilenodióxi das lignanas **1**, **2** e **3** (carbonos em amarelo). São exibidos apenas os resíduos próximos a esta porção dos ligantes. Destaque para a interação C–H...O única da **podofilotoxina** com a Lys350 (linha contínua) e para as ligações de hidrogênio com a Ser248B obtidas para todos os ligantes.

2.2.4.2.3 Lignanas ariltetralônicas **4** e **6**

Para as lignanas ariltetralônicas **4**, **5** e **6** foi obtido um modo de ligação distinto do obtido para os ligantes **1**, **2** e **3**. Provavelmente isto seja devido à configuração dos estereocentros no anel B destes ligantes, a qual não permite que se orientem da mesma maneira que o obtido para **1**, **2** e **3**, já que ocorreriam choques estéricos com a Thr179A e Ala180A devido à proximidade dos substituintes metila com estes resíduos (Fig. 47). É possível observar na Figura 47 que na configuração dos estereocentros dos ligantes **1** e **2** um dos grupos metila fica próximo à Ala180A, porém o outro grupo fica distante da Thr179A; o inverso ocorre para o ligante **3**, onde uma metila fica próxima da Thr179A e a outra distante da Ala180A. Assim, uma lignana ariltetralônica com os dois grupos metila na mesma configuração, como ocorre em **4**, **5** e **6**, não poderia apresentar o mesmo modo de ligação que **1**, **2** e **3** devido à proximidade desta porção do ligante com o par de resíduos Thr179A/Ala180A do sítio de ligação.

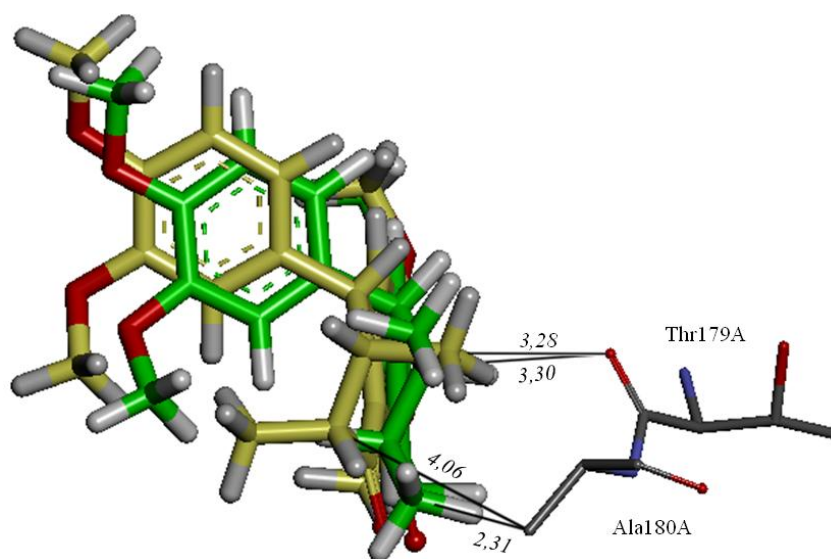


Figura 47 – Comparação da proximidade dos substituintes metila dos ligantes **2** (carbonos em verde) e **3** (carbonos em amarelo) com os resíduos Thr179A e Ala180A do sítio de ligação. Os átomos de hidrogênio são exibidos apenas para os ligantes.

Neste item, será discutido o modo de ligação obtido para as lignanas **4** e **6**; no item seguinte será apresentado o obtido para **5**. Embora tenham sido obtidos diferentes modos de ligação, os valores de *score* foram próximos para todas as lignanas estudadas (Tabela 11).

Os compostos **4** e **6** orientam-se da mesma maneira no sítio de ligação da colchicina da **PfTu**, com o anel aromático C entre os resíduos Ala180A e Leu246B (Fig. 48). As principais interações que estes ligantes realizam com resíduos de aminoácido do sítio são (Fig. 49 e 50):

- interações C–H... π com Ala180A, Leu246B (uma com cada um dos anéis dos ligantes) e Lys350B. Embora o anel contendo o trimetóxi da **colchicina** e da **podofilotoxina** orientem-se em uma posição distinta do sítio, para estes inibidores também ocorre uma interação deste tipo com a Leu246B (Figs. 38 e 40);
- ligação de hidrogênio S–H...O entre o tiol da Cys314B e o oxigênio do substituinte metóxi dos ligantes. Para a **colchicina** também foi obtida uma interação deste tipo com a Cys314B (Fig. 38). Interações com a Cys314B são importantes para se promover a seletividade dos inibidores à proteína do parasita, uma vez que nas tubulinas humana e bovina este resíduo é substituído por uma alanina (Fig. 20), incapaz de realizar este tipo de interação S–H...O;
- ligação de hidrogênio O–H...O com a hidroxila da Ser352B. Assim como a Cys314B, este também é um resíduo substituído por uma alanina nas tubulinas humana e bovina,

incapaz de realizar este tipo de ligação de hidrogênio com o ligante. Portanto, as interações com este resíduo devem ser exploradas para promover a seletividade à **PfTu**;

- interações C–H...O com a Ser178A e Asn256B. Este mesmo tipo de interação com a Asn256B também foi obtido para a **colchicina** (Fig. 38).

Além das interações destacadas acima, apenas o ligante **4** é capaz de realizar duas ligações de hidrogênio N–H...O entre seu substituinte metóxi do anel C e os resíduos Asn101A e Asn256B (Fig. 49). Estas duas ligações de hidrogênio, com os mesmos resíduos do sítio, também foram obtidas para a **podofilotoxina** (Fig. 40). Como o composto **6** apresenta um metilenodióxi nesta mesma posição, estas interações não foram encontradas para este ligante (Fig. 50).

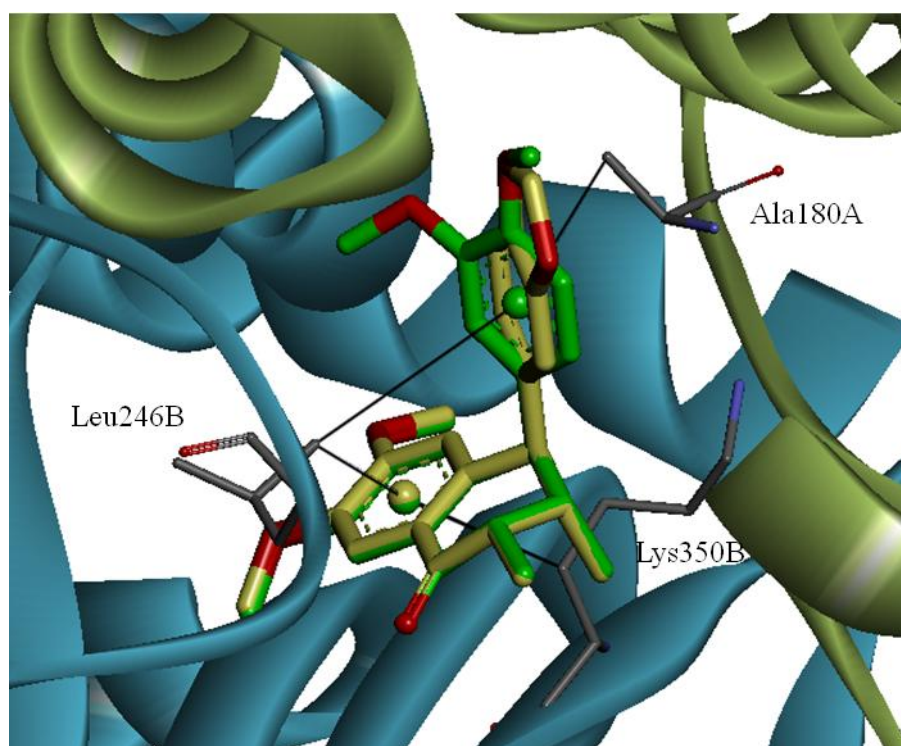


Figura 48 – Modo de ligação obtido para as lignanas **4** (carbonos em verde) e **6** (carbonos em amarelo) na tubulina do *P. falciparum*. São destacadas as ligações C–H... π que ocorrem com resíduos das duas cadeias da proteína. A estrutura secundária da cadeia α da tubulina é representada em dourado e da cadeia β em ciano.

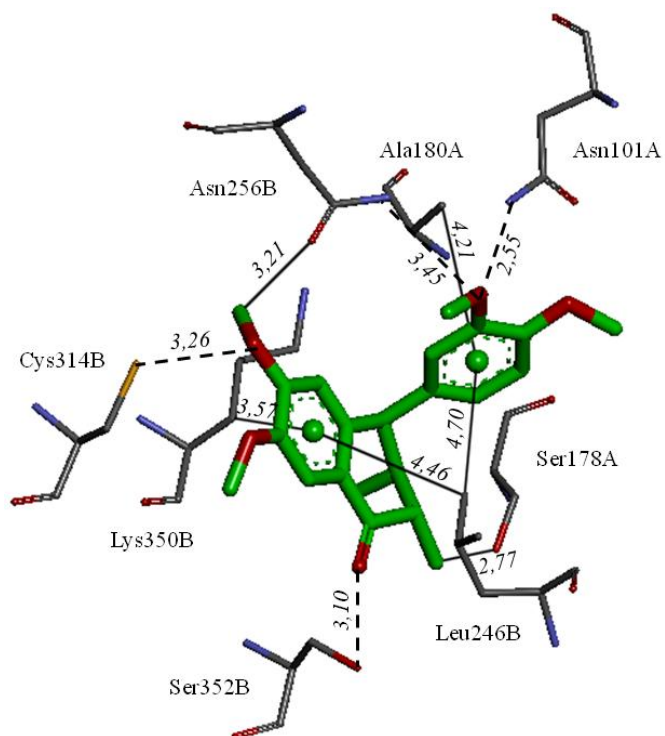


Figura 49 – Interações entre o composto 4 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*.

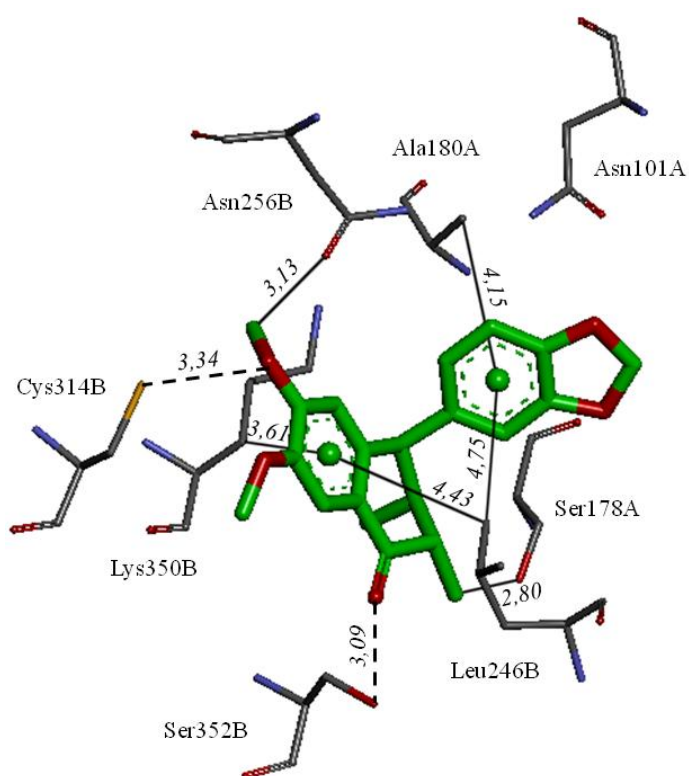


Figura 50 – Interações entre o composto 6 e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*.

Para este modo de ligação, sugere-se que uma forma de se melhorar a atividade dos compostos seja a introdução de uma hidroxila, por exemplo, ligada ao carbono do substituinte metila que se orienta próximo à Ser178A. Isto poderia promover a ocorrência de uma ligação de hidrogênio O–H...O entre os ligantes **4** e **6** e este resíduo do sítio (Figs. 49 e 50).

2.2.4.2.4 Lignana ariltetralônica **5**

O modo de ligação obtido para o composto **5** é único, distinto dos demais ligantes apresentados anteriormente. A configuração de seus estereocentros no anel B não permite que esta lignana se oriente como **1**, **2** e **3** – da mesma forma como discutido para **4** e **6**. Além disso, a presença do substituinte metilenodióxi no anel A também não permite que **5** apresente o mesmo modo de ligação que **4** e **6**, de forma a evitar choques estéricos com a Cys314B; observa-se uma proximidade entre os substituintes dimetóxi do mesmo anel A dos ligantes **4** e **6** e este resíduo (Fig. 51).

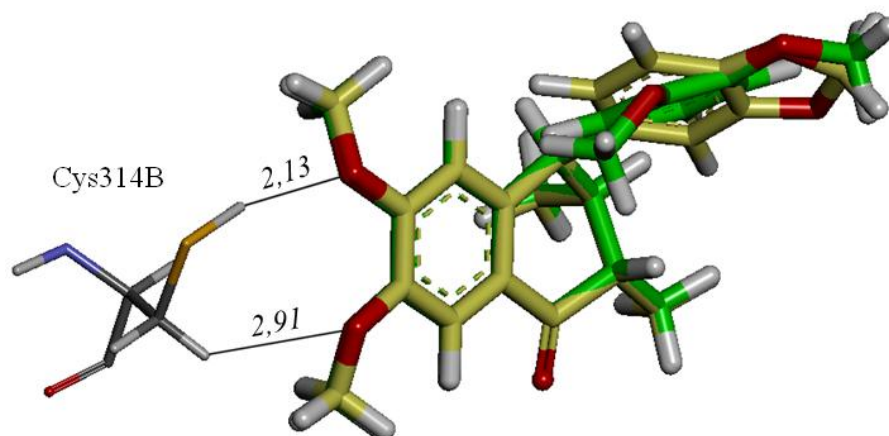


Figura 51 – Representação da proximidade entre as lignanas **4** (verde) e **6** (amarelo) e a Cys314B do sítio de ligação da tubulina do *P. falciparum*.

Para a lignana **5**, os resultados de *docking* molecular indicam que este ligante orienta-se no sítio de ligação da colchicina da **PfTu** de modo que seu anel A, contendo o substituinte metilenodióxi, se sobrepõe ao anel contendo trimetóxi da **colchicina**, reproduzindo duas interações C–H... π obtidas para este conhecido inibidor da tubulina (Fig. 52). Nesta orientação, as principais interações que o ligante realiza com a proteína são (Fig. 53):

- interações C–H... π com a Leu246B (uma com cada anel aromático do ligante) e Leu253B, também obtidas para a **colchicina** (Fig. 38). Já para a **podofilotoxina** também foi encontrada este tipo de interação com a Leu246B (Fig. 40);
- interação N–H... π com a Asn256B;
- interações C–H...O com Thr179A, Leu253B, Asn256B e Lys350B. Interações deste tipo com a Thr179A e Asn256B também foram obtidas para a **colchicina** (Fig. 38), e com a Lys350B também foi obtida para a **podofilotoxina** (Fig. 40);
- interação C–H...S com o tiol da Cys314B. Nas tubulinas humana e bovina há uma alanina nesta posição, incapaz de realizar este tipo de interação por não possuir grupo tiol. É, portanto, uma interação única à forma plasmoidal da tubulina.

Além destas interações, um de seus átomos de oxigênio interage com o enxofre da Met316B, o que também ocorre para a **colchicina** neste mesmo sítio (Fig. 38) – este resíduo é substituído por alanina ou isoleucina nas tubulinas humana e bovina.

Assim como no caso de **4** e **6**, sugere-se que uma forma de se melhorar a atividade do composto **5** seria a introdução de uma hidroxila, por exemplo, ligada ao carbono de um dos substituintes metila no anel B. Desta vez, o grupo metila orienta-se próximo ao tiol da Cys314B e, portanto, a presença da hidroxila poderia promover a ocorrência de uma ligação de hidrogênio S–H...O entre o ligante **5** e este resíduo do sítio (Fig. 53). Conforme já exposto, as interações com o tiol da Cys314B são importantes caso se deseje aumentar a seletividade dos compostos à tubulina do *P. falciparum*, já que nas tubulinas humana e bovina este resíduo é substituído por uma alanina (Fig. 20).

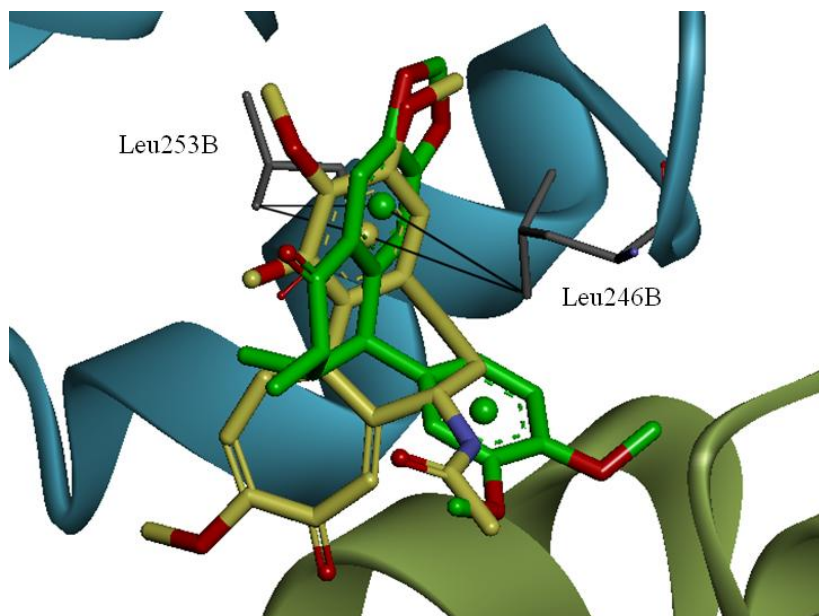


Figura 52 – Modo de ligação obtido para a lignana **5** (verde) no sítio da tubulina do *P. falciparum*, em comparação com o obtido para a colchicina (amarelo) no mesmo sítio. São destacadas as ligações C–H... π que ocorrem com resíduos da proteína. A estrutura secundária da cadeia α da tubulina é representada em dourado e da cadeia β em ciano.

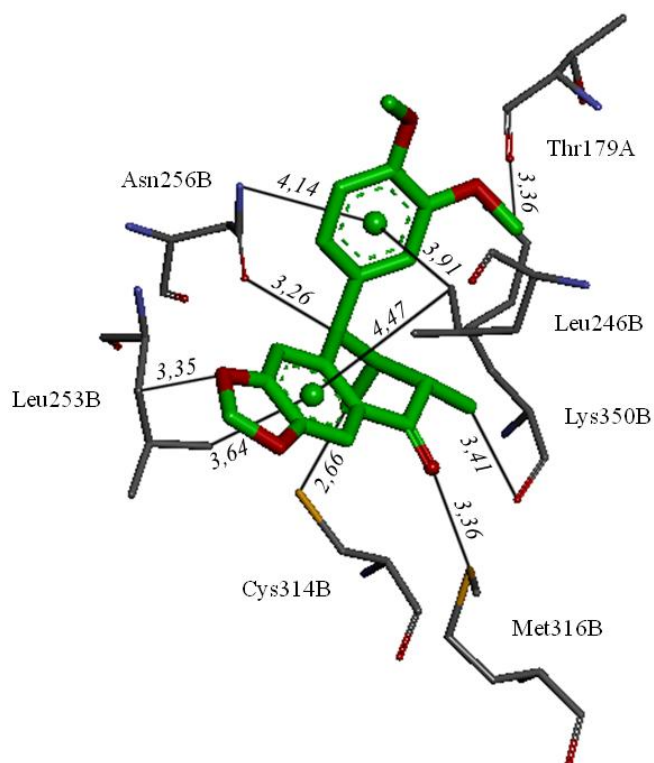


Figura 53 – Interações entre o composto **5** e os resíduos de aminoácido do sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*.

3. RESUMO E CONCLUSÕES

Devido à resistência do *Plasmodium falciparum* aos fármacos antimaláricos atualmente disponíveis, neste trabalho escolheu-se estudar uma série de lignanas ariltetralônicas isoladas da planta *Holostylis reniformis* Duch. (ANDRADE-NETO, 2007), já utilizada na medicina tradicional brasileira para tratar a malária, doença que causou mais de 500.000 mortes somente em 2013. São compostos que apresentam atividade antiplasmodial *in vitro* contra o *P. falciparum*, mas cujo mecanismo de ação não é compreendido.

O primeiro passo para propor um mecanismo de ação destas moléculas foi realizar uma ampla busca, em diferentes bancos de dados, por compostos químicos semelhantes, cujo alvo macromolecular era conhecido. Isto resultou na identificação da podofilotoxina, desoxipodofilotoxina, 5-metoxipodofilotoxina e 5-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[*f*][1,3]benzodioxole como análogos destes ligantes.

Sabe-se que a podofilotoxina é um inibidor da tubulina de diferentes organismos, conhecida por se ligar ao sítio de ligação da colchicina desta proteína. Além disso, os demais ligantes citados acima, todos estruturalmente semelhantes às lignanas estudadas, também inibem a tubulina. Assim, conclui-se que a tubulina do *P. falciparum* é um possível alvo biológico das lignanas ariltetralônicas, podendo estar envolvida com o mecanismo de ação destes compostos.

Como não existe estrutura tridimensional da tubulina do parasita causador da malária determinada experimentalmente, para se investigar o modo de ligação das ariltetralonas nesta proteína foi necessário realizar a sua modelagem molecular por homologia. Então, as sequências de aminoácidos das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum* foram obtidas de bancos de dados de sequência de proteínas e, a seguir, foi realizada uma busca por proteínas homólogas, cuja estrutura tridimensional era conhecida. Por possuir melhor qualidade estrutural e apresentar a colchicina complexada no sítio de ligação onde seriam realizados os cálculos de *docking* das lignanas, uma tubulina bovina foi selecionada como molde para a modelagem por homologia. Esta proteína apresenta mais de 84% de identidade com a tubulina do *Plasmodium*, acima do limite mínimo recomendado (30%) para a realização de modelagem por homologia, sendo assim um molde adequado para o experimento.

Foi realizado o alinhamento entre a sequência de aminoácidos da tubulina alvo, do *P. falciparum*, e a sequência da tubulina bovina molde, com estrutura conhecida; a partir deste alinhamento, foi gerado um modelo teórico da estrutura tridimensional das cadeias α e β da tubulina do *P. falciparum*. Este modelo foi construído considerando a presença da colchicina no

sítio de ligação, de modo que este sítio estaria, portanto, preparado para receber as lignanas nos experimentos de *docking* molecular.

O modelo final foi submetido a quatro ferramentas diferentes de avaliação, ficando dentro dos limites recomendados em todas as avaliações. Portanto, a estrutura tridimensional teórica do dímero da tubulina do *P. falciparum*, obtida por modelagem molecular por homologia, foi validada com sucesso e, então, utilizada para simulações de *docking* molecular.

A análise do modelo construído mostrou que a estrutura secundária da tubulina do *Plasmodium* é conservada em relação à tubulina bovina, de modo que as hélices α e folhas β se sobrepõem ao se comparar estruturalmente as duas proteínas. Apenas algumas regiões de *loop*, localizadas na superfície da proteína, não ficaram sobrepostas na comparação molde-modelo. Também foi encontrado que as cadeias α e β da tubulina do parasita são estruturalmente semelhantes, formadas por duas folhas beta centrais (totalizando 10 fitas paralelas), rodeadas por cerca de 22 hélices alfa. Com relação ao sítio de ligação da colchicina, observou-se que ocorrem algumas substituições de aminoácidos que interagem com este ligante, tais como Ala250B (na forma bovina) por Ser248B (na forma plasmodial), Ala316B por Cys314B e Ile318B por Met316B.

Com a estrutura obtida e validada da tubulina do *P. falciparum*, foi realizado o *docking* molecular das lignanas ariltetralônicas no sítio de ligação da colchicina. Para se validar os parâmetros selecionados para as simulações, foi realizado o *redocking* e o *cross-docking* neste mesmo sítio da tubulina bovina de estrutura conhecida. Como foi possível recriar as orientações cristalográficas tanto da colchicina (*redocking*) quanto da podofilotoxina (*cross-docking*) nesta proteína, os parâmetros selecionados nas simulações foram utilizados para encontrar o modo de ligação de inibidores no sítio da colchicina da tubulina.

A partir dos resultados de *docking* obtidos para **colchicina** na tubulina do *P. falciparum*, encontrou-se que, embora ocorram algumas substituições de aminoácidos neste sítio, o modo de ligação da colchicina nesta proteína é o mesmo que o descrito para a tubulina bovina, no qual o anel aromático do ligante é mantido entre os resíduos Leu246B e Leu253B por meio de interações C–H... π , além de ocorrer uma ligação de hidrogênio N–H...O entre seu átomo de oxigênio e a Val181A. Para a **podofilotoxina**, por sua vez, foi obtido que seu anel aromático contendo o grupo trimetóxi orienta-se em uma posição semelhante ao descrito para a **podofilotoxina** co-cristalizada a uma tubulina bovina (**1sa1**), na qual ocorre uma interação C–H... π com a Leu246B. O restante da molécula, no entanto, ocupa uma posição diferente no sítio em comparação ao ligante cristalográfico. Esta diferença pode ser devida à substituição da

Ala250B na forma bovina pela Ser248B na tubulina plasmodial, o que faz com que o composto se desloque para promover uma ligação de hidrogênio com a hidroxila deste resíduo, além da substituição da Val318B pela Met316B de cadeia lateral mais volumosa, o que faz com que o ligante se desloque para evitar choques estéricos.

As lignanas ariltetralônicas apresentam três modos de ligação diferentes no sítio de ligação da colchicina da tubulina do *P. falciparum*, dependendo da configuração dos estereocentros no anel B e dos substituintes (metilenodióxi ou dimetóxi) nos anéis A e C. No primeiro modo de ligação obtido, as lignanas **1**, **2** e **3** orientam-se de forma que o anel C, contendo o grupo dimetóxi ou metilenodióxi, fica na mesma região do sítio obtida para o anel aromático contendo o grupo trimetóxi da **colchicina** e da **podofilotoxina**, realizando uma interação C–H... π com a Leu246B. Neste modo de ligação, a substituição do grupo dimetóxi pelo grupo metilenodióxi no anel C do ligante não interfere significativamente na atividade dos compostos, uma vez que a ligação de hidrogênio com a Ser248B por meio de um átomo de oxigênio do substituinte é mantida, independente do substituinte. Já a alteração na configuração dos estereocentros no anel B permite que o composto **3** realize uma ligação de hidrogênio exclusiva com a Asn101A, além de uma interação C–H...O adicional com a Asn256B, o que poderia explicar sua atividade um pouco melhor em relação a **1** e **2**.

A configuração diferente dos estereocentros no anel B de **4**, **5** e **6** foram responsáveis por estes ligantes assumirem modos de ligação distintos dos obtidos para **1**, **2** e **3**, como mostram os resultados de *docking*. Isto seria devido à proximidade dos substituintes metila do anel B com os resíduos Thr179A e Ala180A do sítio. No segundo modo de ligação, apresentado pelas lignanas **4** e **6**, o anel C dos ligantes orienta-se entre a Ala180A e a Leu246B, sendo mantido nesta posição por interações C–H... π . Além disso, ocorre uma interação S–H...O com a Cys314B, não observada para as outras lignanas neste sítio; interações com este resíduo são importantes para se promover a seletividade dos compostos à tubulina plasmodial, uma vez que na tubulina humana e bovina este resíduo é substituído por uma alanina. Considerando apenas este modo de ligação, pode-se concluir que a presença do grupo dimetóxi como substituinte no anel C é mais favorável do que um grupo metilenodióxi, pois permite a ocorrência de duas ligações de hidrogênio com Asn101A e Asn256B – isto está de acordo com os dados de atividade, que indicam **4** ser mais ativo do que **6**.

O terceiro modo de ligação obtido neste sítio é exclusivo para a lignana **5**. Embora esta apresente a mesma configuração dos estereocentros que **4** e **6**, não se orienta da mesma forma que estas lignanas no sítio. A partir dos resultados de *docking*, pode-se concluir que isto seja devido à proximidade do substituinte dimetóxi de **4** e **6** com a Cys314B – um grupo

metilenodióxi nesta posição, como em **5**, promoveria um choque estérico com o resíduo do sítio. Ainda, o composto **5** orienta-se com o anel aromático entre a Leu246B e Leu253B, realizando interações C–H... π com estes resíduos, semelhante ao que foi obtido para a **colchicina** neste sítio.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível descrever o provável mecanismo de ação das lignanas ariltetralônicas com atividade antimalária conhecida. Estes compostos atuam ligando-se no sítio de ligação da colchicina da proteína tubulina do *P. falciparum*. Além disso, baseado na análise do modo de ligação obtido para estes compostos no sítio receptor da proteína, foi possível sugerir modificações nos ligantes a fim de se aumentar a afinidade pela tubulina, como a inserção de mais um substituinte metóxi no anel C de **1**, **2** e **3**, além da inserção de uma hidroxila ligada ao carbono de um dos substituintes metila no anel B de **4**, **5** e **6**.

REFERÊNCIAS

- ALTMANN, K. H.; GERTSCH, J. Anticancer drugs from nature – natural products as a unique source of new microtubule-stabilizing agents. **Nat. Prod. Rep.**, v. 24, p. 327-357, 2007.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ALTSCHUL, S.F.; MADDEN, T.L.; SCHÄFFER, A.A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ALTSCHUL, S.F.; WOOTON, J.C.; GERTZ, E.M.; AGARWALA, R.; MORGULIS, A.; SCHÄFFER, A.A.; YU, Y.K. Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. **FEBS**, v. 272, p. 5101-5109, 2005.
- ALUSHIN, G.M.; RAMEY, V.H.; PASQUALATO, S.; BALL, D.A.; GRIGORIEFF, N.; MUSACCHIO, A.; NOGALES, E. The Ndc80 kinetochore complex forms oligomeric arrays along microtubules. **Nature**, v. 467, p. 805-810, 2010.
- AMZEL, L. M. Structure-based drug design. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 9, p. 366-369, 1998.
- ANDRADE-NETO, V. F.; SILVA, T.; LOPES, L. M. X.; ROSÁRIO, V. E.; VAROTTI, F. P.; KRETTLI, A. U. Antiplasmodial activity of aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 7, p. 2346-2350, 2007.
- BARBIER, P.; DORLÉANS, A.; DEVRED, F.; SANZ, L.; ALLEGRO, D.; ALFONSO, C.; KNOSSOW, M.; PEYROT, V.; ANDREU, J.M. Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 41, p. 31672-31681, 2010.
- BEJON, P. A; BANNISTER, L. H.; FOWLER, R. E.; FOOKES, R. E.; WEBB, S. E.; WRIGHT, A.; MITCHELL, G. H. A role for microtubules in *Plasmodium falciparum* merozoite invasion. **Parasitology**, v. 114, p. 1-6, 1997.
- BELL, A. Microtubule inhibitors as potential antimalarial agents. **Parasitology Today**, v. 14, n. 6, p. 234-240, 1998.
- BENTO, A.P.; GAULTON, A.; HERSEY, A.; BELLIS, L.J.; CHAMBERS, J.; DAVIES, M.; KRÜGER, F.A.; LIGHT, Y.; MAK, L.; McGLINCHEY, S.; NOWOTKA, M.; PAPADATOS, G.; SANTOS, R.; OVERINGTON, J.P. The ChEMBL bioactivity database: an update. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. D1083-D1090, 2014.
- BERMAN, H.M.; WESTBROOK, J.; FENG, Z.; GILLILAND, G.; BHAT, T.N.; WEISSIG, H.; SHINDYALOV, I.N.; BOURNE, P.E. The Protein Data Bank. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 1, p. 235-242, 2000.

BERNHARDT, V.G.; PINTO, J.R.T.; PAI, V.R. Insilico docking for validation of drugs leads on Superoxide dismutase of *Homo sapiens* and *Plasmodium falciparum*. **Biomed. Res.**, v. 21, n. 2, p. 214-220, 2010.

BHARATH, E. N.; MANJULA, S. N.; VIJAYCHAND, A. *In silico* drug design-tool for overcoming the innovation deficit in the drug discovery process. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, n. 2, p. 8-12, 2011.

BINDINGDB – BindingDB. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.bindingdb.org/bind/index.jsp>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool. [s.d.]. Disponível em: <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

BODEY, A.J.; KIKKAWA, M.; MOORES, C.A. 9-Ångström structure of a microtubule-bound mitotic motor. **J. Mol. Biol.**, v. 388, p. 218-224, 2009.

BOLTON, E.; WANG, Y.; THIESSEN, P.A.; BRYANT, S.H. PubChem: integrated platform of small molecules and biological activities. **Annu. Rep. Comput. Chem.**, v. 4, p. 217-240, 2008.

BOUSEMA, T.; OKELL, L.; FELGER, I.; DRAKELEY, C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 12, p. 833-840, 2014.

BOWIE, J.U.; LÜTHY, R.; EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a know three-dimensional structure. **Science**, v. 253, n. 5016, p. 164-179, 1991.

BREMAN, J. G. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants, and estimates of the malaria burden. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 64, n. 1-2, p. 1-11, 2001.

CAIN, R.; NARRAMORE, S.; McPHILLIE, M.; SIMMONS, K.; FISHWICK, C.W.G. Applications of structure-based design to antibacterial drug discovery. **Bioorg. Chem.**, v. 55, p. 69-76, 2014.

CARLSBAD – Confederated Annotated Research Libraries of Small molecule Biological Activity Data. [s.d.]. Disponível em: <<http://carlsbad.health.unm.edu/carlsbad/>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

CARPENTER, E. J.; HUZIL, J. T.; LUDUEÑA, R. F.; TUSZYNSKI, J. A. Homology modeling of tubulin: influence predictions for microtubule's biophysical properties. **Eur. Biophys. J.**, v. 43, p. 35-43, 2006.

CDD – Conserved Domain Database. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd/>>. Acesso em: 16 fev. 2015.

CHEBI – ChEBI. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/chebi/>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

CHEMAXON – MarvinSketch 14.12.15.0. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.chemaxon.com/>>. Acesso em: 14 fev. 2015.

CHEMBL – ChEMBL. [s.d.]. Disponível em: <<https://www.ebi.ac.uk/chembl/>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

CLUSTAL OMEGA – Clustal Omega. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

COCHRAN, J.C.; SINDELAR, C.V.; MULKO, N.K.; COLLINS, K.A.; KONG, S.E.; HAWLEY, R.S.; KULL, F.J. The ATPase cycle of the nonmotile kinesin NOD allows microtubule plus-end tracking and drives chromosome movement. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 110-122, 2009.

CONSTANTINO, M. G.; BELTRAME, M.; SILVA, G. V. J.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. A Novel Asymmetric Total Synthesis of (+)-Artemisinin. **Synthetic Comm.**, v. 26, p. 321-329, 1996.

CORRÊA, D. S. **Estudo da formação de complexos enzimas-inibidores *in silico* aplicado ao estudo das enzimas glutatona redutase humana e glutatona redutase do Plasmodium falciparum e dos inibidores das famílias das ariloxazinas.** 2007. 125f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, 2007.

CORRÊA, D. S. **Docking de compostos da família das ariloxazinas em enzimas relacionadas com a malária.** 2010. 155f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

CORMIER, A.; MARCHAND, M.; RAVELLI, R.B.G.; KNOSSOW, M.; GIGANT, B. Structural insight into the inhibition of tubulin by vinca domain peptide ligands. **EMBO Rep.**, v. 9, n. 11, p. 1101-1106, 2008.

CRAWLEY, J.; CHU, C.; MTOVE, G.; NOSTEN, F. Malaria in children. **Lancet**, v. 375, p. 1468-1481, 2010.

CUNHA, R.L.O.R.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; COMASSETO, J. V. Revisiting the addition reaction of TeCl₄ to alkynes: The crystal structure and docking studies of 1-chloro-2-trichlorotelluro-3-phenyl-propen-2-ol. **J. Organomet. Chem.**, v. 691, p. 4807-4815, 2006.

DALEY, L.; GUMINSKI, Y.; DEMERSEMAN, P.; KRUCZYNSKI, A.; ETIÉVANT, C.; IMBERT, T.; HILL, B.T.; MONNERET, C. Synthesis and antitumor activity of new glycosides of epipodophyllotoxin, analogues of etoposide, and NK 611. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 4475-4485, 1998.

DAVIS, A.M.; TEAGUE, S.J.; KLEYWEGT, G.J. Application and limitations of X-ray crystallographic data in structure-based ligand and drug design. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 42, p. 2718-2736, 2003.

DEEPCVIEW USER GUIDE – DeepView – The Swiss-PdbViewer User Guide. 2001. [s.d.]. Disponível em: <<http://spdbv.vital-it.ch/Swiss-PdbViewerManualv3.7.pdf>>. Acesso em: 18 fev. 2015.

DEGTYARENKO, K.; MATOS, P.; ENNIS, M.; HASTINGS, J.; ZBINDEN, M.; McNAUGHT, A.; ALCÁNTARA, R.; DARSOW, M.; GUEDJ, M.; ASHBURNER, M. ChEBI: a database and ontology for chemical entities of biological interest. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. D344-D350, 2007.

DESAI, A.; MITCHISON, T. J. Microtubule polymerization dynamics. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 13, p. 83-117, 1997.

DIMITROPOULOS, D.; IONIDES, J.; HENRICK, K. UNIT 14.3 Using MSDchem to search the PDB ligand dictionary. **Curr. Protoc. Bioinf.**, p. 14.3.1-14.3.3, 2006.

DONDORP, A. M.; NOSTEN, F.; YI, P.; DAS, D.; PHYO, A. P.; TARNING, J.; LWIN, K. M.; ARIEY, F.; HANPITHAKPONG, W.; LEE, S. J.; RINGWALD, P.; SILAMUT, K.; IMWONG, M.; CHOTIVANICH, K.; LIM, P.; HERDMAN, T.; AN, S. S.; YEUNG, S.; SINGHASIVANON, P.; DAY, N. P. J.; LINDEGARDH, N.; SOCHEAT, D.; WHITE, N. J. Artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, n. 5, p. 455-467, 2009.

DORLÉANS, A.; GIGANT, B.; RAVELLI, R.B.G.; MAILLIET, P.; MIKOL, V.; KNOSSOW, M. Variations in the colchicines-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, n. 33, p. 13775-13779, 2009.

DOW, G. S.; ARMSON, A.; BODDY, M. R.; ITENGE, T.; McCARTHY, D.; PARKIN, J. E.; THOMPSON, R. C. A.; REYNOLDS, J. A. *Plasmodium*: assessment of the antimalarial potential of trifluralin and related compounds using a rat model of malaria, *Rattus norvegicus*. **Exp. Parasitol.**, v. 100, p. 155-160, 2002.

DOWNING, K. H. Structural basis for the interaction of tubulin with proteins and drugs that affect microtubule dynamics. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 16, p. 89-111, 2000.

DRAKELEY, C.; SUTHERLAND, C.; BOUSEMA, J.T.; SAUERWEIN, R.W.; TARGETT, G.A.T. The epidemiology of *Plasmodium falciparum* gametocytes: weapons of mass dispersion. **TRENDS Parasitol.**, v. 22, n. 9, p. 424-430, 2006.

DRUGBANK – DrugBank. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.drugbank.ca/>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

DS VISUALIZER – Discovery Studio Visualizer 2.0, *Accelrys Inc., San Diego*, 2007. Disponível em: <<http://accelrys.com>>. Acesso em: 14 fev. 2015.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nat. Rev. Drug Discovery**, v. 9, p. 790-803, 2010.

ERAMIAN, D.; ESWAR, N.; SHEN, M-Y; SALI, A. How well can the accuracy of comparative protein structure models be predicted? **Protein Sci.**, v. 17, p. 1881-1893, 2008.

ERÍĆ, S.; KE, S.; BARATA, T.; SOLMAJER, T.; STANKOVIĆ, J.A.; JURANIĆ, Z.; SAVIĆ, V.; ZLOH, M. Target fishing and docking studies of the novel derivatives of aryl-

aminopyridines with potential anticancer activity. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, p. 5220-5228, 2012.

EWING, T. J. A.; KUNTZ, I. D. Critical evaluation of search algorithms for automated molecular docking and database screening. **J. Comput. Chem.**, v. 18, p. 1175-1189, 1997.

EWING, T. J. A.; MAKINO, S.; SKILLMAN, A. G.; KUNTZ, I. D. DOCK 4.0: search strategies for automated molecular docking of flexible molecule databases. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 15, p. 411-428, 2001.

FARBER, G. K. New approaches to rational drug design. **Pharmacol. Ther.**, v. 84, p. 327-332, 1999.

FASTA – FASTA. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/Tools/sss/fasta/>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

FENNELL, B. J.; CAROLAN, S.; PETTIT, G. R.; BELL, A. Effects of the antimetabolic natural product dolastatin 10, and related peptides, on the human malarial parasite *Plasmodium falciparum*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 51, p. 833-841, 2003.

FENNELL, B. J.; NAUGHTON, J. A.; DEMPSEY, E.; BELL, A. Cellular and molecular actions of dinitroaniline and phosphorothioamidate herbicides on *Plasmodium falciparum*: tubulin as a specific antimalarial target. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 145, p. 226-238, 2006.

FENNELL, B. J.; AL-SHATR, Z. A.; BELL, A. Isotype expression, post-translational modification and stage-dependent production of tubulins in erythrocytic *Plasmodium falciparum*. **Int. J. Parasitol.**, v. 38, p. 527-539, 2008.

FIDOCK, D. A. Priming the antimalarial pipeline. **Nature**, v. 465, n. 20, p. 297-298, 2010.

FISER, A.; ŠALI, A. Modeller: generation and refinement of homology-based protein structure models. **Methods Enzymol.**, v. 374, p. 461-491, 2003.

FOURNIOL, F.J.; SINDELAR, C.V.; AMIGUES, B.; CLARE, D.K.; THOMAS, G.; PERDERISET, M.; FRANCIS, F.; HOUDUSSE, A.; MOORES, C.A. Template-free 13-prot filament microtubule-MAP assembly visualized at 8 Å resolution. **J. Cell Biol.**, v. 19, n. 3, p. 463-470, 2010.

FOWLER, R. E.; FOOKES, R. E.; LAVIN, F.; BANNISTER, L. H.; MITCHELL, G. H. Microtubules in *Plasmodium falciparum* merozoites and their importance for invasion of erythrocytes. **Parasitology**, v. 117, p. 425-433, 1998.

FOWLER, R. E.; SMITH, A. M. C.; WHITEHORN, J.; WILLIAMS, I. T.; BANNISTER, L. H.; MITCHELL, G. H. Microtubule associated motor proteins of *Plasmodium falciparum* merozoites. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 117, p. 187-200, 2001.

GAMO, F. J.; SANZ, L. M.; VIDAL, J.; COZAR, C.; ALVAREZ, E.; LAVANDERA, J. L.; VANDERWALL, D. E.; GREEN, D. V. S.; KUMAR, V.; HASAN, S.; BROWN, J. R.; PEISHOFF, C. E.; CARDON, L. R.; GARCIA-BUSTOS, J. F. Thousands of chemical starting points for antimalarial lead identification. **Nature**, v. 465, n. 20, p. 305-312, 2010.

GARDNER, M.J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R.W.; CARLTON, J.M.; PAIN, A.; NELSON, K.E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I.T.; JAMES, K.; EISEN, J.A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M.S.; NENE, V.; SHALLOM, S.J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M.W.; VAIDYA, A.B.; MARTIN, D.M.A.; FAIRLAMB, A.H.; FRAUNHOLZ, M.J.; ROOS, D.S.; RALPH, S.A.; McFADDEN, G.I.; CUMMINGS, L.M.; SUBRAMANIAN, G.M.; MUNGALL, C.; VENTER, J.C.; CARUCCI, D.J.; HOFFMAN, S.L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R.W.; FRASER, C.M.; BARREL, B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, p. 498-511, 2002.

GENOMENET – GenomeNet. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.genome.jp/>>. Acesso em: 08 fev. 2015.

GIGANT, B.; CURMI, P.A.; MARTIN-BARBÉY, C.; CHARBAUT, E.; LACHKAR, S.; LEBEAU, L.; SIAVOSHIAN, S.; SOBEL, A.; KNOSSOW, M. The 4 Å X-Ray structure of a Tubulin:Stathmin-like domain complex. **Cell**, v. 102, p. 809-816, 2000.

GIGANT, B.; WANG, C.; RAVELLI, R.B.G.; ROUSSI, F.; STEINMETZ, M.O.; CURMI, P.A.; SOBEL, A.; KNOSSOW, M. Structural basis for the regulation of tubulin by vinblastine. **Nature**, v. 435, p. 519-522, 2005.

GINALSKI, K. Comparative modeling for protein structure prediction. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 16, n. 2, p. 172-177, 2006.

GOLD USER GUIDE – GOLD User Guide – *A component of the GOLD Suite – 5.3 Release*. 2014. Disponível em: <<http://www.ccdc.cam.ac.uk/Lists/DocumentationList/gold53.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2015.

GOLDBRUNNER, M.; LOIDL, G.; POLOSSEK, T.; MANNSCHRECK, A.; ANGERER, E. Inhibition of tubulin polymerization by 5,6-Dihydroindolo[2,1-*a*]isoquinoline derivatives **J. Med. Chem.**, v. 40, p. 3524-3533, 1997.

GREENWOOD, B.; MUTABINGWA, T. Malaria in 2002. **Nature**, v. 415, p. 670-672, 2002.

GREENWOOD, B.M.; BOJANG, K.; WHITTY, C.J.M.; TARGETT, G.A.T.T. Malaria. **Lancet**, v. 365, p. 1487-1498, 2005.

GRINTER, S.Z.; ZOU, X. Challenges, application, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. **Molecules**, v. 19, p. 10150-10176, 2014.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2714-2723, 1997.

GUIGUEMDE, W. A.; SHELAT, A. A.; BOUCK, D.; DUFFY, S.; CROWTHER, G. J.; DAVIS, P. H.; SMITHSON, D. C.; CONNELLY, M.; CLARK, J.; ZHU, F.; JIMÉNEZ-DÍAZ, M. B.; MARTINEZ, M. S.; WILSON, E. B.; TRIPATHI, A. K.; GUT, J.; SHARLOW, E. R.; BATHURST, I.; MAZOUNI, F.; FOWBLE, J. W.; FORQUER, I.; MCGINLEY, P. L.; CASTRO, S.; ANGULO-BARTUREN, I.; FERRER, S.; ROSENTHAL, P. J.; DERISI, J. L.;

SULLIVAN Jr, D. J.; LAZO, J. S.; ROOS, D. S.; RISCOE, M. K.; PHILLIPS, M. A.; RATHOD, P. K.; VOORHIS, W. C. V.; AVERY, V. M.; GUY, R. K. Chemical genetics of *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 465, n. 20, p. 311-315, 2010.

GÜNTHER, J.; BERGNER, A.; HENDLICH, M.; KLEBE, G. Utilising structural knowledge in drug design strategies: applications using relibase. **J. Mol. Biol.**, v. 326, p. 621-636, 2003.

HALL, N.; PAIN, A.; BERRIMAN, M.; CHURCHER, C.; HARRIS, B.; HARRIS, D.; MUNGALL, K.; BOWMAN, S.; ATKIN, R.; BAKER, S.; BARRON, A.; BROOKS, K.; BUCKEE, C.O.; BURROWS, C.; CHEREVACH, I.; CHILLINGWORTH, C.; CHILLINGWORTH, T.; CHRISTODOULOU, Z.; CLARK, L.; CLARK, R.; CORTON, C.; CRONIN, A.; DAVIES, R.; DAVIS, P.; DEAR, P.; DEARDEN, F.; DOGGETT, J.; FELTWELL, T.; GOBLE, A.; GOODHEAD, I.; GWILLIAM, R.; HAMLIN, N.; HANCE, Z.; HARPER, D.; HAUSER, H.; HORNSBY, T.; HOLROYD, S.; HORROCKS, P.; HUMPHRAY, S.; JAGELS, K.; JAMES, K.D.; JOHNSON, D.; KERHORNOU, A.; KNIGHTS, A.; KONFORTOV, B.; KYES, S.; LARKE, N.; LAWSON, D.; LENNARD, N.; LINE, A.; MADDISON, M.; McLEAN, J.; MOONEY, P.; MOULE, S.; MURPHY, L.; OLIVER, K.; ORMOND, D.; PRICE, C.; QUAIL, M.A.; RABBINOWITSCH, E.; RAJANDREAM, M.A.; RUTTER, S.; RUTHERFORD, K.M.; SANDERS, M.; SIMMONDS, M.; SEEGER, K.; SHARP, S.; SMITH, R.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; STEVENS, K.; TAYLOR, K.; TIVEY, A.; UNWIN, L.; WHITEHEAD, S.; WOODWARD, J.; SULSTON, J.E.; CRAIG, A.; NEWBOLD, C.; BARREL, B.G. Sequence of *Plasmodium falciparum* chromosomes 1, 3-9 and 13. **Nature**, v. 419, p. 527-531, 2002.

HALLUR, G.; JIMENO, A.; DALRYMPLE, S.; ZHU, T.; JUNG, M.K.; HIDALGO, M.; ISAACS, J.T.; SUKUMAR, S.; HAMEL, E.; KHAN, S.R. Benzoylphenylurea sulfur analogues with potent antitumor activity. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 2357-2360, 2006.

HAMEL, E. Antimitotic natural products and their interactions with tubulin. **Med. Res. Rev.**, v. 16, n. 2, p. 207-231, 1996.

HATTORI, M.; TANAKA, N.; KANEHISA, M.; GOTO, S. SIMCOMP/SUBCOMP: chemical structure search servers for network analyses. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. W652-W656, 2010.

HENIKOFF, S.; HENIKOFF, J.G. Amino acid substitution matrices from protein blocks. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 10915-10919, 1992.

HILLISCH, A.; PINEDA, L. F.; HILGENFELD, R. Utility of homology models in the drug discovery process. **Drug discovery today**, v. 9, n. 15, p. 659-669, 2004.

HOOR, M.J.; HUANG, L.J.; KUO, S.C.; XIA, Y.; BASTOW, K.; NAKANISHI, Y.; HAMEL, E.; LEE, K.H. 6-Alkylamino- and 2,3-Dihydro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinazolinones and related compounds: their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization. **J. Med. Chem.**, v. 43, p. 4479-4487, 2000.

HUBER, S.K.; WERBOVETZ, K.A.; OBAZA-NUTAITIS, J.; LEHNERT, E.K.; MACDONALD, T.L. Tubulin binding of conformationally restricted bis-aryl compounds. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 1, n. 5, p. 243-246, 1991.

HUNG, C.L.; CHEN, C.C. Computational approaches for drug discovery. **Drug Dev. Res.**, v. 75, p. 412-418, 2014.

HUTCHINSON, E.G.; THORNTON, J.M. PROMOTIF – A program to identify and analyze structural motifs in proteins. **Protein Sci.**, v. 5, p. 212-220, 1996.

IMBERT, T. F. Discovery of podophyllotoxins. **Biochimie**, v. 80, p. 207-222, 1998.

IHLENFELDT, W.D.; BOLTON, E.E.; BRYANT, S.H. The PubChem chemical structure sketcher. **J. Cheminformatics**, v. 1, n. 20, p. 1-9, 2009.

IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. ZINC – A free database of commercially available compounds for virtual screening. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 45, n. 1, p. 177-182, 2005.

IRWIN, J.J.; STERLING, T.; MYSINGER, M.M.; BOLSTAD, E.S.; COLEMAN, R.G. ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 52, p. 1757-1768, 2012.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C. Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **J. Mol. Biol.**, v. 245, p. 43-53, 1995.

JONES, G.; WILLETT, P.; GLEN, R. C.; LEACH, A. R.; TAYLOR, R. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **J. Mol. Biol.**, v. 267, p. 727-748, 1997.

JORGENSEN, W. L. Pulled from a protein's embrace. **Nature**, v. 466, p. 42-43, 2010.

JOSEPH-McCARTHY, D. Computational approaches to structure-based ligand design. **Pharmacol. Ther.**, v. 84, p. 179-191, 1999.

KANG, L.; LI, H.; JIANG, H.; WANG, X. An improved adaptive genetic algorithm for protein-ligand docking. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 23, p. 1-12, 2009.

KARSENTI, E.; VERNOS, I. The mitotic spindle: a self-made machine. **Science**, v. 294, p. 543-547, 2001.

KIKKAWA, M.; SABLIN, E.P.; OKADA, Y.; YAJIMA, H. FLETTERICK, R.J.; HIROKAWA, N. Switch-based mechanism of kinesin motors. **Nature**, v. 411, p. 439-445, 2001.

KIKKAWA, M.; HIROKAWA, N. High-resolution cryo-EM maps show the nucleotide binding pocket of KIF1A in open and closed conformations. **EMBO J.**, v. 25, p. 4187-4194, 2006.

KOENDERINK, J. B.; KAVISHE, R. A.; RIJPMAN, S. R.; RUSSEL, F. G. M. The ABCs of multidrug resistance in malaria. **Trends in Parasitol.**, v. 26, n. 9, p. 440-446, 2010.

KOKWARO, G. Ongoing challenges in the management of malaria. **Malar. J.**, v. 8 Suppl 1, p. S2, 2009.

KONTOYIANNI, M.; McCLELLAN, L. M.; SOKOL, G. S. Evaluation of docking performance: comparative data on docking algorithms. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 558-565, 2004.

KOWALSKI, R. J.; GIANNAKAKOU, P.; HAMEL, E. Activities of the microtubule-stabilizing agents Epothilones A and B with purified tubulin and in cells resistant to Paclitaxel (Taxol[®]). **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 4, p. 2534-2541, 1997.

KOZIELEWICZ, P.; PARADOWSKA, K.; ERIĆ, S.; WAWER, I.; ZLOH, M. Insights into mechanism of anticancer activity of pentacyclic oxindole alkaloids of *Uncaria tomentosa* by means of a computational reverse virtual screening and molecular docking approach. **Monatsh Chem.**, v. 145, p. 1201-1211, 2014.

KUNTZ, I. D.; BLANEY J. M.; OATLAY S. J.; LANDRIDGE R.; FERRIN T. E. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 161, p. 269, 1982.

KUO, S.C.; LEE, H.Z.; JUANG, J.P.; LIN, Y.T.; WU, T.S.; CHANG, J.J.; LEDNICER, D.; PAULL, K.D.; LIN, C.M.; HAMEL, E.; LEE, K.H. Synthesis and cytotoxicity of 1,6,7,8-Substituted 2-(4'-Substituted phenyl)-4-quinolones and related compounds: identification as antimitotic agents interacting with tubulin. **J. Med. Chem.**, v. 36, p. 1146-1156, 1993.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin, in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazoles. **Int. J. Parasitol.**, v. 18, n. 7, p. 885-936, 1988.

LASKOWSKI, R.A.; MACARTHUR, M.W.; MOSS, D.S.; THORNTON, J.M. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.**, v. 26, p. 283-291, 1993.

LASKOWSKI, R.A.; HUTCHINSON, E.G.; MICHIE, A.D.; WALLACE, A.C.; JONES, M.L.; THORNTON, J.M. PDBsum: a Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 488-490, 1997.

LAW, V.; KNOW, C.; DJOUMBOU, Y.; JEWISON, T.; GUO, A.C.; LIU, Y.; MACIEJEWSKI, A.; ARNDT, D.; WILSON, M.; NEVEU, V.; TANG, A. GABRIEL, G.; LY, C.; ADAMJEE, S.; DAME, Z.T.; HAN, B.; ZHOU, Y.; WISHART, D.S. DrugBank 4.0: shedding new light on drug metabolism. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, p. D1091-D1097, 2014.

LI, L.; WANG, H.K.; KUO, S.C.; WU, T.S.; MAUGER, A.; LIN, C.M.; HAMEL, E.; LEE, K.H. Antitumor agents. 155. Synthesis and biological evaluation of 3',6,7-Substituted 2-Phenyl-4-quinolones as antimicrotubule agents. **J. Med. Chem.**, v. 37, p. 3400-3407, 1994.

LI, P.K.; XIAO, Z.; HU, Z.; PANDIT, B.; SUN, Y.; SACKETT, D.L.; WERBOVETZ, K.; LEWIS, A.; JOHNSAMUEL, J. Conformationally restricted analogs of Combretastatin A-4 derived from SU5416. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 15, p. 5382-5385, 2005.

LI, Q.; CHENG, T.; WANG, Y.; BRYANT, S.H. PubChem as a public resource for drug discovery. **Drug Discovery Today.**, v. 15, n. 23/24, p. 1052-1057, 2010.

LIEBESCHUETZ, J.W.; COLE, J.C.; KORB, O. Pose prediction and virtual screening performance of GOLD scoring functions in a standardized test. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 26, p. 737-748, 2012.

LITTLE, M.; SEEHAUS, T. Comparative analysis of tubulin sequences. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 90B, n. 4, p. 655-670, 1988.

- LIU, T.; LIN, Y.; WEN, X.; JORISSEN, R.N.; GILSON, M.K. BindingDB: a web-accessible database of experimentally determined protein-ligand binding affinities. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. D198-D201, 2007.
- LIU, Y.; WEI, D.; ZHAO, Y.; CHENG, W.; LU, Y.; MA, Y.; LI, X.; HAN, C.; WEI, Y.; CAO, H.; ZHAO, C. Synthesis and biological evaluation of a series of podophyllotoxins derivatives as a class of potent antitubulin agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, p. 6285-6295, 2012.
- LÖWE, J.; LI, H.; DOWNING, K.H.; NOGALES, E. Refined structure of $\alpha\beta$ -tubulin at 3.5 Å resolution. **J. Mol. Biol.**, v. 313, p. 1045-1057, 2001.
- LÜTHY, R.; BOWIE, J.U.; EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83-85, 1992.
- LYNE, P. D. Structure-based virtual screening: an overview. **Drug discovery today**, v. 7, n. 20, p. 1047-1055, 2002.
- MAESSEN, S.; WESSELING, J G; SMITS, M. A; KONINGS, R. N.; SCHOENMAKERS, J. G. The γ -tubulin gene of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, p. 27-36, 1993.
- MAHANTA, S.; PILLA, S.; PAUL, S. Design of novel Geldanamycin analogue hsp90 alpha-inhibitor in silico for breast cancer therapy. **Med. Hypotheses**, v. 81, p. 463-469, 2013.
- MAHBOOBI, S.; SELLMER, A.; HÖCHER, H.; EICHHORN, E.; BÄR, T.; SCHMIDT, M.; MAIER, T.; STADLWIESER, J.F.; BECKERS, T.L. [4-(Imidazol-1-yl)thiazol-2-yl]phenylamines. A novel class of highly potent colchicines site binding tubulin inhibitors: synthesis and cytotoxic activity on selected human cancer cell lines. **J. Med Chem.**, v. 49, p. 5769-5776, 2006.
- MAITLAND, K.; BEJON, P.; NEWTON, C.R.J.C. Malaria. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 16, p. 389-395, 2003.
- MANDAL, S.; MOUDGIL, M.; MANDAL, S. K. Rational drug design. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 625, p. 90-100, 2009.
- MANDELKOW, E.; MANDELKOW, E. M. Microtubules and microtubule-associated proteins. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 7, p. 72-81, 1995.
- MARCHLER-BAUER, A.; DERBYSHIRE, M.K.; GONZALES, N.R.; SHENNAN, L.; CHITSAZ, F.; GEER, L.Y.; GEER, R.C.; HE, J.; GWADZ, M.; HURWITZ, D.I.; LANCZYCKI, C.J.; LU, F.; MARCHLER, G.H.; SONG, J.S.; THANKI, N.; WANG, Z.; YAMASHITA, R.A.; ZHANG, D.; ZHENG, C.; BRYANT, S. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Res.**, v. 43, p. D222-D226, 2015.
- MARKS, M.; GUPTA-WRIGHT, A.; DOHERTY, J.F.; SINGER, M.; WALKER, D. Managing malaria in the intensive care unit. **Br. J. Anaesthesia**, v. 113, n. 6, p. 910-921, 2014.

MARTÍ-RENOM, M. A.; STUART, A. C.; FISER, A.; SÁNCHEZ, R.; MELO, F.; ŠALI, A. Comparative protein structure modeling of genes and genomes. **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, v. 29, p. 291-325, 2000.

MATHIAS, S.L.; HINES-KAY, J.; YANG, J.J.; ZAHORANSKY-KOHALMI, G.; BOLOGA, C.G.; URSU, O.; OPREA, T.I. The CARLSBAD Database: a confederated database of chemical bioactivities. **Database**, v. 2013, p. 1-8, 2013.

MAURER, S.P.; FOURNIOL, F.J.; BOHNER, G.; MOORES, C.A.; SURREY, T. EBs recognize a nucleotide-dependent structural cap at growing microtubule ends. **Cell**, v. 149, p. 371-382, 2012.

MAYO, S.L.; OLAFSON, B.D.; GODDARD, W.A. DREIDING: a generic force field for molecular simulations. **J. Phys. Chem.**, v. 94, p. 8897-8909, 1990.

MELO, F.; SALI, A. Fold assessment for comparative protein structure modeling. **Protein Sci.**, v. 16, p. 2412-2426, 2007.

MESSIANO, G. B.; SILVA, T.; NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X. Biosynthesis of antimalarial lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 590-596, 2009.

MIGNOT, I.; PECQUEUER, L.; DORLÉANS, A.; KARUPPASAMY, M.; RAVELLI, R.B.G.; DREIER, B.; PLÜCKTHUN, A.; KNOSSOW, M.; GIGANT, B. Design and characterization of modular scaffolds for tubulin assembly. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 37; p. 31085-31094, 2012.

MILLER, L.H.; BARUCH, D.I.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**, v. 415, p. 673-679, 2002.

MITRA, A.; SEPT, D. Binding and interaction of dinitroanilines with apicomplexan and kinetoplastid α -tubulin. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 5226-5231, 2006.

MODELLER DOCUMENTATION – Modeller – Program for Comparative Protein Structure Modelling by Satisfaction of Spatial Restraints – Documentation. [s.d.]. Disponível em: <<https://salilab.org/modeller/documentation.html>>. Acesso em: 19 fev. 2015.

MODEVAL – ModEval Model Evaluation Server. [s.d.]. Disponível em: <<http://modbase.compbio.ucsf.edu/evaluation/>>. Acesso em: 19 fev. 2015.

MORGAN, R.E; AHN, S.; NZIMIRO, S.; FOTIE, J.; PHELPS, M.A.; COTRILL, J.; YAKOVICH, A.J.; SACKETT, D.L.; DALTON, J.T.; WERBOVETZ, K.A. Inhibitors of tubulin assembly identified through screening a compound library. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 72, p. 513-524, 2008.

MORRIS, A.L.; MACARTHUR, M.W.; HUTCHINSON, E.G.; THORNTON, J.M. Stereochemical quality of protein structure coordinates. **Proteins**, v. 12, p. 345-364, 1992.

MOUSTAKAS, D. T.; LANG, P. T.; PEGG, S.; PETTERSEN, E.; KUNTZ, I. D.; BROOIJMANS, N.; RIZZO, R. C. Development and validation of a modular, extensible docking program: DOCK 5. **J. Comput. Aided Mol. Des.**, v. 20, p. 601-619, 2006.

NAUGHTON, J. A.; HUGHES, R.; BRAY, P.; BELL, A. Accumulation of the antimalarial microtubule inhibitors trifluralin and vinblastine by *Plasmodium falciparum*. **Biochem. Pharmacol.**, v. 75, p. 1580-1587, 2008.

NAWROTEK, A.; KNOSSOW, M.; GIGANT, B. The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-tubulin. **J. Mol. Biol.**, v. 412, p. 35-42, 2011.

NCBI – National Center for Biotechnology Information. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

NETTLES, J.H.; LI, H.; CORNETT, B.; KRAHN, J.M.; SNYDER, J.P.; DOWNING, K.H. The binding mode of epothilone A on α,β -tubulin by electron crystallography. **Science**, v. 305, p. 866-869, 2004.

NICKEL, H.C.; SCHMIDT, P.; BÖHM, K.J.; BAASNER, S.; MÜLLER, K.; GERLACH, M.; UNGER, E.; GÜNTHER, E.G.; PRINZ, H. Synthesis, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization by 1,5- and 1,8-disubstituted 10*H*-anthracen-9-ones bearing a 10-benzylidene or 10-(2-oxo-2-phenylethylidene) moiety. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 3420-3438, 2010.

NISSINK, J. W. M.; MURRAY, C.; HARTSHORN, M.; VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; TAYLOR, R. A new test set for validating predictions of protein-ligand interaction. **Proteins: Struct., Funct., Genet.**, v. 49, p. 457-471, 2002.

NOËL, C.; GERBOD, D.; FAST, N. M.; WINTJENS, R.; DELGADO-VISCOGLIOSI, P.; DOOLITTLE, W. F.; VISCOGLIOSI, E. Tubulins in *Trichomonas vaginalis*: molecular characterization of α -tubulin genes, posttranslational modifications, and homology modeling of the tubulin dimer. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 48, n. 6, p. 647-654, 2001.

NOGALES, E.; WOLF, S.G.; DOWNING, K.H. Structure of the $\alpha\beta$ tubulin dimer by electron crystallography. **Nature**, v. 391, p. 199-203, 1998.

NOGALES, E.; WHITTAKER, M.; MILLIGAN, R. A.; DOWNING, K. H. High-resolution model of the microtubule. **Cell**, v. 96, p. 79-88, 1999.

NOGALES, E. Structural insights into microtubule function. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 277-302, 2000.

OLLIARO, P. Mode of action and mechanisms of resistance for antimalarial drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 89, p. 207-219, 2001.

OLLIARO, P. L.; TAYLOR, W. R. J. Antimalarial compounds: from bench to bedside. **J. Exp. Biol.**, v. 206, p. 3753-3759, 2008.

PAUL, N.; KELLENBERGER, E.; BRET, G.; MÜLLER, P.; ROGNAN, D. Recovering the true targets of specific ligands by virtual screening of the Protein Data Bank. **PROTEINS: Struct. Funct. Bioinf.**, v. 54, p. 671-680, 2004.

PAULINO, M. ; VEGA-TEJIDO, M. A. ; SEOANE, G. ; CERECETTO, H. ; CARACELLI, I. ; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. ; OLEA, C. ; STOPPANI, A. O. M. ; FAIRLAMB, A. H. ;

TAPIA, O. Computer assisted design of potentially active anti-trypanosomal compounds. **J. Mol. Struct. Theochem**, v. 584, p. 95-105, 2002.

PDB – Protein Data Bank. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

PDBECHEM – PDBeChem. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/pdbechem/#>>. Acesso em: 08 fev. 2015.

PDBSUM – PDBsum. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/pdbsum/>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

PEARSON, W.R.; LIPMAN, D.J. Improved tools for biological sequence comparison. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 85, p. 2444-2448, 1988.

PECQUEUR, L.; DUELLBERG, C.; DREIER, B.; JIANG, Q.; WANG, C.; PLÜCKTHUN, A.; SURREY, T.; GIGANT, B.; KNOSSOW, M. A designed ankyrin repeat protein selected to bind to tubulin caps the microtubule plus end. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 109, n. 30, p. 12011-12016, 2012.

PEDRETTI, A.; VILLA, L.; VISTOLI, G. VEGA: a versatile program to convert, handle and visualize molecular structure on Windows-based PCs. **J. Mol. Graphics Modell.**, v. 21, p. 47-49, 2002.

POUVELLE, B.; FARLEY, P. J.; LONG, C. A.; TARASCHI, T. F. Taxol arrests the development of blood-stage *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium chabaudi adami* in malaria-infected mice. **J. Clin. Invest.**, v. 94, p. 413-417, 1994.

PRADO, G.R.L.; GARCÍA, C.H.; CEA, L.M.; ESPINILLA, V.F.; MORENO, M.F.M.; MÁRQUEZ, A.D.; POLO, M.J.P.P; GARCÍA, I.A. Malaria in developing countries. **J. Infect. Dev. Ctries**, v. 8, n. 1, p. 001-004, 2014.

PRINZ, H.; ISHII, Y.; HIRANO, T.; STOIBER, T.; GOMEZ, J.A.C.; SCHMIDT, P.; DÜSSMANN, H.; BURGER, A.M.; PREHN, J.H.M.; GÜNTHER, E.G.; UNGER, E.; UMEZAWA, K. Novel Benzylidene-9(10H)-anthracenones as highly active antimicrotubule agents. Synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization. **J. Med. Chem.**, v. 46, p. 3382-3394, 2003.

PRINZ, H.; SCHMIDT, P.; BÖHM, K.J.; BAASNER, S.; MÜLLER, K.; GERLACH, M.; GÜNTHER, E.G.; UNGER, E. Phenylimino-10H-anthracen-9-ones as novel antimicrotubule agents – synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 19, p. 4183-4191, 2011.

PROSA – ProSA-web – Protein Structure Analysis. [s.d.]. Disponível em: <<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>>. Acesso em: 22 fev. 2015.

PROTA, A.E.; BARGSTEN, K.; ZURWERRA, D.; FIELD, J.J.; DÍAZ, J.F.; ALTMANN, K.H.; STEINMETZ, M.O. Molecular mechanism of action of microtubule-stabilizing anticancer agents. **Science**, v. 339, p. 587-590, 2013a.

PROTA, A.E.; MAGIERA, M.M.; KUIJPERS, M.; BARGSTEN, K.; FREY, D.; WIESER, M.; JAUSSI, R.; HOOGENRAAD, C.C.; KAMMERER, R.A.; JANKE, C.; STEINMETZ, M.O. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. **J. Cell Biol.**, v. 200, n. 3, p. 259-270, 2013b.

PROTA, A.E.; DANIEL, F.; BACHMANN, F.; BARGSTEN, K.; BUEY, R.M.; POHLMANN, J.; REINELT, S.; LANE, H.; STEINMETZ, M.O. The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. **J. Mol. Biol.**, v. 426, p. 1848-1860, 2014a.

PROTA, A.E.; BARGSTEN, K.; NORTHCOTE, P.T.; MARSH, M.; ALTMANN, K.H.; MILLER, J.H.; DÍAZ, J.F.; STEINMETZ, M.O. Structural basis of microtubule stabilization by Laulimalide and Peloruside A. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 53, p. 1621-1625, 2014b.

PROTA, A.E.; BARGSTEN, K.; DÍAZ, J.F.; MARSH, M.; CUEVAS, C.; LINIGER, M.; NEUHAUS, C.; ANDREU, J.M.; ALTMANN, K.H.; STEINMETZ, M.O. A new tubulin-binding site and pharmacophore for microtubule-destabilizing anticancer drugs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 111, n. 38, p. 13817-13821, 2014c.

PUBCHEM – PubChem. [s.d.]. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/#>>. Acesso em: 11 fev. 2015.

RANAIVOSON, F.M.; GIGANT, B.; BERRITT, S.; JOULLIÉ, M.; KNOSSOW, M. Structural plasticity of tubulin assembly probed by vinca-domain ligands. **Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.**, v. D68, p. 927-934, 2012.

RAVELLI, R. B. G.; GIGANT, B.; CURMI, P. A.; JOURDAIN, I.; LACHKAR, S.; SOBEL, A.; KNOSSOW, M. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. **Nature**, v. 428, p. 198-202, 2004.

RESTER, U. Dock around the clock – current status of small molecule docking and scoring. **QSAR Comb. Sci.**, v. 25, n. 7, p. 605-615, 2006.

RICHARDS, W. G. Computer-aided drug design. **Pure & Appl. Chem.**, v. 66, n. 8, p. 1589-1596, 1994.

RIDLEY, R. G. Medical need, scientific opportunity and the drive for antimalarial drugs. **Nature**, v. 415, p. 686-693, 2002.

RODRIGUES, S. R. P. **Docking Molecular Aplicado ao Estudo da Formação de Complexos Enzimas-Inibidores entre Compostos Sulfonamidas e as Enzimas Glutathione Redutase de Plasmodium falciparum, Relacionada com a Malária, e Glutathione Redutase Humana.** 2008. 82f. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Bauru, 2008.

ROMAGNOLI, R.; BARALDI, P.G.; PAVANI, M.G.; TIBRIZI, M.A.; PRETI, D.; FRUTTAROLO, F.; PICCAGLI, L.; JUNG, M.K.; HAMEL, E.; BORGATTI, M.; GAMBARI, R. Synthesis and biological evaluation of 2-Amino-3-(3',4',5'-trimethoxybenzoyl)-5-yl thiophenes as a new class of potent antitubulin agents. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 3906-3915, 2006.

SACKETT, D. L. Podophyllotoxin, steganacin and combretastatin: natural products that bind at the colchicine site of tubulin. **Pharmac. Ther.**, v. 59, p. 163-228, 1993.

SAHU, M.; NERKAR, A.G. In silico design, synthesis and pharmacological screening of some quinazolinone metal complexes as dihydrofolate reductase inhibitors for anticancer activity: part-II. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 6, n. 5, p. 509-514, 2014.

ŠALI, A. Modelling mutations and homologous proteins. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 6, p. 437-451, 1995.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **J. Mol. Biol.**, v. 234, p. 779-815, 1993.

SARMA, G.N.; SAVVIDES, S.N.; BECKER, K.; SCHIRMER, M.; SCHIRMER, R.H.; KARPLUS, P.A. Glutathione reductase of the malarial parasite *Plasmodium falciparum*: crystal structure and inhibitor development. **J. Mol. Biol.**, v. 328, p. 893-907, 2003.

SCHLOSSER, J.; RAREY, M. Beyond the virtual screening paradigm: structure-based searching for new lead compounds. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 49, p. 800-809, 2009.

SCHRÉVEL, J.; SINOUE, V.; GRELLIER, P.; FRAPPIER, F.; GUÉNARD, D.; POTIER, P. Interactions between docetaxel (Taxotere) and *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, p. 8472-8476, 1994.

SENG, H.-L.; ALAN, H.-K. O.; RAJA, N.Z.R.A.; BOHARI, M.; TIEKINK, E.R.T; KONG, W.T.; MOHD, J.M.; CARACELLI, I.; NG, C.-H. Factors affecting nucleolytic efficiency of some ternary metal complexes with DNA binding and recognition domains. Crystal and molecular structure of Zn(phen)(edda). **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, p. 1997-2011, 2008.

SENG, H.-L.; VON, S.-T.; TAN, K.-W.; MAAH, M.J.; NG, S.W.; RAHMAN, R.N.; ZALIHA R.A.; CARACELLI, I.; NG, C.-H. Crystal structure, DNA binding studies, nucleolytic property and topoisomerase I inhibition of zinc complex with 1,10-phenanthroline and 3-methyl-picolinic acid. **BioMetals**, v. 23, p. 99-118, 2010.

SHEARWIN, K. E.; PEREZ-RAMIREZ, B.; TIMASHEFF, S. N. Linkages between the dissociation of $\alpha\beta$ tubulin into subunits and ligand binding: the ground state of tubulin is the GDP conformation. **Biochemistry**, v. 33, p. 885-893, 1994.

SHERMAN, I. W. Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). **Microbiological Reviews**, v. 43, n. 4, p. 453-495, 1979.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T.J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; McWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol. Syst. Biol.**, v. 7, p. 539-544, 2011.

SILVA, T.; LOPES, L. M. X. Aryltetralol and aryltetralone lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 929-937, 2006.

SILVA, T.; LOPES, L. M. X. Aryltetralone lignans and 7,8-seco-lignans from *Holostylis reniformis*. **Phytochemistry**, v. 65, p. 751-759, 2004.

SINDELAR, C.V.; DOWNING, K.H. The beginning of kinesin's force-generating cycle visualized at 9-Å resolution. **J. Cell Biol.**, v. 177, n. 3, p. 377-385, 2007.

SINGH, S.; MALIK, B. K.; SHARMA, D. K. Molecular drug targets and structure based drug design: a holistic approach. **Bioinformatics**, v. 1, n. 8, p. 314-320, 2006.

SINHA, S.; MEDHI, B.; SEHGAL, R. Challenges of drug-resistant malaria. **Parasite**, v. 21, n. 61, p. 1-15, 2014.

SINOUE, V.; BOULARD, Y.; GRELLIER, P.; SCHREVEL, J. Host cell and malarial targets for Docetaxel (Taxotere[®]) during the erythrocytic development of *Plasmodium falciparum*. **J. Euk. Microbiol.**, v. 45, n. 2, p. 171-183, 1998.

SIPPL, M.J. Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Proteins**, v. 17, p. 355-362, 1993.

SKINNER-ADAMS, T. S.; DAVIS, T. M. E.; MANNING, L. S.; JOHNSTON, W. A. The efficacy of benzimidazole drugs against *Plasmodium falciparum* *in vitro*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 580-584, 1997.

SLIWOSKI, G.; KOTHIWALE, S.; MEILER, J.; LOWE Jr, E.W. Computational methods in drug discovery. **Pharmacol. Rev.**, v. 66, p. 334-395, 2014.

SNOW, R.W.; GUERRA, C.A.; NOOR, A.M.; MYINT, H.Y.; HAY, S.I. The global distribution of clinical episodes of *Plasmodium falciparum* malaria. **Nature**, v. 434, n. 4, p. 214-217, 2005.

SONG, Y.N.; ZHANG, H.L.; CHANG, C.J. Cytotoxic cyclolignans from *Koelreuteria henryi*. **J. Nat. Prod.**, v. 57, n. 12, p. 1670-1674, 1994.

SOULÈRE, L. Toward docking-based virtual screening for discovering antitubulin agents by targeting taxane and colchicine binding sites. **ChemMedChem.**, v. 4, p. 161-163, 2009.

STEFANI, H.A.; BOTTESELLE, G.V.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; DA SILVA CORRÊA, D.; FARSKY, S.H.P.; MACHADO, I.D.; SANTIN, J.R.; HEBEDA, C.B. Synthesis, anti-inflammatory activity and molecular docking studies of 2,5-diarylfuran amino acid derivatives. **Europ. J. Med. Chem.**, v. 47, p. 52-58, 2012a.

STEFANI, H.A.; GUEOGJAN, K.; MANARIN, F.; FARSKY, S.H.P.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; CARACELLI, I.; PIZANO RODRIGUES, S.R.; MUSCARÁ, M.N.; TEIXEIRA, S.A.; SANTIN, J.R.; MACHADO, I.D.; BOLONHEIS, S.M.; CURI, R.; VINOLO, M.A. Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of 3-(triazolyl)-coumarin derivatives: Effect on inducible nitric oxide synthase. **Europ. J. Med. Chem.**, v. 58, p. 117-127, 2012b.

STEWART, J.J.P. MOPAC: A semiempirical molecular orbital program. **J. Comput.-Aided Mol. Des.**, v. 4, p. 1-105, 1990.

SURKAU, G.; BÖHM, K.J.; MÜLLER, K.; PRINZ, H. Synthesis, antiproliferative activity and inhibition of tubulin polymerization by anthracenone-based oxime derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 45, p. 3354-3364, 2010.

SUTHERLAND, J.J.; NANDIGAM, R.K.; ERICKSON, J.A.; VIETH, M. Lessons in molecular recognition. 2. Assessing and improving cross-docking accuracy. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 47, p. 2293-2302, 2007.

TAN, D.; RICE, W.J.; SOSA, H. Structure of the kinesin13-microtubule ring complex. **Structure**, v. 16, p. 1732-1739, 2008.

TILNEY, L. G.; TILNEY, M. S. The cytoskeleton of protozoan parasites. **Curr. Opin. Cell Biol.**, v. 8, p. 43-48, 1996.

TRAUB-CSEKO, Y. M.; RAMALHO-ORTIGÃO, J. M.; DANTAS, A P.; CASTRO, S. L.; BARBOSA, H. S.; DOWNING, K. H. Dinitroaniline herbicides against protozoan parasites: the case of *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol.**, v. 17, n. 3, p. 136-141, 2001.

TRIPATHI, A.; DURRANT, D.; LEE, R. M.; BARUCHELLO, R.; ROMAGNOLI, R.; SIMONI, D.; KELLOGG, G. E. Hydrophobic analysis and biological evaluation of stilbene derivatives as colchicine site microtubule inhibitors with anti-leukemic activity. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 24, n. 6, p. 1237-1244, 2010.

UCLA MBI – UCLA MBI – Verify_3d. [s.d.]. Disponível em: <http://services.mbi.ucla.edu/Verify_3D/>. Acesso em: 23 fev. 2015.

UNIPROT – UniProt. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/>>. Acesso em: 15 fev. 2015.

VALIRON, O.; ARNAL, I.; CAUDRON, N.; JOB, D. GDP-tubulin incorporation into growing microtubules modulates polymer stability. **J. Biol. Chem.**, v. 285, n. 23, p. 17507-17513, 2010.

VAN VUGT, M.; VAN BEEST, A.; SICURI, E.; VAN TULDER, M.; GROBUSCH, M.P. Malaria treatment and prophylaxis in endemic and nonendemic countries: evidence on strategies and their cost-effectiveness. **Future Microbiol.**, v. 6, n. 12, p. 1485-1500, 2011.

VEGA-TEIJIDO, M. A.; CARACELLI, I.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. Conformational analyses and docking studies of a series of 5-nitrofuran- and 5-nitrothiophen-semicarbazone derivatives in three possible binding sites of trypanothione and glutathione reductases. **J. Mol. Graph. & Model.**, v. 24, p. 349-355, 2006.

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, p. 609-623, 2003.

VIRUPAKSHIAH, DBM; KELMANI, C.; PATIL, R.; HEGADE, P. Computer aided docking studies on antiviral drugs for SARS. **Int. J. Med. Health Biomed. Pharm. Eng.**, v. 1, n. 6, p. 381-383, 2007.

WALLACE, A.C.; LASKOWSKI, R.A.; THORNTON, J.M. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions **Protein Eng.**, v. 8, n. 2, p. 127-134, 1995.

WATTS, K. R.; TENNEY, K.; CREWS, P. The structural diversity and promise of antiparasitic marine invertebrate-derived small molecules. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 21, p. 808-818, 2010.

WEININGER, D. SMILES, a chemical language and information system. 1. Introduction to methodology and encoding rules. **J. Chem. Inf. Comput. Sci.**, v. 28, n. 1, p. 31-36, 1988.

WESSELING, J. G.; DIRKS, R.; SMITS, M. A.; SCHOENMAKERS, J. G. G. Nucleotide sequence and expression of a β -tubulin gene from *Plasmodium falciparum*, a malarial parasite of man. **Gene**, v. 83, p. 301-309, 1989.

WHO – World Health Organization. [s.d.]. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/malaria/en/>>. Acesso em: 17 jan. 2015.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M.J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 35, p. W407-W410, 2007.

WIEMAN, H.; TØNDEL, K.; ANDERSSSEN, E.; DRABLØS, F. Homology-based modelling of targets for rational drug design. **Mini-Rev. Med. Chem.**, v. 4, p. 793-804, 2004.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 209-218, 2002.

WORLD MALARIA REPORT, 2014 – Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/144852/2/9789241564830_eng.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2015.

XIA, Y.; YANG, Z.Y.; XIA, P.; BASTOW, K.F.; TACHIBANA, Y.; KUO, S.C.; HAMEL, E.; HACKL, T.; LEE, K.H. Antitumor agents. 181. Synthesis and biological evaluation of 6,7,2',3',4'-Substituted-1,2,3,4-tetrahydro-2-phenyl-4-quinolones as a new class of antimetabolic antitumor agents. **J. Med. Chem.**, v. 41, p. 1155-1162, 1998.

YEH, I.; HANEKAMP, T.; TSOKA, S.; KARP, P. D.; ALTMAN, R. B. Computational analysis of *Plasmodium falciparum* metabolism: organizing genomic information to facilitate drug discovery. **Genome Res.**, v. 14, p. 917-924, 2004.

YUE, Q. X.; LIU, X.; GUO, D. A. Microtubule-binding natural products for cancer therapy. **Planta Med.**, v. 76, p. 1037-1043, 2010.

ZAVALA, F.; GUENARD, D.; ROBIN, J-P.; BROWN, E. Structure-antitubulin activity relationships in steganacin congeners and analogues. Inhibition of tubulin polymerization in vitro by (\pm)-Isodeoxydopodophyllotoxin. **J. Med. Chem.**, v. 23, p. 546-549, 1980.

ZINC – ZINC. [s.d.]. Disponível em: <<http://zinc.docking.org/>>. Acesso em: 12 fev. 2015.

ZHANG, S.X; BASTOW, K.F.; TACHIBANA, Y.; KUO, S.C; HAMEL, E.; MAUGER, A.; NARAYANAN, V.L.; LEE, K.H. Antitumor agents. 196. Substituted 2-Thienyl-1,8-naphthyridin-4-ones: their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization. **J. Med. Chem.**, v. 42, p. 4081-4087, 1999.

ZHANG, Y.J.; LITAUDON, M.; BOUSSEROUËL, H.; MARTIN, M.T.; THOISON, O.; LÉONCE, S.; DUMONTET, V.; SÉVENET, T.; GUÉRITTE, F. Sesquiterpenoids and cytotoxic lignans from the bark of *Libocedrus chevalieri*. **J. Nat. Prod.**, v. 70, p. 1368-1370, 2007.

ZUSE, A.; SCHMIDT, P.; BAASNER, S.; BÖHM, K.J.; MÜLLER, K.; GERLACH, M.; GÜNTHER, E.G.; UNGER, E.; PRINZ, H. 9-Benzylidene-naphtho[2,3-*b*]thiophen-4-ones as novel antimicrotubule agents – synthesis, antiproliferative activity, and inhibition of tubulin polymerization. **J. Med. Chem.**, v. 49, p. 7816-7825, 2006.

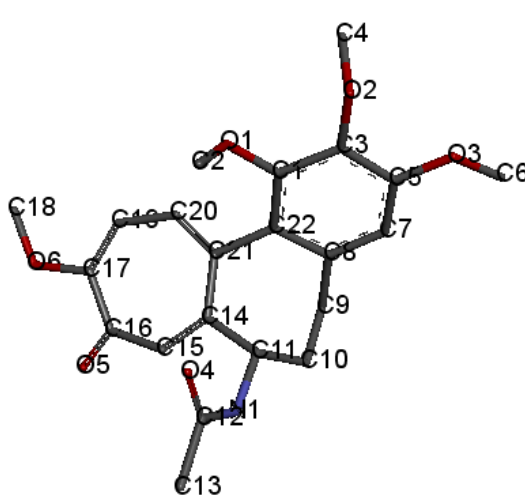
APÊNDICE – Interações proteína-ligantes

Neste Apêndice, são listadas todas as interações intermoleculares dos complexos proteína-ligante apresentados ao longo do trabalho. Para cada interação, são apresentados o átomo do ligante, o átomo do sítio receptor e a distância interatômica.

Para a composição das tabelas, foram consideradas apenas as interações com distância interatômica menor ou igual a 3,5 Å – com exceção das interações com centroides dos anéis dos ligantes, para as quais foi considerado um limite de até 5,0 Å. Além disso, não foram considerados os átomos de hidrogênio.

1. Colchicina-4o2b (*redocking*)

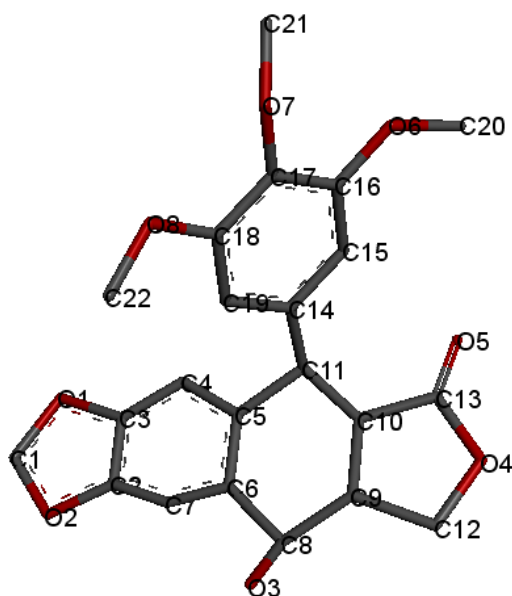
Lista de interações entre a **colchicina** e resíduos de aminoácido da tubulina bovina **4o2b**

| | Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
|  | O4 | 3,49 | CD1 | LEU248 B |
| | C12 | 3,40 | CD1 | LEU248 B |
| | C13 | 3,47 | O | THR179 A |
| | C9 | 3,49 | C | LYS254 B |
| | O1 | 3,30 | CB | ALA316 B |
| | C17 | 3,32 | CG | LYS352 B |
| | C16 | 3,36 | CB | ASN258 B |
| | C16 | 3,35 | CG | LYS352 B |
| | O5 | 3,26 | CA | ALA180 A |
| | O5 | 3,05 | N | VAL181 A |
| | O5 | 3,34 | CB | ASN258 B |
| | O5 | 3,37 | CG | ASN258 B |
| | O6 | 3,46 | CG1 | VAL181 A |
| | O6 | 3,39 | CG | LYS352 B |
| | C18 | 3,45 | O | ASN350 B |
| | Centr. | 3,78 | CD2 | LEU248 B |
| | Centr. | 3,48 | CD1 | LEU255 B |

2. Podofiloxina-4o2b (*cross-docking*)

Lista de interações entre a **podofiloxina** e resíduos de aminoácido da tubulina bovina **4o2b**

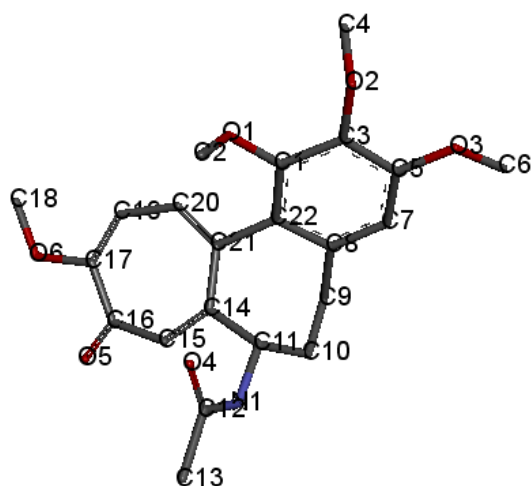
| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| O5 | 2,94 | CB | ALA250 B |
| O5 | 3,24 | C | LYS254 B |
| O5 | 2,88 | CB | LYS254 B |
| O5 | 3,33 | N | LEU255 B |
| C13 | 3,32 | CB | ALA250 B |
| C13 | 3,50 | CB | LYS254 B |
| O4 | 3,42 | OD1 | ASN101 A |
| O4 | 3,35 | CB | ALA250 B |
| C12 | 3,33 | OD1 | ASN101 A |
| C5 | 3,39 | CB | ASN258 B |
| C6 | 3,48 | CB | ASN258 B |
| O3 | 2,78 | O | THR179 A |
| O3 | 3,43 | CG | LYS352 B |
| C7 | 3,47 | CB | ASN258 B |
| C7 | 3,17 | CG | LYS352 B |
| C2 | 3,31 | CG | LYS352 B |
| C3 | 3,46 | SD | MET259 B |
| C4 | 3,43 | CB | ASN258 B |
| O2 | 3,29 | CG1 | VAL181 A |
| O2 | 3,35 | CG | LYS352 B |
| C1 | 3,39 | CB | THR314 B |
| C1 | 3,38 | O | ASN350 B |
| O1 | 3,38 | CG | MET259 B |
| O1 | 2,47 | SD | MET259 B |
| C15 | 3,39 | CD1 | LEU255 B |
| C20 | 3,34 | O | ASP251 B |
| C17 | 3,43 | CD2 | LEU248 B |
| O7 | 3,49 | SG | CYS241 B |
| C22 | 3,49 | C | LYS352 B |
| C22 | 3,22 | O | LYS352 B |
| Centr. | 4,35 | CB | LYS352 B |
| Centr. | 3,25 | CB | ASN258 B |
| Centr. | 3,63 | CD1 | LEU255 B |
| Centr. | 3,72 | CD2 | LEU248 B |



3. Colchicina-PfTu

Lista de interações entre a **colchicina** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

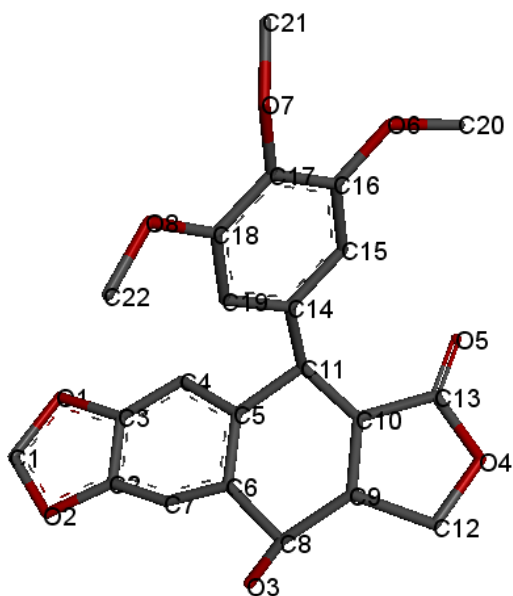
| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| C13 | 3,29 | CB | SER178 A |
| C13 | 3,20 | O | THR179 A |
| C14 | 3,27 | OD1 | ASN256 B |
| C15 | 3,35 | OD1 | ASN256 B |
| C10 | 3,35 | OG | SER248 B |
| C9 | 3,19 | OD1 | ASN256 B |
| C8 | 3,41 | OG | SER248 B |
| C7 | 2,92 | OG | SER248 B |
| O1 | 3,36 | CB | CYS314 B |
| O1 | 3,41 | SG | CYS314 B |
| O2 | 3,50 | SD | MET316 B |
| C6 | 3,34 | O | SER248 B |
| C6 | 3,44 | O | ASP249 B |
| C21 | 3,14 | OD1 | ASN256 B |
| C20 | 3,20 | OD1 | ASN256 B |
| C20 | 3,09 | SG | CYS314 B |
| C19 | 3,46 | OD1 | ASN256 B |
| C19 | 3,28 | SG | CYS314 B |
| C17 | 2,85 | CG | LYS350 B |
| C16 | 3,45 | CG | ASN256 B |
| C16 | 3,39 | OD1 | ASN256 B |
| C16 | 3,03 | CG | LYS350 B |
| O5 | 3,08 | CA | ALA180 A |
| O5 | 3,46 | C | ALA180 A |
| O5 | 2,96 | N | VAL181 A |
| O5 | 3,24 | CG2 | VAL181 A |
| O5 | 3,49 | CB | ASN256 B |
| O5 | 3,36 | CG | LYS350 B |
| O5 | 3,24 | NZ | LYS350 B |
| O6 | 2,98 | CG2 | VAL181 A |
| O6 | 2,92 | CG | LYS350 B |
| C18 | 3,25 | CG2 | VAL181 A |
| C18 | 3,45 | O | ASN256 B |
| C18 | 3,32 | O | ASN348 B |
| Centr. | 3,44 | CD1 | LEU253 B |
| Centr. | 4,53 | CD2 | LEU246 B |



4. Podofilotoxina-PfTu

Lista de interações entre a **podofilotoxina** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

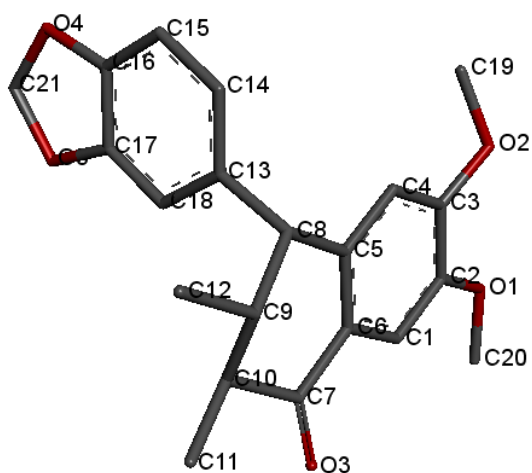
| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| O5 | 3,12 | ND2 | ASN101 A |
| O5 | 3,04 | CG | ASN256 B |
| O5 | 3,16 | OD1 | ASN256 B |
| O5 | 2,40 | ND2 | ASN256 B |
| C13 | 3,34 | ND2 | ASN101 A |
| O4 | 3,33 | OD1 | ASN101 A |
| O4 | 2,88 | ND2 | ASN101 A |
| O3 | 3,33 | CD2 | LEU246 B |
| C7 | 3,46 | CA | SER178 A |
| C7 | 2,92 | CB | SER178 A |
| C7 | 3,13 | OG | SER178 A |
| C2 | 3,30 | CB | SER178 A |
| C2 | 3,20 | OG | SER178 A |
| C3 | 3,27 | CB | LYS350 B |
| C4 | 2,99 | CB | LYS350 B |
| C4 | 3,36 | CG | LYS350 B |
| O2 | 3,34 | CA | SER178 A |
| O2 | 3,36 | CB | SER178 A |
| O2 | 2,85 | OG | SER178 A |
| C1 | 3,28 | O | SER351 B |
| O1 | 3,28 | CA | LYS350 B |
| O1 | 3,01 | CB | LYS350 B |
| O1 | 3,07 | N | SER351 B |
| O1 | 3,41 | O | SER351 B |
| C20 | 3,26 | C | LYS350 B |
| C20 | 3,11 | O | LYS350 B |
| C20 | 3,45 | N | SER351 B |
| C20 | 3,45 | C | SER351 B |
| C18 | 3,39 | OG | SER248 B |
| C19 | 3,41 | OG | SER248 B |
| O8 | 2,92 | OG | SER248 B |
| C22 | 3,24 | CB | SER248 B |
| C22 | 2,94 | OG | SER248 B |
| C22 | 3,34 | O | ASP249 B |
| C22 | 3,35 | CB | LYS252 B |
| C22 | 3,15 | N | LEU253 B |
| C22 | 3,36 | CA | LEU253 B |
| Centr. | 3,86 | CD2 | LEU246 B |



5. 1-PfTu

Lista de interações entre o composto **1** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

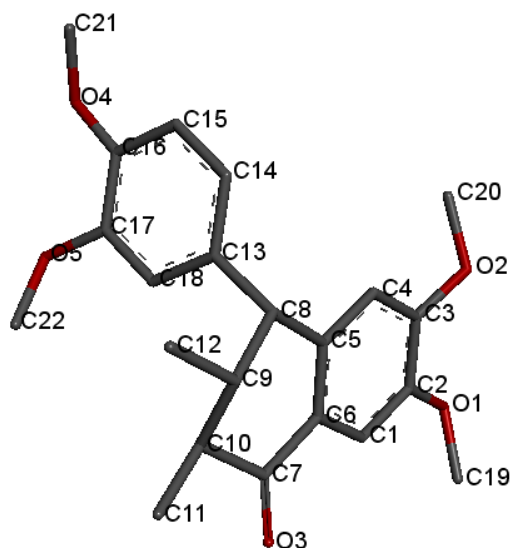
| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| C2 | 3,20 | CB | SER178 A |
| C2 | 3,41 | OG | SER178 A |
| C3 | 3,40 | CB | SER178 A |
| C3 | 3,18 | OG | SER178 A |
| C3 | 3,40 | CD2 | LEU246 B |
| C4 | 3,38 | CD2 | LEU246 B |
| C5 | 3,49 | CD2 | LEU246 B |
| C9 | 3,47 | O | THR179 A |
| O1 | 3,48 | CB | SER178 A |
| O1 | 3,39 | O | GLN245 B |
| O2 | 2,89 | OG | SER178 A |
| O2 | 3,45 | CD | GLN245 B |
| O2 | 3,19 | NE2 | GLN245 B |
| C11 | 3,29 | ND2 | ASN101 A |
| C11 | 3,16 | CA | ALA180 A |
| C11 | 2,39 | CB | ALA180 A |
| C11 | 2,87 | ND2 | ASN256 B |
| C12 | 3,38 | OD1 | ASN256 B |
| C12 | 3,47 | CG | LYS350 B |
| C14 | 3,46 | CB | LYS350 B |
| C18 | 3,29 | CD2 | LEU246 B |
| O5 | 3,04 | OG | SER248 B |
| C19 | 3,33 | CD | GLN245 B |
| C19 | 3,48 | O | SER351 B |
| C21 | 3,44 | CD1 | LEU253 B |
| Centr. | 3,22 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 3,60 | CB | SER178 A |



6. 2-PfTu

Lista de interações entre o composto **2** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

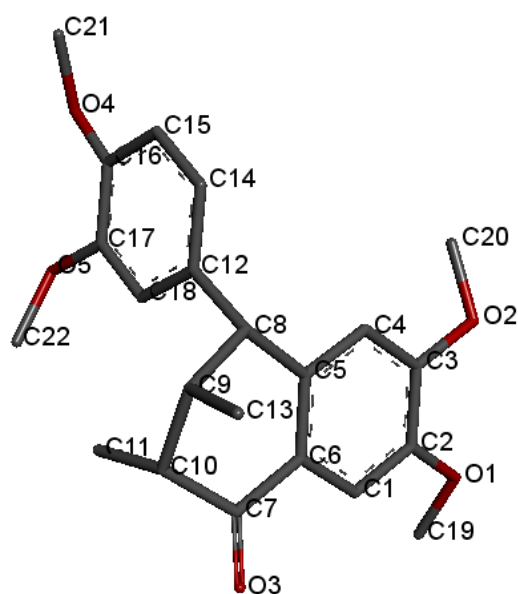
| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| C2 | 3,35 | CB | SER178 A |
| C3 | 3,26 | CB | SER178 A |
| C3 | 3,16 | OG | SER178 A |
| C3 | 3,40 | CD2 | LEU246 B |
| C4 | 3,38 | CD2 | LEU246 B |
| C9 | 3,30 | O | THR179 A |
| O1 | 3,29 | O | GLN245 B |
| O2 | 3,41 | CB | SER178 A |
| O2 | 2,72 | OG | SER178 A |
| O2 | 3,24 | NE2 | GLN245 B |
| O3 | 3,41 | OD1 | ASN101 A |
| C11 | 3,11 | ND2 | ASN101 A |
| C11 | 3,17 | CA | ALA180 A |
| C11 | 2,31 | CB | ALA180 A |
| C11 | 2,85 | ND2 | ASN256 B |
| C14 | 3,41 | CB | LYS350 B |
| C18 | 3,47 | CD2 | LEU246 B |
| O5 | 3,24 | OG | SER248 B |
| C19 | 3,31 | OH | TYR224 A |
| C20 | 3,47 | CG | GLN245 B |
| C20 | 3,26 | CD | GLN245 B |
| C20 | 3,31 | NE2 | GLN245 B |
| C21 | 3,43 | CB | CYS314 B |
| C22 | 3,45 | OG | SER248 B |
| C22 | 3,37 | N | LEU253 B |
| C22 | 3,35 | CA | LEU253 B |
| C22 | 3,48 | OD1 | ASN256 B |
| Centr. | 3,58 | CB | SER178 A |
| Centr. | 3,26 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 3,86 | CD2 | LEU246 B |



7. 3-PfTu

Lista de interações entre o composto **3** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

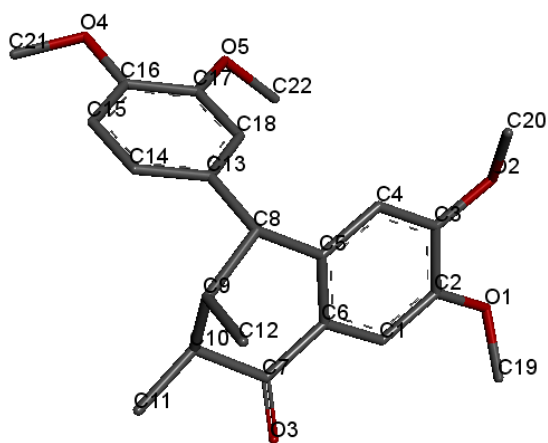
| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| C2 | 3,39 | CB | SER178 A |
| C2 | 3,40 | CD2 | LEU246 B |
| C3 | 3,28 | CD2 | LEU246 B |
| C4 | 3,34 | CD2 | LEU246 B |
| C5 | 3,50 | CD2 | LEU246 B |
| C9 | 3,38 | OD1 | ASN256 B |
| C10 | 3,44 | CG | ASN256 B |
| C10 | 3,38 | OD1 | ASN256 B |
| C10 | 3,08 | ND2 | ASN256 B |
| O1 | 3,26 | CB | SER178 A |
| O2 | 3,33 | CB | SER178 A |
| O2 | 2,78 | OG | SER178 A |
| O3 | 3,31 | OD1 | ASN101 A |
| O3 | 3,21 | ND2 | ASN101 A |
| C11 | 3,25 | OD1 | ASN256 B |
| C11 | 3,30 | ND2 | ASN256 B |
| C13 | 3,28 | O | THR179 A |
| C13 | 3,15 | CA | ALA180 A |
| C13 | 3,50 | CB | ALA180 A |
| C18 | 3,47 | CD2 | LEU246 B |
| O5 | 3,27 | OG | SER248 B |
| C19 | 3,47 | N | ASN247 B |
| C20 | 3,41 | O | SER351 B |
| C21 | 3,46 | CB | CYS314 B |
| C21 | 3,48 | SD | MET316 B |
| C22 | 2,82 | OG | SER248 B |
| Centr. | 3,15 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 4,23 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 4,68 | CD1 | LEU253 B |
| Centr. | 4,12 | CB | SER178 A |



8. 4-PfTu

Lista de interações entre o composto **4** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

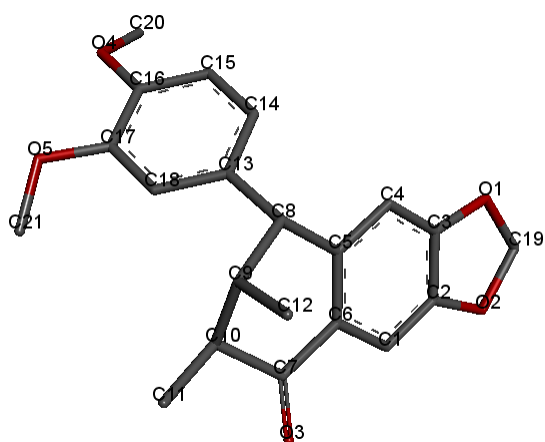
| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| C4 | 3,25 | CB | LYS350 B |
| C4 | 3,48 | CG | LYS350 B |
| C5 | 3,43 | CB | LYS350 B |
| C7 | 3,48 | CD2 | LEU246 B |
| C8 | 3,50 | O | THR179 A |
| O1 | 3,47 | SG | CYS314 B |
| O2 | 3,12 | OD1 | ASN256 B |
| O2 | 3,26 | SG | CYS314 B |
| O3 | 3,16 | O | SER351 B |
| O3 | 3,08 | CA | SER352 B |
| O3 | 2,58 | CB | SER352 B |
| O3 | 3,10 | OG | SER352 B |
| C11 | 2,77 | OG | SER178 A |
| C12 | 3,44 | O | SER351 B |
| C13 | 3,40 | O | THR179 A |
| C14 | 3,36 | O | THR179 A |
| O4 | 2,72 | OD1 | ASN101 A |
| O5 | 3,39 | CG | ASN101 A |
| O5 | 3,49 | OD1 | ASN101 A |
| O5 | 2,55 | ND2 | ASN101 A |
| O5 | 3,45 | ND2 | ASN256 B |
| C20 | 3,21 | OD1 | ASN256 B |
| C20 | 3,34 | CG | LYS350 B |
| C22 | 3,24 | ND2 | ASN101 A |
| C22 | 3,33 | CB | LYS252 B |
| C22 | 3,36 | ND2 | ASN256 B |
| Centr. | 3,57 | CB | LYS350 B |
| Centr. | 4,21 | CB | ALA180 A |
| Centr. | 4,70 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 4,46 | CD2 | LEU246 B |



9. 5-PfTu

Lista de interações entre o composto **5** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| C3 | 3,42 | OG | SER248 B |
| C4 | 3,39 | OG | SER248 B |
| C4 | 3,44 | CD1 | LEU253 B |
| C8 | 3,26 | OD1 | ASN256 B |
| O1 | 3,26 | C | ASP249 B |
| O1 | 2,43 | O | ASP249 B |
| O1 | 3,35 | CB | LEU253 B |
| O2 | 3,47 | CB | SER239 B |
| O3 | 3,36 | SD | MET316 B |
| C11 | 2,69 | CB | LYS350 B |
| C11 | 3,21 | C | LYS350 B |
| C11 | 3,41 | O | LYS350 B |
| C12 | 2,66 | SG | CYS314 B |
| C14 | 3,39 | OG | SER248 B |
| C15 | 3,32 | ND2 | ASN101 A |
| C15 | 3,44 | CB | SER248 B |
| O5 | 3,28 | O | THR179 A |
| C19 | 3,42 | CD2 | LEU240 B |
| C19 | 3,30 | O | ASP249 B |
| C20 | 3,36 | CE | LYS252 B |
| C20 | 3,42 | NZ | LYS252 B |
| C21 | 3,36 | O | THR179 A |
| Centr. | 3,64 | CD1 | LEU253 B |
| Centr. | 4,47 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 4,53 | CD1 | LEU246 B |
| Centr. | 3,91 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 4,14 | ND2 | ASN256 B |



10. 6-PfTu

Lista de interações entre o composto **6** e resíduos de aminoácido da tubulina do *Plasmodium falciparum*

| Átomo do ligante | Distância (Å) | Átomo do sítio receptor | Aminoácido do sítio receptor |
|------------------|---------------|-------------------------|------------------------------|
| C4 | 3,29 | CB | LYS350 B |
| C5 | 3,45 | CB | LYS350 B |
| C7 | 3,47 | CD2 | LEU246 B |
| C8 | 3,50 | O | THR179 A |
| O1 | 3,50 | SG | CYS314 B |
| O2 | 3,03 | OD1 | ASN256 B |
| O2 | 3,34 | SG | CYS314 B |
| O3 | 3,19 | O | SER351 B |
| O3 | 3,09 | CA | SER352 B |
| O3 | 2,57 | CB | SER352 B |
| O3 | 3,09 | OG | SER352 B |
| C11 | 2,79 | OG | SER178 A |
| C12 | 3,40 | O | SER351 B |
| C13 | 3,39 | O | THR179 A |
| C15 | 3,19 | CB | ALA180 A |
| O4 | 2,80 | OD1 | ASN101 A |
| C20 | 3,13 | OD1 | ASN256 B |
| C20 | 3,39 | CG | LYS350 B |
| Centr. | 4,75 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 4,43 | CD2 | LEU246 B |
| Centr. | 3,61 | CB | LYS350 B |
| Centr. | 4,15 | CB | ALA180 A |

