



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA

Glorister Alves Altê

**Planejamento Computacional de Inibidores da glutathione
peroxidase 4 – GPX4**

Florianópolis

2022

Glorister Alves Altê

**Planejamento Computacional de Inibidores da glutathione
peroxidase 4 – GPX4**

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel

Coorientador: Prof. Dr. Marcelo Farina

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Altê, Glorister Alves

Planejamento Computacional de Inibidores da glutathione peroxidase 4 - GPX4 / Glorister Alves Altê ; orientador, Guilherme Razzera Maciel, coorientador, Marcelo Farina, 2022.

91 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. triagem virtual. 3. docking molecular. 4. ferroptose. 5. glutathione peroxidase. I. Maciel, Guilherme Razzera. II. Farina, Marcelo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Glorister Alves Altê

Planejamento Computacional de Inibidores da glutathiona peroxidase 4 – GPX4

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Dra. Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Alfeu Zanotto Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Guilherme Razzera Maciel

“Todo homem vale exatamente tanto quanto vale aquilo em que ele se empenha.”

Marco Aurélio

“Adquira conhecimento. Ele possibilita a quem o possui distinguir o certo do errado; ilumina o caminho para o céu; é nosso amigo no deserto, nossa companhia na solidão, nosso companheiro no desamparo; guia-nos para a felicidade; sustenta-nos no sofrimento; é um ornamento entre amigos e uma armadura contra inimigos.”

Maomé

“Que aquele que busca não pare de buscar até encontrar. Quando se encontra, fica-se perturbado. Quando se está perturbado, fica-se maravilhado e domina-se tudo.”

Jesus

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela vida, pela saúde, pela proteção e por toda a capacidade e força que tenho recebido para seguir o meu destino. Agradeço aos meus anjos da guarda e espíritos de luz que me iluminam, e que intercedem por mim. Agradeço aos meus pais Maurício e Rosemary por serem terem prezado pela minha educação e pelo amor e carinho que recebi durante o tempo em que morei com eles. Também agradeço aos meus queridos irmãos Gisele, Maurício, Lizzyen e Makgregor, pelos tempos de convivência e pelas boas lembranças. Agradeço a todos os meus familiares que torceram por mim e que me deram apoio nessa jornada.

Agradeço ao meu marido Rogério Silva Henriques, que além de sempre me apoiar a seguir a carreira científica, contribuiu para esse trabalho, me ajudando a organizar, tabular e digitar resultados, principalmente antes de eu aprender o básico de programação Python. Também agradeço e muito pela paciência, pelos momentos de solidão, pelo tempo que passei estudando e não estava contigo, apesar de morar contigo, durante esses mais de dois anos de mestrado. Agradeço pela confiança, pelo amor e pelo equilíbrio emocional que você sempre me proporcionou.

Agradeço ao professor Guilherme Razzera por me aceitar como estudante de mestrado, por ter me dado acesso aos clusters de bioinformática, e por me proporcionar liberdade para escolher o tema, seguir e concluir essa dissertação de mestrado. Agradeço ao professor Marcelo Farina pelas discussões de artigos científicos na área da ferroptose e pelos encontros do grupo de pesquisa do laboratório. Esse trabalho só foi possível porque vocês confiaram na minha capacidade e potencial, e sou muito grata por isso.

Agradeço a todos os colegas de laboratório de bioinformática, mas principalmente à Tâmela, à Karin e ao Theo, por todos os comentários e dicas sobre o trabalho, por todo o apoio e ajuda fornecidos, principalmente para acessar o cluster e fazer os experimentos de *docking* molecular. Agradeço a todos os colegas de laboratório de Experimentação em Neuropatologias (LEN), Maurício, Juliete, Leonardo, Josiane e Melânia, muito obrigada pela convivência virtual dos nossos encontros semanais durante os seminários do grupo de pesquisa, sempre foi mais

divertido com a presença de vocês. Agradeço a amizade, a companhia e as conversas.

Agradeço à UFSC, à PRODEGESP, ao CCB, e ao Departamento de Bioquímica e ao meu chefe na época Prof. Alcir Luiz Dafré pela concessão do afastamento para realização do mestrado. Sem o afastamento, esse trabalho não teria sido possível. Então agradeço de coração por ter tido essa oportunidade e pelo prof. Alcir sempre incentivar a sua equipe técnica a continuar estudando. Agradeço ao Prof. Carlos também, que assumiu a chefia durante o meu afastamento, por continuar a me incentivar nos estudos de pós-graduação. Agradeço as minhas queridas colegas Gabriela e Margot por serem boas colegas e sempre me incentivarem a estudar, e por terem continuado trabalhando no Departamento de Bioquímica durante o período da minha licença. Agradeço a Elza, nossa colega falecida, que também sempre me incentivou a continuar com os estudos e a pesquisa.

Agradeço aos professores que aceitaram compor essa banca, agradeço as avaliações de vocês sobre esse trabalho, e espero que esteja à altura de suas expectativas. Faço um agradecimento especial aos Professores Alfeu e Rozângela, que compuseram também minha banca de qualificação, tentei seguir todas as suas recomendações. Agradeço também à professora Rozângela e à doutora Valdelúcia pela inspiração de ver mulheres bioquímicas na área de bioinformática, e por me incentivarem a seguir essa área.

Agradeço a todo o pessoal da UFSC (professores, técnicos, estudantes, terceirizados), e principalmente às pessoas que convivi no Departamento de Bioquímica desde que comecei a trabalhar nessa instituição em 2017. Quase nem acredito que faço 5 anos de UFSC em maio desse ano! Para mim, sempre foi uma alegria trabalhar nessa Universidade, e quero que seja assim por muitos anos.

Também não poderia deixar de agradecer a algumas pessoas e organizações que contribuíram para a minha aquisição de conhecimento durante o mestrado. Agradeço à Professora Raquel Minardi da UFMG, pelo seu curso de Computação aplicada a Bioinformática, e pelo seu canal do youtube OnlineBioinfo, os quais me deram muito suporte e inspiração durante os meus estudos de bioinformática estrutural e programação Python. Também agradeço aos encontros de atualização de conhecimento e aos Congressos organizados pelo WBDS LA (Women in Bioinformatics and Data Science Latin America), vocês foram muito importantes

durante o meu mestrado, me dando apoio e inspiração. Também agradeço à 10ª Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos, que foi um evento maravilhoso organizado pelo LNCC. Agradeço por participar dos Congressos de Química Medicinal da UFCSPA e aprender muito com essas pessoas, além de rever as professoras de química Ana Cristina e Simone, que me deram aula durante a graduação. Agradeço pela honra de apresentar parte dos meus resultados da dissertação no *Current Topics in Biochemistry 2021* (Curto 2021) na modalidade oral, foi uma grande felicidade e satisfação fazer parte desse evento. Agradeço por ter tido muitas oportunidades durante o mestrado, e durante essa pandemia, de participar de inúmeros cursos, eventos, palestras e congressos internacionais e nacionais, os quais sempre foram fontes de inspiração para continuar com essa dissertação de mestrado e ver que eu estava no caminho certo.

Apesar dos tempos incertos, mais de dois anos de pandemia e isolamento social, e considerando todo o estresse que essa situação tem causado nas pessoas em geral, acredito que esse período foi aproveitado ao máximo, e apesar de todos os contratemplos, foi bastante produtivo e proveitoso academicamente.

RESUMO

A glutathiona peroxidase 4 (GPX4) é uma importante enzima antioxidante, que possui a capacidade de reduzir peróxidos inorgânicos e orgânicos em seus respectivos álcoois. A GPX4 é um alvo molecular promissor para induzir morte celular em tumores resistentes. Células tumorais resistentes à quimioterapia tradicional possuem altos níveis de lipídios poli-insaturados e dependência adquirida de GPX4. A inibição da GPX4 é uma das formas de causar morte celular ferroptótica, pois é uma das principais enzimas capazes de impedir peroxidação lipídica em membranas. Alguns inibidores de GPX4 já mostraram resultados promissores em linhagens tumorais e em modelos animais. Entretanto, essas moléculas não possuem algumas das características farmacocinéticas necessárias para se tornarem compostos líderes. Dessa forma, encontrar novas moléculas inibidoras (*hits*) de GPX4 a partir dos inibidores já existentes, é uma estratégia interessante. No presente trabalho, foram utilizadas metodologias computacionais para identificar novos inibidores de GPX4 em dois sítios de interação: na selenocisteína 47 e na cisteína 66. Dentre as principais metodologias utilizadas estão: a triagem virtual baseada na estrutura do ligante, o cálculo de propriedades farmacocinéticas e toxicológicas, o *docking consensus* e análise de predição da atividade biológica. Além disso foi realizado o estudo das interações intermoleculares entre o alvo molecular e as pequenas moléculas. Como principais resultados, obtivemos 7 pequenas moléculas promissoras denominadas nesse estudo como 395 (top1), 275 (top2), 241 (top3), new344 (top4), 344 (top5), 135 (top6) e 268 (top7). Todas essas moléculas apresentam algumas características em comum, tais como: a presença de anel tiofeno e de grupamentos amida, a ausência de toxicidade Herg e o respeito às regras de Lipinski. Além disso, 3 das moléculas encontradas também apresentaram o potencial de realizar ligações de hidrogênio com a Glicina 47, e 4 moléculas também de realizar ligações de hidrogênio com a água 441. Essas interações são importantes pois as mesmas também ocorrem na estrutura cristalográfica 6HKQ. Dessa forma, apresentamos como perspectiva futura desse trabalho o estudo mais focado das 7 moléculas promissoras encontradas, podendo ser realizados estudos de dinâmica molecular e também ensaios *in vitro* em modelos de ferroptose.

Palavras-chave: triagem virtual, *docking* molecular, ferroptose, glutathiona peroxidase.

ABSTRACT

Glutathione peroxidase 4 (GPX4) is an important antioxidant enzyme that reduces inorganic and organic peroxides in their respective alcohols. GPX4 is a promising molecular target to induce cell death in resistant tumors. Tumor cells resistant to traditional chemotherapy have high levels of polyunsaturated lipids and acquired dependence of GPX4. Inhibition of GPX4 is one of the ways to cause ferroptotic cell death, as it is one of the main enzymes capable of preventing lipid peroxidation in membranes. Some GPX4 inhibitors have already shown promising results in tumor lines and in animal models. However, these molecules lack some of the pharmacokinetic characteristics to become lead compounds. Thus, finding new GPX4 inhibitory molecules (hits) from existing inhibitors is an interesting strategy. In this present work, computational methodologies are used to identify new molecules that inhibit GPX4 in two different binding sites: the SEC47 and the CYS66. As a methodology, we use the Ligand-based virtual screening, the calculation of molecule pharmacokinetic and toxicological properties, the *consensus docking* and the analysis of prediction of biological activity. In addition, the study of intermolecular interactions between the target and small molecules was carried out. As mainly results, we found 7 promising small molecules called in these study as 395 (top1), 275 (top2), 241 (top3), new344 (top4), 344 (top5), 135 (top6) and 268 (top7). All these molecules showed some common features, such as: the presence of thiophen ring and presence of amide groups, the absence of Herg toxicity and were alligned with the Lipinski Rules. Furthermore, 3 molecules also share the potential to perform hydrogen bonds with Glycine 47, and 4 molecules also share the potential to perform hydrogen bonds with water 441. These interactions are important because the same interactions also occur in the 6HKQ crystallographic structure. Therefore, we presented as a future perspective of this work, a study more focused on these 7 potential molecules, performing molecular dynamic simulations and also in vitro assays in ferroptose models.

Key words: virtual screening, molecular *docking*, ferroptosis, glutathione peroxidase.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 A glutiona peroxidase 4 (GPX4) e sua importância biológica.....	11
1.2 Os inibidores de GPX4	16
1.3 Bioinformática estrutural, quimioinformática e desenvolvimento de novos fármacos.....	22
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral.....	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3. METODOLOGIA	27
3.1 Critérios empregados na avaliação preliminar da qualidade na aquisição dos dados cristalográficos	27
3.2 Análise Comparativa das estruturas de GPX4 humanas depositadas no PDB....	28
3.3 Análise de interações intermoleculares.....	29
3.5 <i>Docking</i> molecular.....	30
3.6 <i>Target-Based Virtual Screening</i>	32
3.7 <i>Ligand-Based Virtual Screening</i>	33
3.8 Recursos computacionais utilizados.....	37
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Aquisição das estruturas e avaliação de qualidade	38
4.2 Análise Comparativa das Estruturas de GPX4 humanas depositadas no PDB ...	39
4.3 Análise das Interações Intermoleculares entre GPX4 e S-ML162.....	40
4.4 Identificação dos sítios de ligação da GPX4	48
4.4 <i>Docking</i> semi-rígido entre GPX4 e S-ML162	51
4.4 <i>Redocking</i> e <i>Docking</i> flexível entre GPX4, S-ML162 e 1S,3R-RSL3.....	54
4.5 <i>Target-Based Virtual Screening</i>	58
4.5 Ligand-Based Virtual Screening	64
5. CONCLUSÃO	76
6. PERSPECTIVAS	77
6. REFERÊNCIAS	78
ANEXO 1 – Figura sobre distâncias entre os resíduos de aminoácidos da tétrade catalítica da GPX4 de estruturas obtidas do PDB.....	85
ANEXO 2 – Tabela de Inibidores conhecidos de GPX4.	86
ANEXO 3 – Tabelas de Resultados do <i>Docking</i> Flexível	88

1. INTRODUÇÃO

1.1 A glutathiona peroxidase 4 (GPX4) e sua importância biológica

Glutathiona peroxidases (GPX) são uma família de enzimas tetraméricas ou monoméricas que possuem um centro catalítico altamente conservado, que possui um resíduo de selenocisteína ou cisteína, que realiza uma reação de substituição nucleofílica entre um hidroperóxido e dois grupos tióis. (MAIORINO et al., 2015). Nos mamíferos foram identificados 8 tipos diferentes de glutathionas peroxidases (TOPPO et al., 2009). As GPX que utilizam selenocisteína em seu sítio ativo são a GPx1, a GPx2, a GPx3, a GPx4 e a GPx6. Já a GPX5, GPX7 e GPX8 contém cisteína como principal resíduo catalítico. Além disso, a maioria das GPX são homo-tetrâmeros, com a exceção da GPX4, GPX7 e GPX8, que se apresentam na forma monomérica. A GPx4 é a única que contém selenocisteína e é monomérica (TOPPO et al., 2009; MAIORINO et al., 2015). Além disso, apresentar estrutura monomérica confere acesso facilitado dos substratos ao sítio catalítico. Todas as GPXs possuem uma cinética semelhante, apesar da grande variabilidade de preferência por substratos. Além da função antioxidante, as GPXs possuem um importante papel regulatório (FLOHÉ et al., 2020).

A glutathiona peroxidase 4 (GPX4) é um alvo promissor para induzir morte celular em tumores resistentes. Células tumorais resistentes possuem altos níveis de lipídios poli-insaturados, dependência adquirida de GPX4 (EATON et al., 2020) e níveis mais altos de ferro do que células não malignas (HASSANNIA et al., 2018). A inibição da GPX4 é uma das formas de causar morte celular ferroptótica, pois é uma das principais enzimas capazes de impedir peroxidação lipídica em membranas (MAIORINO et al., 2017). Entretanto, recentemente foram descobertas outras enzimas, genes e moléculas envolvidos na proteção contra a peroxidação lipídica (DOLL et al., 2019; NAIME et al., 2022). A Coenzima Q10 (CoQ10), por exemplo, atua como um *ROS Scavenger* para peróxidos lipídicos, a CoQ10 é regenerada pela Proteína supressora da Ferroptose 1 (FSP1, do inglês, *ferroptosis suppressor protein 1*) ao utilizar NAD(P)H (DOLL et al., 2019). A ferroptose é um tipo de morte celular caracterizada por disfunção mitocondrial, disfunção no metabolismo do ferro, aumento da ação de lipooxigenases (LOX), inibição dos sistemas de defesas antioxidantes (GSH, GPX4 e outros) e extensa peroxidação lipídica; reversível por quelantes de ferro ou antioxidantes lipofílicos (YANG et al., 2014; STOCKWELL & JIANG., 2020;

NAIME et al., 2022). Os indutores de ferroptose são divididos em duas classes. Na classe I estão os inibidores da importação de cistina que atuam através do sistema xc⁻ (como por exemplo, erastina, sorafenibe, sulfassalazina e glutamato). Como consequência, eles causam depleção de glutathiona reduzida (GSH). A classe II corresponde aos inibidores diretos da enzima GPX4, como por exemplo o 1S, 3R-RSL3 (SHIMADA et al., 2016). Entretanto, a depleção de GSH pode não inibir a GPX4 completamente principalmente in vivo, pois a enzima pode utilizar outros tióis como fontes redutoras, tais como cisteínas e proteínas ricas em cisteína, bem como a própria GPX4. Dessa forma, inibir diretamente a GPX4 é considerada uma estratégia mais efetiva (WEI et al., 2020). Essa estratégia é muito interessante no câncer, já que diversas linhagens tumorais (carcinoma ovariano, câncer de mama triplo-negativo, carcinomas adrenocorticais, linfoma difuso de células B, câncer de fígado, pâncreas e cólon-retal) demonstraram ser intrinsicamente sensíveis à ferroptose (ZOU & SCHREIBER, 2020).

A GPX4 é uma enzima capaz de reduzir peróxidos inorgânicos e orgânicos, incluindo peróxidos de fosfolípidos e de ésteres de colesterol, em seus respectivos álcoois. Primeiramente, haverá uma redução catalítica do peróxido pela GPX4, seguida pela oxidação do aminoácido selenocisteína, localizado no seu sítio ativo. Posteriormente, duas moléculas de glutathiona reduzida (GSH) são utilizadas para restaurar o estado de oxidação deste resíduo de aminoácido no seu sítio ativo. E então haverá a liberação de dissulfeto de glutathiona (GSSG).

Estruturalmente, a GPX4 humana citosólica é formada por uma cadeia polipeptídica simples constituída por 170 aminoácidos e com peso molecular de 19,5 kDa. A estrutura da proteína mostra um típico motivo de tioredoxina, que consiste em quatro alfa hélices localizadas na superfície da proteína e sete filamentos beta, cinco dos quais estão agrupados para formar uma folha beta central (SCHEERER et al., 2007) conforme pode ser visualizada na figura 1.

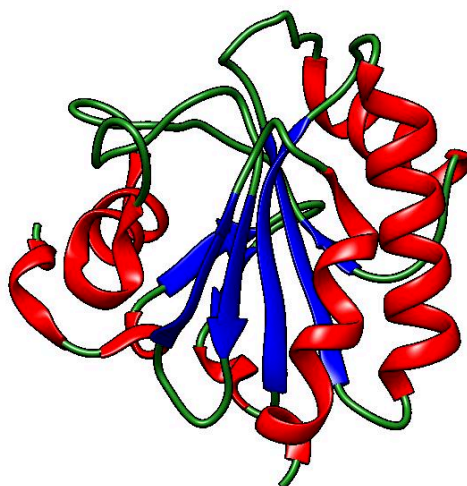


Figura 1. Estrutura da proteína GPX4, mostrando as folhas beta em azul e as alfas hélices em vermelho. Figura preparada pela autora no Chimera, a partir da estrutura 6HKQ do PDB. Fonte: a autora.

Na GPX4 nativa e na estrutura 2OBI (GPX4 com a mutação SEC46CYS), sugere-se que a selenocisteína 46 (que é o resíduo de aminoácido catalítico) está presente como ânion, e que a glutamina 81 e o triptofano 136 sustentam ligações de hidrogênio com o átomo de selênio (sob a forma de selenol/selenolato) para estabilizar sua forma desprotonada (SCHEERER et al., 2007). Apesar de não ser a forma majoritária, o ácido selenínico (SeOO-) já foi encontrado em duas estruturas cristalográficas: a 6EWL (uma estrutura de GPX4 humana) e a 1GP1 (uma estrutura de GPX4 bovina) (BORCHERT et al., 2018).

A tétrade catalítica, formada pelos resíduos de aminoácidos selenocisteína 46 (SEC46), glutamina 81 (GLN81), triptofano 136 (TRP136) e asparagina 137 (ASN137) (MOOSMAYER et al., 2021) está localizada em uma impressão plana da superfície da proteína (SCHEERER et al., 2007). Ela se estende para uma superfície positivamente carregada com exposição de fragmentos de aminoácidos básicos (LYS48, LYS135 e ARG152) e da THR139 (alifático hidroxilado). Esse motivo estrutural é delimitado pelos seguintes resíduos: MET156 (que contém enxofre), os PRO155, GLY154, ILE129, LEU130, ALA133, ILE134, GLY79 (todos esses considerados alifáticos) e a PHE78 (aromático). A maioria desses resíduos possuem um caráter mais apolar e, dessa forma, podem estar envolvidos no posicionamento de hidroperóxidos lipídicos (SCHEERER et al., 2007). A tétrade catalítica das

estruturas 6HKQ/SEC46, 6HKQ/CYS46, 2OBI e 6EWL também estão demonstradas no anexo 1.

Quando mutada para cisteína 46 (U46C), a GPX4 mantém de 1 a 10% de sua atividade enzimática (SCHEERER et al., 2007). Entretanto, em células PFa1 transduzidas parece haver uma compensação na expressão gênica da proteína mutante, que é 3 vezes superior em relação à nativa (MANNES et al., 2011). Segundo Borchert e colaboradores (2018), a troca Sec46Cys altera a geometria dos resíduos de aminoácidos envolvidos na catálise. Na estrutura cristalina 2OBI, onde há a substituição Sec46Cys, a distância de Cys46 a Trp136 foi igual a 3,9Å (SCHEERER et al., 2007), o que excede as distâncias usuais de ligação de hidrogênio. Para a enzima contendo Sec (6ELW) essa distância foi consideravelmente menor (3,2Å). Por outro lado, as distâncias dos resíduos catalíticos principais (Sec46 / Cys46) em relação ao resíduo Gln81 foram semelhantes para ambas as variantes enzimáticas (BORCHERT et al., 2018). De acordo com as análises de distâncias realizadas pelo Laboratório de Biologia Computacional e Bioinformática da UFSC, no Software Chimera, é possível que o tipo de estrutura cristalográfica depositada no PDB (se for holo ou apo) é mais importante do que o fato de terem ou não a mutação Sec46Cys no sítio ativo. A conformação Apo é aquela que corresponde à proteína na forma livre, enquanto à conformação holo corresponde à proteína interagindo com o ligante. Sendo que a única estrutura considerada Holo da GPX4 é a 6HKQ, pois foi co-cristalizada com um inibidor do tipo pequena molécula, o S-ML162 (MOOSMAYER et al., 2021). As distâncias dos aminoácidos das tétrades catalíticas, na presença e na ausência de mutação na Sec46Cys estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Distâncias dos resíduos de aminoácidos em função da mutação Sec46Cys em diferentes estruturas de GPX4. Fonte: a autora.

Estrutura no PDB	Resíduo aa catalítico	GLN81 OE1 - SEC/CYS46	TRP136 NE1 - SEC/CYS46	TRP136 NE1 - ASN 137 ND2	GLN81 CB - ASN 137 OD1	GLN81 CG - SEC/CYS46
6HKQ	SEC46	6.1657	5.0338	3.2640	5.4993	4.6195
6HKQ	CYS46	6.4259	4.8778	3.2640	6.5344	4.8482
2OBI	CYS46	3.3296	3.9169	3.2646	4.2959	5.5044
6EWL	SEC46	4.8198	3.7464	5.3011	5.6507	5.5994

Legendas: GLN81 OE1: átomo de oxigênio E1 do resíduo de Glicina 81. SEC/CYS46: átomo de selênio da selenocisteína 46 nas estruturas 6HKQ e 6EWL ou átomo de enxofre da cisteína 46 nas estruturas 6HKQ e 2OBI. TRP136 NE1: átomo de nitrogênio NE1 do resíduo de triptofano 136. ASN 137 ND2: átomo de nitrogênio D2 dos resíduos de asparagina 137. ASN 137 OD1: átomo de oxigênio D1 dos resíduos de asparagina 137. GLN81 CG: átomo de carbono gama do resíduo de glutamina 81.

Em relação à influência da temperatura na atividade da GPX4, foi verificado que a atividade catalítica aumenta até 35°C e decresce em temperaturas mais altas, tendo uma atividade residual de 10% à 45°C. Em condições de homeostase, o pH que essa enzima atua no organismo é em torno de 7.4, porém, em ensaios in vitro, o seu pH ótimo é 8. Em relação à preferência por substratos, a enzima tem maior afinidade pelo peróxido de hidrogênio, seguido de hidroperóxido de fosfatidilcolina (PC-OH) e, quando comparado aos anteriores, apresenta menor afinidade pelo hidroperóxido de tercbutila. De acordo com Borchert e colaboradores (2018), na reação da GPX4 com um peróxido (ROOH), a selenocisteína alterna entre o selenol (Se^-), ácido selênico (SeO^-) e ácido selínico (SeOO^-) durante o ciclo catalítico. Dependendo do estado redox celular, a GPX4 pode funcionar predominantemente dentro do ciclo catalítico de "baixa oxidação", no qual o estado de oxidação do selênio se desloca entre Se^- e SeO^- . Sob estresse oxidativo, a enzima pode ser deslocada para o ciclo catalítico de "alta oxidação", no qual, o estado de oxidação do selênio se desloca entre SeO^- e SeOO^- (BORCHERT et al., 2018) como podemos visualizar na figura 2.

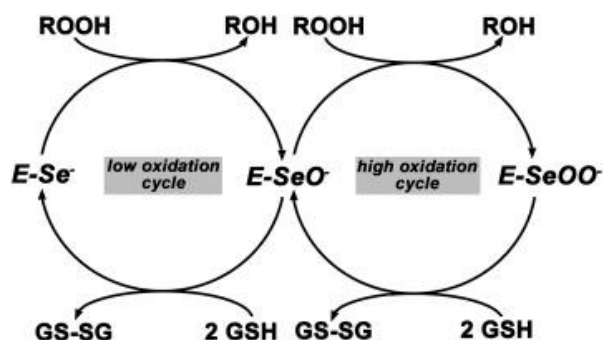


Figura 2. Ciclos de atividade catalítica da GPX4 e os estados de oxidação do resíduo de selenocisteína nas formas de selenol, ácido selênico e ácido selínico, adaptado de Borchert et al., 2018. ROOH: peróxido. ROH: álcool. Se⁻: selenol. SeO: ácido selênico. SeOO: ácido selínico. GS-SG: dissulfeto de glutatona. GSH: glutatona reduzida.

1.2 Os inibidores de GPX4

Revisando a literatura, foi verificado que a maioria dos inibidores de GPX4 possuem como mecanismo de ação a formação de ligação covalente com a enzima no resíduo de aminoácido selenocisteína 46. A primeira exceção é a molécula withaferina A, que possui afinidade de ligação pelo resíduo de cisteína 107. A segunda exceção é o S-ML162, que também possui afinidade pela cisteína 66. Todas as moléculas inibidoras encontradas têm em comum o carácter eletrofílico, que é atraído por sítios ativos nucleofílicos, como é o caso do sítio ativo da GPX4. Os compostos foram classificados em 5 grupos baseados em seus quimiotipos. Os principais quimiotipos encontrados foram as cloroacetamidas, as clorometiltriazinas, os nitroisozazóis, os diacilfuroxanos e as lactonas. O grupo com maior número de moléculas inibidoras é o das cloroacetamidas, cujas moléculas 1S, 3R -RSL3 e ML162 são as mais estudadas. A tabela contendo as moléculas inibidoras está no anexo I, e foi realizada através de uma revisão de literatura (YANG et al., 2008; WEIWER et al., 2011; YANG et al., 2014; SHIMADA et al., 2016; HASSANIA et al., 2018; EATON et al., 2019; EATON et al., 2020; STOCKWELL & JIANG, 2020).

O composto letal RAS seletivo número 3 (RSL3, do inglês *RAS-selective lethal compound number 3*), foi o primeiro inibidor de GPX4 identificado, foi descrito em um *high throughput screening* quantitativo (qHTS) para a seleção de compostos letais seletivos às células que apresentam o oncogene RAS (do inglês, *Rat Sarcoma Virus*) mutado (YANG & STOCKWELL., 2008). Posteriormente, investigou-se o mecanismo de ação do RSL3, e por uma estratégia de quimioproteômica, identificou-

se a GPX4 como alvo preferencial. A GPX4 foi confirmada como alvo após uma série de ensaios envolvendo o estudo da ferroptose, onde foram medidas a atividade enzimática da GPX4, adicionalmente, foram realizados ensaios de modulação da expressão de GPX4 (utilizando estratégias de silenciamento e de super-expressão), e observação da formação de adutos covalentes com o RSL3 entre outras metodologias (YANG et al., 2014). O RSL3 é uma molécula quiral com 4 estereoisômeros. A porção de cloroacetamida deste composto é essencial para a atividade inibidora, que ocorre após o composto se ligar covalentemente à selenocisteína da GPX4, com a liberação de um átomo de cloro. O 1S, 3 R – RSL3 é considerado o composto ativo por ser seletivo para células tumorais (que expressam RAS mutado) e por ter um EC50 na faixa de 10 nM. Enquanto seus isômeros não são seletivos entre células tumorais e normais, também apresentam um EC50 maior, na faixa de 3 a 10 µM (YANG et al., 2014; STOCKWELL & JIANG., 2020). O RSL3 forma adutos com a GPX4 purificada, mas em um grau de interação bem menor quando comparada à formação de adutos em células íntegras. Isso é justificável, em parte, pela necessidade de interação do RSL3 com uma proteína adaptadora (14-3-3 Épsilon) para favorecer a interação e ligação com a GPX4 (VUCKOVIC et al., 2019; EATON et al., 2019).

Um estudo desenvolvido por Weiwer e colaboradores (2012) identificou duas moléculas seletivas à proteína RAS e que mais tarde foram confirmadas como inibidores de GPX4: o ML162 e o ML210. O ML162 é uma mistura racêmica ativa indutora de ferroptose, cujo EC50 varia de 25 a 35 nM (WEIWER et al., 2012). O ML162 possui um grupo alfa-cloroacetamida (essencial para a atividade), um grupo tiofeno, um grupo 3-cloro-metoxianilina e um grupo fenetilamina. O enantiômero S do S-ML162 é o único inibidor que foi co-cristalizado com a GPX4 (estrutura 6HKQ no PDB), e ele serviu de base para a síntese de vários compostos DPI similares. O S-ML162 forma adutos com a GPX4 purificada, sendo mais potente e seletivo que o RSL3 (WEIWER et al., 2012; YANG et al., 2014; EATON et al., 2019; STOCKWELL & JIANG, 2020;). A estrutura do RSL3 e do ML162 podem ser visualizadas na figura 3.

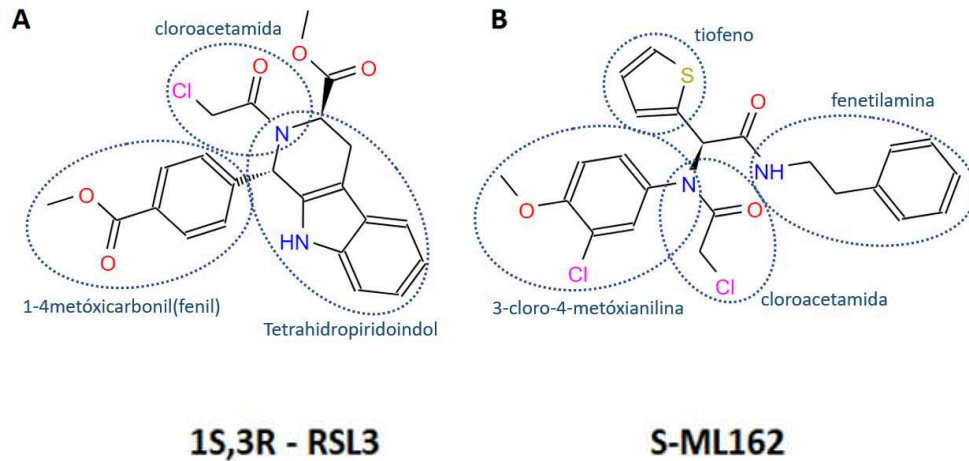


Figura 3. A) Estrutura química do 1S, 3R - RSL3, uma alfa-cloroacetamida, mostrando os grupos químicos metoxycarbonilfenol e tetrahidropiridoindol. B) Estrutura do S-ML162, uma alfa-cloroacetamida, com os seus grupos químicos clorometóxi-anilina, fenetilamina e tiofeno. As estruturas foram adaptadas da base de dados ZINC15 (<https://zinc15.docking.org/>). Fonte: a autora.

O estudo de Moosmayer e colaboradores (2021) adicionou mais uma evidência na forma como o composto ML162 atua ao inibir a GPX4. Os dois enantiômeros S e R do ML162 são ativos e fazem adutos covalentes com os resíduos de aminoácidos SEC46 e a CYS66, tanto que só foi possível realizar a cristalização, inserindo uma mutação CYS66SER, indicando que este pode ser um importante sítio de interação alostérica. Além disso, nesse mesmo estudo, também reafirmam que a falta de um sítio de ligação mais definido e profundo na estrutura da proteína GPX4 que poderia favorecer a interação do tipo inibidor alostérico para o ML162. Portanto, essas limitações implicam em dificuldades no desenvolvimento de inibidores de GPX4 que atuem em sítios importantes para a função catalítica da proteína.

Em seguida, uma série de compostos indutores de ferroptose (FIN, do inglês, *ferroptosis inducers*) foi sintetizada e classificada como compostos DPI. Em um ensaio de medição da atividade da GPX4 em lisados celulares, empregando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, oito compostos FIN (DPI17, DPI10, DPI12, DPI13, DPI17, DPI18, DPI19 e RSL3) inibiram a atividade de GPX4 de reduzir o hidroperóxido de fosfatidilcolina (PC-OOH) exógeno (YANG et al., 2014; STOCKWELL & JIANG., 2020). No estudo de Yang e colaboradores (2014), foram avaliados os compostos DPI17, DPI18, que formam o grupo das clorometiltriazinas, cuja estrutura é muito semelhante a da altretamina, conforme pode ser visualizado na

figura 4. As clorometiltriazinas são um grupo fortemente relacionado às alfa-cloroacetamidas.

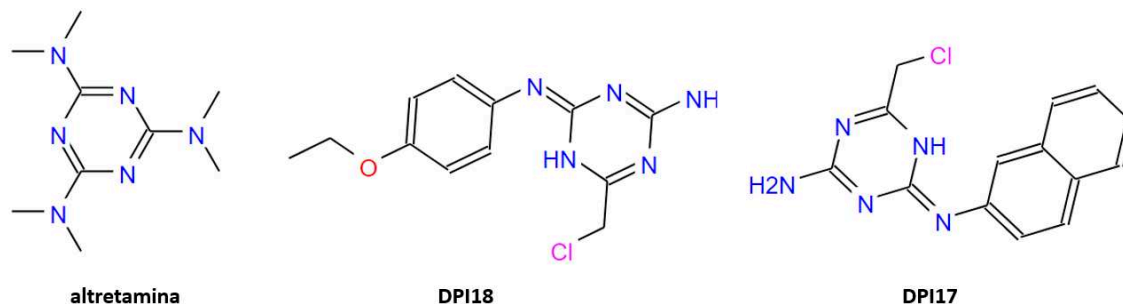


Figura 4. Estruturas químicas da altretamina e de duas clorometiltriazinas (DPI18 e DPI17) retiradas da base de dados ZINC15 (<https://zinc15.docking.org/>).

O composto ML210 exibiu um padrão de morte celular em mais de 800 linhagens tumorais, que é muito semelhante à resposta dos compostos ML162 e do RSL3. A descoberta do composto ML210 (também denominado DPI10) permitiu o desenvolvimento dos nitroisozazóis, uma nova classe de compostos inibidores de GPX4. Essa classe está profundamente relacionada aos furoxanos, pois ambas as classes geram espécies eletrofílicas de óxido nitrila, que apresentam a estrutura geral R-CNO, que se ligam covalentemente à GPX4. O ML210 é um pró fármaco e necessita ser convertido em JKE 1674 e este último se transforma em JKE-1777 ou JKE-1708, que se ligam covalentemente à GPX4, através da formação de um aduto selenohidroximato (EATON et al., 2020; EATON et al.,2019). Esse mecanismo de conversão pode ser visualizado nas figuras 5 e 6.

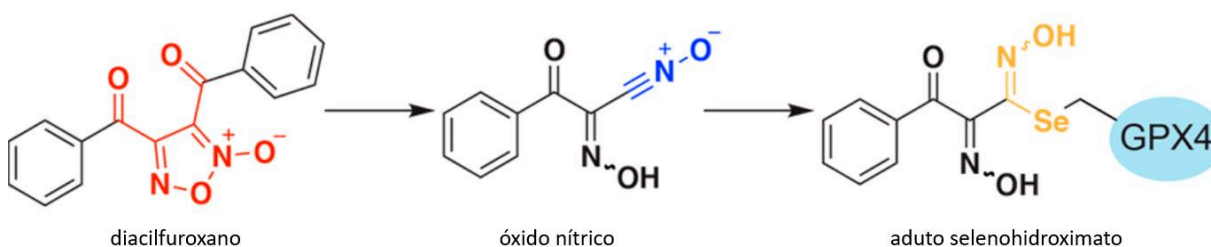


Figura 5. Conversão de diacilfuroxanos em espécies com o grupo óxido nítrico, que formam adutos do tipo selenohidroximato com a enzima GPX4. Fonte: adaptado de Eaton et al., 2019.

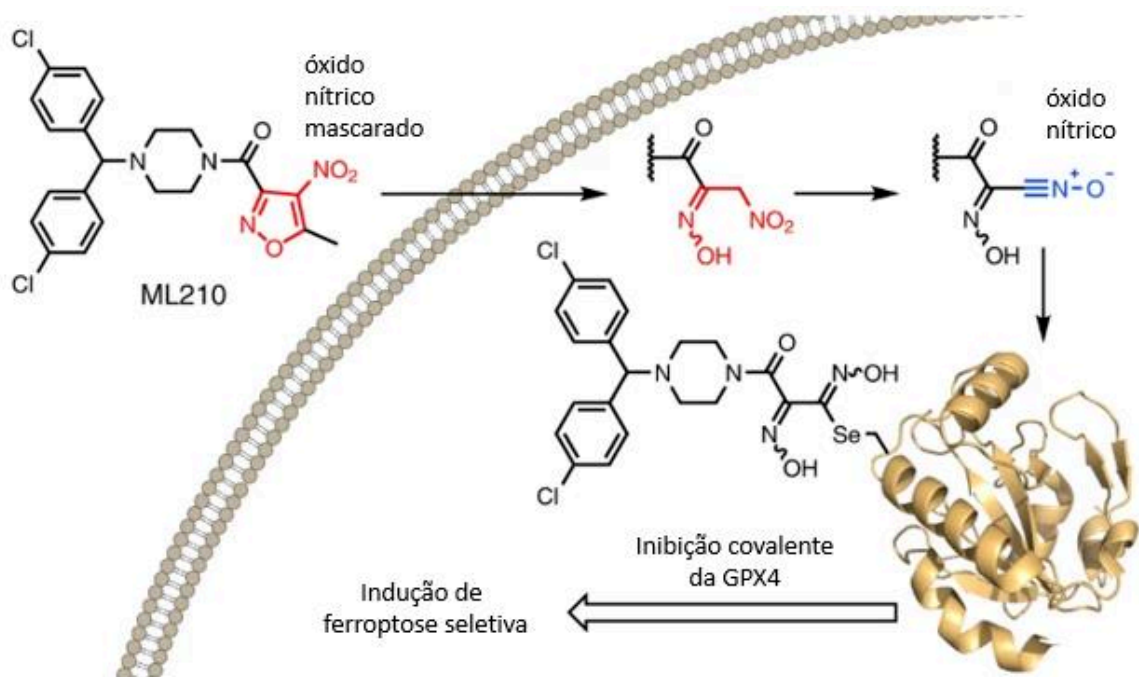


Figura 6. Conversão do ML210 (um nitroisazol) em espécies reativas de óxido de nítrico, que inativam a GPX4. Fonte: adaptado de Eaton et al., 2020.

Mais compostos indutores de ferroptose foram descobertos no estudo de Shimada e colaboradores (2016), onde foram analisados 56 compostos letais independentes de caspase (CIL) e identificados 3 indutores de ferroptose eletrofílicos semelhantes ao composto RSL3, que foram identificados como CIL69, CIL75 e CIL79. Nesse estudo, eles também desenvolveram o FIN56, que é uma molécula que induz degradação de GPX4, sem interagir fisicamente com a enzima.

Entre os compostos inibidores da GPX4 também foram identificadas as lactonas, este quimiotipo possui dois compostos principais já identificados, a withaferina A (HASSANIA et al., 2018), que é uma lactona esteróide epóxido e o DMOCPLT (DING et al., 2019), um composto sintético derivado do partenólideo, este último é uma substância natural encontrada como metabólito secundário em algumas espécies de plantas. A withaferina A possui 11 átomos quirais, o que leva a 2^{11} isômeros, 2048 isômeros possíveis no total. E esses outros isômeros possíveis ainda não foram estudados como inibidores de GPX4. A withaferina A é um agente natural de indução de ferroptose, que tanto inibe a GPX4 quanto aumenta o conteúdo de Ferro lábil intracelular, ativando a heme-oxigenase 1. A withaferina A alquila preferencialmente locais nucleofílicos contendo tióis por meio da adição de Michael. Ademais, a withaferina A interage preferencialmente com cisteínas ao invés de selenocisteínas. O tratamento de tumores xenográficos de neuroblastoma com withaferina A aumentou o conteúdo de indicadores de ferroptose tais como hidroperóxidos de fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol e fosfatidilcolina, e diminuiu o tamanho dos tumores (HASSANIA et al., 2018). Já o DMOCPTL foi apresentado como um composto líder interessante, com a vantagem de ser mais potente do que a molécula original de partenólideo, que pode se ligar à GPX4 e causar a sua degradação por ubiquitinação, além de induzir processos de morte celular ferroptótica e apoptótica em modelos in vitro e in vivo para estudos empregando células de câncer de mama triplo negativo (DING et al., 2019).

Moléculas indutoras de ferroptose (e inibidores de GPX4) foram inicialmente descobertas através de triagens para encontrar compostos citotóxicos seletivos para às células com o oncogene RAS mutado. Apesar de não ser esperado encontrar moléculas inibidoras de GPX4 nesses estudos, tais achados não se tratam de meras coincidências. Pois, a super-expressão da proteína RAS oncogênica determina a modulação positiva do metabolismo lipídico, favorecendo a progressão tumoral (RICOULT et al., 2016; ZHANG et al., 2021). As vias de síntese de ácidos graxos e a do mevalonato parecem ser importantes na regulação da sensibilidade de células à ferroptose (SHIMADA et al., 2016).

Foi verificado que o composto ML210 e as cloroacetamidas RSL3 e ML162 são capazes de interagir com a proteína GPX4 mutante U46C, mostrando que a cisteína também pode formar adutos covalentes com tais inibidores. ML210 pode se ligar à tubulinas (EATON et al. 2019). Em relação à especificidade dos inibidores de

GPX4, foi verificado que o RSL3 e o S-ML162 (que são cloroacetamidas) também podem se ligar à selenoproteína tioredoxina redutase 1 (TXNRD1). Diacilfuroxanos podem se ligar à glutatona S-transferase ômega 1. No estudo de Gao e colaboradores (2018), foi verificada a possibilidade de interação do composto RSL3 com outras selenoenzimas, tais como a selenoproteína T do tipo tioredoxina redutase (SELT), a tioredoxina redutase 1 (TRXR1), a tioredoxina redutase 2 (TRXR2), a selenoproteína K (SELK), a selenoproteína S (SELS), a proteína adeniltransferase SeLO (SELO), selenoproteína H (SELH) e a selenoproteína N (SELN).

1.3 Bioinformática estrutural, quimioinformática e desenvolvimento de novos fármacos

A bioinformática é uma área de estudo onde são utilizadas técnicas e ferramentas computacionais para propor hipóteses, realizar experimentos, analisar dados e gerar novos conhecimentos na área de pesquisa biológica. De acordo com Florian Markowitz (2017), a bioinformática pode remodelar a área de pesquisa biológica. A quimioinformática funciona de forma semelhante, sendo prioritariamente aplicada às áreas de química medicinal e estudos inovadores. Tanto a bioinformática estrutural quanto a quimioinformática utilizam as informações estruturais das moléculas para prever moléculas mais promissoras e apresentar modelos de interações intermoleculares. Ambas as áreas são fundamentais para os processos que envolvem a descoberta e o desenvolvimento de fármacos. Na indústria farmacêutica, a utilização de metodologias de planejamento de fármacos com o auxílio de ferramentas computacionais (do inglês, *computer aided drug design* - CADD), é bastante comum, e tem sido usada há muitos anos, pois faz parte de um processo racional e econômico no desenvolvimento de novas moléculas promissoras (HUGHES et al., 2011; SWINNEY & ANTHONY, 2011; MUEGGE et al., 2017; CHAN et al., 2019).

As metodologias CADD podem ser classificadas em planejamento de fármacos baseado na estrutura (do inglês, *structure based drug design* - SBDD) ou planejamento de fármacos baseado no ligante (do inglês, *ligand based drug design* - LBDD). As metodologias SBDD se baseiam no conhecimento prévio da estrutura do alvo macromolecular, que podem ser proteínas, ácidos nucleicos, lipídios ou carboidratos. Os alvos mais estudados são os proteicos, e dentre eles estão os receptores acoplados à proteína G, os receptores tirosina quinase, as enzimas (como por exemplo as

quinases), os canais iônicos, os fatores de transcrição e algumas proteínas de transporte e de sinalização. Geralmente as metodologias SBDD utilizam *docking*, dinâmica molecular e modelos farmacofóricos do sítio ativo para identificação de moléculas com atividade biológica. Por outro lado, as metodologias LBDD se baseiam no conhecimento prévio de moléculas bioativas, que possuem uma estrutura tridimensional característica, grupos funcionais importantes, e propriedades farmacocinéticas conhecidas. As metodologias baseadas em LBDD utilizam modelos farmacofóricos dos ligantes, “impressão digital de moléculas” (do inglês, *molecular fingerprints*) além de estudos quantitativos de relação estrutura-atividade (do inglês, *quantitative structure-activity relationship* - QSAR). (SOTRIFER et al., 2011; HUGHES et al., 2011; MUEGGE et al., 2017; KONTOYANNI., 2017; YU & MACKERELL., 2017; MONTANARI et al., 2019).

Ambas as metodologias, SBDD ou LBDD, podem ser utilizadas em estudos de triagem virtual (do inglês, *virtual screening* - VS). De acordo com Verli e colaboradores (2014), a triagem virtual é um procedimento que analisa computacionalmente uma grande quantidade de ligantes, com o objetivo de selecionar, de acordo com algum critério pré-definido, compostos provavelmente mais ativos frente a determinado alvo farmacológico. A triagem virtual seria um experimento muito semelhante à triagem de alto rendimento experimental (*high throughput screening* - HTS), só que realizado de forma computacional. No entanto, a abordagem computacional é baseada em predições e cálculos teóricos realizados por algoritmos desenvolvidos com objetivos determinados.

O VS pode ser SBDD ou LBDD ou uma mistura de ambos. Existem muitas metodologias diferentes disponíveis de VS e não há um “padrão-ouro”, ou seja, as metodologias são escolhidas geralmente com base nas informações disponíveis sobre o ligante e a proteína alvo. Em geral, as metodologias de VS possuem muitos “falsos positivos”, moléculas que parecem interagir com o alvo *in silico*, mas que não interagem em ensaios de bancada, também conhecidas como *Decoys*. Além disso, nessa área de descoberta de fármacos (do inglês, *drug discovery* - DD) existem alguns termos técnicos importantes, como por exemplo *hit*, *lead* e *drug*. *Hit* é uma molécula que possui baixa ou média afinidade pelo alvo. Geralmente em estudos bem sucedidos de VS, o que nós obtemos são hits. *Lead* ou composto líder, é uma molécula com afinidade “subótima” de ligação pelo alvo. E *drug* é uma molécula que apresenta ótima afinidade

de ligação pelo alvo e que também possui outras características físico-químicas especiais que a enquadram como *drug-like* (HUGHES et al., 2011; VERLI et al., 2014, MONTANARI et al., 2019).

Existem algumas estratégias para aumentar a chance de encontrar um composto ativo em estudos de *virtual screening*. Segundo Sotriffer e colaboradores (2011), a construção de bibliotecas focadas de compostos (do inglês, *focused library*) pode aumentar em até 30% a chance de descobrir um composto ativo no VS, quando comparada a bibliotecas diversas (do inglês, *diversity based library*). A construção de bibliotecas focadas de compostos pode ser realizada através da aplicação de filtros diversos em bancos de dados de moléculas, como por exemplo: filtros de propriedades moleculares como regra dos 5 de Lipinski, *drug-like*, *lead-like*, *fragment-like*; aplicação de filtros ADME, filtros uni/bi/tridimensionais, filtros farmacofóricos, filtros de eliminação de propriedades indesejáveis (SOTRIFFER et al., 2011; KONTOYIANNI, 2017; LARSEN & OPREA, 2019). Existem muitos bancos de dados públicos de moléculas como o ZINC15, PubChem, ChEMBL, BindingDB e DrugBank, que podem ser utilizados para o preparo de *focused libraries* (STERLING & IRWIN, 2015; KIM et al., 2016; GAULTON et al., 2012; GILSON et al., 2015; WISHART et al., 2018). A ZINC15 por exemplo, é uma base de dados que contém mais de 750 milhões de moléculas comercialmente disponíveis e mais de 230 milhões de moléculas prontas para estudos de *docking* molecular (STERLING & IRWIN, 2015). Além disso, o ZINC15 é uma base de dados integradas a outros bancos de dados como HMDB, ChEMBL, DrugBank, UniProt, ClinicalTrials.gov. Dessa forma, a ZINC15 representa um importante centro de informações integradas, como informações sobre atividade biológica e moléculas bioativas (STERLING & IRWIN, 2015). Permitindo, também, vários tipos de busca de compostos, além de possibilitar a montagem de bibliotecas focadas baseadas em ligantes anotados para um determinado gene ou para grupos de genes ortólogos (STERLING & IRWIN, 2015).

O atracamento molecular ou encaixe molecular (do inglês, *molecular docking*) é um conjunto de metodologias que visam identificar compostos capazes de interagir com um dado sítio macromolecular e identificar a geometria adotada por ambos ligante e sítio de ligação nos processos de encaixe (MONTANARI et al., 2019). Os procedimentos de docagem são utilizados para prever a orientação e conformação do ligante no sítio ativo, e prever a afinidade de ligação dos complexos proteína-

ligante. Existem muitos tipos de *docking* molecular, que podem ser classificados de acordo com os algoritmos de busca de conformações dos ligantes, funções de pontuação escolhidas, e flexibilidade do ligante e do alvo macromolecular. Como o *docking* molecular é um problema complexo, geralmente são utilizadas heurísticas (métodos que buscam aproximações) e entre esses métodos, o algoritmo genético é um dos algoritmos de busca mais amplamente utilizados. O algoritmo genético é utilizado no software DockThor por exemplo. Já as funções de pontuação podem ser empíricas, baseadas em campos de força ou em conhecimento. Em relação à flexibilidade, o *docking* pode ser classificado em 3 tipos: *docking* rígido (proteína e ligantes rígidos), *docking* semi-rígido (proteína rígida e ligante flexível) e *docking* flexível (proteína com algumas cadeias laterais de resíduos de aminoácidos flexíveis e ligante flexível). Quanto maior a flexibilidade do sistema, maior a acurácia da técnica, porém maior também serão os custos computacionais, o que faz o *docking* flexível ser uma das últimas etapas em estudos de virtual screening. Em relação aos programas disponíveis, existe uma infinidade de programas para realizar estudos de *docking* molecular, alguns são de livre acesso enquanto outros são comerciais. Dentre alguns exemplos de programas importantes de *docking* molecular estão: o AutoDock, o AutoDock Vina, o DOCK, o SwissDock, o DockThor e o BindScope (TROTT & OLSON, 2010; SOTRIFFER et al., 2011; VERLI et al., 2014; FORLI et al., 2016; KONTOYIANNI et al., 2017; PAGADALA et al., 2017; MONTANARI et al., 2019, SKALIC, M. et al., 2019; DE MAGALHÃES et al., 2014; DOS SANTOS et al., 2015; GUEDES et al., 2021a; GUEDES et al., 2021b).

No presente trabalho, foram utilizadas metodologias computacionais como o *virtual screening* para identificar novas moléculas candidatas a inibidoras de GPX4. É importante ressaltar o caráter inovador desse trabalho, visto que esse é um dos primeiros estudos de *virtual screening* realizados com essa enzima. Além disso, essas moléculas encontradas, se efetivas como inibidores (em ensaios de atividade enzimática), poderão servir como compostos líderes para o aprimoramento de moléculas mais eficazes, servir como ferramentas para o estudo da ferroptose, e adicionalmente, e até como fármacos antitumorais em potencial (após a avaliação in vivo), se tiverem as propriedades adequadas.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Predizer potenciais inibidores da enzima GPX4 utilizando técnicas de planejamento de fármacos com auxílio de ferramentas computacionais.

2.2 Objetivos Específicos

-Selecionar e comparar as estruturas tridimensionais da enzima GPX4 disponíveis no PDB;

-Construir uma biblioteca focada de compostos utilizando como referência a molécula inibidora S-ML162;

-Realizar uma triagem virtual da biblioteca de compostos utilizando *docking* molecular e técnicas teóricas que envolvem simulações computacionais.

3. METODOLOGIA

3.1 Critérios empregados na avaliação preliminar da qualidade na aquisição dos dados cristalográficos

As informações estruturais sobre a proteína GPX4 humana foram obtidas do Protein Data Bank (PDB), disponível em <https://www.rcsb.org/>. O PDB é uma base de dados onde são depositadas e atualizadas as informações estruturais de proteínas resolvidas por cristalografia de raios X, ressonância magnética nuclear (RMN) ou criomicroscopia eletrônica (BERMAN et al., 2000; BERMAN et al., 2003; BURLEY et al., 2020).

Alguns indicadores são utilizados para avaliar a qualidade das estruturas tridimensionais depositadas. *Ramachandran outliers*, *R-value Free* e a resolução (empregada na aquisição dos dados) são alguns desses indicadores que estão disponíveis no próprio PDB.

O Diagrama de Ramachandran é um gráfico onde avalia todos os ângulos ϕ (eixo x) e ψ (eixo y) de um determinado resíduo de aminoácido em uma estrutura. Esses resíduos possuem regiões em vermelho que são consideradas as regiões permitidas. Em boas estruturas, espera-se encontrar pelo menos 85% de resíduos de aminoácidos nessas regiões. Os resíduos que se encontram fora dessas regiões são considerados *outliers* de Ramachandran (BURLEY et al., 2020).

O *R-value*, do inglês valor R ou fator R, significa literalmente Fator Residual ou Fator de concordância. O *R-value* é uma medida de concordância entre o modelo cristalográfico gerado e os dados experimentais de difração de raio X. Um modelo perfeito teria valor 0, enquanto um modelo randômico teria um valor de 0,63. Geralmente esses valores ficam em torno de 0,20. Entretanto, durante a etapa de refinamento de uma estrutura, o modelo atômico geralmente é utilizado juntamente com os dados experimentais para o cálculo da densidade eletrônica, e isso pode adicionar um viés ao valor R. Dessa forma, criou-se o *R-free value*, do inglês valor de R livre, onde antes do refinamento começar, 10% dos dados experimentais são removidos do conjunto de dados (para posterior validação). O *R-free value* geralmente é semelhante ao *R-value*, sendo um pouco mais alto, em torno de 0,26 (KLEYWEGT & JONES, 1997; KONTOYIANNI, M. 2017; BURLEY et al., 2020)

A resolução é a distância mínima na qual dois pontos podem ser considerados distintos. A resolução é uma das medidas de qualidade mais amplamente utilizadas. Essa medida mostra o nível de detalhe visto no mapa de densidade eletrônica. Quanto maior a resolução, menor o valor numérico, e maior a qualidade da estrutura. Estruturas de alta resolução tem valor menor ou igual a 1Å, enquanto estruturas de baixa resolução possuem valores iguais ou maiores que 3Å (KONTOYIANNI, M. 2017; BURLEY et al., 2020).

A avaliação de qualidade de estruturas cristalinas é um fator muito importante a ser considerado antes de selecionar uma estrutura para os estudos computacionais. É importante lembrar que as estruturas cristalinas são instantâneos estáticos (como fotografias) e não representam o movimento e a flexibilidade de macromoléculas, e para isso são necessários estudos de dinâmica molecular. Ensaios de dinâmica molecular permitem calcular os movimentos de deslocamento de uma pequena molécula ligante na superfície e nas cavidades de uma macromolécula, bem como as energias envolvidas nos deslocamentos do ligante e rotação das cadeias da proteína e movimentação de regiões como os loops durante o tempo de simulação. As estruturas dos alvos biológicos geralmente são classificadas como apo (conformação da proteína na ausência do ligante) ou holo (conformação da proteína na presença do ligante) (KONTOYIANNI, M. 2017; GUTERRES et al., 2021). Essas conformações geralmente são distintas, com uma diferença de RMSD que pode variar de 0.5Å a 2.0Å. Entretanto, quando se avalia as orientações das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, 90% das proteínas holo possuem pelo menos um resíduo com mudanças rotaméricas significativas. Foi verificado que quando uma estrutura holo da proteína alvo não está disponível, isso reduz de forma significativa a performance de estudos de *virtual screening*. Sendo que estruturas holo diferenciam melhor ligantes de não ligantes em ensaios de *docking*. Dessa forma, estruturas apo são raramente utilizadas devido a mudanças significativas nos sítios ativos (GUTERRES et al., 2021).

3.2 Análise Comparativa das estruturas de GPX4 humanas depositadas no PDB

Nestes ensaios teóricos os dados de estruturas cristalográficas da proteína GPX4 humana foram extraídos do PDB, e foram realizados estudos de comparação estrutural no programa UCSF Chimera 1.14 utilizando os métodos “MatchMaker” e

Math-Align. O alinhamento estrutural foi realizado entre a estrutura “6HKQ” e as outras estruturas da GPX4 humana disponíveis no PDB (2GS3, 2OBI, 5H5Q, 5H5R, 5H5S, 6ELW, 6HN3). Esse experimento teve como objetivo verificar a possível existência de diferenças estruturais entre as estruturas depositadas no PDB da GPX4 humana, para caso seja necessário realizar análises de *ensemble docking*. Foi utilizado o Jupyter notebook para organização dos dados de alinhamento e o software Chimera para a geração da imagem do alinhamento estrutural.

3.3 Análise de interações intermoleculares

Foi analisado o arquivo no formato “.pdb” obtido da estrutura cristalográfica holo da GPX4 humana baixada do PDB (6HKQ). Essa estrutura foi usada como referência para analisar as interações intermoleculares entre ligante e o alvo em 4 softwares de análise de interações diferentes: NGL viewer (ROSE et al., 2018), PoseView (STIERAND et al., 2006), NaPOLI (FASSIO et al., 2019) e LigPlot+ (WALLACE et al., 1996). Através dessa metodologia, foi selecionado o programa mais adequado para prosseguir com as análises posteriores para predição de interações dos modelos gerados nos atracamentos moleculares. Além disso, através desse estudo, também foram identificadas as principais interações intermoleculares entre a enzima e seu inibidor referência (S-ML162), permitindo que essas interações fossem utilizadas como comparativo entre a enzima e outras moléculas inibidoras ou inibidoras em potencial.

3.4. Identificação e seleção do sítio de ligação da GPX4: sítio principal e sítio alostérico

A identificação de sítios de ligação ou sítios de interação (do inglês, *binding pockets*) é uma informação que pode ser encontrada na literatura científica para a proteína de interesse (pela coleta de informações de estudos de bancada, como os artigos de resolução estruturais), em base de dados de estruturas ou sequências (por exemplo, PDB, NCBI Protein, OMIM, UniProt,) ou que pode ser simulada através de *docking* molecular (quando se usa o “atracamento cego”, do inglês *blind docking*) ou através de programas que tem como função encontrar/identificar esses locais de interação como o DoGSiteScorer do ProteinPlus (VOLKAMER et al., 2012).

O DoGSiteScorer é um algoritmo automatizado para a predição de sítios de ligação e de “drugabilidade” (do inglês, *druggability*). Segundo Owens (2007), drugabilidade é a probabilidade de determinado alvo biológico ser modulado por pequenas moléculas ou fármacos. Aparentemente, apenas 10% do genoma humano apresenta alvos moleculares do tipo druggable. Segundo Keller (2006), drugabilidade se refere a proteínas que podem se ligar a compostos semelhantes à fármacos com uma afinidade de ligação abaixo de 10 μ M. Um dos pré-requisitos da drugabilidade é a capacidade de um alvo biológico de ser acessado por moléculas de baixo peso molecular. O DoGSiteScorer é um algoritmo que utiliza técnicas de aprendizado de máquina, como *support vector machines* (SVM) e *nearest neighbor*. Além disso utiliza um banco de dados de 1069 macromoléculas (para treinar e validar o modelo), permitindo a classificação correta (de 90%) de um alvo macromolecular em 3 categorias de acordo com o DrugScore: *druggable*, *difficult* e *undruggable*. *Undruggable* são alvos biológicos com sítios onde não há interação de pequenas moléculas, ou que se ligam a moléculas não biodisponíveis oralmente, ou que se ligam a moléculas sem características *drug-like*, ou cujo sítio de interação não apresenta propriedades favoráveis para a interação com pequenas moléculas. Além disso, esse programa também pode identificar sítios alostéricos de um alvo, mostrar os sítios identificados em um programa de visualização e fornecer uma série de informações sobre os sítios de ligação identificados, como por exemplo, o volume, a área de superfície, a profundidade, a composição de aminoácidos/elementos/outros descritores relevantes (VOLKAMER et al., 2012). Através de uma busca simples do ID PDB da proteína de interesse no ProteinPlus e no DoGSiteScorer, foi possível ter acesso a essas informações.

3.5 Docking molecular

Para os estudos de *docking* molecular foi utilizada a estrutura 6HKQ original (SEC46) e a mutada (CYS46). A mutação foi realizada no programa UCSF Chimera 1.14. (PETTERSEN et al., 2004). Essa mutação foi necessária para o uso de alguns *softwares* de *docking*, como o DockThor e o BindScope, que não reconhecem o átomo de selênio em seus programas. No *AutoDock Vina* se conseguiu utilizar a selenocisteína. O Chimera também foi utilizado para o preparo das estruturas do(s) ligante(s) e do(s) alvo(s). Durante esse preparo, geralmente devem ser adicionados

átomos não representados graficamente na molécula (como os átomos de hidrogênio), remover as moléculas de água, e também são retiradas moléculas empregadas no processo de cristalização. Além disso, são adicionadas cargas parciais e torções às moléculas. Nesse processo, um arquivo do receptor no formato “.pdb” é convertido para o formato “.pdbqt”; e um arquivo do ligante nos formatos “.mol2” ou “.pdb” são convertidos em “.pdbqt” também. Muitos pesquisadores comentam que a etapa de preparo do ligante e do receptor é uma etapa crítica que pode afetar os resultados (IBRAHIM et al., 2015; FORLI et al., 2016; KONTOYIANNI et al., 2017; MONTANARI et al., 2019).

Foram realizados estudos de *docking* molecular, do tipo semi-rígido e flexível, com o software AutoDock Vina (TROTT & OLSON, 2010; FORLI et al., 2016). Em um primeiro momento, foram realizados 36 estudos de *docking* molecular semi-rígido, somente entre a proteína GPX4 (6HKQ) e o seu ligante co-cristalografado S-ML162 para padronizar as condições das simulações referentes as seguintes variáveis: presença ou ausência de água, estado de protonação do resíduo cisteína 46, tamanho e centralização da caixa de atracamento (do inglês, *grid box*), tipo de entrada do ligante (arquivos .pdb ou smiles). Foram analisados como essas variações poderiam afetar as energias livres (ΔG) dos atracamentos moleculares. Foram adotados uma *energy range* de 3, uma exaustividade de 8 e até 10 poses/ligante para todos os experimentos. Esses estudos foram realizados utilizando o AutoDock Vina e o software gráfico UCSF Chimera 1.14. Os resultados desses experimentos foram analisados no software GraphPad Prism 6.01.

Também foram realizados 4 experimentos de *docking* flexível (ligante flexível e cadeias laterais de resíduos de aminoácidos selecionados flexíveis) no AutoDock Vina, utilizando a estrutura 6HKQ sem água, com a CYS46 nos estados protonada e desprotonada e os ligantes S-S-ML162 e 1S,3R-RSL3. Os aminoácidos considerados flexíveis foram os seguintes: ALA43, SER44, GLN45, CYS46, GLY47, LYS48, THR49, PRO74, CYS75, ASN76, GLN77, PHE78, GLY79, LYS80, GLN81, GLU82, TRP136, ASN137 e PHE138. Como parâmetros de *docking*, foram utilizados uma *energy range* de 3, uma exaustividade de 14 e até 10 poses possíveis para cada ligante. Para a caixa de atracamento (do inglês, *grid box*) foram consideradas as mesmas coordenadas nas três dimensões dos quadrantes ($x = -22.00$, $y = 4.00$, $z = 3.12$) e as mesmas dimensões do espaço de busca ($x = 18.00$, $y = 19.00$, $z = 18.00$). Os arquivos foram convertidos

manualmente para “.pdbqt” e depois para “.pdb” e os resultados desses experimentos foram analisados no LigPlot+ 2.2.5 , para a análise de contatos. Além disso, foram realizadas as medições das distâncias entre o átomo de enxofre da CYS46 e o átomo de carbono reativo de cada inibidor no UCSF Chimera 1.14.

Também foram realizadas análises de *redocking*, para verificar se no estudo do *docking* flexível era possível replicar a pose do S-ML162 da estrutura cristalografada. Para essa análise, foram utilizados o *ensemble match* do Chimera e o *LS-align*, onde foram comparadas a estrutura do ligante S-ML162. Nesse experimento, foram obtidos resultados de RMSD (sigla em inglês de *root mean square deviation*), que indica as variações de distância entre as poses de um alinhamento estrutural, valores iguais a zero indicam mesmo alinhamento, e quanto maior o RMSD, maiores são as diferenças das poses adotadas. A pose é um fator muito importante, pois pode indicar o modo de ligação ou de interação de uma pequena molécula com seu alvo macromolecular.

3.6 Target-Based Virtual Screening

Foi realizado um *target based-virtual screening* piloto utilizando o *docking* molecular semi-rígido no AutoDock Vina 1.1.2. Nesse experimento, foram realizados 72 estudos de *docking*, com 31 ligantes, 5 decoys, sem água, e na presença da CYS46 em dois estados de protonação, e considerando 10 poses por ligante. As moléculas dos ligantes e dos decoys foram obtidas no formato “.sdf” da base de dados de moléculas ZINC15 (STERLING & IRWIN, 2015), e convertidos em “.mol2” no Chimera. A estrutura da proteína GPX4 humana foi obtida do PDB (6HKQ) e preparada conforme ensaios de *docking* anteriores. Os arquivos de saída (720 arquivos) foram convertidos manualmente para “.pdbqt” e depois para “.pdb”. A medição de distâncias entre o carbono reativo de cada ligante e o átomo de enxofre da CYS46 foi realizada no Chimera. Os resultados desses experimentos foram transcritos manualmente para ambientes de desenvolvimento integrados para a linguagem Python (como o google colabory e o Jupiter notebook 6.1.4) (RANGLES et al., 2017). Os dados foram salvos no formato de listas e dicionários, para posteriormente a criação de um *dataframe*, que pode ser facilmente manipulado e analisado utilizando bibliotecas do Python como o Pandas 1.4.3 (MACKINNEY, 2010; REBACK et al., 2020) e o Matplotlib (HUNTER, 2007). Foram utilizados o método *.describe()* para estatística descritiva, o método *.hist()* para geração de histogramas, o método *.boxplot()* para geração dos

boxplots e o método `plt.scatter()` para geração dos gráficos de dispersão. Os dataframes foram salvos como arquivos “.csv” e arquivos “.xlsx”. Durante a fase de análise de dados, o objetivo foi elencar os critérios mais favoráveis e que possuísem alguma correspondência com a tabela experimental de EC50 dos ligantes. Além disso, pretendia-se utilizar outros filtros além do *docking* molecular para poder separar de forma eficaz decoys de ligantes. E esse estudo piloto foi muito importante para verificar a possibilidade de elencar esses critérios e filtros para a realização do *virtual screening* baseada na estrutura do alvo.

3.7 Ligand-Based Virtual Screening

Inicialmente foram realizadas análises de mapa de calor e análises de componentes principais do grupo de 33 moléculas inibidoras da GPX4 na tentativa de encontrar algum parâmetro ou correlação importante referente às características quimiométricas dos ligantes. Essas moléculas foram obtidas da revisão de literatura realizada disponível no anexo 2. Foram excluídas do estudo as moléculas que interagem com a enzima GPX4 de forma indireta. Essas análises foram realizadas no Jupyter notebook, utilizando as bibliotecas Pandas, NumPy (HARRIS et al., 2020), seaborn 0.11.2 (WASKOM, 2021) e Matplotlib, e os métodos `.corr()` para realizar os cálculos das correlações, `sns.heatmap()` para montagem do heatmap, e o método `PCA()` para a análise de componentes principais.

Foi realizado um *Ligand-based virtual screening* a partir da construção de uma biblioteca focada de ligantes baseada na busca de similaridade, do tipo busca combinada, com o S-S-ML162 nas bases de dados ZINC15, com o auxílio da ferramenta *SwissSimilarity* (ZOETE et al., 2016). Esta ferramenta realiza uma série de cálculos para triagem virtual com base na estrutura do ligante, onde são realizadas buscas de similaridade com a molécula referência através do uso de fingerprints bidimensionais e tridimensionais em bases de dados de fármacos (DrugBank), de compostos bioativos (chEMBL), de compostos comercialmente disponíveis (ZINC15) ou bibliotecas virtuais (SIGMA ALDRICH LIBRARY), que retorna uma lista de *smiles* dessas moléculas. Em seguida foi possível realizar o *docking* no AutoDock Vina dessas moléculas selecionadas e, elencar as melhores moléculas. Após a realização da busca por similaridade, foram realizados os cálculos das propriedades das 400 moléculas encontradas no SwissADME (DAINA et al. 2014; DAINA et al., 2016). No Jupyter

notebook, foram abertos os arquivos gerados no virtual screening, e foram aplicados os seguintes filtros de toxicidade e farmacocinética: não ser substrato para a glicoproteína P (filtro utilizado em todas as moléculas) (MAHAR DOAN et al., 2002; HA et al., 2007) não ser inibidor de CYP1A2 (filtro utilizado em todas as moléculas), não ser inibidor de CYP2C19, não ser inibidor de CYP2C9, não ser inibidor de CYP2D6, não ser inibidor de CYP3A4 (CUMMINGS et al., 2013; BOLOGA et al., 2019). Após o uso de filtros de toxicidade, foram utilizados filtros para fármacos de sucesso no sistema nervoso central, visando o desenvolvimento de moléculas para tratamento de glioblastomas (HITCHCOCK et al., 2006; BOLOGA et al., 2019), que são os seguintes: Peso molecular (MW) <400, doadores de ligação de hidrogênio (HBD) <2, aceptores de ligação de hidrogênio (HBA) <9, número de ligações rotacionáveis (NRB) <10, área de superfície polar (PSA) <120, e lipofilicidade (representada pelo ClogP) entre 1 e 4. Após a aplicação dos filtros mencionados, todas as moléculas resultantes foram analisadas no ADMETLAB (WANG et al., 2016; LIU et al., 2018; XIONG et al., 2021) em relação a alguns parâmetros de toxicidade (bloqueio de Herg, hepatotoxicidade, toxicidade respiratória).

Foi realizado o *Docking consensus* (DARDENNE, 2021) e a predição de atividade biológica no Sea Search Server com as moléculas resultantes. O *docking consensus* foi realizado através do estudo de *docking* molecular da GPX4 (estrutura 6HKQ) no sítio ativo (Sec46 ou Cys46) e no sítio alostérico (Cys66) em três softwares, o BindScope, o DockThor e o AutoDock Vina. A partir dos resultados de afinidade, foram ranqueadas as moléculas com maior potencial de inibir a GPX4. Para os estudos de *docking*, foram utilizadas caixas de atracamento com as mesmas dimensões de aresta em angströms (20x20x20) e aplicando as mesmas coordenadas de centralização da caixa para o sítio ativo (22, 6 e 5) e para o sítio alostérico (8, 5.5 e 20).

A busca de atividade biológica no *Sea Search Server* (KEISER et al., 2007; IRWIN et al., 2018) também foi útil para verificar se os compostos tinham perfil poli farmacológico (típico das cloroacetamidas), além de verificar o envolvimento de outros alvos importantes da via da ferroptose, sendo mais uma ferramenta para verificar a evidência de moléculas biologicamente ativas. Adicionalmente, foram realizados experimentos *in silico* de Bioisosterismo no SwissBioisostere (WIRTH et al., 2013; CUOZZO et al., 2021), com objetivo de encontrar fragmentos candidatos à substituição do grupamento tiofeno nas moléculas encontradas, visando um aprimoramento futuro

desses compostos. A figura 7 apresenta um resumo das etapas de metodologias adotada nesse estudo, e também os caminhos decisórios que influenciaram na adoção de uma mudança metodológica durante a pesquisa. Foram realizadas alterações nos protocolos utilizados para aumentar a confiabilidade dos resultados obtidos. Além disso, é importante ressaltar o caráter inédito da abordagem metodológica utilizada neste trabalho.

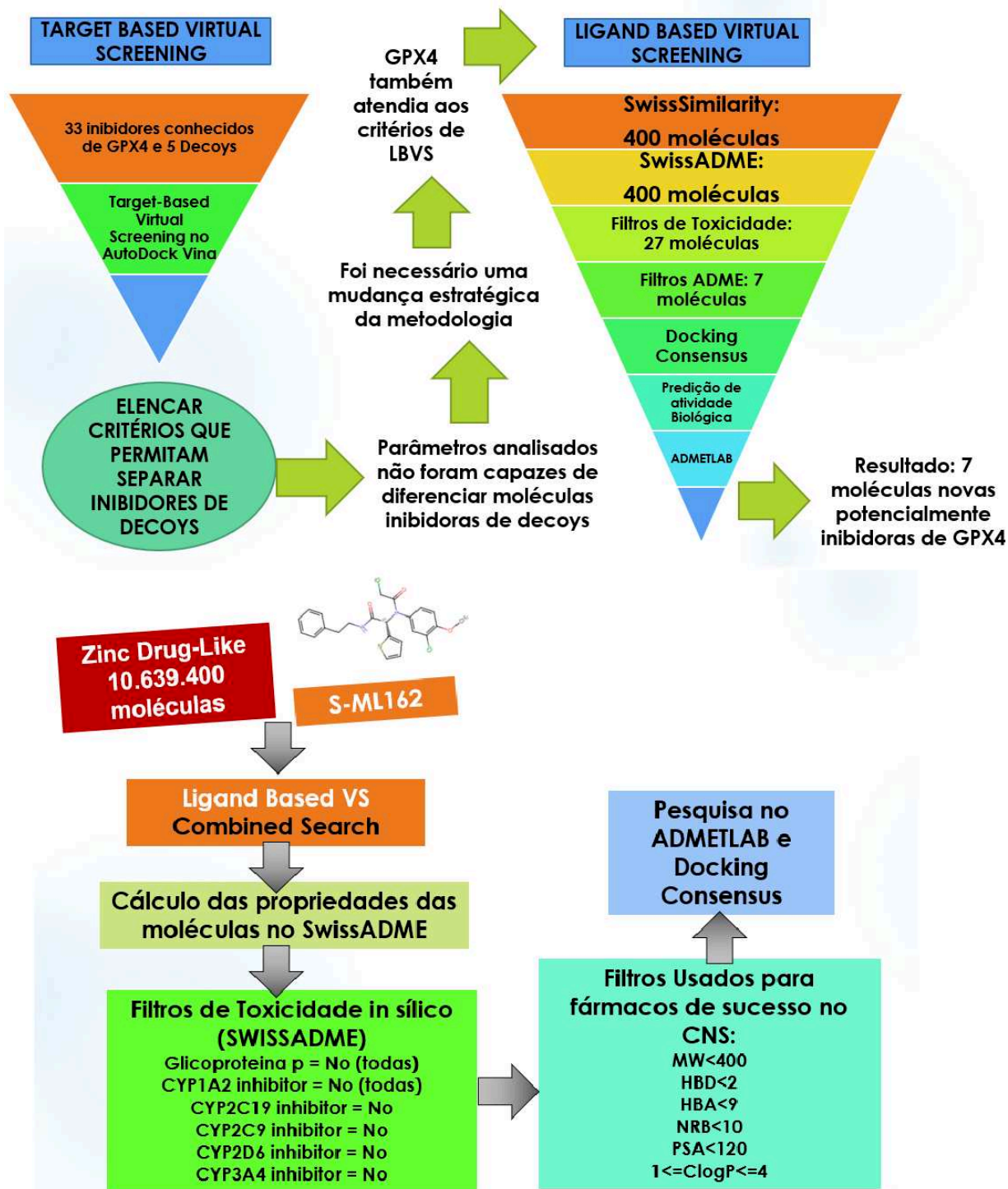


Figura 7. Esquema metodológico do target-based virtual screening e do Ligand-based virtual screening adotados nesse trabalho.

3.8 Recursos computacionais utilizados

Todas as análises teóricas e a maior parte das simulações foram realizadas em um notebook inspiron I15-7572-A30S, sistema operacional Windows 10, empregando processador 8ª Intel Core i7 16GB (Geforce M150 com 4Gb) 1Tb 128GB SSD Full Hd 15,6" W10 Dell. Alguns experimentos foram realizados no Laboratório de Bioinformática Estrutural (LBE) vinculado ao Núcleo de Bioinformática e Biologia Computacional da UFSC, que conta com um servidor MSI Z370-A PRO, com 32GB de memória, processador i7 8700K com 6 núcleos de 3.7 GHz, duas placas de GPU NVIDIA GeForce GTX1060. Além disso, o Núcleo também disponibilizou para esse projeto um servidor HP PROLIANT ML350P G8, com 64 Gb de memória RAM e 12 núcleos de processamento, configurado para servir como uma plataforma remota para multiusuários baseada no sistema Linux, contendo variadas bases de dados e programas de análise. Também foram realizadas algumas análises no *cluster* Santos Dumont vinculado ao LNCC através de solicitação de *Virtual Screening* pelo Programa DockThor. Também foram utilizados recursos do *Expasy* para os experimentos envolvendo o *SwissSimilarity* e o *SwissADME*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Aquisição das estruturas e avaliação de qualidade

Através da busca do termo “Human GPX4” no PDB, foram encontradas 8 estruturas dessa enzima depositadas no banco de dados. Todas as estruturas depositadas apresentaram bons indicadores de qualidade, com resolução ≤ 1.90 Å, e R-value Free ≤ 0.204 , e não apresentando *outliers* no gráfico de Ramachadran. Dessa forma, foi selecionada para os ensaios computacionais a única estrutura holo disponível para a GPX4 humana no PDB, a estrutura 6HKQ (MOOSMAYER et al., 2021). Informações mais detalhadas podem ser visualizadas na tabela 2 abaixo.

Tabela 2. Estruturas da GPX4 humana depositadas no PDB.

Código PDB	Ramach. Outliers (%)	Resolução (Å)	R – Value Free	Localização celular	Tipo	Resíduos de aminoácidos mais importantes na catálise	Referências
2OBI	0	1.55	0.186	citósol	Apo	CYS46	SCHEERER et al., 2007
5H5S	0	1.85	0.204	mitocondrial	Apo	SEC73	SAKAMOTO et al., 2017
5H5R	0	1.20	0.162	mitocondrial	Apo	SEC73	SAKAMOTO et al., 2017
5H5Q	0	1.10	0.184	mitocondrial	Apo	SEC73	SAKAMOTO et al., 2017
6ELW	0	1.30	0.155	mitocondrial	Apo	SEC46	BORCHERT et al., 2018
2GS3	0	1.90	0.191	citósol	Apo	GLY61	Sem artigo. Apenas a estrutura foi depositada.
6HKQ	0	1.54	0.184	citósol	Holo	SEC46	MOOSMAYER et al., 2021.
6HN3	0	1.01	0.137	citósol	Apo	SEC46	MOOSMAYER et al., 2021.

4.2 Análise Comparativa das Estruturas de GPX4 humanas depositadas no PDB

A estrutura GPX4 humana apresenta algumas regiões que sugerem maior flexibilidade, principalmente as regiões das alças, incluindo regiões localizadas no sítio ativo, marcadas em roxo na figura 8.



Figura 8. Alinhamento estrutural de estruturas de GPX4 depositadas no PDB (2GS3, 6HN3, 5H5S, 5H5R, 5H5Q, 6ELW, 2OBI e 6HKQ). Em ciano, a molécula de S-ML162 no sítio de ligação. Em roxo, destaque para alças do sítio ativo.

A estrutura usada como referência nas análises de alinhamento estrutural, a 6HKQ, é aquela que possui a alça mais aberta (mais voltada para fora), e talvez isso seja relevante para a interação com o ligante S-ML162 que será discutida posteriormente nesse trabalho (em ciano na figura 8). As estruturas com maior RMSD e maior identidade são a 2GS3, 6HN3, a 5H5S e a 5H5R, conforme apresentado na tabela 3.

Tabela 3. Resultados do alinhamento estrutural das proteínas GPX4 depositadas no PDB em comparação com a estrutura 6HKQ. RMSD, do inglês *root mean square deviation*, ou seja, referente ao valor médio do desvio quadrático entre estruturas. Foi utilizado o programa UCSF Chimera 1.14 utilizando os métodos *MatchMaker* e *Math-Align*.

PDB id	overall_RMSD	Identidade
2GS3	3.461	90.91
6HN3	3.118	99.43
5H5S	3.112	95.86
5H5R	3.005	95.86
5H5Q	1.168	95.86
6ELW	0.517	92.05
2OBI	0.476	94.89

4.3 Análise das Interações Intermoleculares entre GPX4 e S-ML162

A fim de avaliar melhor as interações intermoleculares entre GPX4 e uma molécula inibidora já descrita na literatura, o S-ML162 (WEIWER et al., 2012; YANG et al., 2014; EATON et al., 2019; STOCKWELL AND JIANG, 2020; MOOSMAYER et al., 2021), os resultados provenientes de diferentes programas foram comparados. Foram analisadas as interações moleculares da estrutura 6HKQ por meio dos seguintes servidores disponíveis na internet (Pose View, NGL Viewer e nAPOLI) e através do software LigPlot+ 2.2.5.

No servidor Protein Plus, utilizando o Pose View, foi gerado um mapa de interações moleculares entre a GPX4 (6HKQ) e o seu ligante S-ML162 (que corresponde ao G9N segunda a estrutura cristalográfica). Nesse mapa, podemos visualizar a presença de uma ligação de hidrogênio entre um átomo de nitrogênio do triptofano 136 e um átomo de oxigênio (uma cetona do grupamento cloroacetamida) do S-ML162. Além disso, sugere-se interações hidrofóbicas entre a glutamina 81 e as porções cloroacetamida e a porção 3-cloro-4-metóxi-anilina do S-ML162 (figura 9A).

Como resultados obtidos no programa NGL Viewer, foram identificadas 2 ligações de hidrogênio e a presença de 2 contatos hidrofóbicos entre a estrutura da proteína e seu ligante. Foi demonstrada uma interação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio 22 do G9N e o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio NE1 do triptofano 136. A outra ligação de hidrogênio ocorre entre o átomo de oxigênio 12 do G9N e o

átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio N do *backbone* da glicina 47. As ligações de hidrogênio podem ser visualizadas na figura 9B. Uma observação importante é mencionar que na maioria dos programas, quando se utiliza estruturas diretas do PDB (sem tratamento), os átomos de hidrogênio podem estar omitidos da estrutura e das ligações de hidrogênio, como ocorre nas análises dessa seção do trabalho.

Além das ligações de hidrogênio, como resultados obtidos no NGL Viewer, foram preditos 2 contatos hidrofóbicos entre a estrutura da proteína e de seu ligante. É demonstrado um contato hidrofóbico entre o átomo de carbono 18 (pertencente ao anel tiofeno) do S-ML162 e o átomo de carbono CZ2 (pertencente ao anel da cadeia lateral) do triptofano 136. Outro contato hidrofóbico foi observado entre o átomo de carbono 20 (pertencente ao grupo cloroacetamida) do S-ML162 e o átomo de carbono beta CB do *backbone* da glutamina 81. As interações hidrofóbicas podem ser visualizadas na figura 9C.

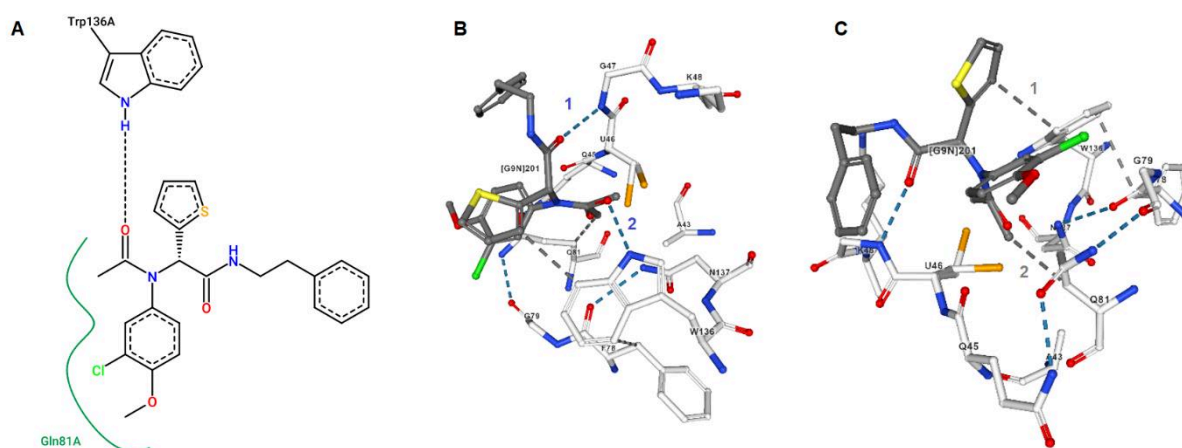


Figura 9. A) Mapa de interações Intermoleculares entre GPX4 (6HKQ) e S-ML162 (G9N) gerado no servidor Pose View. B) Representação das ligações de hidrogênio entre GPX4 (6HKQ) e S-ML162 (G9N) gerada no NGL Viewer. A ligação de hidrogênio representada pelo número 1 ocorre entre o átomo de oxigênio 12 do S-ML162 e o átomo de hidrogênio do nitrogênio N do *backbone* da glicina 47. A ligação de hidrogênio representada pelo número 2 ocorre entre o átomo de oxigênio 22 do S-ML162 e o átomo de hidrogênio ligado ao nitrogênio NE1 do triptofano 136. C) Representação das interações hidrofóbicas entre GPX4 (6HKQ) e S-ML162 (G9N) geradas NGL Viewer. A interação hidrofóbica representada pelo número 1 ocorre entre o átomo de carbono 18 (pertencente ao anel tiofeno) do S-ML162 e o átomo de carbono CZ2 (pertencente ao anel da cadeia lateral) do triptofano 136. A interação hidrofóbica

representada pelo número 2 ocorre entre o átomo de carbono 20 (pertencente ao grupo cloroacetamida) do S-ML162 e o átomo de carbono beta CB do *backbone* da glutamina 81.

No programa nAPOLI (*Analysis of PrOtein-Ligand Interactions by* Universidade Federal de Minas Gerais), é gerado um conjunto considerável de dados, incluindo tabelas, gráficos e imagens sobre todas as interações moleculares entre todos os ligantes de uma dada estrutura do PDB. Neste trabalho, o nAPOLI foi utilizado para avaliar as interações entre 6HKQ e o seu ligante S-ML162 (que foi representado como G9N). Como resultados, foram verificadas a presença das seguintes interações intermoleculares: 4 ligações de hidrogênio (2 entre o ligante e a proteína e 2 entre o ligante e uma molécula de água estrutural), 1 interação aromática do tipo pi-stacking e 9 interações hidrofóbicas. O total de interações intermoleculares obtidos no nAPOLI pode ser visualizado na figura 10.

Em relação às ligações de hidrogênio entre o S-ML162 e a GPX4, podemos visualizar 2 interações. A primeira ocorre entre o átomo de oxigênio 12 (classificado como acceptor) do S-ML162 e o átomo de nitrogênio (classificado como doador) do resíduo de aminoácido glicina 47, cuja distância de interação é igual a 2,8 Å. A segunda ocorre entre o átomo de oxigênio 22 (acceptor) do S-ML162 e o átomo de nitrogênio NE1 (aromático e doador) do resíduo de aminoácido triptofano 136, cuja distância é igual a 2,8 Å.

Em relação às ligações de hidrogênio entre o S-ML162 e a água estrutural número 441, foram observadas também 2 interações. Uma interação entre o átomo de oxigênio 12 (acceptor) do S-ML162 e a água 441 (acceptor ou doador), cuja distância é igual a 3,2 Å. A outra interação ocorre entre o átomo de oxigênio 22 (acceptor ou doador) do S-ML162 e a água 441 (acceptor ou doador), cuja distância é igual a 3,0 Å. Existe uma terceira ligação de hidrogênio demonstrada nesse modelo, mas ela ocorre entre a água 441 e a proteína. Nessa interação temos o átomo de nitrogênio N (doador) do *backbone* do resíduo de aminoácido lisina 48 interagindo com a água 441, em uma distância igual a 2,9 Å.

Em relação à interação aromática do tipo *pi-stacking*, ela ocorre entre o átomo de carbono 18 (hidrofóbico e aromático) do S-ML162 e o átomo de carbono CZ2 (hidrofóbico e aromático) do resíduo de aminoácido triptofano 136, cuja distância de interação é igual a 3,5 Å.

Em relação às interações hidrofóbicas entre a GPX4 e o ligante S-ML162, podemos classificá-las em dois tipos: as que ocorrem entre o ligante e o resíduo de aminoácido triptofano 136, e as que ocorrem entre o ligante e o resíduo de aminoácido glutamina 81.

Foram encontradas 3 interações hidrofóbicas entre o ligante e o resíduo de aminoácido triptofano 136. A primeira interação ocorre entre o átomo de carbono 18 (hidrofóbico e aromático) do S-ML162 e o átomo de carbono CH2 (hidrofóbico e aromático) do resíduo de aminoácido triptofano 136, cuja distância é igual a 4,1 Å. Na segunda interação hidrofóbica descrita, temos o átomo de carbono 18 (hidrofóbico e aromático) do S-ML162 interagindo com o átomo CZ2 (hidrofóbico e aromático) do resíduo de aminoácido triptofano 136, cuja distância é igual a 3,5 Å. Essa interação é a mesma que foi classificada anteriormente como *pi-stacking*. Por último, a terceira interação hidrofóbica, ocorre entre o átomo de carbono 28 (hidrofóbico e aromático) do S-ML162 e o átomo CZ2 (hidrofóbico e aromático) do resíduo de aminoácido triptofano 136, cuja distância é igual a 4,0 Å.

Foram encontradas 6 interações hidrofóbicas entre o ligante e o resíduo de aminoácido glutamina 81. A primeira interação ocorre entre o átomo de carbono 25 (hidrofóbico e aromático) do S-ML162 e o átomo de carbono CG (hidrofóbico) do resíduo de aminoácido glicina 81, cuja distância é igual a 3,7 Å. A segunda interação ocorre entre o átomo de carbono 28 (hidrofóbico e aromático) do S-ML162 e o átomo de carbono CG (hidrofóbico) do resíduo de aminoácido glicina 81, cuja distância é igual a 3,6 Å. A terceira interação hidrofóbica ocorre entre o átomo de carbono 27 (hidrofóbico e aromático) do ligante e o átomo de carbono CG (hidrofóbico) do resíduo de aminoácido glutamina 81, cuja distância é igual a 3,5 Å. A quarta interação hidrofóbica ocorre entre o carbono 20 (hidrofóbico) do S-ML162 e o átomo de carbono CG (hidrofóbico) do resíduo de aminoácido glicina 81, cuja distância é igual a 3,5 Å. A quinta interação ocorre entre o carbono 20 (hidrofóbico) do ligante e o átomo de carbono beta CB (hidrofóbico) do resíduo de aminoácido glicina 81, cuja distância é igual a 3,4 Å. E a última interação hidrofóbica encontrada foi entre o átomo de carbono 24 (hidrofóbico e aromático) do ligante e o átomo de carbono CG (hidrofóbico) do resíduo de aminoácido glicina 81, cuja distância é igual a 3,8 Å.

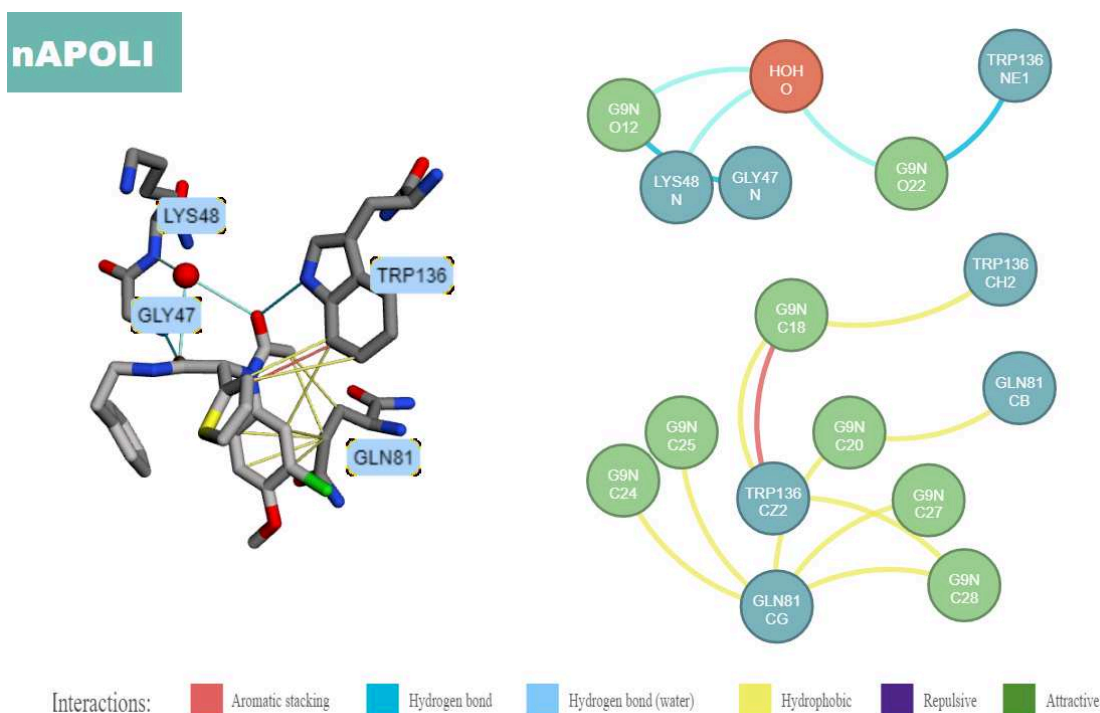


Figura 10. Representação das interações intermoleculares entre GPX4 (6HKQ) e S-ML162 (G9N) gerada na web server nAPOLI, através da visão 3d do ligante e do resumo gráfico.

No Software LigPlot+, foram encontradas 4 ligações de hidrogênio (2 envolvendo a água 441) e várias interações hidrofóbicas entre o ligante e os resíduos de aminoácidos Sec46, Gln45, Gln81, Asn137, Trp136 e Gly47 da proteína. Em relação às ligações de hidrogênio, podemos visualizar as seguintes interações. Uma interação entre o átomo de oxigênio 22 do ligante e o átomo NE1 do resíduo de aminoácido triptofano 136, com distância de 2,94 Å. Outra interação entre o átomo de oxigênio 12 do ligante e o átomo de nitrogênio do resíduo de aminoácido glicina 47, com distância de 2,80 Å. Também foram identificadas duas ligações de hidrogênio entre o ligante e uma água estrutural. A primeira interação desse tipo ocorre entre o átomo de oxigênio 22 do ligante e a água 441, com distância de 3,05 Å. A outra interação ocorreu entre o oxigênio 12 do ligante e a água 441, com distância de 3,21 Å. As interações do tipo ligação de hidrogênio podem ser visualizadas na figura 11A.

Em relação às interações hidrofóbicas, há a presença de muitas interações desse tipo, contabilizando um total de 24 interações. A maior parte dessas interações (9 ao todo) ocorrem entre o ligante (principalmente a porção 3-cloro-4-metóxi-anilina) e o resíduo de aminoácido de glutamina 81. Depois os resíduos de aminoácidos glicina 47 (4 interações), selenocisteína 46 (4 interações) e triptofano 136

(3 interações) são aqueles que apresentam mais interações. Ambos os resíduos de aminoácidos asparagina 137 e glutamina 45 possuem 2 interações cada com o ligante. As interações que ocorrem entre o ligante e os resíduos de aminoácidos selenocisteína 46, asparagina 137, glutamina 81 e glicina 45 não foram especificadas em relação aos átomos da proteína. Foram especificados os átomos apenas das interações entre o ligante e os resíduos de aminoácidos glicina 47 e triptofano 136. O software também não fornece a distância em angstroms para as interações hidrofóbicas. Todas as interações hidrofóbicas encontradas no LigPlot+ podem ser visualizadas na figura 11B.

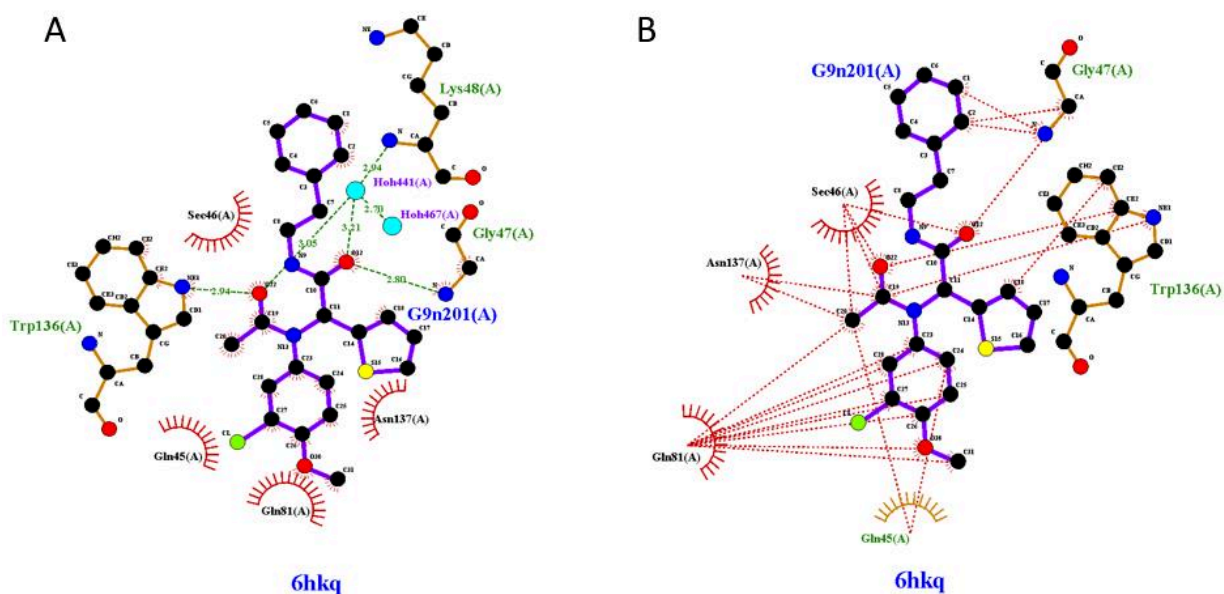


Figura 11. A) Representação das interações intermoleculares entre GPX4 (6HKQ) e S-ML162 (G9N) gerada no programa LigPlot+, com destaque para as ligações de hidrogênio (em verde tracejado). B) Representação das interações hidrofóbicas (em vermelho tracejado) entre GPX4 (6HKQ) e S-ML162 (G9N) gerada no programa LigPlot+.

Dependendo do *Web Server* utilizado, o número total de interações intermoleculares entre o alvo biológico e o ligante varia de 2 a 13 interações. As ligações de hidrogênio variam de 1 a 4 ligações. As interações hidrofóbicas variam de 2 a 9 interações. Dessa forma percebemos que tanto as ligações de hidrogênio quanto as interações hidrofóbicas são essenciais para a interação do S-ML162 e o sítio ativo da GPX4, embora as interações hidrofóbicas pareçam ser mais frequentes. As interações mais frequentes identificadas foram as seguintes: 2 ligações de hidrogênio (O12 e N do resíduos de aminoácido glicina 47; O22 e NE1 do resíduo de aminoácido triptofano 136) e 2 interações hidrofóbicas (C18 e CZ2 do resíduo de aminoácido triptofano 136; C20 e CB do resíduo de aminoácido glutamina 81). Vale a pena ressaltar, que a maioria das

interações ocorre com os dois resíduos de aminoácidos pertencentes à tétrade catalítica: o triptofano 136 e a glutamina 81. A maioria das interações hidrofóbicas com o ligante está relacionada ao resíduo glutamina 81, seguida de interações com o resíduo triptofano 136. Os resíduos de glicina 47 e de triptofano 136 parecem ser importantes na formação de ligações de hidrogênio. Além disso, uma água estrutural número 441 também parece ser importante na formação de ligações de hidrogênio com o ligante. As interações intermoleculares identificadas apenas com o nAPOLI não podem ser descartadas, visto que essa web server apresenta algoritmos mais completos e complexos para identificação de interações intermoleculares. Na tabela 4 podemos visualizar melhor toda a análise das interações intermoleculares nos quatro programas utilizados.

Tabela 4. Análise das interações intermoleculares entre GPX4 e S-ML162 (estrutura cristalográfica 6HKQ). Observação: nem todos os programas fornecem informações precisas como os átomos envolvidos nas interações e as distâncias das interações. O nAPOLI e o LigPlot+ são os programas que mais fornecem esse tipo de informação.

Interações Intermoleculares entre GPX4 e s-sS-ML162. Estrutura no PDB: 6HKQ e G9N					Web Server			Software
					Pose View	NGL Viewer	nAPOLI	LigPlot+
Nº Ligações de hidrogênio					1	2	4	4
Nº interações hidrofóbicas					Presente	2	9	24
Nº interações pi-stacking					0	0	1	0
Nº total de interações					2	4	14	28
Tipo de interação	Átomo ligante	Átomo da proteína	Distância (Å) nAPOLI	Distância (Å) LigPlot+	Está presente?			
L.Hidrogênio	O12	N GLY47	2,80	2,80	NÃO	SIM	SIM	SIM
L.Hidrogênio	O22	NE1 TRP136	2,80	2,94	SIM	SIM	SIM	SIM
L.Hidrogênio	O12	H2O 441	3,21	3,21	NÃO	NÃO	SIM	SIM
L.Hidrogênio	O22	H2O 441	3,04	3,05	NÃO	NÃO	SIM	SIM
I. Hidrofóbicas	C18	CH2 TRP136	4,12	-	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
I. Hidrofóbicas ou <i>Pi-stacking</i>	C18	CZ2 TRP136	3,55	-	NÃO	SIM	SIM	SIM
I. Hidrofóbicas	C28	CZ2 TRP136	4,02	-	NÃO	NÃO	SIM	NÃO
I. Hidrofóbicas	C19	NE1 TRP136	-	-	NAO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	O22	CE2 TRP136	-	-	NÃO	NAO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	O12	N GLY47	-	-	NÃO	NAO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C1	N GLY47	-	-	NÃO	NAO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C2	N GLY47	-	-	NÃO	NAO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C2	CA GLY47	-	-	NÃO	NAO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C25	CG GLN81	3,77	-	PROV.	NÃO	SIM	SIM
I. Hidrofóbicas	C28	CG GLN81	3,65	-	PROV.	NÃO	SIM	SIM

I. Hidrofóbicas	C27	CG GLN81	3,55	-	PROV.	NÃO	SIM	SIM
I. Hidrofóbicas	C20	CG GLN81	3,59	-	PROV.	NÃO	SIM	NÃO
I. Hidrofóbicas	C20	CB GLN81	3,40	-	PROV.	SIM	SIM	SIM
I. Hidrofóbicas	C24	CG GLN81	3,88	-	PROV.	NÃO	SIM	SIM
I. Hidrofóbicas	C23	? GLN81	-	-	PROV.	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C26	? GLN81	-	-	PROV.	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C31	? GLN81	-	-	PROV.	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	O30	? GLN81	-	-	PROV.	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C19	? SEC46	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C20	? SEC46	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	O12	? SEC46	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	O22	? SEC46	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C19	? ASN137	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C20	? ASN137	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C20	? GLN45	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
I. Hidrofóbicas	C24	? GLN45	-	-	NÃO	NÃO	NÃO	SIM

Quando visualizamos a estrutura 6HKQ no Chimera, foi possível verificar que o ligante SML-162 (representado como G9N) possui duas estruturas alternativas, que divergem quanto à localização dos átomos de oxigênio 22 e do carbono 20, como demonstrado na figura 12. O átomo de selênio também apresenta essa variação de posição. A dúvida da posição desses átomos pode afetar a presença e a ausência de interações intermoleculares como as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas. Após a análise das possíveis interações intermoleculares entre o ligante S-ML162 e a GPX4, mostramos que esses dois átomos estão presentes em duas interações bastante importantes. Com base na análise dessas interações, só seria possível aceitar a posição onde o átomo de oxigênio 22 está mais próximo do triptofano 136, e o átomo de carbono 20 está mais próximo da glutamina 81. Na posição alternativa, nenhuma dessas 2 interações seria possível. A posição mais provável está mostrada na figura 12B.

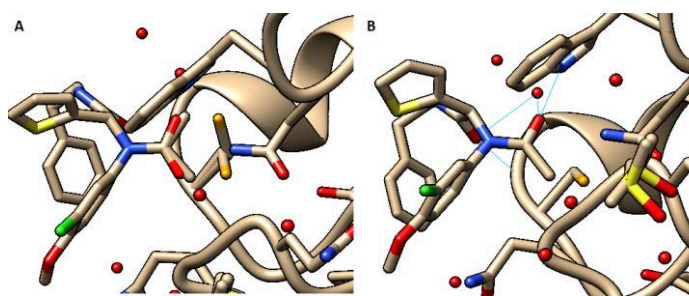


Figura 12. A) Detalhe da estrutura do S-ML162 e as duas possíveis posições dos átomos de oxigênio 22 e carbono 20 da estrutura da GPX4 humana (PDB ID: 6HKQ), imagem gerada no UCSF Chimera. B) Detalhe da estrutura do S-ML162 e a posição mais provável do átomo de oxigênio 22 e do carbono 20

da estrutura da GPX4 humana (PDB ID: 6HKQ) com base na análise das interações intermoleculares, imagem gerada no Chimera.

4.4 Identificação dos sítios de ligação da GPX4

É muito importante em experimentos de *docking*, a definição do tamanho e localização do espaço de busca (*grid box*). Dependendo do algoritmo, quanto maior for esse espaço de busca, maiores as chances de erros acontecerem. Por exemplo, no AutoDock Vina é aconselhável manter uma *grid box* de tamanho máximo 30x30x30 (FORLI et al., 2016). Para aumentar o espaço de busca para valores maiores, deve-se aumentar a exaustividade (que é um parâmetro interno do Vina, para o esforço de máquina). Esse espaço de busca deve conter o sítio de ligação ou interação com os ligantes. Além disso, esse sítio de ligação deve conter um conjunto de aminoácidos específicos, que serão avaliados quanto à diferentes ligantes. Em protocolos de *docking* “flexível-flexível”, esses mesmos aminoácidos podem ter suas cadeias laterais com uma certa “liberdade” de movimento.

Em relação à GPX4, alguns estudos cristalográficos e de biofísica de proteínas citam o resíduo de aminoácido selenocisteína 46 (SEC46 ou U46) como “o sítio ativo”, pois é ele quem desempenha as funções catalíticas essenciais de oxirredução da enzima (SCHEERER et al., 2007; BORCHERT et al., 2018). Em conjunto, os resíduos de aminoácidos selenocisteína 46, glutamina 81, triptofano 136 e asparagina 137 desempenham o papel de tétrede catalítica. Entretanto, há vários outros aminoácidos “em torno” da tétrede catalítica que podem ser importantes para processos de inibição enzimática e ou interação com substratos (SAKAMOTO et al., 2017; MOOSMAYER et al., 2021). Realizando uma inspeção visual da estrutura da GPX4 (PDB ID: 6HKQ) e do seu ligante S-ML162 no programa de visualização Chimera, pôde-se identificar 7 resíduos próximos do ligante, que são: SEC46, GLY47, GLY79, PHE78, TRP136, ASN137 e GLN81. Utilizando o web server ProteinPlus, foi gerado um *pocket* com base no ligante S-ML162 e foram identificados 14 resíduos de aminoácidos importantes, que foram os seguintes: ALA43, SER44, GLN45, SEC46, GLY47, LYS48, THR49, PHE78, GLY79, LYS80, GLN81, TRP136, ASN137 e PHE138. Para verificar se esses aminoácidos pertenciam à algum *pocket* já existente da proteína, foi utilizado o web server DoGSiteScorer do ProteinPlus, e dos 25 *pockets* identificados, o P_1_0 teve maior sobreposição com o ligante. É importante ressaltar que nesse trabalho,

consideramos “sítio ativo” todos os resíduos de aminoácidos da tétrede catalítica e do entorno dessa cavidade chamada *Pocket P_1_0*.

Esse *pocket P_1_0* apresentou 16 resíduos de aminoácidos em sua composição, sendo eles: ALA43, SER44, GLN45, GLY47, LYS48, THR49, ASN52, PHE78, GLY79, GLN81, TRP136, ASN137, PHE138, LYS140, PRO155 e MET156. O *Pocket P_1_0* gerado no DoGSiteScorer e sua comparação com a estrutura do S-ML162 estão mostradas na Figura 13.

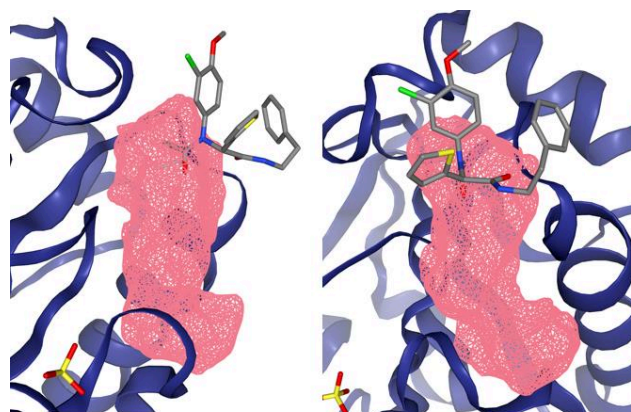


Figura 13. Detalhe do *pocket P_1_0* gerado no DogSiteScorer do ProteinPlus da estrutura 6HQK, mostrando que o S-ML162 ocupa parte desse *pocket*, na porção cloroacetamida do ligante.

Para Volkamer e colaboradores (2012), existem algumas características mais relevantes que distinguem *druggable pockets* de *undruggable* e elas estão resumidas na tabela 5. Os dois sítios de interação analisados e utilizados nesse estudo foram o *P_1_0*, que apesar de não conter a SEC46 (esta está muito próxima) e foi considerado o sítio ativo, e o sítio *P_4_0*, que contém a CYS66 e que foi considerado como um potencial sítio alostérico. Um resumo das características desses dois sítios pode ser visto na tabela 5.

Tabela 5. Características de *Druggable* e *Undruggable Pockets*

<i>Druggable Pockets</i>	<i>Undruggable Pockets</i>	GPX4 – Sítio ativo P_1_0 Pocket	GPX4 – Sítio alostérico P_4_0 Pocket
Volume (média): 900 Å ³	Volume (média): 300 Å ³	Volume (média): 198.91	Volume (média): 83.39 Å ³
Profundidade (média): 21 Å	Profundidade (média): 13 Å	Profundidade (média): 6.57Å	Profundidade (média): 6.57Å
Razão de aa apolares: 0.57	Razão de aa apolares: 0.37	10.41Å	Razão de aa apolares: 0.30

DrugScore > 0.5	DrugScore < 0.5	Razão de aa apolares: DrugScore: 0.27
		0.38
		DrugScore: 0.43

Pockets na categoria difícil possuem volume e profundidade semelhante aos *druggable pockets*, mas uma razão de aminoácidos apolares semelhantes aos *undruggable pockets*, e DrugScore igual ou maior que 0.5. A cavidade do sítio ativo da GPX4 foi formada baseada na estrutura da proteína (6HKQ), e tem as seguintes descrições de tamanho e forma: volume de 198.91 Å³, superfície de 409.6 Å² e profundidade de 10.41 Å. Já a cavidade do sítio alostérico possui um volume de 83.39 Å³, superfície de 244.97 Å², e profundidade de 6.57 Å. Esses dois sítios de interação da GPX4 possuem várias características como volume, profundidade, razão de aminoácidos apolares e DrugScore que tornam o seu pocket semelhante aos *undruggable pockets*.

Além disso, ambos os sítios da GPX4 também possuem outras características de *undruggable pockets* tais como localização mais superficial e grande contato com solvente, e forte presença de resíduos de aminoácidos hidrofílicos. E o DrugScore foi menor que 0.5, confirmando essas suposições. Quanto mais próximo de 1 o DrugScore, maior a drugabilidade. Embora a GPX4 seja um alvo molecular contendo vários sítios de interação com diversos ligantes comprovados experimentalmente (tanto inibidores quanto ativadores), esse alvo molecular possui seus desafios, já que apresenta muitas características de alvos do tipo *undruggable*. E essa característica *undruggable* representa um desafio experimental para ensaios computacionais de *docking* molecular, cujas funções de pontuação darão maiores valores de ΔG para esses *pockets* superficiais. Na figura 14 podemos visualizar os 25 subpockets encontrados na GPX4 e também os dois pockets utilizados nesse estudo, em destaque nas cores azul (sítio ativo) e rosa (sítio alostérico).

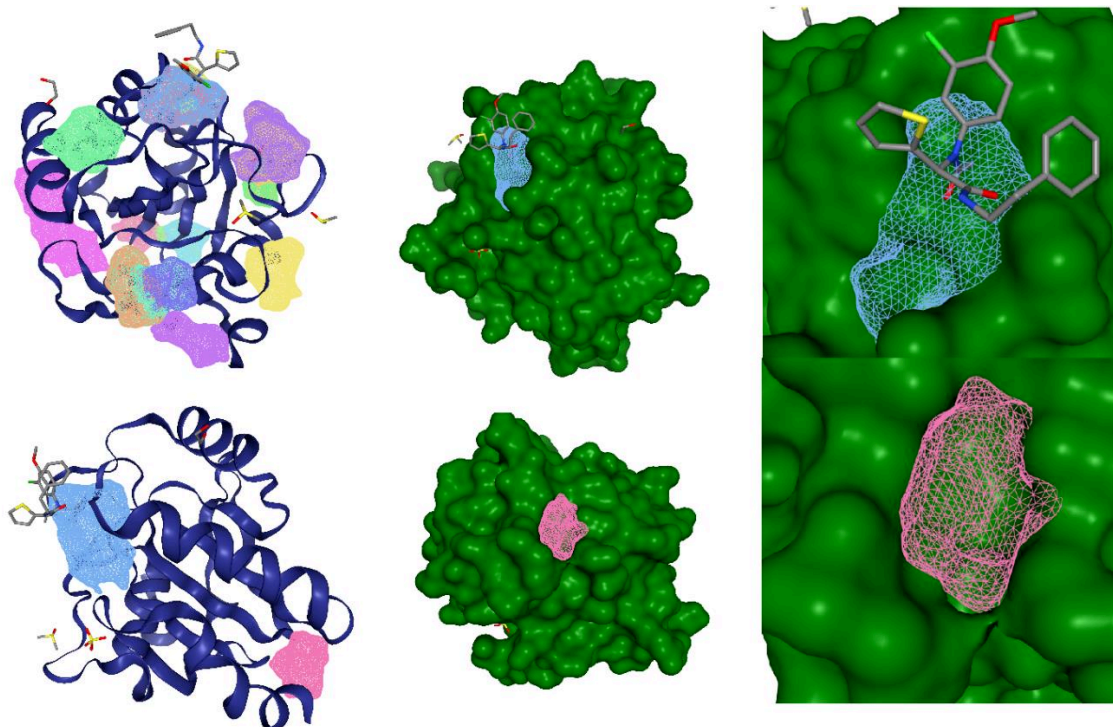


Figura 14. Resultado do DogSiteScorer na pesquisa de *subpockets*. A GPX4 apresentou 25 *subpockets*. Desses *pockets*, mostramos em detalhes o pocket P_1_0 (local do sítio ativo e de interação com o S-ML162) em azul. Também mostramos os detalhes do pocket P_4_0 (local do sítio alostérico onde o S-ML162 também interage) em rosa.

4.4 Docking semi-rígido entre GPX4 e S-ML162

Foram realizados 36 estudos de *docking* molecular entre a estrutura 6HKQ e estruturas do S-ML162, onde alguns parâmetros variaram, com o objetivo de realizar uma padronização, e verificar quais os melhores parâmetros de *docking* neste sistema controle, uma vez que o ligante S-ML162, mostrou-se ativo na inibição de GPX4 (MOOSMAYER et al., 2021; STOCKWELL AND JIANG, 2020; EATON et al., 2019; GAO et al., 2018; YANG et al., 2014; WEIWER et al., 2012). Foram analisados como essas variações de parâmetros poderiam afetar as energias livres (ΔG) dos atracamentos moleculares. O único parâmetro que influenciou de forma significativa o ΔG foi o tamanho e centralização da grid box, como pode ser visualizado na Figura 15. Na figura 16 podemos ver em detalhes os valores adotados em termos de tamanho e centralização da *grid box* utilizada nos experimentos.

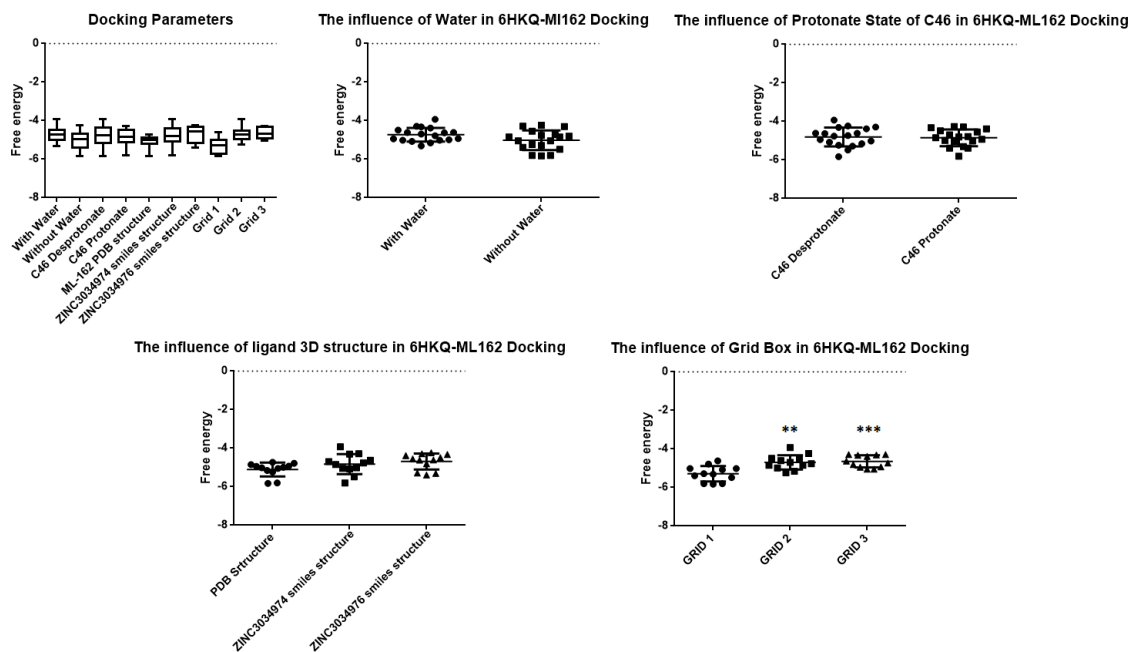


Figura 15. Gráficos de distribuição dos valores de energia livres de todos os parâmetros analisados, influência da presença e ausência de água, influência do estado de protonação, influência do arquivo de entrada do ligante, influência do tamanho e centralização da *grid box*.

Como obteve-se a menor energia livre na Grid box1, foi investigada mais a fundo se essa caixa seria a apropriada para realizar os futuros experimentos. Entretanto, como pode ser visualizado na figura 17, a maior parte das interações ocorreram fora do sítio ativo e sem interação com a cisteína 46, marcada em verde. A interação predominante foi com uma alfa hélice entre os aminoácidos SER85 e GLY95. Além disso, de acordo com os desenvolvedores do software AutoDock Vina, Trott & Olson (2010), não é recomendado utilizar grid box com tamanhos superiores a 30x30x30, a menos que se aumente a exaustividade. Dessa forma, essa caixa não foi escolhida para seguir com os experimentos.

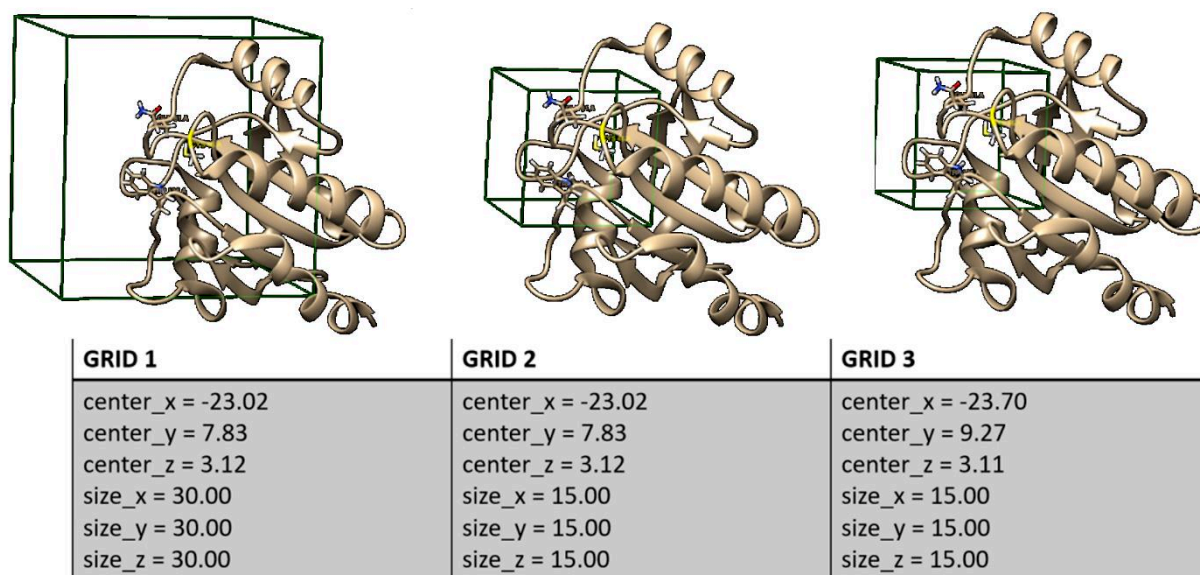


Figura 16. Tipos de grid box utilizadas nos experimentos, note a variação do tamanho e da centralização das *grid boxes* 1, 2 e 3.

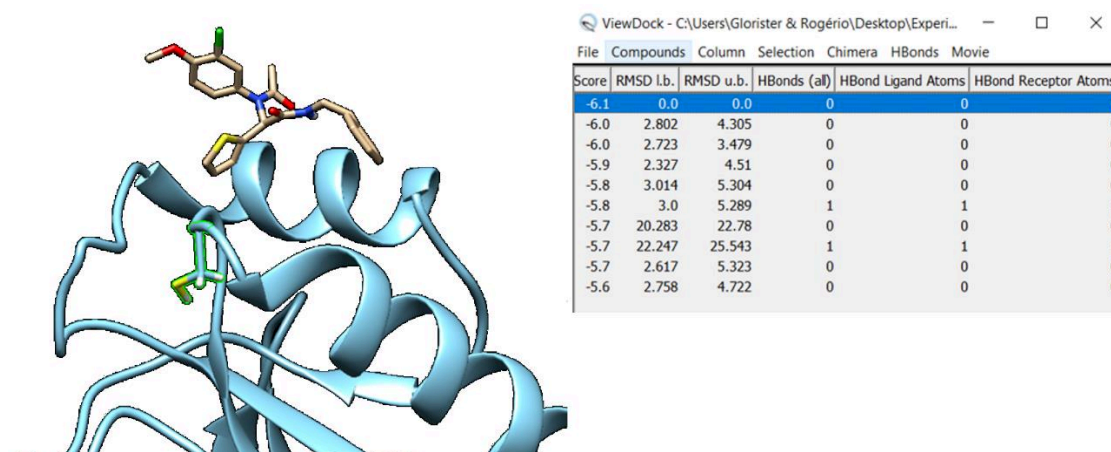


Figura 17. Detalhe do modo de ligação do ML162 interagindo com uma alfa hélice. Contornado em verde está o resíduo de aminoácido cisteína 46, mostrando que o inibidor não está no sítio ativo.

O uso de moléculas de água estrutural em *docking* moleculares é uma prática incomum, mas que tem sido cada vez mais apontada como importante quando essas águas estão envolvidas em interações. Apesar do fato de algumas águas parecerem ter um papel significativo na formação de ligações de hidrogênio com o ligante nesse estudo, elas não se mostraram significativas no *docking* molecular (pois não modificaram significativamente o ΔG). Mas não é porque não altera um parâmetro quantitativo de afinidade, que aquele parâmetro não é importante. Como a presença de moléculas de água aumenta consideravelmente o tempo de execução dos experimentos, optou-se pela simplificação e não utilização de água nas simulações

posteriores. Entretanto, excluir a água estrutural 441 parece não ter sido uma boa estratégia. Em um segundo momento dos experimentos, foi demonstrado que a água estrutural 441 foi incluída novamente, devido a sua importância qualitativa na formação de novas interações, e conforme já indicado pelo nAPOLI.

Uma observação importante a se fazer aqui é que os resultados do experimento de avaliação do estado de protonação foram inconclusivos e inválidos, devido a um problema durante a execução do experimento. Durante a inspeção visual e individual dos resultados, foi verificado que nos parâmetros padrão, quando o AutoDock Vina é rodado dentro do software de visualização Chimera, há uma adição de “hidrogênios” aos arquivos “.pdb” de todas as proteínas quando estes arquivos são convertidos em “.pdbqt”, mesmo que seja selecionada a opção de desprotonar alguns sítios. E, talvez por isso não foi verificada diferença significativa nas energias livres entre os grupos protonada e desprotonada. Foi verificado que o mesmo não ocorre quando se utiliza as linhas de comando para realizar o AutoDock Vina, e dessa forma, os futuros experimentos foram realizados em Prompt de comando.

4.4 Redocking e Docking flexível entre GPX4, S-ML162 e 1S,3R-RSL3

Como nos experimentos anteriores de docagem semi-rígida não foram encontradas poses semelhantes à do inibidor co-cristalografada à proteína GPX4, foi decidido realizar um experimento de *docking* flexível para verificar se essa metodologia seria capaz de replicar o resultado experimental da estrutura cristalografada encontrada no PDB, aqui denominada como *redocking*. Além das análises de *redocking*, o *docking* flexível permitiu o estudo dos contatos mais comuns que ocorrem entre a GPX4 (com o resíduo CYS46 protonado ou desprotonado) e os ligantes S-ML162 e 1S,3R-RSL3. As tabelas disponíveis no anexo 3.1 e 3.2, trazem um resumo dos resultados do *docking* entre a enzima e o inibidor S-ML162, e as figuras 18 e 19 mostram as análises de contatos no LigPlot+ (PDB ID: 6HKQ).

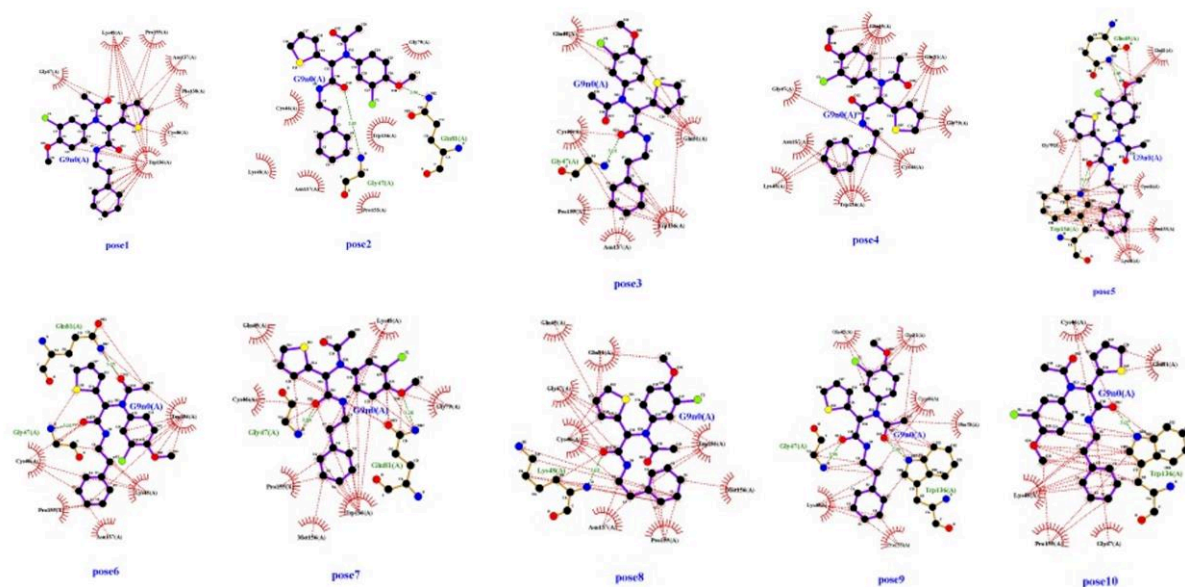


Figura 18. Análise de contatos no LigPlot+ do resultado do *docking* flexível no AutoDock Vina entre a GPX4 contendo resíduo de cisteína 46 desprotonada e o inibidor S-ML162.

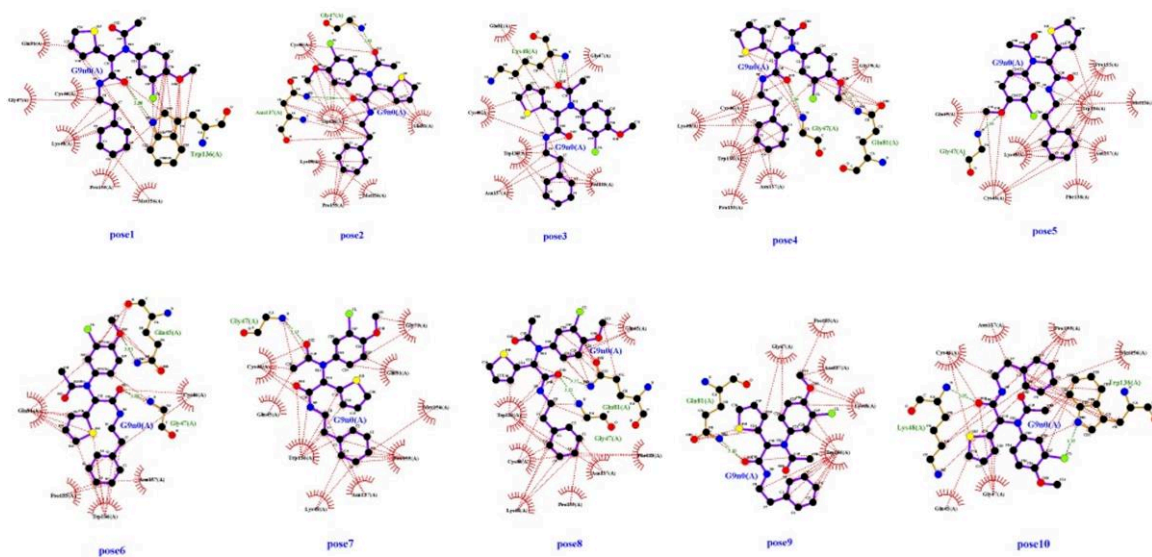


Figura 19. Análise de contatos no LigPlot+ do resultado do *docking* flexível no AutoDock Vina entre a GPX4 contendo o resíduo de cisteína 46 protonada e o inibidor S-ML162.

A pose 9 da tabela presente no anexo 3.1 foi utilizada nas análises de *redocking*, pois apresentou a menor distância entre o carbono reativo e o átomo de enxofre da cisteína 46, além de apresentar as mesmas ligações de hidrogênio presentes no cristal. Essas ligações foram: átomo de oxigênio 12 do ligante interagindo

com o átomo de nitrogênio do *backbone* da glicina 47 (O12-N GLY47) e o átomo do carbono 22 do ligante interagindo com o átomo do nitrogênio do anel presente na cadeia lateral do triptofano 136 (O22-NEI TRP136). Como resultado das análises de *redocking*, o resultado de RMSD foi igual a 3.5, enquanto no LS-align foi igual a 2.6. Apesar desses valores indicarem certa proximidade entre ambos os modelos, eles ultrapassam os valores de referência aceitos na literatura, que são RMSD de até 2 Å para estruturas rígidas e de até 2,5 Å para estruturas flexíveis (XIAO et al., 2018; DOS SANTOS et al., 2020; DARDENNE, 2021) Mesmo com esses resultados, foi dado prosseguimento ao trabalho com as análises do *docking* molecular no AutoDock Vina. Os resultados de *redocking* podem ser conferidos nas figuras 20 e 21.

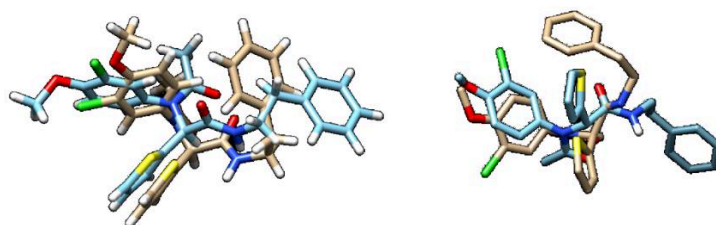


Figura 20. *Redocking* entre a estrutura cristalografada e o modelo de *docking* flexível do inibidor S-ML162, mostrando um alinhamento estrutural entre as duas poses, à esquerda com hidrogênios explícitos, à direita sem hidrogênios explícitos. Resultado do *Ensemble docking* no Chimera foi um RMSD igual a 3.5. Proteína não foi representada para facilitar a visualização.



Figura 21. *Redocking* entre a estrutura cristalografada e o modelo de *docking* flexível do inibidor S-ML162, mostrando um alinhamento estrutural entre as duas poses, à esquerda os dados referentes à análise no LS-align, mostrando um RMSD igual a 2.6, à direita a imagem do alinhamento estrutural.

Já as tabelas disponíveis nos anexos 3.3 e 3.4, mostram um resumo dos resultados do *docking* entre enzima e o inibidor 1S,3R-RSL3, e as figuras 22 e 23 mostram as análises de contatos no LigPlot+. Em todos os *dockings* foi possível verificar a presença de ligações de hidrogênio com os seguintes átomos e resíduos de aminoácidos, em pelo menos uma das poses: nitrogênio da glicina 47, nitrogênio da cadeia lateral do triptofano 136, nitrogênio da cadeia lateral da glutamina 81, nitrogênio da cadeia lateral da glicina 45. Além disso, em 3 *dockings* foi possível identificar a presença dos átomos e resíduos: nitrogênio da cadeia lateral do resíduo de aminoácido lisina 48 e nitrogênio da cadeia lateral do resíduo de aminoácido asparagina 137.

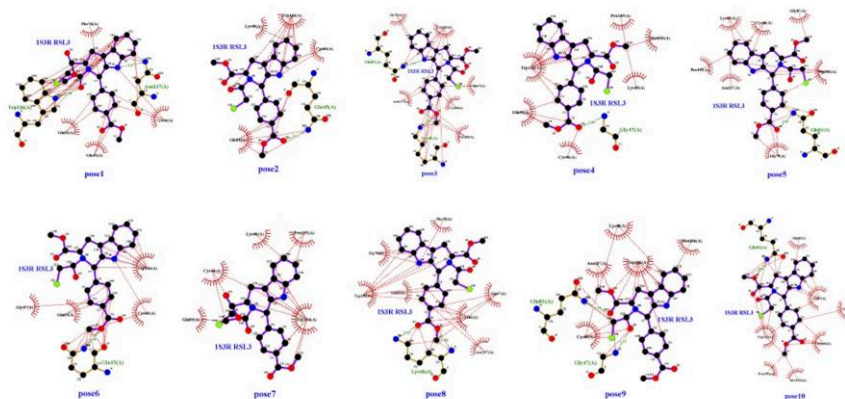


Figura 22. Análise de contatos no LigPlot+ do resultado do *docking* flexível no AutoDock Vina entre a GPX4 contendo resíduo de cisteína 46 desprotonada e o inibidor 1S,3R-RSL3.

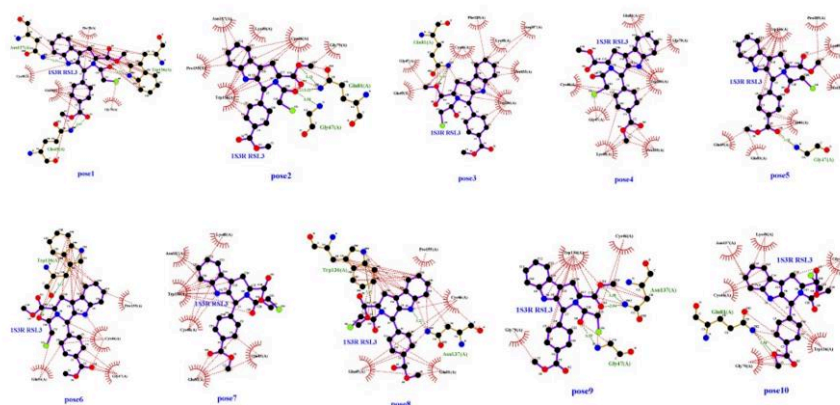


Figura 23. Análise de contatos no LigPlot+ do resultado do *docking* flexível no AutoDock Vina entre a GPX4 contendo resíduo de cisteína 46 protonada e o inibidor 1S,3R-RSL3.

4.5 Target-Based Virtual Screening

Como resultado do *target based-virtual screening*, foram obtidas 720 poses de 72 estudos de *docking* realizados, com 31 ligantes e 5 decoys (compostos considerados falso-positivos) Foram analisados os seguintes parâmetros: pose, energias de afinidade, RMSD L.B (RMSD lower bound), RMSD U.B (RMSD lower bound), estado de protonação da cisteína 46, distância do carbono reativo do ligante ao átomo de enxofre reativo da cisteína 46, e EC50 dos ligantes obtidos da literatura (YANG et al., 2008; WEIWER et al., 2011; YANG et al., 2014; SHIMADA et al.,2016; HASSANNIA et al., 2018; EATON et al.,2019; EATON et al.,2020; STOCKWELL et al., 2020;). Apesar

de almeçadas, não foram realizadas as análises de quantidade e distâncias de ligações de hidrogênio e de quantidade e distância de ligações hidrofóbicas em todas as 720 poses por falta de tempo hábil ou de um algoritmo de automatização. Dessa forma, essas análises estão limitadas aos critérios que foram analisados em todas as poses. O método `.describe()`, permitiu uma análise de estatística descritiva de todos os parâmetros analisados e o seu resultado pode ser observado na tabela 6. Nessa tabela, podemos verificar que as energias de ligação variaram entre -6.8 à -3.0 kcal/mol, sendo a média igual a -4.7 kcal/mol. Além disso, também podemos verificar que a variação de distância entre o carbono reativo do ligante e o átomo de enxofre do resíduo de cisteína 46 foi de no mínimo 3.6 Å e de no máximo 16.11 Å, sendo a distância média em torno de 7.39 Å.

Tabela 6. Estatística Descritiva dos critérios analisados no *Target-based Virtual Screening*, pelo método `.Describe()`, retirado de anotações da autora do *Jupyter Notebook*.

	Pose	Energias	RMSD L.B	RMSD U.B	Distância C46
count	720.000000	720.000000	720.000000	720.000000	720.000000
mean	5.500000	-4.709722	3.159882	5.111171	7.391911
std	2.874278	0.577308	2.409958	3.045747	2.429012
min	1.000000	-6.800000	0.000000	0.000000	3.603900
25%	3.000000	-5.000000	2.031250	3.135000	5.499450
50%	5.500000	-4.600000	2.764000	5.129000	7.278650
75%	8.000000	-4.300000	3.536000	6.622500	8.817150
max	10.000000	-3.000000	13.472000	14.559000	16.110800

C46: sigla para cisteína 46.

Foram utilizados os métodos `hist()` e o `boxplot()` para todas as variáveis analisadas anteriormente, e as figuras foram separadas nos seguintes grupos: todos os compostos, todos os inibidores, todos os decoys, todos os inibidores (variando o estado de protonação da cisteína 46) e todos os decoys (variando o estado de protonação da cisteína 46). Os resultados dos histogramas de energias, RMSD L.B., RMSD U.B. e de

distância do átomo de enxofre da cisteína 46 do átomo de carbono reativo de cada ligante estão disponíveis nas figuras 24, 25, 26 e 27, respectivamente.

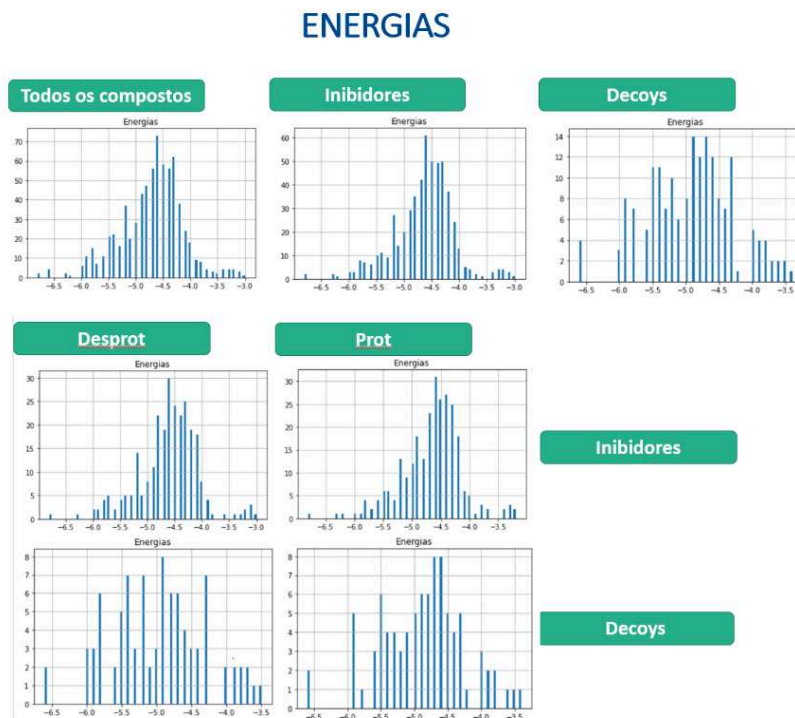


Figura 24. Histograma de frequências das energias de interação das 720 poses de *docking* do *target-based virtual screening*, realizado no *Jupyter Notebook*.

RMSD LB

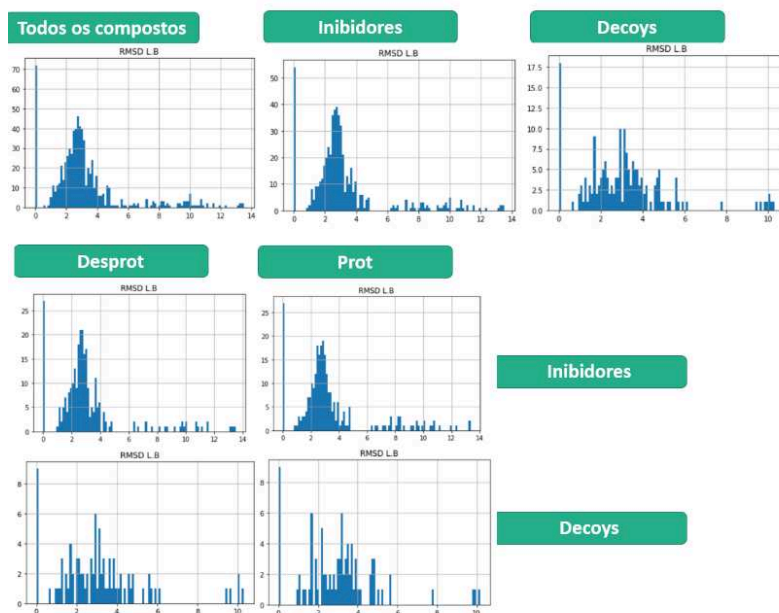


Figura 25. Histograma de frequências do RMSD LB das 720 poses de *docking* do *target-based virtual screening* realizado no *Jupyter Notebook*.

RMSD UB

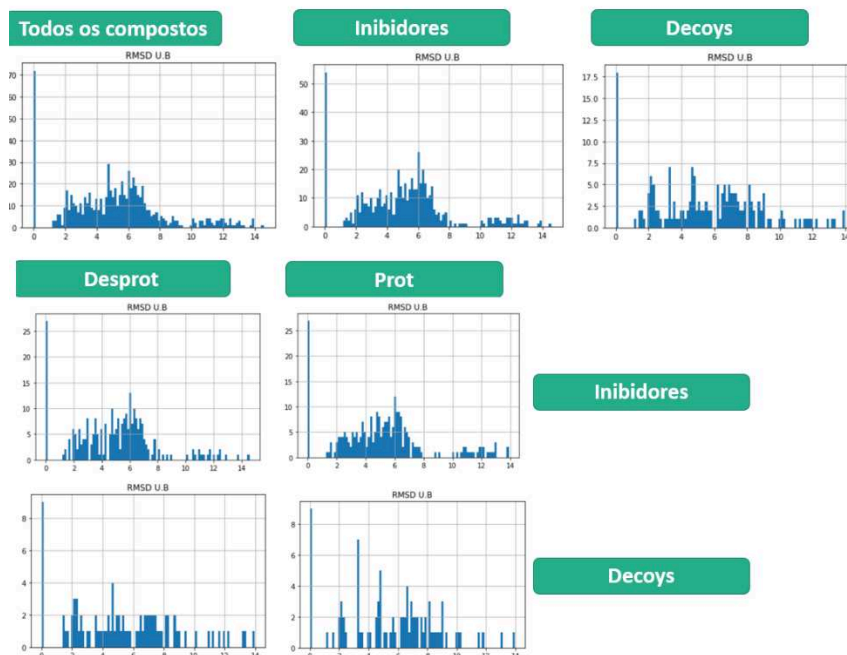


Figura 26. Histograma de frequências do RMSD UB das 720 poses de *docking* do *target-based virtual screening* realizado no *Jupyter Notebook*.

Distância C46 do átomo reativo

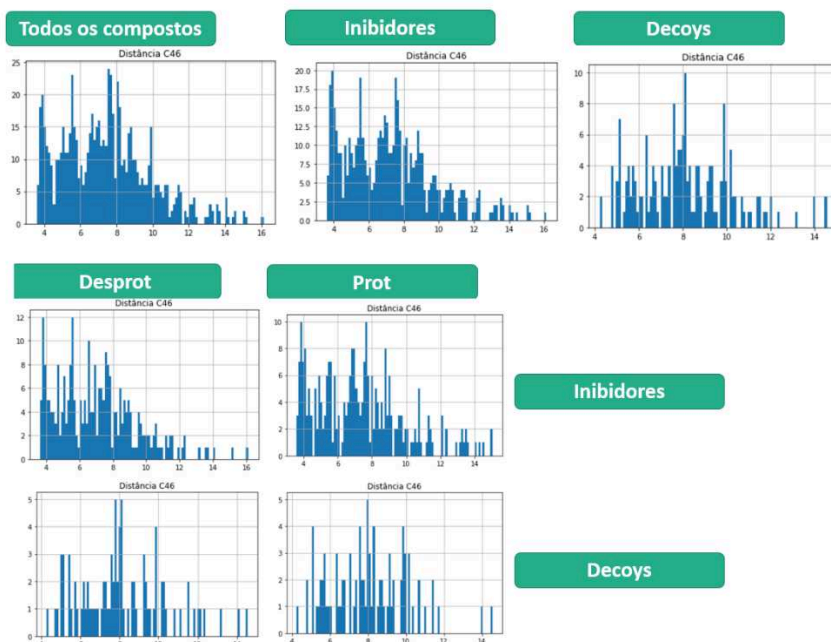


Figura 27. Histograma de frequências das distâncias entre os carbonos reativos de cada ligante e o átomo de enxofre da cisteína 46 da GPX4, resultantes das 720 poses de *docking* do *target-based virtual screening* realizado no *Jupyter Notebook*.

Pretendia-se utilizar outros filtros além do *docking* molecular para poder separar de forma mais eficaz os *decoys* dos ligantes. Desta forma, esse estudo piloto foi muito importante pois através dele, podemos verificar que a *estratégia target-based virtual screening* não era a mais adequada para esse tipo de alvo molecular (a GPX4) e o seu grupo de moléculas inibidoras. Sendo assim, os critérios analisados não puderam ser confirmados como critérios interessantes ou capazes de diferenciar os grupos de moléculas inibidoras das falsas positivas (*decoys*). Talvez uma análise mais qualitativa, levando em consideração as ligações de hidrogênio e as interações hidrofóbicas em resíduos de aminoácidos mais relevantes, poderia ser indicada nesse caso específico.

Dentre os vários motivos para a falha dos estudos de triagem molecular baseada na estrutura do alvo molecular, uma forte hipótese é que as características *undruggable* dos sítios de interação da GPX4 sejam preponderantes, e que sítios de interação localizados em superfícies muito expostas ao solvente são modelos difíceis de serem preditos através de metodologias de atracamento molecular. Além disso, em primeiro de abril de 2020 foi publicada a estrutura 6HKQ da GPX4 no PDB, e baseada nessa estrutura, também foi publicada na base de dados de orientação de proteínas em membranas (do inglês, *Orientation of Proteins in Membranes Database – OPM Database*) uma predição do ancoramento da GPX4 na face interna de uma membrana mitocondrial. A base de dados OPM não é um base de dados recente (LOMIZE et al., 2006; LOMIZE et al., 2012), mas é atualizada de forma periódica, e a cada acréscimo no PDB, há um acréscimo na OPM. E segundo essa predição, a GPX4 poderia ser considerada uma proteína periférica de membrana em algumas situações fisiológicas, e parte significativa de seu sítio ativo estaria em contato com fosfolípidos de membrana. A orientação da GPX4 na membrana foi baixada e analisada. E como resultado dessa análise, observamos que os resíduos de aminoácidos da GPX4 que potencialmente interagem com a membrana são: leucina 130, isoleucina 125, glicina 131, lisina 135, metionina 156 e triptofano 136. Além disso, também observamos que parte significativa do ligante poderia também interagir com a membrana, como toda a porção do anel tiofeno, o cloro da metóxianilina e uma porção da fenetilamina. Na figura 28 podem ser visualizadas a GPX4 (PDB ID: 6HKQ) orientada na face interna da membrana mitocondrial e os detalhes para os resíduos de aminoácidos que interagem com a membrana e as porções do ligante que também entram em contato com a membrana mitocondrial.

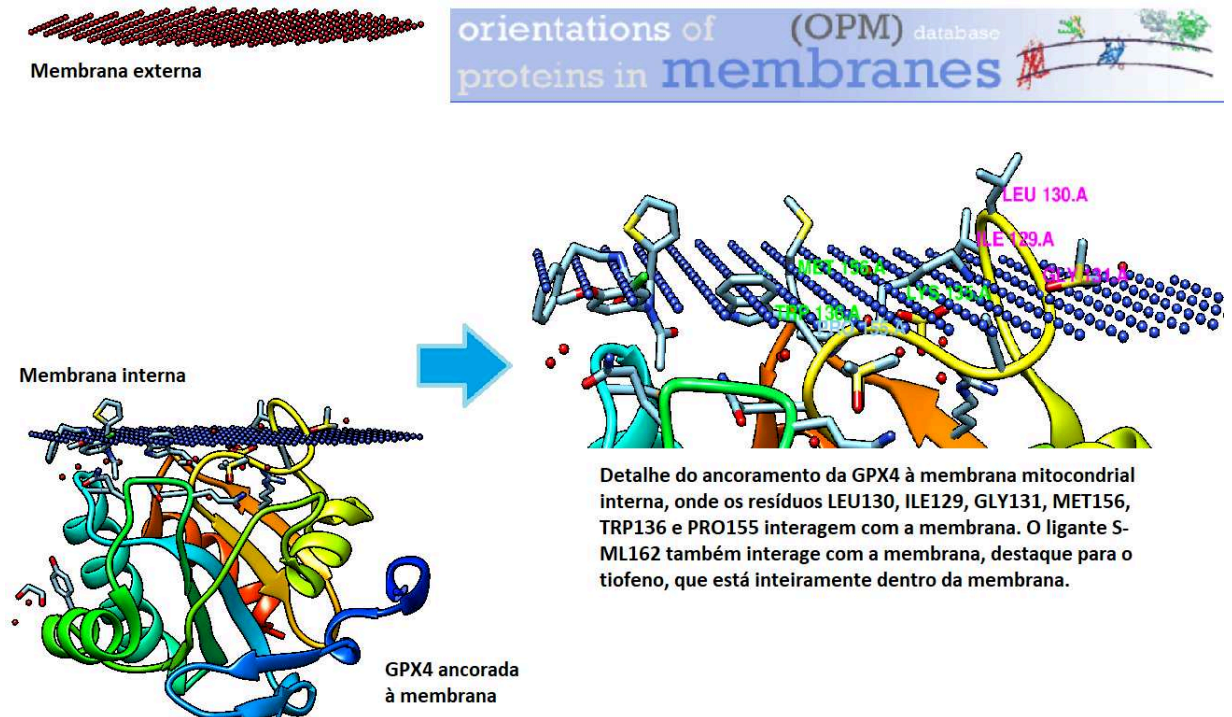


Figura 28. Orientação da GPX4 na face interna da membrana mitocondrial, sendo predita como uma proteína periférica de membrana segundo a OPM Database. Detalhe da porção de interação, com aumento e destaque para os resíduos de aminoácidos e para o ligante, que possuem porções significativas com possível interação com os fosfolípidos de membrana.

4.5 Ligand-Based Virtual Screening

Como o *target-based virtual screening* não se mostrou promissor e não foram encontrados critérios significativos para a divisão, seleção e/ou ranqueamento das moléculas mais promissoras, adotou-se uma nova estratégia de planejamento de fármacos baseada na estrutura do ligante. As estratégias baseadas nos ligantes, para serem bem sucedidas necessitam de um conjunto pré-estabelecido ou conhecido de moléculas inibidoras, e o ideal seria que ao menos um dos inibidores conhecidos co-cristalografado com a proteína de interesse. Como a GPX4 atendia a esses critérios, essa abordagem foi explorada. Primeiramente foi realizada uma análise dos parâmetros moleculares (peso molecular, logP, número de aceptores e doadores de hidrogênio entre outros parâmetros) dos 33 inibidores de GPX4 conhecidos, a partir de cálculos na plataforma SWISSADME. A partir desse conjunto e dados, foram realizadas duas análises, um mapa de calor e a análise de componentes principais. No *Heatmap* disponível na Figura 29, podemos observar que o peso molecular (MW) é correlacionado positivamente com número de ligações rotacionáveis, número de

aceptores de hidrogênio, e alguns parâmetros de lipofilicidade (como o LogP *consensus*).

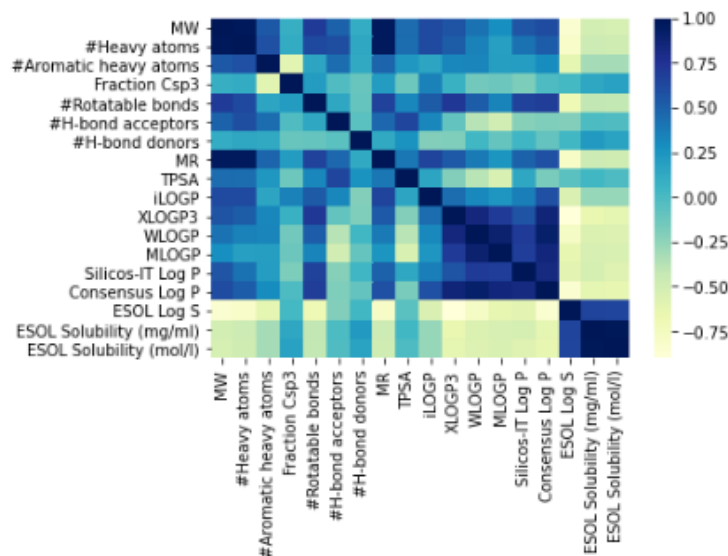


Figura 29. Mapa de calor dos critérios intermoleculares dos 33 ligantes inibidores de GPX4. A cor azul escura representa forte correlação positiva, enquanto a cor mais clara representa forte correlação negativa. Peso molecular (MW) é correlacionado positivamente com número de ligações rotacionáveis, número de aceptores de hidrogênio, e alguns parâmetros de lipofilicidade (como o LogP *consensus*) realizado no Jupyter Notebook, com os dados gerados do SWISSADME.

Já na figura 30, temos o gráfico de cotovelo (*scree plot*) da análise PCA. Nesse gráfico, apenas a primeira componente explica mais de 90% dos dados. Ou seja, o peso molecular explica 94% dos dados.

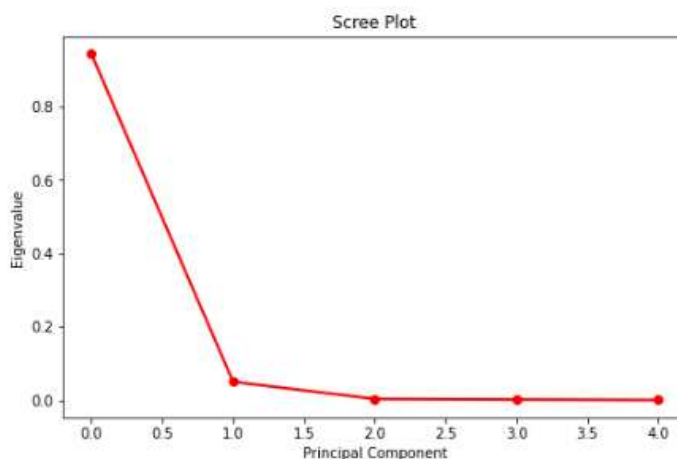


Figura 30. Análise de Componentes Principais dos critérios intermoleculares dos 33 ligantes inibidores de GPX4. Nesse gráfico, apenas a primeira componente explica mais de 90% dos dados. Ou seja, o peso molecular explica 94% dos dados. Realizado no Jupyter Notebook, com os dados gerados do SWISSADME.

A partir da molécula S-ML162, foi realizada uma busca de similaridade do tipo combinada no SwissSimilarity (ZOETE et al., 2016) na base de dados Zinc Drug Like (STERLING et al., 2015), e a partir dessa busca em um banco de dados de 10.639.400 moléculas, foram obtidas uma lista de 400 moléculas. Essas 400 moléculas apresentaram o valor de índice de similaridade que variou entre 0.993 e 0.633 em comparação com a molécula de busca. A partir desse resultado, foram calculadas as propriedades farmacocinéticas e toxicológicas das 400 moléculas no SwissADME (DAINA et al., 2017). A tabela resultante das 400 moléculas e suas propriedades foi filtrada por meio de filtros de toxicidade e farmacocinética (glicoproteína P e vários citocromos), o que resultou em 27 moléculas. As 27 moléculas foram filtradas novamente, agora utilizando critérios farmacocinéticos para fármacos de sucesso no Sistema Nervoso Central (visando moléculas que poderiam atuar em tumores encefálicos primários ou secundários, como por exemplo aqueles oriundos de metástase de câncer de mama). Após todo esse processo, foram obtidas 6 moléculas.

Como resultado, as 6 moléculas obtidas possuem em sua estrutura os grupos tiofeno e metóxi-anilina do S-ML162, porém, nenhuma possuiu o grupo cloroacetamida, essencial para a ligação covalente (WEIWER et al., 2012; YANG et al., 2014; EATON et al., 2019; STOCKWELL & JIANG, 2020;). Dessa forma, a estrutura das 6 moléculas foi analisada individualmente, e a partir da molécula 344, foi realizada uma modificação (adição de grupamento Cloro no átomo de carbono 1) e isso resultou em uma nova molécula da classe das cloroacetamidas, que foi denominada new344. A partir de então as 7 moléculas foram analisadas por meio de um estudo de *Docking consensus* e de pesquisa complementar de toxicidade no ADMETLAB (XIONG et al., 2021). Os resultados dos *docking* moleculares em todos os programas e sítios de interação encontram-se a tabela 7. A última etapa de ranqueamento foi o *docking consensus*, mostrado na tabela 8.

Tabela 7. Resultado dos *Dockings* moleculares em todos os softwares e sítios de interação nos programas *Bindscope*, *Dockthor* e *Autodock Vina*.

Moléculas	<i>Bindscope</i>	<i>Dockthor</i>	<i>Vina</i>	<i>Bindscope</i>	<i>Dockthor</i>	<i>Vina</i>
	(CYS 46)	(CYS 46 + H ₂ O)	(SEC 46 + H ₂ O)			
Sítio Ativo – SEC 46 ou CYS 46				Sítio Alostérico – CYS 66		
135	0.6041bp*	-6.902	-4.7	0.107	-7.584	-4.1
	-4.70116			-4.24266		
241	0.0136	-7.962	-5.0	0.011	-7.852	-4.4
	-5.02751			-4.46520		
268	0.0003	-6.918	-4.5	0.0101	-7.542	-4.2
	-4.91099			-4.20165		
275	0.2218	-7.372	-5.0	0.1707	-7.963	-4.5
	-4.76324			-4.33151		
395	0.3395	-8.090	-4.7	0.359	-7.900	-5.0
	-4.91412			-4.98264		
344	0	-7.652	-4.2	0	-8.031	-4.8
	-4.86208			-4.77621		
New344	0.0001	-7.639	-4.2	0.0001	-8.078	-4.7
	-4.76951			-4.72803		

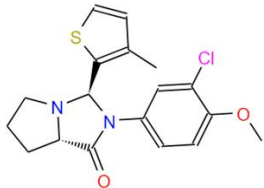
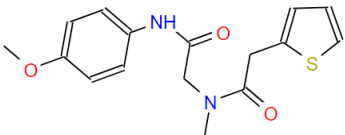
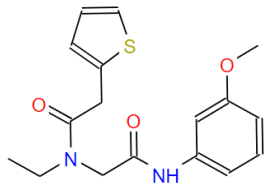
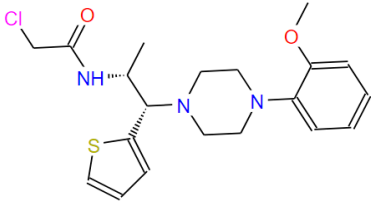
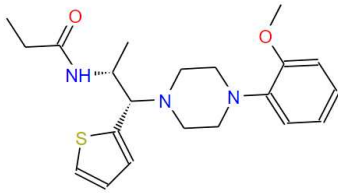
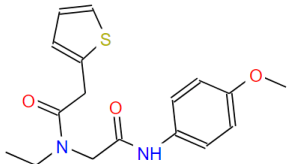
Observação: O BindScope oferta dois tipos de resultado: a energia de interação e a probabilidade de interação. *bp significa *binding probability*, do inglês, probabilidade de ligação, esse índice foi usado para o ranqueamento. Nos outros softwares de *docking*, Dockthor e AutoDock Vina, foram utilizados a energia de interação para o ranqueamento. Nos programas BindScope e Dockthor, foram utilizados a cisteína no lugar da selenocisteína 46 no sítio ativo. E nos softwares Dockthor e Vina, foram utilizadas águas estruturais no sítio ativo. O tamanho e localização da caixa foram os mesmos em todas as simulações.

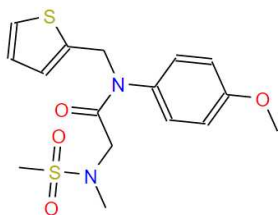
Tabela 8. Resultado do *Docking consensus*, com os ranqueamentos utilizados para cada molécula em cada *docking* e sítio de interação. R é o Ranqueamento final, que é igual a média das posições daquela molécula em todos os *dockings*. As moléculas foram ranqueadas pelo seu menor valor de R.

Moléculas	R	Sítio Ativo – SEC 46 ou CYS 46			Sítio Alostérico – CYS 66		
		Bindscope	Dockthor	Vina	Bindscope	Dockthor	Vina
135	4.33	1 ^a	7 ^a	2 ^a	3 ^a	6 ^a	7 ^a
241	3.50	4 ^a	2 ^a	1 ^a	4 ^a	5 ^a	5 ^a
268	5.33	5 ^a	6 ^a	3 ^a	5 ^a	7 ^a	6 ^a
275	3	3 ^a	5 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a
395	1.8	2 ^a	1 ^a	2 ^a	1 ^a	4 ^a	1 ^a
344	4.16	7 ^a	3 ^a	4 ^a	7 ^a	2 ^a	2 ^a
New344	4	6 ^a	4 ^a	4 ^a	6 ^a	1 ^a	3 ^a

Como resultado de todo o *Ligand-Based Virtual Screening*, a molécula *top1* foi a 395 (com o índice de similaridade igual a 0.636), enquanto a *top7* foi a 268 (com índice de similaridade igual a 0.690). As 7 moléculas encontradas apresentam como características comuns: a presença de anel tiofeno, de grupamentos amida, a ausência de toxicidade Herg e o respeito às regras de Lipinski. A tabela 9 resume os principais resultados encontrados do *Ligand-Based Virtual Screening*, demonstrando o resultado da molécula no ranqueamento, o número dela na primeira etapa de seleção, o ID da molécula na base de dados ZINC15, o índice de similaridade ao S-ML162 e a sua estrutura química.

Tabela 9. Resumo dos principais resultados do *Ligand-Based Virtual Screening*.

<i>Ranking</i>	Número da molécula no Virtual Screening	ZINC ID	Índice de Similaridade	Estrutura
1º	395	ZINC75402967	0.636	
2º	275	ZINC08313206	0.688	
3º	241	ZINC27425389	0.702	
4º	New344	Não está na base de dados;	Não contém	
5º	344	ZINC23181675	0.688	
6º	135	ZINC07988654	0.749	

7º	268	ZINC71879919	0.690	
----	-----	--------------	-------	---

Molécula de Referência	S-ML168	1.000	
------------------------------	---------	-------	---

A partir desse ponto foram descritos e detalhados os resultados encontrados para cada uma das 7 novas moléculas com potencial de serem inibidoras de GPX4.

A molécula 395 é um isômero com 2 sítios quirais, encontrada na base de dados ZINC15 (ZINC75402967) e no PubChem ([CID:71686257](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/71686257)), e foi considerada a *top1* nesse estudo de *virtual screening*, tendo o índice de similaridade igual a 0.636. Os valores de afinidade no AutoDock Vina foram iguais a -4.7 kcal/mol para o sítio ativo e -5.0 kcal/mol no sítio alostérico, não realizando ligações de hidrogênio. Em relação aos seus parâmetros farmacocinéticos calculados no SwissADME, possui um peso molecular igual a 362.87, 3 ligações rotacionáveis, 3 aceptores de hidrogênio, o que explica a ausência de ligações de hidrogênio, alta absorção gastrointestinal, logP *consensus* igual a 3.53, um TPSA (do inglês, *topological polar surface area*, significa área de superfície polar topológica) igual a 61.02, com possibilidade de permear a barreira hematoencefálica (BHE).

As propriedades farmacocinéticas são importantes para determinar se uma molécula possui a capacidade de atravessar a BHE, e nesse caso, alguns dos fatores mais importantes são: o valor de área de superfície polar (PSA) não pode ser maior do que 120Å², sendo preferível valores menores que 70 (KELDER et al., 1999; HITCHCOCK et al., 2006; CUMMINGS et al., 2013), o peso molecular deve ser menor que 400 (OPREA et al., 2001; HITCHCOCK et al., 2006; CUMMINGS et al., 2013) e apresentar uma lipofilicidade adequada (ou seja, LogP entre 1 e 4), entre outras características (HITCHCOCK et al., 2006). A exclusão de moléculas carregadas negativamente pode enriquecer o pool de moléculas que atravessam a BHE, já que

grupos carregados negativamente ($pK_a < 4$) são desfavoráveis para penetração encefálica (FISCHER et al., 1998; HITCHCOCK et al., 2006). Segundo Lobel e colaboradores (2003), moléculas positivamente carregadas no pH 7 ou 8, favorecem a penetração encefálica. Além disso, também é considerada característica importante evitar o efluxo mediado pela glicoproteína P, sendo esse critério considerado um pré-requisito para moléculas terem atividade biológica no sistema nervoso central (MAHAR DOAN et al., 2002; HA et al., 2007). Adicionalmente, a ligação a proteínas plasmáticas como a albumina é prejudicial à penetração no SNC, uma vez que apenas o fármaco livre atravessa a BHE (MAURER et al., 2005; DI et al., 2008).

A molécula 395 não está disponível para a venda segundo a base de dados ZINC15, sendo necessário a sua síntese, e o grau de acessibilidade sintética (índice do SwissADME que varia de 1 a 10, sendo que 1 indica síntese muito fácil, e 10 síntese muito difícil) foi igual a 3.66, indicando que o processo é viável. Segundo análises de toxicidade no ADMETLAB, não é bloqueador de HERG, porém apresenta certo grau de hepatotoxicidade, toxicidade respiratória, sendo enquadrada no grupo de fármacos que devem ter uma dose máxima diária para limitar os efeitos adversos. Em relação ao seu potencial de atividade biológica, foi feita uma busca no preditor SEA do ChEMBL 20, que apresentou como resultado 9 alvos biológicos, que são:

- Receptores de 5-hidrotirptamina do tipo 2B, 2C e 2A.
- Enzima málica dependente de NADP (ME1)
- Uma proteína não caracterizada chamada de TRHDE
- Peptidil-proli-cis-trans-isomerase (FKBP1)
- Fosfodiesterase (PDEB1)
- Receptor gustativo tipo 1 membro 1, do inglês, *Taste receptor type 1 member 1* (TAS1R1)
- Proteína homóloga 1 à proteína de reparo de DNA RAD51 (RAD51)

A molécula 275, a segunda molécula mais promissora segundo o VS, possui um índice de similaridade igual a 0.688, e está comercialmente disponível no ZINC15 (ZINC08313206) por 3 vendedores, sendo também encontrada no PubChem (CID: 9438600). No AutoDock Vina, apresentou -5.0 kcal/mol no sítio ativo e a formação de duas ligações de hidrogênio (envolvendo o resíduo de aminoácidos SEC46 e a água estrutural 441). A apresentação de ligação de hidrogênio com a água 441 é bastante

relevante, já que esse tipo de interação está presente no cristal do S-ML162. No sítio alostérico, apresentou -4.5 kcal/mol de afinidade e a formação de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de cisteína 66. Na análise no ADMETLAB também demonstrou que não bloqueia canais HERG, porém, pode apresentar toxicidade hepática induzida por fármacos. A molécula 275 possui peso molecular igual a 318.39, 8 ligações rotacionáveis, 3 aceptores de ligação de hidrogênio, 1 doador de ligação de hidrogênio, índice TPSA igual a 86.88 e LogP *consensus* igual a 2.13. Devido a essas características, provavelmente não ultrapassa a BHE, porém, apresenta alta absorção gastrointestinal. Segundo a análise preditora de atividade biológica, apresentou mais de 135 alvos potenciais, dentre eles alguns relacionados ao estresse oxidativo, como por exemplo, KEAP-1 e LOX15, além de metaloproteinase-16 de matriz, que também é um alvo tumoral, sendo associada a proliferação e invasão em câncer de estômago (CAO et al., 2016).

A molécula 241, considerada top3 nesse estudo, está disponível comercialmente no ZINC15 (ZINC27425389) por 2 vendedores e também se encontra no PubChem (CID: 34779937). O índice de similaridade foi igual 0.702, e suas propriedades farmacocinéticas se resumem em: peso molecular igual a 332.42, 9 ligações rotacionáveis, 3 aceptores de ligações de hidrogênio, 1 doador de ligação de hidrogênio, TPSA igual a 86.88 e LogP *consensus* igual a 2.49. Segundo essas características, também não ultrapassa a BHE, porém possui alta absorção gastrointestinal. Nas análises do ADMETLAB também demonstrou que não bloqueia HERG, e apresentou pequena toxicidade hepática. Em relação aos resultados no AutoDock Vina, apresentou -5.0 kcal/mol no sítio ativo (apresentando duas ligações de hidrogênio, uma com a água 441 e outra com a SEC46), e -4.4 kcal/mol no sítio alostérico (apresentando uma ligação de hidrogênio com a CYS66). Segundo a análise no preditor SEA, foram encontrados 131 alvos biológicos em potencial, como por exemplo, receptores de melatonina tipo 1B e 1A, canais de potássio da subfamília K, membros 9 e 3, malato-desidrogenase citoplasmática, e um gene supressor tumoral a proteína 1 associada ao BRCA1 (BAP1).

A molécula top 4 foi desenhada nesse estudo, ao se adicionar um átomo de cloro ao carbono 1 da molécula 344, sendo denominada “new344”. Essa molécula não foi encontrada nas bases de dados ZINC15 ou PubChem. Além disso, também foi realizada uma busca na plataforma Cortellis Drug Discovery (CLARIVATE, 2022) e no

SPRESiWEB patent Database (INFOCHEM GMBH, 2019) e não foram encontradas estruturas similares patenteadas, sendo uma potencial fonte de inovação, se comprovada a sua atividade biológica *in vitro*. A molécula new344 é uma cloroacetamida com dois sítios quirais, e com viabilidade sintética de 3.79. Além disso nos estudos de *docking* molecular no Autodock Vina, apresentou -4.2 kcal/mol no sítio ativo (com a presença de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de glicina 47, reproduzindo uma interação relevante que também ocorre com o S-ML162), e -4.7 no sítio alostérico (formando uma ligação de hidrogênio com a glicina 34). Como propriedades farmacocinéticas, possui um peso molecular igual a 407.96, 8 ligações rotacionáveis, 3 aceptores de hidrogênio, 1 doador de hidrogênio, TPSA igual a 73.05, LogP *consensus* igual a 3.13. Essas características conferem a essa molécula a capacidade de ser altamente absorvida no trato gastrointestinal e também de permear a barreira hematoencefálica, sendo a segunda molécula encontrada nesse estudo com essa capacidade. Nas análises do ADMETLAB demonstrou que não bloqueia HERG, porém pode apresentar toxicidade no teste ames, e toxicidade oral aguda em ratos, além de toxicidade respiratória. Segundo as análises no preditor SEA, apresenta 89 alvos biológicos em potencial, como por exemplo, receptores de dopamina (D1, D2, D3 e D4), receptores de 5-hidroxitriptamina (1A, 2A, 6 e 1D), receptores alfa-adrenérgicos (1A, 1B, 1D,) receptores beta-adrenérgicos e receptor de neuropeptídeo Y.

Portanto, pode-se considerar que essa nova molécula, a new334, desenhada e proposta nesse estudo, possa ser um alvo potencial de GPX4 com ação polifarmacológica em outros alvos, sendo uma molécula com características farmacocinéticas diferenciadas, já que ultrapassa a barreira hematoencefálica e possui o grupamento cloroacetamida, fundamental para a inibição direta de GPX4.

A molécula 344, top5 nesse estudo, é um isômero com 2 sítios quirais, que está disponível no ZINC15 (ZINC23181675) por 5 vendedores, e também na base de dados PubChem (CID: 7086658). Seu índice de similaridade é 0.688, e possui as seguintes características farmacocinéticas: peso molecular igual a 387.54, 8 ligações rotacionáveis, 3 aceptores de ligação de hidrogênio, 1 doador de ligação de hidrogênio, TPSA igual a 73.05, LogP *consensus* igual a 3.1, apresentando alta absorção intestinal e capacidade de penetrar a BHE. Em relação aos resultados no AutoDock Vina, no sítio ativo apresentou energia de afinidade igual a -4.2 kcal/mol e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de glicina 47 (reproduzindo uma interação do cristal), enquanto que no

sítio alostérico apresentou uma energia de afinidade igual a -4.8 kcal/mol e uma ligação de hidrogênio com o resíduo de glicina 34. Nas análises do ADMETLAB verificou-se que não bloqueia HERG, porém apresenta possibilidade de ter hepatotoxicidade e toxicidade respiratória. No preditor de atividade biológica, apresentou 111 alvos moleculares, sendo alguns exemplos relevantes receptores dopaminérgicos (D1, D2, D3, D4), receptores alfa-adrenérgicos (1A, 1B, 1D), receptores de 5-hidroxitriptamina (1A, 2A e 7) e receptor de urotensina 2.

A molécula 135, classificada nesse estudo como top6, está disponível no ZINC15 (ZINC07988654) por 4 vendedores e apresentou um índice de similaridade igual a 0.749. As propriedades farmacocinéticas da molécula 135 são as seguintes: peso molecular igual a 332.42, 9 ligações rotacionáveis, 3 aceptores de ligação de hidrogênio, 1 doador de ligação de hidrogênio, TPSA igual a 86.88, logP *consensus* igual a 2.54, apresentando alta absorção gastrointestinal, porém não ultrapassa a BHE. Nas análises de ADMETLAB mostrou que não bloqueia HERG, porém pode apresentar hepatotoxicidade e injúria hepática. Em relação aos estudos no AutoDock Vina, no sítio ativo apresentou uma energia de afinidade igual a -4.7 kcal/mol e apresentou 3 ligações de hidrogênio (com os resíduos de glicina 47 e triptofano 136 e, com a água estrutural 441, todas as interações estão presentes no cristal 6HKQ). Já em relação aos estudos de *docking* no sítio alostérico, foi obtido um resultado de -4.1 kcal/mol de energia de afinidade e a presença de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de cisteína 66. Segundo o preditor de atividade biológica ChEMBL 20 (GAULTON et al., 2012), pode interagir com o receptor de melatonina tipo 1B e enzimas do tipo liase, como a anidrase carbônico mitocondrial.

A última molécula encontrada nesse estudo de *virtual screening*, a molécula 268, top7, está disponível no ZINC15 (ZINC71879919) por 4 vendedores, e com índice de similaridade igual a 0.690. Em relação às propriedades farmacocinéticas, apresenta um peso molecular igual a 368.47, 8 ligações rotacionáveis, 5 aceptores de ligações de hidrogênio, nenhum doador de ligação de hidrogênio, TPSA igual a 103.54, logP *consensus* de 1.97, apresentando alta absorção gastrointestinal e não permeando a BHE. Nas análises de toxicidade do ADMETLAB foi verificado que a molécula não bloqueia HERG, porém pode apresentar hepatotoxicidade e toxicidade respiratória. Em relação aos estudos de *docking* molecular, no AutoDock Vina, apresentou -4.5 kcal/mol como valor de afinidade no sítio ativo, apresentando 3 ligações de hidrogênio (com os

resíduos de glicina 47 e triptofano 136 e, com a água estrutural 441, todas interações presentes no cristal). Em relação aos resultados no sítio alostérico, a energia de afinidade foi igual a -4.2 kcal/mol e não apresentou ligações de hidrogênio. Em relação aos estudos de predição de atividade, foi predita a possibilidade de interação com uma proteína chamada proteína morfogenética óssea 1 (do inglês, *Bone morphogenetic protein 1*).

Como resultado dos experimentos de bioisosterismo no SwissBioisostere (WIRTH et al., 2013), obtivemos uma lista no formato “.csv” de 3.691 fragmentos candidatos para a substituição do grupo tiofeno. Essa estratégia pode ser aplicada futuramente para o aprimoramento da molécula em questões de bioatividade e de patenteabilidade. A figura 31 apresenta um gráfico contendo todos esses fragmentos e a sua dispersão em relação à diferença da área total de superfície polar ($\Delta tPSA$) e de um parâmetro de lipofilicidade ($\Delta \log P$) em comparação com o grupamento original de tiofeno.

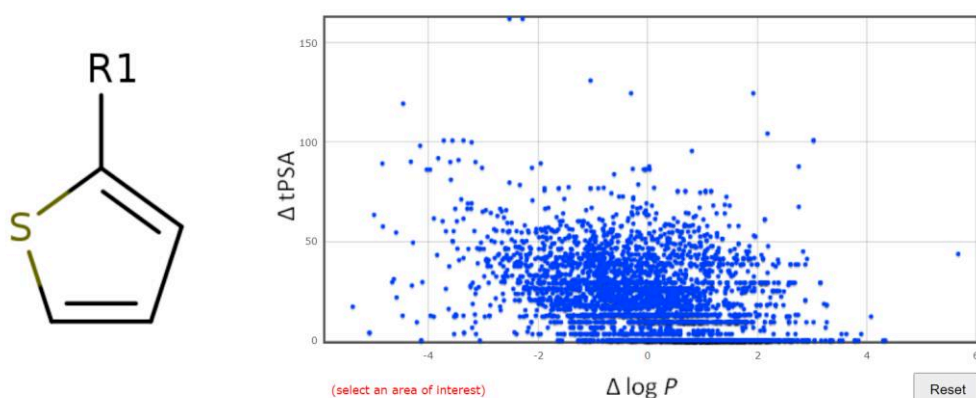


Figura 31. Resultado do experimento de bioisosterismo no SwisBioisostere mostrando a dispersão dos 3.691 fragmentos candidatos à substituir o grupamento tiofeno e sua distribuição diferencial em relação ao fragmento substituinte, nos parâmetros de área total de superfície polar ($\Delta tPSA$) e lipofilicidade ($\Delta \log P$).

5. CONCLUSÃO

A GPX4 é um alvo biológico promissor na indução de ferroptose, e muitas sondas e pequenas moléculas foram sintetizadas visando a inibição de GPX4 (YANG et al., 2008; YANG et al., 2014; EATON et al., 2019; STOCKWELL et al., 2020). Recentemente foi relatado o desenvolvimento de uma molécula líder baseada na partenólídeo e que causa a degradação e a inibição de GPX4, e que teve efeito farmacológico em células tumorais de câncer de mama triplo negativo e em modelos animais da doença (DING et al., 2021). Apesar de promissora, a GPX4 é um alvo difícil para realização de experimentos de triagem virtual baseada na estrutura do alvo molecular, pois apresenta uma série de características típicas de *undruggable targets*. Entretanto, apesar dos desafios, foi possível realizar uma triagem virtual baseada nos ligantes conhecidos, pois foram encontradas muitas publicações descrevendo pequenas moléculas que interagem com a GPX4. Com base nessa metodologia, e na estrutura do S-ML162, foi possível encontrar novas 6 moléculas e desenhar uma molécula inédita (a new344), potencialmente inibidoras da GPX4. É importante ressaltar que, segundo a predição realizada, todas as moléculas encontradas possuem características farmacocinéticas relevantes e apropriadas para fármacos, e pouca toxicidade potencial, o que é um diferencial desse estudo de *virtual screening*. Essas 7 moléculas novas encontradas nesse estudo poderão ser testadas *in vitro* em futuros trabalhos, e também poderão ser aprimoradas por estratégias de bioisosterismo.

6. PERSPECTIVAS

A partir das 7 moléculas novas encontradas, esperamos realizar estudos de dinâmica molecular para aprofundar o conhecimento sobre o modo de interação dessas moléculas nos sítios de ligação da GPX4, tanto no sítio principal quanto no alostérico. Além disso, experimentos de dinâmica molecular em um sistema de membranas estão sendo planejados como futura etapa desse trabalho, já que a porção da proteína que interage com a membrana é bastante próxima do sítio ativo, e isso pode interferir de forma significativa na seleção de moléculas potencialmente bioativas. Essa interação possui um potencial de modelagem de um novo sítio de interação (levando em consideração a membrana, para futuros estudos de *virtual screening*). Essas moléculas também poderão ser testadas *in vitro* em modelos de ferroptose, e em ensaios enzimáticos da atividade da GPX4 para verificar a sua eficácia como inibidores enzimáticos, e se são capazes de induzir morte celular ferroptótica em modelos celulares de indução e prevenção de ferroptose. Além disso, se alguma das moléculas se mostrar muito promissora, poderão se aplicar esforços para modificação de partes da molécula através de estratégias de bioisosterismo.

6. REFERÊNCIAS

1. BERMAN, H.M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T.N.; Weissig, T.H.; Shindyalov, I.N.; Bourne, P.E. **The Protein Data Bank**. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28: 235-242.
2. BERMAN, H.M.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H. **Announcing the worldwide Protein Data Bank**. *Nature Structural Biology*, 2003, 10 (12): 980.
3. BOLOGA, C.G.; URSU, O.; OPREA, T. I. **How to prepare a compound collection prior to virtual screening**. In: LARSON, R.; OPREA, T.I. **Bioinformatics and Drug Discovery, Methods in Molecular Biology**. Vol 1939, Springer Nature, 2019.
4. BOGDANOVIC, A. et al. **Characterization of twelve newly synthesized N-(substituted phenyl)-2-chloroacetamides with QSAR analysis and antimicrobial activity tests**. *Arh Hig Rada Toksikol* 2021, 72, 70-79.
5. BORCHERT A, KALMS J, ROTH SR, et al. **Crystal structure and functional characterization of selenocysteine-containing glutathione peroxidase 4 suggests an alternative mechanism of peroxide reduction**. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2018;1863(9):1095-1107. doi:10.1016/j.bbalip.2018.06.006
6. BURLEY, S. K. et al. **RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences**. *Nucleic Acids Research*, 2021, 49: D437–D451 doi: 10.1093/nar/gkaa1038
7. CHAN, H.C S. et al. **Advancing Drug Discovery via Artificial Intelligence**. *Trends in Pharmacological Sciences*, August 2019, Vol. 40, No. 8 <https://doi.org/10.1016/j.tips.2019.06.004>
8. CLARIVATE. **Cortellis Drug Discovery Database**, 2022. Página inicial. Disponível em: <https://access.cortellis.com/login?app=drugdiscovery&referrer=%2Fdrugdiscovery%2F> Acesso em: 21 de mar. 2022.
9. CAO, Li. et al. **MMP16 is a marker of poor prognosis in gastric cancer promoting proliferation and invasion**. *Oncotarget*. 7, 32, 2016.
10. CUMMINGS, M. D.; ARNOULT, E.; BUYCH, C.; TRESADEN, G.; VOS, A.M.; WEGNER, J.K. **Preparing and Filtering Compound Databases for Virtual and Experimental Screening**. In: SOTRIFFER, C.; **Virtual Screening: Principles, Challenges and Practical Guidelines**. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p35-p59.
11. CUOZZO, A., DAINA, A., PEREZ, MAS., MICHIELIN, O. AND ZOETE, V., **SwissBioisostere 2021: updated structural, bioactivity and physicochemical data delivered by a reshaped web interface**. *Nucleic Acids Research*, Volume 50, Issue D1, 7 January 2022, Pages D1382–D1390, <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1047>.
12. DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. **iLOGP: A Simple, Robust, and Efficient Description of n-Octanol/Water Partition Coefficient for Drug Design Using the GB/SA Approach**. *Journal of Chemical Information and Modeling*. Volume 54, issue 12, 2014, pages 3284-3301. DOI: 10.1021/ci500467k
13. DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. **SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry**

- friendliness of small molecules.** *Science Reports*, 7, 42717 (2017).
<https://doi.org/10.1038/srep42717>
14. DA SILVA, D. L. et al. **Xanthenones: calixarenes-catalysed syntheses, anticancer activity and QSAR studies.** *Org. Biomol. Chem.*, 2015, 13, 3280.
 15. DARDENNE, L. E. **Minicurso Prático de Métodos de Docking Receptor-Ligante e Virtual Screening da X Escola de Modelagem Molecular em Sistemas Biológicos.** *LNCC/MCTI*. 2021
 16. DI, L.; KERNS, E.H.; CARTER, G.T. **Strategies to assess blood-brain barrier penetration.** *Expert Opinion on Drug Discovery*, Volume 3, 2008, Pages 677-687.
 17. DING, Y., CHEN, X., LIU, C., et al. **Identification of a small molecule as inducer of ferroptosis and apoptosis through ubiquitination of GPX4 in triple negative breast cancer cells.** *Journal of Hematology and Oncology*. 2021.
 18. DOLL, S.; Freitas, F.P.; SHAH, R. et al. **FSP1 is a glutathione-independent ferroptosis suppressor.** *Nature* 575, 693–698 (2019).
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1707-0>
 19. DOS SANTOS, K. B.; GUEDES, I. A.; KARL, A. L. M.; DARDENNE, L. **Highly Flexible Ligand Docking: Benchmarking of the DockThor Program on the LEADS-PEP Protein-peptide Dataset,** *J. Chem. Inf. Model.*, Jan. 2020, doi: 10.1021/acs.jcim.9b00905.
 20. EATON, JOHN K. et al. **Selective covalent targeting of GPX4 using masked nitrile-oxide electrophiles.** *Nature Chemical Biology*, [s. l.], v. 16, n. 5, p. 497–506, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0501-5>
 21. EATON JK, RUBERTO RA, KRAMM A, VISWANATHAN VS, SCHREIBER SL. **Diacylfuroxans Are Masked Nitrile Oxides That Inhibit GPX4 Covalently.** *J Am Chem Soc.* 2019;141(51):20407-20415. doi:10.1021/jacs.9b10769
 22. FASSIO, A.; SANTOS, L.H.; SILVEIRA, S.A.; FERREIRA, R.S.; MELO-MINARDI, R.C. **nAPOLI: A Graph-Based Strategy to Detect and Visualize Conserved Protein-Ligand Interactions in Large-Scale.** *IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform.* Jul-Aug 2020;17(4):1317-1328. doi: 10.1109/TCBB.2019.2892099. Epub 2019 Jan 10.
 23. FISCHER, H.; GOTTSCHLICH, R.; SEELIG, A. **Blood-brain barrier permeation: molecular parameters governing passive diffusion.** *The Journal of Membrane Biology*. Volume 165, 1998, Pages 201-211.
 24. FLOHÉ, R. B.; FLOHÉ, L. **Regulatory Phenomena in the glutathione peroxidase superfamily.** *Antioxidants & Redox Signaling*. 2020.
 25. FORLI S, HUEY R, PIQUE ME, SANNER MF, GOODSSELL DS, OLSON AJ. **Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite.** *Nat Protoc.* 2016;11(5):905-919. doi:10.1038/nprot.2016.051
 26. GAO J, YANG F, CHE J, HAN Y, WANG Y, CHEN N, BAK DW, LAI S, XIE X, WEERAPANA E, WANG C. **Selenium-Encoded Isotopic Signature Targeted Profiling.** *ACS Cent Sci.* 2018 Aug 22;4(8):960-970. doi: 10.1021/acscentsci.8b00112. Epub 2018 Jul 16. PMID: 30159393; PMCID: PMC6107865.
 27. GAULTON, A. et al. **ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery.** *Nucleic Acids Research*, 2012, Vol. 40, Database issue. doi:10.1093/nar/gkr777

28. GILSON, M. et al. **BindindDB in 2015: A public database for medicinal chemistry, computational chemistry and systems pharmacology.** *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, Database issue. doi: 10.1093/nar/gkv1072
29. GUEDES, I. A.; BARRETO, A. M. S.; MARINHO, D.; KREMPSE, E.; KUENEMANN, M. A.; SPERANDIO, O.; DARDENNE, L. E.; MITEVA, M. A. **New Machine Learning and Physics-Based Scoring Functions for Drug Discovery.** *Sci Rep* 2021a, 11 (1), 3198. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82410-1>.
30. GUEDES, I. A. ET AL. **Drug design and repurposing with DockThor-VS web server focusing on SARS-CoV-2 therapeutic targets and their non-synonym variants.** *Sci Rep* 11, 5543 (2021b).
31. GUTERRES, H. et al. **Ligand Binding Site Refinement to Generate Reliable Holo Protein Structure Conformations from Apo Structures.** *J Chem Inf Model*. 2021 January 25; 61(1): 535–546. doi:10.1021/acs.jcim.0c01354.
32. HA, S.N.; HOCHMAN, J.; SHERIDAN, R.P. **Mini review on molecular modeling of P-glycoprotein (Pgp).** *Current Topics in Medicinal Chemistry*. Volume 7, 2007, PAGES 1525-1529.
33. HARRIS, C.R.; MILLMAN, K.J.; VAN DER WALT, S.J. et al. **Array programming with NumPy.** *Nature* 585, 357–362 (2020). DOI: 10.1038/s41586-020-2649-2.
34. HASSANNIA B, WIERNICKI B, INGOLD I, et al. **Nano-targeted induction of dual ferroptotic mechanisms eradicates high-risk neuroblastoma.** *J Clin Invest*. 2018;128(8):3341-3355. doi:10.1172/JCI99032
35. HITCHCOCK, S.A. & PENNINGTON, L.D. **Structure-brain exposure relationships.** *Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 49, 2006, Pages 7559-7583.
36. HUGHES, J.P. et al. **Principles of early drug discovery.** *British Journal of Pharmacology* (2011) 162 1239–1249 DOI:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
37. HUNTER, J. D. **Matplotlib: A 2D Graphics Environment.** *Computing in Science & Engineering*, vol. 9, no. 3, pp. 90-95, May-June 2007, doi: 10.1109/MCSE.2007.55.
38. IBRAHIM TM, BAUER MR, BOECKLER FM. **Applying DEKOIS 2.0 in structure-based virtual screening to probe the impact of preparation procedures and score normalization.** *J Cheminform*. 2015 May 20;7:21. doi: 10.1186/s13321-015-0074-6. PMID: 26034510; PMCID: PMC4450982.
39. INFOCHEM GMBH. **SPRESIWEB.** 2019. Página inicial. Disponível em: <https://www.spresi.com/> Acesso em: 21 de mar. 2022.
40. IRWIN, J.J.; GASKINS, G.; STERLING, T.; MYSINGER, M. M.; KEISER, M. J. **Predicted Biological Activity of Purchasable Chemical Space.** *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2018 58 (1), 148-164 DOI: 10.1021/acs.jcim.7b00316
41. KEISER, M.J.; ROTH, B.L.; ARMBRUSTER, B.N.; ERNSBERGER, P.; IRWIN, J.J.; SHOICHET, B.K. **Relating protein pharmacology by ligand chemistry.** *Nature Biotechnology* Volume 25, issue 2, 2007, 197-206
42. KELDER, J.; GROOTENHUIS, P.D.; BAYADA, D.M.; DELBRESSINE, L.P.; PLOEMEN, J.P. **Polar molecular surface as a dominating determinat for oral absorption and brain penetration of drugs.** *Pharmaceuticals Research*. Volume 16, 1999, Pages 1514-1519.
43. KELLER, T. H. et al. **A practical view of “druggability”.** *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006.

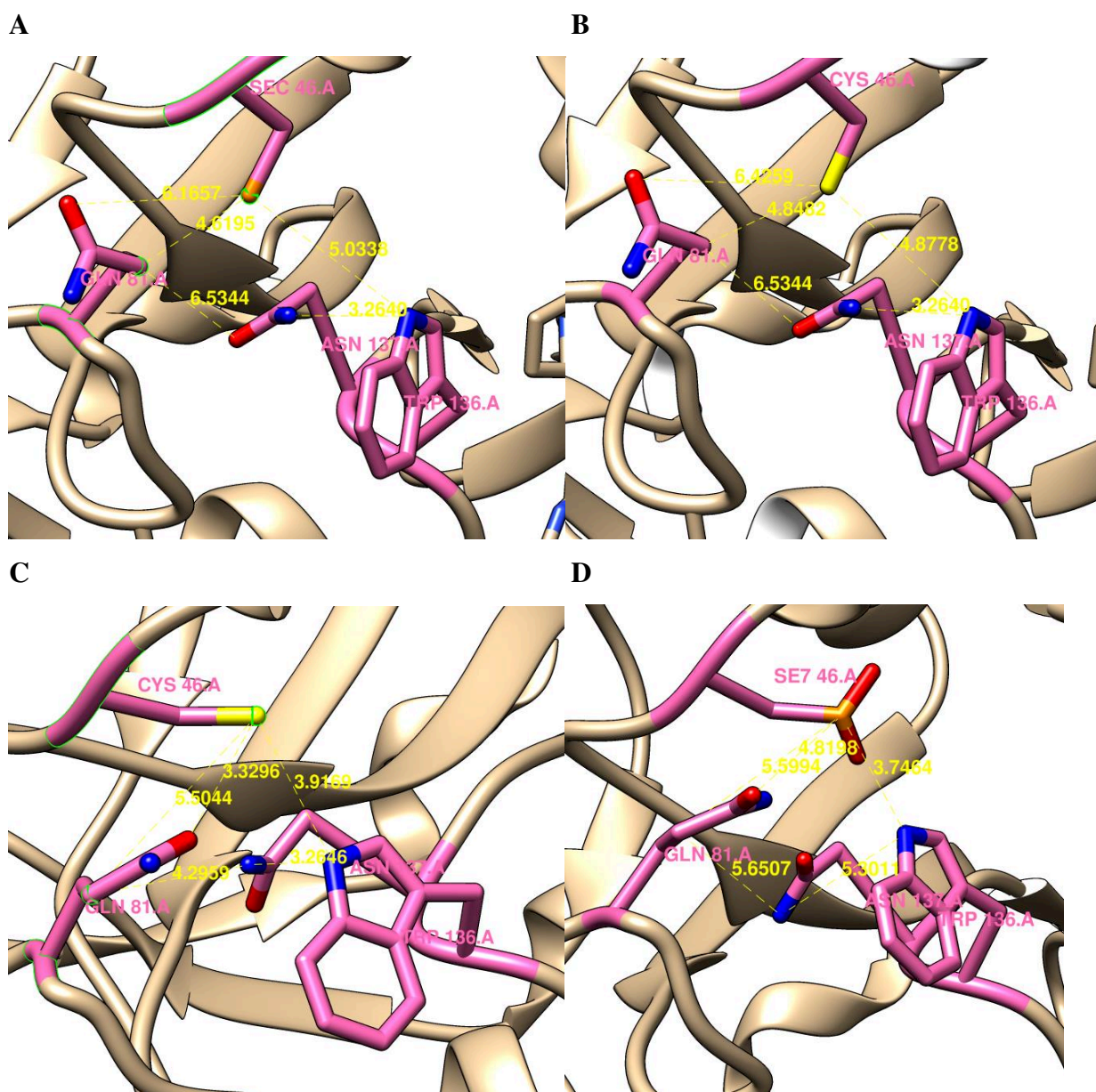
44. KIM, S. et al. **PubChem Substance and Compound databases.** *Nucleic Acids Research*, 2016, Vol. 44, Database issue. doi: 10.1093/nar/gkv951
45. KLEYWEGT, G.J.; JONES, T. A. **Model Building and Refinement Practice.** *Methods in Enzymology*. 277, 208-230 (1997).
46. KONTOYIANNI, M. **Chapter 18: Docking and Virtual Screening in Drug Discovery.** In: IULIA M. LAZAR ET AL. (eds.), **Proteomics for Drug Discovery: Methods and Protocols**, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1647, DOI 10.1007/978-1-4939-7201-2_18, © Springer Science+Business Media LLC 2017
47. LIU, L.; FU, LI.; ZHANG, J.; WEI, H.; YE, W.; DENG, Z.; ZHANG, L.; CHENG, Y.; OUYANG, D.; CAO, Q.; CAO, D. **Three-Level Hepatotoxicity Prediction System Based on Adverse Hepatic Effects.** *Molecular pharmaceutics*, 2018, 16, 393-408.
48. LOBELL, M.; MOLNAR, L.; KESERU, G.M. **Recent Advances in the prediction of blood-brain partitioning from molecular structure.** *Journal of Pharmaceuticals Sciences*. Volume 92, 2003, Pages 360-370.
49. LOMIZE, M. A. et al. **OPM: Orientations of Proteins in Membranes database.** *Bioinformatics*. 2006. Vol 22, 5, 623-625.
50. LOMIZE, M. A. et al. **OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes.** *Nucleic Acids Research*. 2012, 40.
51. MAGALHÃES, C. S.; ALMEIDA, D. M.; BARBOSA, H. J. C.; DARDENNE, L. **A dynamic niching genetic algorithm strategy for docking highly flexible ligands.** *Information Sciences*, vol. 289, pp. 206–224, Dec. 2014, doi: 10.1016/j.ins.2014.08.002.
52. MAHAR DOAN, K.M.; HUMPHREYS, J.E.; WEBSTER, L.O.; WRING, S.A.; SHAMPINE, L.J.; SERABJIT-SINGH, C.J.; ADKISON, K.K; POLLI, J.W. **Passive Permeability and P-Glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Volume 303, 2002, Pages 1029-1037.
53. MAIORINO, M. et al., **Understanding mammalian glutathione peroxidase 7 in the light of its homologs.** *Free Radical Biology and Medicine*. 2015.
54. MANNES AM, SEILER A, BOSELLO V, MAIORINO M, CONRAD M. **Cysteine mutant of mammalian GPX4 rescues cell death induced by disruption of the wild-type selenoenzyme.** *FASEB J*. 2011;25(7):2135-2144. doi:10.1096/fj.10-177147
55. MARKOWETZ F. **All biology is computational biology.** *PLoS Biol* 15(3): e2002050. 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2002050>
56. MAURER, T.S.; DEBARTOLO, D.B.; TESS, D.A.; SCOTT, D.O. **Relationship between exposure and nonspecific binding of thirty-three central nervous system drugs in mice.** *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals*. Volume 33, 2005, Pages 175-181.
57. MCKINNEY, W. **Data Structures for statistical computing in Python.** *Proc. of the 9th Python in Science Conf*. 2010.
58. MOOSMAYER, D., HILPMANN, A., HOFFMANN, J. et al. **Crystal structures of the selenoprotein glutathione peroxidase 4 in its apo form and in complex with the covalently bound inhibitor ML162.** *Acta Crystallogr D Struct Biol*, 2021 Feb 1;77(Pt 2):237-248. doi: 10.1107/S2059798320016125. Epub 2021 Jan 26.

59. MONTANARI, C.A.P.P. São Paulo. Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos. São Paulo: *Edusp*, 2019.
60. MUEGGE, I. et al. **Computer-aided drug design at Boehringer Ingelheim.** *J Comput Aided Mol Des* (2017) 31:275–285 J DOI 10.1007/s10822-016-9975-3
61. NAIME, A. A.; BARBOSA, F. A. R. ; BUENO, D. C.; PEDROSA, R. C.; CANTO, R.F.C.; COLLE, D.; BRAGA, A.L.; FARINA, M. **Prevention of ferroptosis in acute scenarios: an in vitro study with classic and novel anti-ferroptotic compounds.**, *Free Radical Research*, 2022, DOI: 10.1080/10715762.2021.2017912
62. OPREA, T.I.; DAVIS, A.M.; TEAGUE, S.J.; LEESON, P.D. **Is there a difference between leads and drugs? A historical perspective.** *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*. Volume 41, 2001, Pages 1308-1315.
63. OWENS, J. **Determining Druggability.** *Nature Reviews: Drug Discovery*. 2007.
64. PAGADALA, N. S. et al. **Software for molecular docking: a review.** *Biophys Rev* (2017) 9:91–102 DOI 10.1007/s12551-016-0247-1
65. RANDELES, B. M. et al. **Using the Jupyter Notebook as a Tool for Open Science: An Empirical Study.** *2017 ACM/IEEE Joint Conference on Digital Libraries (JCDL)*, 2017, pp. 1-2, doi: 10.1109/JCDL.2017.7991618.
66. REBACK, J. et al. **Pandas-dev/pandas: Pandas.** *Zenodo*. 2020. DOI: 10.5281/zenodo.3715232
67. RICOULT, S. J. H. **Oncogenic PI3K and K-Ras Stimulate de novo lipid synthesis through mTORC1 and SREBP.** *Oncogene*. 2016.
68. ROSE, A.S.; BRADLEY, A.R.; Valasatava, Y.; Duarte, J.M.; Prlić, A.; ROSE, PW. **NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes.** *Bioinformatics*: bty419, 2018. doi:10.1093/bioinformatics/bty419
69. SCHEERER P, BORCHERT A, KRAUSS N, ET AL. **Structural basis for catalytic activity and enzyme polymerization of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase-4 (GPX4).** *Biochemistry*. 2007;46(31):9041-9049. doi:10.1021/bi700840d
70. SHIMADA, K., SKOUTA, R., KAPLAN, A. *et al.* **Global survey of cell death mechanisms reveals metabolic regulation of ferroptosis.** *Nat Chem Biol* **12**, 497–503 (2016). <https://doi.org/10.1038/nchembio.2079>
71. SOTRIFFER, C. **Virtual Screening.** *WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA*, Weinheim, 2011. ISBN: 978-3-527-32636-5
72. STERLING, T.; IRWIN, J. **ZINC 15 – Ligand Discovery for Everyone.** *J. Chem. Inf. Model*. 2015, 55, 2324–2337. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00559
73. STIERAND, K., MAAB, P., RAREY, M. **Molecular Complexes at a Glance: Automated Generation of two-dimensional Complex Diagrams.** *Bioinformatics*, 2006, 22, 1710-1716.
74. SKALIC, M., MARTINEZ-ROSELL, G., JIMENEZ, J. FABRITIIS, G. **PlayMolecule Bindscope: large scale CNN-based virtual screening on the web.** *Bioinformatics*, Volume 35, Issue 7, 01 April 2019, Pages 1237–1238, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty758>
75. STOCKWELL AND JIANG, **The Chemistry and Biology of Ferroptosis,** *Cell Chemical Biology* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2020.03.013>
76. SWINNEY., D.C.; ANTHONY, J. **How were new medicines discovered?** *Nature Reviews Drug Discovery*. V.10 July 2011 doi:10.1038/nrd3480

77. TOPPO, S. et al. **Catalytic mechanisms and specificities of glutathione peroxidases: Variations of a basic scheme.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009.
78. TROTT, O.; OLSON, A. J. **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading.** *J Comput Chem*. 2010 January 30; 31(2): 455–461. doi:10.1002/jcc.21334.
79. VOLKAMER et al. **Combining Global and Local Measures for Structure-Based Druggability Predictions.** *Chem. Inf. Model*. 2012, 52, 360–372 dx.doi.org/10.1021/ci200454v |
80. VUČKOVIĆ AM, BOSELLO TRAVAIN V, BORDIN L, et al. **Inactivation of the glutathione peroxidase GPX4 by the ferroptosis-inducing molecule RSL3 requires the adaptor protein 14-3-3ε.** *FEBS Lett*. 2020;594(4):611-624. doi:10.1002/1873-3468.13631
81. WALLACE A C, LASKOWSKI R A, THORNTON J M (1996). **LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions.** *Protein Eng.*, 8, 127-134. [PubMed id: 7630882]
82. WANG, S.; SUN, H.; LIU, H.; YOUYONG, D. L.; HOU, T. **ADMET evaluation in drug discovery: Predicting hERG blockers by combining multiple pharmacophores and machine learning approaches.** *Molecular Pharmaceutics*, 2016, 13, 2855-2866.
83. WASKOM, M. L. **Seaborn: statistical data visualization.** *The Journal of Open Source Software*. 2021. DOI: 10.21105/joss.03021
84. WEI Y, LV H, SHAIKH AB, et al. **Directly targeting glutathione peroxidase 4 may be more effective than disrupting glutathione on ferroptosis-based cancer therapy.** *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2020;1864(4):129539. doi:10.1016/j.bbagen.2020.129539
85. WEIWER M, BITTKER JA, LEWIS TA, SHIMADA K, YANG WS, MACPHERSON L, DANDAPANI S, PALMER M, STOCKWELL BR, SCHREIBER SL, MUNOZ B. **Development of small-molecule probes that selectively kill cells induced to express mutant RAS.** *Bioorg Med Chem Lett*. 2012 Feb 15;22(4):1822-6. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.09.047. Epub 2011 Sep 28. PMID: 22297109; PMCID: PMC3528973.
86. WIRTH, M.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O.; SAUER, W. H. B. **SwissBioisostere: a database of molecular replacements for ligand design.** *Nucleic Acids Research*, Volume 41, Issue D1, 1 January 2013, Pages D1137–D1143, <https://doi.org/10.1093/nar/gks1059>.
87. WISHART, D. S. et al. **DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018.** *Nucleic Acids Research*, 2018, Vol. 46, Database issue. doi: 10.1093/nar/gkx1037
88. WU, Y. et al. **SAR and QSAR research on tyrosinase inhibitors using machine learning methods.** *Environmental Research*. 2021, 32:2, 85-110.
89. XIAO, W. et al. **Multi-body Interactions in molecular docking program devised with key water molecules in protein binding sites.** *Molecules*. 2018, 23, 2321; doi:10.3390/molecules23092321
90. XIONG, G. et al. **ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties.** *Nucleic Acids Res*, 2021, 49, W5-W14.

91. YANG, W.S.; SRIRAMARATNAM, R.; WELSCH, M.E.; SHIMADA, K.; SKOUTA, R.; VISWANATHAN, V.S.; CHEAH, J.H.; CLEMONS, P.A.; SHAMJI, A.F.; CLISH, C.B.; BROWN, L.M.; GIROTTI, A.W.; CORNISH, V.W.; SCHREIBER, S.L.; STOCKWELL, B.R. **Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4.** *Cell*. 2014 Jan 16;156(1-2):317-331. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.010. PMID: 24439385; PMCID: PMC4076414.
92. YANG WS, STOCKWELL BR. **Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells.** *Chem Biol*. 2008;15(3):234-245. doi:10.1016/j.chembiol.2008.02.010
93. YU, W. & MACKERELL, A. D. **Computer-Aided Drug Design Methods.** *Methods Mol Biol*. 2017 ; 1520: 85–106. doi:10.1007/978-1-4939-6634-9_5.
94. ZHANG, M. et al. **Interaction between RAS gene and lipid metabolism in cancer.** *Journal of Zhejiang University (Medical Sciences)*. 2021. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2021-0054.
95. ZOETE, V. et al. **SwissSimilarity: A Web Tool for Low to Ultra High Throughput Ligand-Based Virtual Screening.** *J. Chem. Inf. Model*. 2016, 56, 1399–1404 DOI: 10.1021/acs.jcim.6b00174
96. ZOU Y, SCHREIBER SL. **Progress in Understanding Ferroptosis and Challenges in Its Targeting for Therapeutic Benefit.** *Cell Chem Biol*. 2020;27(4):463-471. doi:10.1016/j.chembiol.2020.03.015

ANEXO 1 – Figura sobre distâncias entre os resíduos de aminoácidos da tétrede catalítica da GPX4 de estruturas obtidas do PDB.



Anexo 1. Distâncias entre os resíduos de aminoácidos da tétrede catalítica da GPX4, medidos no Software Chimera. A. Estrutura 6HKQ contendo SEC46 no sítio catalítico. B. Estrutura da 6HKQ mutada contendo CYS46 no sítio catalítico. C. Estrutura da 2OBI contendo CYS46 no sítio catalítico. D. Estrutura da 6EWL contendo SEC46 no sítio catalítico.

ANEXO 2 – Tabela de Inibidores conhecidos de GPX4.

	Nome do Composto	PubChem CID	ZINC ID	EC 50 (uM)	Classe química	Tipo de inibição	Sítio de interação	Ref.
1	DPI3	3689415	3034982	0,02	cloroacetamida	irreversível	SA	75,91
2	DPI3	3689415	3034984	0,02	cloroacetamida	irreversível	SA	75,91
3	DPI4	3689416	3034986	0,02	cloroacetamida	irreversível	SA	75
4	DPI4	3689416	3034988	0,02	cloroacetamida	irreversível	SA	75
5	DPI7/ML16 2***	3689413	3034974	0,02	cloroacetamida	irreversível	SA CYS 66	75,91, 85,21
6	DPI7/ML16 2***	3689413	3034976	0,02	cloroacetamida	irreversível	SA CYS 66	75, 79,85, 21
7	JKE-1674	???	???	0,03	diacilfuroxano	Se transforma em JKE-1777 ou JKE-1708	SA	75,20, 21
8	ML210**	49766530	73278737	0,07	nitroisozazol	Se transforma em JKE 1674	SA	75,85, 20,21
9	Isopropyl-ML210 ou DPI10*	15945537	20285409	0,3	nitroisozazol	Se transforma em JKE 1674	SA	75,91, 20
10	DPI17*	932617	18043823	0,08	clorometiltriazina	irreversível	SA	75, 91
11	DPI12*	2416356	103142536	0,1	cloroacetamida	Irreversível	SA	75, 91
12	DPI12	2416356	12487851	0,1	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
13	DPI12	2416356	100255434	0,1	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
14	DPI12	2416356	254557300	0,1	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
15	1S, 3R - RSL3**	1750826	2094071	0,2	cloroacetamida	irreversível	SA	75,91, 20, 21, 92
16	DPI6	4381125	17441041	0,2	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
17	DPI6	4381125	17441042		cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
18	DPI8	4230741	3035299	0,2	cloroacetamida	irreversível	SA	75,91
19	DPI8	4230741	3035301	0,2	cloroacetamida	irreversível	SA	75,91
20	DPI9	12004949	8682987	0,2	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
21	DPI9	12004949	8682988	0,2	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
22	DPI18*	932657	18102979	0,2	clorometiltriazina	irreversível	SA	75,91

23	DPI19*	1637653	1903842	0,2	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
25	DPI15	6545175	4029308	0,4	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
26	DPI15	6545175	5903230	0,4	cloroacetamida	Irreversível	SA	75,91
27	DPI13*	2449454	3333298	0,8	cloroacetamida	irreversível	SA	75,91
28	Withaferina A	265237	64373300	1 a 10	lactona esteróide e epóxido	Irreversível	CYS 107	75,34
29	NSC144988	286532	1728124	1,7	diacilfuroxano	irreversível	SA	75,21
30	NSC144988	286532	142155572	1,7	diacilfuroxano	irreversível	SA	75,21
31	1R, 3R - RSL3 (isômero inativo)	1750827	2094073	10	cloroacetamida	Irreversível	SA	91
32	1R, 3S - RSL3 (isômero inativo)	40911229	9034087	10	cloroacetamida	irreversível	SA	91
33	1S, 3S - RSL3 (isômero inativo)	40911230	9034088	10	cloroacetamida	Irreversível	SA	
34	altretamina	2123	905	250	triazina	Irreversível	SA	75
35	JKE-1777	???	???	???	diacilfuroxano	irreversível	SA	20
36	JKE-1716	???	???	???	diacilfuroxano	irreversível	SA	20
37	JKE-1708	???	???	???	diacilfuroxano	irreversível	SA	20
38	CIL69	818740	333886	3,1	cloroacetamida	#	???	70
39	CIL75	818737	333882	0,44	cloroacetamida	#	???	70
40	CIL79	6545175	4029308	31,62	cloroacetamida	#	???	70

*Compostos testados contra inibição enzimática de GPX4.

**Compostos com maiores evidências na literatura de que são inibidores de GPX4.

***Composto com maior evidência na literatura de que é inibidor de GPX4, pois está co-cristalografado com a proteína.

Ativa como inibidor de TrxR1 também.

SA: Sítio Ativo

CYS : resíduo de aminoácido cisteína

ANEXO 3 – Tabelas de Resultados do *Docking* Flexível

Anexo 3.1 Tabela com resultados do *Docking* Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 desprotonada e S-ml162 e análise de contatos.

Resultado <i>Docking</i> Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 desprotonada e S-ML162								
Pose	Energia (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.	Nº P.H.	A.P.H	Cristal	Nº I.H.	D. C46 - C20
1	-5.9	0	0	0	-	NÃO	28	7.446
2*	-5.6	2.253	3.931	2	O12-N GLY47 O30-N GLU81	SIM NÃO	22	8.403
3*	-5.2	2.761	4.705	1	O12-N GLY47	SIM	22	8.644
4	-5.2	2.993	5.485	0	-	NÃO	29	9.744
5	-5.1	2.783	4.992	2	O12-NE1 TRP136 O30-NE2 GLN45	NÃO NÃO	39	8.131
6*	-5.1	2.045	3.817	2	O12-N GLY47 O22-NE12 GLN81	SIM NÃO	22	5.143
7*	-5.0	2.159	3.738	2	O12-N GLY47 O30-NE12 GLN81	SIM NÃO	26	9.666
8	-4.9	1.952	3.411	1	O12-N LYS48	NÃO	29	8.750
9**	-4.9	2.702	4.721	2	O12-N GLY47 O22-NE1 TRP136	SIM SIM	27	3.671
10	-4.9	1.830	3.874	1	O12-NE1 TRP136	NÃO	25	9.334

NºP.H. Número de ligações de hidrogênio. A.P.H. Átomos envolvidos nas ligações de hidrogênios. NºL.H. Número de interações hidrofóbicas. D.C46-C20 significa distância entre o átomo de enxofre da cisteína 46 e o átomo do carbono 20. * Indicam que as interações presentes no modelo de *docking* são as mesmas do cristal. ** Indica pose utilizada nas análises de *redocking*.

Anexo 3.2. Tabela com resultados do *Docking* Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 protonada e S-ML162 e análise de contatos e distâncias. Mesmas abreviações da tabela anterior.

Resultado <i>Docking</i> Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 protonada e S-ML162								
Pose	Energia (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.	Nº P.H.	A.P.H	Cristal	Nº I.H.	D. C46 - C20
1	-4.9	0	0	1	O12-NE1 TRP136	NÃO	26	9.233
2	-4.8	1.634	2.475	2	O12-ND2 ASN137 O22-N GLY47	NÃO NÃO	27	7.273
3	-4.8	1.509	2.798	1	O22-N LYS48	NÃO	18	6.891
4*	-4.7	1.814	2.878	2	O12-N GLY47 O30-NE2 GLN81	SIM NÃO	28	8.092
5	-4.6	1.915	3.269	1	O30-N GLY47	NÃO	24	9.401
6*	-4.6	2.661	4.423	2	O12-N GLY47 O30-NE2 GLN45	SIM NÃO	22	8.136
7	-4.5	2.246	3.751	1	O22-N GLY47	NÃO	27	5.255

8*	-4.5	2.392	4.117	2	O12-N GLY47 O12-NE2 GLN81	SIM NÃO	30	9.014
9	-4.4	1.794	3.370	1	O12-NE2 GLN81	NÃO	20	7.942
10	-4.3	2.001	2.869	2	O12-N LYS48 CL-NE1 TRP136	NÃO NÃO	28	8.121

Anexo 3.3. Tabela com resultados do *Docking* Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 desprotonada e 1S,3R-RSL3 e análise de contatos e distâncias. Mesmas abreviações da tabela anterior.

Resultado <i>Docking</i> Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 desprotonada e 1S,3R-RSL3								
Pose	Energia (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.	Nº P.H.	A.P.H	Cristal	Nº I.H.	D. C46 - C21
1	-6.6	0	0	2	O5-NE1 TRP136	--	27	8.599
2	-6.4	1.336	1.709	1	N1-ND2 ASN137	--	19	8.765
3	-6.4	2.416	4.361	2	O2-NE2 GLN45	--	28	6.582
4	-6.3	2.598	4.062	1	O1-NE LYS48 N1-NE2 GLN81	--	19	7.749
5	-5.9	2.097	3.418	1	O2-NE2 GLN81	--	16	8.179
6	-5.8	1.872	2.593	1	O1-NE2 GLN45	--	24	8.120
7	-5.7	2.109	4.246	0	-	--	17	7.804
8	-5.6	2.014	3.513	2	O1-N LYS48 O2-NE LYS48	--	29	6.857
9	-5.2	2.159	3.813	2	O3-NE2 GLN81 O5-N GLY47	--	22	3.935
10	-5.1	2.357	4.495	1	O4-NE2 GLN81	--	26	7.252

Anexo 3.4. Tabela com resultados do *Docking* Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 protonada e 1S,3R-RSL3 e análise de contatos e distâncias. Mesmas abreviações da tabela anterior.

Resultado <i>Docking</i> Flexível no AutoDock Vina entre GPX4 C46 protonada e 1S,3R-RSL3								
Pose	Energia (kcal/mol)	RMSD l.b.	RMSD u.b.	Nº P.H.	A.P.H	Cristal	Nº I.H.	D. C46 - C21
1	-6.8	0	0	3	N1-ND2 ASN137 O6-NE1 TRP136 O2-NE2 GLN45	--	32	8.890
2	-6.4	2.410	3.907	3	O2-NE2 GLN45 O4-NE2 GLN81 O5-N GLY47	--	23	5.998
3	-6.2	2.316	4.216	1	O4-NE2 GLN81	--	22	8.472
4	-6.2	2.570	4.486	0	--	--	22	6.845
5	-6.1	2.524	3.968	1	O2-N GLY47	--	21	7.231
6	-6.1	1.660	2.146	1	O5-NE1 TRP136	--	26	6.480
7	-6.1	1.755	2.064	0	--	--	23	8.866

8	-6.1	1.286	1.623	2	N1-ND2 ASN137 O5-NE1 TRP136	--	30	8.603
9	-5.8	2.187	3.790	3	O4-ND2 ASN137 O3-ND2 ASN137 O5-N GLY47	--	20	4.585