



UFRJ

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



Campus UFRJ-Macaé
Professor Aloísio Teixeira

CAMPUS – UFRJ MACAÉ

CURSO DE FARMÁCIA

**TRIAGEM VIRTUAL DE METABÓLITOS DE ALGAS DO
GÊNERO *LAURENCIANA* PROTEÍNA QUINASE IRAK-4**

SÁVIO DE SOUZA TAVARES

DEZEMBRO DE 2013

MACAÉ

Sávio De Souza Tavares

Título: Triagem Virtual de
Metabólitos de Algas do
Gênero *Laurencia* com
Proteína Quinase IRAK-4

Monografia Apresentada ao
Curso de Farmácia da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro como um dos requisitos
para obtenção do título de
farmacêutico.

Orientadores: Nelilma Correia
Romeiro, Angélica Ribeiro
Soares

Macaé

Dezembro de 2013

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela oportunidade que me foi dada de passar para uma universidade do tamanho da UFRJ e de estar me graduando neste momento na mesma. Meus pais e irmãos que me acompanharam durante esses longos cinco anos de estudo e sempre me apoiaram. Aos meus familiares e namorada, com destaque para Tia Gerusa, Tia Thereza, Tio Zé e Vovó Elsa que sempre estiveram dispostos a ajudar financeiramente com a passagem quando fosse preciso. Gostaria de agradecer ainda aos meus colegas e amigos. Aos mestres, doutores e pós-doutores que passaram seus conhecimentos e sempre mostraram grande entusiasmo a cada aula. À orientadora Nelilma pela oportunidade que me foi dada ao abrir às portas do laboratório para realização dos projetos confiados a mim. Aos companheiros de laboratório também, tanto os que se foram e os que lá continuam. À Faperj pelo apoio financeiro dado ao projeto. Para finalizar, gostaria de agradecer aos meus companheiros de turma, ou melhor, irmãos e irmãs pelo grande laço que foi criado e pelos momentos difíceis e felizes que passamos juntos.

LISTA DE FIGURAS

1. Reação de fosforilação das proteínas quinases com resíduo de Treonina, Serina e Tirosina.
2. Inibidores de proteínas quinases.
3. Produtos naturais marinhos, inibidores de proteínas quinases.
4. Representação de alguns metabólitos extraídos de algas do gênero *Laurencia* derivados da via do isopreno e acetogeninas com atividade citotóxica e antibacteriana.
5. Cascata de Sinalização da IRAK-4.
6. Estrutura geral do domínio quinase da IRAK-4 e suas particularidades.
7. Resíduos catalíticos de interação com grupos fosfato na IRAK-4.
8. Exemplos de aminoácidos pertencentes aos sítios de ligação aos substratos na IRAK-4 (P+1 e P+2).
9. Inibidores de IRAK-4 descritos na literatura.
10. Inibidor da IRAK-4, T12.
11. Exemplos de inibidores utilizados no *docking* com a IRAK-4..
12. IRAK-4 co-cristalizada com o T12
13. Metabólitos das algas do gênero *Laurencia* utilizado no estudo com a IRAK-4.
14. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemScore e o resíduo Met265 como referência
15. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemPLP e o resíduo Met265 como referência.
16. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemScore e o resíduo Arg273 como referência.

17. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemPLP e o resíduo Arg273 como referência.
18. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemScore e o resíduo Lys213 como referência.
19. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemPLP e o resíduo Lys213 como referência.
20. Gráficos de dispersão correlacionando os scores obtidos no *docking* da Met265 vs pIC₅₀ dos inibidores da literatura por uma linha de tendência e seu R².
21. Gráficos de dispersão correlacionando os scores obtidos no *docking* da Arg273 vs pIC₅₀ dos inibidores da literatura por uma linha de tendência e seu R².
22. Gráficos de dispersão correlacionando os scores obtidos no *docking* da Lys213 vs pIC₅₀ dos inibidores da literatura por uma linha de tendência e seu R².
23. Melhor complexo do Metabólito 16 (anil) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD.
24. Melhor complexo do Metabólito 18 (verde) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD.
25. Melhor complexo do Metabólito 19 (anil) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD.
26. Melhor complexo do Metabólito 15 (anil) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD.
27. Sobreposição do metabólito 16 e metabólito 18 com o T12 em suas melhores “poses” obtidas por *docking* molecular com o programa GOLD na IRAK-4.

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

Gráfico 1. Estruturas representativas e atividades inibitórias dos inibidores de IRAK-4 (pIC_{50}) distribuídas em faixa logarítmica de cinco unidades.

Gráfico 2. Valores de *score* obtidos por *docking* molecular dos metabólitos deste estudo e com IRAK-4 utilizando o programa GOLD.

Tabela 1. Valores de *score* obtidos por *redocking* do inibidor T12 com a IRAK-4.

Tabela 2. Valores de *score* obtidos com função Chemscore, resíduo de referência Lys213, raio 10Å e atividade (pIC_{50}).

LISTA DE ABREVIACOES

ATP –Trifosfato de adenosina

CAMK – proteína quinasedependente de Ca²⁺/calmodulina

cAPK–proteína quinase dependente do AMP cíclico

CDK – proteína quinase dependente de ciclina

GTP – Trifosfato de guanosina

HTS– *High ThroughputScreening*; em português, triagem automatizada em alta escala

IL-1 – interleucina-1

IL-1R –Receptorde interleucina-1

IL-18R –Receptorde interleucina-18

IRAKs –Proteínas quinasesassociadas ao receptor de interleucina-1

IRAK-4 –Proteína quinase-4 associada ao receptor de interleucina-1

IRK – Tirosina quinase receptora de insulina

JAK3 – Quinasejanus3

JNK– c-JunquinaseN-terminal

LBVS–*ligand-based virtual screening*; em português, triagem virtual baseada na estrutura do ligante

LCK – Proteína tirosina quinase linfócito específica

MAPK – Proteína quinase associada amitgenos

MM – Modelagem molecular

NF-κB – Fator nuclear kappa B

PhK – Quinasefosforilase

PKA – Proteína quinase A

PKC – Proteína quinase C

PTK – Proteína tirosina quinase

QF – Química farmacêutica

RTKS–Tirosinasquinases receptoras

SAR –Structureactivityrelationship, em português, relação estrutura atividade

SBVS – *Structure-based virtual screening*; em português, triagem virtual baseada na estrutura do receptor

TIR – Receptores Toll e de IL-1

TLR–Receptor *Toll-like*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

TRAF6 – Fator 6 associado ao receptor de TNF

T12 – 1-(3-hidroxipropil)-2-[(3-nitrobenzoil)amino]-1*H*-benzimidazol-5-il pivalato

VS – *Virtual screening*; em português, triagem virtual

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUÇÃO.....	3
○ PROTEÍNAS QUINASES.....	4
▪ INIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASES.....	6
▪ INIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASES OBTIDOS DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS.....	8
○ PROTEÍNA QUINASE 4 ASSOCIADA AO RECEPTOR DE INTERLEUCINA-1 (IRAK-4).....	10
▪ ESTRUTURA DA IRAK-4.....	12
▪ INIBIDORES DA IRAK-4.....	15
○ MODELAGEM MOLECULAR.....	16
▪ TRIAGEM VIRTUAL DE FÁRMACOS.....	17
JUSTIFICATIVA.....	21
OBJETIVOS.....	22
METODOLOGIA.....	23
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42

RESUMO

As proteínas quinases são enzimas responsáveis pela catálise de reações por fosforilação de proteínas. A fosforilação de resíduos de aminoácidos de proteínas é responsável por vários estímulos extracelulares e intracelulares. As quinases são conhecidas como a maior família de proteínas em eucariotos, sendo chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. Todas as proteínas quinases têm um domínio catalítico que contém uma fenda onde uma molécula de ATP se liga e, no planejamento de fármacos, moléculas que bloqueiam o sítio de ligação de ATP são promissoras. Um alvo recente no contexto da modulação da resposta inflamatória é a IRAK-4 que está envolvida na cascata *downstream* sendo responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias e pela expressão de moléculas coestimulatórias. Várias classes de inibidores de IRAK-4 têm sido relatadas na literatura, visando à terapia de doenças autoimunes e inflamatórias. Alguns inibidores de quinases obtidos de produtos naturais marinhos são conhecidos, sendo um deles o ácido atomárico. Alguns metabólitos de *Laurencia* apresentam atividades antibacteriana e citotóxica, principalmente. Esse projeto visa à modelagem molecular da IRAK-4 e a triagem virtual como ferramenta na descoberta e no planejamento racional de substâncias inovadoras de origem sintética e obtidas de produtos naturais marinhos. Como resultado se tem a análise do complexo ligante-proteína através do *redocking* do T12, análise da melhor função de pontuação por gráficos de dispersão e análise das interações intermoleculares entre a IRAK-4 e metabólitos das algas do gênero *Laurencia* que foram utilizados. Em conclusão, este estudo sugere que as melhores funções para serem utilizadas em um docking molecular com a proteína quinase IRAK-4 são a ChemPLP e ChemScore e nem sempre o maior score que é gerado pelo programa GOLD é de fato o melhor complexo proteína-ligante do estudo.

Palavras-chave: IRAK-4, modelagem molecular, produtos naturais marinhos, *docking*, inibidores.

ABSTRACT

Protein kinases are enzymes responsible for the catalysis of reactions for protein phosphorylation. Phosphorylation of amino acid residues of protein is responsible for various extracellular and intracellular stimuli. Kinases are known as the largest family of proteins in eukaryotes, being central key intracellular communication in control, regulation and signal transduction. All protein kinases that have a catalytic domain contains a slot where a molecule binds ATP and in drug design molecules that block ATP binding site are promising. A recent target in the context of modulation of the inflammatory response is IRAK - 4 that is involved in the cascade downstream being responsible for the production of proinflammatory cytokines and the expression of costimulatory molecule. Several classes of inhibitors of IRAK -4 have been reported in the literature, aiming to the therapy autoimmune and inflammatory diseases. Some kinase inhibitors derived from natural marine products are known, one being the atomárico acid. Some metabolites of *Laurencia* exhibit antibacterial and cytotoxic activities mainly. This project aims to molecular modeling of IRAK - 4 and virtual screening as a tool in the discovery and rational design of innovative substances of synthetic origin and obtained from marine natural products. As a result we have the analysis of ligand-protein complex through redocking T12, analysis of best scoring function for scatter plots and analysis of intermolecular interactions between IRAK -4 and metabolites of algae of the genus *Laurencia* were used. In conclusion, this study suggests that the best functions for use in molecular docking with the protein kinase IRAK - 4 are ChemPLP and ChemScore and not always the highest score that is generated by the GOLD program is in fact the best protein-ligand complex the study.

Keywords : IRAK-4, molecular modeling, marine natural products, docking, inhibitors.

1. INTRODUÇÃO

As doenças inflamatórias de caráter crônico, assim como as doenças autoimunes fazem parte de um conjunto de problemas de saúde que afetam milhões de pessoas no mundo todo. Pelo fato de estarem associadas em alguma etapa a outras doenças comuns, como a diabetes do tipo 2 (DONATH e SHOELSON, 2011), doenças cardiovasculares (MILLER e MCINNES, 2011; MASKREY *et al.*, 2011) e câncer, sua gravidade e importância são devido a disfunções das suas vias sinalizadoras. A compreensão da natureza da modulação inflamatória, assim como dos sistemas sinalizadores complexos envolvidos são etapas chave para o planejamento de intervenções terapêuticas potenciais.

A associação entre inflamação crônica e câncer não é nova. No entanto, as associações reconhecidas anteriormente tinham implicações práticas limitadas e só é relativamente recente a compreensão dos mecanismos moleculares do câncer e a interação entre o sistema imunológico e a angiogênese que têm levado ao potencial para a intervenção direcionada para prevenir e tratar um número de diferentes tipos de câncer. Foi reconhecido no século XIX, que certos tipos de câncer foram devido à irritação crônica, principalmente o câncer do escroto de limpadores de chaminés, onde o agente irritante era o pó de carvão e câncer de mama masculino associado à irritação crônica por chaves. Foi Virchow, em 1863, que escreveu sobre as possibilidades de câncer decorrentes de locais de inflamação crônica, observando que o câncer é semelhante a feridas que não conseguiram curar/cicatrizar. As semelhanças entre a cicatrização de feridas e estroma tumoral foram revistos mais à frente por Dvorak. Existem outras condições inflamatórias crônicas que são reconhecidas como estar associadas a um risco aumentado de câncer, entre elas incluem a esquistossomose (bexiga) e colite ulcerativa (cólon). A compreensão recente que muitas infecções bacterianas e virais crônicas também estão associados com a formação de tumor fornece os exemplos mais convincentes. Além de esquistossomose e câncer de bexiga, o *Helicobacter pylori*, originalmente associado com gastrite crônica, é agora reconhecido como um agente causador de adenocarcinoma gástrico e linfoma linfóide do tecido gástrico associado à mucosa. (WILLIAMS E POUNDER, 1999).

Neste sentido, é de extrema relevância que sejam identificados alvos (proteínas) de micromoléculas (ligantes) que possuam papéis centrais na rede complexa da inflamação, que envolve citocinas como Interleucina 1 (IL-1), fator nuclear *kappa* B (NF- κ B) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), entre outras, extremamente importantes para o desenvolvimento do processo inflamatório (RAMAN *et al.*, 2011).

1.1. PROTEÍNAS QUINASES

As proteínas quinases são enzimas responsáveis pela fosforilação de proteínas, através da transferência de um grupo fosforila de ATP e, em casos excepcionais, de GTP, para resíduos de serina, treonina ou resíduos de tirosina. A proteína quinase capaz de fosforilar resíduos de tirosina é denominada tirosina quinase e a que fosforila resíduos de serina e treonina é denominada serina/treonina quinase (Figura 1). A fosforilação destes resíduos é responsável por vários estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem um mecanismo altamente eficiente para o controle de toda a atividade de proteínas, como, por exemplo, a cascata de sinalização de segundos mensageiros (SILVA *et al.*, 2009).

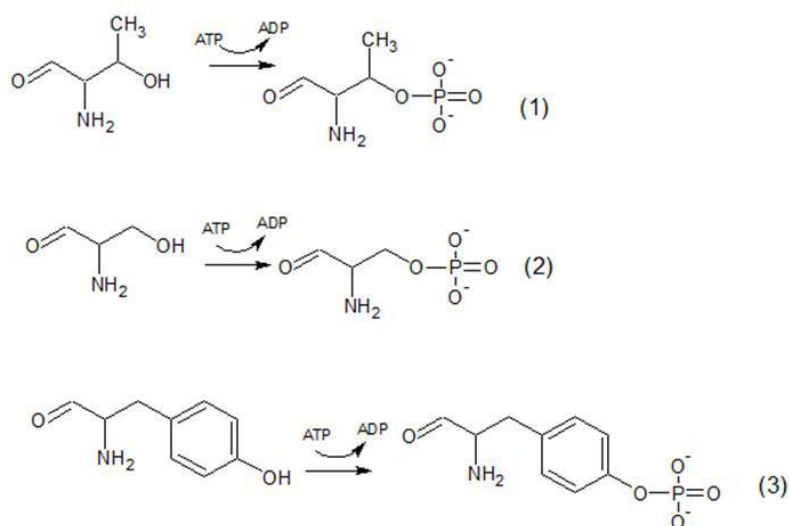


Figura 1. Esquema da reação de fosforilação das proteínas quinases com resíduos de Treonina (1), Serina (2) e Tirosina (3).

A atividade catalítica das proteínas quinases pode favorecer cineticamente a reação entre os resíduos de aminoácidos e o ATP; entretanto, a hidrólise espontânea de monoéster fosfato possui uma cinética lenta nas condições fisiológicas normais, tornando necessária a ação de fosfatases para que a reação

seja acelerada (BRIDGES *et al.*, 2001). Dessa forma, a fosforilação de proteínas é reversível e controlada por enzimas em ambas as direções.

As quinases são conhecidas como a maior família de proteínas em eucariotos (MANNING *et al.*, 2002) e são a chave central da comunicação no controle intracelular, regulação e transdução de sinais. O mecanismo regulador desse tipo de proteína inclui vários fenômenos, que vão desde alterações químicas e estruturais, até o controle transcricional. Por isto, o estudo do mecanismo de controle das proteínas quinases é foco para muitas pesquisas, principalmente para a descoberta de novos fármacos (ENGH *et al.*, 2001).

Existem mais de 50 estruturas cristalinas do sítio catalítico dessas proteínas foram publicadas no PDB (*Protein Data Bank*) e já foram identificadas cerca de 2000 quinases no genoma humano (LIAO, 2007).

Em função de seu papel essencial que desempenha no processo de apoptose, proliferação celular, oncogênese, entre outros, a desregulação ou superexpressão de proteínas quinases está intimamente ligada a doenças como asma, câncer, distúrbios cardiovasculares, diabetes e doenças do sistema nervoso central, entre outras (NARAYANA *et al.*, 1999; KOIDE *et al.*, 1995). O envolvimento de proteínas quinases no desenvolvimento e manutenção de tumores malignos humanos pode ocorrer de diferentes maneiras: rearranjo genômico, incluindo translocação cromossomal, gerando fusão de proteínas que contêm o domínio catalítico e uma proteína não relacionada que usualmente fornece a função de dimerização, bem como a fusão dos genes Bcr-Abl em leucemia mielóide crônica; (CORTES *et al.*, 1996) mutações que conduzem à atividade quinase; desregulação da atividade quinase por ativação de oncogenes ou perda da função de supressores tumorais (BLUME-JENSEN *et al.*, 2001).

Proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC), proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina (CAMK), proteína quinase dependente de ciclina (CDK), tirosinas quinases (PTK) e tirosinas quinases receptoras (RTKS) são alguns exemplos de quinases existentes e, descobertas mais recentemente, as proteínas quinases associadas ao receptor de interleucina-1 (IRAKs, do inglês "Interleucin Receptor Associated Kinases"), também fazem parte da grande família de proteínas quinases.

1.1.2. INIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASES

Todas as proteínas quinases têm um domínio catalítico que contém uma fenda onde uma molécula de ATP se liga. O conhecimento estrutural desse domínio tem sido bastante utilizado no planejamento de moléculas que façam a inibição alterando a conformação espacial destas enzimas e, conseqüentemente, bloqueando os sítios de ligação do ATP. Além de ligações de hidrogênio tipo doador e aceptor, existem interações de natureza lipofílica da quinase com o ATP. Os sítios de ligação de ATP entre as quinases são muito conservados, porém as regiões próximas e adjacentes a esse variam de uma quinase para outra, fazendo com que essas regiões também sejam utilizadas no planejamento de fármacos inibidores de quinases (FABBRO *et al.*, 2002).

Em 1986, Tamaoki e colaboradores identificaram a estaurosporina (1) como um potente inibidor de proteína quinase C (PKC), aumentando assim o interesse pela síntese e estudo de inibidores deste tipo de quinase. Porém, como essa enzima apresenta várias isoformas, a sua inibição seletiva não é trivial. Vários inibidores de quinases foram desenvolvidos e são utilizados para diferentes tipos de disfunções fisiológicas desde então; entre estes destacam-se os inibidores de proteína quinase dependente de ciclina CDK (2) e inibidores do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (3), entre outros (Figura 2).

Uma nova classe de inibidores foi criada algum tempo depois dos primeiros desenvolvidos, os inibidores de receptores múltiplos de quinases ou inibidores multiquinases. Houve um tempo no qual os inibidores de receptores múltiplos de quinases eram considerados um risco. Contudo, em 2006 pela “*Battling breast cancer*” novas evidências mostraram que não somente o organismo tolera o ataque multipropagado, como também a estratégia mais apropriada é justamente atacar a complexa via da comunicação celular. Nesta classe se enquadram as quinazolininas (4), pirrolotriazinas (5), uréias *N*, *N'*-dissubstituídas e oxindóis (6), diidroindenopirazóis (7) e derivados de pirimidinas (8) (Figura 2) (MASTALERZ *et al.*, 2007; DANIEL *et al.*, 2006; AKRITOPOULOU-ZANZE *et al.*, 2007; BUSCHBECK *et al.*, 2005).

A ligação a dois sítios pode aumentar a potência e especificidade de inibidores para muitas enzimas. Inibidores desse tipo podem, por exemplo, ligar-se ao sítio

ativo e ao domínio SH2 de uma Src quinase ao mesmo tempo. Os principais inibidores que se ligam a duas regiões de uma quinase são divididos em quatro categorias: derivados de sulfonilbenzoil (9), derivados de ácidos carboxílicos (10), derivados de dipeptídeos (11) e derivados de fosfodiésteres (12) (Figura 2) (PARANG *et al.*, 2001).

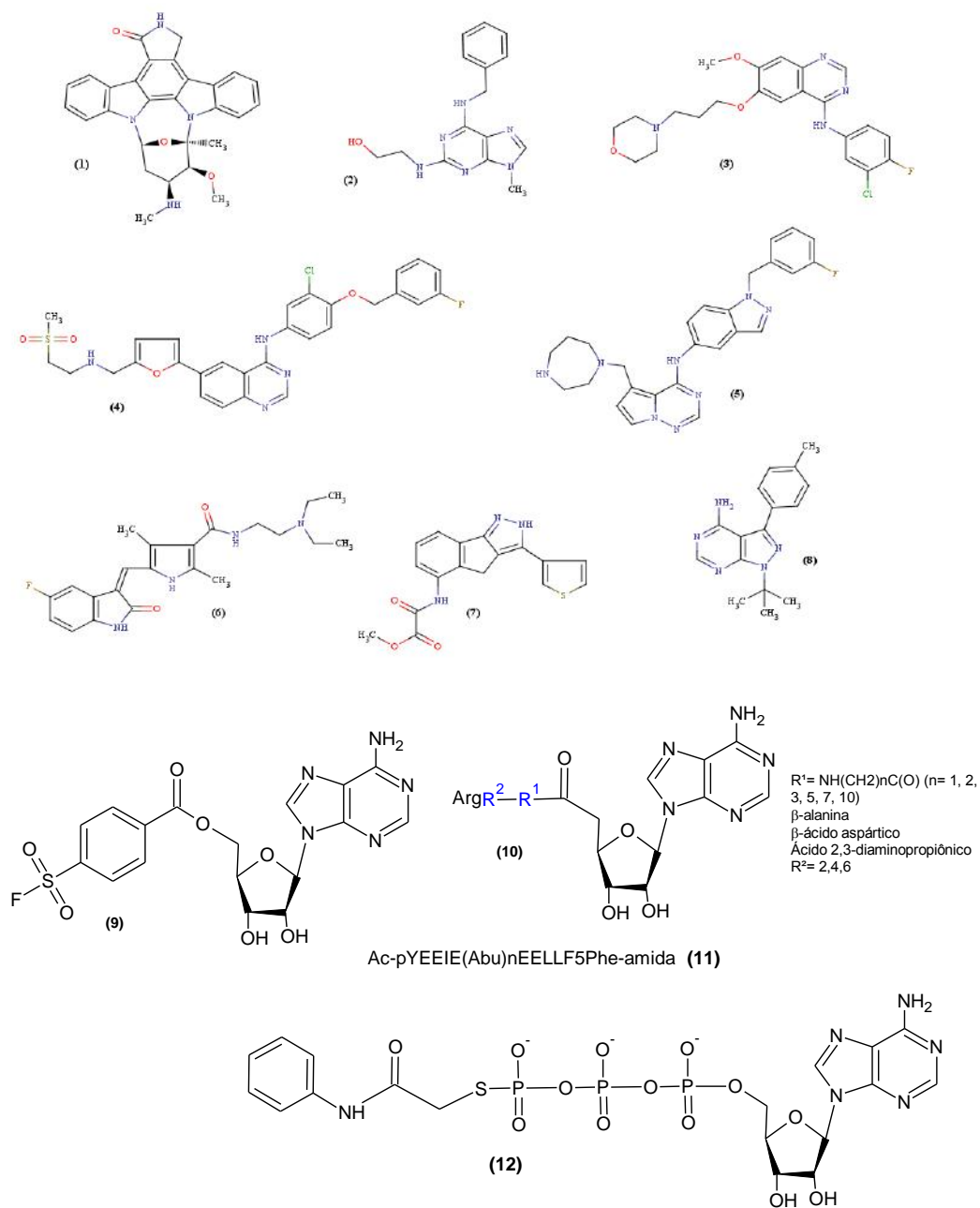


Figura 2. Inibidores de proteínas quinases. Estaurosporina (1), olomoucina (2), gefitinibe (Iressa®) (3), lapatinibe (Tykerb®) (4), pirrolotriazina inibidora de EFGR e HER2 (5), Sunitinibe, SU11248 (6), diidroindenopirazol para receptor do domínio de inserção de

quinase(KDR) (7), PP1 (8), sulfonilbenzoil inibidor de PKC e PKA (9), derivados de ácidos carboxílicos inibidores de PKC e PKA (10), derivado de peptídeo inibidor de quinasesSrc (11) e derivado fosfodiéster inibidor de PKA (12).

1.1.2.1. INIBIDORES DE PROTEÍNAS QUINASES OBTIDOS DE PRODUTOS NATURAIS MARINHOS

Os produtos naturais obtidos de plantas e microorganismos terrestres têm sido fontes tradicionais de fármacos há tempos. Exemplos dessa classe de substâncias são a morfina, obtida de sementes de papoula, os glicosídeos cardiotônicos, obtidos de *digitalis* e as penicilinas, dos fungos. Programas modernos de descoberta de fármacos foram bem-sucedidos em diversos casos, devido à utilização de moléculas isoladas de produtos naturais, que sempre têm sido arcabouços moleculares importantes para a investigação de novos fármacos (MOLINSKI *et al.*, 2009; BUTLER, 2004; BLUNT *et al.*, 2011).

O primeiro fármaco isolado de produtos naturais marinhos, o ziconotídeo(ω -conotoxina MVIIA), um peptídeo originado de um molusco marinho, foi aprovado em 2004 nos Estados Unidos, com o nome comercial de Prialto®, para o tratamento de dor crônica em danos da medula espinhal (TERLAU e OLIVERA, 2004). Além disso, vários produtos naturais marinhos estão sendo avaliados em testes clínicos de Fase I-III nos Estados Unidos e Europa, para o tratamento de vários tipos de câncer, entre outros tipos de disfunções (MAYER e GUSTAFSON, 2008). Também foram relatados produtos naturais marinhos inibidores de proteínas quinases como a lamelarina N (13) e a Variolina B (14) (BAUNBECK *et al.*, 2008; SIMONE *et al.*, 2005), entre outros (MAYER e GUSTAFSON, 2008).

Alguns terpenos isolados de *Styopodium zonale* (*Dictyotaceae*), uma alga marinha parda, foram descritos como antitumorais, inibidores de tirosina quinase p56^{lck}, incluindo-se o composto, o ácido atomárico (15), e o ácido estipoquinônico (16), (WESSELS *et al.*, 1999), que apresentam potencial para estudos de simplificação molecular, visando à investigação dos grupos farmacofóricos para a atividade inibidora de proteínas quinases, numa estratégia que tem sido utilizada com sucesso no desenvolvimento de fármacos utilizando como referência o arcabouço molecular de produtos naturais (NEWMAN *et al.*, 2003; BUTLER, 2004).

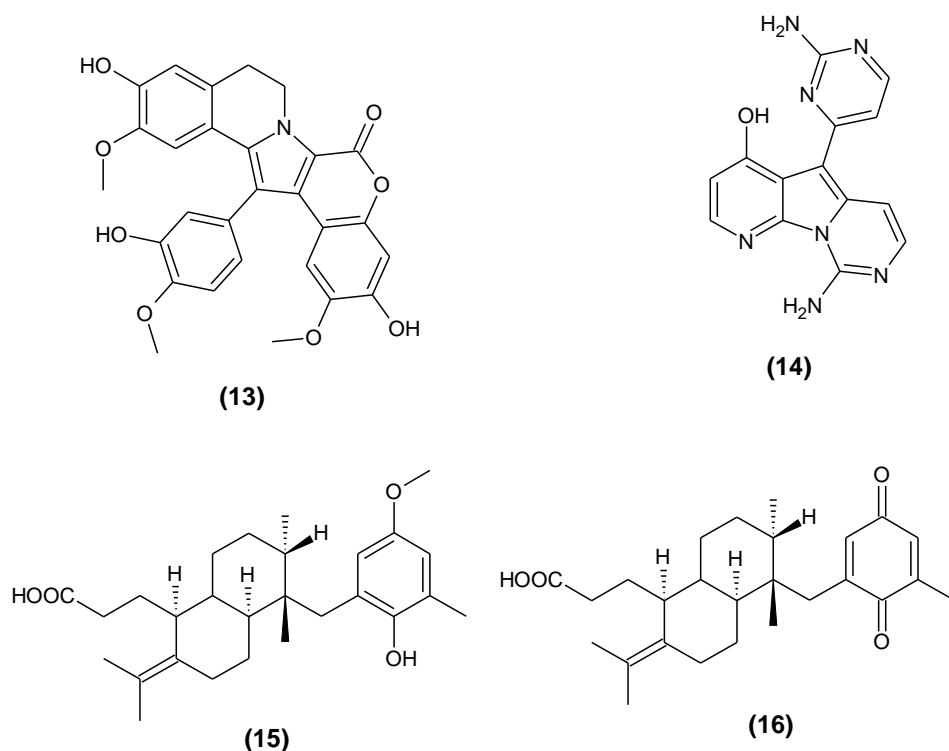


Figura 3. Produtos naturais marinhos, inibidores de proteínas quinases.

Nesse contexto, o Grupo de Pesquisas em produtos Naturais de Organismos Aquáticos (GPNOA-NUPEM-UFRJ-Macaé), coordenado pela Prof^a. Angélica Ribeiro Soares tem contribuído imensamente para o avanço no conhecimento do potencial bioativo de produtos naturais. O grupo tem demonstrado a atividade biológica de uma variedade de substâncias obtidas espécies marinhas como as algas pardas *Styopodium zonale* e vermelha *Laurencia dendroidea*, entre outras (SOARES *et al.*, 2008; MACHADO *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2010; MACHADO *et al.*, 2011).

Segundo Soares A. R., Machado F L. da S. e colaboradores, as algas vermelhas do gênero *Laurencia* são conhecidas como uma riquíssima fonte de metabólitos secundários. Os principais metabólitos já isolados de algas deste gênero são sesquiterpenos (WRIGHT *et al.*, 1991), diterpenos (ROCHFORT & CAPON, 1996), triterpenos (SOUTO *et al.*, 2002) e acetogeninas (ILIOPOULOU *et al.*, 2002), podendo ou não conter halogênios em sua estrutura (Figura 4).

Alguns estudos mostram que os metabólitos de *Laurencia* podem apresentar múltiplas funções, como proteção contra herbívoros e organismos incrustantes,

aumentando a capacidade adaptativa do indivíduo ao ambiente (PEREIRA *et al.*, 2003). A mediação destes metabólitos em interações entre organismos pode indicar que estes metabólitos também atuam em outros sistemas biológicos. Com isso, surge a motivação para a busca de metabólitos de interesse terapêutico. Muitos estudos têm verificado diferentes e importantes ações farmacológicas de metabólitos de algas do gênero *Laurencia* (KONIG *et al.*, 1994), principalmente citotóxica e antibacteriana.

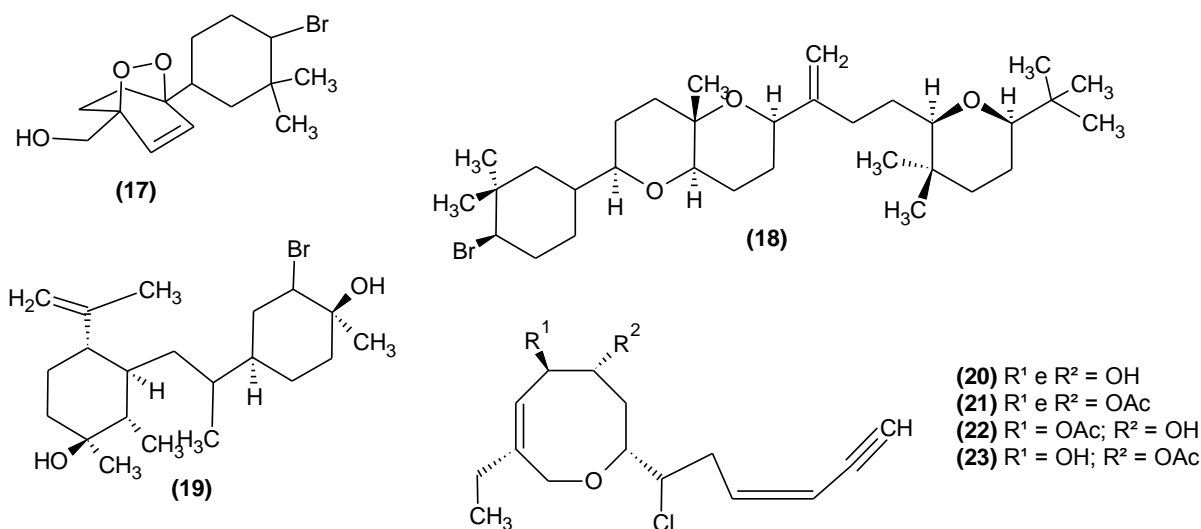


Figura 4. Representação de alguns metabólitos extraídos de algas do gênero *Laurencia* derivados da via do isopreno (sesqui, di e triterpenos) e acetogeninas com atividade citotóxica e antibacteriana. Sesquiterpene majapoleno A (17), triterpene isodeidrotirsiferol (18), diterpene neorogioldiol B (19) e uma série de acetogeninas (20, 21, 22 e 23).

1.2. PROTEÍNA QUINASE 4 ASSOCIADA AO RECEPTOR DE INTERLEUCINA-1 (IRAK-4)

Um alvo recente no contexto da modulação da resposta inflamatória é a IRAK-4 (LI *et al.*, 2002; FLANNERY e BOWIE, 2010), uma Ser/Thr quinase que foi revelada ser um transdutor de sinal essencial na cascata *downstream* dos receptores de interleucina-1 (IL-1R), de interleucina-18 (IL-18R) e dos receptores *Toll-like* (TLRs), os quais apresentam como característica em comum a presença de domínios intracelulares conservados de receptores Toll e de IL-1 (TIR) (O'NEILL *et al.*, 2008). Os TLRs possuem um papel central na resposta imune inata em mamíferos (AKIRA, 2003; SUHIR e ETZIONI, 2010), dando início à primeira cascata de sinais

inflamatórios e respostas imunes inatas após a sua ativação (TAKEDA e AKIRA, 2004; AKIRA, 2006).

Sugere-se que moléculas sinalizadoras chave na cascata *downstream* ao IL-1R e aos TLRs teriam efeitos impactantes na resposta inflamatória e seriam alvos terapêuticos efetivos para o tratamento de várias doenças associadas à disfunção da resposta inflamatória. Após a ligação específica de ligantes ao TLR, o mesmo se associa a proteínas adaptadoras intracelulares, como a MyD88 (KAWAI *et al.*, 1999), a qual recruta quinases associadas ao receptor de interleucina-1 (IRAKs) para o complexo receptor (Burns *et al.*, 1998).

O ligante (IL-1, LPS, etc.) ao se ligar ao receptor de IL-1 ou *Toll like*, ativa a proteína acoplada ao receptor, a MyD88, a qualrecruta a proteína IRAK-4 que é fosforilada e após isso ela fosforila a IRAK-1 que é capaz de se autofosforilar. Essa autofosforilação da IRAK-1 é responsável pela ativação do NF- κ B também de sua degradação através de ubiquitinação. (Figura 5).

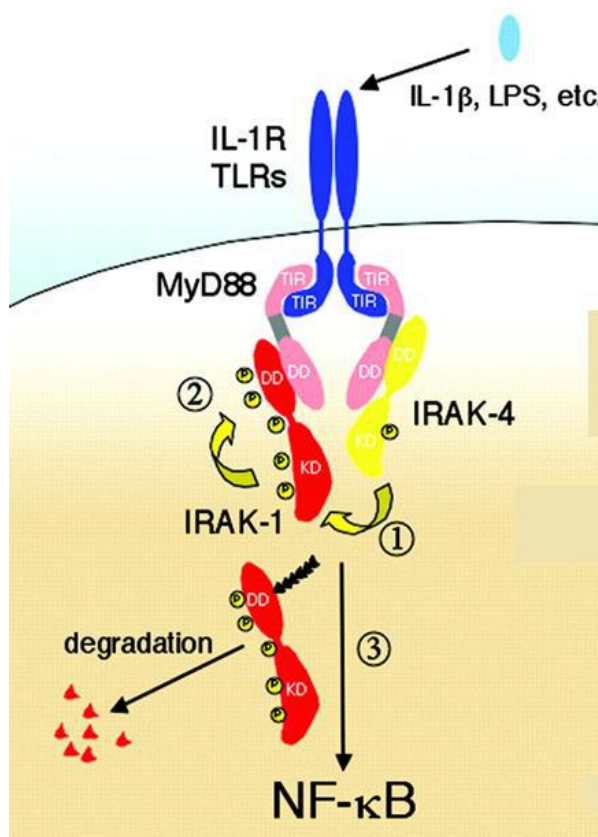


Figura 5. Cascata de Sinalização da IRAK-4. A proteína MyD88 se liga a IRAK-1, com a ativação da IRAK-4 e posteriormente do NF- κ B. A estimulação de IL-1 pelo IL-1Rs induz a montagem de um complexo de sinalização contendo MyD88 e IRAK-1 e IRAK-4. Dímeros de

MyD88 ligam IRAK-1 e IRAK-4 trazendo os respectivos domínios quinases em estreita associação (1). Isto resulta na fosforilação de IRAK-1 por IRAK-4, o qual, por sua vez induz a atividade de quinase de IRAK-1 conduzindo à sua autofosforilação (2). Estando autofosforilada, a IRAK-1 se liga primeiro ao fator TNFR-6-associado (não representado) que irá ativar o NF- κ B (3) e, em seguida, é ubiquitinada (setas múltiplas ligada a IRAK-1) e degradada. Para simplicidade, algumas moléculas adaptadoras foram omitidas.

A proteína IRAK-4 tem despontado como uma molécula com estas características, por ser essencial para a sinalização dos receptores TIR, sendo uma quinase que é recrutada logo após a ativação dos receptores por ligantes, além de interagir com várias moléculas chave sinalizadoras *downstream* (LI *et al.*, 2002) e é importante para a produção de citocinas pró-inflamatórias e para a expressão de moléculas coestimulatórias em resposta à sinalização dos TLRs (SUZUKI *et al.*, 2003; Cao *et al.*, 1996). Assim que é fosforilada, a IRAK-4 se dissocia do complexo receptor e associa-se ao fator 6 associado ao receptor de TNF (TRAF6), que é membro da família de proteínas TRAF, as quais possuem papel essencial em vias sinalizadoras de vários receptores celulares, *e.g.* TLR, levando à ativação do NF- κ B e à indução de citocinas pró-inflamatórias (KOBAYASHI *et al.*, 2004).

1.2.1. ESTRUTURA DA IRAK-4

O domínio quinase da IRAK-4 possui uma estrutura clássica de proteínas quinases, onde o sítio de ligação ao ATP se encontra em sanduíche, num arranjo entre dois domínios (Figura 6). A comparação estrutural da IRAK-4 com outras Ser/Thr ou Tirosinas quinases mostra que a maioria dos elementos estruturais são bem conservados. Entretanto, a estrutura cristalográfica da IRAK-4 apresenta características únicas, incluindo, por exemplo, uma hélice α adicional a partir da extensão do domínio N-terminal e um *loop* maior entre as hélices α D e α E, entre outros (WANG *et al.*, 2006).

Outra característica interessante refere-se ao padrão de interação do fosfato da IRAK-4, em comparação a outras Ser/Thr quinases, onde são observados dois ou três resíduos de ligação ao fosfato (ZHENG *et al.*, 1993; CANAGARAJAH *et al.*, 1997; BROWN *et al.*, 1999). Entre os resíduos carregados positivamente, incluem-se aqueles pertencentes ao *loop* catalítico e à hélice α C, que são importantes para

promover a orientação correta e o ambiente eletrostático para Asp311, que funciona como a base catalítica (JOHNSON *et al.*, 1996). Porém, na IRAK-4, o padrão das interações do fosfato é mais parecido com aquele observado em Tirosinas Quinases (BOGGON *et al.*, 2005), que possuem um *motif* em comum para a interação do fosfato, representado por um único resíduo de arginina ou de lisina no *loop* de ativação, em posições equivalentes a Arg334 da IRAK-4.

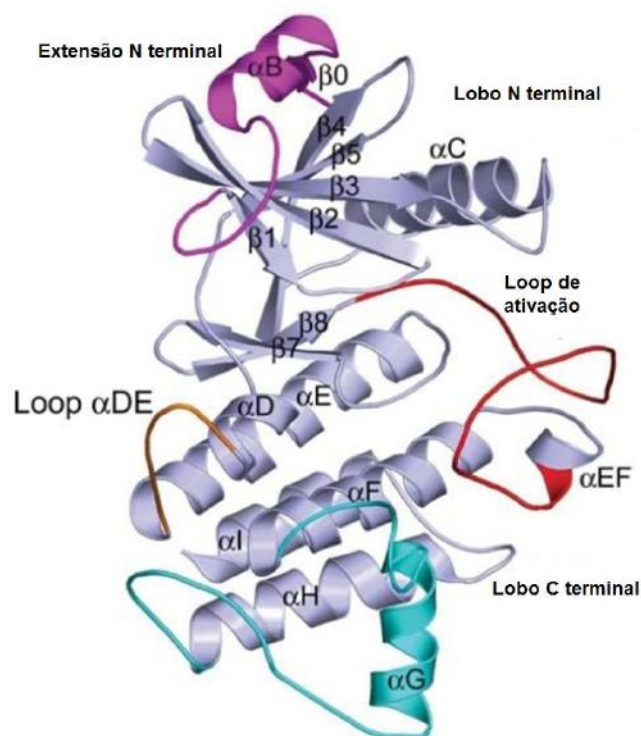


Figura 6. Estrutura geral do domínio quinase da IRAK-4 e suas particularidades. Figura gerada no programa Pymol, v. 0.99 (DELANO, 2002) a partir da estrutura da IRAK-4 obtida no PDB com o código 2NRU (BERMAN *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2006).

Dessa forma, o padrão de interação do fosfato com a IRAK-4 é quase idêntico ao da proteína tirosina quinase receptora de insulina (IRK), embora a IRAK-4 seja uma Ser/Thr quinase (Figura 7).

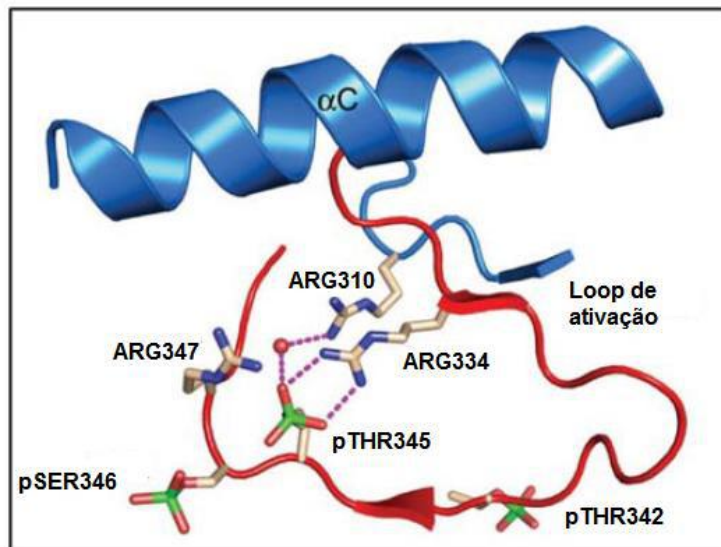


Figura 7. Resíduos catalíticos de interação com grupos fosfato na IRAK-4. Figura gerada no programa Pymol, v. 0.99 (DELANO, 2002) a partir da estrutura da IRAK-4 obtida no PDB com o código 2OIB (BERMAN *et al.*, 2000; KUGLSTATTER *et al.*, 2007).

Além de apresentar um padrão de interação com o grupo fosfato diferente de outras Ser/Thr quinases, a IRAK-4 também possui um sítio de ligação a substratos que é diferenciado (WANG *et al.*, 2009). O enovelamento da bolsa P+1 da IRAK-4, definida pela superfície do *loop* de ativação com a hélice α EF (resíduos I348VGTAYM355), é bem semelhante ao da proteína quinase dependente do AMP cíclico (cAPK) e quinase fosforilase (PhK), com um resíduo de treonina conservado (Thr351, que corresponde a Thr186 na PhK), que interagem com a base catalítica Asp311 e Lys313, pertencentes ao *loop* catalítico (Figura 8).

Além disso, há uma diferença significativa no tamanho do sítio de ligação da IRAK-4. Ao invés de estar alinhado com todos os resíduos hidrofóbicos na bolsa P+1, tais como Val183, Pro187 e Leu190 na PhK, e Leu198, Pro202 e Leu205 na cAPK, IRAK-4 possui Ile348, Thr352 e Met355. Sugere-se, então que, devido a este alinhamento diferenciado, os substratos irão provavelmente adotar uma conformação semelhante em torno do sítio P+1, porém com especificidades diferentes. Um resíduo grande e mais polar em P+1 será mais adequado para interagir com Thr352 no *loop* P+1. Adicionalmente, dois resíduos carregados, Arg347 no *loop* de ativação e Asp220 no *loop* próximo à hélice α C, alcançam o sítio

P+2. Em suma, um resíduo polar ou carregado em P+2 será preferencial para os substratos da IRAK-4 (WANG *et al.*, 2009).

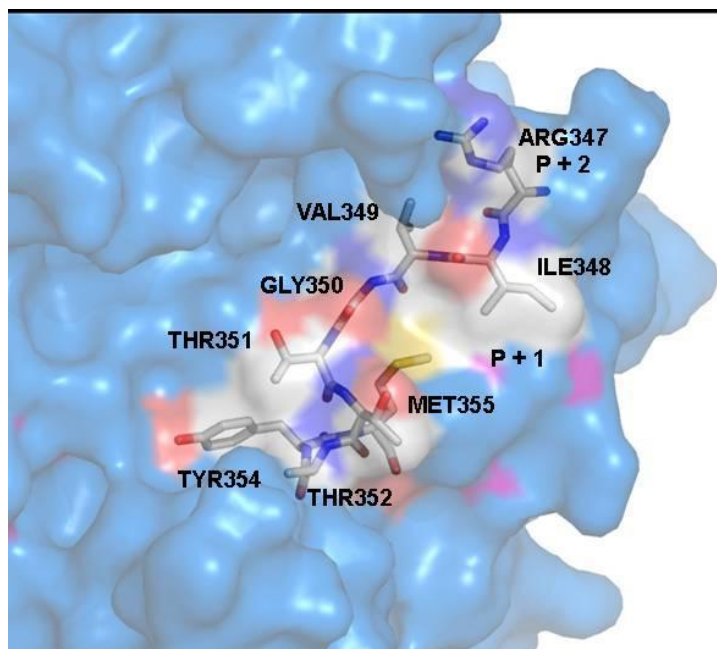


Figura 8. Exemplos de aminoácidos pertencentes aos sítios de ligação aos substratos na IRAK-4 (P+1 e P+2). Figura gerada no programa Pymol, v. 0.99 (DELANO, 2002) a partir da estrutura da IRAK-4 obtida no PDB com o código 2NRU (BERMAN *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2006).

1.2.2. INIBIDORES DA IRAK-4

Várias classes de inibidores de IRAK-4 têm sido relatadas na literatura, visando à terapia de doenças autoimunes e inflamatórias (WANG *et al.*, 2009). As principais classes de inibidores relatadas incluem amino benzimidazóis (POWERS *et al.*, 2006), amidas com o núcleo tiazol ou piridina (BUCKLEY *et al.*, 2008a), imidazo[1,2- α]piridinas (BUCKLEY *et al.*, 2008b; BUCKLEY *et al.*, 2008c), imidazo[1,2- β]piridazinas e benzimidazol-indazóis (DURAND-REVILLE *et al.*, 2008; GUCKIAN *et al.*, 2008). As estruturas químicas de alguns inibidores desta classe estão representadas abaixo (Figura 9):

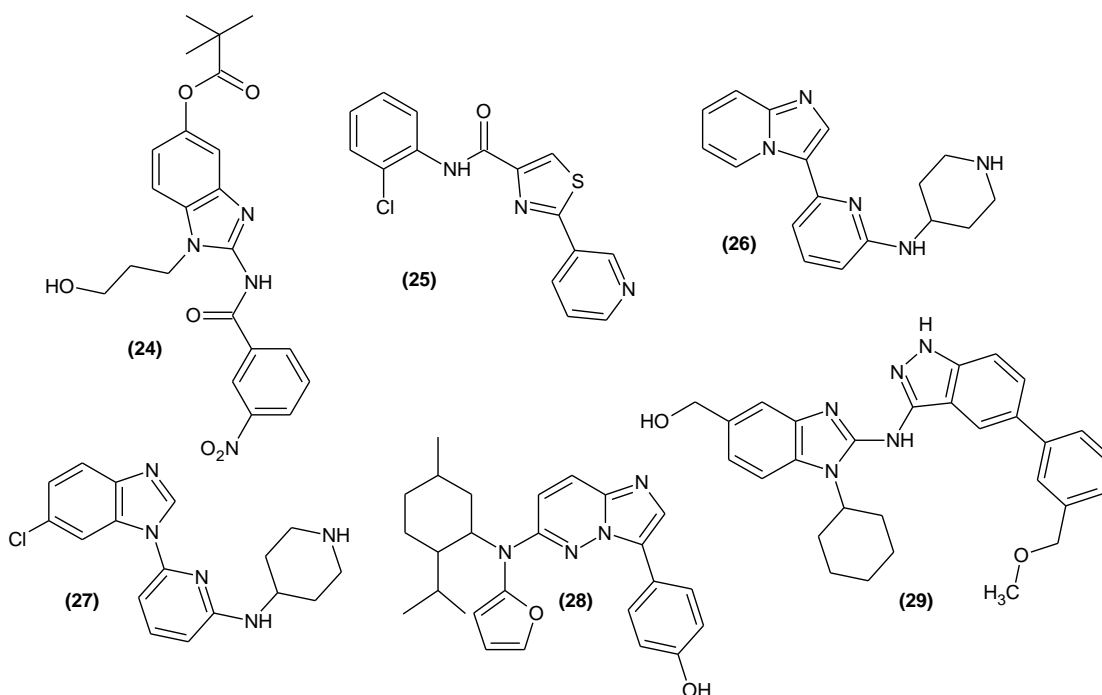


Figura 9. Inibidores de IRAK-4 descritos na literatura, pertencentes à classe dos amino benzimidazóis (24), tiazol-amidas (25), imidazo[1,2 α]-piridinas (26), benzimidazol-piridinas (27), imidazo[1,2 β]-piridazinas (28) e indazóis (29).

1.3. MODELAGEM MOLECULAR

A modelagem molecular constitui-se em uma ferramenta do planejamento racional envolvendo a compreensão da interação ao nível atômico de uma substância com seu receptor, sob os pontos de vista qualitativo e quantitativo. Permite ainda que se analise profundamente, não só a estrutura molecular compreendida em determinado sistema biológico, como também fornece meios para prever a potencialidade de moléculas candidatas a compostos bioativos. De forma simplificada, pode ser considerada como conjunto de técnicas computadorizadas baseadas em métodos de química teórica e/ou dados experimentais (COHEN, 1996).

Um dos avanços mais importantes no planejamento e na descoberta de novos fármacos tem sido a utilização da modelagem molecular (MM). Atualmente, a MM é uma ferramenta indispensável não somente no processo de descoberta de novos fármacos, mas também na otimização de protótipos já existentes e no planejamento racional de candidatos a fármacos (COHEN, 1996; SANT'ANNA, 2002; CARVALHO

et al., 2005; WERMUTH, 2009). Segundo a IUPAC, a MM é a investigação das estruturas e das propriedades moleculares pelo uso de química computacional e técnicas de visualização gráfica, visando fornecer uma representação tridimensional, sob um dado conjunto de circunstâncias (SANT'ANNA, 2002).

O grande desenvolvimento da MM nos últimos anos deveu-se em grande parte ao avanço dos recursos computacionais em termos de *hardware* (velocidade de cálculo) e de *software* (programas computacionais), além dos avanços em química computacional, ressonância magnética nuclear, cristalografia de raios-X, bioquímica e biologia molecular (COHEN, 1996). Isto levou a uma grande contribuição na descoberta de candidatos a fármacos, conduzindo a rápidos progressos em pesquisas e despertando o interesse tanto do meio acadêmico como de indústrias farmacêuticas (COHEN, 1996; WERMUTH, 2009). Além disso, a MM pode desempenhar papel importante no processo interativo de ensino e aprendizagem, por ressaltar aspectos importantes das disciplinas de Planejamento de Fármacos e Química Farmacêutica (QF) (COHEN, 1996; SANT'ANNA, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005; WERMUTH, 2009). Como consequência, a elucidação dos mecanismos envolvidos nas ações moleculares dos fármacos pode ser compreendida pela integração de conhecimentos fundamentais de Química Orgânica, Bioquímica, Biologia Molecular e Farmacologia. Os estudos de propriedades estéricas, eletrônicas e físico-químicas, de mecanismo de ação, das relações entre estrutura química e atividade biológica (SAR) e das interações fármaco/ligante-receptor são aspectos que podem ser explorados através da MM (SANT'ANNA, 2002; CARVALHO *et al.*, 2005; WERMUTH, 2009).

1.3.1. TRIAGEM VIRTUAL DE FÁRMACOS

Considerando-se o expressivo número de alvos biológicos (proteínas alvo) promissores para o planejamento de fármacos, as técnicas de triagem biológica automatizada de alta produtividade (HTS - *high throughput screening*) e de triagem virtual (VS - *virtual screening*) têm ocupado papel de destaque entre as estratégias modernas exploradas na identificação de novas substâncias bioativas (LOMBARDINO e LOWE III, 2004). A triagem virtual é um método *in silico* (“computacional”) empregado no estudo de grandes bases de dados de compostos,

com o objetivo de identificar moléculas pequenas com elevado potencial de interagirem com proteínas alvo, para posterior avaliação bioquímica *in vitro* (GUIDO, R. V. C. *et. al*, 2008 e ANDRICOPULO, A. D. *et. al*, 2009).

A triagem virtual é definida geralmente como um processo em que grandes bibliotecas de compostos são automaticamente avaliadas usando técnicas computacionais (BOTTEGONI, G. *et. al*, 2012). Seu objetivo é descobrir moléculas potencialmente bioativas em grandes bancos de dados de compostos químicos (geralmente ligantes para alvos biológicos) e remover moléculas identificadas como tóxicas ou que possuam propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas desfavoráveis (EKINS, S. *et. al*, 2007).

As técnicas de triagem virtual podem se dividir em duas grandes categorias. A primeira tem como base a estrutura de ligantes bioativos (LBVS - *ligand-based virtual screening*; em português, triagem virtual baseada na estrutura do ligante) e a segunda é baseada na estrutura do receptor biológico (SBVS - *structure-based virtual screening*; em português, triagem virtual baseada na estrutura do receptor). Nestes casos, centenas de milhares de moléculas podem ser avaliadas com base tanto na similaridade de ligantes conhecidos (LBVS), quanto no acoplamento a sítios de ligação específicos de proteínas alvo (SBVS). O método SBVS, conhecido como ancoramento molecular (*molecular docking*), possibilita a seleção de uma pequena fração de moléculas apresentando um conjunto favorável de interações intermoleculares, com base em um determinado mecanismo e modo de ligação (e.g., inibidores enzimáticos) que atuem de maneira reversível através de um mecanismo do tipo competitivo (GUIDO *et al.*, 2008 e ANDRICOPULO *et al.*, 2009).

O *Docking* (VALERIO, 2009; MAGGIORA, 2011 e WILLET, 2006) consiste em procedimentos computacionais que predizem o modo de ligação e a afinidade de um ligante com um alvo receptor, e suas origens remontam à década de 80 (VENKATRAMAN *et. al*, 2010). Cada ligante de um banco de dados é ancorado a um sítio ativo de um receptor, e os algoritmos fazem uma busca extensiva das possibilidades de conformação e orientação do ligante dentro do sítio. Cada possibilidade é avaliada quantitativamente por uma função de pontuação, e os ligantes podem ser ordenados através desta afinidade com o receptor (STUMPFE, D. *et. al*, 2011).

O programa de ancoramento molecular *Gold*, já existe há alguns anos (JONES *et. al*, 1995 e 1997). Esse programa tem apresentado uma contínua evolução ao longo dos anos, fazendo com que se mantenha um dos programas de *docking* mais utilizados e citados disponíveis atualmente. Inicialmente, o Gold tinha apenas uma função de pontuação, Goldscore. Atualmente, possui quatro, que podem ser usadas para *docking*: Goldscore (JONES *et. al*, 1995 e 1997), Chemscore (ELDRIDGE *et. al*, 1997 e VERDONK *et. al*. 2003), ASP (MOOIJ E VERDONK 2005) e ChemPLP (KORB, STÜTZLE e EXNER 2009).

Cada uma das quatro funções de pontuação é diferente significativamente em construção para com as outras:

- A função Goldscore é baseada em campos de força padrões e compreende a energia de interação entre o receptor e o ligante (definida pelos termos de energia de ligação de hidrogênio do complexo receptor-ligante e energia de interação de van der Waals) e a energia interna do ligante (definidas pelos termos de energia de ligação de hidrogênio intramolecular e de van der Waals do ligante).
- A função Chemscore é empírica e assim, visa obter com mais precisão o cálculo da energia livre de interação do ligante com a macromolécula a partir do ajuste das equações provenientes dos campos de força, utilizando dados experimentais.
- ASP (Astex Statistical Potential, em português Potencial Astex Estatístico) é uma função de pontuação baseada no conhecimento derivado a partir de bancos de dados de proteínas (PDB).
- ChemPLP é a função de pontuação introduzida mais recentemente. Ela trata contatos neutros e repulsivos através do potencial linear por partes (PLP). Este simples potencial possui tanto uma parte atrativa e repulsiva para contatos neutros e apenas uma parte repulsiva para contatos anticomplementares (doador-doador, metal-doador e aceptor-aceptor). O termo Chemscore de ligação de hidrogênio é usado para ligações de hidrogênio e o termo Chemscore de energia interna também é usado. ChemPLP é rápido para calcular (aferição em 23s para 10x repetições de ancoramentos em configurações padrão, em comparação com Goldscore, tendo aferição a 90s).

Com características marcantes como elevado desempenho, versatilidade, baixo custo e facilidade de uso, o sucesso do emprego da VS pode ser confirmado pelos inúmeros compostos bioativos que já foram descritos (GUIDO *et al.*, 2008 e ANDRICOPULO *et al.*, 2009).). Entretanto, existem algumas limitações inerentes a este método que devem ser esclarecidas.

Na avaliação de compostos por SBVS, por exemplo, os modelos utilizados são simplificados e não representam de forma completa as interações intermoleculares entre ligantes (micromoléculas) e proteínas alvo (macromoléculas). (LEACH *et. al*, 2006) Consequentemente, além de uma fração de compostos que possui boa pontuação (*i.e.*, predição de alta afinidade pela proteína alvo) e atividade biológica, há também uma fração de falso-positivos (*i.e.*, compostos que obtêm boa pontuação, mas não se ligam com alta afinidade ao alvo) que não apresentam atividade biológica. Além disso, existe o problema dos falso-negativos, ou seja, compostos com boa atividade biológica que não obtêm boa pontuação (SHOICHET, 2004). Para que bons resultados possam ser alcançados, uma questão bastante importante é o planejamento da estratégia a ser empregada, fundamentado em um entendimento sólido da informação disponível e das potencialidades e limitações dos métodos.

2. JUSTIFICATIVA

Na química medicinal moderna, estudos de modelagem molecular com as biomacromoléculas-alvo podem auxiliar na proposição de novos derivados funcionais e análogos sintéticos. Nesse contexto, o ancoramento molecular tem sido aplicado à descoberta de novos ligantes de alvos terapêuticos reconhecidos, como por exemplo, a partir de uma triagem virtual em um banco de dados de estruturas moleculares tridimensionais selecionadas (ligantes) tendo como alvo um determinado receptor molecular (KROEMER, 2007).

Esta ferramenta tem possibilitado a descoberta de novos arcabouços moleculares de origem sintética e de produtos naturais, assim como tem auxiliado na otimização da atividade de compostos-protótipos, aumentando a afinidade e a especificidade entre receptor e ligante, assim como a resistência adquirida (KITCHEN *et al.*, 2004).

A proteína IRAK-4 utilizada nos estudos foi escolhida pelo fato de ser uma quinase que é ativada e recrutada logo no início da cascata de sinalização de uma resposta inflamatória. Esta proteína também se destaca por estar presente na cascata de todos os receptores do tipo *Toll-like*. Outro motivo imprescindível para escolha desta proteína para estudo é a disponibilidade desta para teste em bancada através de um kit de ensaio enzimático.

A escolha das algas do gênero *Laurencia* foi feita por um estudo realizado anteriormente feito seus metabólitos e outras duas proteínas quinases onde os resultados obtidos foram satisfatórios e também, por serem conhecidos metabólitos inibidores de proteínas quinases e seus metabólitos estarem relacionados com atividade antiinflamatória e citotóxica.

Portanto, no âmbito de um programa de pesquisas que visa o planejamento e a descoberta de novos compostos, candidatos a protótipos de fármacos antiinflamatórios, com ação sobre biomacromoléculas de importância reconhecida, esse projeto visa à modelagem molecular da proteína quinase IRAK-4 e a triagem virtual como ferramenta no planejamento racional de substâncias inovadoras de origem sintética e obtidas de produtos naturais marinhos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o modo de ligação e interação dos metabólitos do gênero *Laurencia* com a IRAK-4 usando a triagem virtual como ferramenta no planejamento racional de substâncias inovadoras.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Validar o *docking* com a IRAK-4 utilizando inibidores existentes na literatura, para a construção de gráficos de pIC_{50} versus função de pontuação disponíveis no programa GOLD;

Utilizar a função de *pontuação* validada para realizar o *docking* com metabólitos antitumorais isolados da alga do gênero *Laurencia*;

Analisar as interações intermoleculares entre os complexos ligante-proteína.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção da estrutura da proteína IRAK-4

A estrutura da proteína-alvo (IRAK-4) co-cristalizada com seu inibidor (1-(3-hidroxipropil)-2-[(3-nitrobenzoi)amino]-1*H*-benzimidazol-5-il pivalato ou T12, como é conhecido) (Figura 10) foi obtida no banco de dados de proteínas (*Protein Data Bank*– PDB) (www.rcsb.org/pdb/) sob inserção do código 2NRU com resolução de 2Å (WANG *et al*, 2006).

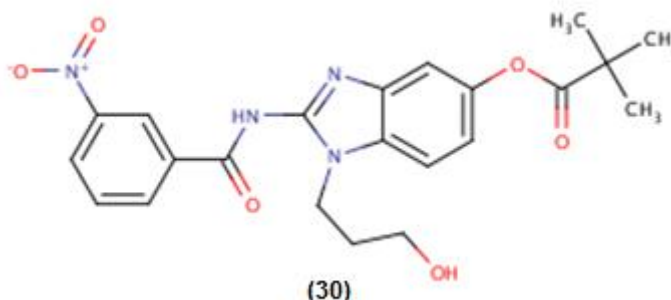


Figura 10. Inibidor da IRAK-4, T12.

4.1.2 Seleção e construção dos inibidores de referência

Visando calibrar o método de *docking* molecular, foram selecionados 90 inibidores de IRAK-4 da classe dos imidazo[1,2- α]piridina, benzimidazóis e tiazolidinas (Figura 11) com atividades inibitórias distribuídas em uma faixa logarítmica de 5 unidades (Gráfico 1). Feito isso, os inibidores selecionados da literatura foram construídos e otimizados pelo método semi-empírico AM1 no programa SpartanPro (Wavefunction, Inc.). Vale ressaltar que grupos ionizáveis foram modelados em suas formas carregadas.

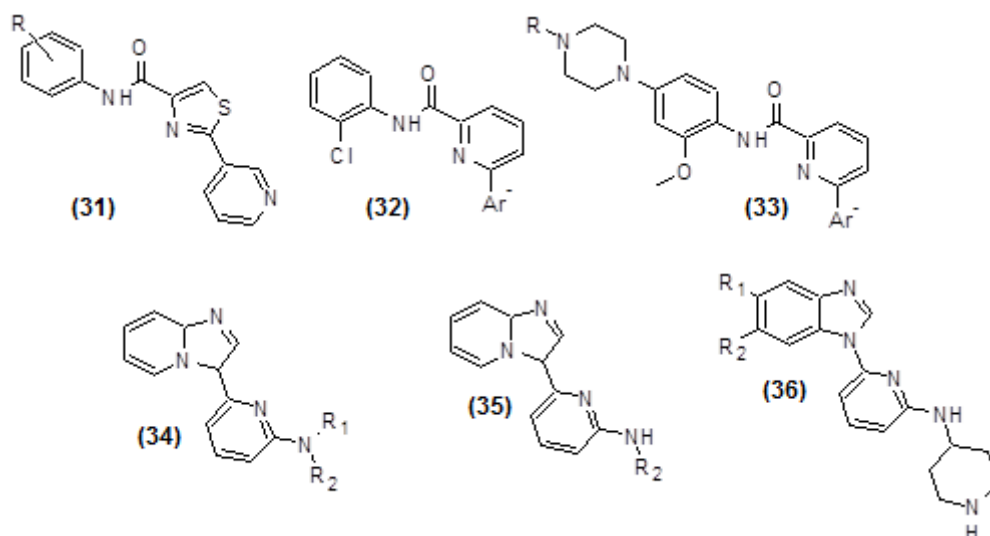


Figura 11. Exemplos de inibidores utilizados no *docking* com a IRAK-4. Derivados amidas e imidazo[1,2 α]-piridinas com estudo de SAR em grupos funcionais diferentes; anel anilina (31), terminal aromático (32), anilinas da série tiazol fundido à aromáticos terminais (33), núcleo piridina com 2 posições substituintes (34), núcleo piridina (35), análogos de benzimidazóis (36).

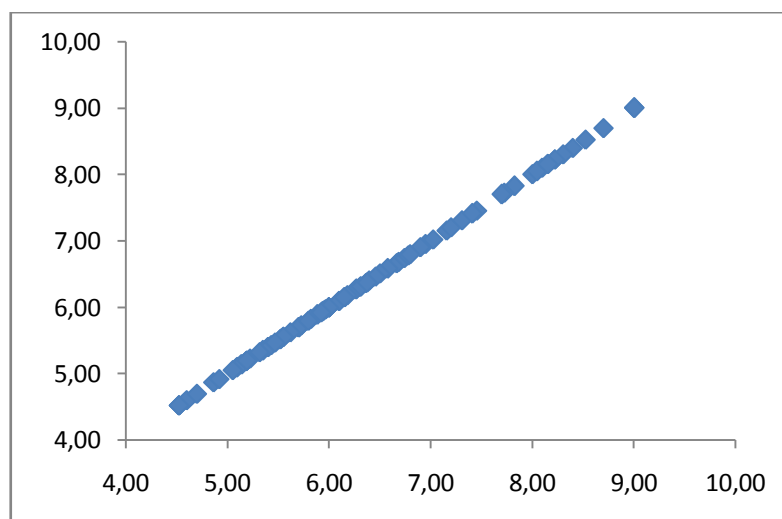


Gráfico 1. Estruturas representativas e atividades inibitórias dos inibidores de IRAK-4 (pIC_{50}) distribuídas em faixa logarítmica de cinco unidades.

4.1.3 *Docking* molecular

Após a construção e otimização dos inibidores referências, foi aplicada a metodologia de *docking* molecular do programa GOLD versão 4.1.2 (VERDONK *et al.*, 2003) com a estrutura da IRAK-4 co-cristalizada com o T12 (Figura 12).

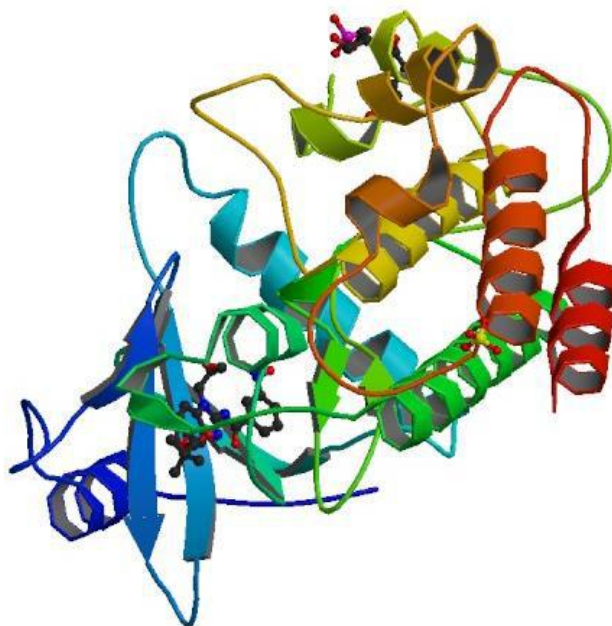


Figura 12. IRAK-4 co-cristalizada com o T12

As etapas dos estudos de *docking* estão descritas abaixo:

- 1)- *Docking* molecular com a estrutura da IRAK-4 (2NRU) utilizando os resíduos Met265, Arg273 e Lys213 como referência para definição do espaço de busca;
- 2)- Variações no tamanho do raio desejado para o sítio de ligação (10, 15 e 20 Å);
- 3)- Variação nas funções de *score*: Chemscore e ChemPLP.

4.1.4 Validação dos estudos de docking

Com os valores dos *scores* em mãos, a metodologia foi validada por:

- 1)- Análise do *redocking* com o ligante co-cristalizado, T-12;
- 2)- Análise dos gráficos de dispersão entre os valores de *score* obtidos por cada função em cada raio utilizado vs pIC_{50} ($-\text{Log}IC_{50}$, em M) dos inibidores listados na literatura, seguido da identificação do R^2 da reta. A função de *score* e o raio do sítio ativo com maior R^2 apresentado dentre todos os cálculos foi selecionada para avaliação do *redocking*.
- 3)- Seleção da melhor metodologia de *docking* para estudos com metabólitos de *Laurencia*

4)- Análise do número de interações das melhores poses e sobreposição dos inibidores de referência com a IRAK-4;

Posteriormente foi realizada a construção e otimização de metabólitos das algas do gênero *Laurencia* (Figura 13) pelo software Spartan Pro (Wavefunction, Inc.), utilizando os mesmos critérios adotados para os inibidores da referência. Com isso, o *docking* molecular dos metabólitos das algas do gênero *Laurencia* com a IRAK-4 foi realizado usando a melhor metodologia. A visualização dos resultados foi realizada no Pymol, versão 0.99, para Windows (DELANO, 2002). As moléculas que apresentaram maiores valores de *score* e maior número de interações (ligações hidrogênio, interações hidrofóbicas, etc.) foram selecionadas para estudos posteriores.

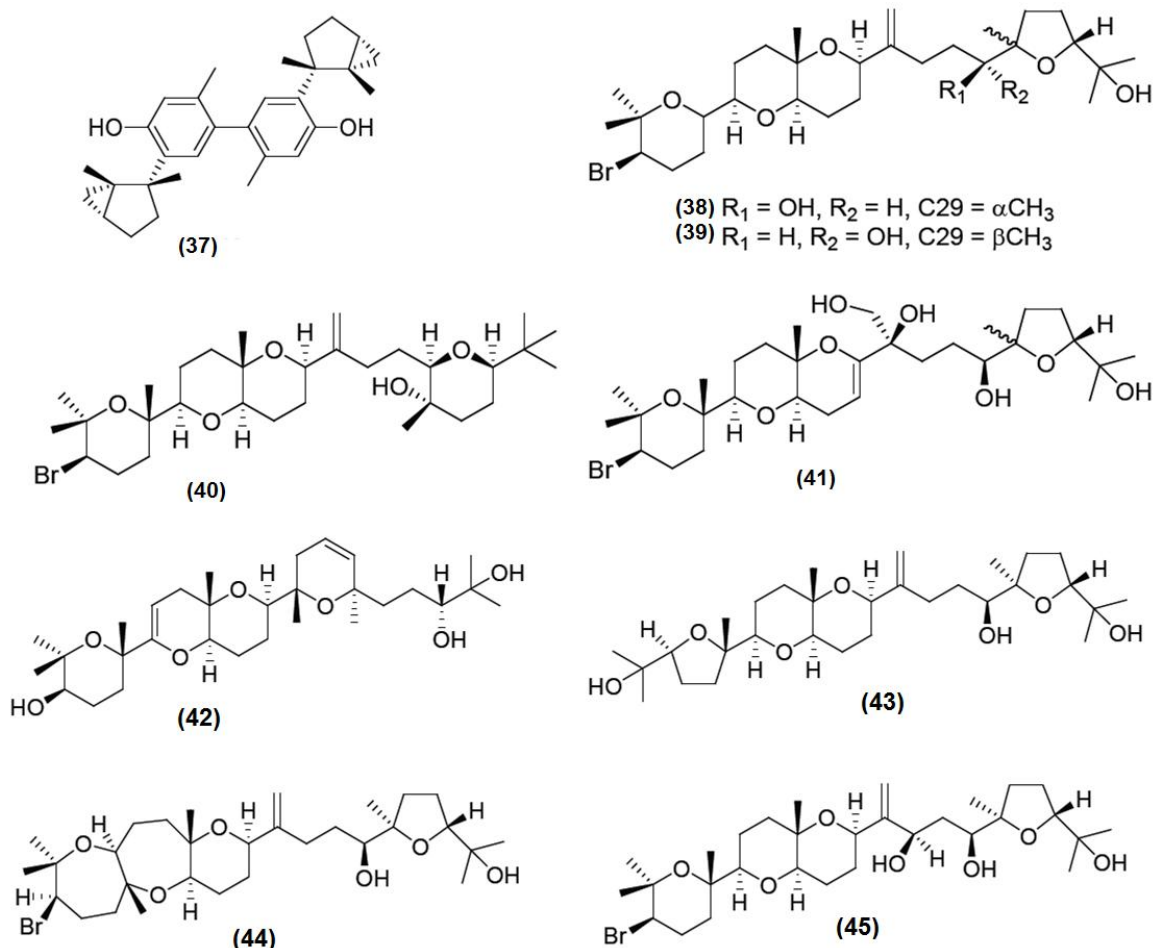


Figura 12. Metabólitos das algas do gênero *Laurencia* utilizado no estudo com a IRAK-4. Metabólito 19 (37), Metabólito 11 (38), Metabólito 12 (39), Metabólito 13 (40), Metabólito 14 (41), Metabólito 15 (42), Metabólito 16 (43), Metabólito 17 (44) e Metabólito 18 (45).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Validação da metodologia de *docking* por "*redocking*"

5.1.1. *Redocking* do inibidor

O *redocking* do inibidor T12 foi realizado utilizando as funções de *score* Chemscore e ChemPLP no programa GOLD e diferentes resíduos de aminoácidos do sítio ativo da IRAK-4 como referência estão mostrados na Tabela 1. As diferenças nos valores de *score* não são comparáveis porque as funções geram os valores utilizando termos de energia diferentes. Portanto, faz-se necessária a inspeção visual das poses obtidas para cada estratégia utilizada.

Tabela 1. Valores de *score* obtidos por *redocking* do inibidor T12 com a IRAK-4.

Valor de <i>score</i>	Função	Resíduo referência
34,65	Chemscore	Met265
92,99	ChemPLP	Met265
29,39	Chemscore	Arg273
89,19	ChemPLP	Arg273
30,26	Chemscore	Lys213
71,06	ChemPLP	Lys213

Os resíduos utilizados como referência são os resíduos do sítio ativo que fazem interação por ligação de hidrogênio com o inibidor co-cristalizado à IRAK-4.

5.1.2 Inspeção Visual do *redocking* do inibidor

A sobreposição das melhores poses do inibidor T12 com a IRAK-4 utilizando o resíduo de aminoácido Met265 como referência está demonstrada nas Figuras 14 e 15. Na sobreposição do inibidor utilizando a função ChemScore (Figura 14), observa-se que ocorrem cinco interações por ligação de hidrogênio entre o inibidor e os resíduos Lys213, Tyr262, Tyr264, Ala315 e Ser328, enquanto que na sobreposição do inibidor utilizando a função ChemPLP (Figura 15), observam-se

seis interações. Observa-se ainda que três dos resíduos que interagiram por ligação de hidrogênio com o inibidor utilizando a função ChemScore aparecem no melhor resultado obtido com a função ChemPLP (Lys213, Tyr262, Tyr264). Há, ainda, interação com os resíduos Ser269, Asp272 e Met265.

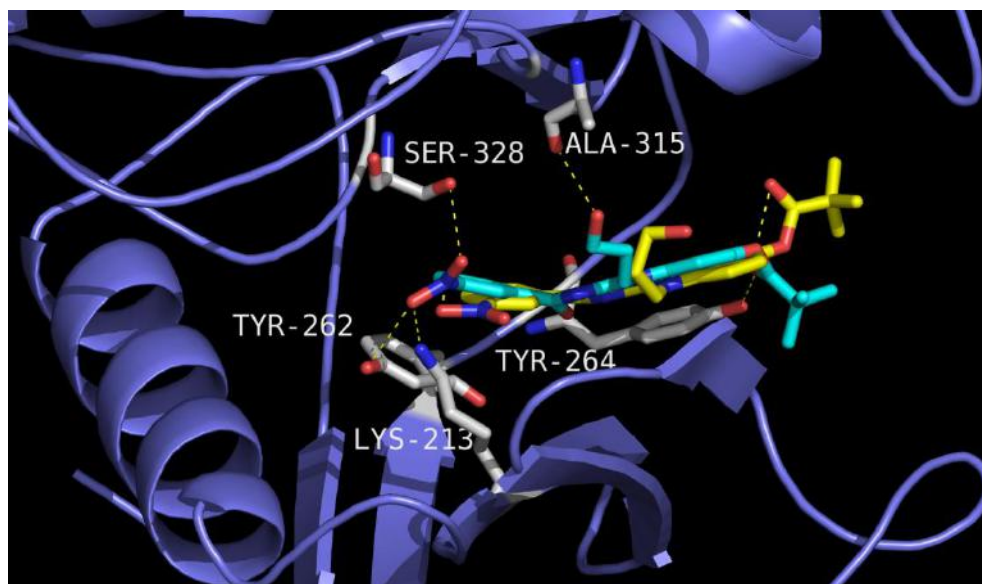


Figura 14. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemScore e o resíduo Met265 como referência. T12 do cristal em amarelo e T12 do *redocking* em azul, com destaque para as interações intermoleculares por ligação de hidrogênio (amarelo) com resíduos de aminoácidos da proteína (branco).

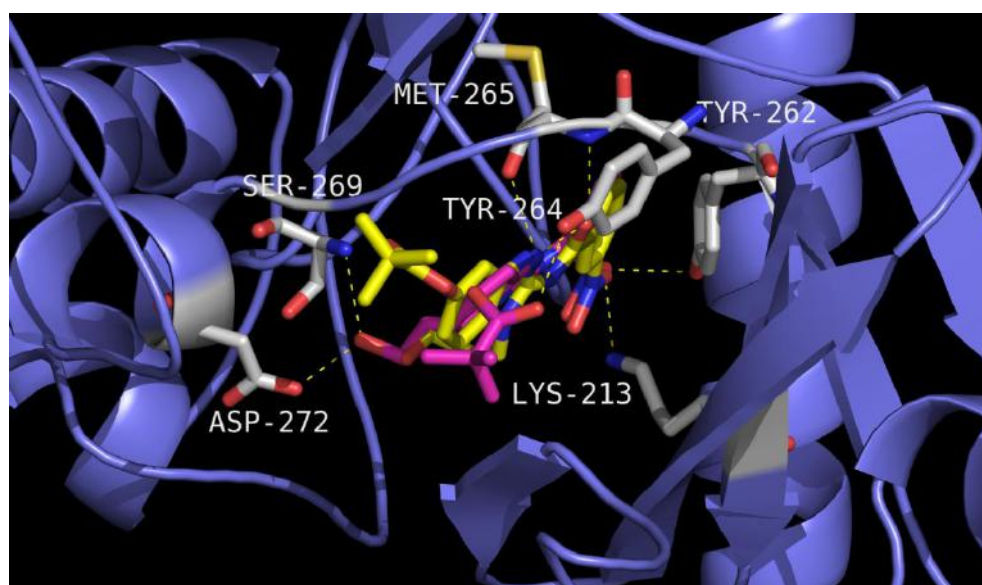


Figura 15. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemPLP e o resíduo Met265 como referência. T12 do cristal em amarelo e T12 do

redocking em rosa, com destaque para as interações intermoleculares por ligação de hidrogênio (amarelo) com resíduos de aminoácidos da proteína (branco).

As inspeções visuais da sobreposição do inibidor co-cristalizado com a IRAK-4 utilizando o resíduo de aminoácido Arg273 como referência estão representadas nas Figuras 16 e 17. Analisando-se a sobreposição do inibidor utilizando a função ChemScore (Figura 16) percebe-se quatro interações por ligação de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Ile185, Lys191, Lys202 e Tyr264. É notável que o inibidor ocupou apenas pequena parte do sítio de ligação do T12 cristalizado com a IRAK-4.

A análise da sobreposição da melhor pose do inibidor com a função ChemPLP tendo o resíduo Arg273 como referência para a definição do sítio ativo (Figura 17) mostra que há um número maior de ligações de hidrogênio, com os resíduos Lys213, Tyr264, Met265, Ser269 e Asp272.

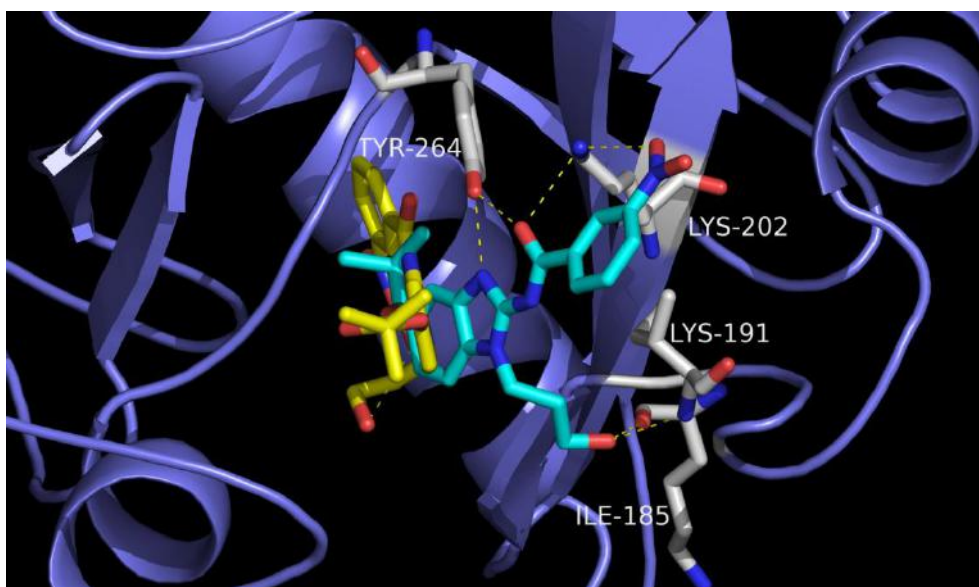


Figura 16. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemScore e o resíduo Arg273 como referência. T12 do cristal em amarelo e T12 do *redocking* em anil, com destaque para as interações intermoleculares por ligação de hidrogênio (amarelo) com resíduos de aminoácidos da proteína (branco).

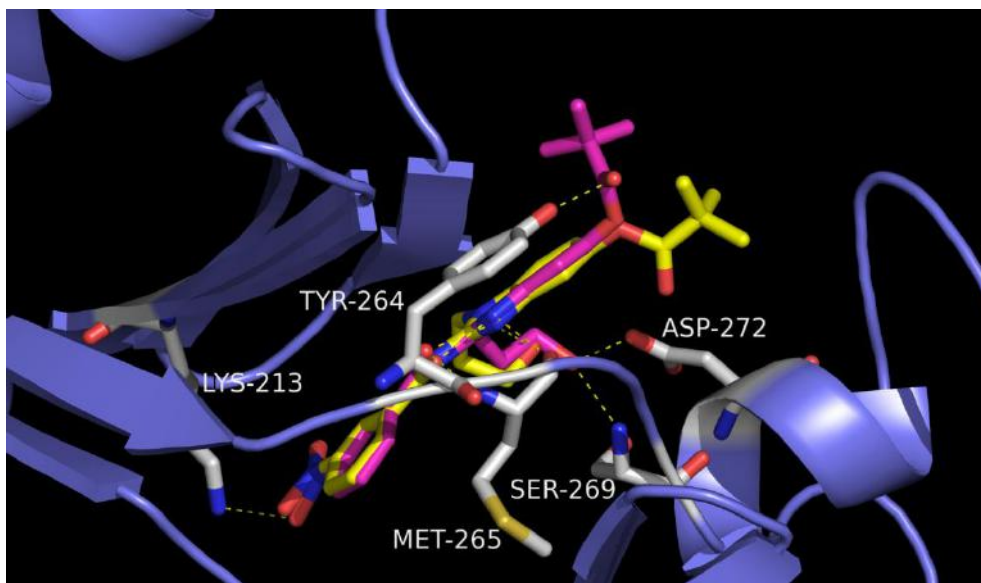


Figura 17. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemPLP e o resíduo Arg273 como referência. T12 do cristal em amarelo e T12 do *redocking* em rosa, com destaque para as interações intermoleculares por ligação de hidrogênio (amarelo) com resíduos de aminoácidos da proteína (branco).

As sobreposições das melhores poses do inibidor utilizando o resíduo de aminoácido Lys213 como referência e as funções Chemscore e ChemPLP estão representadas nas Figuras 18 e 19. Ao analisarmos a sobreposição do inibidor utilizando a função ChemScore (Figura 18) observa-se que este ocupa o sítio parcialmente e que este interage com a IRAK-4 por ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Lys313, Asn316 e Met265. Analisando-se a sobreposição do inibidor utilizando a função ChemPLP (Figura 19), observa-se que a interação com a proteína ocorre por ligação de hidrogênio com os mesmos resíduos de aminoácidos observados utilizando a função ChemScore.

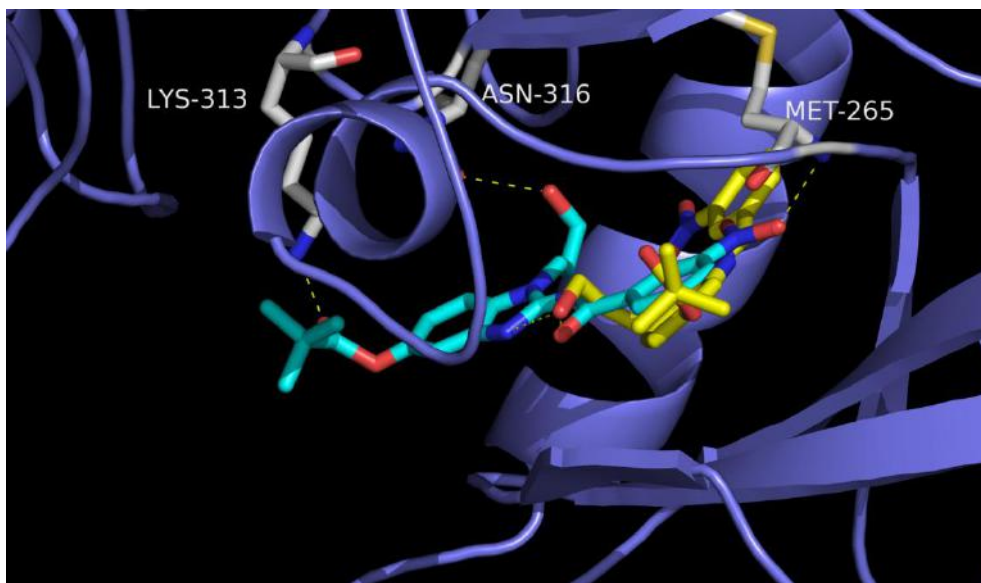


Figura 18. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemScore e o resíduo Lys213 como referência. T12 do cristal em amarelo e T12 do *redocking* em anil, com destaque para as interações intermoleculares por ligação de hidrogênio (amarelo) com resíduos de aminoácidos da proteína (branco).

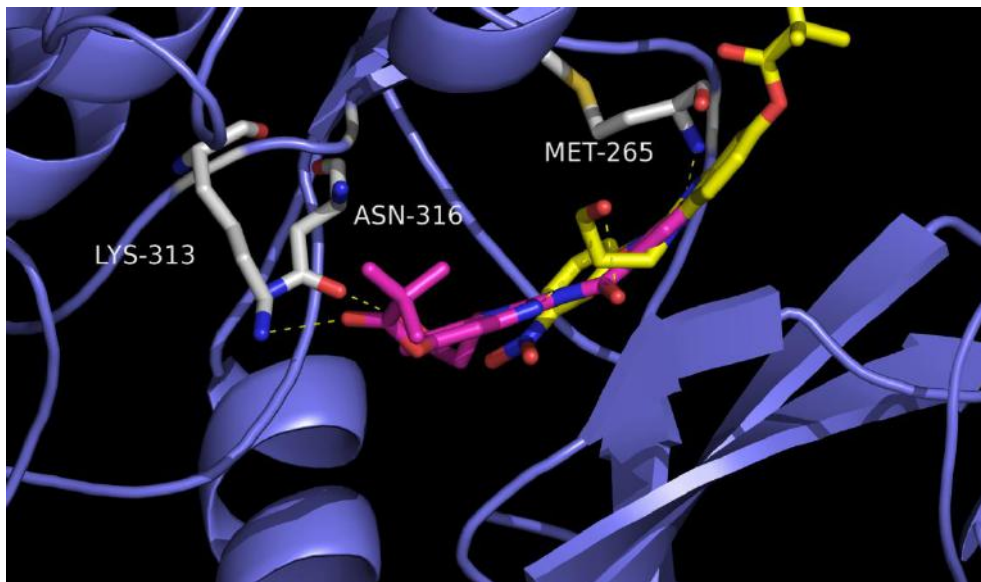


Figura 19. Sobreposição do inibidor referência (T12) cristalizado com a IRAK-4, utilizando a função ChemPLP e o resíduo Lys213 como referência. T12 do cristal em amarelo e T12 do *redocking* em rosa, com destaque para as interações intermoleculares por ligação de hidrogênio (amarelo) com resíduos de aminoácidos da proteína (branco).

Esses resultados sugerem que se pode utilizar tanto a função ChemScore tendo como referência o resíduo Met265 quanto a função ChemPLP e resíduo de Arg273 para prosseguimento dos estudos, já que a sobreposição das melhores poses e o número de interações observadas são praticamente idênticos.

5.2 Validação da metodologia de *docking* utilizando a correlação entre valores de pIC_{50} e scores obtidos

5.2.1 *Docking* molecular utilizando o resíduo Met265 do sítio ativo da IRAK-4 como referência

Baseado nos resultados anteriores optou-se por utilizar a função Chemscore nos estudos de correlação, incluindo a variação dos raios atômicos. Os resultados estão demonstrados na Figura 20.

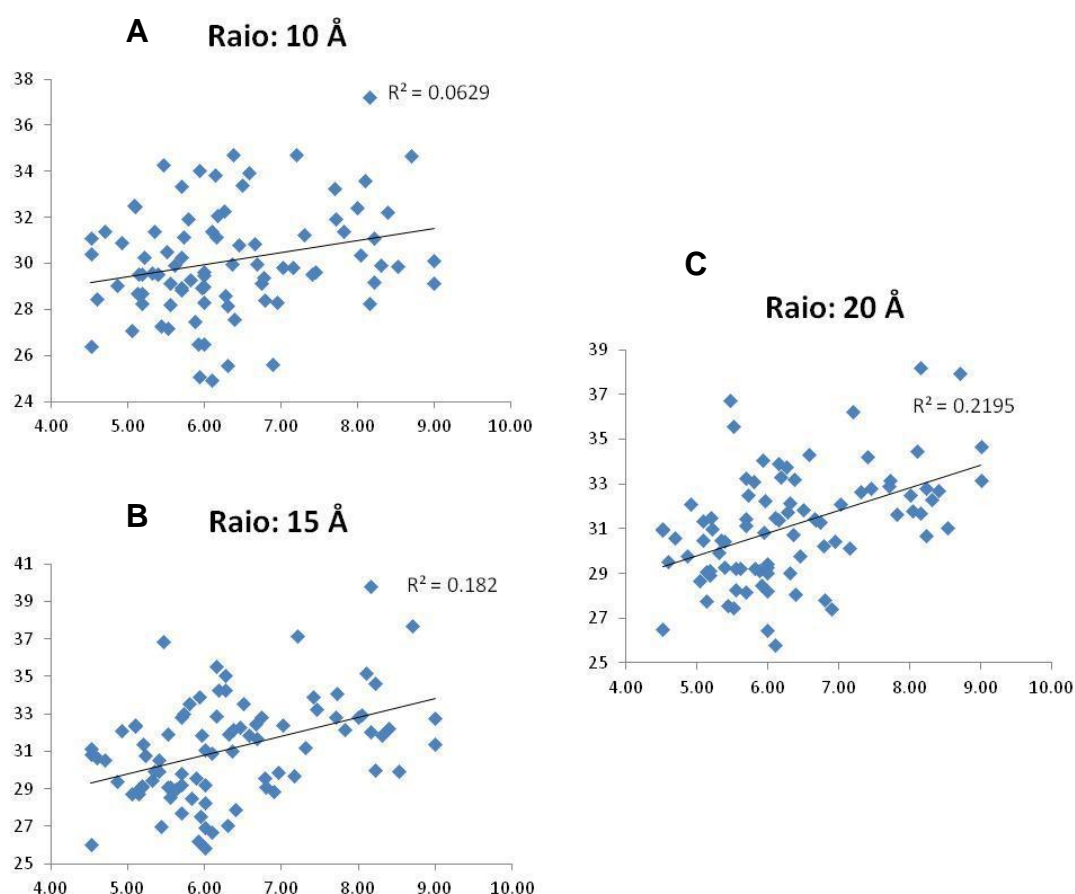


Figura 20. Gráficos de dispersão correlacionando os scores obtidos no *docking* da Met265 vs pIC_{50} dos inibidores da literatura por uma linha de tendência e seu R^2 . a) função

ChemScore e raio de 10 Å, b) função ChemScore e raio de 15 Å, c) função ChemScore e raio de 20 Å.

Como pode ser observado, os melhores resultados do ancoramento molecular com a IRAK-4 utilizando o resíduo Met265 como base para as interações entre o complexo proteína-inibidor foram obtidos com a função ChemScore e raio de 20 Å (Figura 20). Entretanto, o valor do R^2 da linha de tendência (0,2195) indica uma baixa correlação.

5.2.2 Docking molecular utilizando o resíduo Arg273 do sítio ativo da IRAK-4 como referência

O ancoramento molecular utilizando-se o resíduo de Arg273 como referência do sítio ativo da proteína quinase foi realizado com o intuito de verificar se ao utilizar este resíduo como base para as interações intermoleculares entre o complexo proteína-inibidor seria obtida melhor correlação entre os dados. A metodologia adotada para realização do ancoramento molecular utilizando este resíduo foi igual ao anterior, mudando apenas o resíduo de referência. De modo semelhante ao ancoramento molecular com o resíduo de Met265, gráficos de dispersão dos valores de score *versus* a pIC_{50} dos inibidores foram gerados (Figura 21).

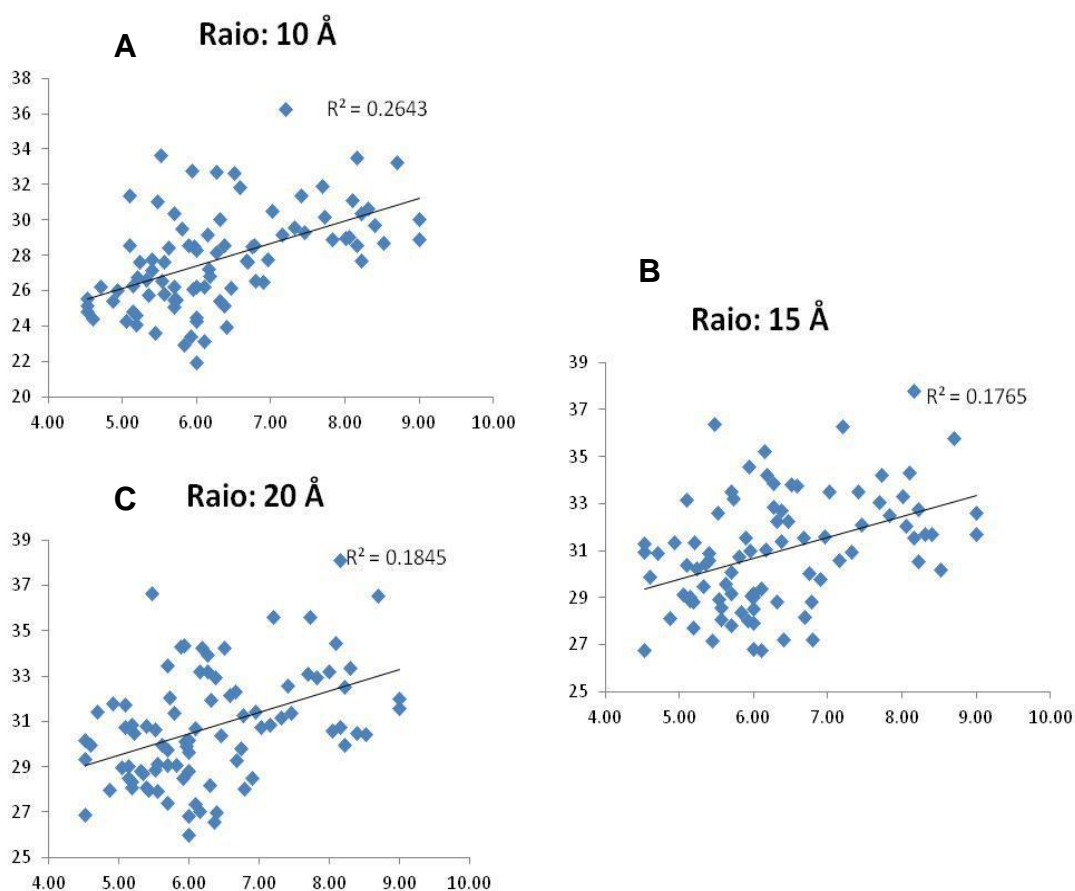


Figura 21. Gráficos de dispersão correlacionando os scores obtidos no *docking* da Arg273 vs pIC₅₀ dos inibidores da literatura por uma linha de tendência e seu R². a) função ChemScore e raio de 10 Å, b) função ChemScore e raio de 15 Å, c) função ChemScore e raio de 20 Å.

Pela análise dos gráficos pode-se observar que o valor de R² quando comparado aos valores obtidos com a Met265 foi maior utilizando-se um raio de 10 Å (0,2643). Neste caso, ao aumentarmos o tamanho do raio o valor de R² em vez de aumentar como foi observado no ancoramento utilizando Met265 como referência diminuiu de 0,2643 inicial para 0,184 com a variação final do raio (20 Å).

5.2.3 *Docking* molecular utilizando o resíduo Lys213 do sítio ativo da IRAK-4 como referência

Como os resultados do ancoramento dos inibidores com os resíduos de Met265 e Arg273 não foram satisfatórios, foi realizado ainda um último *docking* com o resíduo catalítico Lys213. A metodologia adotada para o ancoramento com este resíduo foi a mesma utilizada pelos anteriores, sendo que ao analisar os resultados já era visto que os valores de *score* gerados aparentavam ser melhores. Para

confirmar essa suspeita, mais uma vez, gráficos de dispersão foram gerados e os resultados obtidos foram maiores do que os anteriores, indicando que o ancoramento com a IRAK-4 utilizando este resíduo do sítio ativo como base para as interações intermoleculares entre complexo proteína-ligante é o de melhor escolha entre os três. Os gráficos que obtiveram melhor resultado na correlação função score em diferentes raios (10, 15 e 20 Å) vs pIC_{50} dos inibidores da literatura através de uma linha de tendência e R^2 da mesma são apresentados na Figura 22.

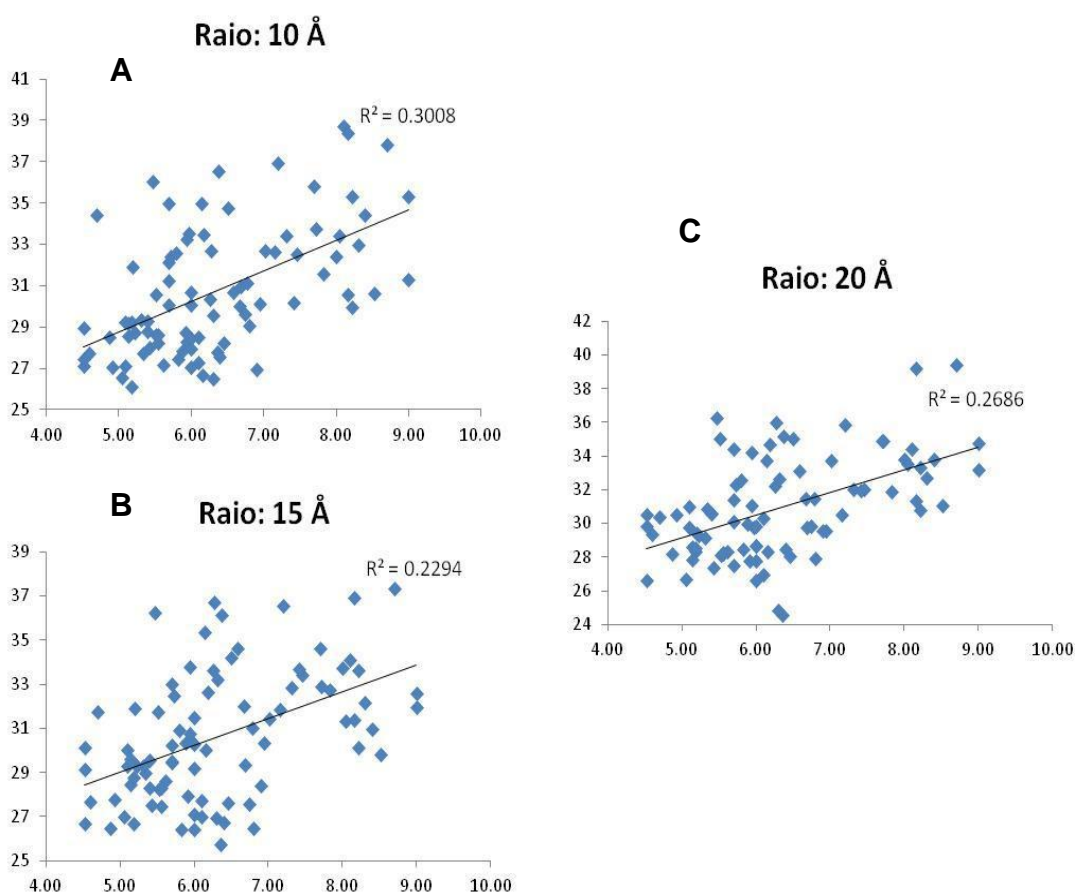


Figura 22. Gráficos de dispersão correlacionando os scores obtidos no docking da Lys213 vs pIC_{50} dos inibidores da literatura por uma linha de tendência e seu R^2 . a) função ChemScore e raio de 10 Å, b) função ChemScore e raio de 15 Å, c) função ChemScore e raio de 20 Å.


O resultado mais expressivo nesses estudos de correlação foi observado utilizando-se o resíduo Lys213 como referência e raio de 10 Å, visto que o valor de R^2 obtido (0,3) foi superior aos anteriores, apesar de estar longe do ideal, que seria no mínimo um valor de 0,5 ou superior. Baseado nisso, utilizou-se essa metodologia como padrão para o *docking* com os metabólitos das algas do gênero *Laurencia*.

Cabe ressaltar que também foi feito o *docking* incluindo a flexibilidade dos resíduos do sítio ativo para tentar obter um encaixe proteína-ligante mais próximo ao real. Contudo, os resultados não foram melhores (dados não mostrados), mantendo-se então a metodologia onde os resíduos da proteína considerados são rígidos.

Só foram mostrados os gráficos utilizando a função ChemScore pelo fato dos gráficos de correlação de pIC_{50} vs score das funções de pontuação que alcançaram um valor de R^2 um pouco expressivo ter sido os gráficos dos *docking* utilizando a ChemScore. A correlação entre pIC_{50} vs score da ChemPLP e também GoldScore, obteve um valor de R^2 muito abaixo do esperado (valores entorno de 0,005 e 0,18 no máximo).

Tabela 2. Valores de score obtidos com função Chemscore, resíduo de referência Lys213, raio 10Å e atividade (pIC_{50}).

Inibidor	pIC_{50}	Score	Inibidor	pIC_{50}	Score
4	7,82	31.59	1h	5,19	29.24
7	8,52	30.61	1i	4,52	28.95
10	8,00	32.41	1j	5,22	28.76
11	5,96	33.55	1k	5,35	27.74
12	9,00	35.31	1n	4,60	27.76
13	8,22	35.32	1o	5,40	29.27
16	8,40	34.43	1p	4,52	27.44
18	8,10	38.71	1q	5,10	29.25
19	8,15	38.37	1r	5,70	30.05
20	8,70	37.83	1u	4,70	34.43
22	8,30	32.97	1v	5,70	35.00
31	5,09	27.11	1x	5,70	32.15
35	5,52	30.59	2a	5,55	28.21
39	7,72	33.73	2b	5,14	28.57
41	5,73	32.43	2c	5,14	29.21
44	8,22	29.95	2g	5,32	29.33
45	9,00	31.32	2h	5,05	26.58
46	8,05	33.43	2i	5,43	28.00
47	8,15	30.58	2j	5,19	31.92
1a	5,40	28.81	2k	5,62	27.18
1c	4,87	28.50	2m	5,55	28.60
1d	5,19	26.14	2p	5,92	28.71
1e	4,92	27.06	3a	5,47	36.06
1f	4,52	27.12	3e	5,80	32.57
1g	5,52	28.61	4b	7,70	35.82



Baixa atividade
Alta atividade

Esta tabela mostra que apesar dos valores de R^2 não terem alcançado um valor igual ou superior à 0,5, o programa GOLD consegue prever de uma forma confiável as moléculas mais ativas (amarelo) e menos ativas (vermelho) através da correlação com o valor de score que é emitido pelo mesmo.

5.3 Estudos de *docking* dos metabólitos de *Laurencia* com a IRAK-4

Os metabólitos deste estudo foram ancorados à proteína IRAK-4, visando à comparação com o modo de ligação no cristal observado para o T12, composto de referência. O maior valor de *score* foi obtido para o metabólito 19, seguido do metabólito 13, 18 e 16, respectivamente. Vale ressaltar que somente um metabólito, o 15, obteve valor de *score* menor do que foi observado para o inibidor T12. O gráfico abaixo mostra de forma mais clara os valores de *score* obtidos no *docking* para cada metabólito.

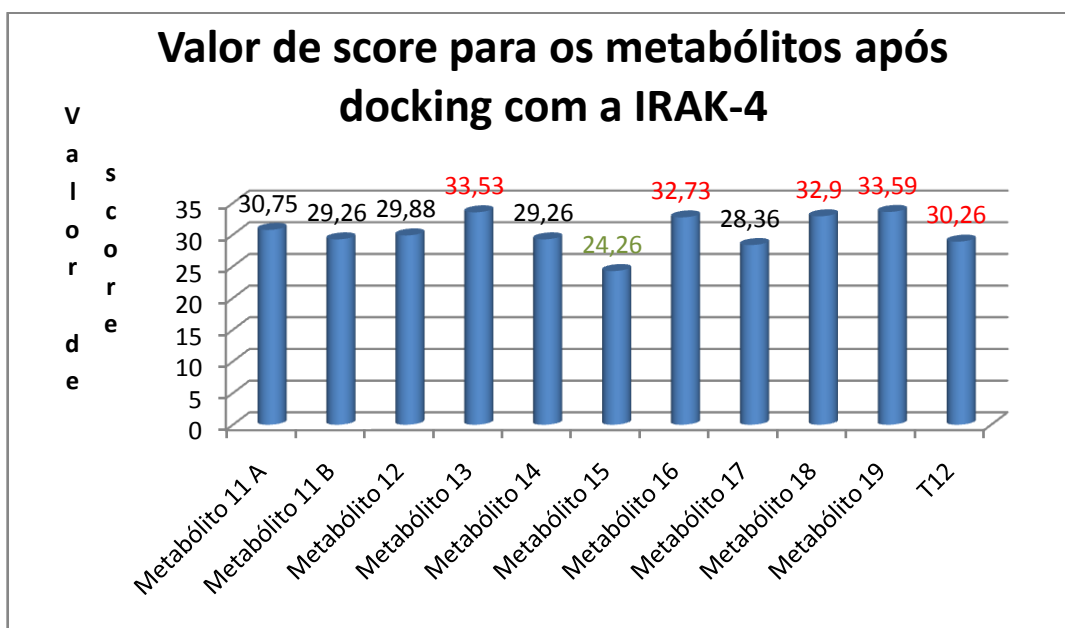


Gráfico 2. Valores de *score* obtidos por *docking* molecular dos metabólitos deste estudo e com IRAK-4 utilizando o programa GOLD.

5.3.1 Inspeção Visual das Interações entre os ligantes e a IRAK-4

A inspeção visual do melhor complexo do Metabólito 16 com a IRAK-4 é representada na Figura 23. Nela é possível perceber que ocorrem interações de ligação hidrogênio entre o metabólito 16 e os resíduos de Met265, Asp329, Asn316 e Lys313. Ainda foram destacados resíduos do sítio ativo que podem fazer possíveis interações hidrofóbicas, dentre esses estão os Ser328, Phe197, Ala315, Tyr262, Tyr264, Val200.

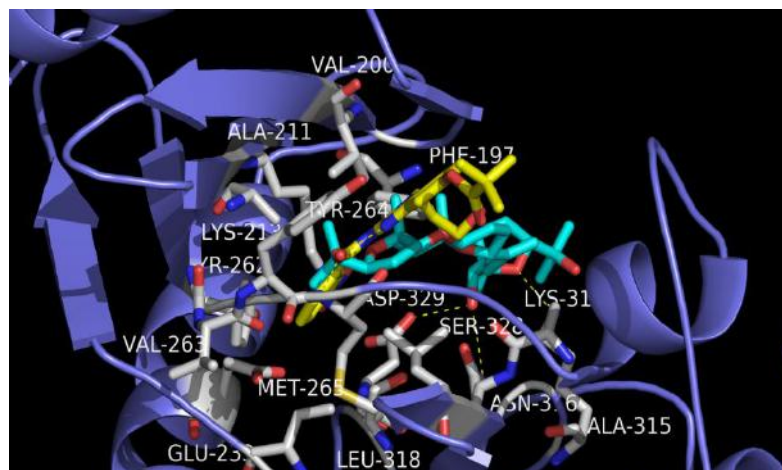


Figura 23. Melhor complexo do Metabólito 16 (anil) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD. T12 (amarelo), ligação hidrogênio pontilhada e resíduos de aminoácidos envolvidos nela e em interação hidrofóbica em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

O complexo do Metabólito 18 com a IRAK-4 obtido por *docking* é mostrado na Figura 24. Este complexo apresentou também quatro interações por ligação de hidrogênio, sendo que duas dessas são com um mesmo resíduo de aminoácido, Asn316, porém o local dessas é diferente, uma é com o –NH da cadeia lateral do aminoácido e a outra é com o oxigênio do grupamento carbonila da mesma. As interações por ligação de hidrogênio são realizadas com os resíduos Asn316, Met265 e Asp329. São destacados ainda os resíduos que fazem possíveis interações hidrofóbicas.

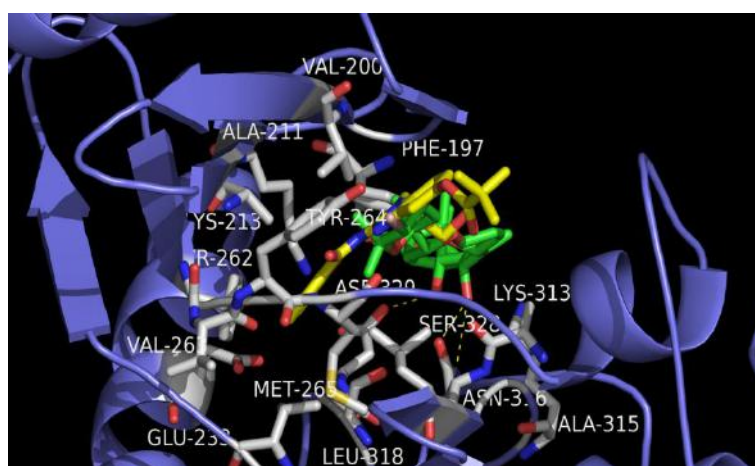


Figura 24. Melhor complexo do Metabólito 18 (verde) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD. T12 (amarelo), ligação hidrogênio pontilhada e resíduos

de aminoácidos envolvidos nela e em interação hidrofóbica em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

A inspeção visual do melhor complexo do Metabólito 19 com a proteína utilizada mostrou apenas uma interação por ligação de hidrogênio com o resíduo Met265, mas interações hidrofóbicas podem ocorrer. Alguns resíduos do sítio ativo para possíveis interações hidrofóbicas foram destacados na inspeção visual, entre eles estão a Tyr262, Tyr264, Val200, Lys213, Phe197, Asp329 (Figura 25).

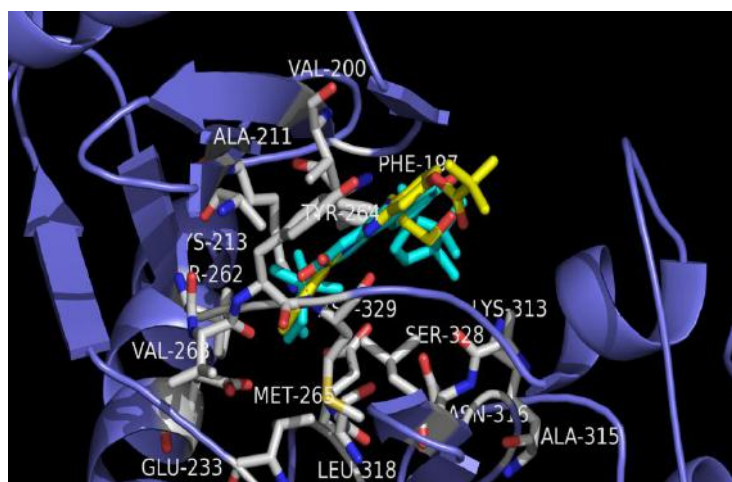


Figura 25. Melhor complexo do Metabólito 19 (anil) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD. T12 (amarelo), ligação hidrogênio pontilhada e resíduos de aminoácidos envolvidos nela e em interação hidrofóbica em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

A inspeção do melhor complexo do Metabólito 15 em *docking* molecular com a IRAK-4 é mostrado na Figura 26. Nela é possível observar o metabólito interagindo com a proteína através de três ligações de hidrogênio com os aminoácidos Lys313 (duas interações) e com Lys213. Resíduos de aminoácidos do sítio ativo também foram destacados para mostrar que é possível ocorrer interação hidrofóbica entre eles e o metabólito em questão. Destes resíduos destacam-se, Ser328, Phe197, Asp329, Tyr262, Tyr264.

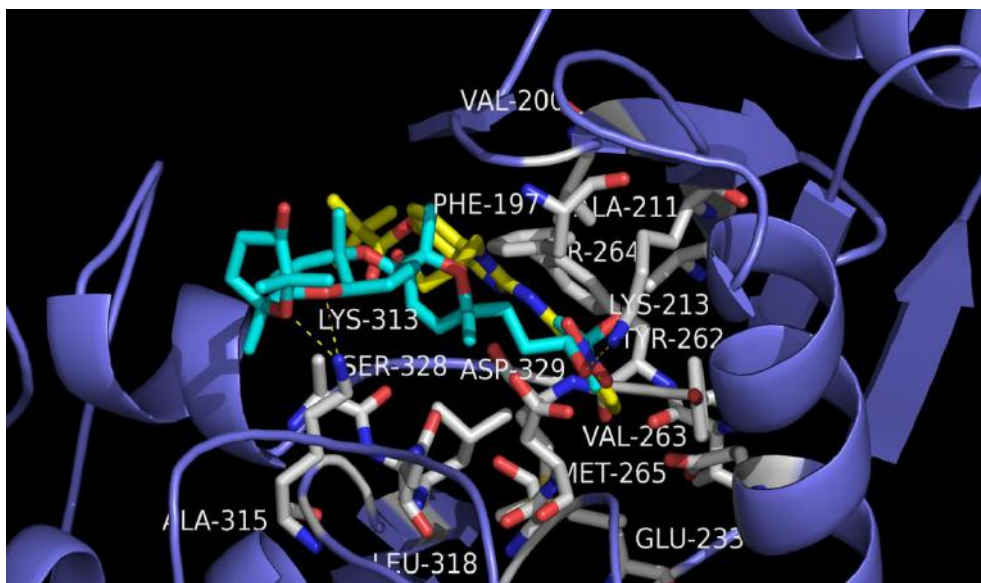


Figura 26. Melhor complexo do Metabólito 15 (anil) com a IRAK-4 obtido por *docking* molecular com o programa GOLD. T12 (amarelo), ligação hidrogênio pontilhada e resíduos de aminoácidos envolvidos nela e em interação hidrofóbica em legendas brancas. Os átomos de hidrogênio foram omitidos para melhor visualização.

Os estudos de *docking* molecular com a proteína quinase IRAK-4 mostraram uma melhor afinidade teórica geral, julgando-se pelos valores de *score* obtidos, para os metabólitos extraídos de algas do gênero *Laurencia*. Neste sentido, os metabólitos 16 e 18, por exemplo, foram capazes de se ligar, embora parcialmente, ao mesmo sítio de ligação do T12, o composto de referência (Figura 27).

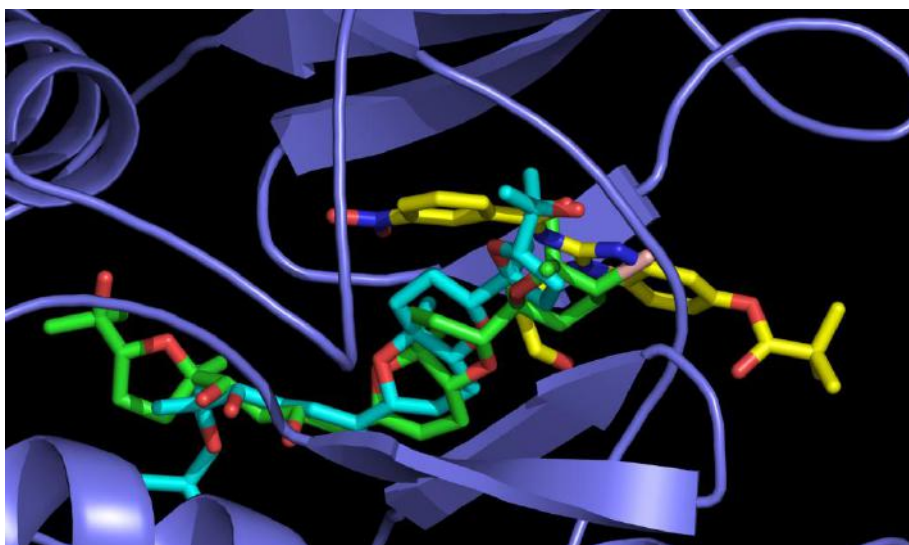


Figura 27. Sobreposição do metabólito 16 (anil) e metabólito 18 (verde) com o T12 (amarelo) em suas melhores “poses” obtidas por *docking* molecular com o programa GOLD na IRAK-4.

6. CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo sugere que as melhores funções para serem utilizadas em um *docking* molecular com a proteína quinase IRAK-4 são a ChemPLP e ChemScore julgando pelo estudo de *redocking* do inibidor com análise das sobreposições e também pela análise dos gráficos de dispersão entre valor de *score* obtidos vs pIC_{50} dos inibidores descritos na literatura. Nem sempre o maior *score* que é gerado pelo programa GOLD é de fato o melhor complexo proteína-ligante do estudo, fato este que pode ser confrontado pela inspeção visual dos metabólitos de algas do gênero *Laurencia* com a IRAK-4, onde o Metabólito 19 (maior valor de *score*) apresentou apenas uma interação por ligação de hidrogênio, apenas algumas interações hidrofóbicas e ocupou parcialmente o sítio de ligação do mesmo enquanto que o Metabólito 15 (pior valor de *score*) apresentou uma ocupação do sítio de ligação do inibidor um pouco melhor do que o Metabólito 19 e ainda, conseguiu interagir com a proteína através de três ligações de hidrogênio com resíduos do sítio ativo e também apresentou uma maior possibilidade de possíveis interações hidrofóbicas.

Ao final da inspeção visual dos metabólitos complexados à IRAK-4 percebe-se que o metabólito 16 é o que possui uma melhor posição na cavidade do sítio ativo, fato este que pode ser comprovado pelo número de interações de ligação de hidrogênio e resíduos de aminoácidos do sítio ativo que podem fazer interações hidrofóbicas com este metabólito. Dessa forma o metabólito 16 se destaca para realização de estudos posteriores com a IRAK-4, visando modificações estruturais para otimizar as interações realizadas com a proteína IRAK-4.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akira, S.; **Toll-like Receptor Signaling**, The Journal Of Biological Chemistry, Vol. 278, No. 40, Issue of October 3, pp. 38105–38108, 2003.
- Akira S. **TLR signaling**. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 311:1–16;
- Akritopoulou-Zanze, I.; Albert, D. A.; Bousquet, G. A. C.; Harris, C. M.; Moskey, M.; Dinges, J.; Stewart, K. D.; Sowin T. J.; **Synthesis and biological evaluation of 5-substituted 1,4-dihydroindeno[1,2-c]pyrazoles as multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitors**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007, 17, 3136-40;
- Andricopulo, A. D. et al. **Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry**. *Curr.Top. Med. Chem.*, v.9, n.9, p.771-90, 2009;
- “Battling breast cancer”; *Chem. Eng. News* 2006, 84 (32), 21;
- Baunbek, D.; Trinkler, N.; Ferandin, Y.; Lozach, O.; Ploypradith, S.; e Rucirawat, F. **Anticancer alkaloid lamellarins inhibit protein kinases**. *Marine Drugs* 2008, 6, 514-27;
- Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, J. N.; Bourne, P. E. **The Protein Data Bank**. *Nucl. Acids Res.* 2000, 28, 235-242;
- Bingham, A. H.; Davenport, R. J.; Gowers, L.; Knight, R. L.; Lowe, C.; Owen, D. A.; Parry, D. M.; Pitt, W. R. **A novel series of potent and selective IKK2 inhibitors**. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 409-412;
- Bissantz, C.; Kuhn, B.; Stahl, M. **A medicinal chemist's guide to molecular interactions**. *J. Med. Chem.* 2010, 53, 5061-5084;
- Blume-Jensen, P.; Hunter T.; **Oncogenic kinase signalling**. *Nature* 2001, 411, 355-65;
- Blunt, J. W.; Copp, B. R.; Munro, M. H. G.; Northcote, P. T.; Prinsep, M. R. **Marine natural products**. *Nat. Prod. Rep.* 2011, 28, 196-268;
- Boggon, T. J.; Li, Y.; Manley, P. W.; Eck, M. J. **Crystal structure of the Jak3 kinase domain in complex with a staurosporine analog**. *Blood* 2005, 106, 996-1002.;

Bottegoni, G.; Favia, A. D.; Recanatini, M.; Cavalli, A. **The role of fragment-based and computational methods in polypharmacology.** *Drug Discovery Today* 2012, 17, 23 – 34;

Bridges, A. J.; **Chemical inhibitors of protein kinases.** *Chem. Rev.* 2001, 101, 2541-72;

Brown, N. R.; Noble, M. E.; Endicott, J. A.; Johnson, L. N. **The structural basis for specificity of substrate and recruitment peptides for cyclin-dependent kinases.** *Nat. Cell Biol.* 1999, 1, 438-443.;

Buckley, G. M., Gowers, L., Higuero, A. P., Jenkins, K., Mack, S. R., Morgan, T., Parry, D. M., Pitt, W. R., Rausch, O., Richard, M. D., Sabin, V.; Fraser, J. L. **IRAK-4 inhibitors. Part 1: A series of amides.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 3211-3214;

Buckley, G. M.; Fosbeary, R.; Fraser, J. L.; Gowers, L.; Higuero, A. P.; James, L. A.; Jenkins, K.; Mack, S. R.; Morgan, T.; Parry, D. M.; Pitt, W. R.; Rausch, O.; Richard, M. D.; Sabin, V. **IRAK-4 inhibitors. Part III: A series of imidazo[1,2- α]pyridines.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 3656-3660;

Buckley, G. M.; Ceska, T. A.; Fraser, J. L.; Gowers, L.; Groom, C. R.; Higuero, A. P.; Jenkins, K.; Mack, S. R.; Morgan, T.; Parry, D. M.; Pitt, W. R.; Rausch, O.; Richard, M. D.; Sabin, V. **IRAK-4 inhibitors. Part II: A structure-based assessment of imidazo[1,2- α]pyridine binding.** *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2008, 18, 3291-3295;

Buschbeck, M.; Hofbauer, S.; Di Croce, L.; Keri, G.; Ullrich A.; **Abl-kinase-sensitive levels of ERK5 and its intrinsic basal activity contribute to leukaemia cell survival.** *EMBO Rep.* 2005, 6, 63-69;

Butler, M.S. **The role of natural product chemistry in drug discovery.** *J. Nat. Prod.* 2004, 67, 2141-53;

Canagarajah, B. J.; Khokhlatchev, A.; Cobb, M. H.; Goldsmith, E. J. **Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation.** *Cell* 1997, 90, 859-869.;

Cao, Z., Henzel, W.J., Gao, X., 1996a. IRAK: a kinase associated with the interleukin-1 receptor. *Science* 271, 1128-1131.;

Carvalho I, Borges ADL, Bernardes LSC. **Medicinal Chemistry and Molecular Modeling: An Integration To Teach Drug Structure–Activity Relationship and the Molecular Basis of Drug Action.** J. Chem. Educ. 2005;82(4):588-96;

Cohen NC. **Guidebook on molecular modeling in drug design.** San Diego: Academic Press, 1996;

Cortes, J. E.; Talpaz, M.; Kantarijan, H.; Am. J. Med. 1996, 100, 555;

Daniel, H. A.; Tapang, P.; Magoc, T. J.; Pease, L. J.; Reuter, D. R.; Wei, R.-Q.; Li, J.; Guo, J.; Bousquet, P. F.; Ghoreish-Haack, N. S.; Wang, B.; Bukofzer, G. T.; Wang, Y-C.; Stavropoulos, J. A.; Hartandi, K.; Niquette, A. L.; Soni, N.; Johnson, E. F.; McCall, J. O.; Bouska, J. J.; Luo, Y.; Donawho, C. K.; Dai, Y.; Marcotte, P. A.; Glaser, K. B.; Michaelides, M. R.; Davidsen, S. K.; **Preclinical activity of ABT-869, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor.** Mol. Cancer Ther. 2006, 5, 995-1006;

Delano, W. L. DeLano Scientific: SAN CARLOS, CA, 2002;

Donath, M. Y.; Shoelson, S. E. **Type 2 diabetes as an inflammatory disease.** Nat. Rev. Immunol. 2011, 11, 98-107;

Durand-Reville, T.; Jewell, C.; Hammond, C.; Chin, D. **IRAK modulators for treating an inflammatory condition, cell proliferative disorder, immune disorder.** PCT Int. Appl. WO2008030579A3, 2008.;

Dvorak, H.F. (1986).**Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing.** N. Engl. J. Med. 315:1650-1659;

Ekins, S.; Mestres, J.; Testa, B. **In silico pharmacology for drug discovery: methods for virtual ligand screening and profiling.** British Journal of Pharmacology 2007, 152, 9–20;

Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini GV, Mee RP, **Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes.** 1997. J Comput Aided Mol Des 11:425–445;

Engh, R. A.; Bossemeyer D.; **The protein kinase activity modulation sites: mechanisms for cellular regulation - targets for therapeutic intervention.** *Advan.Enzyme Regul.* 2001, 41, 121-49;

Fabbro, D.; Ruetz, S.; Buchdunger, E.; Cowan-Jacob, S. W.; Fendrich, G.; Liebetanz, J.; Mestan, J.; O'Reilly, T.; Traxler, P.; Chaudhuri, B.; Fretz, H.; Zimmermann, J.; Meyer, T.; Caravatti, G.; Furet, P.; Manley, P. W.; **Protein kinases as targets for anticancer agents: from inhibitors to useful drugs.** *Pharmacol. Ther.* 2002, 93, 79-98;

Flannery S, Bowie AG: **The interleukin-1 receptor-associated kinases: Critical regulators of innate immune signalling.** *Biochem Pharmacol* 2010, 80:1981-1991.

Guckian, K.; Jewell, C.; Conlan, P.; Lin, E. Y.-S.; Chan, T. **Indazole derivatives as modulators of interleukin-1 receptor associated kinase.** *PCT Int. Appl.* WO2008030584A3, 2008;

Guido, R. V. C.; Oliva, G.; Andricopulo, A. D.; *Curr. Med. Chem.* 2008, 15, 37; Andricopulo, A. D.; Salum, L. B.; Abraham, D. J.; *Curr. Top. Med. Chem.* 2009, 9, 771;

Hubbard, S.R., 1997. **Crystal structure of the activated insulin receptor tyrosine kinase in complex with peptide substrate and ATP analog.** *Embo J* 16, 5572-5581;

Iliopoulou D, Vagias C, Harvala C, Roussis V 2002a. **C15 acetogenins from the red alga *Laurencia obtusa*.** *Phytochemistry* 59: 111-116;

Iliopoulou D, Roussis V, Pannecouque C, De Clercq E, Vagias C 2002b. **Halogenated sesquiterpenes from the red alga *Laurencia obtusa*.** *Tetrahedron* 58: 6749-6755;

Johnson, L. N.; Noble, M. E.; Owen, D. J. **Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation.** *Cell* 1996, 85, 149-158.;

Jones G, Willett GP, Glen RC, **Molecular recognition of receptor sites using a genetic algorithm with a description of desolvation.** 1995, *J MolBiol* 245:43–53;

Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor RJ, **Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking.** 1997, *Mol. Biol* 267:727–748;

- Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. and Akira, S. (1999) **Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin.** *Immunity*. 11, 115–122;
- Kitchen, D. B.; Decornez, H.; Furr, J. R. e Bajorath, J., **Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications.** *Nat. Rev. Drug Disc.* 2004, 3, 935-949;
- Kobayashi, T., Walsh, M. C., Choi, Y. (2004) **The role of TRAF6 in signal transduction and the immune response.** *Microbes Infect.* 6, 1333–1339.;
- Koide, K.; Bunnage, M. E.; Paloma, L. G.; Kanter, J. R.; Taylor, S. S.; Brunton, L. L.; Nicolaou, K. C.; **Molecular design and biological activity of potent and selective protein kinase inhibitors related to balanol.** *Chem. Biol.* 1995, 2, 601;
- Konig GM, Wright AD, Sticher O, Angerhofer CK, Pezzuto JM 1994. **Biological-activities of selected marine natural-products.** *Planta Med* 60:532-537;
- Korb O, Stutzle T, Exner TE, **Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS.** 2009, *J Chem Inf Model* 49(1):84–96;
- Kroemer, R. T, **Structure-based drug design: docking and scoring.** *Curr. Prot. Pept. Sci.* 2007, 8, 312-328;
- Ku, C-L.; Yang, K.; Bustamante, J.; Puel, A.; von Bernuth, H.; Santos, O. F.; Lawrence, T.; Chang, H-H.; Al-Mousa, H.; Picard, C.; Cassanova, J-L. **Inherited disorders of human Toll-like receptor signaling: immunological implications.** *Immunol. Rev.* 2005, 203, 10-20.;
- Ku, C-L.; von Bernuth, H.; Picard, C.; Zhang, S-Y.; Chang, H-H.; Yang, K.; Chrabieh, M.; Issekutz, A. C.; Cunningham, C. K.; Gallin, J.; Holland, S. M.; Roifman, C.; Ehl, S.; Smart, J.; Tang, M.; Barrat, F. J.; Levy, O.; McDonald, D.; Day-Good, N. K.; Miller, R.; Takada, H.; Hara, T.; Al-Hajjar, S.; Al-Ghonaïum, A.; Speert, D.; Sanlaville, D.; Li, X.; Geissmann, F.; Vivier, E.; Maródi, L.; Garty, B-Z.; Chapel, H.; Rodriguez-Gallego, C.; Bossuyt, X.; Abel, L.; Puel, A.; Cassanova, J-L. **Selective predisposition to bacterial infections in IRAK-4-deficient children: IRAK-4-dependent TLRs are otherwise redundant in protective immunity** *J. Exp. Med.* 2007, 204, 2407-2422;
- Kuglstatter, A.; Villaseñor, A. G.; Shaw, D.; Lee, S. W.; Tsing, S.; Niu, L.; Song, K. W.; Barnett, J. W.; Browner, M. F. **Cutting Edge: IL-1 receptor-associated kinase**

4 structures reveal novel features and multiple conformations. J. Immunol. 2007, 178, 2641-2645;

Leach, A. R. **Molecular Modeling: Principles and Applications. 2.ed.** London: Prentice Hall, 2001. p.774;

Li, S., Strelow, A., Fontana, E.J., Wesche, H., 2002. **IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase.** Proc Natl Acad Sci USA 99, 5567-5572.;

Liao, J. J.-L.; **Molecular recognition of protein kinase binding pockets for design of potent and selective kinase inhibitors.** J. Med. Chem. 2007, 50, 409;

Lombardino, J. G.; Lowe III, J. A.; **The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now.** Nat. Rev. Drug Discov. 2004, 3, 853;

Luis G. Valerio, J. **In silico toxicology for the pharmaceutical sciences.** Toxicology and applied pharmacology 2009, 241, 356–370;

Machado, F. L.; Kaiser, C. R.; Costa, S. S.; Gestinari, L. M.; Soares, A. R. Rev. Bras. Farmacogn. 2010, 20, 441-452;

Machado, F. L. S.; Pacienza-Lima, W.; Rossi-Bergmann, B.; Gestinari, L. M. S.; Fujii, M. T.; Paula, J. C.; Costa, S. S.; Lopes, N. P.; Kaiser, C. R.; Soares, A. R. Planta Med. 2011, 77, 733-735;

Maggiora, G. **The reductionist paradox: are the laws of chemistry and physics sufficient for the discovery of new drugs?** Journal of Computer-Aided Molecular Design 2011, 25, 699–708;

Manning, G., Whyte, D.B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S., 2002. **The protein kinase complement of the human genome.** Science 298, 1912-1934.;

Maskrey, B. H.; Megson, I. L.; Whitfield, P. D.; Rossi, A. G., **Mechanisms of resolution of inflammation: a focus on cardiovascular disease.** Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2011, 31, 1001-1006;

Mastalerz, H.; Chang, M.; Gavai, A.; Johnson, W.; Langley, D.; Lee, F. Y.; Marathe, P.; Mathur, A.; Oppenheimer, S.; Tarrant, J.; Tokarski, J. S.; Vite, G. D.; Vyas, D. M.; Wong, H.; Wong, T. W.; Zhang, H.; Zhang, G.; **Novel C-5 aminomethyl**

pyrrolotriazine dual inhibitors of EGFR and HER2 protein tyrosine kinases. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2007, 17, 2828;

Mayer, A. M. S. e Gustafson, K. R. **Marine pharmacology in 2005-2006: antitumour and cytotoxic compounds.** Eur. J. Cancer 2008, 44, 2357-2387;

Medvedev, A.E., K. Thomas, A. Awomoyi, D.B. Kuhns, J.I. Gallin, X. Li, and S.N. Vogel. 2005. **Cutting edge: expression of IL-1 receptor- associated kinase-4 (IRAK-4) proteins with mutations identified in a patient with recurrent bacterial infections alters normal IRAK-4 interaction with components of the IL-1 receptor complex.** J. Immunol. 174:6587–6591;

Mendes, G. S.; Soares, A. R.; Martins, F. O.; Albuquerque, M. C. M.; Costa, S. S.; Yoneshigue-Valentin, Y.; Gustinari, L. M. S.; Santos, N.; Romanos, M. T. V. **Antiviral activity of the green marine alga Ulva fasciata on the replication of human metapneumovirus.** Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo 2010, 52, 3-10;

Miller, A. M.; McInnes, I. B. **Cytokines as therapeutic targets to reduce cardiovascular risk in chronic inflammation.** Curr Pharm Des. 2011, 17, 1-8;

Molinski, T. F.; Dalisay, D. S.; Lievens, S. L. e Saludes, J. P. **Drug development from marine natural products.** Nat. Rev. Drug Discov. 2009, 8, 69;

Mooij WTM, Verdonk M, **General and targeted statistical potentials for protein-ligand interactions.** 2005, PROTEINS 61:272–28;

Moresco, E. M.; Lavine, D.; Beutler, B., **Toll-like receptors.** Curr.Biol. 2011, 21, 488-493;

Narayana, N.; Diller, T. C.; Koide, K.; Bunnage, M. E.; Nicolaou, K. C.; Brunton, L. L.; Xuong, N.; Eyck, T.; Taylor, S. S.; **Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase.** Biochemistry 1999, 38, 2367;

Newman, D. J.; Cragg, G. M. e Snader, K. M. ., **Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.** J. Nat. Prod. 2003, 66, 1022;

O'Neill, L. A., **The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: 10 years of progress.** Immun. Rev. 2008, 226, 10-18;

Parang, K.; Till, J. H.; Ablooglu, A. J.; Kohanski, R. A.; Hubbard, S. R.; Cole, P. A.; **Mechanism-based design of a protein kinase inhibitor.** Nat. Struct. Biol. 2001, 8, 37;

Pereira RC, Da Gama BA, Teixeira VL, Yoneshigue-Valentin Y 2003. **Ecological roles of natural products of the Brazilian red seaweed *Laurencia obtusa*.** Braz J Biol 63: 665-672;

Picard, C.; Puel, A.; Bonnet, M.; Ku, C. L.; Bustamante, J.; Yang, K.; Soudais, C.; Dupuis, S.; Feinberg, J.; Fieschi, C.; Elbim, C.; Hitchcock, R.; Lammas, D.; Davies, G.; Al-Ghonaïum, A.; Al-Rayes, H.; Al-Jumaah, S.; Al-Hajjar, S.; Al-Mohsen, I. Z.; Frayha, H. H.; Rucker, R.; Hawn, T. R.; Aderem, A.; Tufenkeji, H.; Haraguchi, S.; Day, N. K.; Good, R. A.; Gougerot-Pocidalò, M-A.; Ozinsky, A.; Casanova, J-L. 2003. **Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency.** Science 299, 2076-2079;

Raman, D.; Sobolik-Delmaire, T.; Richmond A., **Chemokines in health and disease.** Exp. Cell Res. 2011, 317, 575-589;

Rochfort SJ, Capon RJ 1996. **Parguerenes revisited: new brominated diterpenes from the southern Australian marine red alga *Laurencia filiformis*.** Aust J Chem 49: 19-26;

Sant'anna CMR. **Glossário de termos usados no planejamento de fármacos. (Recomendações da IUPAC para 1997),** Quim.Nova, 2002;25(3):505-12;

Sayle, K. L.; Bentley, J.; Boyle, F. T.; Calvert, A. H.; Cheng, Y.; Curtin, N. J.; Endicott, J. A.; Golding, B. T.; Hardcastle, I. R.; Jewsbury, P.; Mesguiche, V.; Newell, D. R.; Noble, M. E. M.; Parsons, R. J.; Pratt, D. J.; Wang, L. Z.; Griffin, R. J. **Structurebased design of 2-arylamino-4-cyclohexylmethyl-5-nitroso-6-aminopyrimidine inhibitors of cyclin-dependent kinases 1 and 2.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 2003, 13, 3079-3082;

Schnare, M., Barton, G. M., Holt, A. C., Takeda, K., Akira, S., Medzhitov, R., **Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses.** Nat. Immunol. 2001, 2, 947-950;

Shoichet, B. K.; **Virtual screening of chemical libraries.** Nature 2004, 432, 862;

Silva B. V, et al., **Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos**, Quim. Nova, Vol. 32, No. 2, 453-462, 2009;

Simone, M.; Erba, E.; Damia, G.; Vikhanskaya, F.; Di Francesco, A. M.; Riccardi, R. et al, **Variolin B and its derivate deoxy-variolin B: new marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity**. Eur. J. Cancer 2005, 41, 2366;

Soares, A. R.; Gama, B. A. P.; Cunha, A. P.; Pereira, R. C.; Teixeira, V. L. Marine Biotech. 2008, 10, 158-165;

Spartan 10; Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Avenue, Suite 370. Irvine, California 92612, USA;

Souto ML, Manriquez CP, Norte M, Fernandez JJ 2002. **Novel marine polyethers**. Tetrahedron 58: 8119-8125;

Stumpfe, D.; Bajorath, J. In Virtual Screening; Mannhold, R., Kubinyi, H., Folkers, G., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2011; Chapter 11, pp 291–318;

Suhir, H.; Etzioni, A., **The role of Toll-like receptor signaling in human immunodeficiencies**. Clin. Rev. Allergy Immunol. 2010, 38, 11-19;

Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC: **Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4**. Nature 2002, 416:750-756.

Suzuki, N., Suzuki, S., Eriksson, U., Hara, H., Mirtosis, C., Chen, N. J., Wada, T., Bouchard, D., Hwang, I., Takeda, K., Fujita, T., Der, S., Penninger, J. M., Akira, S., Saito, T., Yeh, W. C. (2003) **IL-1R-associated kinase 4 is required for lipopolysaccharide-induced activation of APC**. J. Immunol. 171, 6065–6071.;

Takeda, K.; Akira, S. **TLR signaling pathways**. Semin. Immunol. 2004, 16, 3-9.;

Tamaoki, T.; Nomato, H.; Takahashi, I.; Kato, Y.; Morimoto, M.; Tomita, F.; **Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase**. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986, 35, 397;

Terlau, H. e Olivera, B. M., **Conus venoms: a rich source of novel ion channel-targeted peptides**. Physiol. Rev. 2004, 84, 41;

Venkatraman, V.; Pérez-Nueno, V. I.; Mavridis, L.; Ritchie, D. W. **Comprehensive Comparison of Ligand-Based Virtual Screening Tools Against the DUD Data set Reveals Limitations of Current 3D Methods.** *Journal of Chemical Information and Modeling* 2010, 50, 2079–2093;

Verdonk, M. L.; Cole, J. C.; Hartshorn, M.J.; Murray, C.W.; Taylor, R.D., **Improved protein-ligand docking using GOLD.** *Proteins* 2003, 52, 609-623;

Wang, Z.; Liu, J.; Sudom, A.; Ayres, M.; Li, S.; Wesche, H.; Powers, J. P.; Walker, N. P. **Crystal structures of IRAK-4 kinase in complex with inhibitors: a serine/threonine kinase with tyrosine as a gatekeeper.** *Structure* 2006, 14, 1835-1844;

Wang, Z.; Wesche, H.; Stevens, T.; Walker, N.; Yeh, W- C-. **IRAK-4 Inhibitors for Inflammation.** *Curr. Top; Med. Chem.* 2009, 9, 724-737;

Wermuth CG, **The practice of medicinal chemistry. 3rd ed.** London: Academic Press; 2009;

Wessels, M.; Koniig, G. M. e Wright, A. D., **A new tyrosine kinase inhibitor from the marine brown alga *Styopodium zonale*.** *J. Nat. Prod.* 1999, 62, 927;

Willett, P. **Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints.** *Drug discovery today* 2006, 11, 1046–1053;

Williams, M.P. and Pounder, R.E., 1999. ***Helicobacter pylori*: from the benign to the malignant.** *Am. J. Gastroenterol.* 94: S II-S 16;

Wright AD, Konig G M, Sticher O 1991. **New sesquiterpenes and C15 acetogenins from the marine red alga *Laurencia implicata*.** *J Nat Prod* 54: 1025-1033;

Yamaguchi, H., Hendrickson, W.A., 1996. **Structural basis for activation of human lymphocyte kinase Lck upon tyrosine phosphorylation.** *Nature* 384, 484-489;

Zheng, J.; Knighton, D. R.; ten Eyck, L. F.; Karlsson, R.; Xuong, N.; Taylor, S. S.; Sowadski, J. M., **Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor.** *Biochemistry* 1993, 32, 2154-2161.