

Introduction to Bioinformatics

Ernane Rosa Martins
(Organizador)

 **Atena**
Editora
2019



Ernane Rosa Martins
(Organizador)

Introduction to Bioinformatics

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall’Acqua – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionele delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Profª Drª Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

I61	Introduction to bioinformatics [recurso eletrônico] / Organizador Ernane Rosa Martins. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2019. Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader Modo de acesso: World Wide Web Inclui bibliografia. ISBN 978-85-7247-113-8 DOI 10.22533/at.ed.138191202 1. Bioinformática. 2. Inteligência artificial. I. Martins, Ernane Rosa. CDD 570.285
-----	---

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2019

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A bioinformática é um campo interdisciplinar, que busca analisar, interpretar e processar dados biológicos, com foco na aplicação de técnicas computacionais intensivas, tais como: métodos computacionais, teoria de grafos, inteligência artificial, algoritmos matemáticos, reconhecimento de padrões, mineração de dados, algoritmos de aprendizado de máquina, processamento de imagens e simulação computacional. Como um campo interdisciplinar, a bioinformática combina diversas áreas do conhecimento, como: engenharia, matemática, física, química, estatística, ciência da computação e biologia, entre outras.

A coletânea “*Introduction to bioinformatics*” é um livro composto por 6 capítulos que abordam assuntos atuais, tais como: o adenocarcinoma gástrico que é uma malignidade com elevada incidência e mortalidade no mundo; o vírus zika (VZIK) que é um Arbovirus que pertence à família Flaviviridae; As H^+ -ATPases que são proteínas integrais da membrana plasmática que têm a capacidade de utilizar a energia química da hidrólise de ATP para expulsar os prótons para o ambiente extracelular, atuando na manutenção da homeostase iônica e transporte de solutos; o vírus da família Geminiviridae que tem sido intensamente estudado devido à gravidade das doenças causadas em várias culturas importantes como: feijão, algodão, milho, tomate e mandioca.

Espero que os capítulos deste livro possam contribuir efetivamente na disseminação dos conhecimentos relevantes da bioinformática, proporcionando uma visão ampla sobre este campo de conhecimento.

Assim, desejo a todos uma excelente leitura.

Ernane Rosa Martins

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 1

ANÁLISE DE lncRNAs EM NPCs DE HAMSTER GOLDEN SÍRIO (*Mesocricetus auratus*) RECÉM-NASCIDOS INFECTADOS PELO VÍRUS ZIKA

Jardel Fabio Lopes Ferreira
Samir Mansour Moraes Casseb
Karla Fabiane Lopes de Melo
Carlos Alberto Marques de Carvalho
Gustavo Moraes Holanda
Paloma Daguer Ewerton dos Santos
Suellen de Almeida Machado
Francisco Canindé Ferreira de Luna
Walter Felix Franco Neto
Livia Carício Martins
Ana Cecília Ribeiro Cruz
Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

DOI 10.22533/at.ed.1381912021

CAPÍTULO 2 11

ANÁLISE *IN SILICO* DA FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO COMPOSTO BENZOTIAZÓLICO COM POTENCIAL ANTITUMORAL CONTRA LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Felipe Pantoja Mesquita
Luina Benevides Lima
Julio Paulino Daniel
Adrhyan Jullianne de Sousa Portilho
Lais Lacerda Brasil de Oliveira
Emerson Lucena da Silva
Eliza de Lucas Chazin
Thatyana Rocha Alves Vasconcelos
Maria Elisabete Amaral de Moraes
Raquel Carvalho Montenegro

DOI 10.22533/at.ed.1381912022

CAPÍTULO 3 23

ANÁLISE PRIMÁRIA DE TRANSCRIPTOMA DE TECIDO TESTICULAR DE HAMSTERS (*MESOCRICETUS AURATUS*) INFECTADOS COM VÍRUS ZIKA

Walter Felix Franco Neto
Samir Mansour Moraes Casseb
Karla Fabiane Lopes de Melo
Wallax Augusto Silva Ferreira
Ana Paula Sousa Araujo
Jardel Fabio Lopes Ferreira
Taiana Andrade Freitas
Milene Ferreira Silveira
Livia Carício Martins
Pedro Fernando da Costa Vasconcelos

DOI 10.22533/at.ed.1381912023

CAPÍTULO 4	32
CARACTERIZAÇÃO FILOGENÉTICA DA FAMÍLIA MULTIGÊNICA DA H ⁺ -ATPASE DE MEMBRANA PLASMÁTICA EM MONOCOTILEDÔNEAS DA ORDEM POALES	
Lyndefânia Melo de Sousa Clesivan Pereira dos Santos Thais Andrade Germano Moacília de Souza Lemos Stelamaris de Oliveira Paula Rafael de Souza Miranda José Helio Costa	
DOI 10.22533/at.ed.1381912024	
CAPÍTULO 5	40
CLADISTIC ANALISYS IN GEMINIVIRIDAE: AN EVIDENCE OF MULTISPECIFICITY FOR CULTIVARS HOSTS	
Rafael Trindade Maia Aparecida Yasmim Silva de Azevedo Maria Bartira Chaves de Souza Silva Ana Verônica Silva do Nascimento	
DOI 10.22533/at.ed.1381912025	
CAPÍTULO 6	50
DESENVOLVIMENTO DE FRAMEWORK PARA CRIAÇÃO DE MODELOS COMPUTACIONAIS DE CÉLULA COMPLETA	
Frederico Chaves Carvalho Paulo Eduardo Ambrósio	
DOI 10.22533/at.ed.1381912026	
CAPÍTULO 7	63
IN-SILICO DETOXIFICATION EVIDENCE OF THE HERBICIDE BISPYRIBAC SODIUM BY A TEORETHICAL MODEL OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASE TAU 5 FROM <i>Oryza sativa</i> L.	
Vinícius Costa Amador Ravenna Lins Rodrigues Felipe de Oliveira França Rafael Trindade Maia	
DOI 10.22533/at.ed.1381912027	
CAPÍTULO 8	73
INVESTIGAÇÃO IN SILICO DA EFICÁCIA DE FÁRMACOS ANTIVIRAIS NA INIBIÇÃO DA NS5 DO VÍRUS DA ZIKA	
Henriqueta Monalisa Farias Rafael de Lima Medeiros Franklin de Ferreira Farias Nóbrega Rafael Trindade Maia	
DOI 10.22533/at.ed.1381912028	
SOBRE O ORGANIZADOR	85

ANALISE *IN SILICO* DA FARMACOCINÉTICA E FARMACODINÂMICA DO COMPOSTO BENZOTIAZÓLICO COM POTENCIAL ANTITUMORAL CONTRA LINHAGEM DE ADENOCARCINOMA GÁSTRICO

Felipe Pantoja Mesquita

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

Luina Benevides Lima

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

Julio Paulino Daniel

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

Adrhyann Jullyanne de Sousa Portilho

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

Lais Lacerda Brasil de Oliveira

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

Emerson Lucena da Silva

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

Eliza de Lucas Chazin

Universidade Federal Fluminense, Departamento

de Química Orgânica, Instituto de Química.
Niterói – Rio de Janeiro

Thatyana Rocha Alves Vasconcelos

Universidade Federal Fluminense, Departamento
de Química Orgânica, Instituto de Química
Niterói - Rio de Janeiro

Maria Elisabete Amaral de Moraes

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

Raquel Carvalho Montenegro

Universidade Federal do Ceará, Núcleo de
Pesquisa e Desenvolvimento em Medicamentos,
Faculdade de Medicina
Fortaleza-Ceará

RESUMO: O adenocarcinoma gástrico é uma malignidade com elevada incidência e mortalidade no mundo. Buscando novas alternativas de tratamento, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antitumoral do benzotiazol AFN01 na linhagem de adenocarcinoma gástrico ACP03. Além disso, realizar a predição computacional da farmacocinética e farmacodinâmica dessa molécula, bem como o *docking* molecular com um alvo farmacológico relevante encontrado na predição. Para tanto, foi realizado o ensaio do MTT para a avaliação do potencial citotóxico e

a microscopia de fluorescência para medir a capacidade de indução de morte celular, com os fluoróforos Diacetato de Fluoresceína, Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo. O resultado da curva concentração-resposta revelou um efeito citotóxico promissor na linhagem com valores de CI50 em torno de 17,24 μM para 24h, 8,23 μM para 48h e 1,39 μM para 72h de tratamento. A AFN01 foi capaz de induzir apoptose nas concentrações de 1 e 2 μM . As análises computacionais identificaram propriedades farmacocinéticas relevantes como capacidade de absorção intestinal positiva, inibição do CYP1A2, CYP2C9 e CYP3A4, inibição fraca de hERG e toxicidade oral aguda classe III. A predição farmacodinâmica identificou alvos moleculares relacionados à atividade antitumoral. A enzima TDP1 foi selecionada para o *docking* molecular, indicando uma energia de ligação de -7.5 kcal/mol com o benzotiazol e importantes interações com resíduos do sítio catalítico da enzima. Em conclusão, o composto benzotiazólico AFN01 se mostrou um excelente candidato para o tratamento do adenocarcinoma gástrico, com bons parâmetros farmacocinéticos preditos e possível alvo farmacológico relevante do ponto de vista molecular.

PALAVRAS-CHAVE: FARMACOCINÉTICA; FARMACODINÂMICA; BENZOTIAZOL

ABSTRACT: Gastric adenocarcinoma has high incidence and mortality rates worldwide. The aim of this study was to evaluate the antitumor activity of benzothiazole AFN01 against ACP03 gastric adenocarcinoma cell line. Furthermore, computational prediction of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of this molecule and the molecular docking with the relevant pharmacological target found were performed. The MTT assay was performed to evaluate the cytotoxic potential of the compound and fluorescence microscopy was used to measure cell death induction with Fluorescein Diacetate, Hoechst 33342 and Propidium Iodide fluorophores. The result of the concentration-response curve obtained by MTT assay revealed a relevant cytotoxic effect against the lineage with IC50 values around 17.24 μM at 24 h, 8.23 μM at 48 h and 1.39 μM at 72 h of exposure. AFN01 was able to induce apoptosis at 1 and 2 μM . Computational analyses identified relevant pharmacokinetic properties such as positive intestinal absorption, inhibition of CYP1A2, CYP2C9 and CYP3A4, as well as weak inhibition of hERG and class III acute oral toxicity. The pharmacodynamic prediction identified molecular targets related to antitumor activity. The enzyme TDP1 was selected for molecular docking, indicating that benzothiazole has a binding energy of -7.5 kcal/mol and important interactions with catalytic site residues of the enzyme. In conclusion, the AFN01 benzothiazole compound is an excellent candidate for the treatment of gastric adenocarcinoma, with good predicted pharmacokinetic parameters and a potentially new molecular target.

KEYWORDS: PHARMACOKINETICS; PHARMACODYNAMICS; BENZOTHIAZOLE

1 | INTRODUÇÃO

O adenocarcinoma gástrico é uma das malignidades originadas no estômago com elevada incidência e mortalidade no mundo. Apesar de um aparente declínio em

sua incidência, este ainda tem um prognóstico ruim e é muitas vezes diagnosticado em estágios avançados, o que leva ao aumento nas taxas de mortalidade (CARCAS, 2014; GABR *et al.*, 2014). Nesse sentido, o câncer gástrico exige atenção continuada e novas pesquisas relacionadas à prevenção, detecção precoce e novas opções terapêuticas.

Dependendo do tamanho e localização do tumor primário, a terapia mais utilizada é a ressecção cirúrgica com gastrectomia total ou subtotal. As terapias alvo dirigidas têm sido importantes para o aprimoramento das intervenções terapêuticas (CARCAS, 2014). Vários estudos vêm sendo desenvolvidos na intenção de ampliar as opções de tratamentos disponíveis com o intuito de melhorar a resposta farmacológica e a sobrevida dos pacientes (CARCAS, 2014; QIN, 2014).

Nesse contexto, os benzotiazóis constituem uma classe importante de agentes terapêuticos. Compostos derivados dessa molécula já demonstraram diversos efeitos farmacológicos, incluindo atividades antimicrobiana, antiinflamatória e antitumoral (GABR *et al.*, 2014). Nogueira e colaboradores (2010) sintetizaram onze hidrazonas contendo o núcleo benzotiazólico, dentre essas, o composto (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazol-2-il)hidrazono)metil)-4-nitrofenol (AFN01) foi o único que demonstrou citotoxicidade nas linhagens câncer de colón (HCT-8), de mama (MDAMB-435) e leucemia (HL-60). Além disso, no estudo de Vasconcelos e colaboradores (2018) foi avaliado a atividade deste composto em linhagens de melanoma maligno, comprovando seu potencial antitumoral, indutor de apoptose e inibidor de migração e invasão *in vitro*.

Com base na necessidade de novos fármacos como alternativas ao tratamento do adenocarcinoma gástrico, esse trabalho teve por objetivo testar a atividade antitumoral do benzotiazol (*E*)-2-((2-(benzo[d]tiazol-2il)hidrazono)metil)-4-nitrofenol na linhagem de adenocarcinoma gástrico do tipo difuso ACP03, realizar a predição computacional da farmacocinética e farmacodinâmica dessa molécula, bem como o *docking* molecular com o alvo farmacológico relevante encontrado na predição.

2 | METODOLOGIA

2.1 Cultivo celular

A linhagem de adenocarcinoma gástrico utilizada neste estudo foi estabelecida no Laboratório de Citogenética Humana situado na Universidade Federal do Pará (UFPA), a partir de um tumor primário de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal de um paciente natural do Brasil (LEAL *et al.*, 2009). As células foram cultivadas em Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco®), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB, Gibco®), 100 U / mL de penicilina e 100 µg / mL de estreptomicina (Gibco®). A linhagem celular foi armazenada em estufa com ambiente contendo 5% de CO₂ a 37°C.

2.2 Ensaio MTT

Acitotoxicidade do benzotiazolAFN01 foi avaliada na linhagem de adenocarcinoma gástrico ACP03 e determinada por meio do ensaio do MTT (BERRIDGE *et al.*, 1996). A linhagem foi semeada na densidade de 3×10^3 células por poço em placas de 96 poços e incubados por 24 h. Em seguida, a solução estoque de AFN01 (10 mM) foi diluída em meio de cultura para obtenção de uma curva de concentração (10 μ M a 0,156 μ M). O controle negativo foi tratado com o solvente DMSO (0,01%) e o controle positivo com doxorubicina por 24, 48 e 72 horas. A densidade ótica foi medida por espectrofotometria no comprimento de onda de 550 nm. Os valores de CI50 (concentração inibitória de 50% do crescimento celular) e IC95% (intervalo de confiança de 95%) foram obtidos a partir de uma regressão não linear sigmoidal seguindo a equação $Y=100/(1+10^{((\text{LogIC50}-X)*\text{HillSlope}))}$.

2.3 Estudo do padrão de morte celular

A capacidade de indução de morte celular foi realizada através da análise morfológica das células por microscopia de fluorescência utilizando os fluoróforos Diacetato de Fluoresceína (DAF), Hoechst 33342 (HO) e Iodeto de Propídeo (IP). O método se baseia na revelação diferencial das células viáveis, apoptóticas e necróticas frente a esses fluoróforos. O DAF é lipossolúvel e cora o citoplasma em verde, enquanto que o HO lipossolúvel intercala no DNA corando o núcleo em azul. Por outro lado, o IP é um intercalante de DNA hidrossolúvel e só marca o núcleo se houver perda da integridade da membrana plasmática (CHAN *et al.*, 2015).

Dessa maneira, as células viáveis possuem membrana íntegra em verde e apresentam núcleo uniforme corado em azul. As células em apoptose (membrana ainda íntegra) apresentam manchas azuis brilhantes com condensação da cromatina e fragmentação nuclear, por vezes são marcadas por IP na apoptose tardia ou secundária em que ocorre o afrouxamento da membrana permitindo que o corante incorpore no núcleo. Há ainda alterações na membrana celular em decorrência da formação de corpos apoptóticos. Já as células em necrose são coradas inteiramente em vermelho, devido a perda da integridade plasmática, e apresentam-se com tamanho celular aumentado (GALLUZZI *et al.*, 2018).

2.4 Análise por ferramentas computacionais

2.4.1 Desenho do ligante

A estrutura bidimensional (2D) do composto foi desenhada no programa MarvinSketch®. A partir do modelo, obteve-se o SMILES (Simplified Molecular Input Line Entry Specification), uma forma de representar a molécula com caracteres comuns.

2.4.2 Predição farmacocinética

As propriedades de similaridade a fármacos (*drug-likeness*), baseadas nas Regras de Lipinski (LIPINSKI *et al.*, 1997; LIPINSKI, 2000), também foram preditas. Essa regra caracteriza fármacos de melhor absorção como aqueles com $\log P \leq 5$ (log do coeficiente de partição da molécula), peso molecular ≤ 500 Da (PM), número de aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 (ALH), número de doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 (DLH) e área de superfície polar ≤ 140 Å (ASP). Além disso, uma regra adicional, proposta por Veber, diz que o número de ligações rotacionáveis (NLR) não deve ser superior a 10, visto que a molécula deve adotar uma conformação fixa para interagir com o alvo, passar pelas membranas, e ao mesmo tempo adotar a conformação ativa (VEBER *et al.*, 2002). A violação de duas ou mais dessas regras podem indicar possíveis problemas na biodisponibilidade oral. Para tanto, o *SMILES* foi utilizado no servidor molinspiration.

A ferramenta admetSAR foi usada para calcular os parâmetros de absorção, dispersão, biotransformação e toxicidade teóricos dos benzotiazóis (CHENG *et al.*, 2012). Esta informação é útil para a condução de estudos que necessitam de uma avaliação do risco para humanos. O método da ferramenta é baseado na similaridade estrutural com outros compostos de parâmetros farmacocinéticos já conhecidos e descritos em modelos biológicos, presentes no banco de dados do servidor. Para a realização deste método, o *SMILES* da molécula estudada foi submetido no servidor admetSAR (CHENG *et al.*, 2012)

2.4.3 Avaliação do perfil farmacodinâmico

Os possíveis alvos terapêuticos da molécula AFN01 foram avaliados por meio do servidor SwissTarget Prediction. Esse servidor compara a similaridade dos compostos com uma biblioteca de 280.000 compostos ativos, em mais de 2.000 alvos farmacológicos, em organismos diferentes (GFELLER; BASSANI-STERNBERG, 2018). Novamente, o *SMILES* da molécula foi submetido à ferramenta online, e os alvos foram classificados segundo uma função de probabilidade.

2.4.4 Preparo do ligante

Com o uso do programa Avogadro[®], a estrutura 2D informada pelo *SMILES* foi convertida no esqueleto tridimensional (3D), seguindo a correta estereoquímica. Em seguida, todas foram submetidas a otimização geométrica do Avogadro[®] e salvas em “.mol2”. O *software* AutoDock Tools (ADT) foi utilizado para converter as moléculas no formato “.mol2” em “.pdbqt”, contendo somente os hidrogênios polares e com as definições de ligações de rotação livre ou rígida.

2.4.5 Preparo do alvo farmacológico

Após a avaliação dos alvos farmacodinâmicos, foi feita a busca das estruturas cristalográficas dos potenciais receptores. O *Protein Data Bank* (PDB) foi utilizado para busca e download das estruturas no formato “.pdb”. O *software* PyMol® foi utilizado para visualização e manipulação dos arquivos, a fim de remover moléculas de água, ligantes nativos, outros reagentes e adicionar os átomos de hidrogênios.

2.4.6 Ancoragem (*docking*) molecular

Os arquivos do receptor e do ligante foi convertido, respectivamente, do formato “.pdb” para “.pdbqt”, por meio do *software* Auto Dock Tools (ADT). O mesmo programa também foi utilizado para visualização do tamanho e centro do *grid box*, que foi anotado para a definição das configurações do *docking* com o *software* Vina® (TROTT; OLSON, 2010). Além do tamanho nos eixos x, y e z, e das coordenadas do centro da caixa (nos mesmos eixos), o parâmetro de *exhaustiveness* (exaustividade) também foi definido no arquivo de configuração de cada *docking*. O valor padrão para a exaustividade é de 8, mas o valor escolhido para este trabalho foi de 150, permitindo um maior tempo de busca da conformação e aumentando a probabilidade de encontrar o mínimo global.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir do ensaio do MTT foi obtida uma curva concentração-resposta com um efeito citotóxico relevante contra a linhagem ACP03 com valores de CI50 [Intervalo de confiança com 95%] em torno de 17,24 μM [14,92 – 19,92] para 24h, 8,23 μM [7,02 – 9,65] para 48h e 1,39 μM [1,14 – 1,69] para 72h. O resultado pode ser visualizado na Figura 1. Nogueira e colaboradores (2010) mostraram que o benzotiazol AFN01 obteve uma atividade anticâncer *in vitro* contra células de câncer de colon (HCT-8), mama (MDAMB-435) e leucemia (HL-60), sendo a linhagem leucêmica a mais sensível ao composto com um CI50 de 1,66 μM . Portanto, os resultados encontrados neste estudo mostram que o composto AFN01 é significativamente sensível contra a linhagem de câncer gástrico do tipo intestinal com uma potência de 1,39 μM após 72 horas de tratamento.

Este potencial citotóxico observado na linhagem de câncer gástrico é de extrema importância, visto que já foi descrito na literatura que esta linhagem celular possui uma expressiva quimiorresistência contra alguns fármacos utilizados rotineiramente na clínica, como a cisplatina (CI50 de 28,62 μM) e irinotecano (CI50 de 32,07 μM) (PINTO *et al.*, 2015). A citotoxicidade dos benzotiazóis descrita na literatura é variável. Alguns trabalhos mostram que os derivados de benzotiazóis podem ter uma potência em torno de 20 μM e outros mostram uma potência baixa em torno de 2 μM , condizente com o efeito mostrado neste presente trabalho.

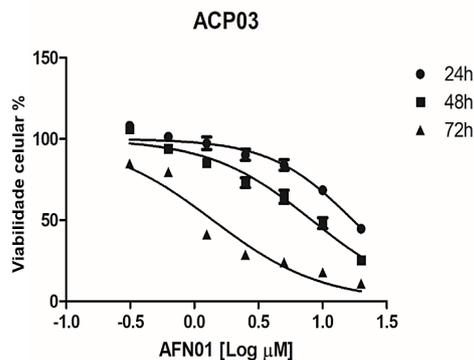


Figura 1: **Efeito citotóxico da AFN01 na linhagem ACP03.** A atividade citotóxica foi avaliada através do ensaio do MTT em três tempos distintos de tratamento, foi realizada uma curva de concentração da substância teste (10-0.156 μM).

Com o intuito de esclarecer o padrão de morte desencadeado pelo efeito citotóxico do composto AFN01, a análise por microscopia de fluorescência mostrou que o composto AFN01 foi capaz de induzir de forma significativa apoptose nas concentrações de 1 e 2 μM ($P < 0.05$), assim como a doxorrubicina, utilizada como controle positivo (Figura 2). Este efeito pró-apoptótico observado é consistente com o observado na literatura com outros benzotiazóis que foram identificados como bloqueadores do ciclo celular e indutores de morte celular por apoptose (WANG *et al.*, 2011; SINGH *et al.*, 2016).

A apoptose é um importante mecanismo de defesa para as células, impedindo a proliferação desordenada em condições normais e, portanto, tem sido considerada um alvo para o desenvolvimento de novos fármacos anticâncer (PFEFFER; SINGH, 2018). Portanto, por ser capaz de induzir a morte celular por apoptose em baixas concentrações, o benzotiazol AFN01 pode prover uma nova abordagem terapêutica.

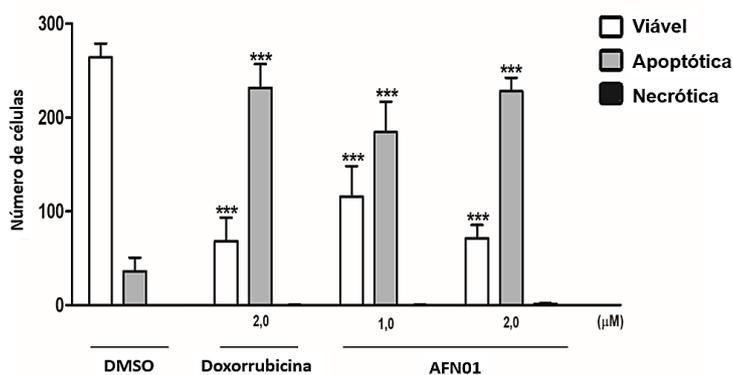


Figura 2: **Análise do mecanismo de morte celular.** Números de células viáveis, apoptóticas e necróticas. A doxorrubicina (2 μM) foi usado como controle positivo. Os dados são apresentados como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. As amostras tratadas foram comparadas com o controle negativo DMSO, analisados estatisticamente usando ANOVA seguido por teste de Bonferroni. Diferenças significativas: *** $p < 0.001$.

As análises computacionais são de extrema importância para o desenvolvimento de novos fármacos para o mercado, pois fornecem informações úteis que direcionam os estudos a um baixo custo e sem utilização de animais de laboratório (YAN *et al.*, 2017). Primeiramente, a avaliação do perfil físico-químico pelo programa Molinspiration (tabela 1) identificou que a molécula AFN01 se adequou os parâmetros propostos por Lipinski e Veber (LIPINSKI *et al.*, 1997; LIPINSKI, 2000; Veber *et al.*, 2002). Portanto, este resultado indica que a molécula é passível de boas características farmacocinéticas quanto a absorção e biodisponibilidade.

Propriedades físico-químicas	
LogP	3,66
ASP	103,33
PM	314,33
ALH	7
DLH	2
NLR	4

Tabela 1 – Parâmetros preditos pelo servidor Molinspiration.

Na análise pelo servidor admetSAR foram identificadas propriedades farmacocinéticas relevantes, como capacidade de absorção intestinal positiva, confirmando a possibilidade de administração oral do composto. A inibição do CYP1A2, CYP2C9 e CYP3A4 também foi encontrada, importante na questão do metabolismo de fármacos e interações medicamentosas. Outro parâmetro avaliado foi a inibição de canais iônicos de potássio hERG que mostrou ser fraca, indicando uma baixa probabilidade de cardiotoxicidade (YU *et al.*, 2015). A presença de toxicidade oral aguda classe III (LD50 entre 500 e 5000 mg/kg) corrobora com a hipótese de que o benzotiazol AFN01 é um composto seguro e aceitável para o consumo humano (BOIK; NEWMAN, 2008). Entretanto, ainda há a necessidade dos estudos biológicos *in vivo* para a confirmação de tais resultados encontrados no modelo *in silico*.

A predição farmacodinâmica permitiu a triagem de alvos moleculares de importância para a atividade antitumoral. Nesta análise, os alvos farmacológicos são triados baseados na similaridade estrutural dos ligantes em estudo com ligantes com alvos já conhecidos. Dentre diversos alvos encontrados, a enzima Tiroxil-DNA fosfodiesterase-1 (TDP1) foi um dos alvos com maior probabilidade de ligação com a AFN01 (tabela 2).

Target	Uniprot ID	Gene Code	Probability
Microtubule-associated protein tau	P10636	MAPT	0.68
Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1	Q9NUW8	TDP1	0.63
Arachidonate 5-lipoxygenase	P09917	ALOX5	0.46
Arachidonate 15-lipoxygenase	P16050	ALOX15	0.46
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12S-type	P18054	ALOX12	0.46
Arachidonate 15-lipoxygenase B	O15296	ALOX15B	0.46
Arachidonate 12-lipoxygenase, 12R-type	O75342	ALOX12B	0.46
Epidermis-type lipoxygenase 3	Q9BYJ1	ALOXE3	0.46
Focal adhesion kinase 1	Q05397	PTK2	0.29
Protein-tyrosine kinase 2-beta	Q14289	PTK2B	0.29

Tabela 2 - Predição dos alvos farmacológicos utilizando o servidor SwissTarget Prediction.

A TDP1 é uma enzima importante relacionada com mecanismos de reparo do DNA, atuando em conjunto com a enzima Topoisomerase-1, remove lesões na ponta 3' da fita de DNA e protege contra uma possível degradação durante o reparo (FLETT *et al.*, 2018). Após essa identificação, a enzima TDP1 foi selecionada para o *docking* molecular. O resultado mostrou que o benzotiazol possui uma energia de ligação de -7.5 kcal/mol e importantes interações com resíduos do sitio catalítico da enzima (Figuras 3 e 4). Interações como ligações de hidrogênio convencionais compõem a maior parte da interação entre o ligante AFN01 e a proteína TDP1, favorecendo a estabilidade da molécula dentro da cavidade catalítica. Estes dados são importantes no que diz respeito ao entendimento do mecanismo de ação do composto para produzir o efeito anticâncer esperado. Ao inibir a enzima TDP1, o composto AFN01 impede o mecanismo de reparo do DNA da célula tumoral, direcionando a célula para a via de morte celular programada (MEISENBERG *et al.*, 2015).

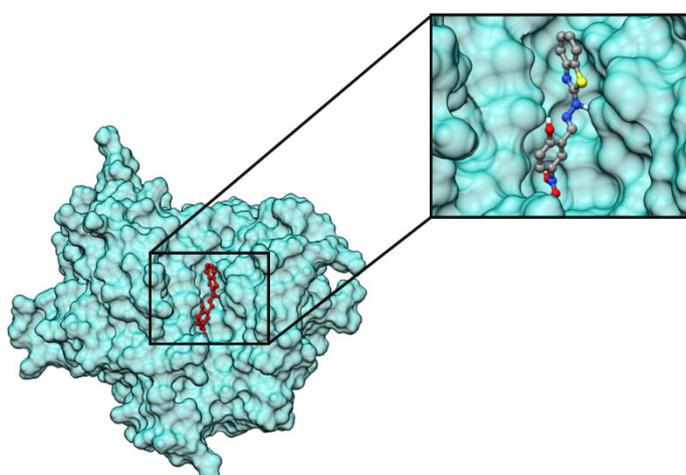


Figura 3: **Docking molecular da molécula AFN01.** A estrutura da proteína TDP1 está representada em azul e a molécula em vermelho. Ao lado, a ampliação da imagem mostra com mais detalhes o ligante acomodado na cavidade catalítica da enzima.

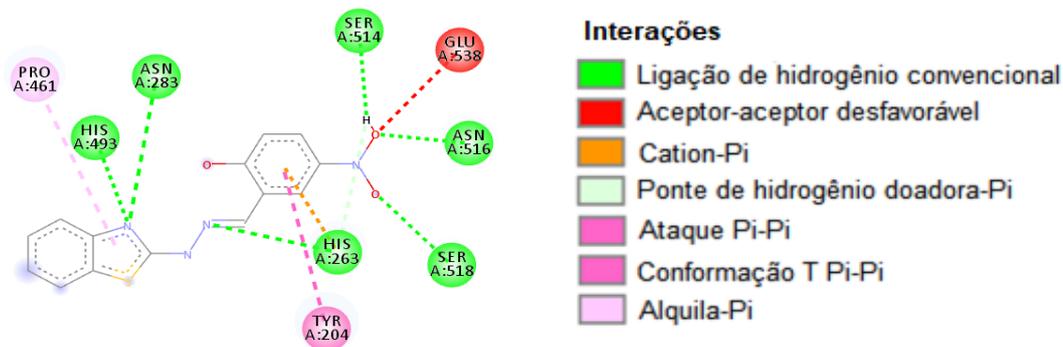


Figura 4: Representação das interações da molécula e do ligante.

4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, o composto benzotiazólico AFN01 é um excelente candidato para o tratamento do adenocarcinoma gástrico, com parâmetros farmacocinéticos preditos aceitáveis e possível alvo farmacológico relevante do ponto de vista molecular. Entretanto, faz-se necessário a realização de mais ensaios para a confirmação dos efeitos celulares e moleculares, bem como os aspectos toxicológicos em modelos animais, para que então o possível fármaco possa seguir para as fases clínicas.

5 | AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) por tornarem possível que este trabalho fosse realizado.

REFERÊNCIAS

- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S.; MCCOY, K. D.; WANG, R. **The biochemical and cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts.** *Biochemical*, v. 4, p. 14–19, jan. 1996.
- BOIK, J. C.; NEWMAN, R. A. **Structure-activity models of oral clearance, cytotoxicity, and LD50: a screen for promising anticancer compounds.** *BMC Pharmacol.* v. 8, n. 12, 2008.
- CARCAS, L. P. **Gastric cancer review.** *Journal of Carcinogenesis*, v. 13, n. :14, dez. 2014.
- CHAN, L. L.; KUKSIN, D.; LAVERTY, D. J.; SALDI, S.; QIU, J. **Morphological observation and analysis using automated image cytometry for the comparison of trypan blue and fluorescence-based viability detection method.** *Cytotechnology*, v. 67, n. (3), p. 461-473, mar. 2015.
- CHENG, F. LI, W.; ZHOU, Y.; SHEN, J.; WU, Z.; LIU, G.; LEE, P. W.; TANG, Y. **AdmetSAR: A comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties.** *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 52, n. 11, p. 3099–3105, nov. 2012.

- FLETT, F. J.; RUKSENAITE, E.; ARMSTRONG, L. A.; BHARATI, S.; CARLONI, R.; MORRIS, E. R.; MACKAY, C. L.; INTERTHAL, H.; RICHARDSON, J. M. **Structural basis for DNA 3'-end processing by human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1**. *Nat commun.*, v. 8, n. 24, jan. 2018.
- GABR, M. T.; EL-GOHARY, N. S.; EL-BENDARY, E. R.; EL-KERDAWY, M. M. **New series of benzothiazole and pyrimido[2,1-b]benzothiazole derivatives: synthesis, antitumor activity, EGFR tyrosine kinase inhibitory activity and molecular modeling studies**. *Medicinal Chemistry Research*, v. 24, n. 2, p. 860–878, fev. 2015.
- GALLUZZI, L.; VITALE, I. et al. **Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018**. *Cell Death and Differentiation*, v. 25, p. 486-541, 2018.
- GFELLER, D.; BASSANI-STERBERG, M. **Predicting Antigen Presentation—What Could we Learn from a Million Peptides?**. *Frontiers in immunology*, v. 9, n. 2, p. 1716, jul. 2018.
- LEAL, M. F.; MARTINS DO NASCIMENTO, J. L.; DA SILVA, C. E.; VITA LAMARÃO, M.F.; CALCAGNO, D.Q.; KHAYAT, A. S.; ASSUMPÇÃO, P.P.; CABRAL, I. R.; DE ARRUDA CARDOSO, S. M.; BURBANO, R. R. **Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines**. *Cancer Genet Cytogenet.*, v. 195, n. 1, p. 85-91, nov. 2009.
- LIPINSKI, C. A. **Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability**. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, v. 44, n. 1, p. 235–249, mar. 2000.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. **Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings**. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 23, p. 3–25, jan. 1997.
- MEISENBERG, C.; GILBERT, D. C.; CHALMERS, A.; HALEY, V.; GOLLINS, S.; WARD, S.E.; EL-KHAMISY, S.F. **Clinical and cellular roles for TDP1 and TOP1 in modulating colorectal cancer response to irinotecan**. *Mol Cancer Ther.*, v. 14, n. 2, p. 575-85, fev. 2015.
- NOGUEIRA, A. F.; AZEVEDO, E.C.; FERREIRA, V. F.; ARAUJO, A. J.; SANTOS, E. A.; PESSOA, C.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; MORAES, M. O.; VASCONCELOS, T. R. A. **Synthesis and Antitumor Evaluation of (E)-2-Benzothiazole Hydrazones**. *Letters in Drug Design & Discovery*, v. 7, n. 8, p. 551-555, mai. 2010.
- PFEFFER, C. M.; SINGH, A. T. **Apoptosis: a target for anticancer therapy**. *International journal of molecular sciences*, v.19, n. 2, p. 448, fev. 2018.
- PINTO, L. C; SOARES, B. M.; PINHEIRO J. J.; RIGGINS, G. J.; ASSUMPÇÃO, P. P.; BURBANO, R. M.; MONTENEGRO, R. C. **The anthelmintic drug mebendazole inhibits growth, migration and invasion in gastric cancer cell model**. *Toxicology in vitro*, v. 29, n. 8, p. 2038-2044, dez. 2015.
- QIN, S. **Phase III study of apatinib in advanced gastric cancer: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial**. *Journal of Clinical Oncology*, v. 32, n. 15 (Suppl.), p. 4003-4003, 2014.
- SINGH, M.; MODI, A.; NARAVAN, G.; SINGH, S. K. **Benzothiazole derivatives bearing amide moiety: potential cytotoxic and apoptosis-inducing agents against cervical cancer**. *Anti-Cancer Drugs*, v. 27, n. 6, p. 519-532, jul. 2016.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading**. *Journal of computational chemistry*, v. 31, n. 2, p. 455-461, jan. 2010.
- VASCONCELOS, Z. S.; RALPH, A. C. L.; CALCAGNO, D. Q.; DOS SANTOS BARBOSA, G.;

PEDROSA, T. N.; ANTONY, L. P.; SMITH, M. A. C.; CHAZIN E. L.; VASCONCELOS, T. R. A. ; MONTENEGRO, R. C.; DE VASCONCELLOS, M. C. **Anticancer potential of benzothiazolic derivative (E)-2-((2-(benzo [d] thiazol-2-yl) hydrazono) methyl)-4-nitrophenol against melanoma cells.** *Toxicology in Vitro*, v. 50, n. 3, p. 225-235, ago. 2018.

VEBER, D. F.; JOHNSON, S.R.; CHENG, H. Y.; SMITH, B. R.; WARD, K. W.; KOPPLE, K. D. **Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

WANG, Z. SHI, X.H.; WANG, J.; ZHOU, T.; XU, Y. Z.; HUANG, T. T.; LI, Y. F.; ZHAO, Y. L.; YANG, L.; YANG, S. Y.; YU, L. T.; WEI, Y. Q. **Synthesis, structure–activity relationships and preliminary antitumor evaluation of benzothiazole-2-thiol derivatives as novel apoptosis inducers.** *Bioorg Med Chem Lett*, v. 21, n. 4, p. 1097-101, fev. 2011.

YAN, G.; WANG, X.; CHEN, Z.; WU, X.; PAN, J.; HUANG, Y.; WAN, G.; YANG, Z. **In-silico ADME studies for new drug discovery: from chemical compounds to Chinese herbal medicines.** *Curr Drug Metab.*, v. 18, n. 6, p. 535-539, jul. 2017.

YU, Z.; IJZERMAN, A. P.; HEITMAN, L. H. **Kv11.1 (hERG)-induced cardiotoxicity: a molecular insight from a binding kinetics study of prototypical Kv11.1 (hERG) inhibitors.** *Br J Pharmacol.* v. 172, n. 3, p. 940-955, 2015.

SOBRE O ORGANIZADOR

ERNANE ROSA MARTINS Doutorado em andamento em Ciência da Informação com ênfase em Sistemas, Tecnologias e Gestão da Informação, na Universidade Fernando Pessoa, em Porto/Portugal. Mestre em Engenharia de Produção e Sistemas pela PUC-Goiás, possui Pós-Graduação em Tecnologia em Gestão da Informação pela Anhanguera, Graduação em Ciência da Computação pela Anhanguera e Graduação em Sistemas de Informação pela Uni Evangélica. Atualmente é Professor de Informática do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás - IFG (Câmpus Luziânia), ministrando disciplinas nas áreas de Engenharia de Software, Desenvolvimento de Sistemas, Linguagens de Programação, Banco de Dados e Gestão em Tecnologia da Informação. Pesquisador do Núcleo de Inovação, Tecnologia e Educação (NITE).

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-113-8

