

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

DAVID LEANDRO PALOMINO SALCEDO

Estudos de modelagem molecular na caracterização da interação entre o domínio de ligação da colchicina da $\alpha\beta$ -tubulina e agentes antitumorais

São Carlos
2021

DAVID LEANDRO PALOMINO SALCEDO

Estudos de modelagem molecular na caracterização da interação entre o domínio de ligação da colchicina da $\alpha\beta$ -tubulina e agentes antitumorais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Versão Original

São Carlos
2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Salcedo, David Leandro Palomino

Estudos de modelagem molecular na caracterização da interação entre o domínio de ligação da colchicina da ab-tubulina e agentes antitumorais / David Leandro Palomino Salcedo; orientador Adriano Defini Andricopulo -- São Carlos, 2021.

92 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2021.

1. Química medicinal. 2. Tubulina. 3. Planejamento de fármacos. 4. Câncer. 5. Dinâmica molecular. I. Andricopulo, Adriano Defini, orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

David Leandro Palomino Salcedo

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada - Opção: Física Biomolecular.

Aprovado(a) em: 29/11/2021

Comissão Julgadora

Dr(a). Adriano Defini Andricopulo

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a). Marcelo Santos Castilho

Instituição: (UFBA/Salvador)

Dr(a). Gustavo Henrique Goulart Trossini

Instituição: (FCF/USP)

Dr(a). Káthia Maria Honório

Instituição: (EACH/USP)

Dr(a). João Renato Carvalho Muniz

Instituição: (IFSC/USP)

À minha família por acreditar sempre em mim.

AGRADECIMENTOS

A minha família por sempre estar presente para mim.

A Majo pelo seu carinho e compreensão nos momentos difíceis.

Ao Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo pela acolhida e orientação.

Ao Dr. Leonardo Ferreira pela sua ajuda na escrita e correção deste documento.

Aos meus colegas do LQMC pelo companheirismo.

A todos os amigos e não tão amigos que me apoiaram durante todo este tempo.

“O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) Código de financiamento 001”.

"The scientist is not the person who always gives the right answers,
he is the one who asks the right questions."

— **Claude Levi-Strauss**

RESUMO

SALCEDO, D. L. P. **Estudos de modelagem molecular na caracterização da interação entre o domínio de ligação da colchicina da $\alpha\beta$ -tubulina e agentes antitumorais.** 2021. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

O câncer consiste em uma série de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células. Os microtúbulos, componentes principais do citoesqueleto das células eucariotas, são polímeros formados por heterodímeros de α/β -tubulina. Estão envolvidos na motilidade, transporte e formação da estrutura celular. Portanto, o desenvolvimento de agentes citotóxicos que atuem sobre os microtúbulos é de grande importância na terapia de diversas doenças, incluindo o câncer. Neste trabalho, estudos computacionais foram desenvolvidos para estimar a capacidade de moléculas se ligarem ao domínio de ligação da colchicina nas isoformas β_{IIB} e β_{III} da tubulina. Estas moléculas impedem a polimerização dos microtúbulos durante o processo de divisão celular e, portanto, podem atuar como compostos anticâncer. Foram realizados estudos de docagem molecular para um conjunto de compostos com propriedades anticâncer. Os resultados serviram de base para a realização de simulações de dinâmica molecular dos sistemas proteína-ligante. As simulações de dinâmica molecular, em conjunto com análises de *clustering* de conformações, apontaram a estabilidade dos compostos no domínio de ligação da colchicina. Adicionalmente, a formação de redes de moléculas de água que atuam como estabilizadoras dos ligantes no sítio de interação foi investigada. As moléculas de água que interagem com a colchicina no seu domínio de ligação foram analisadas usando uma série de estruturas cristalográficas de alta resolução das isoformas α_{IB}/β_{IIB} da tubulina. Em seguida, foram gerados modelos dos dímeros α_{IB}/β_{IIB} e α_{IB}/β_{III} da tubulina humana ligados à colchicina. A partir destes modelos, foram realizadas simulações de dinâmica molecular que indicaram o papel chave do resíduo Ser241B na formação da rede de águas na isoforma β_{III} . Este achado corrobora a atividade apresentada em ensaios *in vitro* realizados com essa isoforma. Estes resultados revelam aspectos moleculares importantes para o reconhecimento intermolecular entre a tubulina e seu ligantes, destacando o papel essencial desempenhado por moléculas de água estruturais. Estas descobertas são úteis para o planejamento de novos inibidores da polimerização da tubulina e para o desenvolvimento de candidatos a fármacos mais eficazes para o tratamento do câncer.

Palavras-chave: Química medicinal. Tubulina. Planejamento de fármacos. Câncer. Dinâmica molecular.

ABSTRACT

SALCEDO, D. L. P. **Molecular modeling studies on the interaction between the colchicine binding domain in $\alpha\beta$ -tubulin and antitumoral agents.** 2021. 92 p. Thesis (Doutorado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

Cancer consists of a series of diseases that have in common the uncontrolled growth of cells. Microtubules, the major components of the cytoskeleton of eukaryotic cells, are polymers formed by α/β -tubulin heterodimers. They are involved in motility, transport, and formation of cell structure. Therefore, the development of cytotoxic agents that act on microtubules is highly important for the treatment of several diseases, including cancer. In this work, computational studies were developed to estimate the ability of molecules to interact with the colchicine binding domain in β_{IIB} and β_{III} tubulin isoforms. These molecules prevent the polymerization of microtubules during the process of cell division and, therefore, can act as anticancer compounds. Molecular docking studies were carried out for a set of compounds with anticancer properties. These results served as the basis for carrying out molecular dynamics simulations of the protein-ligand systems. The molecular dynamics, along with conformational cluster analysis, demonstrated the stability of the compounds in the colchicine binding domain. Additionally, the formation of networks of water molecules that stabilize the compounds at the binding site was investigated. The water molecules that interact with colchicine in its binding domain were investigated using a series of high-resolution crystallographic structures of the α_{IB}/β_{IIB} tubulin isoforms. Subsequently, models of the α_{IB}/β_{IIB} and α_{IB}/β_{III} dimers of human tubulin bound to colchicine were generated. Based on these models, molecular dynamics simulations were performed and indicated the key role played by Ser241B in the formation of the water network in the β_{III} isoform. This finding corroborates the activity of *in vitro* assays performed with this isoform. These results reveal important molecular aspects for the intermolecular recognition between tubulin and its ligands, highlighting the essential role played by structural water molecules. These findings are useful for the design of novel tubulin polymerization inhibitors and for the development of more effective drug candidates for the treatment of cancer.

Keywords: Medicinal chemistry. Tubulin. Cancer. Molecular dynamics. Drug design.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Polimerização dos microtúbulos	24
Figura 2. Representação esquemática da instabilidade dos microtúbulos.....	25
Figura 3. Dímero de α/β -tubulina em complexo com o GTP e GDP	27
Figura 4. Sítios de ligação no dímero de tubulina	29
Figura 5. Estrutura química da colchicina	30
Figura 6. Três zonas do domínio da colchicina	31
Figura 7. Distribuição da frequência dos B_{norm} para algumas estruturas proteicas representativas de alta resolução	34
Figura 8. Geometria de uma cadeia molecular simples.....	39
Figura 9. Página do PDB com a lista de opções para a busca por atributo.	43
Figura 10. Moléculas ligadas nas estruturas de $\alpha_{IB}\beta_{IIB}$ -tubulina selecionadas	47
Figura 11. Alinhamentos para as isoformas α	48
Figura 12. Alinhamentos para as isoformas β	49
Figura 13. Derivados da acridina 1 , 1a e 1b	50
Figura 14. Configurações de melhor score na docagem dos compostos 1a e 1b	51
Figura 15. Comparação entre a conformação cristalográfica da podofilotoxina e a calculada pela docagem molecular	53
Figura 16. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante colchicina.....	54
Figura 17. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante d-podofilotoxina	55
Figura 18. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante podofilotoxina.....	56
Figura 19. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante 1a	57
Figura 20. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante 1b	58
Figura 21. Conformação mais visitada da proteína ligada aos compostos colchicina, d-podofilotoxina e podofilotoxina nos últimos 20 ns de trajetória.....	60
Figura 22. Conformação mais visitada da proteína ligada aos compostos 1a e 1b nos últimos 20 ns de trajetória.....	61
Figura 23. Posição alternativa do composto 1a	63

Figura 24. Conformação mais visitada nas duas isoformas da proteína ligada ao composto plinabulina nos últimos 20 ns de trajetória	65
Figura 25. Conformação mais visitada da proteína ligada aos compostos colchicina, d-podofilotoxina, podofilotoxina e 1a nos últimos 20 ns de trajetória	66
Figura 26. Rede de moléculas de água envolvidas na interação entre a colchicina e o seu domínio de ligação	68
Figura 27. Favorabilidade das posições das águas estruturais	69
Figura 28. <i>Cluster</i> de água calculado nas trajetórias do dímero de α_{IB}/β_{IIB} ligado à colchicina	71
Figura 29. <i>Cluster</i> de água calculado nas trajetórias do dímero de α_{IB}/β_{III} ligado à colchicina	72
Figura 30. Duas configurações possíveis do composto 1a no dímero de α_{IB}/β_{IIB}	73
Figura 31. Duas configurações possíveis do composto 1a no dímero de α_{IB}/β_{III}	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da β -tubulina em células e tecidos humanos.....	28
Tabela 2. Estudos clínicos das alterações na expressão de isoformas da tubulina, tipos de tumor, e resposta à fármacos.....	28
Tabela 3. Mutações no sítio de ligação da colchicina em diferentes isoformas da β -tubulina.	31
Tabela 4. Estruturas dos compostos derivados de acridina.	32
Tabela 5. Estruturas de $\alpha_i\beta_{IIB}$ -tubulina selecionadas.	47
Tabela 6. Atividade biológica dos enantiômeros 1a e 1b	50
Tabela 7. Escores obtidos com a função ChemPLP nos cálculos de docagem para os compostos 1a e 1b	51
Tabela 8. Médias dos valores de RMSD das trajetórias de DM dos compostos selecionados em diferentes intervalos de tempo	59
Tabela 9. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada em cada trajetória para a isoforma β_{IIB}	62
Tabela 10. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada na trajetória da isoforma β_{IIB} ligada ao composto 1a na configuração alternativa	63
Tabela 11. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada na trajetória nas duas isoformas ligadas ao composto plinabulina.....	64
Tabela 12. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada de cada trajetória para a isoforma β_{III}	66
Tabela 13. B_{norm} das águas presentes na interação da colchicina com o seu domínio.....	70
Tabela 14. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre a colchicina e os resíduos do domínio na isoforma β_{IIB}	71
Tabela 15. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre a colchicina e os resíduos do domínio na isoforma β_{III}	72
Tabela 16. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre o composto 1a e os resíduos do domínio da colchicina na isoforma β_{IIB}	73
Tabela 17. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre o composto 1a e os resíduos do domínio da colchicina na isoforma β_{III}	74

SUMÁRIO

1 Introdução	21
1.1 Câncer	21
1.2 Microtúbulos	23
1.3 α/β -tubulina	26
1.4 Domínio de ligação da colchicina	29
1.5 Repositório de proteínas	33
1.6 Águas estruturais	33
1.7 Modelagem por homologia	35
1.8 Docagem molecular	37
1.9 Dinâmica molecular	38
2 Objetivo geral	41
2.1 Objetivos específicos	41
3 Metodologia	43
3.1 Seleção das estruturas	43
3.2 Determinação das águas estruturais	44
3.3 Docagem Molecular	44
3.4 Modelos das tubulinas β_{IIB} e β_{III} humanas	45
3.5 Simulações de DM dos sistemas $\alpha_{IB}\beta_{IIB}$ e $\alpha_{IB}\beta_{III}$	45
3.6 Clusters e pontes de água	46
4 Resultados e discussão	47
4.1 Seleção das estruturas de trabalho	47
4.2 Docagem molecular dos compostos 1a e 1b	50
4.3 Preparação dos sistemas proteína ligante	52
4.4 Trajetórias de DM dos dímeros de $\alpha_{IB}\beta_{IIB}$ -tubulina com os ligantes colchicina, podofilotoxina, d-podofilotoxina, 1a e 1b	53
4.5 Configuração alternativa do composto 1a no domínio de ligação da colchicina	63
4.6 Diferenças na interação entre as isoformas β_{IIB} e β_{III} : o caso da plinabulina	64
4.7 Trajetórias de DM dos dímeros de $\alpha_{IB}\beta_{III}$ -tubulina com os ligantes colchicina, podofilotoxina, d-podofilotoxina e 1a	65
4.8 Rede de águas no domínio de ligação da colchicina	67
4.9 Cluster de águas da colchicina nas simulações de DM das duas isoformas	70
4.10 Cluster de águas do composto 1a nas simulações de DM das duas isoformas	72

5	Conclusões.....	77
	Referências.....	79
	ANEXOS.....	85

1 Introdução

A tubulina é uma proteína estrutural essencial para a formação dos microtúbulos, os quais são estruturas do citoesqueleto celular.¹ O domínio de ligação do fármaco colchicina na α/β -tubulina tem sido amplamente estudado no planejamento de moduladores da tubulina com potencial anticâncer.² A modulação do sítio de ligação da colchicina é uma alternativa em relação aos sítios de ligação de fármacos amplamente usados no tratamento do câncer, como o paclitaxel.³ Mutações nestes sítios de interação e mudanças na expressão das diferentes isoformas da tubulina estão, frequentemente, associados à emergência de resistência a estes fármacos. Apesar da grande quantidade de estudos sobre o tema, ainda não estão totalmente esclarecidas as razões da diferença de afinidade da colchicina frente a diferentes isoformas, especialmente sua baixa afinidade pela isoforma β_{III} .⁴ Estudos tem demonstrado que a expressão desta isoforma está aumentada em vários tipos de câncer.⁵ Neste trabalho, técnicas de modelagem molecular foram utilizadas para investigar as interações de compostos que possuem o grupo fenil-trimetoxi com os dímeros α_{IB}/β_{IIB} e α_{IB}/β_{III} da tubulina. Estas informações são úteis no planejamento de novos compostos com propriedades antitumorais otimizadas. Nesta seção, é apresentada uma breve introdução ao conceito de câncer e ao uso da tubulina como alvo molecular para o planejamento de fármacos. Além disso, serão apresentados conceitos fundamentais sobre as diferentes técnicas utilizadas no desenvolvimento deste estudo.

1.1 Câncer

O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI, do inglês *National Cancer Institute*) define o câncer como uma série de doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se sem controle para outras regiões do corpo.⁶ O processo de disseminação de células tumorais para outras partes do corpo é conhecido como metástase. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA), câncer é o nome dado a mais de 100 doenças que compartilham esse comportamento, ou seja, células que se dividem rapidamente e tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores ou neoplasias malignas.⁷ O câncer pode ser provocado por fatores internos ou externos. Os fatores externos incluem o tabagismo, maus hábitos alimentares, alcoolismo, uso de alguns medicamentos e a alta exposição à radiação solar. Em muitos tipos de câncer ocorre a formação de tumores sólidos, com exceção dos que afetam o sangue, como a leucemia.⁶

Em oposição aos tumores cancerosos (malignos), os tumores benignos são massas localizadas de células que se multiplicam vagarosamente e se assemelham ao seu tecido original, raramente constituindo um risco de vida. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) o câncer causou 10 milhões de óbitos em 2020, sendo a primeira ou segunda causa de morte para pessoas com menos de 70 anos em 112 dos 183 países estudados, e ocupou a terceira ou quarta posição em outros 23.⁸ O câncer de mama feminino é o mais comum, com 2,3 milhões de novos casos (11,7%), seguido do de pulmão (11,4%), colorretal (10,0%), de próstata (7,3%) e de estômago (5,6%). O câncer de pulmão é a principal causa de morte por neoplasia, com uma estimativa de 1,8 milhão de mortes (18%), seguido do câncer colorretal (9,4%), de fígado (8,3%), de estômago (7,7%) e de mama feminino (6,9%).⁸

As células cancerosas se tornam insensíveis aos mecanismos de auto reparação e regulação devido a mutações no DNA. Dentre as alterações relacionadas à malignidade dos tumores, destacam-se: (I) autossuficiência de sinais de crescimento; (II) insensibilidade a fatores inibidores do crescimento; (III) evasão da apoptose (morte celular programada); (IV) potencial de replicação ilimitado; (V) angiogênese sustentada e (VI) invasão de outros tecidos ou metástase.⁹ Uma complexa rede de vias bioquímicas está envolvida no desenvolvimento e manutenção desses mecanismos. Esta rede bioquímica gera oportunidades para a intervenção farmacológica em diferentes alvos moleculares, incluindo proteínas e ácidos nucleicos, os quais podem ter sua atividade modulada por moléculas pequenas.¹⁰ Alguns exemplos de vias e alvos moleculares importantes incluem a enzima telomerase,¹¹ a via de sinalização de fatores de crescimento epitelial,¹² as enzimas quinases¹³, e a tubulina, alvo molecular selecionado neste trabalho.¹⁴

Os casos mais complexos e letais de câncer, como os tumores metastáticos, exigem tratamentos múltiplos além da remoção cirúrgica, incluindo a radioterapia e a quimioterapia.¹⁵ A quimioterapia, no entanto, apresenta diversos problemas, principalmente alta toxicidade, a qual está relacionada à inabilidade de o fármaco atuar seletivamente sobre as células tumorais, poupando as células saudáveis do organismo. Além disso, muitos fármacos disponíveis atualmente estão sujeitos a múltiplos mecanismos de resistência, o que reduz sua eficácia terapêutica.¹⁶ O cenário atual, de significativo avanço da doença, demonstra a necessidade de se desenvolver novos compostos mais eficazes, seletivos e seguros para a terapia do câncer.

1.2 Microtúbulos

Os microtúbulos são o maior componente do citoesqueleto das células eucariotas. Sua sequência de resíduos de aminoácidos tem sido bastante conservada ao longo do processo evolutivo.¹⁷ Os microtúbulos são polímeros formados por repetições de heterodímeros de α/β -tubulina e estão envolvidos na motilidade, transporte e estrutura celulares. Todas estas funções envolvem a interação dos microtúbulos com um grande número de proteínas associadas conhecidas como MAPs (do inglês, *Microtubule-Associated Proteins*), que são importantes para a regulação e distribuição dos microtúbulos na célula.¹⁸

A função vital desempenhada pelos microtúbulos os torna alvos moleculares muito atrativos para o desenvolvimento de compostos que atuem como agentes citotóxicos. Ao interferir na dinâmica regular de formação e decomposição dos microtúbulos e, conseqüentemente, nas diferentes funções do citoesqueleto, esses compostos apresentam grande potencial no combate ao câncer.¹⁹ Os microtúbulos são responsáveis pela separação dos cromossomos durante a mitose, o que ressalta ainda mais sua importância como alvos moleculares para o desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico contra o câncer.¹⁷ Os heterodímeros de α/β -tubulina são a unidade fundamental para a construção dos microtúbulos, que crescem e se alongam para formar o fuso mitótico durante a divisão celular.²⁰ Durante a mitose, a rede de microtúbulos se modela para conferir a dinâmica de movimentos necessários para que os filamentos do fuso mitótico efetuem de forma correta a segregação dos cromossomos.²¹ A formação dos feixes mitóticos (áster) e dos microtúbulos cinetócoros requer uma dinâmica muito bem regulada para garantir a correta fixação e separação dos cromossomos durante a divisão celular.²² A falha em fixar ou segregar corretamente os cromossomos interrompe o ciclo celular no ponto de controle mitótico, o que leva ao início do processo de apoptose (morte celular programada).²¹ Cada microtúbulo é formado pela associação paralela de protofilamentos, os quais são polímeros lineares formados a partir dos dímeros de α/β -tubulina (figura 1).

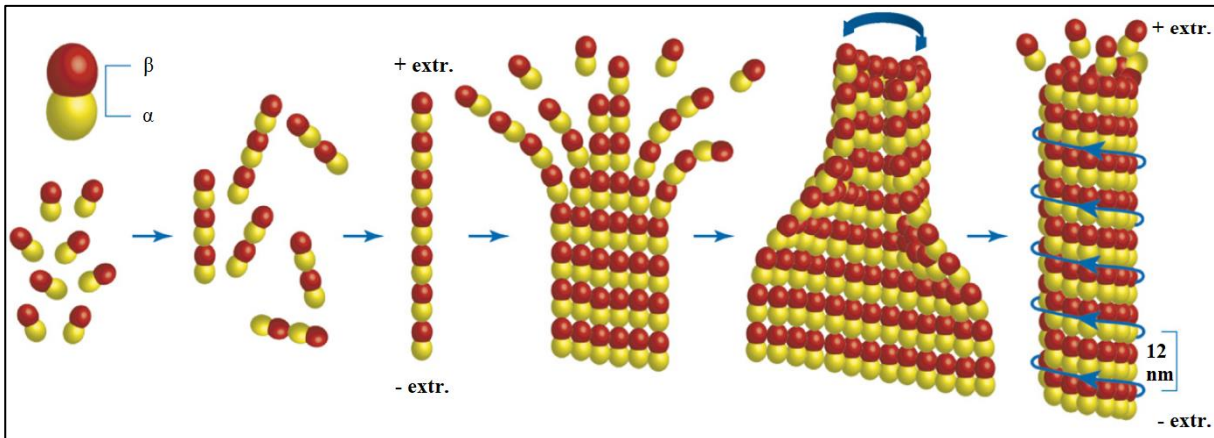


Figura 1. Polimerização dos microtúbulos. Os dímeros de tubulina se unem de formando oligômeros que se alongam em protofilamentos. Quando os protofilamentos atingem um comprimento crítico estimado de 12 ± 2 dímeros, eles começam a interagir lateralmente formando folhas com uma curvatura interna intrínseca característica. Com um número típico de 13 protofilamentos, a folha de tubulina se fecha em um tubo, formando um microtúbulo. A estrutura apresenta uma simetria helicoidal esquerda.

Fonte: Adaptada de PAMPALONI; FLORIN.²³

A sequência e a estrutura da tubulina contêm as informações necessárias para a automontagem dos protofilamentos em microtúbulos polares e dinâmicos, que por sua vez interagem com uma série de outros componentes celulares.¹⁸ Ao contrário de outros componentes do citoesqueleto celular, como os filamentos de actina que crescem continuamente enquanto houver G-actina disponível, os microtúbulos alternam entre fases de crescimento e contração, mesmo sob alta concentração de tubulina livre.²⁴ Este comportamento dinâmico é observado tanto *in vitro* quanto *in vivo*, e permite que o citoesqueleto seja rapidamente remodelado em resposta a sinais internos e externos. A dinâmica dos microtúbulos é incomum e de importância fundamental para o papel que estes polímeros desempenham nas células. Além disso, tanto o crescimento quanto o encurtamento destas estruturas podem gerar trabalho mecânico, traduzido em motilidade celular.²⁵ A notável capacidade de alongamento e encurtamento dos microtúbulos de forma cíclica, denominada de instabilidade dinâmica, tem sido associada tanto ao estado das moléculas de guanosina-trifosfato (GTP) que se ligam reversivelmente à β -tubulina, quanto à estrutura dos protofilamentos de tubulina nas extremidades positivas e negativas. A dinâmica de montagem e desmontagem dos microtúbulos está intimamente associada ao ciclo de conversão do GTP em guanosina-difosfato (GDP)²⁶ (figura 2).

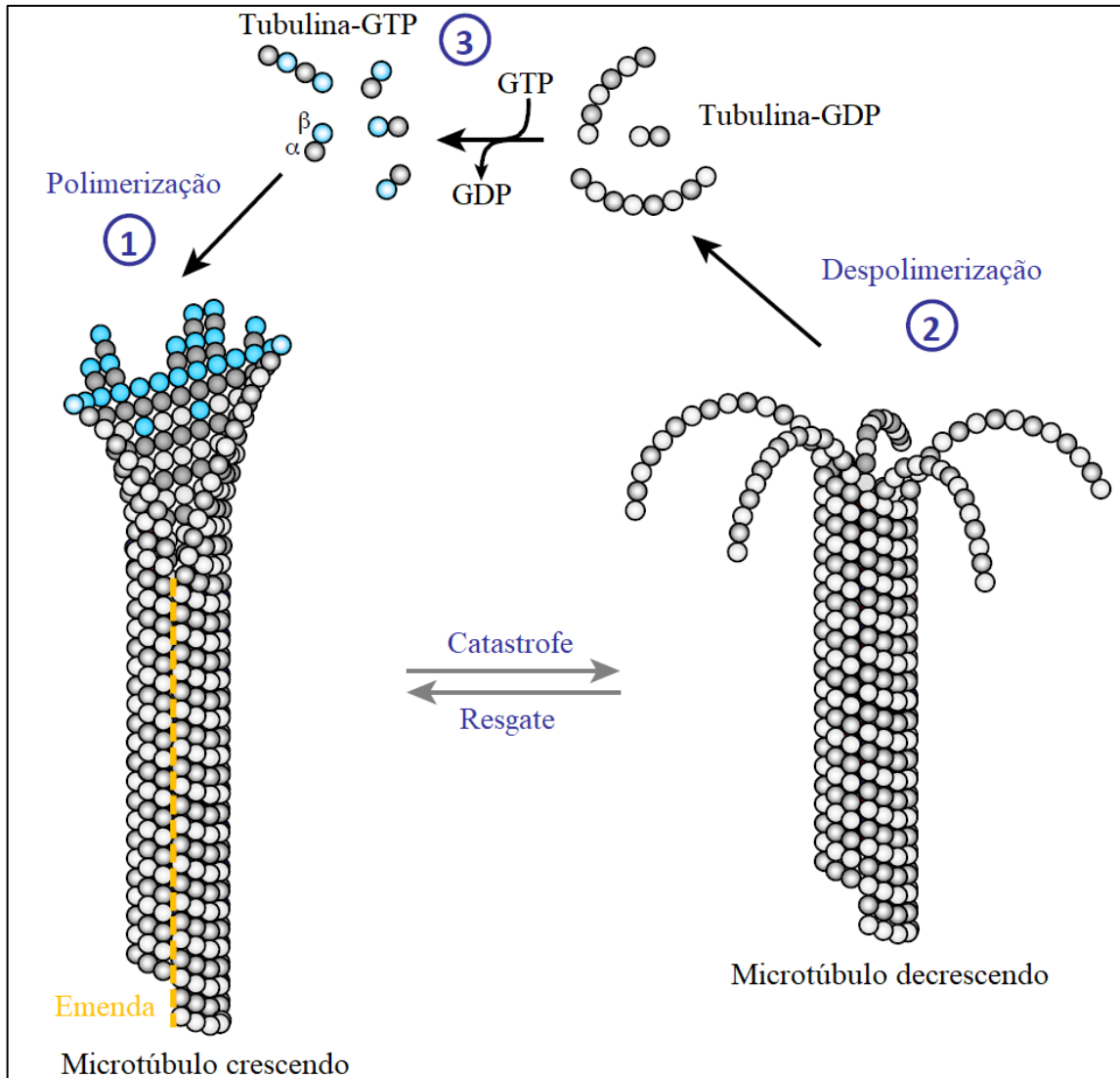


Figura 2. Representação esquemática da instabilidade dos microtúbulos. (1) Os dímeros tubulina-GTP (β -tubulina representada em azul) adicionam-se ao microtúbulo em crescimento na extremidade positiva, que mantém uma estrutura aberta de tipo folha e uma tampa estabilizadora com GTP. (2) Após a perda estocástica da capa de GTP, o microtúbulo despolimeriza rapidamente em dímeros de tubulina-GDP (β -tubulina representada em branco). O ciclo de montagem-desmontagem da tubulina é completado pela troca do nucleotídeo GDP com GTP.

Fonte: Adaptada de STEINMETZ; PROTA.¹⁹

Devido a sua polaridade intrínseca, os microtúbulos contêm duas extremidades estruturalmente distintas: uma extremidade negativa de crescimento lento e uma extremidade positiva de crescimento rápido. Nas células, as extremidades negativas dos microtúbulos são tipicamente ancoradas no centróssoma e não crescem. Em contraste, as extremidades positivas, altamente dinâmicas, são livres para explorar o espaço citoplasmático, alternando de maneira estocástica períodos de crescimento e encurtamento. Este comportamento de alternância que ocorre de forma aleatória é denominado instabilidade dinâmica.²⁷ As subunidades da α/β -tubulina ligadas ao GTP associam-se em protofilamentos de uma forma conhecida como “cabeça a cauda”. Normalmente, 13 protofilamentos são associados lado a lado para formar um

microtúbulo cilíndrico e oco.²⁸ As extremidades positivas apresentam protofilamentos curvos durante a despolimerização do microtúbulo. Na polimerização, apresentam a forma de uma folha reta. Os dímeros de α/β -tubulina ligados ao GDP não se associam aos microtúbulos, no entanto, formam estruturas em forma de anéis.²⁹ Acredita-se que a tendência de se curvar característica do complexo GDP-tubulina é o fenômeno responsável pela deformação do microtúbulo, causando a despolimerização quando se perde a tampa de α/β -tubulina ligada ao GTP na extremidade positiva. A partir destas informações, foi proposto um modelo para o dímero de tubulina se organizar em microtúbulos que se assemelha a um estado intermediário entre o reto e o curvo. A β -tubulina parece adotar uma conformação relacionada ao estado curvo, enquanto α -tubulina parece mais provavelmente associada à configuração reta.³⁰ A curvatura resultante do dímero de tubulina na rede de microtúbulos indica o potencial dos dímeros para assumir a configuração exterior conhecida como forma de “chifre de carneiro dobrado”, encontrada após a despolimerização. As limitações de conformação no microtúbulo, entretanto, parecem agir contra esta flexão, e assim, direcionar o dímero para um estado intermediário. Como já destacado, o principal componente estrutural dos microtúbulos é a proteína tubulina. Dada a importância da tubulina, não é de se surpreender que ela seja explorada como alvo molecular para uma infinidade de compostos de origem natural e sintética, alguns dos quais são utilizados no tratamento do câncer.³¹

1.3 α/β -tubulina

A tubulina é uma proteína globular que se liga ao GTP e tem massa molecular de aproximadamente 55 kDa. Existem 23 genes funcionais no genoma humano que codificam diferentes tipos de tubulina. As proteínas que esses genes codificam são classificadas nas famílias de tubulinas α , β , γ , δ , e ϵ . Enquanto as tubulinas γ , δ e ϵ estão presentes principalmente no centrôssoma, os dímeros de α - e β -tubulinas são a principal unidade de construção dos microtúbulos.³¹ Tanto a α - quanto a β -tubulina são formadas por cerca de 450 resíduos de aminoácido. Estes dois tipos de tubulina possuem uma alta semelhança, com cerca de 40% de identidade na sua sequência primária.³⁰ Ainda que ambas as subunidades possam ligar GTP, somente a β -tubulina pode hidrolisar o GTP após a polimerização, convertendo-o em GDP (Figura 3).

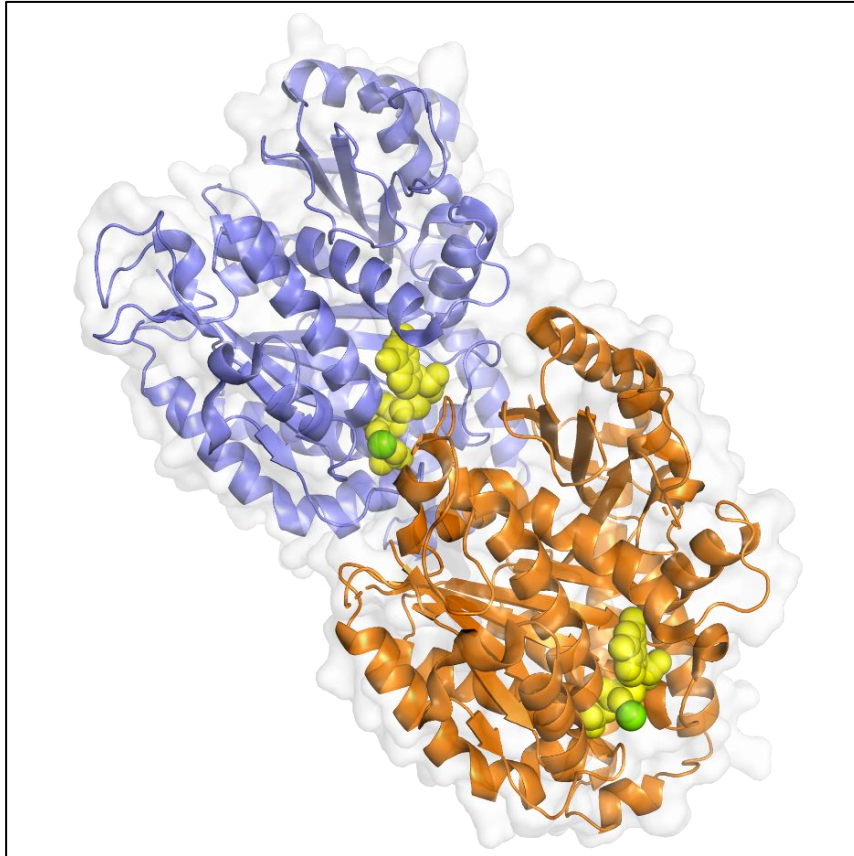


Figura 3. Dímero de α/β -tubulina em complexo com o GTP e GDP. Monômero de α -tubulina (azul) em complexo com o GTP (amarelo). Monômero de β -tubulina (laranja) em complexo com o GDP (amarelo). Íons magnésio em verde.

Fonte: Elaborada pelo autor

Nos seres humanos, sete isoformas da α -tubulina e nove da β -tubulina foram descritas, sendo relatada a expressão de isoformas específicas em determinados tecidos.³² Estas isoformas de α/β -tubulina apresentam variações na sequência de resíduos de aminoácidos, principalmente na extremidade C-terminal, composta por uma região altamente desordenada contendo entre 18 e 24 resíduos. Apesar dessa variação, as diferentes isoformas conservam sua homologia, apresentando identidade de cerca de 95%.²¹ A cauda é importante na interação com outras proteínas, além de ser o local de modificações pós-traducionais, o que confere características únicas a cada isoforma. A polimerização de diferentes isoformas da tubulina nos microtúbulos afeta sua instabilidade dinâmica, sua interação com proteínas motoras e com as MAPs, além de modificar sua afinidade de ligação para diferentes compostos.³² A β_I -tubulina é a isoforma mais comum enquanto a β_{III} -tubulina é localizada especificamente nos neurônios e testículos.⁴ A expressão exacerbada da β_{III} -tubulina está associada ao câncer agressivo e resistente à quimioterapia. Uma análise das sequências das isoformas da β -tubulina indica que a maior variabilidade ocorre entre as isoformas β_{III} , β_{IV} , β_V , β_{VI} e β_{VII} .² A tabela 1 exhibe algumas diferenças entre as β -tubulinas humanas.

Tabela 1. Distribuição da β -tubulina em células e tecidos humanos.

Isoforma	Expressa no Tecido/Órgão	Célula
β_I	Constitutiva	Todos os órgãos
$\beta_{IIa/b}$	Isoformas de neurônios maiores: cérebro, nervos e músculos	Restrito a um tipo particular de células
β_{III}	Isoformas de neurônios menores: cérebro	Somente neurônios
-	Testículos	Células de Sertoli
-	Cólon	Somente em células epiteliais
β_{IVa}	Cérebro	Neurônios e glia
β_{VIb}	Constitutiva	Principalmente em células ciliadas
β_V	Isoforma menor	Em quase todos os tecidos, menos cérebro
β_{VI}	Tecido hematopoiético	-
β_{VII}	Cérebro	Desconhecido

Fonte: MASSAROTTI *et al.*²

A expressão alterada das tubulinas β_I , β_{II} , β_{IVa} e β_V tem sido associada à resistência aos compostos que interagem com a tubulina (TBA do inglês, *tubulin binding agent*) em vários tipos de câncer.²¹ No entanto, a tubulina β_{III} é a isoforma que está majoritariamente envolvida na resistência aos taxanos e alcaloides da vinca em muitos tipos de tumor, incluindo o câncer de pulmão, mama, ovários e neoplasias gástricas. Na tabela 2, Parker *et al.*²¹ apresentam alguns dos tipos de câncer em que se evidenciaram alterações na expressão da tubulina e os efeitos resultantes destas alterações.

Tabela 2. Estudos clínicos das alterações na expressão de isoformas da tubulina, tipos de tumor, e resposta à fármacos

Isoforma alterada da tubulina	Efeito	Tipo de Tumor
Aumento na expressão de β_I	Baixa resposta ao tratamento com docetaxel	Câncer de mama
Diminuição na expressão de β_{II}	Relacionado à baixa resposta ao tratamento com taxanos ou doença em estado avançado	Câncer de mama e ovário
	Baixa sobrevida, mau resultado cirúrgico ou resposta a tratamento com TBA	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
Aumento na expressão de β_{III}	Relacionados com baixa sobrevivência, má resposta ao tratamento com platina e taxanos, estágio avançado ou doença agressiva	Câncer de ovário
	Resposta favorável ao tratamento com taxanos	Ovário (Adenocarcinoma de células claras)
	Baixa resposta ao tratamento com taxanos	Câncer de mama
	Baixa resposta ao tratamento com taxanos/platina	Carcinoma seroso uterino
	Baixa resposta ao tratamento com taxanos	Câncer gástrico
	Doença avançada e recaída precoce	Câncer de próstata
Aumento na expressão de β_{IVa}	Baixa resposta ao tratamento com taxol	Câncer de ovário
Aumento na expressão de β_V	Resposta favorável ao tratamento com taxanos	Carcinoma de pulmão de células não pequenas

Fonte: PARKER *et al.*²¹

1.4 Domínio de ligação da colchicina

Os agentes quimioterápicos que modulam a tubulina (TBA) como os taxanos, os alcaloides da vinca e as epotilonas, se ligam aos dímeros de α/β -tubulina em diferentes sítios afetando a dinâmica de formação dos microtúbulos, interrompendo a segregação dos cromossomos e induzindo a morte celular.²¹ Até 2021 conheciam-se 7 desses sítios de ligação, como representado na figura 4.

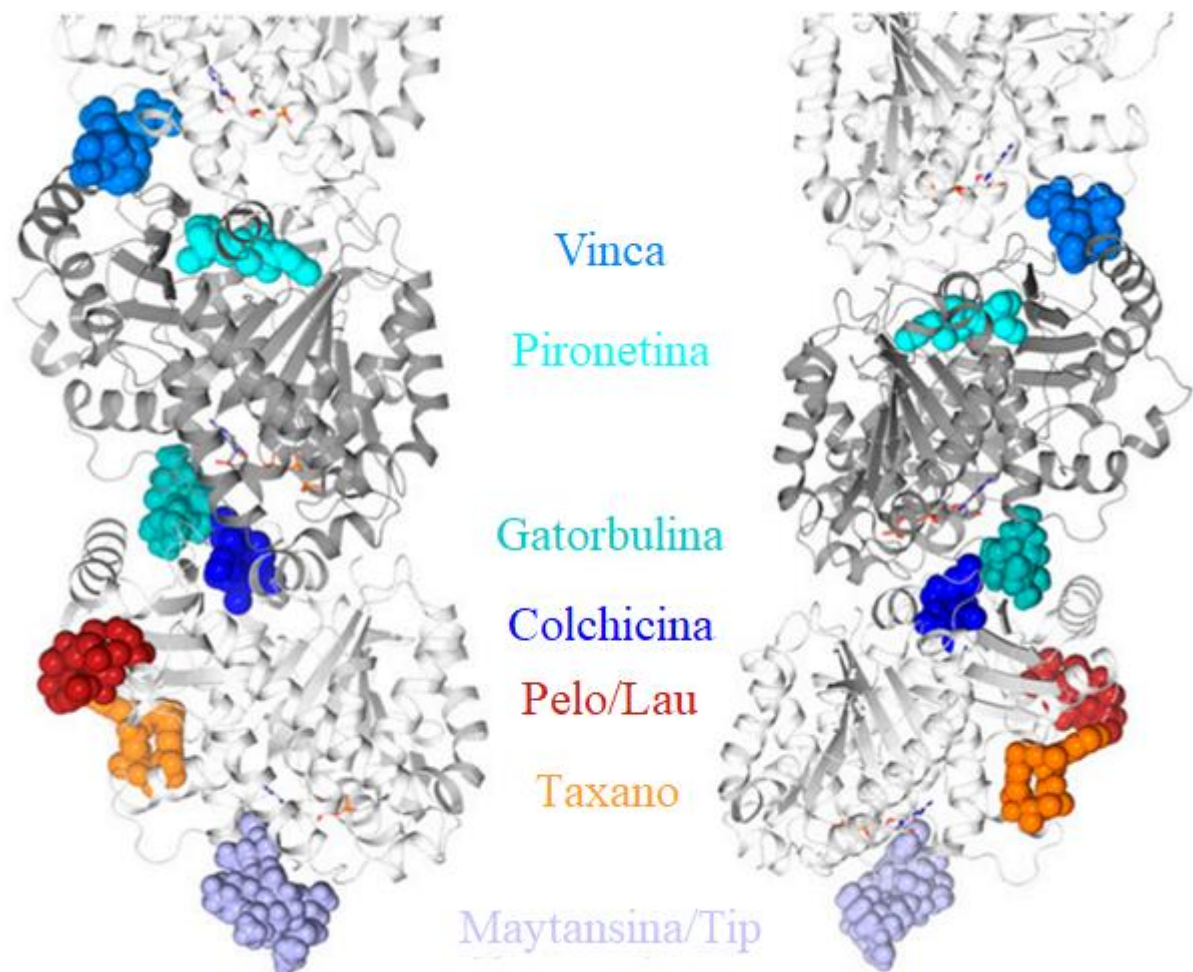


Figura 4. Sítios de ligação no dímero de tubulina. Heterodímero de tubulina (α -tubulina em cinza e β -tubulina em branco) na representação de fitas, onde os sete sítios de ligação conhecidos foram destacados mostrando os ligantes representativos em representação de esferas: vinblastina (PDB ID: 4EB6, azul claro), pironetina (PDB ID: 5FNV, ciano), gatorbulin (PDB ID: 7ALR, verde), colchicina (PDB ID: 4O2B, azul escuro), pelorusida (PDB ID: 4O4J, vermelho), Epotilona (PDB ID: 4O4I, laranja) e Maytansina (PDB ID: 4TV8, violeta).

Fonte: Adaptada de MATTHEW *et al.*³³

Os TBA afetam fortemente a dinâmica dos microtúbulos, processo fundamental para uma ampla gama de processos biológicos.³³ Os TBA são classificados em dois grupos de acordo com sua interação com os microtúbulos. O primeiro grupo de compostos promove a

estabilização dos microtúbulos ao interagir com o sítio do taxano ou da pelorusida/laulimalida. O mecanismo subjacente a este processo ainda não está totalmente elucidado. As evidências mostram que essas moléculas impedem a despolimerização dos microtúbulos através do travamento dos contatos laterais e/ou longitudinais. O outro grupo de TBA desestabiliza a polimerização dos microtúbulos. Esse é o tipo mais comum de TBA e o mais tóxico. Eles induzem a rápida despolimerização dos microtúbulos através de dois mecanismos diferentes, conhecidos como bloqueio e cunha. Os compostos que se ligam a sítios na superfície superior da β -tubulina ou na superfície inferior da α -tubulina, bloqueiam a incorporação de um novo heterodímero de tubulina ao inativar a superfície de contato. Enquanto os compostos que interagem com o sítio da colchicina o dos alcaloides da vinca bloqueiam a mudança da conformação curva para a esticada, o que impede a formação do microtúbulo.

Esta tese de doutorado tem como foco moléculas que se ligam ao sítio da colchicina, inibindo a sua polimerização. A colchicina (figura 5) é amplamente usada no tratamento da gota, cirrose, febre mediterrânea, certas formas de leucemia, e tumores sólidos.³⁴ Contudo, devido a sua toxicidade, que inclui mal-estar, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, febre, alopecia, danos no fígado e nos sistemas nervoso e hematopoiético,³⁵ é necessário o desenvolvimento de novos ligantes do sítio da colchicina, que inibam a polimerização da tubulina e apresentem propriedades otimizadas. Neste contexto é importante observar que nem todas as isoformas de β -tubulina humana são homologas em relação ao sítio de ligação da colchicina (tabela 3).

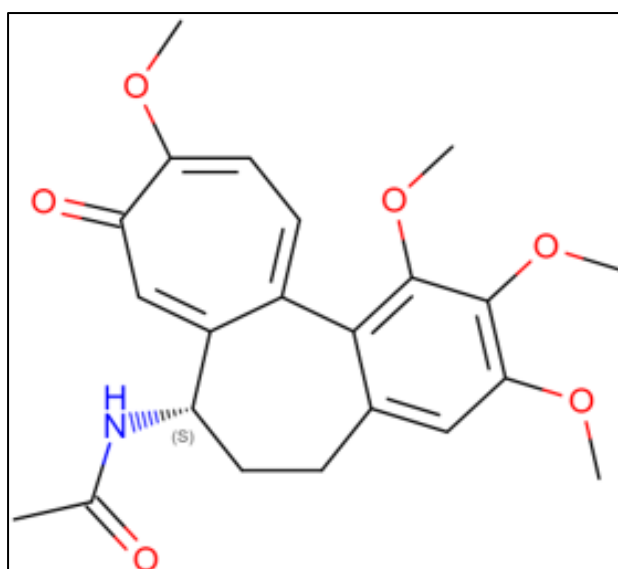


Figura 5. Estrutura química da colchicina
Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 3. Mutações no sítio de ligação da colchicina em diferentes isoformas da β -tubulina

Isoforma	Mutação					
β_{III}	-	C239S	-	-	A315T	T351V
β_{IV}	-	C239S	-	-	A315T	T351V
β_{V}	V236I	C239S	-	-	A315T	T351V
β_{VI}	-	-	V255M	V313A	-	-
β_{VII}	-	-	-	V313A	-	-

Fonte: MASSAROTTI *et al.*²

Existem diferentes tipos de compostos que interagem com o sítio da colchicina, incluindo alguns que podem se ligar à uma cavidade vizinha.³⁶ Por esta razão, foi proposto que esta região seja chamada de domínio da colchicina ao invés de sítio da colchicina.² O domínio da colchicina está dividido em três zonas: as zonas 1 e 2 são as cavidades em que se liga a colchicina, e a zona 3 é denominada cavidade adicional.³⁶ A zona 1 está localizada na interface entre os dois monômeros e inclui os resíduos Ser178A, Val181A, Asn258B e Met259B. A zona 2 é conhecida como bolsão hidrofóbico. Localizado no monômero β , é delimitado pelos resíduos Cys241B, Leu242B, Leu248B, Ala250B, Leu252B, Lys254B, Leu255B, Ala316B, Ala317B, Ile318B, Ile378B, Asn350B e Lys352B. Finalmente, a zona 3, conhecida como região profunda do domínio, é formada pelos resíduos Ile4B, Gln136B, Asn167B, Phe169B, Glu200B, Tyr202B, Val239B e Thr239B. A figura 6 apresenta estas diferentes zonas na estrutura do domínio da colchicina.

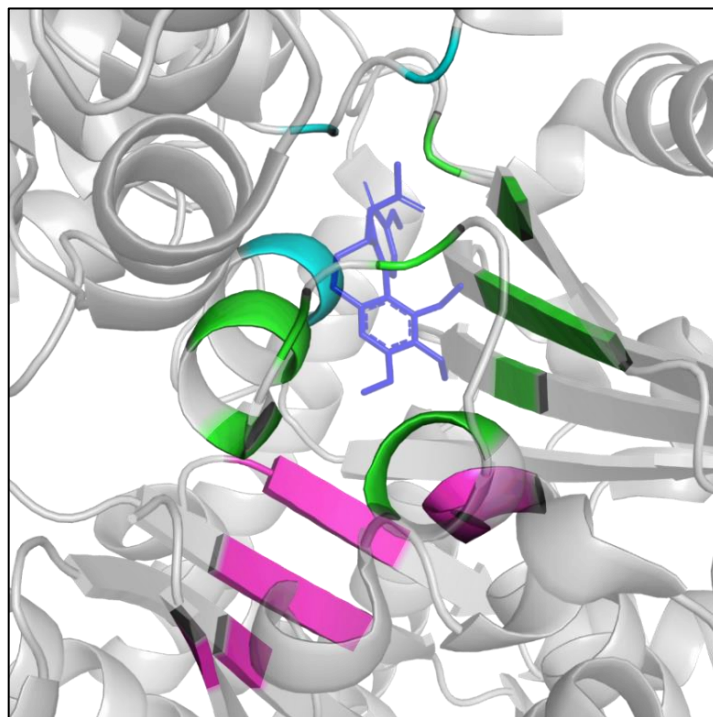


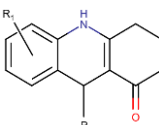
Figura 6. Três zonas do domínio da colchicina. A zona 1 está representada em ciano, a zona 2 em verde e a zona 3 em magenta. A colchicina está em azul.


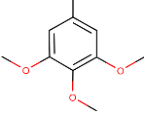

























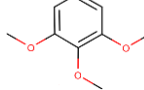



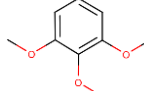
Fonte: Elaborada pelo autor

1.5 Série de moléculas derivadas de acridina

Uma série de 14 compostos derivados de acridina foram identificados durante o desenvolvimento de um trabalho de mestrado em nosso grupo (tabela 4).³⁷ Todos eles foram testados como misturas racêmicas, e apenas o composto **1** foi purificado em seus dois enantiômeros. Estes compostos inibem a migração celular por meio da inibição da polimerização da tubulina. Também foram seletivamente citotóxicos contra diferentes linhagens de células tumorais. Estas substâncias interrompem o ciclo celular na fase G2/M e desencadeiam o processo de apoptose na célula cancerígena.³⁷

Tabela 4. Estruturas dos compostos derivados de acridina.



Composto	R ₁	R ₂	Composto	R ₁	R ₂
1			9		
2			10		
3			11		
4			12		
5			13		
6			14		
7			1a		
8			1b		

Fonte: Adaptada de MAGALHAES *et. al.*³⁷

1.6 Repositório de proteínas: o Banco de Dados de Proteínas

O Banco de Dados de Proteínas (PDB, do inglês *Protein Data Bank*) é um repositório amplamente usado para depositar estruturas de macromoléculas que foram resolvidas experimentalmente.³⁸ Até o momento da elaboração desta tese, aproximadamente 180.000 estruturas foram depositadas nesta base*. A maioria das estruturas, aproximadamente 158.000, foram determinadas pelo método de cristalografia por difração raios-X. No entanto, o PDB também contém estruturas resolvidas por ressonância magnética nuclear (aproximadamente 13.000), e nos últimos anos, o número de estruturas determinadas por crio-microscopia eletrônica vem aumentando (aproximadamente 8.000). O PDB contém menos de 500 estruturas resolvidas por outras técnicas, como a difração de nêutrons e cristalografia de elétrons. Cada entrada possui um código de quatro letras e números, e os arquivos *.pdb* contêm uma série de informações, que vão desde detalhes experimentais até características biológicas da macromolécula. Dentre outras informações relevantes, são destacados a lista dos átomos e suas posições (x, y, z), sua ocupação no espaço (igual a 1 se os átomos tiverem uma posição estável única ou menor do que 1 se tiverem duas ou mais posições estáveis), e o parâmetro de deslocamento atômico, ou fator B, no caso das estruturas obtidas por difração de raios-X.³⁸ O fator B fornece informações importantes e, em certos casos, permite a predição de características biológicas relevantes para o planejamento de fármacos. O fator B pode indicar se as moléculas de água encontradas nas estruturas de macromoléculas podem ser classificadas como estruturais ou não estruturais.

1.7 Águas estruturais

Em 1997 Parthasarathy e Murthy analisaram a distribuição dos fatores B em uma série de estruturas proteicas de alta resolução³⁹. Eles observaram que os valores do fator B presentes nas diferentes estruturas proteicas variavam significativamente. Entretanto, quando os fatores B eram normalizados usando a equação 1, essa distribuição ficava muito semelhante entre as estruturas, assumindo a forma da superposição de duas gaussianas com máximos em -1.1 e 0.4 (figura 7).

$$B_{norm} = \frac{B - \langle B \rangle}{\partial B} \quad (1)$$

* Julho de 2021

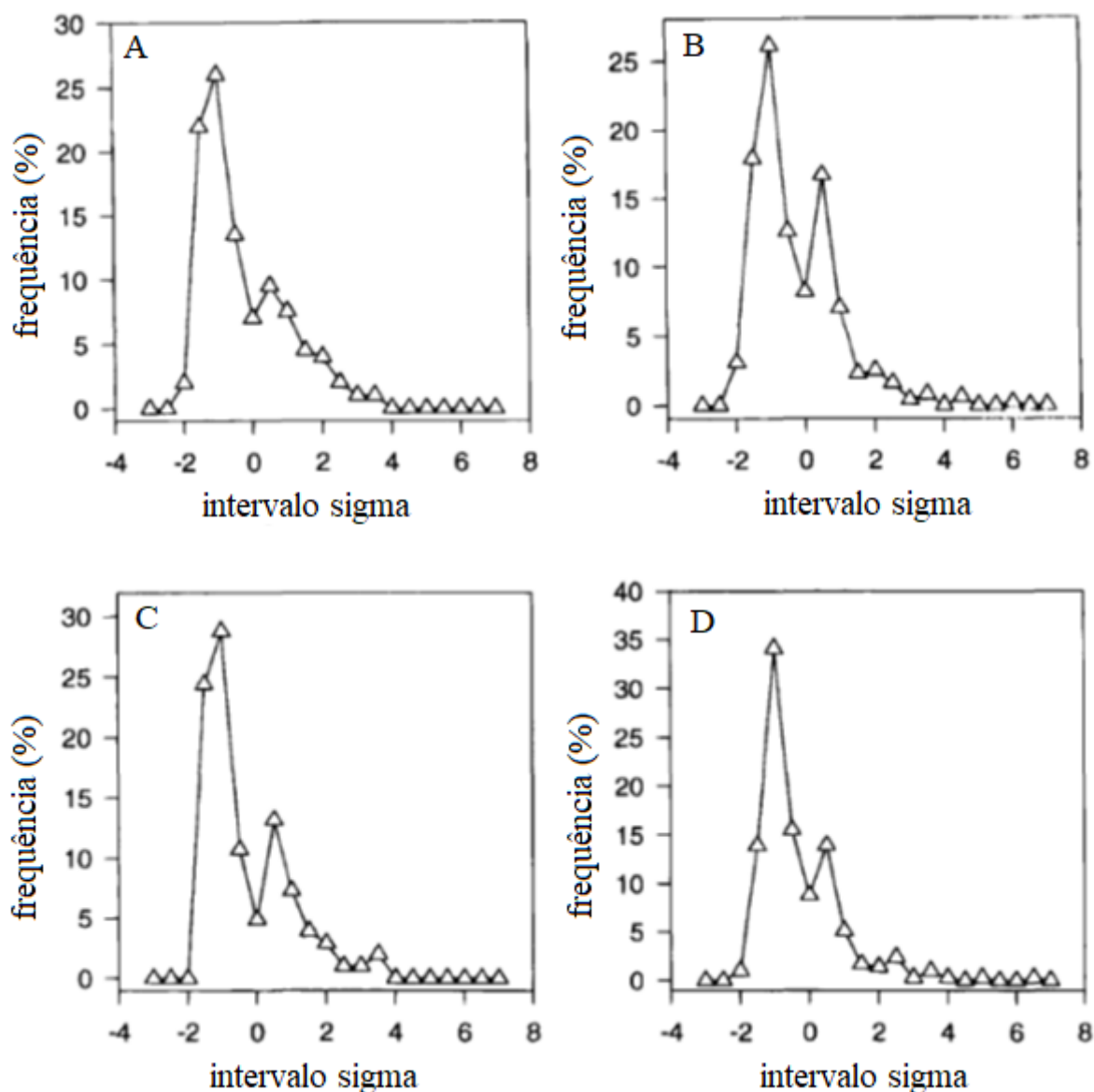


Figura 7. Distribuição da frequência dos B_{norm} para algumas estruturas proteicas representativas de alta resolução. A: Endonuclease de restrição Bam HI (1BAM). B: Quitinase (1CNS). C: Dihidrofolato redutase (1DYR). D: Ferredoxina (1FNC).

Fonte: Adaptada de PARTHASARATHY; MURTHY.³⁹

Esses resultados foram analisados por Carugo, que em 1999 propôs uma correlação entre os fatores B e a ocupação das moléculas de água em estruturas cristalinas de proteínas.⁴⁰ Para comprovar esta hipótese, foram analisadas 26 estruturas da mioglobina depositadas no PDB. As estruturas deveriam cumprir algumas condições, que foram determinadas à temperatura ambiente para o grupo espacial P21, com sequências primárias idênticas, sem deleções ou lacunas nos mapas de densidade de elétrons, e com resolução menor ou igual a 2.0 Å. Essas estruturas tinham sido determinadas por diferentes laboratórios independentemente e com o uso de diferentes pacotes de *software*, portanto, se presumiu que eram representativas de toda a população de conformações possíveis para a proteína. Somente estruturas determinadas

no grupo espacial P21 foram consideradas para se eliminar possíveis interferências da rede cristalina. Usando uma distância limite entre *clusters* de água igual a 2,75 Å, a relação entre os fatores B_{norm} e a ocupação das moléculas é dada pela equação 2.

$$\text{ocupação} = 0,86 - 0,12(B_{\text{norm}}) \quad (2)$$

Essa relação nos diz que uma molécula de água assumirá ocupação total do sítio de hidratação, ou seja, será uma água estrutural, quando o valor de B_{norm} for igual a -1,2. O sítio estará totalmente vazio (ocupação zero), quando o valor de B_{norm} for igual a 7,2. Estes valores estão relacionados com os valores dos dois picos de B_{norm} determinados por Parthasarathy e Murthy. A partir destes resultados, é possível usar um código de cores, como proposto por Darby et. al.,⁴¹ para representar a probabilidade de uma molécula de água ocupar um determinado sítio na estrutura cristalográfica.

1.8 Modelagem por homologia

Conhecer a estrutura tridimensional de uma proteína é crucial para responder a diferentes questões biológicas.⁴² No entanto, com o avanço das tecnologias de sequenciamento de genomas, a relação entre sequências de resíduos e estruturas de proteínas conhecidas vem aumentando cada vez mais. Em 2021, para as cerca de 180.000 estruturas depositadas no PDB, existiam aproximadamente 220 milhões[†] de sequências depositadas no Uniprot[‡]. Neste cenário, os métodos de predição de estruturas de proteínas a partir da sequência de resíduos ganha importância. A modelagem por homologia, ou modelagem comparativa, é uma técnica de predição empírica.⁴³ Na modelagem por homologia é seguido um protocolo que consiste, em princípio, em quatro etapas. Primeiro, se identifica a similaridade entre a sequência alvo e uma estrutura conhecida. Posteriormente, se alinham as duas sequências, a da proteína alvo contra a da estrutura de referência (determinada experimentalmente). A partir desse alinhamento se constrói o modelo baseado na estrutura de referência. Finalmente se verifica a precisão do modelo. O protocolo geralmente é repetido iterativamente até que um modelo satisfatório seja obtido.⁴² No momento da construção do modelo, é preciso identificar regiões estruturalmente conservadas, identificar regiões estruturalmente variáveis, incluir as inserções de sequência e

[†] Julho de 2021

[‡] Universal Protein Database website <https://www.uniprot.org/>

os resíduos faltantes, tanto na extremidade N-terminal quanto na C-terminal, além de modelar as cadeias laterais desses resíduos.

Durante desenvolvimento do protocolo, são usados uma série de programas e bases de dados. A primeira base de dados usada é o Uniprot⁴⁴. Nela, procura-se por sequências das proteínas escolhidas para serem modeladas, as chamadas sequências alvo. Cada sequência inserida na base de dados possui um código alfanumérico de seis caracteres. Além disso, cada entrada contém o nome da sequência, da proteína, do gene, do organismo de origem, e o tamanho da sequência de resíduos. A entrada contém uma série de informações de caracterização da proteína, incluindo a sequência de resíduos de aminoácido em um formato denominado FASTA. O próximo passo consiste em se realizar uma busca por meio da ferramenta BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*).⁴⁵ A ferramenta básica de busca por alinhamento local pode encontrar regiões de similaridade local entre sequências.⁴⁶ O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas com bancos de dados de sequências e calcula a significância estatística das correspondências. Realizando-se a busca sobre a base de dados do PDB, é possível identificar proteínas com estruturas resolvidas experimentalmente que tenham a maior similaridade com as sequências da proteína alvo. Uma vez identificadas as estruturas de referência (estruturas guias), é realizado o alinhamento entre as sequências alvo e as sequências dessas estruturas. Para esta finalidade, pode-se empregar o programa Clustal Omega,⁴⁷ um programa de alinhamento de sequências múltiplas que utiliza árvore filogenética e técnicas de perfil de HMM (modelo oculto de Markov) para gerar alinhamentos entre três ou mais sequências. Este programa produz alinhamentos biologicamente significativos de múltiplas sequências divergentes. Após o alinhamento, o modelo é gerado, o que pode ser feito com o programa de modelagem comparativa para proteínas MODELLER.⁴⁸ O programa calcula automaticamente um modelo contendo todos os átomos (exceto os hidrogênios) a partir do alinhamento entre uma sequência alvo e estruturas guias sem qualquer intervenção do usuário. Na geração do modelo, o MODELLER implementa restrições espaciais, entre as quais temos: 1) restrições de distância e ângulos diedros dos resíduos homólogos, obtidos a partir do alinhamento da sequência alvo com as estruturas guias, 2) restrições estereoquímicas, tais como comprimento e ângulo de ligação, obtidas do campo de força CHARMM-22, 3) Predileção estatística dos ângulos diedros e distâncias interatômicas, obtidas de um conjunto representativo de estruturas proteicas conhecidas, e 4) outras restrições inseridas manualmente, como aquelas relacionadas à espectroscopia por ressonância magnética, espectroscopia de fluorescência, e regras de empacotamento de estruturas secundárias. Finalmente, o modelo deve ser validado,

com o programa PROCHECK⁴⁹, com o qual a qualidade estereoquímica da estrutura modelada pode ser verificada a partir de uma série de gráficos da geometria geral de todos os resíduos.

1.9 Docagem molecular

A docagem molecular (do inglês *molecular docking*) é um método computacional que busca avaliar a formação de complexos receptor-ligante. Esse método pode ser utilizado em triagens virtuais ou para prever o modo de ligação de complexos moleculares.^{50,51} A docagem molecular foi introduzida em meados da década de 1980⁵² para prever os modos de interação ligante-receptor, em particular, de proteínas e ácidos nucleicos, por meio da investigação da orientação e conformação do ligante na cavidade de interação do receptor.⁵³⁻⁵⁵ Diversos programas utilizam essa técnica, sendo os mais populares o AutoDock, o AutoDock Vina, o DOCK, o FlexX, o Glide, o GOLD e o LUDI.^{53,56-57} Para este trabalho de tese foi escolhido o programa GOLD (do inglês, *Genetic Optimisation for Ligand Docking*), que usa um algoritmo genético para o acoplamento do ligante no sítio de ligação da proteína.⁵⁸ O GOLD otimiza o *fitness score*, que está relacionado à afinidade de ligação, explorando uma população de possíveis soluções. A seguir, o algoritmo designa um cromossomo para cada conformação, contendo informações como ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas e conformações flexíveis entre ligante e proteína. A cada cromossomo é atribuído um *fitness score* que é utilizado para sua classificação. Os cromossomos passam a ser otimizados através de operações de mutação e recombinação, e a cada ciclo uma nova população de cromossomos é gerada. O processo se repete até que não seja mais possível gerar soluções que possam ser otimizadas. O processo abrange os seguintes passos:⁵⁹

- i. Um conjunto de operadores de reprodução (cromossomos) é escolhido. A cada operador é designado um peso;
- ii. Uma população aleatória é criada e o *fitness score* é calculado;
- iii. Um dos operadores é selecionado aleatoriamente de acordo com seu peso;
- iv. Os cromossomos pais são escolhidos pelo operador com o *fitness score*;
- v. Depois de sua produção, o cromossomo filho é avaliado pelo *fitness score*;
- vi. Não se alcançando uma solução, substitui-se o membro com menor peso dentre a população.
- vii. Com uma solução aceitável alcançada, o processo é cessado, do contrário, se repete.

Vários parâmetros controlam a operação do algoritmo genético, dentre os quais: o tamanho da população, o número de operadores, o operador de peso e os parâmetros de avaliação das interações de hidrogênio e de van der Waals, dentre outros.

1.10 Dinâmica molecular

A dinâmica molecular (DM) é uma técnica que permite simular o comportamento de um sistema no decorrer do tempo, usando princípios fundamentais da mecânica clássica. Uma simulação de dinâmica molecular considera as moléculas como conjuntos de partículas unidas por forças elásticas ou harmônicas. Essas interações podem ser descritas usando a segunda lei de Newton,^{57,60} descrita nas equações (3) e (4).

$$\vec{f}_i = m_i \vec{a}_i \quad (3)$$

$$\vec{f}_i = -\nabla U(\vec{r}_i(t)) \quad (4)$$

Onde, m_i são as massas, \vec{a}_i são as acelerações e \vec{f}_i as forças da i -ésima partícula. $U(\vec{r}_i(t))$ é a energia potencial de interação com as outras partículas no tempo t , assumindo que esse potencial é aditivo.⁶¹ Este potencial é composto por dois tipos de forças de interação, que conhecemos como forças não ligadas e forças ligadas e que juntas formam o que conhecemos como campo de força. Em DM usam-se dois potenciais para calcular as interações não ligadas ou intermoleculares. O primeiro é o potencial de Lennard-Jones, representado na equação (5).

$$v^{LJ}(r_{ij}) = 4\epsilon \left[\left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^{12} - \left(\frac{\sigma}{r_{ij}} \right)^6 \right] \quad (5)$$

O segundo potencial de interação não ligado é o que representa as interações eletrostáticas, conhecido como potencial de Coulomb, representado na equação (6).

$$v^{Coulomb}(r_{ij}) = \frac{Q_i Q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}} \quad (6)$$

No caso das interações ligadas ou intramoleculares podem-se identificar três tipos de potenciais: os que envolvem as distâncias de ligação entre os átomos, os que descrevem os

ângulos entre as ligações, e finalmente os que descrevem os ângulos de torção que definem planos entre três átomos ligados a quatro coordenadas atômicas (figura 8).⁶⁰

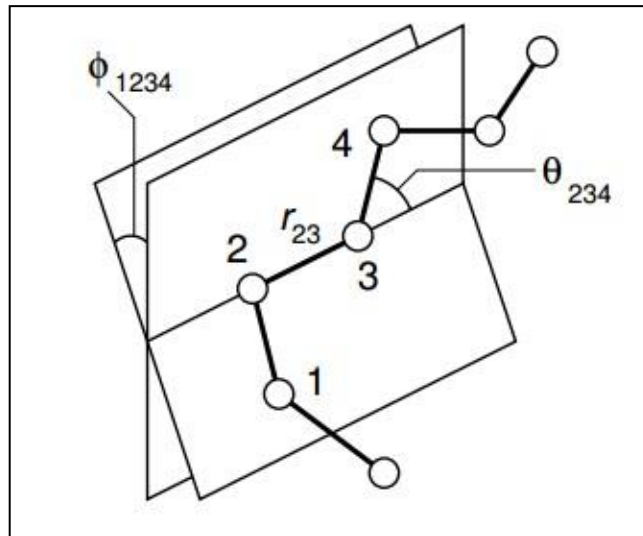


Figura 8. Geometria de uma cadeia molecular simples, ilustrando a definição das distâncias interatômicas r_{23} , ângulos entre ligações θ_{234} , e os ângulos de torção ϕ_{1234} .

Fonte: ALLEN.⁶⁰

As equações que representam as ligações são representadas na equação (7).

$$\begin{aligned}
 u_{intramolecular} = & \frac{1}{2} \sum_{\text{ligações}} k_{ij}^r (r_{ij} - r_{eq})^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\substack{\text{ângulos} \\ \text{de ligação}}} k_{ijk}^\theta (\theta_{ijk} - \theta_{eq})^2 \\
 & + \frac{1}{2} \sum_{\substack{\text{ângulos} \\ \text{de torção}}} \sum_m k_{ijkl}^{\phi, m} (1 + \cos(m\phi_{ijkl} - \gamma_m))
 \end{aligned} \quad (7)$$

Diferentes tipos de campos de força são usados nas simulações de dinâmica molecular de proteínas, e dentre os principais, destacamos o AMBER, o CHARMM e o OPLS.⁵⁷ Os parâmetros destes campos são determinados por uma combinação de cálculos químico-quânticos com dados derivados da termodinâmica e da coexistência de fases. Esses campos de força possuem um padrão de qualidade tão alto que a preferência de se usar um em relação a outro depende, geralmente, apenas de considerações de ordem prática, como o *software* que será usado para a execução da DM. Uma trajetória de DM é a solução numérica da equação (3) na faixa de tempo desejada, nela temos uma descrição detalhada da dinâmica do sistema. As simulações de DM permitem estudar diferentes efeitos em proteínas como as mudanças

conformacionais devido a mutações ou eventos de reconhecimento molecular como interações proteína-proteína e proteína-fármaco. Numa simulação de DM é possível considerar a presença de solvente, tanto implícita quanto explicitamente, e condições termodinâmicas como pressão, temperatura e força iônica.⁶²

2 Objetivo geral

O objetivo geral desta tese de doutorado é o desenvolvimento de um protocolo de estudos de modelagem molecular que permitam estimar a habilidade de uma molécula se ligar ao domínio da colchicina das isoformas β_{IIB} e β_{III} da tubulina, e, desta forma, inibir a polimerização dos microtúbulos durante o processo de divisão celular.

2.1 Objetivos específicos

- Selecionar uma série de estruturas das isoformas da α/β -tubulina que estejam em complexo com moléculas pequenas e que permitam a validação dos resultados obtidos.
- Realizar uma análise das possíveis conformações de ligantes no domínio de ligação da colchicina por meio de estudos de docagem molecular e dinâmica molecular.
- Criar modelos de α/β_{II} -tubulina e α/β_{III} -tubulina humana em complexo com ligantes no domínio de ligação da colchicina a partir das estruturas determinadas por cristalografia por difração de raios-X.
- Realizar simulações de dinâmica molecular com os modelos α/β_{II} -tubulina e α/β_{III} -tubulina humana em complexo com compostos cristalográficos e com os ligantes em estudo.
- Examinar as estruturas de raios-X de melhor resolução e caracterizar as redes de água que estabilizam os ligantes no domínio de ligação da colchicina.
- Usar as trajetórias de dinâmica molecular para identificar mudanças nos padrões de interação de ligantes com o domínio ligação da colchicina na α/β_{II} -tubulina e α/β_{III} -tubulina.
- Propor uma estratégia de estudos de modelagem molecular baseada nas correlações observadas entre os resultados computacionais e observações experimentais de inibição da polimerização da α/β -tubulina.

3 Metodologia

3.1 Seleção das estruturas

As estruturas dos dímeros de α/β -tubulina foram selecionadas através de buscas no PDB. Com o objetivo de se realizar buscas mais direcionadas, foi empregada a opção de busca avançada. Dentre as diferentes opções na aba de pesquisa, usou-se o termo “*Macromolecular Name*” que está na categoria “*Polymer Macromolecular Features*”. Na figura 9 é apresentada a página de busca avançada do PDB.

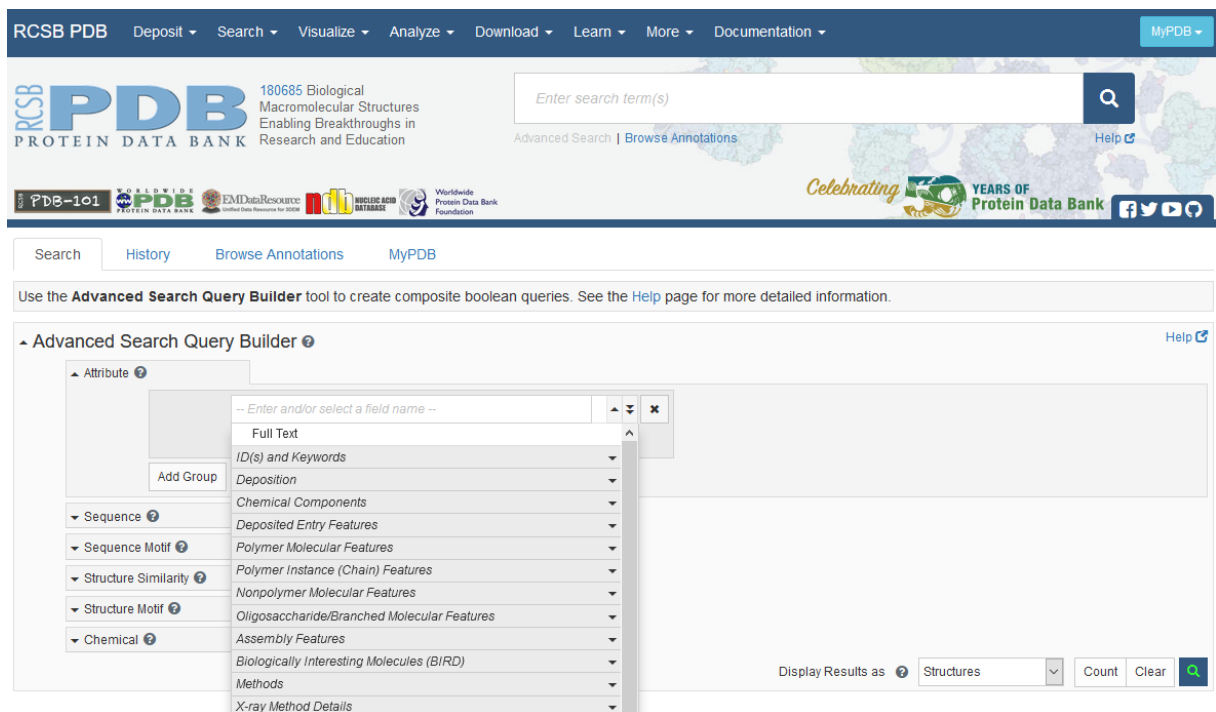


Figura 9. Página do PDB com a lista de opções para a busca por atributo.
Fonte: Elaborada pelo autor.

A primeira busca foi executada usando a palavra “*tubulin*” a qual gerou como resultado 540 entradas de diferentes estruturas. Aproximadamente 2/3 destes resultados são de estruturas resolvidas por cristalografia de raios-X. O restante é formado por estruturas de criomicroscopia, ressonância magnética e cristalografia de elétrons. Quando os termos “*tubulin beta*”, “*tubulin beta-2*”, “*tubulin beta-2a*” e “*tubulin beta-2b*” foram usados, foram obtidos 404, 2, 0 e 220 resultados, respectivamente. Como a isoforma mais estudada é a β_{IIB} , muitas estruturas depositadas que usam apenas o nome “*tubulin beta*” são desta isoforma. Para fazer um levantamento de todas as isoformas possíveis, foram usadas variações de “*tubulin beta-*”

adicionando os números 1, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, e as letras *a* ou *b*. Com este protocolo de busca, foram gerados apenas nove resultados para “*tubulin beta-1*”, e sete para “*tubulin beta-3*”. Destes resultados, nenhuma das estruturas da tubulina β_I está em complexo com ligantes. No entanto, uma estrutura β_{III} está em complexo com a plinabulina, ligante que interage com o sítio da colchicina, e a outra está em complexo com a gatarbulina, que possui um sítio de ligação específico.

3.2 Determinação das águas estruturais

Para calcular os valores de B_{norm} é preciso calcular a média dos valores e seu desvio padrão. Esses valores são obtidos do arquivo *.pdb* de cada uma das estruturas selecionadas. Uma vez que se tem os valores, o passo seguinte é usar a equação 1 para realizar o cálculo de B_{norm} para cada átomo da estrutura. Um gráfico da densidade dos valores de B_{norm} foi gerado usando R^{63} para verificar se essa distribuição se encontrava na mesma região para as estruturas selecionadas. Para facilitar a análise, foi usado um código de cores proposto por Darby et. al.⁴¹ para representar graficamente as águas usando o programa PyMOL.⁶⁴ As cores escolhidas foram o azul para valores -1σ ou menores (favorável), branco para 1σ (neutro), e vermelho para valores 3σ ou maiores (desfavorável).

3.3 Docagem Molecular

As simulações de docagem molecular foram realizadas usando o programa GOLD v.2019.2^{58,59} disponível no pacote CSD-Discovery Suite 2019, disponibilizado pela CAPES via Dot.Lib Brasil. Os ligantes usados na docagem molecular foram o **1a** e **1b**. As estruturas de $\alpha_1\beta_{III}$ -tubulina foram aquelas com os PDB IDs: 5EYP, 5XLT e 5JCB. Trabalhou-se com a aproximação de receptor rígido e ligante flexível. Primeiramente, foram preparadas as estruturas das proteínas adicionando átomos de hidrogênio automaticamente com o programa GOLD. Posteriormente, foi definido o sítio de ligação com todos os átomos da proteína presentes até a distância de até 6,0 Å ao redor do ligante cristalográfico. O programa detecta todos os átomos doadores/aceptores de ligações de hidrogênio da cavidade que foram tratados como acessíveis ao solvente. A função de pontuação selecionada foi a ChemPLP.⁶⁵ Foram realizados 100 cálculos para cada composto. A avaliação gráfica dos resultados foi realizada usando o PyMol.⁶⁴ A conformação de maior pontuação foi a selecionada para as análises posteriores. Em todos os casos, as diferentes conformações obtidas apresentaram um padrão de

ligação preferencial que reproduz as interações intermoleculares fundamentais para a interação com o alvo molecular.

3.4 Modelos das tubulinas β_{IIB} e β_{III} humanas

Os modelos dos dímeros $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ e $\alpha_{IA}\beta_{III}$ da tubulina humana, com o GTP, GDP e a colchicina ligados aos seus respectivos sítios, foram realizados utilizando o protocolo clássico de modelagem por homologia, com algumas pequenas modificações.^{48,66} As sequências das isoformas α_{IA} (Q71U36), β_{IIB} (Q9BVA1), e β_{III} (Q13509) de tubulina humana foram obtidas do UniProtKB.⁴⁴ A estrutura escolhida como modelo guia foi aquela como o PDB ID 5EYP. Essa estrutura já possui o ligante colchicina e os cofatores GTP e GDP nos sítios esperados. O programa de modelagem por homologia Modeller v9.2⁴³ foi utilizado para gerar cinco modelos de cada complexo proteína-ligante. A função de pontuação DOPE foi usada para selecionar os melhores modelos. O melhor modelo foi minimizado no vácuo usando o pacote GROMACS 2019^{67,68} com o campo de força CHARMM 36⁶⁹ para remover contatos inadequados. Os modelos foram avaliados por meio de um gráfico Ramachandran gerado pelo programa RAMPAGE⁷⁰, com o z-score calculado pelo ProSA.⁷¹

3.5 Simulações de DM dos sistemas $\alpha_{IB}\beta_{IIB}$ e $\alpha_{IB}\beta_{III}$

As simulações de dinâmica molecular foram realizadas usando o pacote GROMACS 2019^{67,68} e o campo de força CHARMM36⁶⁹. Como o GROMACS é projetado para parametrizar apenas proteínas, é necessário gerar as topologias dos ligantes usando outra ferramenta. Neste trabalho foi usado o servidor CGenFF.⁷² Foram carregados os arquivos das estruturas das moléculas pequenas e obtidas as suas respectivas topologias. Todos os complexos foram solvatados com moléculas de água explícitas do tipo TIP3P⁷³ após definição de caixas cúbicas de solvatação, com pelo menos 1 nm entre cada complexo e a borda. Foram adicionados íons cloreto e sódio, para neutralizar a carga total do sistema, numa concentração máxima de 0,20 mM. Em todas as simulações, as moléculas de água foram tratadas como rígidas, usando o algoritmo SETTLE.⁷⁴ Após a montagem dos sistemas, e com o intuito de evitar contatos incorretos, foi realizada uma minimização usando o algoritmo *steepest descent* com 50.000 passos de simulação e com intervalo de passo de 0,01 kJ·mol⁻¹. Ligações que envolvem átomos de hidrogênio foram restringidas com o uso do algoritmo LINCS.⁷⁵ Em seguida, foram realizadas três etapas de equilibração diferentes usando as condições NPT (N, número de

partículas; P, pressão e T, temperatura constantes). Na primeira, com duração de 100 ps, os movimentos de todos os átomos (exceto os de hidrogênio), tanto da proteína quanto dos ligantes e cofatores, foram restringidos. Na segunda, com duração de 2 ns, o movimento foi restringido apenas para os átomos (exceto os de hidrogênio) da proteína. Na última, com duração de 3 ns, todo o sistema foi deixado livre. Todas as equilibrações foram simuladas usando um intervalo de tempo de cálculo de 2 fs, com condições periódicas de fronteira, mantendo uma temperatura constante de 310 K e uma pressão de 1 atm usando o termostato e o barostato de Berendsen⁷⁶, respectivamente. As interações não-ligadas foram truncadas a uma distância de 1,2 nm. O método de PME⁷⁷ (do inglês, *Particle Mesh Ewald*), um método para calcular as energias eletrostáticas de interação em sistemas periódicos, foi utilizado para o tratamento das interações eletrostáticas de longo alcance, adotando-se um espaçamento de grade de 0,16 nm e uma ordem de interpolação de 4. Finalmente, foram realizadas três simulações independentes de dinâmica molecular para cada sistema. Cada simulação teve duração de 200 ns, mantendo as condições NPT das equilibrações e mudando o barostato para o de Parrinello-Rahman.⁷⁸

3.6 Clusters e interações com a água

As interações entre as moléculas de água, proteína, e ligante foram calculadas usando a biblioteca MDAnalysis⁷⁹ e a linguagem de programação Python. Foi definido um ângulo máximo de 130° e um raio entre doador e acceptor de no máximo 3,6 Å. Foram feitos cálculos para interações de ordem 1, 2 e 3, ou seja, para interações entre a proteína e o ligante mediadas por 1, 2 ou 3 moléculas de água. Os sítios nos quais as águas se posicionam por longos períodos de tempo (sítios de águas), foram calculados usando o método de *cluster* de posições do programa WATCLUST⁸⁰ com os parâmetros padrão.

4 Resultados e discussão

4.1 Seleção das estruturas

A partir das buscas de estruturas de α/β -tubulina no PDB usando diferentes palavras-chave, foram obtidas estruturas com diferentes ligantes no domínio da colchicina. No total foram selecionadas 5 estruturas de $\alpha\beta_{\text{IIB}}$ -tubulina (tabela 5), contendo ligantes de interesse (figura 10). Destas estruturas, quatro foram selecionadas devido à similaridade entre os ligantes e a série de compostos estudada (figuras 10A, 10C, 10D e 10E). A estrutura que contém a plinabulina (figura 10B) foi usada para comparação porque este composto é o único para o qual há uma estrutura disponível também para a $\alpha\beta_{\text{III}}$ -tubulina.

Tabela 5. Estruturas de $\alpha\beta_{\text{IIB}}$ -tubulina selecionadas.

PDB ID	Organismo	Cristalização	Resolução (Å)	Ligante
5EYP	<i>Ovis aries</i>	DARPIN	1,90	Colchicina
1SA1	<i>Bos taurus</i>	Stathmin	4,20	Podofilotoxina
5XLT	<i>Bos taurus</i>	Stathmin	2,81	4'-demetilepipodofilotoxina
5JCB	<i>Sus scrofa</i>	Stathmin	2,30	4 β -(1,2,4-triazol-3-iltio)-4-deoxipodofilotoxina
6S8K	<i>Bos taurus</i>	DARPIN	1,52	Plinabulina

Fonte: Elaborada pelo autor.

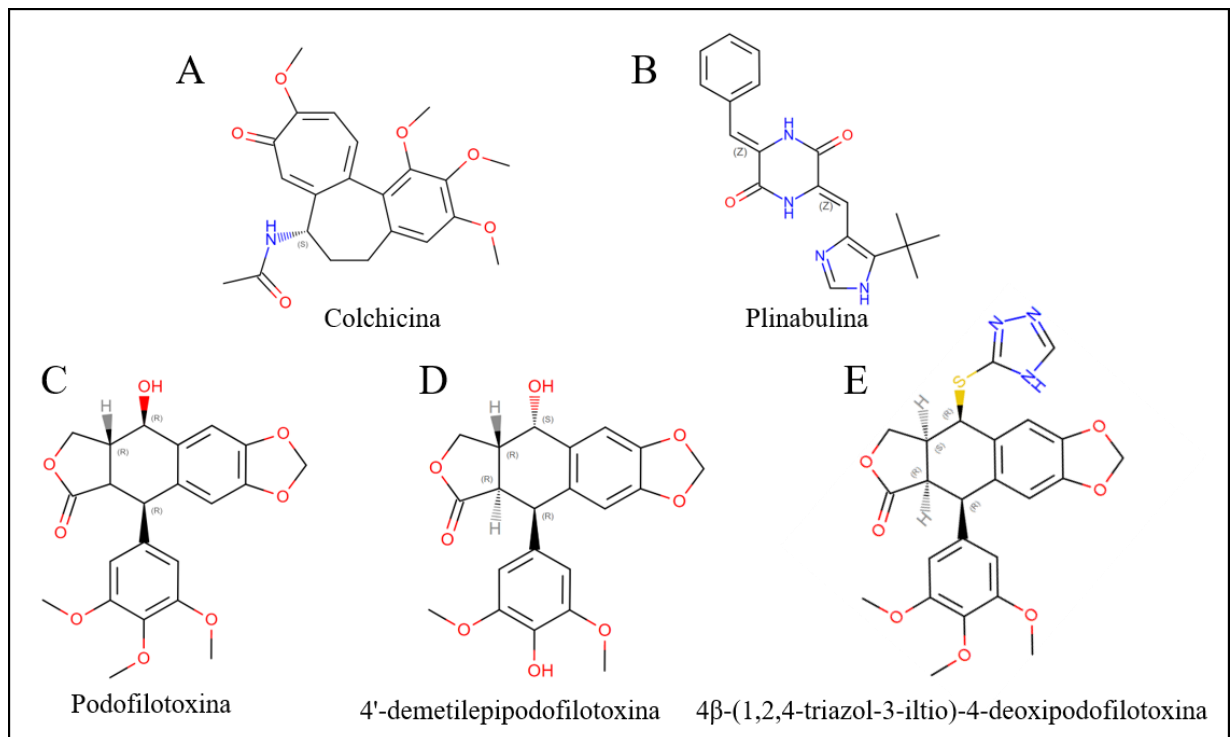


Figura 10. Moléculas ligadas nas estruturas de $\alpha\beta_{\text{IIB}}$ -tubulina selecionadas.

Fonte: Elaborada pelo autor com imagens do PDB.

Em todos os casos as estruturas estão em complexo com os cofatores GTP e GDP nos monômeros α_I e β_{IIB} , respectivamente. Só a estrutura 1SA1 contém o monômero da isoforma α_{ID} , enquanto as restantes contêm o monômero da isoforma α_{IB} . A isoforma β_{IIB} do monômero β é comum a todas as estruturas. As sequências foram isoladas de três organismos diferentes: *Ovis aries*, *Bos taurus* e *Sus scrofa*. Um alinhamento das sequências dos diferentes organismos foi realizado para cada um dos monômeros usando o Clustal Ômega.⁴⁷ Com isso foi possível avaliar e comparar a identidade em relação às sequências de *Homo sapiens*. Os resultados dos alinhamentos para as isoformas α são representados na figura 11.



Figura 11. Alinhamentos para as isoformas α . A) Alinhamento das sequências da isoforma α_{IB} de *Homo sapiens*, *Bos taurus* e *Sus scrofa*. B) Alinhamento das sequências da isoforma α_{IB} de *Homo sapiens* e *Ovis aries*. C) Alinhamento das sequências da isoforma α_{IB} de *Homo sapiens* e da isoforma α_{ID} de *Bos taurus*. D) Alinhamento das sequências da isoforma α_{IB} de *Ovis aries* e da isoforma α_{ID} de *Bos taurus*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

As sequências dos resíduos foram obtidas do UniProt,⁴⁴ com os códigos P68363 para a isoforma α_{IB} de *Homo sapiens*, P81947 para α_{IB} de *Bos taurus*, Q2XVP4 para α_{IB} de *Sus scrofa*, D0VWZ0 para α_{IB} de *Ovis aries* e Q2HJ86 para α_{ID} de *Bos taurus*. Como pode ser observado na figura 11A a identidade das sequências de resíduos da isoforma α_{IB} entre os organismos *Homo sapiens*, *Bos taurus* e *Sus scrofa* é de 100%. No caso das sequências da isoforma α_{IB} de *Homo sapiens* e *Ovis aries* se tem uma identidade de 99,6%, devido às mutações dos aminoácidos nas posições 232 (Ser232AGly) e 340 (Ser340AThr), como assinalado na figura 11B. Essas mutações não estão no *loop* L5 que faz parte do domínio de ligação da colchicina, o que nos permite usar qualquer uma das duas estruturas nas nossas análises. Neste caso, a identidade é de 99,6%. A identidade entre a isoforma α_{IB} de *Homo sapiens* e a α_{ID} de *Bos taurus* é de 98,4% (figura 11C). Neste caso, nenhuma das 7 mutações está no *loop* L5. Duas delas se encontram no *loop* final que não faz parte da estrutura cristalográfica, além disso, há um ácido glutâmico adicional na posição 248 do *loop*. Finalmente, a identidade entre a isoforma α_{IB} de *Ovis aries* e a α_{ID} de *Bos taurus* é de 98,7% (figura 11D). Os alinhamentos das isoformas β estão representados na figura 12.

HsB2B	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDQLQLERINIVVYNEATGNKYV	60	HsB2B	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDQLQLERINIVVYNEATGNKYV	60	
OaB2B	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDQLQLERINIVVYNEATGNKYV	60	SsB2B	MREIVHIQAGQCGNQIGAKFWEVISDEHGIDPTGSYHGSDQLQLERINIVVYNEAAGNKYV	60	

HsB2B	PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNIAKGHYTEGAEELVDVSLDW	120	HsB2B	PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNIAKGHYTEGAEELVDVSLDW	120	
OaB2B	PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNIAKGHYTEGAEELVDVSLDW	120	SsB2B	PRAILVDLEPGTMDSVRSGPFGQIFRPDNFVFGQSGAGNNIAKGHYTEGAEELVDVSLDW	120	

HsB2B	RKESESCDCQLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPRIMNTFSVMPSPKVSOTW	180	HsB2B	RKESESCDCQLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPRIMNTFSVMPSPKVSOTW	180	
OaB2B	RKESESCDCQLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPRIMNTFSVMPSPKVSOTW	180	SsB2B	RKESESCDCQLQGFQLTHSLGGGTGSGMGTLLISKIREEYPRIMNTFSVMPSPKVSOTW	180	

HsB2B	EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRLLKLTPTPYGDLNHLVSAHSGVTTCL	240	HsB2B	EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRLLKLTPTPYGDLNHLVSAHSGVTTCL	240	
OaB2B	EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRLLKLTPTPYGDLNHLVSAHSGVTTCL	240	SsB2B	EPYNATLSVHQLVENTDETYCIDNEALYDICFRLLKLTPTPYGDLNHLVSAHSGVTTCL	240	

HsB2B	RFPGQLNADLRKLVAVNVPFRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDKNNIM	300	HsB2B	RFPGQLNADLRKLVAVNVPFRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDKNNIM	300	
OaB2B	RFPGQLNADLRKLVAVNVPFRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDKNNIM	300	SsB2B	RFPGQLNADLRKLVAVNVPFRLHFFMPGFAPLTSRGSQQYRALTVPELTQQMFDKNNIM	300	

HsB2B	AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQHLNVQNKSSYFVEIIPNNVKTAVCDIPPRG	360	HsB2B	AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQHLNVQNKSSYFVEIIPNNVKTAVCDIPPRG	360	
OaB2B	AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQHLNVQNKSSYFVEIIPNNVKTAVCDIPPRG	360	SsB2B	AACDPRHGRYLTVAAVFRGRMSMKEVDEQHLNVQNKSSYFVEIIPNNVKTAVCDIPPRG	360	

HsB2B	LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFKFLHMYTGGMDNEFTEAESNMNDLVS	420	HsB2B	LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFKFLHMYTGGMDNEFTEAESNMNDLVS	420	
OaB2B	LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFKFLHMYTGGMDNEFTEAESNMNDLVS	420	SsB2B	LKMSATFIGNSTAIQELFKRISEQFTAMFRKAFKFLHMYTGGMDNEFTEAESNMNDLVS	420	

HsB2B	EYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA	445	A	HsB2B	EYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA	445
OaB2B	EYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA	445		SsB2B	EYQQYQDATADEQGEFEEEEGEDEA	445

Figura 12. Alinhamentos para as isoformas β . A) Alinhamento das sequências da isoforma β_{IB} de *Homo sapiens* e *Ovis aries*. B) Alinhamento das sequências da isoforma β_{IB} de *Homo sapiens* e *Sus scrofa*.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Neste caso, os códigos das sequências foram Q9BVA1 para a isoforma β_{IB} de *Homo sapiens*, Q6B856 para β_{IB} de *Bos taurus*, D0VWY9 para β_{IB} de *Ovis aries* e P02554 para β_{IB} de *Sus scrofa*. Como no caso anterior, as sequências das isoformas β_{IB} de *Homo sapiens* e de *Bos taurus* possuem 100% de identidade e não foram representadas na figura. No caso das sequências da isoforma β_{IB} de *Homo sapiens* e *Ovis aries* encontraram-se, novamente, apenas

duas mutações: Cys201BSer e Ile316BVal (figura 12A). A identidade entre estas sequências é de 99,6%. A mutação Ile316BVal de *Ovis aries* encontra-se no domínio de ligação da colchicina, mas como essa mutação ocorre entre dois resíduos muito similares que estão na região mais profunda do sítio, não há interferência nos resultados dos cálculos de docagem molecular. No caso das simulações de DM, esse resíduo foi mutado para trabalhar com a sequência de *Homo sapiens* em todos os casos. Uma análise similar pode ser feita com a isoforma β_{IIB} de *Sus scrofa*, a qual tem 6 resíduos diferentes em relação à proteína de *Homo sapiens*, o que gera uma identidade de 98,7%. Neste caso, a mutação Ile316BVal também está presente, e nenhuma das outras mutações encontra-se no domínio de ligação. Duas mutações estão no *loop* final, o qual não faz parte da estrutura cristalográfica.

Uma vez selecionadas as estruturas cristalográficas, foram realizados os estudos de docagem molecular para os derivados da acridina.

4.2 Docagem molecular dos compostos 1a e 1b

Da série de derivados de acridina investigados no trabalho de doutorado da Dra. Luma G. Magalhães, desenvolvido no Laboratório de Química Medicinal e Computacional (LQMC-IFSC-USP),⁸¹ apenas os enantiômeros da mistura racêmica do composto **1** foram separados (figura 13). Os valores de IC₅₀ medidos para a inibição da polimerização da tubulina são apresentados na tabela 6.

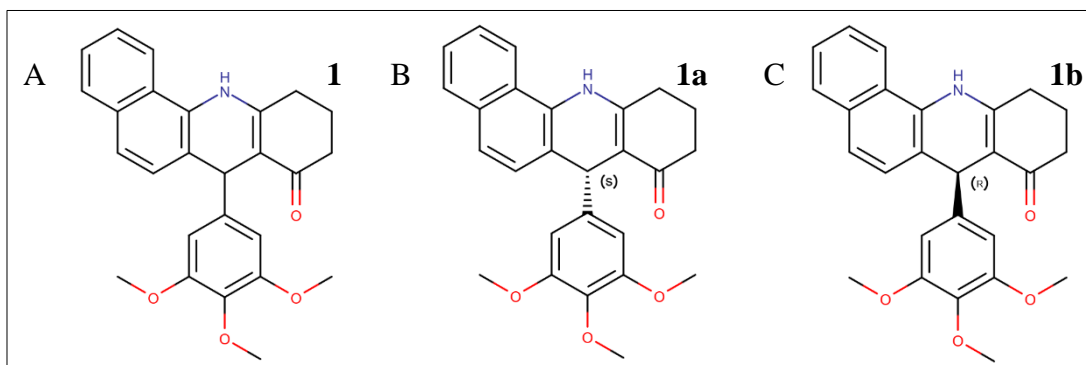


Figura 13. Derivados da acridina **1**, **1a** e **1b**. A) composto **1**, B) enantiômero *S*, **1a** e C) enantiômero *R*, **1b**.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 6. Atividade biológica dos enantiômeros **1a** e **1b**.

Composto	IC ₅₀ (μM)	
	Citotoxicidade (MDA-MB-231)	Polimerização da tubulina
1	0,12 ± 0,02	1,35 ± 0,06
1a	0,013 ± 0,003	0,78 ± 0,03
1b	6 ± 2	Inativo

Fonte: MAGALHÃES.⁸¹

Como o composto **1** é o único para o qual se tem o valor experimental de atividade biológica dos seus enantiômeros, apenas os enantiômeros **1a** e **1b** foram usados nos estudos de modelagem molecular. A primeira etapa na investigação da interação dos compostos **1a** e **1b** com o domínio de ligação da colchicina foi a realização dos estudos de docagem molecular com o programa Gold,⁵⁹ usando as três estruturas de melhor resolução e que estavam em complexo com ligantes similares ao composto **1**: 5EYP, 5XLT e 5JCB. Dentre as três estruturas da tubulina, os melhores resultados foram obtidos com a estrutura 5JCB. Esta estrutura gerou os melhores resultados quando foram usadas águas explícitas no domínio de ligação e quando não foram incluídas moléculas de água. A tabela 7 apresenta os valores de escore obtidos nestas análises.

Tabela 7. Escores obtidos com a função ChemPLP nos cálculos de docagem para os compostos **1a** e **1b**.

Composto	5JCB (sem moléculas de água)	5JCB (com moléculas de água)
1a	84,76	93,73
1b	94,89	97,28

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os modos de ligação preditos para os compostos **1a** e **1b** podem ser observados na figura 14A. Na figura 14B, também é apresentado, para fins de comparação, o composto cristalográfico 4 β -(1,2,4-triazol-3-iltio)-4-deoxipodofilotoxina (*d*-podofilotoxina).

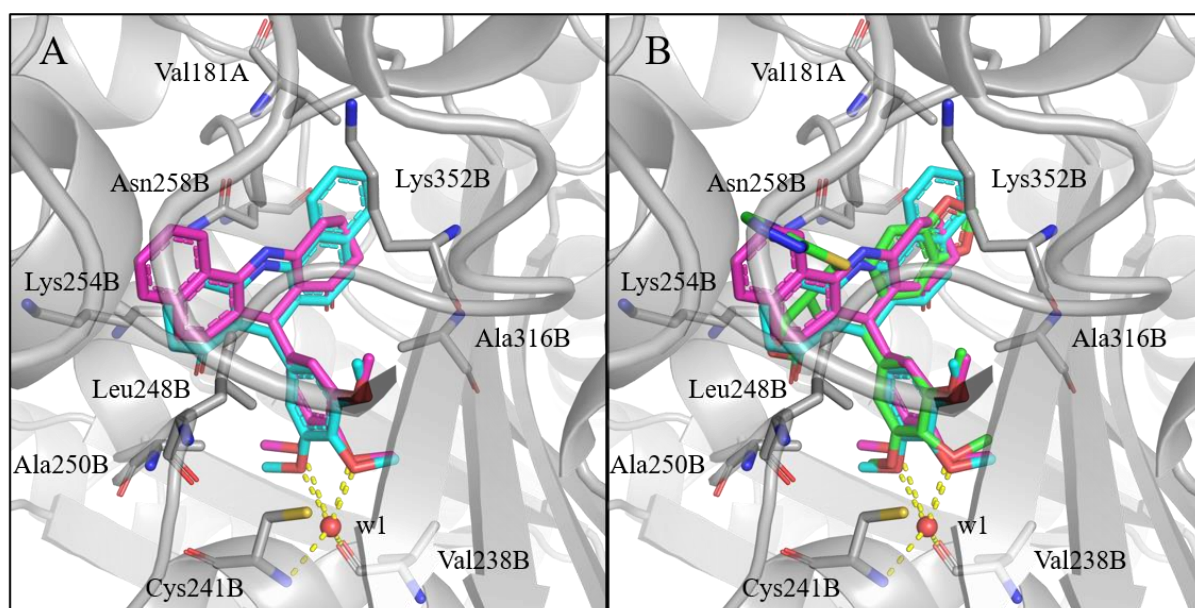


Figura 14. Configurações de melhor escore na docagem dos compostos **1a** e **1b**. A) Composto **1a** (ciano) e **1b** (roxo). B) Composto **1a** (ciano), **1b** (roxo) e *d*-podofilotoxina (verde). PDB ID 5JCB.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado na figura 14, os três compostos interagem com a tubulina por meio de ligações de hidrogênio de ordem 1 mediadas pela água w1, com os resíduos Val238B e Cys241B. Adotando-se essa configuração inicial, a estabilidade dos modos de ligação preditos pela docagem molecular foi investigada empregando-se simulações de DM. Simulações dos compostos cristalográficos também foram realizadas e utilizadas como controle.

4.3 Preparação dos sistemas proteína-ligante para as simulações de DM

Para a realização das simulações de DM, foram preparados 5 sistemas de dímeros de $\alpha_{\text{IB}}\beta_{\text{IIB}}$ -tubulina humana ligados aos compostos **1a** e **1b**, colchicina, podofilotoxina e *d*-podofilotoxina. A maioria das estruturas proteicas resolvidas por difração de raios-X depositadas no PDB não contém átomos de hidrogênio explícitos devido a resolução insuficiente para a determinação das posições destes átomos. A maioria das estruturas possuem resolução ao redor de ou superior a 2 Å. Nenhuma das estruturas selecionadas neste trabalho contém átomos de hidrogênios explícitos. Também é comum que algumas estruturas não contenham algumas cadeias laterais dos resíduos mais expostos ao solvente. Resíduos completos e *loops* inteiros podem estar ausentes em algumas estruturas. Desta forma, é necessário que os sistemas a serem simulados sejam preparados antes da realização das simulações de DM. A preparação também inclui a exclusão de reagentes usados na solução de cristalização e de moléculas de água. Esses procedimentos são necessários para se evitar possíveis erros na configuração do sistema, como a inserção de íons no interior da proteína durante a etapa de equilíbrio da carga total da caixa de águas.

O programa Modeller foi usado para completar os resíduos faltantes da estrutura 5EYP e realizar as duas mutações necessárias para converter a sequência do monômero β_{IIB} de *Ovis aries* na sequência de *Homo sapiens*. No monômero α_{IB} , foram adicionados os resíduos faltantes do *loop* que se estende da Ser38A ao Asp46A. No monômero β_{IIB} , foram adicionados os resíduos faltantes do *loop* que se estende da Gly279B à Arg284B. Os *loops* finais dos dois monômeros, que possuem 15 e 14 resíduos, não foram modelados. O programa Modeller também foi usado para completar os resíduos faltantes da estrutura 5JCB. Neste caso, foram adicionados apenas três resíduos faltantes no monômero β_{IIB} : Met1B, Ala56B e Thr57B. Os *loops* finais de 12 e 16 resíduos também não foram modelados. Com a finalização destes procedimentos, completou-se a preparação das estruturas para as simulações de DM com os compostos **1a** e **1b**. Finalmente, para a simulação com a podofilotoxina no domínio da colchicina, foi gerado um modelo por homologia usando as estruturas 5EYP, 5JCB e 5XLT

como referência. A molécula de podofilotoxina foi inserida na cavidade de interação por meio de docagem molecular. A figura 15 mostra a estrutura cristalográfica da podofilotoxina sobreposta à solução resultante da docagem molecular.

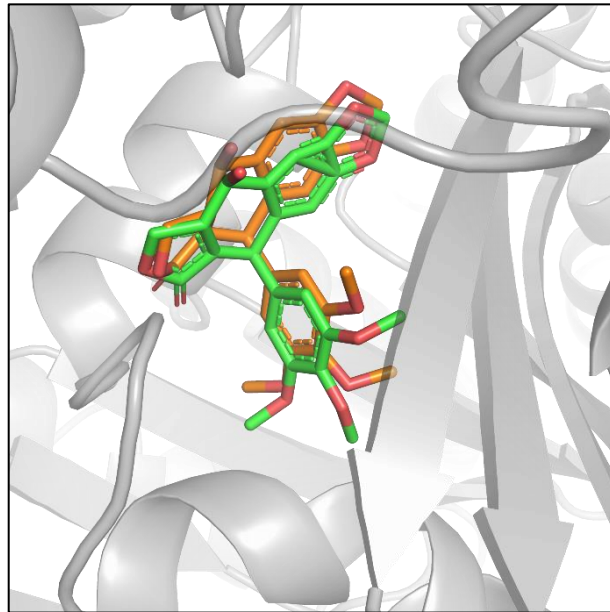


Figura 15. Comparação entre a conformação cristalográfica da podofilotoxina (verde) e a calculada pela docagem molecular (laranja). PDB ID 1SA1.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Devido à baixa resolução da estrutura 1SA1, o ligante podofilotoxina contém um erro em um dos anéis aromáticos, distorcendo a geometria esperada. Devido a esse e outros possíveis erros na estrutura proteica se decidiu gerar um modelo ao invés de se usar a estrutura cristalográfica para as simulações de DM.

Finalmente, os 5 sistemas foram preparados usando o pacote Gromacs com o protocolo descrito na metodologia. Esse protocolo inclui adição de hidrogênios, inserção do sistema proteína-ligante na caixa de águas explícitas, neutralização das cargas com a adição de íons, minimização e equilibrações. Uma vez terminados esses passos foram realizadas as simulações de DM.

4.4 Trajetórias de DM dos dímeros de $\alpha_{\text{IB}}\beta_{\text{IIB}}$ -tubulina com os compostos 1a, 1b, colchicina, podofilotoxina e *d*-podofilotoxina

Para cada simulação de DM, foram gerados 200 ns de trajetória. Foram realizados cálculos de RMSD usando o pacote Gromacs para os monômeros α_{IB} e β_{IIB} separadamente. Também foram realizados cálculos de RMSD para a posição do ligante após o alinhamento do domínio de ligação (figuras 16 a 20).

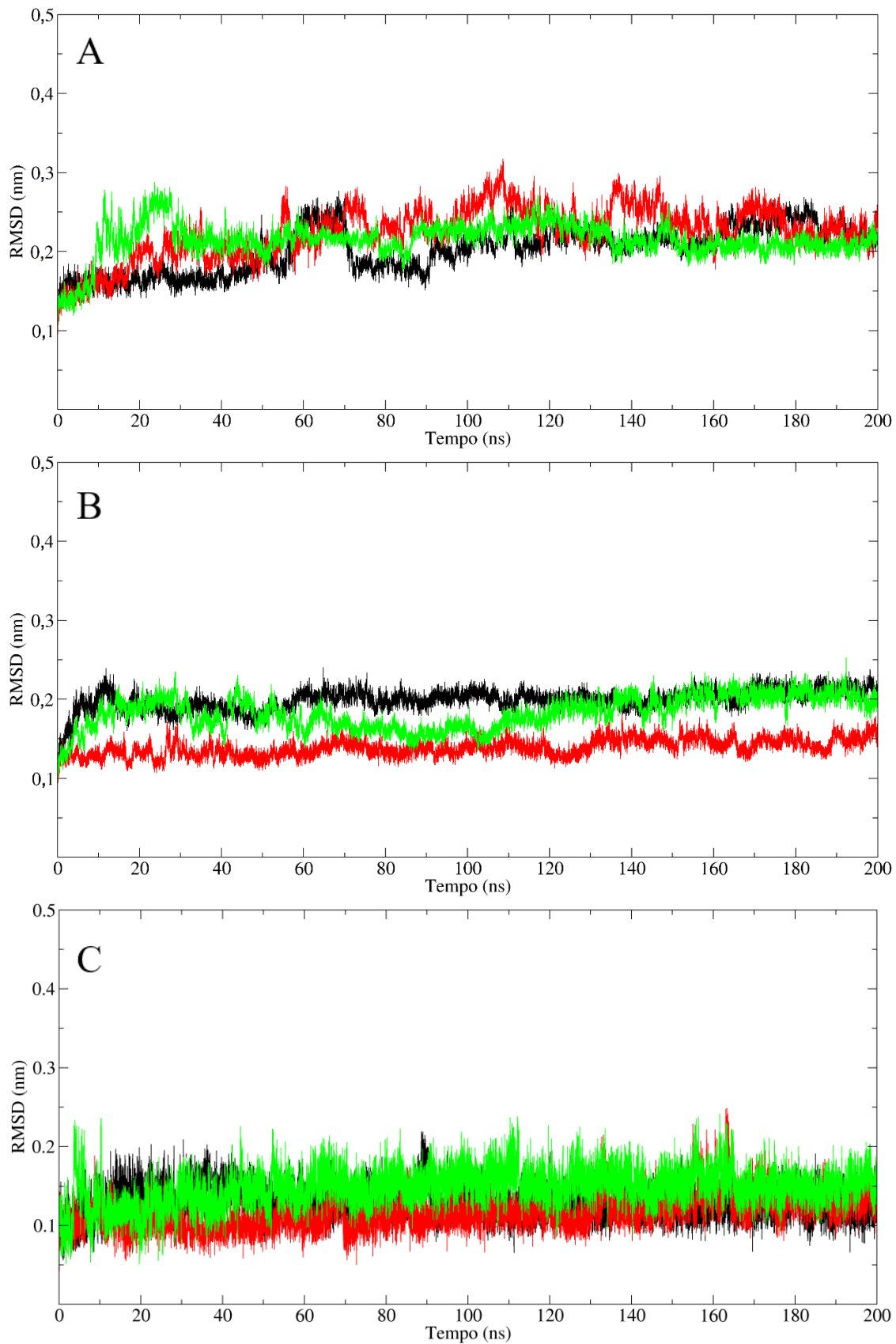


Figura 16. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante colchicina. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IIB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante colchicina em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

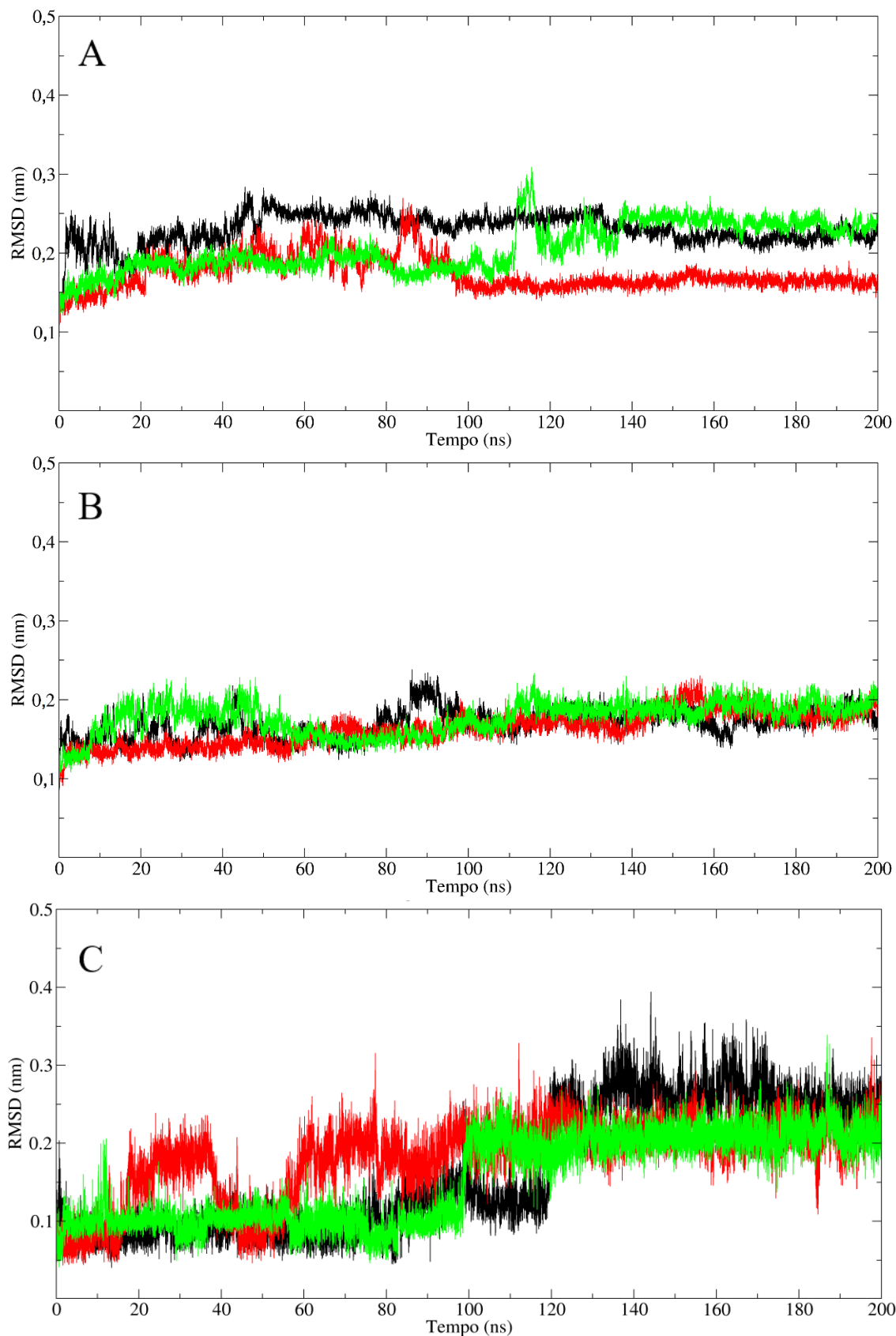


Figura 17. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IB}$ -tubulina com o ligante d-podofilotoxina. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante d-podofilotoxina em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

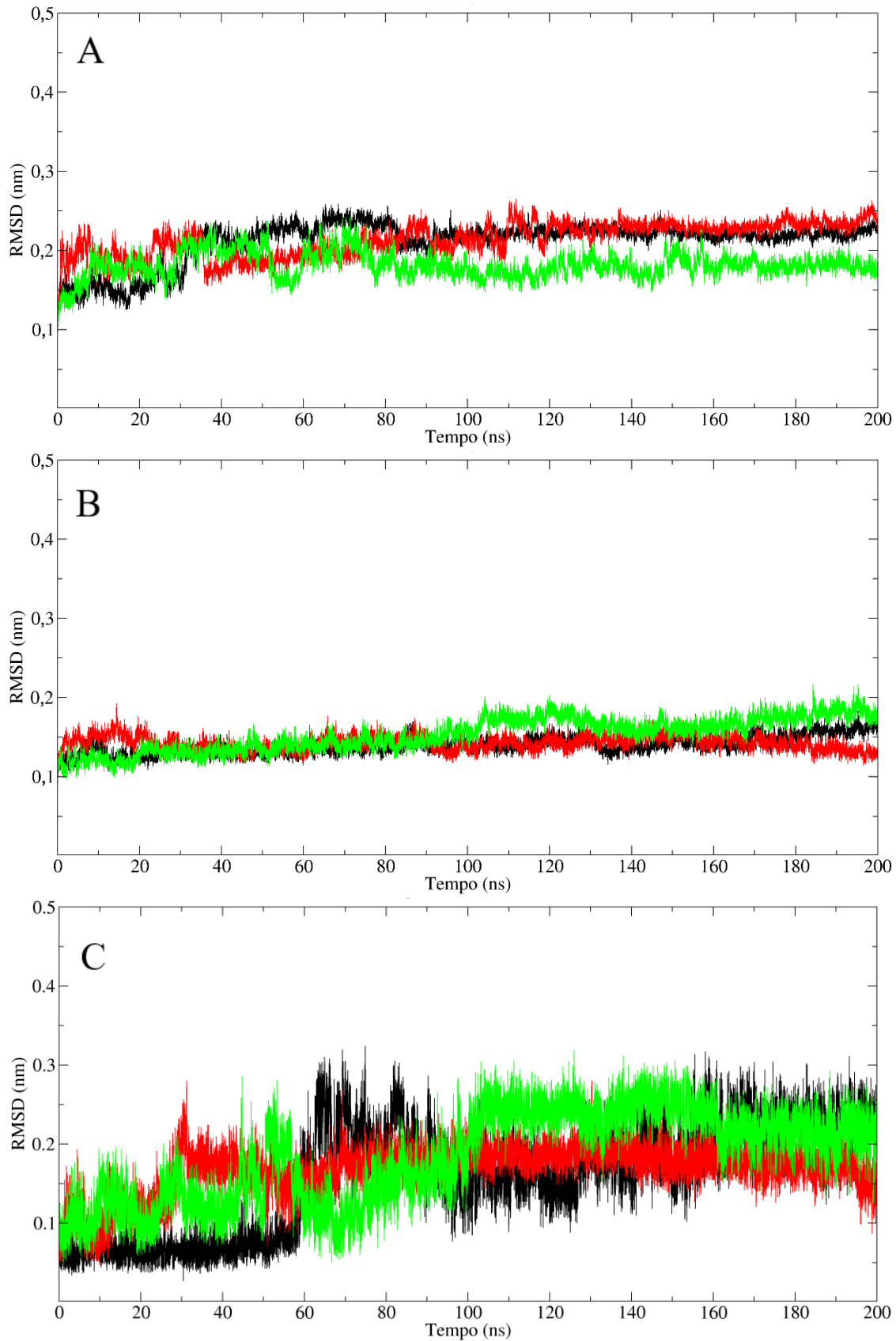


Figura 18. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IB}$ -tubulina com o ligante podofilotoxina. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante podofilotoxina em relação a sua posição inicial

Fonte: Elaborada pelo autor.

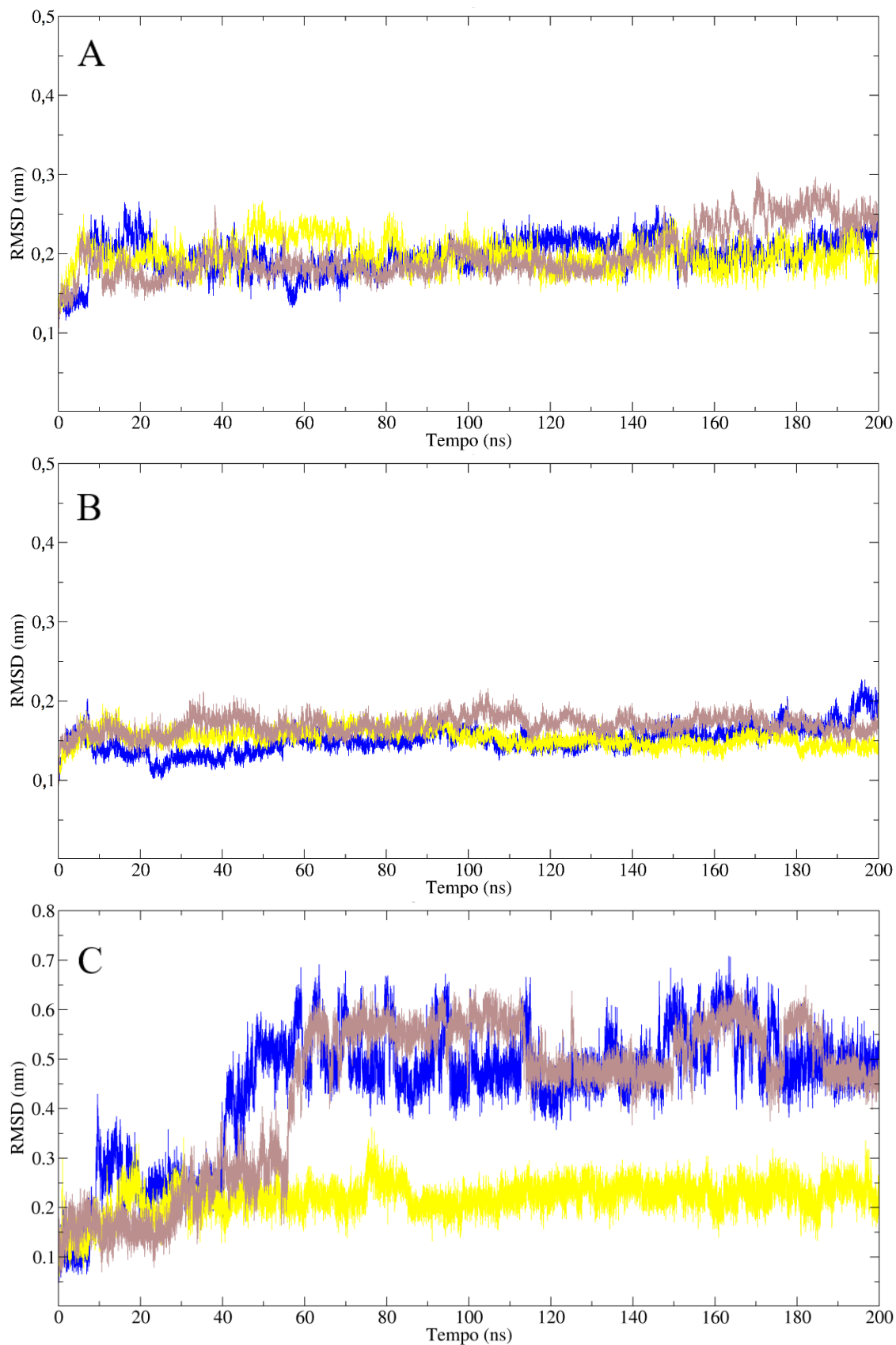


Figura 19. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante **1a**. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IIB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante **1a** em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

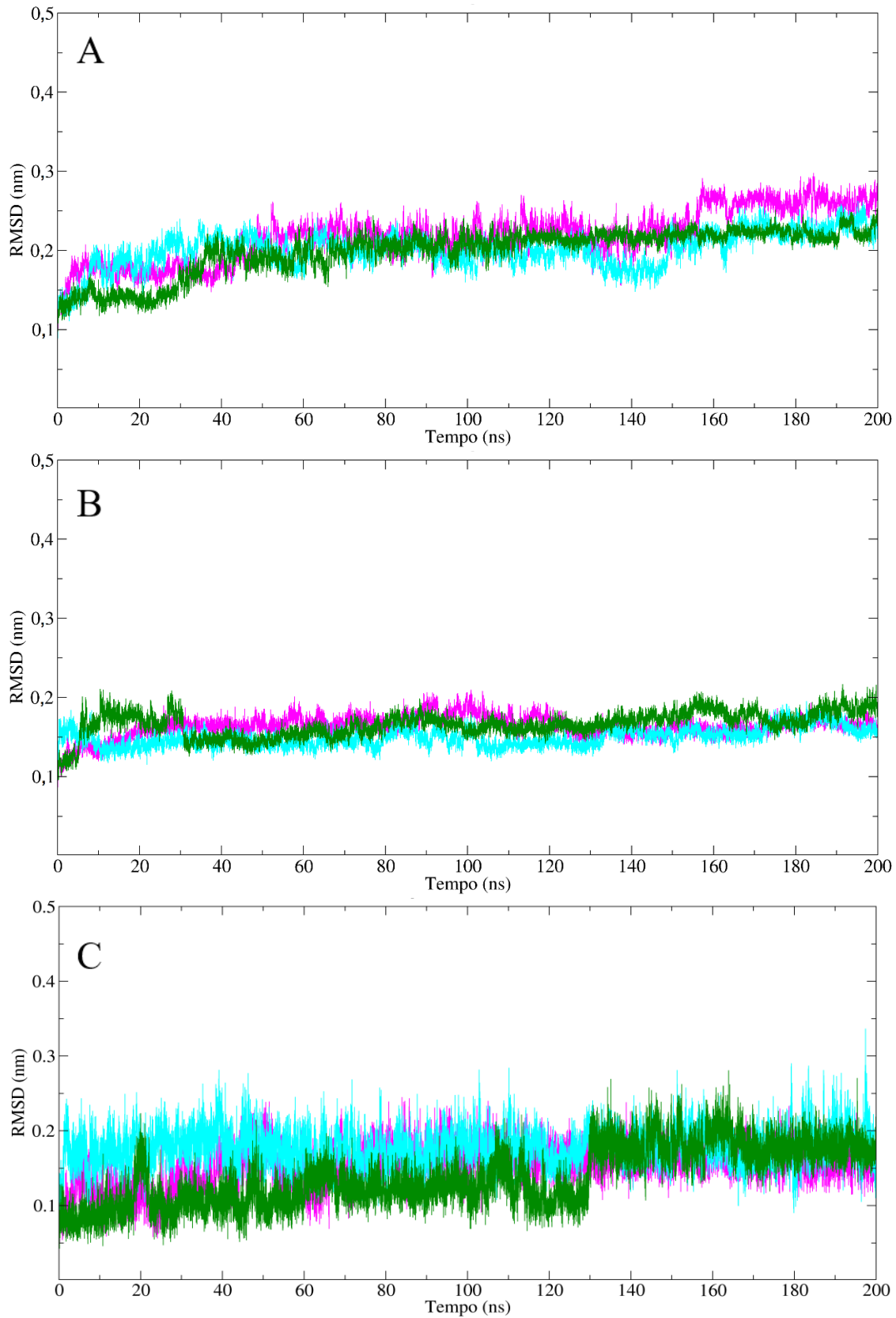


Figura 20. Trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante **1b**. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IIB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante **1b** em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nos diferentes gráficos de dinâmica molecular, a trajetória em preto representa a primeira trajetória, a vermelha a segunda, e a verde a terceira. Esse código de cores foi usado para as simulações do monômero β_{IIB} . Para os dímeros $\alpha_{\text{IB}}/\beta_{\text{IIB}}$ em complexo com o composto **1a**, foram usadas as cores azul, amarelo e rosa para a primeira, segunda e terceira dinâmica, respectivamente. Para o composto **1b**, foram empregadas as cores roxo, ciano e verde escuro para as diferentes trajetórias.

Como pode ser observado nas figuras 16 a 20, os monômeros α_{IB} e β_{IIB} não sofrem maiores deformações, sendo que os valores de RMSD após 60 ns oscilam entre 0,15 e 0,3 nm. Já a estabilização dos ligantes no sítio pode ser muito rápida como no caso da colchicina, ou levar mais de 100 ns como no caso da podofilotoxina e seu derivado. O RMSD do composto **1a** apresenta valores da ordem dos 0,5 nm para as trajetórias 1 e 3, o que significa que o composto está assumindo uma configuração muito diferente da inicial. Ou seja, esse resultado sugere que o composto **1a** não teria afinidade pelo domínio da colchicina. Para o composto **1b**, os valores de RMSD não ultrapassam 0,25 nm na maior parte do tempo. Comparando apenas o valor de RMSD do ligante com sua posição inicial, poderíamos inferir que o composto **1b** teria afinidade pelo sítio de ligação. A tabela 8 apresenta a média desses valores de RMSD em 4 faixas de tempo, em que Tt é o tempo total de 200ns, T1 é a faixa de 50 a 200 ns, T2 é o intervalo de 100 a 200 ns, e T3 é o intervalo de 180 a 200 ns.

Tabela 8. Médias dos valores de RMSD das trajetórias de DM dos compostos selecionados em diferentes intervalos de tempo.

Trajetoária	Tt [nm Δ (nm)]	T1 [nm Δ (nm)]	T2 [nm Δ (nm)]	T3 [nm Δ (nm)]
Col-B2 MD-1	0,129 (0,020)	0,127 (0,018)	0,124 (0,016)	0,123 (0,018)
Col-B2 MD-2	0,116 (0,020)	0,120 (0,020)	0,125 (0,020)	0,131 (0,015)
Col-B2 MD-3	0,147 (0,024)	0,153 (0,020)	0,154 (0,020)	0,149 (0,017)
D-Pod-B2 MD-1	0,164 (0,081)	0,190 (0,078)	0,232 (0,057)	0,247 (0,018)
D-Pod-B2 MD-2	0,181 (0,050)	0,200 (0,034)	0,213 (0,022)	0,213 (0,025)
D-Pod-B2 MD-3	0,153 (0,057)	0,171 (0,055)	0,207 (0,020)	0,215 (0,020)
Pod-B2 MD-1	0,159 (0,069)	0,190 (0,049)	0,197 (0,041)	0,230 (0,025)
Pod-B2 MD-2	0,167 (0,031)	0,177 (0,020)	0,181 (0,018)	0,169 (0,019)
Pod-B2 MD-3	0,184 (0,058)	0,205 (0,050)	0,233 (0,025)	0,215 (0,023)
1a -B2 MD-1	0,445 (0,127)	0,504 (0,058)	0,502 (0,058)	0,489 (0,030)
1a -B2 MD-2	0,220 (0,034)	0,227 (0,027)	0,230 (0,025)	0,230 (0,028)
1a -B2 MD-3	0,437 (0,153)	0,517 (0,071)	0,517 (0,055)	0,498 (0,050)
1b -B2 MD-1	0,154 (0,028)	0,162 (0,021)	0,165 (0,017)	0,160 (0,017)
1b -B2 MD-2	0,177 (0,025)	0,177 (0,024)	0,180 (0,024)	0,188 (0,029)
1b -B2 MD-3	0,138 (0,039)	0,150 (0,036)	0,163 (0,035)	0,177 (0,016)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como observado na tabela 8, o único composto que apresenta valores de RMSD superiores de 0,25 nm é a molécula **1a** nas dinâmicas 1 e 3. O resultado experimental demonstra que esse composto é ativo e a molécula **1b** é inativa. Portanto, calculou-se a conformação mais visitada pela proteína nos últimos 20 ns para observar a posição dos ligantes cristalográficos nessa faixa de tempo, como representado na figura 21.

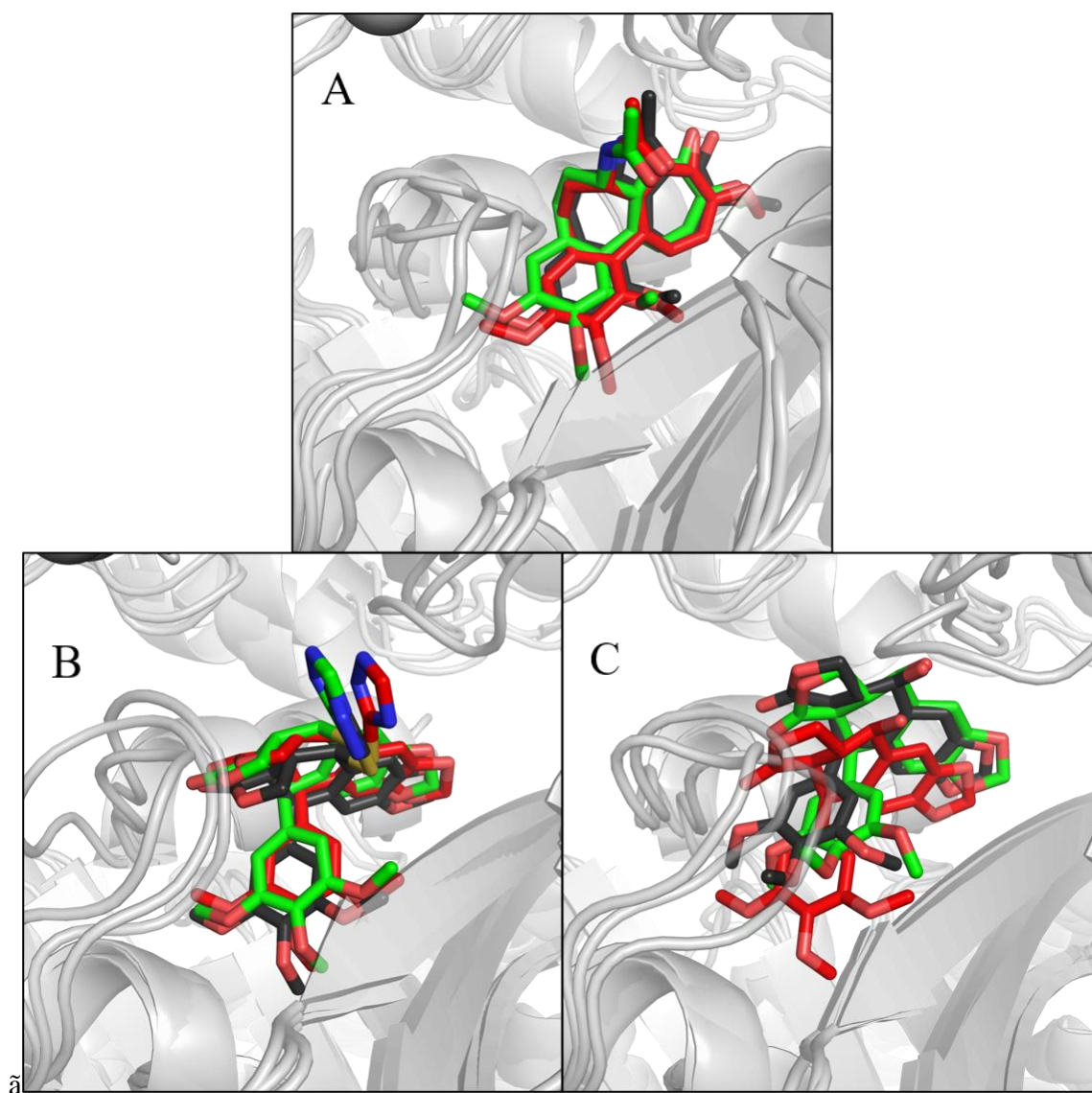


Figura 21. Conformação mais visitada da proteína ligada aos compostos colchicina, d-podofilotoxina e podofilotoxina nos últimos 20 ns de trajetória. Para todos os casos, o preto representa a trajetória 1, o vermelho representa a trajetória 2 e o verde representa a trajetória 3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 21A mostra que a colchicina se manteve em uma mesma conformação nas três dinâmicas. Esse resultado é condizente com a baixa variação dos valores de RMSD calculados para as diferentes trajetórias (0,123, 0,131 e 0,149 nm). O mesmo ocorre com o composto *d-*

podofilotoxina (figura 21B). O ligante assume conformações muito semelhantes apesar de apresentar valores de RMSD maiores do que os da colchicina (0,247, 0,213 e 0,215 nm). A podofilotoxina, por sua vez (figura 21C), ficou mais próxima da posição inicial (RMSD = 0,169 nm) na trajetória 2. Conformações similares, mas diferentes da inicial, foram observadas nas outras trajetórias (RMSD de 0,230 e 0,215 nm). Neste caso, os resultados sugerem a transição do ligante entre duas configurações possíveis no domínio de ligação. Ao observar a figura 18C e os respectivos valores de RMSD, essa configuração seria visitada entre 100 e 150 ns, e na trajetória 3, entre 60 e 100 ns. Em todos os casos, esses valores de RMSD não superam o valor de 0,250 nm e, portanto, estariam dentro do esperado ao se partir de uma configuração cristalográfica. O cálculo das conformações mais visitadas foi realizado também para as trajetórias de DM dos compostos **1a** e **1b**. Os resultados são ilustrados na figura 22.

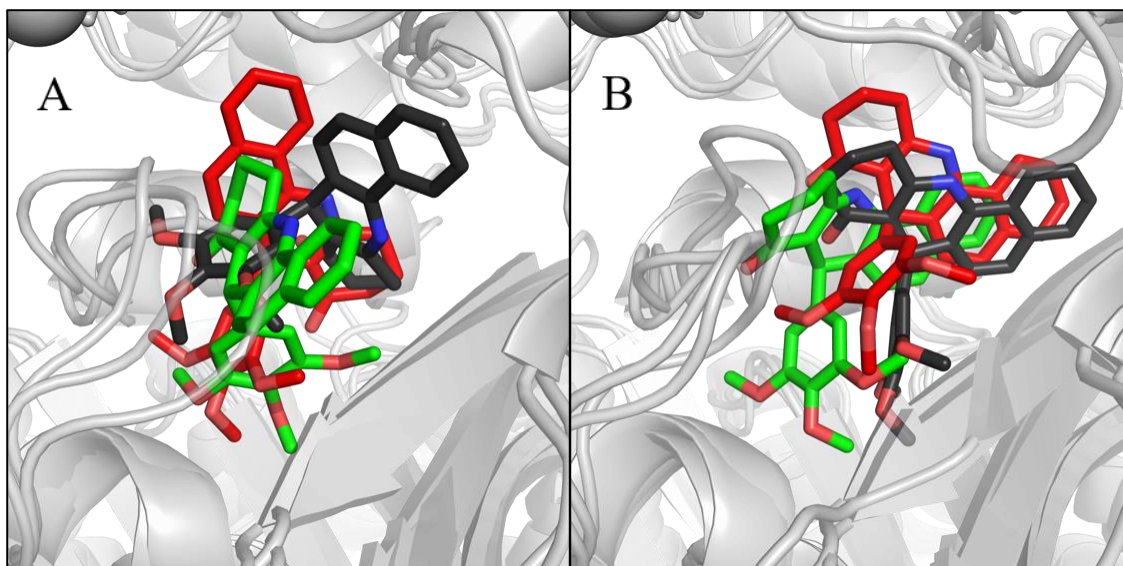


Figura 22. Conformação mais visitada da proteína ligada aos compostos **1a** e **1b** nos últimos 20 ns de trajetória. Para todos os casos, o preto representa a trajetória 1, o vermelho representa a trajetória 2 e o verde representa a trajetória 3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como esperado pelos altos valores de RMSD (0,489, 0,230 e 0,498 nm) para as trajetórias 1, 2 e 3 na figura 22A, o composto **1a** não se mantém na configuração encontrada na docagem molecular. Na figura 22B, apesar dos baixos valores de RMSD obtidos (0,160, 0,188 e 0,177 nm) para as diferentes trajetórias, as posições são bastante diversas. Os resultados sugerem que a medida do RMSD comparando a posição do ligante com sua posição inicial não seria o melhor método para determinar a estabilidade dos ligantes no domínio da colchicina. Como alternativa, calculamos o RMSD da posição do ligante em cada trajetória de DM em relação à conformação mais visitada em cada trajetória. A partir destes cálculos, geramos uma

matriz de RMSD em que a diagonal compara a posição do ligante em cada trajetória com a sua conformação mais visitada. Os valores calculados desta forma são apresentados na tabela 9.

Tabela 9. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada em cada trajetória para a isoforma β_{IIB} .

	Col-B2 MD-1	Col-B2 MD-2	Col-B2 MD-3
Col-B2 MD-1	0,072	0,099	0,108
Col-B2 MD-2	0,112	0,076	0,072
Col-B2 MD-3	0,118	0,098	0,075
	D-Pod-B2 MD-1	D-Pod-B2 MD-2	D-Pod-B2 MD-3
D-Pod-B2 MD-1	0,066	0,119	0,111
D-Pod-B2 MD-2	0,102	0,096	0,129
D-Pod-B2 MD-3	0,099	0,091	0,076
	Pod-B2 MD-1	Pod-B2 MD-2	Pod-B2 MD-3
Pod-B2 MD-1	0,070	0,238	0,081
Pod-B2 MD-2	0,225	0,059	0,231
Pod-B2 MD-3	0,128	0,193	0,089
	1a-B2 MD-1	1a-B2 MD-2	1a-B2 MD-3
1a-B2 MD-1	0,095	0,416	0,522
1a-B2 MD-2	0,437	0,103	0,507
1a-B2 MD-3	0,478	0,453	0,159
	1b-B2 MD-1	1b-B2 MD-2	1b-B2 MD-3
1b-B2 MD-1	0,077	0,252	0,304
1b-B2 MD-2	0,237	0,100	0,332
1b-B2 MD-3	0,295	0,326	0,071

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser visto no caso dos ligantes colchicina e *d*-podofilotoxina, todos os valores que comparam as posições entre elas estão bastante próximos aos da diagonal. No caso da podofilotoxina, são encontrados valores maiores, mas nenhum deles excede 0,250 nm. O composto **1a** não apresenta uma configuração estável, gerando valores que excedem 0,4 nm, que são muito distantes dos valores da diagonal. Para o composto **1b**, dos seis valores fora da diagonal, três são maiores do que 0,3 nm e dois são maiores do que 0,25 nm, o que também indica que esse composto não estaria estável no domínio de ligação.

A limitação da docagem molecular em determinar a conformação bioativa de ligantes no domínio da colchicina, devido ao seu tamanho e variabilidade das possíveis interações, foi documentada em 2016 por Wang *et. al.*⁸² Nessa publicação, os autores determinaram a estrutura cristalográfica de quatro compostos estruturalmente diversos e, em todos os casos, estudos de docagem molecular que tinham usado esses compostos não tinham sido bem-sucedidos. Com base nestes achados, foram observadas as configurações do composto **1a** nas três dinâmicas e, a partir destas, a configuração mais próxima da bioativa foi modelada.

4.5 Configuração alternativa do composto **1a** no domínio de ligação da colchicina

Considerando que a configuração bioativa do composto **1a** foi atingida nas simulações de DM, a conformação mais visitada nos últimos 20 ns de cada simulação foi analisada. Como pode ser observado na trajetória 1 (figura 22A, em preto), o anel trimetoxi saiu da região 2 do domínio de ligação e, portanto, não estaria no lugar esperado para esse grupo. Na trajetória 2, o ligante se manteve próximo da sua configuração inicial (RMSD de 0,230 nm) e, portanto, não foi considerado como assumindo uma configuração alternativa. Na trajetória 3, o grupo acridina girou dentro do domínio de ligação e o grupo fenil-trimetoxi se manteve na região esperada, como representado na figura 23A.

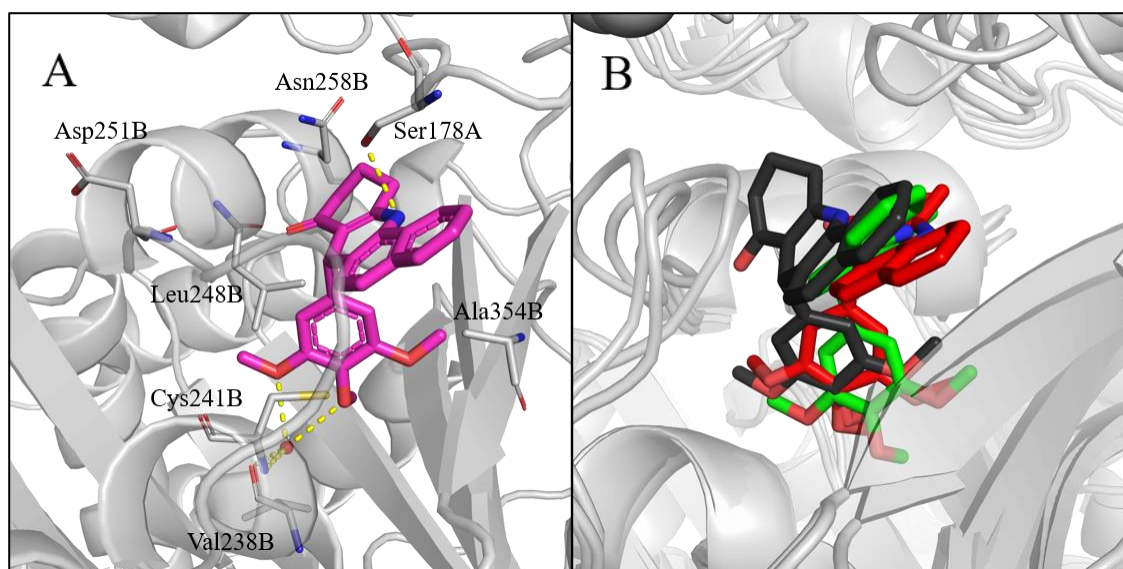


Figura 23. Posição alternativa do composto **1a**. A) nova posição do composto **1a** no domínio de ligação da colchicina. B) Conformação mais visitada da proteína em complexo com o composto **1a** na configuração alternativa. O ligante em preto representa a trajetória 1, em vermelho representa a trajetória 2, e em verde representa a trajetória 3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Nesta nova configuração, o composto **1a** apresenta uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo de Ser178A, além de formar ligações de hidrogênio mediadas por uma molécula de água com as cadeias principais da Val238B e Cys241B. Estas interações também são observadas nas estruturas com a colchicina e *d*-podofilotoxina. Portanto, três novas trajetórias de DM foram geradas para o composto **1a** nesta nova configuração repetindo-se o protocolo usado nas simulações anteriores. Os resultados são apresentados na figura 23B e na tabela 10. Na seção de anexos encontram-se os gráficos de RMSD das trajetórias.

Tabela 10. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada na trajetória da isoforma β_{IIB} ligada ao composto **1a** na configuração alternativa.

	1a-B2 MDA-1	1a-B2 MDA-2	1a-B2 MDA-3
1a-B2 MDA-1	0,110	0,229	0,237
1a-B2 MDA-2	0,201	0,115	0,138
1a-B2 MDA-3	0,240	0,140	0,136

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os resultados de RMSD apresentados na tabela 10 indicam que o ligante se manteve bastante estável no domínio de ligação, não apresentando valores de RMSD maiores do que 0,250 nm. Na trajetória 1 o ligante assumiu uma configuração mais próxima da inicial e nas outras duas, adotou outra conformação, mas ainda próxima da configuração inicial. Este protocolo de avaliação da capacidade dos compostos interagirem com o domínio da colchicina na isoforma β_{IIB} , foi adicionalmente usado para a isoforma β_{III} .

4.6 Diferenças na interação entre as isoformas β_{IIB} e β_{III} : o caso da plinabulina

A plinabulina é o único composto que possui estruturas cristalográficas em complexo com as isoformas β_{IIB} e β_{III} da tubulina. Por esta razão, esse composto foi selecionado para validar a estratégia desenvolvida. Novamente, os sistemas para cada isoforma foram preparados e três simulações de DM calculadas. Os resultados são apresentados na tabela 11 e na figura 24. Na seção de anexos encontram-se os gráficos de RMSD das trajetórias.

Tabela 11. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada na trajetória nas duas isoformas ligadas ao composto plinabulina.

	Pli-B2 MD-1	Pli-B2 MD-2	Pli-B2 MD-3
Pli-B2 MD-1	0,096	0,122	0,108
Pli-B2 MD-2	0,123	0,124	0,116
Pli-B2 MD-3	0,120	0,102	0,103
	Pli-B3 MD-1	Pli-B3 MD-2	Pli-B3 MD-3
Pli-B3 MD-1	0,102	0,194	0,147
Pli-B3 MD-2	0,186	0,124	0,219
Pli-B3 MD-3	0,152	0,220	0,085

Fonte: Elaborada pelo autor.

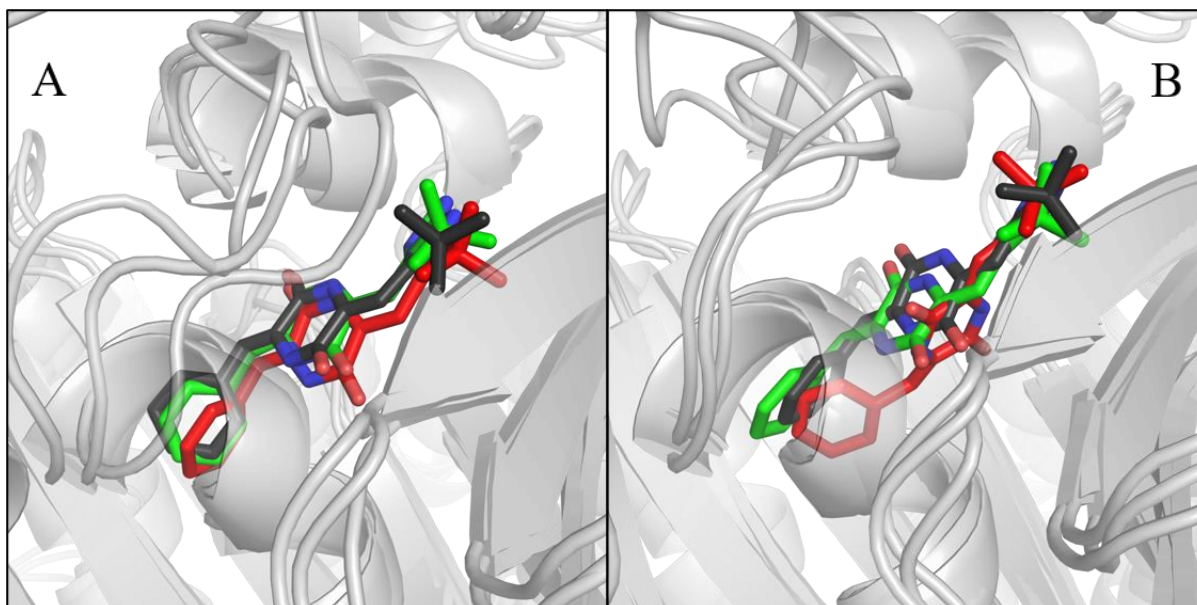


Figura 24. Conformação mais visitada nas duas isoformas da proteína ligada ao composto plinabulina nos últimos 20 ns de trajetória. O ligante em preto representa a trajetória 1, em vermelho representa a trajetória 2, e em verde representa a trajetória 3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Observa-se que os valores obtidos para a plinabulina ligada à β_{IIB} -tubulina estão próximos aos obtidos na diagonal, assim como os valores obtidos para a colchicina e a *d*-podofilotoxina. No caso do isômero β_{III} -tubulina, os valores são um pouco maiores, o que pode ser explicado pela menor afinidade do ligante. No entanto, apenas dois deles são maiores do que 0,2 nm e nenhum é maior do que 0,25 nm. Esses resultados indicam que o protocolo é útil para testar compostos na isoforma β_{III} , à medida que se modelou dímeros $\alpha_{\text{IB}}/\beta_{\text{III}}$ em complexo com compostos estudados anteriormente, além do composto **1a**.

4.7 Trajetórias de DM dos dímeros de $\alpha_{\text{IB}}\beta_{\text{III}}$ -tubulina com o composto **1a**, colchicina, podofilotoxina, e *d*-podofilotoxina

Seguindo a mesma estratégia, três simulações de DM foram realizadas para cada sistema proteína-ligante. Os resultados são apresentados na figura 25 e na tabela 12. Na seção de anexos encontram-se os gráficos de RMSD das trajetórias.

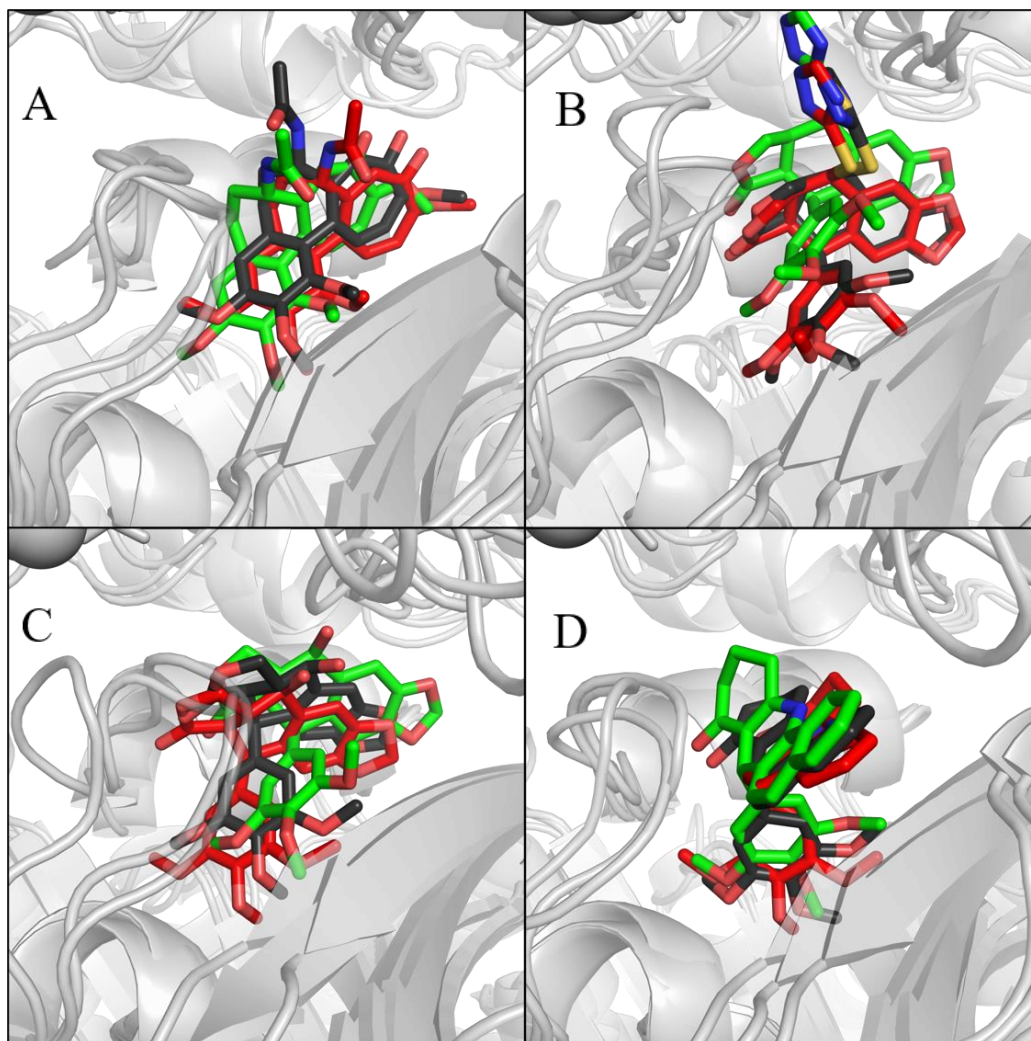


Figura 25. Conformação mais visitada da proteína ligada aos compostos colchicina, d-podofilotoxina, podofilotoxina e **1a** nos últimos 20 ns de trajetória. O ligante em preto representa a trajetória 1, em vermelho representa a trajetória 2, e em verde representa a trajetória 3.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 12. Matriz de RMSD comparada à configuração mais visitada de cada trajetória para a isoforma β_{III} .

	Col-B3 MD-1	Col-B3 MD-2	Col-B3 MD-3
Col-B3 MD-1	0,113	0,095	0,185
Col-B3 MD-2	0,171	0,069	0,228
Col-B3 MD-3	0,153	0,184	0,088
	D-Pod-B3 MD-1	D-Pod-B3 MD-2	D-Pod-B3 MD-3
D-Pod-B3 MD-1	0,089	0,109	0,248
D-Pod-B3 MD-2	0,131	0,073	0,217
D-Pod-B3 MD-3	0,211	0,209	0,101
	Pod-B3 MD-1	Pod-B3 MD-2	Pod-B3 MD-3
Pod-B3 MD-1	0,096	0,128	0,192
Pod-B3 MD-2	0,141	0,073	0,245
Pod-B3 MD-3	0,212	0,270	0,089
	1a -B3 MD-1	1a -B3 MD-2	1a -B3 MD-3
1a -B3 MD-1	0,107	0,123	0,166
1a -B3 MD-2	0,130	0,128	0,181
1a -B3 MD-3	0,132	0,199	0,101

Fonte: Elaborada pelo autor.

Como pode ser observado, os compostos cristalográficos apresentam maiores valores de RMSD, o que provavelmente se deve à sua menor afinidade pelo domínio da colchicina na isoforma β_{III} . Mas no caso particular do composto **1a**, esses valores são menores do que aqueles obtidos para a isoforma β_{IIB} , o que sugere que esse composto possui afinidade similar ou maior pelo domínio de ligação da isoforma β_{III} . Esse resultado é condizente com resultados publicados na tese da Dra. Luma G. Magalhães. Quando a mistura racêmica do composto **1a** foi testada, não foram observadas diferenças significativas na inibição da divisão celular de células que expressam majoritariamente as isoformas β_{IIB} ou β_{III} .

4.8 Rede de águas no domínio de ligação da colchicina

A colchicina foi a primeira molécula que interage com a tubulina a ser descoberta, o que fez a colchicina ser o primeiro ligante da tubulina a ser descoberto, o que fez com que o domínio de ligação levasse seu nome, e sua atividade de inibição da polimerização dos microtúbulos fosse amplamente estudada. A caracterização da interação colchicina-tubulina tem destacado, principalmente, as interações hidrofóbicas entre a proteína e o ligante. No entanto, as moléculas de água do sítio de ligação têm se mostrado muito importantes na interação proteína-ligante. Buscas avançadas no PDB com os termos “ β -tubulin” e o código LOC (código da colchicina no PDB) foram realizadas com o intuito de se caracterizar redes de águas no domínio de ligação da colchicina. Foram encontradas 12 estruturas com resoluções entre 1,9 e 3,8 Å. Destas, apenas as estruturas com resolução menor do que 2,5 Å foram selecionadas. Este valor de corte foi adotado para que estruturas com o maior número de moléculas de água cristalográficas fossem selecionadas. Quatro estruturas, todas com a mesma sequência de aminoácidos, foram selecionadas: 5EYP (1,9 Å), 5NM5 (2,05 Å), 5ITZ (2,2 Å) e 4O2B (2,3 Å). A estrutura 5NM5 apresenta poucas moléculas de água, nenhuma delas no domínio de ligação da colchicina e, portanto, não foi usada. A estrutura 4O2B tem dois dímeros e ambos foram usados separadamente. Portanto, 4 dímeros foram usados nas análises das redes de moléculas de água.

O sítio de ligação da colchicina apresenta 12 moléculas de água em comum entre os dímeros, a quais intermediam interações entre a proteína e o ligante, como ilustrado na figura 26.

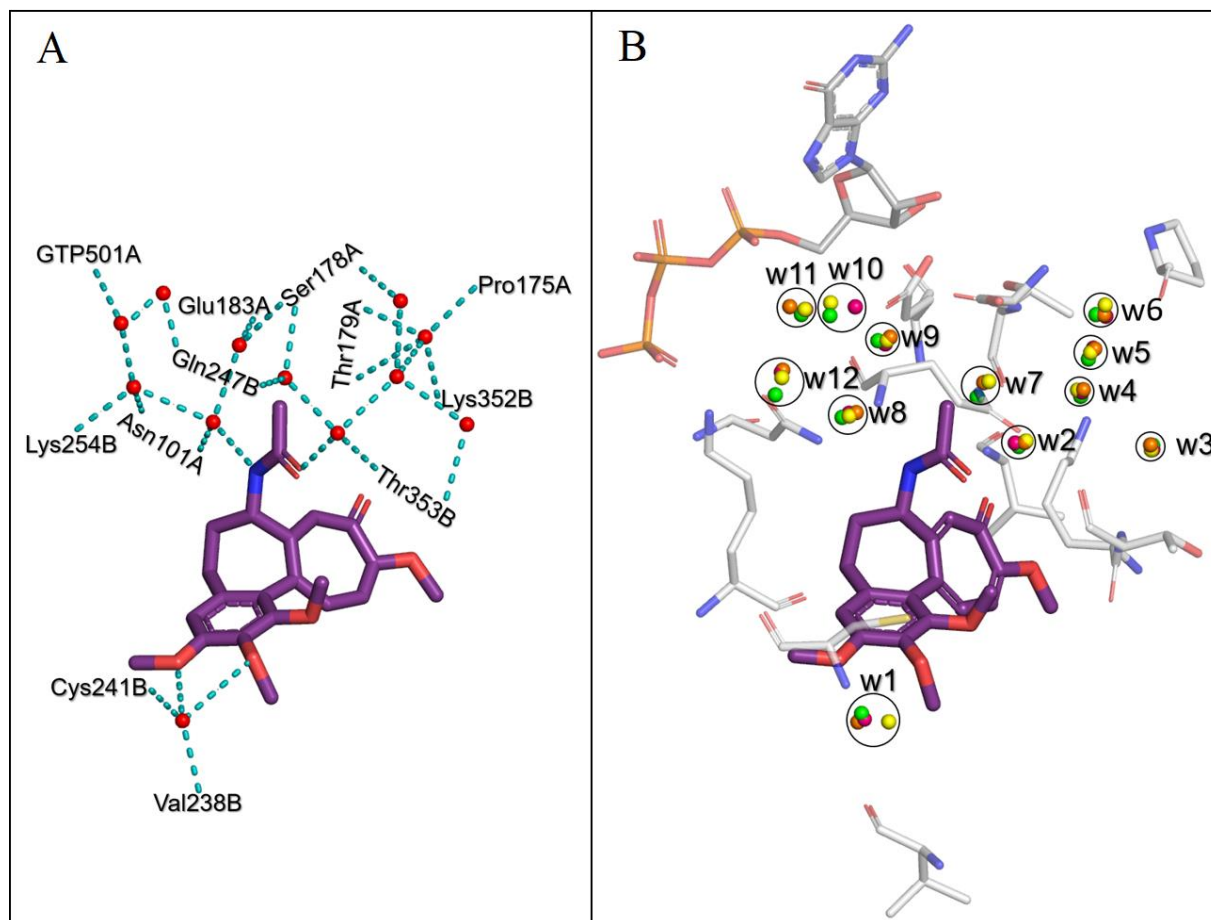


Figura 26. Rede de moléculas de água envolvidas na interação entre a colchicina e o seu domínio de ligação. (A) Águas presentes na interação da colchicina com o seu domínio de ligação, por clareza se representou apenas o nome do resíduo com sua posição na cadeia correspondente. (B) Representação por cores das águas presentes nos 4 dímeros estudados, cada cor representa um dímero diferente. Rosa para 5EYP, amarelo para 5ITZ, verde para o primeiro dímero da estrutura 4O2B e laranja para o segundo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A figura 26 mostra que apenas três moléculas de água intermedeiam interações de ordem 1 entre o ligante e a proteína: w1, w2 e w8. A molécula w1 realiza uma interação dupla entre os átomos de oxigênio dos grupos 2- e 3-metoxi da porção fenil-trimetoxi da colchicina e a amida da cadeia principal da Cys241B e a carbonila da cadeia principal da Val238B. A molécula w2 realiza uma interação entre o oxigênio da porção amida da colchicina e a carbonila da cadeia principal da Thr353B. A água w8 intermedia uma interação entre o nitrogênio da porção amida da colchicina e a amida da cadeia lateral da ASN101A. As 12 moléculas de água não estão presentes em todas as estruturas. A estrutura 5EYP não apresenta a água w12. A água w10 não está presente no segundo dímero da estrutura 4O2B.

Para se determinar se as águas ocupam posições favoráveis, foi calculado para cada dímero, o coeficiente B_{norm} a partir dos fatores de temperatura normalizados. Os resultados são apresentados na figura 27.

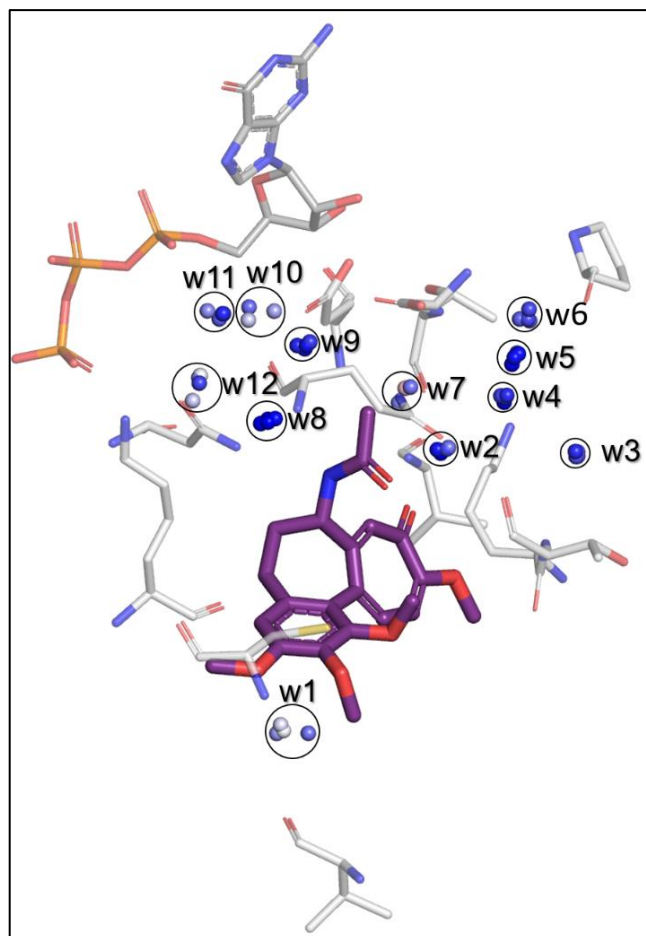


Figura 27. Favorabilidade das posições das águas estruturais. O coeficiente que determina se as moléculas de água estão em posições favoráveis, B_{norm} , é representado em escala de azul (-1, favorável) a vermelho (3, desfavorável), com o branco representando a neutralidade (1, neutro).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Todas as águas apresentam valores favoráveis de B_{norm} (abaixo de 1), com exceção das águas w7 e w10 na estrutura 5EYP (tabela 13). Os resultados indicam que existe uma rede de moléculas de água que participam da interação entre a colchicina e seu domínio na β_{II} -tubulina. Pela ausência de estruturas da β_{III} -tubulina, esse sistema foi simulado para fins de comparação.

Tabela 13. B_{norm} das águas presentes na interação da colchicina com o seu domínio.

	5EYP	5ITZ	4O2B_1	4O2B_2
w1	0,22	-0,01	0,78	0,94
w2	-0,35	0,01	-0,99	-0,75
w3	-0,59	-0,26	-0,14	-0,17
w4	-0,59	-0,36	-0,86	-0,54
w5	-0,31	-0,79	-0,92	-0,42
w6	-0,83	-0,34	-0,16	-0,11
w7	1,43	0,02	0,10	X
w8	-0,85	-1,05	-1,27	-1,02
w9	-0,46	-0,76	-0,60	-0,76
w10	1,38	-0,06	0,32	0,38
w11	0,19	-0,60	-0,16	0,11
w12	0,90	-0,36	0,61	0,21

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores de B_{norm} (tabela 13) são muito próximos entre as estruturas para a maioria das moléculas de água, com exceção das moléculas w7, w10, w11 e w12, que estão na região mais externa no domínio. O caso da água w1 é muito interessante porque ainda que ela esteja presente em todas as estruturas e no interior do domínio, os valores de B_{norm} estão na faixa da neutralidade. Este resultado indica que essa molécula não ocupa uma posição ótima.

4.9 Simulações de DM para o *cluster* de água na interação da colchicina com as duas isoformas

Como demonstrado, a colchicina é estável no domínio de ligação das duas isoformas e, portanto, é possível identificar os *clusters* de água formados nesses sítios. Para o dímero da isoforma β_{II} foram identificadas as moléculas w1, w2 e w3 (figura 28A). Um fenômeno interessante foi observado quando a colchicina estabiliza e se afasta da hélice H7. Como resultado, a água w1 não intermedia a interação de ordem 1, no entanto, a molécula w1' posiciona-se entre a colchicina e a água w1, estabelecendo uma interação de ordem dois (figuras 28B, 28C e tabela 14). Este resultado explica a razão pela qual os valores de B_{norm} da água w1 nas diferentes estruturas cristalográficas da tubulina ligada à colchicina ficaram na faixa do neutro.

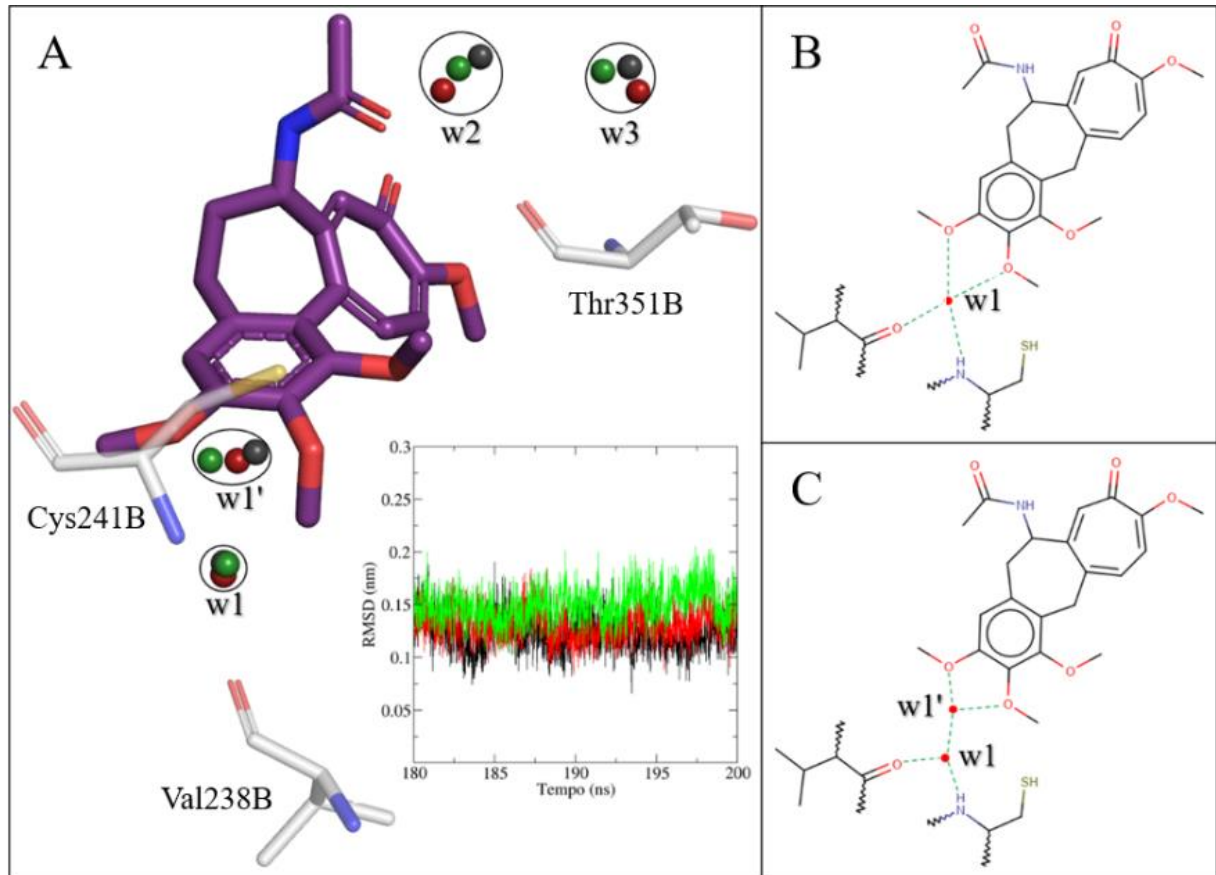


Figura 28. *Cluster* de água calculado nas trajetórias do dímero de α_{IB}/β_{IB} ligado à colchicina. A) águas encontradas no cálculo do cluster de águas. Código de cores: preto para trajetória 1, vermelho para a trajetória 2, e verde para a trajetória 3. B) interação de ordem 1 mediada pela água na estrutura cristalográfica. C) interação de ordem 2 identificada na dinâmica molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 14. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre a colchicina e os resíduos do domínio na isoforma β_{IB} .

Ordem	MD-1 (%)			MD-2 (%)			MD-3 (%)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Asn101A	94	-	94	93	-	93	-	-	-
Val238B	-	84	-	-	79	-	-	93	-
Cys241B	-	84	-	-	77	-	-	93	-
Thr353B	61	-	63	76	-	75	90	-	85

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a isoforma β_{III} , observou-se que a cadeia lateral da Ser241B pode adotar duas configurações diferentes. Quando a cadeia lateral se posiciona do lado de fora do bolsão hidrofóbico, são observadas as mesmas interações intermoleculares que ocorrem na isoforma β_{IB} . Na segunda configuração, uma interação de hidrogênio se forma entre a cadeia lateral e um dos oxigênios do anel fenil-metoxi da colchicina (figura 29 e tabela 15). A perda de interações mediadas pela água pode explicar a diminuição da atividade da colchicina quando da interação com a isoforma β_{III} em comparação com a isoforma β_{IB} .

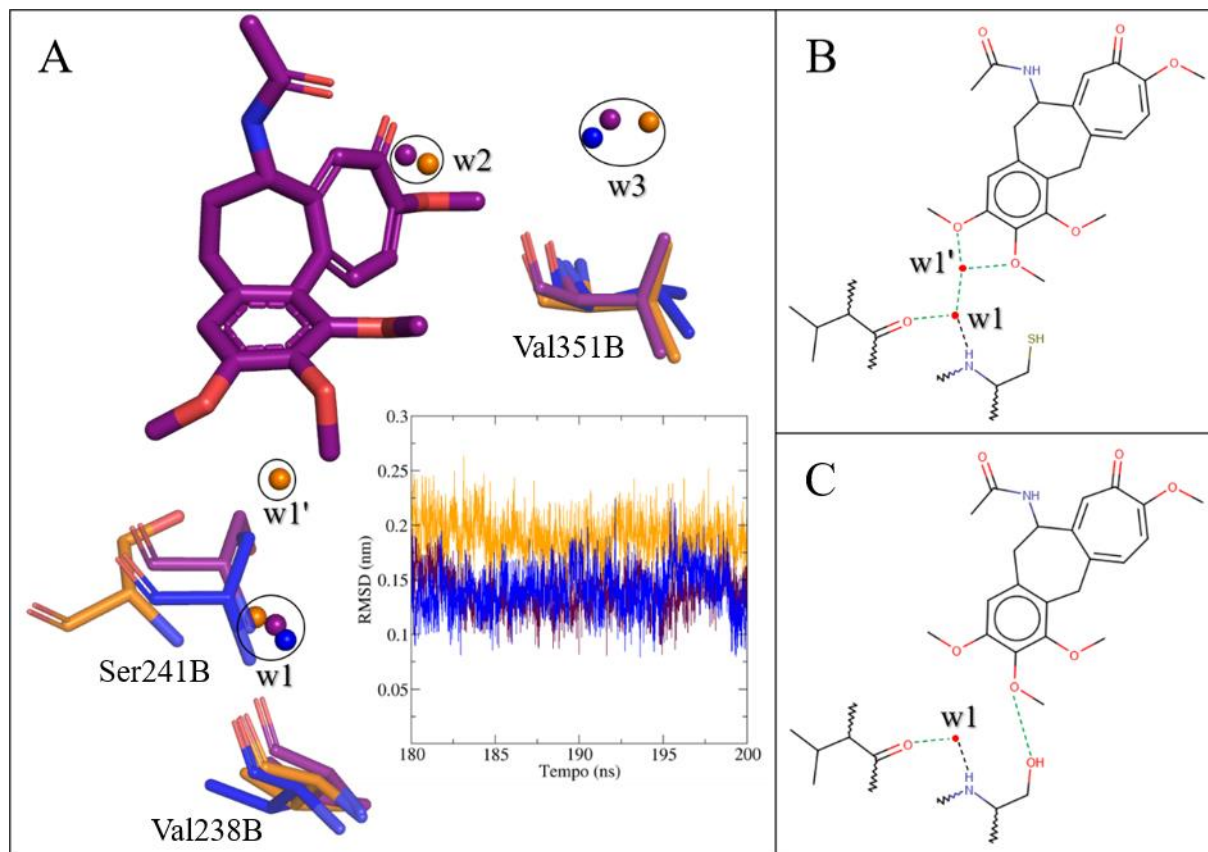


Figura 29. *Cluster* de água calculado nas trajetórias do dímero de α_{IB}/β_{III} ligado à colchicina. A) águas encontradas no cálculo do *cluster* de águas. Código de cores: roxo para trajetória 1, laranja para a trajetória 2, e azul para a trajetória 3. B) interação de ordem 1 mediada pela água na estrutura cristalográfica. C) interação de ordem 2 identificada na dinâmica molecular.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 15. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre a colchicina e os resíduos do domínio na isoforma β_{III} .

Order	DM-1 (%)			DM-2 (%)			DM-3 (%)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Asn101A	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Val238B	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ser41B	-	-	-	-	65	-	-	-	-
Val353B	36	-	40	89	-	86	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

A perda de interações mediadas pela água pode explicar a diminuição da atividade da colchicina quando ela interage com a isoforma β_{III} em comparação com a isoforma β_{IIB} .

4.10 Simulações de DM para o *cluster* de água na interação do composto 1a com as duas isoformas

O composto **1a** apresenta dois possíveis modos de interação muito similares, tanto no domínio de ligação da colchicina da isoforma β_{IIB} quanto no da β_{III} . Para a isoforma β_{IIB} , a água

w1 participa da rede de interações em ambos os modos de ligação. No primeiro modo de interação (figura 30A), a água w2 também está presente, estabelecendo uma interação de ordem 1 com o grupo amina do composto **1a** e com o resíduo Thr351B. O grupo carboxila estabelece uma interação de hidrogênio com a cadeia principal do Asp251B. No segundo modo de interação (figura 30B), a água w2 está ausente e o grupo amina forma uma interação de hidrogênio com a cadeia principal da Thr351B. Por sua vez, o grupo carboxila do composto **1a** forma uma interação de hidrogênio com o Asp251B através de uma interação de ordem 1 com a água w13.

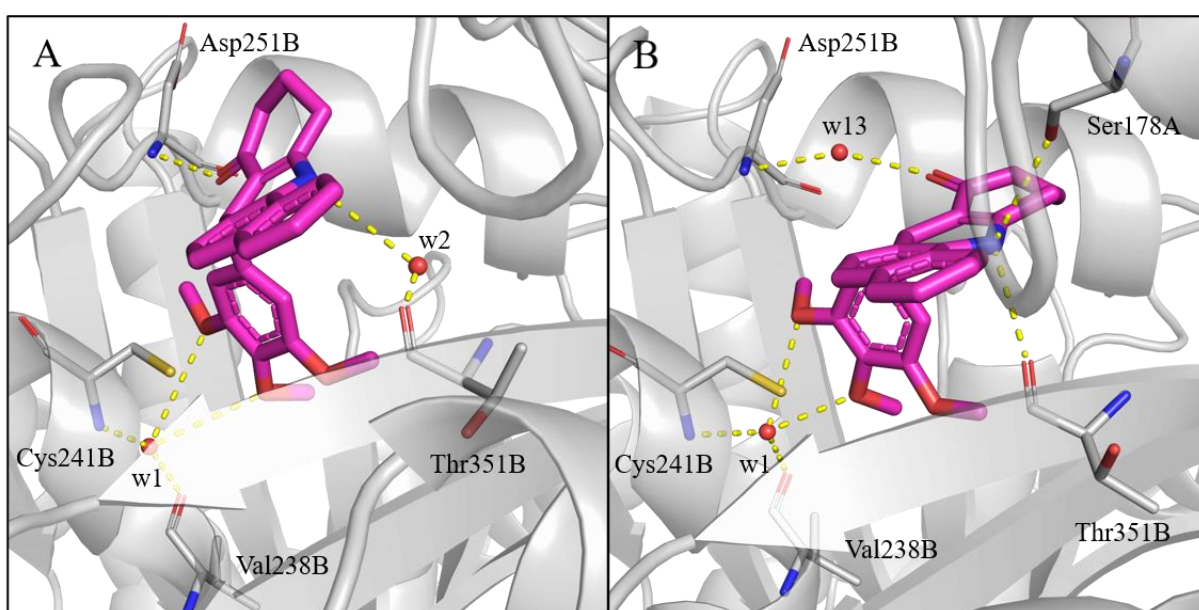


Figura 30. Duas configurações possíveis do composto **1a** no dímero de α_{1B}/β_{1B} .
Fonte: Elaborada pelo autor.

Não foram observadas interações de hidrogênio intermediadas pela molécula w2. Como observado na tabela 16, nenhuma interação com o resíduo Thr351 foi identificada. Interações envolvendo a Ser178A mediadas por moléculas de água também não foram detectadas.

Tabela 16. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre o composto **1a** e os resíduos do domínio da colchicina na isoforma β_{1B} .

	DM-1				DM-2				DM-3			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Val238B	-	80,9	-	31,9	-	92,8	-	20,8	-	84,7	-	33,5
Cys241B	-	58,4	-	-	-	87,8	-	-	-	82,4	-	-
Asp251B	85,9	-	-	-	-	85,3	-	79,9	-	84,8	-	81,0

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para a isoforma β_{III} , a análise dos *clusters* mostrou que a água w1 participa da rede de interações nos dois modos de ligação observados. Como ocorre na isoforma β_{IB} , o segundo modo de ligação envolve a molécula w13 (figura 31B). Nesta isoforma, a água w2 participa de interações nos dois modos de ligação, estabelecendo uma interação de ordem 1 entre o grupo amina do composto **1a** e a Val351B. A maior diferença entre as duas configurações ocorre na interação observada entre o grupo carboxila do composto e a cadeia principal do Asp251B. No primeiro modo de ligação (figura 31A), ocorre uma interação de hidrogênio direta entre a proteína e o ligante. No entanto, no segundo modo de ligação, esta interação de hidrogênio é mediada pela água w13.

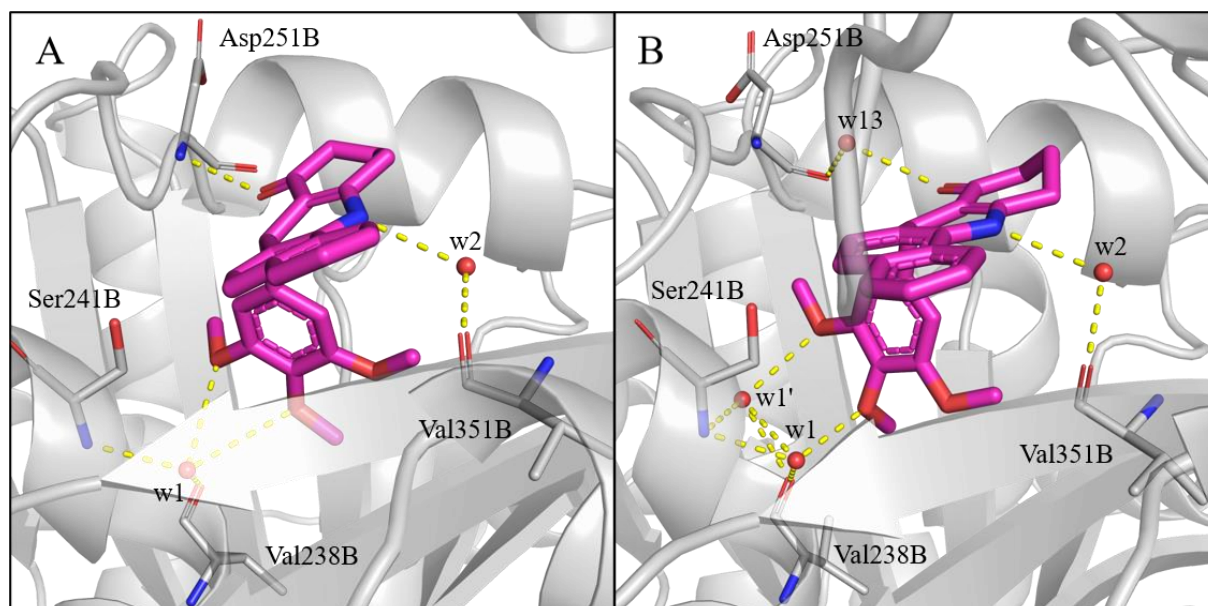


Figura 31. Duas configurações possíveis do composto **1a** no dímero de α_{IB}/β_{III} .
Fonte: Elaborada pelo autor.

As simulações de DM não detectaram a formação de interações de hidrogênio mediadas por água entre o composto e a Val351B (tabela 17). Neste caso, é observada uma interação de ordem 1 entre o composto e a Leu245B. No entanto, esta interação se mantém por curtos períodos e, desta forma, não foi detectada pela análise de *cluster*.

Tabela 17. Porcentagem de tempo em que as interações formadas pela água se mantêm entre o composto **1a** e os resíduos do domínio da colchicina na isoforma β_{III} .

Ordem	DM-1				DM-2				DM-3			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
Val238B	-	79,4	-	-	-	73,2	-	34,5	-	93,6	-	-
Ser241B	-	73,7	-	-	-	70,0	-	-	-	66,2	-	-
Leu245B	-	49,0	-	-	-	61,0	-	41,6	-	44,8	-	-
Asp251B	58,0	-	-	-	32,3	-	-	53,9	91,4	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

A partir destes resultados, é possível observar que a mutação do resíduo Cys241B nas isoforma β_{IIB} para Ser241B na isoforma β_{III} não afeta a interação mediada pela água w1 com o composto. Este fenômeno pode ser a razão pela qual a atividade deste composto seja mantida frente às duas isoformas. A partir dos resultados obtidos, propomos um protocolo para se avaliar potenciais ligantes quanto à sua capacidade de inibir a polimerização da tubulina.

4.11 Protocolo proposto

Com o intuito de se caracterizar um determinado composto como potencial ligante do domínio de ligação da colchicina e, portanto, como inibidor da polimerização da tubulina, estabelecemos o seguinte protocolo:

- i. Realizar estudos de docagem molecular usando estruturas depositadas no PDB que tenham alta resolução e diferentes inibidores ligados ao domínio de ligação da colchicina.
- ii. Selecionar os melhores resultados e realizar no mínimo três simulações de DM de 200 ns.
- iii. Usar os últimos 20 ns da trajetória para analisar a conformação mais visitada através de cálculos de *cluster* de conformação.
- iv. Comparar as conformações do composto usando o cálculo de matriz de RMSD. Caso mais da metade dos valores fiquem acima de 0,25 nm, analisar se o composto está assumindo uma nova configuração e repetir os passos ii e iii com a nova configuração. Caso não se identifique uma configuração estável, o composto é classificado como inativo.
- v. Após a identificação de uma configuração estável, investigar a existência de possíveis redes de água usando os métodos de *clustering* de moléculas de água e de identificação de interações de hidrogênio.

5 Conclusões

Nesta tese de doutorado, métodos de SBDD foram integrados para investigar os fenômenos envolvidos no reconhecimento molecular entre dímeros de tubulina e ligantes do domínio de ligação da colchicina. Aspectos essenciais da interação entre a tubulina e derivados da acridina, d-podofilotoxina, podofilotoxina e colchicina foram examinados. Os estudos de docagem molecular, dinâmica molecular e *clustering* demonstraram que, além de interações hidrofóbicas, estes inibidores da polimerização da tubulina estabelecem uma extensa rede de interações de hidrogênio com a proteína. A maioria destas interações de hidrogênio são mediadas por moléculas de água que fazem parte do domínio de ligação da colchicina, ou seja, águas estruturais. Adicionalmente, mutações no domínio de ligação da colchicina interferem de maneiras diferentes na formação das redes de água nas isoformas β_{IIB} e β_{III} . Esta interferência é crítica para ligantes seletivos para uma das isoformas, contudo, não afeta a atividade de outras moléculas, ativas contra ambas as isoformas.

Os estudos de SBDD desenvolvidos nesta tese racionalizam resultados experimentais *in vitro* obtidos previamente para os derivados da acridina. Os resultados reportados nesta tese demonstram a razão molecular pela qual o enantiômero *S* (**1a**) do derivado **1** é ativo frente à tubulina, enquanto o enantiômero *R* (**1b**) é inativo. Além disso, as redes de água formadas durante a interação entre a colchicina e a tubulina sugerem a causa da diferença de atividade desta molécula frente às isoformas β_{IIB} e β_{III} : a mutação do resíduo Cys241B na isoforma β_{IIB} para Ser241B na isoforma β_{III} . Esta mutação não interfere nas interações mediadas pelas águas estruturais para o composto **1a**, o que explica a manutenção da atividade desta molécula frente às diferentes isoformas da tubulina. A molécula de água w1 se mostrou crítica para interação do composto **1a** com ambas as isoformas.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam que o reconhecimento intermolecular entre inibidores da polimerização da tubulina e o sítio de ligação da colchicina é um fenômeno complexo. Envolve fatores como a acomodação de diferentes configurações dos ligantes no sítio, adaptação a mutações, e rearranjos de moléculas de água estruturais fundamentais para o reconhecimento molecular. Este conhecimento contribui para a descoberta de novos inibidores da polimerização da tubulina e para o avanço das pesquisas dedicadas ao desenvolvimento de novos candidatos a fármaco para o tratamento do câncer.

Referências

- 1 BINAROVÁ, P.; TUSZYNSKI, J. Tubulin: structure, functions and roles in disease. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1294, 2019. DOI:10.3390/cells8101294.
- 2 MASSAROTTI, A. *et. al.* The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. **ChemMedChem**, v. 7, n. 1, p. 33–42, 2012. DOI:10.1002/cmdc.201100361.
- 3 HUCZYŃSKI, A. *et. al.* Synthesis, antiproliferative activity and molecular docking of Colchicine derivatives. **Bioorganic Chemistry**, v. 64, p. 103–112, 2016. DOI:10.1016/j.bioorg.2016.01.002.
- 4 KUMBHAR, B. V.; BHANDARE, V. V. Exploring the interaction of Peloruside-A with drug resistant $\alpha\beta$ II and $\alpha\beta$ III tubulin isotypes in human ovarian carcinoma using a molecular modeling approach. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 39, n. 6, p. 1990–2002, 2021. DOI:10.1080/07391102.2020.1745689.
- 5 TAME, M. A. *et. al.* TUBB3 overexpression has a negligible effect on the sensitivity to taxol in cultured cell lines. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 71536–71547, 2017. DOI:10.18632/oncotarget.17740.
6. NATIONAL CANCER INSTITUTE. **What is cancer?** Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/understanding/what-is-cancer>. Acesso em: 15 julho 2021.
- 7 INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **O que é câncer?** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/o-que-e-cancer>. Acesso em: 15 julho 2021.
- 8 SUNG, H. *et. al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.71, n. 3, p. 209–249, 2021. DOI:10.3322/caac.21660.
- 9 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011. DOI:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 10 PALCHAUDHURI, R.; HERGENROTHER, P. J. DNA as a target for anticancer compounds: methods to determine the mode of binding and the mechanism of action. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 497–503, 2007. DOI:10.1016/J.COPBIO.2007.09.006.
- 11 NEIDLE, S.; PARKINSON, G. Telomere maintenance as a target for anticancer drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v 1, n.5, p. 383–393, 2002. DOI:10.1038/nrd793.
- 12 BASELGA, J.; SWAIN, S. M. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 7, p. 463–475, 2009. DOI:10.1038/nrc2656.
- 13 GAUTSCHI, O. *et. al.* Aurora kinases as anticancer drug targets. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 6, p. 1639–1648, 2008. DOI:10.1158/1078-0432.CCR-07-2179.
- 14 JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253–265, 2004. DOI:10.1038/nrc1317.

- 15 SOUSSAIN, C. *et al.* CNS complications of radiotherapy and chemotherapy. **Lancet**, v. 374, n. 9701, p. 1639–1651, 2009. DOI:10.1016/S0140-6736(09)61299-X.
- 16 LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 275–292, 2005. DOI:10.1002/path.1706.
- 17 MCLOUGHLIN, E. C.; O'BOYLE, N. M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: A review. **Pharmaceuticals**, v. 13, n. 1, p. 1–43, 2020. DOI:10.3390/ph13010008.
- 18 NOGALES, E. Structural insights into microtubule function. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 30, n. 1, p. 397–420, 2001. DOI:10.1146/annurev.biophys.30.1.397.
- 19 STEINMETZ, M. O.; PROTA, A. E. Microtubule-targeting agents: strategies to hijack the cytoskeleton. **Trends in Cell Biology**, v. 28, n. 10, p. 776–792, 2018. DOI:10.1016/j.tcb.2018.05.001.
- 20 MAJUMDAR, S.; DASTIDAR, S. G. Ligand binding swaps between soft internal modes of α,β -Tubulin and alters its accessible conformational space. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 1, p. 118–128, 2017. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b11322.
- 21 PARKER, A. L. *et al.* An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1434, 2017. DOI:10.3390/ijms18071434.
- 22 KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194–204, 2010. DOI:10.1038/nrc2803.
- 23 PAMPALONI, F.; FLORIN, E. Microtubule architecture: inspiration for novel carbon nanotube-based biomimetic materials. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 6, p. 302–310, 2008. DOI:10.1016/j.tibtech.2008.03.002.
- 24 IGAEV, M.; GRUBMÜLLER, H. Microtubule assembly governed by tubulin allosteric gain in flexibility and lattice induced fit. **eLife**, v. 7, n., p. 1–21, 2018. DOI:10.7554/elife.34353.
- 25 MCINTOSH, J. R. *et al.* Microtubules grow by the addition of bent guanosine triphosphate tubulin to the tips of curved protofilaments. **Journal of Cell Biology**, v. 217, n. 8, p. 2691–2708, 2018. DOI:10.1083/jcb.201802138.
- 26 NAWROTEK, A. *et al.* The determinants that govern microtubule assembly from the atomic structure of GTP-tubulin. **Journal of Molecular Biology**, v. 412, n. 1, p. 35–42, 2011. DOI:10.1016/j.jmb.2011.07.029.
- 27 PROTA, A. *et al.* The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 8, p. 1848–1860, 2014. DOI:10.1016/j.jmb.2014.02.005.
- 28 BROUHARD, G. J.; RICE, L. M. The contribution of $\alpha\beta$ -tubulin curvature to microtubule dynamics. **Journal of Cell Biology**, v. 207, n. 3, p. 323–334, 2014. DOI:10.1083/jcb.201407095.

- 29 BARBIER, P. *et al.* Stathmin and interfacial microtubule inhibitors recognize a naturally curved conformation of tubulin dimers. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31672–31681, 2010. DOI:10.1074/jbc.M110.141929.
- 30 KREBS, A. *et al.* Structural rearrangements in tubulin following microtubule formation. **EMBO Reports**, v. 6, n. 3, p. 227–232, 2005. DOI:10.1038/sj.embor.7400360.
- 31 ČERMÁK, V. *et al.* Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. **European Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 4, p. 151075, 2020. DOI:10.1016/j.ejcb.2020.151075.
- 32 KUMBHAR, B. V. *et al.* Exploring the origin of differential binding affinities of human tubulin isotypes $\alpha\beta$ II, $\alpha\beta$ III and $\alpha\beta$ IV for DAMA-colchicine using homology modelling, molecular docking and molecular dynamics simulations. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0156048, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0156048.
- 33 MATTHEW, S. *et al.* Gatorbulin-1, a distinct cyclodepsipeptide chemotype, targets a seventh tubulin pharmacological site. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 9, p. 1–11, 2021. DOI:10.1073/pnas.2021847118.
- 34 PANDEY, D. K.; BANIK, R. M. Optimization of extraction conditions for colchicine from *Gloriosa superba* tubers using response surface methodology. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, n. 4, p. 1301–1315, 2012. Disponivel em: http://ijat-aatsea.com/pdf/v8_n4_12_july/14_ijat_2012_8_4_devendra%20k.pdf. Acesso em: 29 setembro 2021.
- 35 CARR, A. A. Colchicine toxicity. **Archives of Internal Medicine**, v. 115, n. 1, p. 29, 1965. DOI:10.1001/archinte.1965.03860130031005.
- 36 LI, W. *et al.* Tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site: a perspective of privileged structures. **Future Medical Chemistry**, v. 9, n. 15, p. 1765–1794, 2017. DOI:10.4155/fmc-2017-0100.
- 37 MAGALHAES, L. G. *et al.* Discovery of a series of acridinones as mechanism-based tubulin assembly inhibitors with anticancer activity. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160842, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0160842.
- 38 CARUGO, O. Atomic displacement parameters in structural biology. **Amino Acids**, v. 50, n. 7, p. 775–786, 2018. DOI:10.1007/s00726-018-2574-y.
- 39 PARTHASARATHY, S.; MURTHY, M. R. N. Analysis of temperature factor distribution in high-resolution protein structures. **Protein Science**, v. 6, n. 12, p. 2561–2567, 1997. DOI:10.1002/pro.5560061208.
- 40 CARUGO, O. Correlation between occupancy and B factor of water molecules in protein crystal structures. **Protein Engineering**, v. 12, n. 12, p. 1021–1024, 1999. DOI:10.1093/protein/12.12.1021.
- 41 DARBY, J. F. *et al.* Water networks can determine the affinity of ligand binding to proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 141, n. 40, p. 15818–15826, 2019. DOI:10.1021/jacs.9b06275.
- 42 ESWAR, N. Tools for comparative protein structure modeling and analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3375–3380, 2003. DOI:10.1093/nar/gkg543.

- 43 ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779–815, 1993. DOI:10.1006/JMBI.1993.1626.
- 44 BATEMAN, A. *et.al.* UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D204–D212, 2015. DOI:10.1093/nar/gku989.
- 45 ALTSCHUL, S. *et.al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990. DOI:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- 46 DONG, S. *et. al.* A guideline for homology modeling of the proteins from newly discovered betacoronavirus, 2019 novel coronavirus (2019-nCoV). **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 9, p. 1542–1548, 2020. DOI:10.1002/jmv.25768.
- 47 SIEVERS, F. *et. al.* Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011. DOI:10.1038/msb.2011.75.
- 48 UM, S *et. al.* Homology modeling, virtual screening and dynamics study of proteins involved in Pebrine-Serine protease inhibitor 106 and spore wall protein 26. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 38, n. 17, p. 5148–5158, 2020. DOI:10.1080/07391102.2019.1696704.
- 49 LASKOWSKI, R. A *et. al.* PROCHECK: validation of protein structure coordinates. **International Tables of Crystallography**, v. F, n. 25.2, p. 722–725, 2006. DOI:10.1107/97809553602060000882.
- 50 FERREIRA, L. *et. al.* Structure-based virtual screening and biochemical evaluation for the identification of novel *Trypanosoma brucei* aldolase inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 5, p. 397–405, 2018. DOI:10.2174/1568026618666180427150428.
- 51 FERREIRA, L. G. *et. al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies, **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015. DOI:10.3390/molecules200713384.
- 52 KUNTZ, I. D. *et. al.* A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **Journal of Molecular Biology**, v. 161, n. 2, p. 269–288, 1982. DOI:10.1016/0022-2836(82)90153-X.
- 53 GRINTER, S. Z.; ZOU, X. Challenges, applications, and recent advances of protein-ligand docking in structure-based drug design. **Molecules**, v. 19, n. 7, p. 10150–10176, 2014. DOI:10.3390/molecules190710150.
- 54 MORRIS, G. M.; LIM-WILBY, M. Molecular Docking. **Methods in Molecular Biology**, v. 443, p. 365–382, 2008. DOI:10.1007/978-1-59745-177-2_19.
- 55 TAYLOR, R. D. *et. al.* A review of protein-small molecule docking methods. **Journal of Computer-Aided Molecular Design**, v. 16, n. 3, p. 151–166, 2002. DOI:10.1023/A:1020155510718.
- 56 CROSS, J. B. *et. al.* Comparison of several molecular docking programs: pose prediction and virtual screening accuracy. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 6, p. 1455–1474, 2009. DOI:10.1021/ci900056c.

- 57 DE VIVO, M. *et. al.* Role of molecular dynamics and related methods in drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4035–4061, 2016. DOI:10.1021/acs.jmedchem.5b01684.
- 58 JONES, G. *et. al.* Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation. **Journal of Molecular Biology**, v. 245, n. 1, p. 43–53, 1995. DOI:10.1016/S0022-2836(95)80037-9.
- 59 JONES, G. *et. al.* Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997. DOI:10.1006/jbmi.1996.0897.
- 60 ALLEN, M. *et.al.* Computational soft matter: from synthetic polymers to proteins, lecture notes. *In: NIC Series. Jülich: John von Neumann Institute for Computing (NIC)*, v. 23, n., p. 1–28, 2004. Disponivel em: <https://juser.fz-juelich.de/record/152581/files/FZJ-2014-02193.pdf>. Acesso em: 14 setembro 2021.
- 61 BINDER, K. *et.al.* Molecular dynamics simulations. **Journal of Physics: condensed matter**, v. 16, n. 5, p. S429–S453, 2004. DOI:10.1088/0953-8984/16/5/006.
- 62 MURA, C.; MCANANY, C. E. An introduction to biomolecular simulations and docking. **Molecular Simulation**, v. 40, n. 10–11, p. 732–764, 2014. DOI:10.1080/08927022.2014.935372.
- 63 CORE TEAM 2020: R: a language and environment for statistical computing. Vienna:R Foundation for Statistical Computing, 2020. Disponivel em: <https://www.R-project.org/>. Acesso em: 29 setembro 2021.
- 64 DELANO, W. L.; BROMBERG, S. **The PyMOL molecular graphics system**. 2004. Disponivel em: <https://dasher.wustl.edu/chem430/software/pymol/user-guide.pdf>. Acesso em: 29 setembro 2021.
- 65 KORB, O. *et. al.* Empirical scoring functions for advanced protein–ligand docking with PLANTS. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 49, n. 1, p. 84–96, 2009. DOI:10.1021/ci800298z.
- 66 NIM, Y.; WONG, K. B.. Using homology modeling to understand the structural basis of specific interaction of a plant-specific AtSar1a–AtSec23a pair involved in protein ER export. **Methods in Molecular Biology**, v. 1662, p. 59–73, 2017. DOI:10.1007/978-1-4939-7262-3_5.
- 67 VAN DER SPOEL, D. *et. al.* GROMACS: fast, flexible, and free. **Journal of Computational Chemistry**, v. 26, n. 16, p. 1701–1718, 2005. DOI:10.1002/jcc.20291.
- 68 ABRAHAM, M. *et.al.* GROMACS: high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX**, v. 1–2, p. 19–25, 2015. DOI:10.1016/j.softx.2015.06.001.
- 69 BEST, R. B. *et.al.* Optimization of the additive CHARMM all-atom protein force field targeting improved sampling of the backbone ϕ , ψ and side-chain χ 1 and χ 2 dihedral angles. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 8, n. 9, p. 3257–3273, 2012. DOI:10.1021/ct300400x.

- 70 LOVELL, S. C. *et al.* Structure validation by $C\alpha$ geometry: ϕ, ψ and $C\beta$ deviation. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 50, n. 3, p. 437–450, 2003. DOI:10.1002/prot.10286.
- 71 WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 2, p. W407–W410, 2007. DOI:10.1093/nar/gkm290.
- 72 VANOMMESLAEGHE, K. *et al.* CHARMM general force field: a force field for drug-like molecules compatible with the CHARMM all-atom additive biological force fields. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 4, p. 671–690, 2009. DOI:10.1002/jcc.21367.
- 73 JORGENSEN, W. L. *et al.* Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **Journal of Chemical Physics**, v. 79, n. 2, p. 926–935, 1983. DOI:10.1063/1.445869.
- 74 MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: an analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992. DOI:10.1002/JCC.540130805.
- 75 HESS, B. *et al.* LINCS: a linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997. DOI:10.1002/(SICI)1096-987X(199709)18:12<1463::AID-JCC4>3.0.CO;2-H.
- 76 BERENDSEN, H. J. C. *et al.* Molecular dynamics with coupling to an external bath. **Journal of Chemical Physics**, v. 81, n. 8, p. 3684–3690, 1984. DOI:10.1063/1.448118.
- 77 DARDEN, T. *et al.* Particle mesh Ewald: an $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. **Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089–10092, 1993. DOI:10.1063/1.464397.
- 78 PARRINELLO, M.; RAHMAN, A. Polymorphic transitions in single crystals: a new molecular dynamics method. **Journal of Applied Physics**, v. 52, n. 12, p. 7182–7190, 1981. DOI:10.1063/1.328693.
- 79 MICHAUD-AGRAWAL, N. *et al.* MDAnalysis: a toolkit for the analysis of molecular dynamics simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2319–2327, 2011. DOI:10.1002/jcc.21787.
- 80 LÓPEZ, E. D. *et al.* WATCLUST: a tool for improving the design of drugs based on protein-water interactions. **Bioinformatics**, v. 31, n. 22, p. 3697–3699, 2015. DOI:10.1093/bioinformatics/btv411.
- 81 MAGALHÃES, L. G. **Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer.** Tese (Doutorado em Ciências), Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019. DOI:10.11606/T.76.2019.tde-28082019-113629
- 82 WANG, Y. *et al.* Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. **FEBS Journal**, v. 283, n. 1, p. 102–111, 2016. DOI:10.1111/febs.13555.

ANEXOS

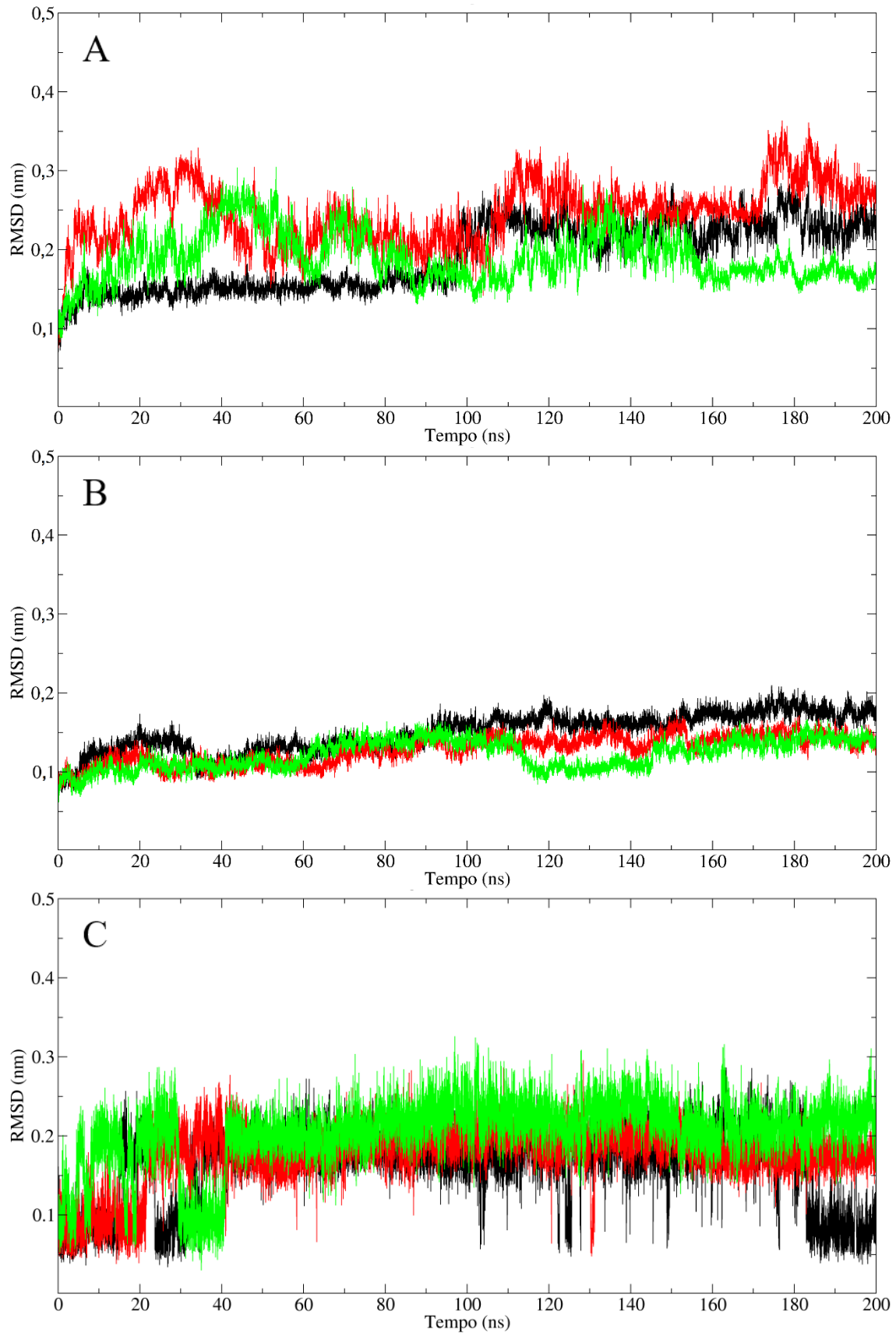


Figura A1. RMSD trajetórias de DM do dímero $\alpha_{1A}\beta_{1B}$ -tubulina com o ligante **1a** na configuração alternativa. A) RMSD da trajetória do monômero α_{1A} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{1B} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante **1a** em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

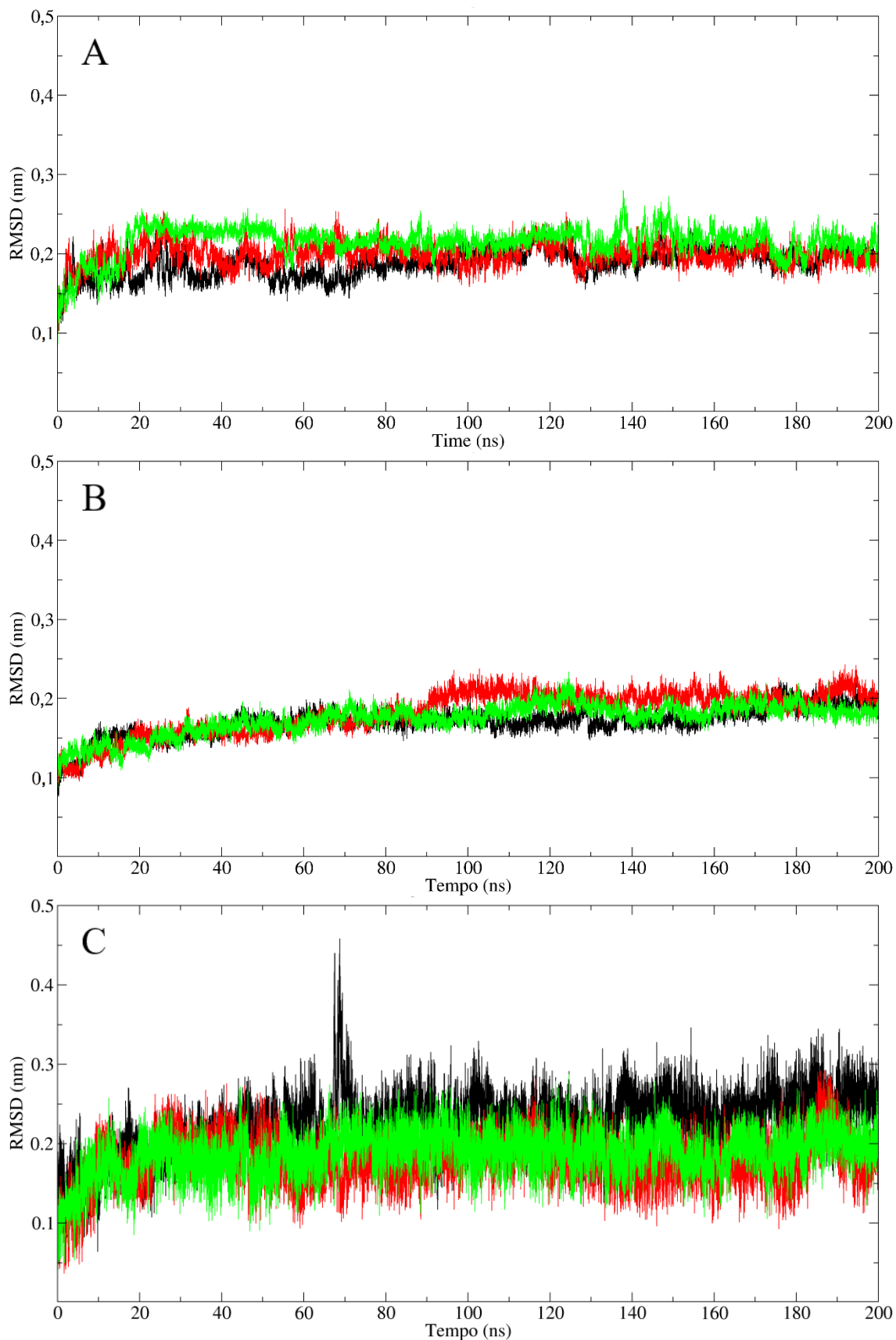


Figura A2. RMSD trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IB}$ -tubulina com o ligante plinabulina. A) RMSD da trajetória do monómero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monómero β_{IB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante plinabulina em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

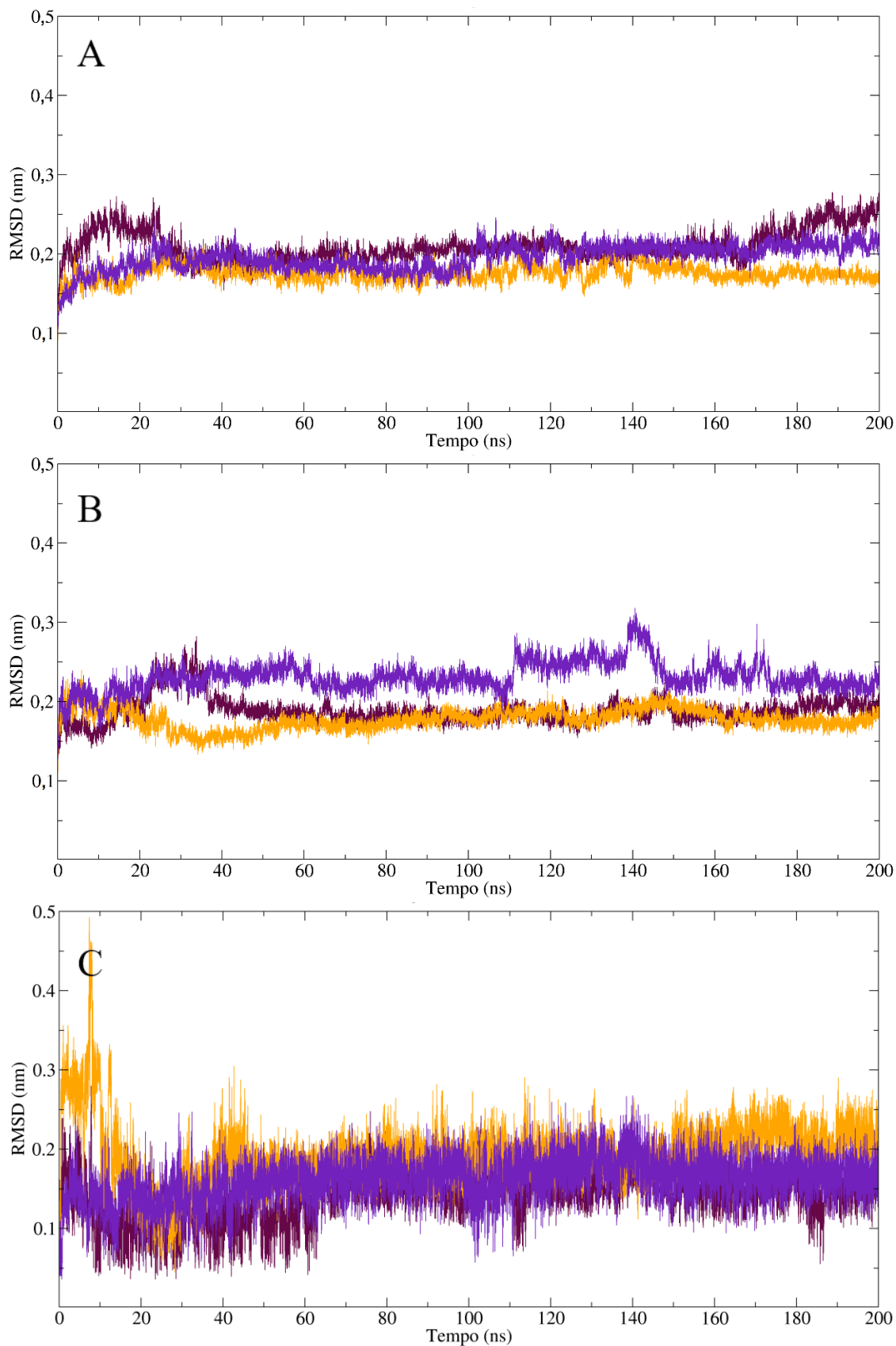


Figura A3. RMSD trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante plinabulina. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IIB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante plinabulina em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

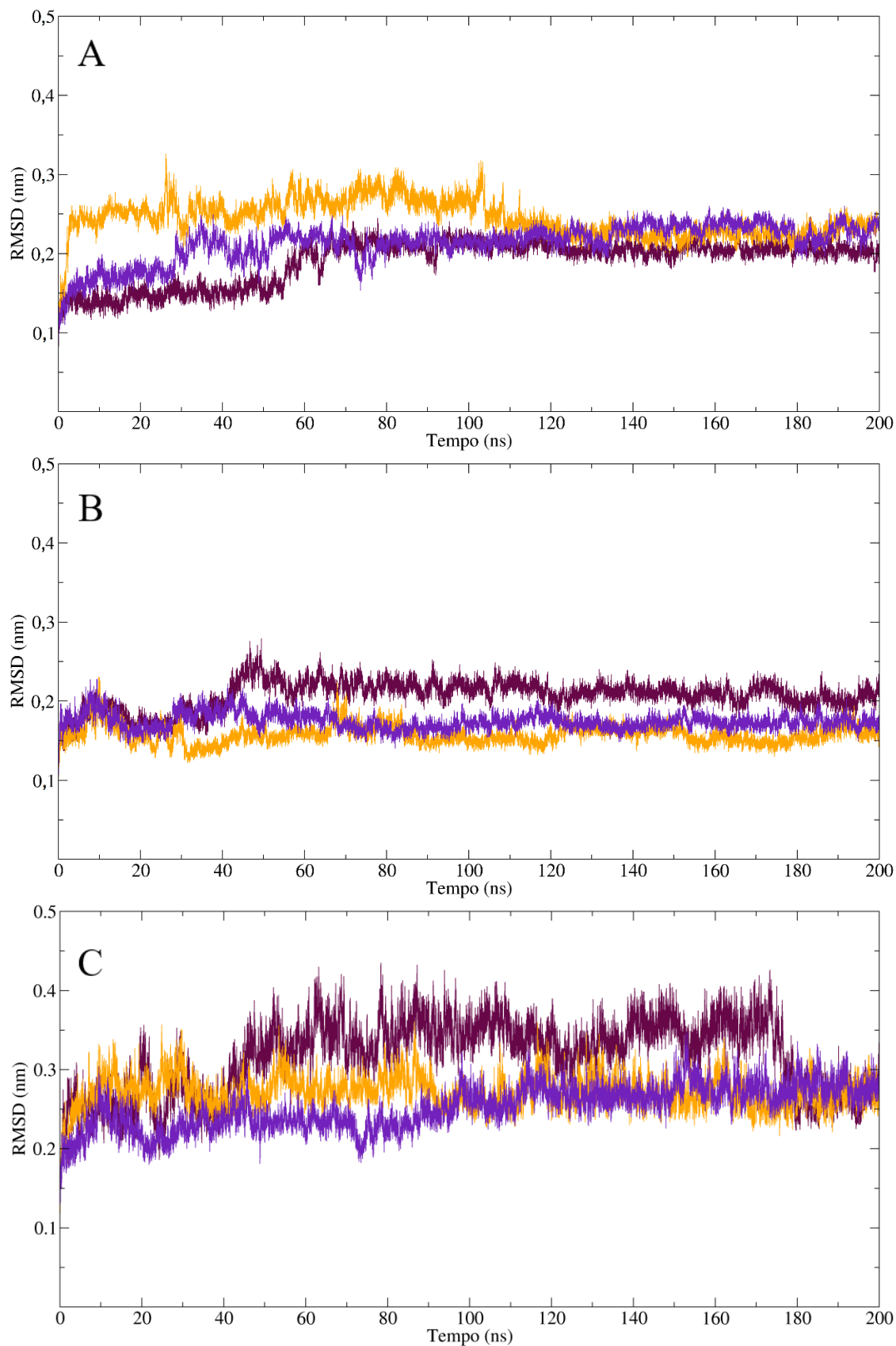


Figura A4. RMSD trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IIB}$ -tubulina com o ligante colchicina. A) RMSD da trajetória do monómero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monómero β_{IIB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante colchicina em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

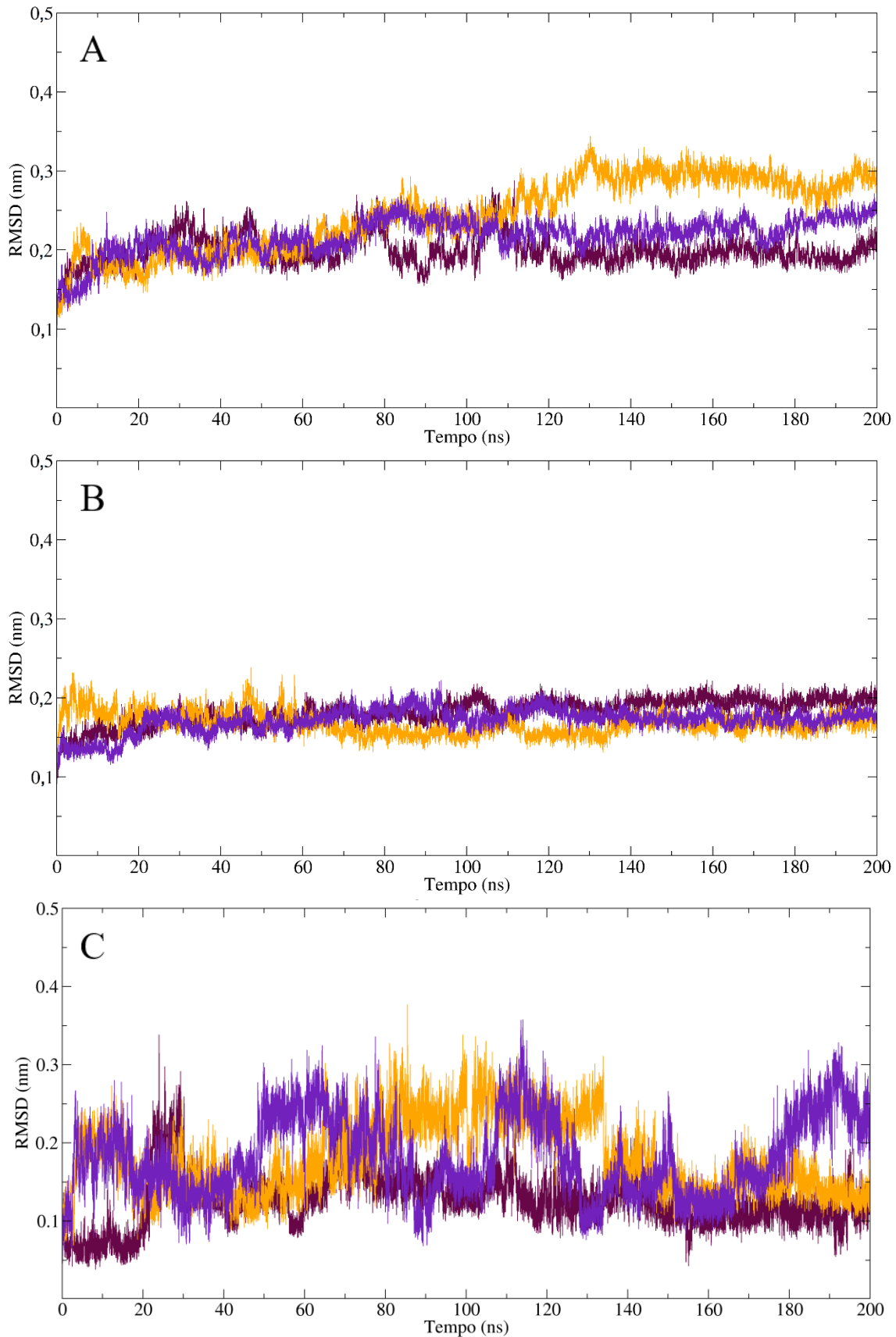


Figura A5. RMSD trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{III}$ -tubulina com o ligante d-podofilotoxina. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{II_B} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante d-podofilotoxina em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

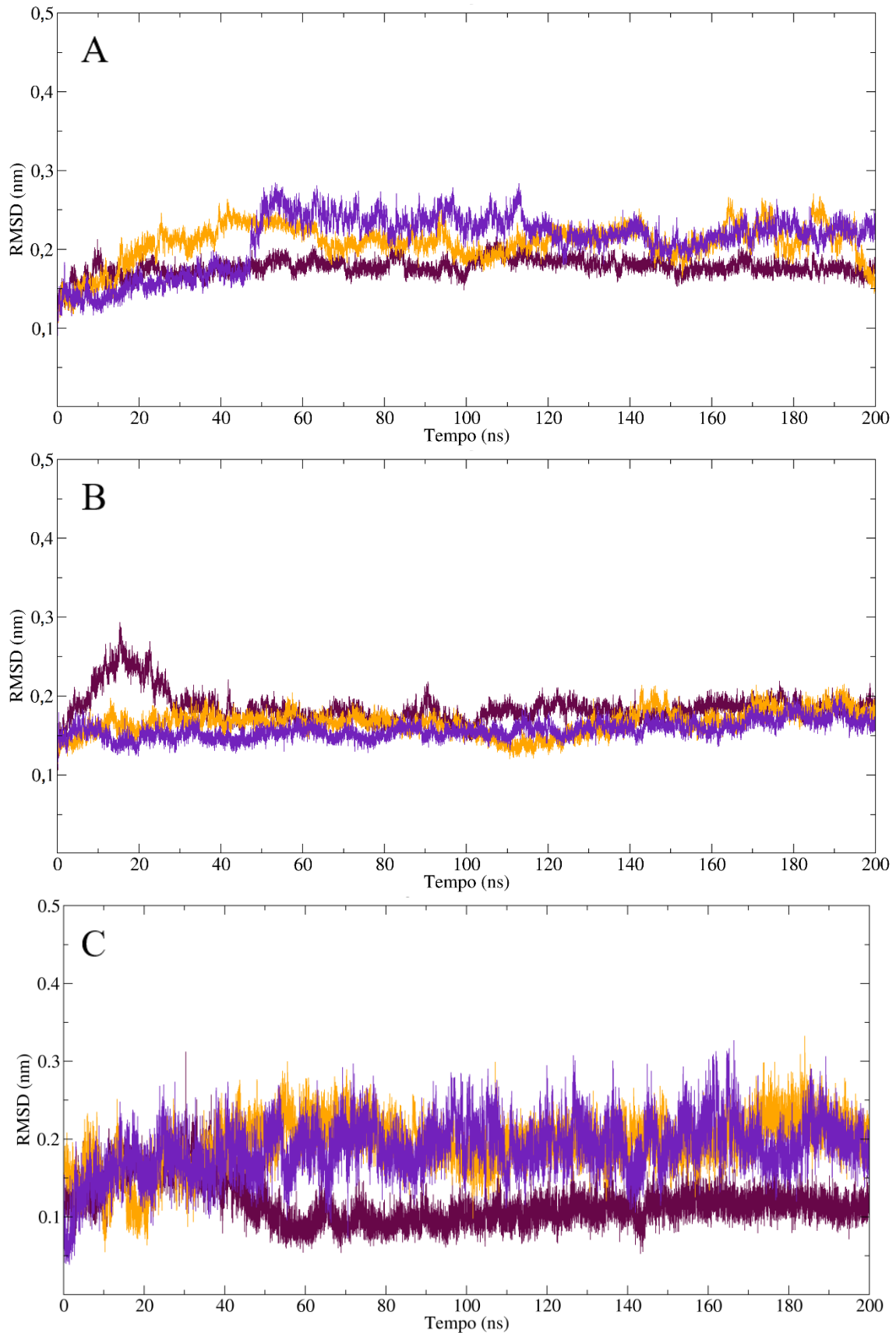


Figura A6. RMSD trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IB}$ -tubulina com o ligante podofilotoxina. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante podofilotoxina em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.

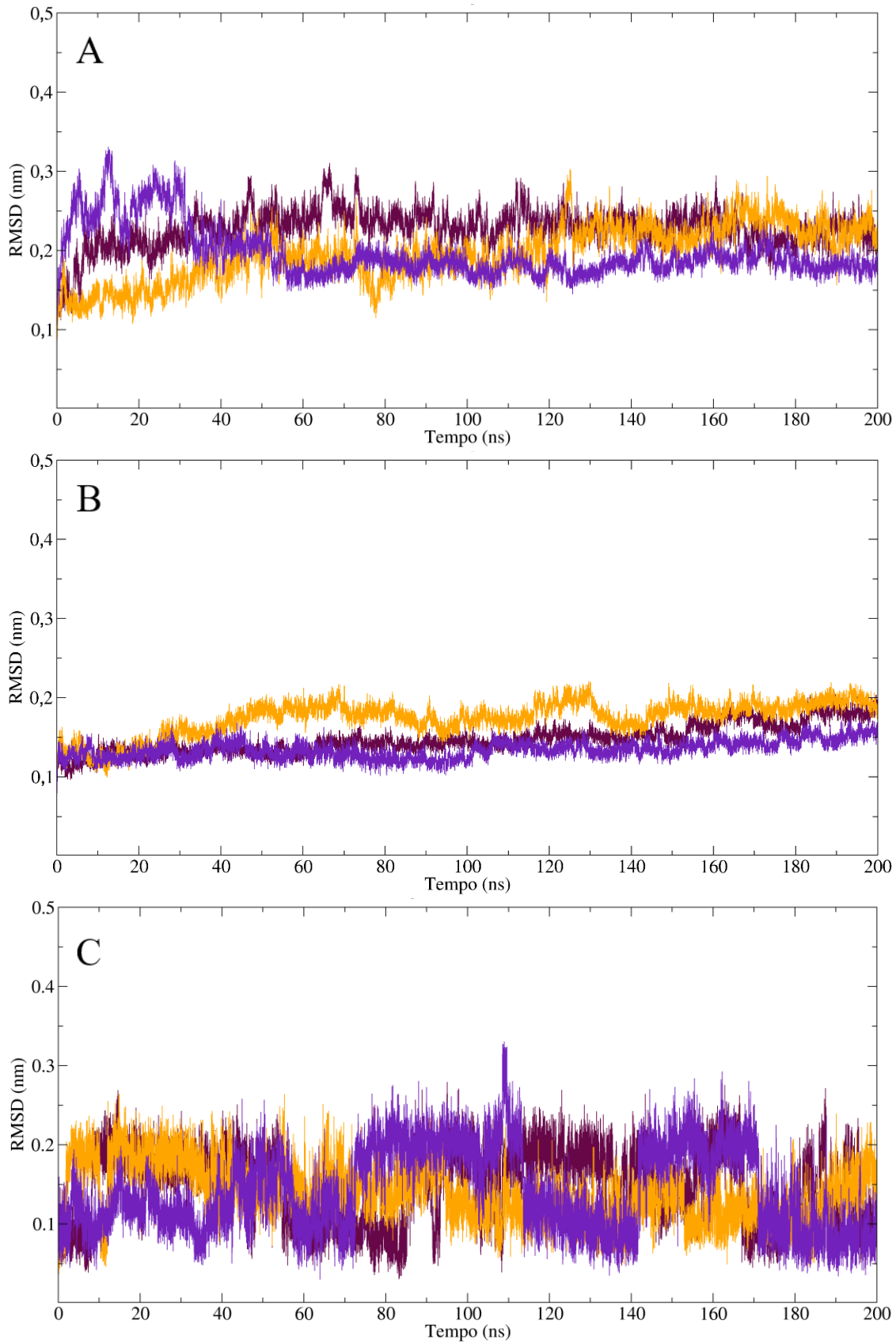


Figura A7. RMSD trajetórias de DM do dímero $\alpha_{IA}\beta_{IB}$ -tubulina com o ligante **1a** na configuração alternativa. A) RMSD da trajetória do monômero α_{IA} em relação a sua conformação inicial. B) RMSD da trajetória do monômero β_{IB} em relação a sua conformação inicial. C) RMSD da trajetória do ligante **1a** em relação a sua posição inicial.

Fonte: Elaborada pelo autor.