



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA**



WANESSA MELO DE LIMA

**INTERAÇÃO MOLECULAR DA NITAZOXANIDA POR
MEIO DE UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA**

OURO PRETO

2019

WANESSA MELO DE LIMA

INTERAÇÃO MOLECULAR DA NITAZOXANIDA POR MEIO DE UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade

OURO PRETO

2019

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

L732i Lima, Wanessa Melo de .

Interação molecular da nitazoxanida por meio de uma abordagem proteômica.
[manuscrito] / Wanessa Melo de Lima. - 2019.
93 f.

Orientador: Prof. Dr. Milton Hercules Guerra de Andrade.
Monografia (Bacharelado). Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de
Farmácia. Graduação em Farmácia .

1. Câncer . 2. Fármacos. 3. Enzimas. I. Andrade, Milton Hercules Guerra de. II.
Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU 615.3

Bibliotecário(a) Responsável: Soraya Fernanda Ferreira e Souza - SIAPE: 1.763.787

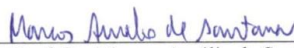


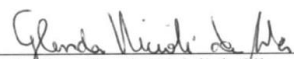
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Escola de Farmácia

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 480ª MONOGRAFIA DO CURSO DE FARMÁCIA DA ESCOLA DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO. Aos 12 dias do mês de dezembro de dois mil e dezanove, quinta-feira, realizou-se, a partir das 15 horas e 20 minutos, no auditório da Escola de Farmácia, no Campus Morro do Cruzeiro, a sessão de defesa de monografia do candidato ao grau de Farmacêutico Generalista, **Wanessa Melo de Lima**, matrícula **15.1.2058**, intitulada **“Interação Molecular da Nitazoxanida por meio de uma Abordagem Proteômica”**. A banca examinadora foi constituída pelo Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso, pelo Prof. Dr. Marcos Aurélio de Santana e pelo orientador Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade. De acordo com o regulamento do Curso, o orientador, presidente da banca, abriu a sessão, passando a palavra ao candidato, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva defesa do candidato. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença do candidato e do público, tendo deliberado pela sua aprovação, com a NOTA 10. Comunicou-se ao candidato que essa nota somente será liberada para a PROGRAD, após a entrega do exemplar definitivo de acordo com as normas estabelecidas pelo Sistema de Bibliotecas e Informação (Sisbin), com as devidas correções sugeridas pela banca e com o aval escrito do orientador. Nada mais havendo para constar, a presente ata foi lavrada e após a leitura pública seguirá assinada pelos membros da banca examinadora e pela presidente do colegiado. Ouro Preto, 12 de dezembro de 2019.


Prof. Dr. Milton Hércules Guerra de Andrade


Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso


Prof. Dr. Marcos Aurélio de Santana


Profª. Dra. Glenda Nicoli da Silva
Presidente do Colegiado de Farmácia

AGRADECIMENTOS

Por este trabalho, agradeço primeiramente a Deus, que me sustentou em todos os momentos em que achei que não fosse capaz e me mostrou que sempre existe um caminho de sucesso. Aos meus pais, José Mauro e Aelia, que sempre me apoiaram em todas as decisões e que me proporcionaram todo esse privilégio que é cursar uma Universidade Federal renomada e de qualidade, por nunca me faltarem como alicerces em todas as adversidades e não medirem esforços para tal. À minha irmã, Walkíria, por acreditar no meu potencial em todos os momentos e por toda a alegria que ela e seus filhos, Gustavo e Arthur, me propiciaram durante esses cinco anos. E a todos os meus familiares que sempre me apoiaram e acreditaram em mim.

Agradeço também à Universidade Federal de Ouro Preto pela possibilidade de cursar Farmácia nesta instituição e poder desfrutar de muitas das oportunidades de ensino que esta tem a oferecer. À Escola de Farmácia pela chance de estudar em uma escola com memória e qualidade. A todos os professores que passou a mim e aos meus colegas sua bagagem de conhecimento técnico e de vida, muitos dos quais levarei como exemplos de exímios profissionais. Aos técnicos e colaboradores desta instituição que corroboram para excelência em ensino.

Ao Professor Doutor Milton Hércules Guerra de Andrade, meu orientador, por todos os ensinamentos, paciência e por me proporcionar a realização deste trabalho. Ao Laboratório de Enzimologia e Proteômica (LEP) por todo o suporte. À Nauhara e Suliana por toda ajuda e disponibilidade no decorrer do trabalho e a todos do LEP que contribuíram de alguma forma com o mesmo.

Agradeço aos amigos que fiz durante a Universidade e que pretendo levar para vida, Juliana, Grazieli, Jonathan, Laura e Isabela, que sempre preencheram os dias mais vazios e me ajudaram em todos os momentos que precisei. E a todos os colegas que de alguma forma contribuíram para meu crescimento e evolução durante este curso.

RESUMO

A Nitazoxanida e o seu metabólito Tizoxanida apresentam ampla atividade antiparasitária sobre protozoários, bactérias e vírus. A falta da elucidação de estudos das interações moleculares entre a NTZ e o organismo de mamíferos deixa uma lacuna sobre possíveis alvos farmacológicos da droga. Os estudos dessas interações contribuem para o esclarecimento de mecanismos de ação sobre alvos farmacológicos e para identificar possíveis novas aplicações e efeitos adversos dos mesmos. Para isso, neste trabalho, foi realizado um estudo de interações da NTZ com proteínas de mamíferos, por meio de modelagem molecular. Dentre as proteínas identificadas previamente pelo nosso grupo de trabalho, estão as sulfotransferases, responsáveis pela sulfonação de compostos endógenos e xenobióticos, estão entre as proteínas identificadas. Os resultados obtidos mostraram que a NTZ se liga a três isoformas da sulfotransferase, SULT1A1, SULT1B1 e SULT1C1. As sulfotransferases, particularmente SULT1A1, estão super expressas em alguns tipos de câncer, como colorretal e gástrico. E estudos apontam que essa desregulação da expressão pode levar ao aumento do crescimento celular e angiogênese, contribuindo para o desenvolvimento do tumor. Além de levar ao desequilíbrio de substratos como os estrogênios, podendo exacerbar ainda mais a susceptibilidade ao câncer. Desta forma, a inibição da enzima se faz uma alternativa ao tratamento da doença. Em virtude disso, foi realizada investigação das características de interações da NTZ com a sulfotransferase e, se o fármaco é um potencial inibidor da enzima por meio de análises de modelagem molecular. A modelagem revelou a inibição da SULT pela NTZ. Essa substância possui constante de inibição da ordem de 10^{-6} M, valor esse coincidente com a concentração de NTZ suficiente para inibir alvos moleculares já elucidados, como a GSTP1. Ademais, a NTZ também possui os mesmos sítios de interação (Fenilalanina 142 e Lisina 106) com a SULT1A1 que o estradiol, e os inibidores, Meclofenamato e Nimesulida, caracterizando uma inibição competitiva.

Palavras-chaves: Nitazoxanida. NTZ. Sulfotransferases. Câncer. Inibição.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACAD/ACOX: Acil Coenzima A desidrogenase

ACETILCoA: Acetil Coenzima A

AINES: Antiinflamatórios Não Esteroidais

ALD: Aldeído Desidrogenase

AKR: Aldocetoreductase

COX: Ciclooxygenase

CYP450: Citocromo P450

GSTP: Glutathione S-Transferase

HSD: Hidroxiesteróides

IC50: Inibição de 50% da atividade enzimática

K_D: Constante de Dissociação

K_{eq}: Constante de Equilíbrio

K_i: Constante de Inibição

NTZ: Nitazoxanida

PAPs: Cofator 3'-fosfoadenosina-5' fosfosulfato

PAP: 3'- Fosfoadenosina- 5'-Fosfato

PDB: Protein Data Bank

PDI: Proteína Dissulfeto Isomerase

SULT: Sulfotransferase

UniProtKB: UniProt Knowledgebas

LISTA DE FIGURAS

Figura

Página

Figura 1: Estrutura Química da Nitazoxanida. Malesuik, 2010.....	6
Figura 2: Descarboxilação oxidativa do piruvato em AcetilCoA e CO ₂ a partir da PFOR, com ferredoxina (Fd) e Flavodoxina (Fld). Hoffman et al., 2007.....	8
Figura 3: Sulfotransferase 1A1 na presença de seu substrato, Estradiol (em azul), do produto do cofator, PAP – 3'-phosphoadenosina 5'-phosphato (em amarelo) e do ligante Nitazoxanida sobreposto (em vermelho). Fonte: Próprio autor.....	15
Figura 4: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular da NTZ com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	16
Figura 5: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular da NTZ com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	16
Figura 6: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular da NTZ com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	17
Figura 7: Sulfotransferase 1A1 na presença de seu substrato, Estradiol (em azul), do produto do cofator, PAP (em amarelo) e do ligante Meclofenamato sobreposto (em vermelho). Fonte: Próprio autor.....	18
Figura 8 : Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	18
Figura 9: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	19
Figura 10: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	20
Figura 11: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	20
Figura 12: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.....	21
Figura 13: Catálise da Sulfotransferase. Modificado. Fonte: UniProtKB.	22
Figura 14: Fluxograma da relação entre Sulfotransferase, Sulfatase no mecanismo de manutenção de tumores.	24
Figura 15: Gráfico Atividade da SULT1A1 X Concentração dos Inibidores, meclofenamato e nimesulida. Modificado (KING; GHOSH; WU, 2006).	25

Figura 16: Gráfico Atividade da SULT1A1 X Concentração dos Inibidores, meclofenamato e nimesulida. Modificado (KING; GHOSH; WU, 2006).	26
Figura 17: Gráfico Atividade da SULT1A1 X Concentração dos Inibidores, meclofenamato e nimesulida. Modificado (KING; GHOSH; WU, 2006).	26

LISTA DE TABELAS

Tabela	Página
Quadro 1: Proteínas ligantes à Nitazoxanida e suas respectivas isoformas.....	14
Quadro 2: Quadro com os valores de Constante de Dissociação (Kd) de Nitazoxanida, Meclofenamato e Nimesulida.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
1.1 Nitazoxanida	6
1.1.1 Farmacocinética	7
1.1.2 Farmacodinâmica	7
2. OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivos Gerais	11
2.2 Objetivos Específicos	11
3. METODOLOGIA	12
4.1 Modelagem Molecular	12
4. RESULTADOS	14
Mobilizada em colunade afinidade.....	14
5.2 Modelagem Molecular	15
5. DISCUSSÃO.....	22
5.1 Sulfotransferases	22
5.2 Inibição da Sulfotransferase.....	23
5.2.1 Inibidores da Sulfotransferase	25
5.2.2 A Nitazoxanida.....	27
6. CONCLUSÃO	31
7. REFERÊNCIAS	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nitazoxanida

A Nitazoxanida (NTZ) é um fármaco antiparasitário de amplo espectro da classe dos tiazolídicos. A NTZ é administrada por via oral e possui boa tolerância quanto aos efeitos gastrointestinais, além de biodisponibilidade efetiva. O fármaco é indicado para o tratamento de gastroenterites virais provocadas por rotavírus, helmintíases, amebíase, giardíases, criptosporidíase, blastocistose, balantidíase e isosporíase (FOX; SARAVOLATZ, 2005; Bula Annita®, 2018).

A NTZ é um nitrotiazolil-salicilamida que se apresenta como pó cristalino levemente amarelado, de nome químico 2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil), forma molecular $C_{12}H_9N_3O_5S$, seu peso molecular é 307,3, Denominação Comum Internacional (DCI) nitazoxanide e Denominação Comum Brasileira (DCB) Nitazoxanida (MALESUIK, 2010).

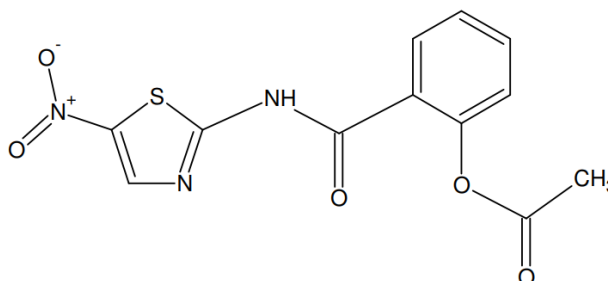


Figura 1: Estrutura Química da Nitazoxanida. Malesuik, 2010.

A NTZ foi desenvolvida em 1975 por Jean François Rossignol no instituto Pasteur como um antiparasitário. Sua comercialização foi iniciada no Brasil em 2006, pelo laboratório Farmoquímica S/A, com nome comercial Annita® (BRAGA et al., 2016; GILLES; HOFFMAN, 2002).

1.1.1 Farmacocinética

A NTZ é bem absorvida no trato gastrointestinal e a partir da sua chegada na circulação sanguínea é rapidamente biotransformada por esterases do plasma em tizoxanida, um derivado desacetilado. Este metabólito ativo possui alto caráter de distribuição, e se liga em cerca de 99% às proteínas plasmáticas, com tempo de meia vida de aproximadamente 1,5 horas decorridos da administração oral do fármaco em questão. A interação fármaco-alimento não é significativa. O metabólito da NTZ é excretado a partir da urina, fezes e bile (FOX; SARAVOLATZ, 2005).

As interações fármaco-fármaco também não são significativas, uma vez que a NTZ não interfere na atuação do citocromo P450 (CYP450), enzima responsável pelo metabolismo da maioria dos medicamentos. No entanto, como o medicamento se liga expressivamente às proteínas plasmáticas podem ocorrer interferências com fármacos que também se ligam a essas proteínas, como por exemplo a Varfarina (Bula Annita®, 2018).

1.1.2 Farmacodinâmica

Estudos evidenciam que a ação antiparasitária da NTZ se dá pela inibição da piruvato ferredoxina oxirredutase (PFOR), uma enzima essencial para o metabolismo de protozoários anaeróbicos, bactérias (*Trichomonas vaginalis*, *Entamoeba histolytica*, *Clostridium perfringens*) e do microaerófilo *Helicobacter pylori*. E, diferente dos demais compostos nitroimidazólicos, a interação desse fármaco com a PFOR não depende de a mesma estar reduzida, garantindo sua eficácia terapêutica. O mecanismo de ação da NTZ contra helmintos ainda não foi esclarecido com exatidão, no entanto acredita-se que as enzimas envolvidas no transporte de elétrons estejam relacionadas com a ação do fármaco (GILLES; HOFFMAN, 2002).

A enzima PFOR é responsável por catalisar a descarboxilação oxidativa do piruvato em acetil coenzima A (acetilCoA) e dióxido de carbono (CO₂), o que garante a potência do fármaco NTZ contra microrganismos anaeróbicos, já que estes dependem da PFOR no catabolismo do piruvato. Tudo indica que a NTZ interrompe a transferência de elétrons à

nível do cofator tiamina pirofosfato (TPP), que apresenta estrutura molecular semelhante ao fármaco (HOFFMAN et al., 2007).

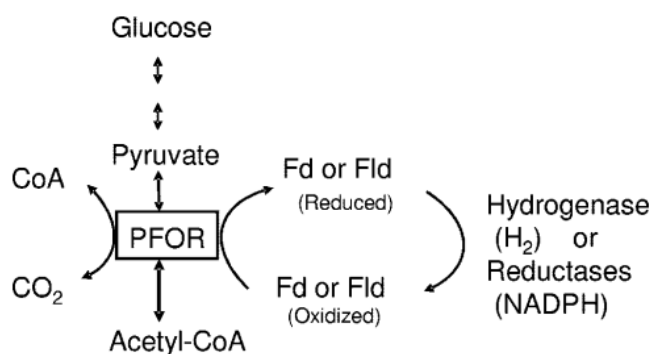


Figura 2: Descarboxilação oxidativa do piruvato em AcetilCoA e CO₂ a partir da PFOR, com ferredoxina (Fd) e Flavodoxina (Fld). Hoffman et al., 2007.

Um estudo demonstrou que a presença da região salicilada na molécula de NTZ é essencial para sua atividade antiparasitária e que a remoção do grupo nitro não prejudica seu espectro de ação (ESPOSITO et al., 2005)(ESPOSITO et al., 2005).

Pesquisas indicam que a NTZ e a tizoxanida agem sobre *Mycobacterium tuberculosis* através de penetração e acúmulo na bactéria causando perturbação do potencial de membrana e da homeostase do pH intra bacteriano (BRAGA et al., 2016; DE CARVALHO et al., 2011; SHIGYO et al., 2013).

Estudos sugerem a ação letal da NTZ sobre protozoários do gênero *Leishmania*, tendo a mitocôndria do parasita como alvo. O possível mecanismo de ação envolve a despolarização da membrana mitocondrial, aumentando assim a produção de espécies reativas de oxigênio seguido de estresse oxidativo e morte celular(BRAGA et al., 2016).

O mecanismo de ação antiviral da NTZ parece estar relacionado com ativação da proteína quinase ativada (PKR) por RNA de cadeia dupla, induzindo a síntese de interferon que medeia a imunidade celular antiviral (BRAGA et al., 2016).

Além disso, a NTZ demonstrou ação na diminuição da replicação do vírus HIV-1 em ensaios *in vitro*, este efeito está relacionado com a regulação negativa dos receptores de HIV-1, CD4 e CCR-5 (BRAGA et al., 2016; GEKONGE; BARDIN; MONTANER, 2014).

Desta forma, fica evidente que é bem conhecido que Nitazoxanida possui amplo espectro de ação contra parasitas intestinais e tissulares, como helmintos, protozoários e enterobactérias que afetam animais e humanos. No entanto, a interação do fármaco com o organismo em que este é administrado não é recorrente na literatura científica (ESPOSITO et al., 2005).

As proteínas são importantes componentes que podem ser usadas como marcadores moleculares em doenças, como no câncer, por exemplo. Isso porque são produtos proteicos dos transcritos de genes que são alterados em algumas patologias do organismo. Portanto, a análise da interação de proteínas que possuam afinidade pela NTZ se torna relevante para o estudo do fármaco (BARBOSA et al., 2012). E nesse sentido, a modelagem molecular entra como ferramenta de estudos entre um ligante e uma proteína, em sua estrutura cristalizada, viabilizando assim, o estudo do remodelamento do fármaco em questão, e aumentando o conhecimento em relação à essas interações e possíveis efeitos colaterais da substância no organismo de mamíferos.

1.2 Modelagem Molecular

A modelagem molecular é um método que analisa a conformação e posicionamento de uma molécula ou ligante em uma macromolécula alvo. O estudo por meio de algoritmos permite a definição de possíveis sítios de ligação na macromolécula em questão e, para tanto, nos últimos anos tem sido desenvolvido vários softwares capazes de realizar essa função (TORRES; SODERO; JOFILY, 2019)

A primeira etapa para realização da modelagem molecular é encontrar o cristal da macromolécula em questão, que muitas vezes são proteínas, em três dimensões. Este cristal pode ser encontrado no Protein Data Bank, que fornece o formato PDB para as posteriores análises. Após determinar o cristal da macromolécula é necessário buscar informações sobre o ligante, em bancos de dados como o ZINC, por exemplo (TORRES; SODERO; JOFILY, 2019).

No caso das proteínas, geralmente, sabe-se o sítio de interação de um ligante já conhecido, seja um substrato ou um inibidor. Esse dado pode direcionar a modelagem molecular do novo ligante em questão (TORRES; SODERO; JOFILY, 2019).

Os softwares de modelagem molecular avaliam as cargas dos ligantes, torções e distribuições de carga para cada átomo que compõe a molécula em questão. Além de avaliar os estados de protonação da macromolécula alvo e seus resíduos de aminoácidos que podem ser críticos para realização de interações com ligantes (TORRES; SODERO; JOFILY, 2019).

Os programas de modelagem molecular, então, permitem determinar os sítios de melhor encaixe de um ligante à uma macromolécula. Podendo ser uma ótima ferramenta desde a descoberta de novos medicamentos até elucidação de novos alvos moleculares. Deste modo, os softwares de modelagem molecular avaliam dois parâmetros, a previsão da conformação do ligante, juntamente com sua posição e orientação dentro da macromolécula em questão e, determinação da afinidade de ligação entre os dois componentes analisados (MENG et al., 2012).

A modelagem molecular se mostra, então, uma ferramenta muito útil na prática do reposicionamento de fármacos. O reposicionamento de fármacos representa uma estratégia de introdução de medicamentos já presentes no mercado para uso em novas abordagens de tratamentos. Esta é uma estratégia que agrega um grande valor na busca de novas terapêuticas, uma vez que a pesquisa por fármacos inovadores demanda longo tempo de estudos, muitos recursos financeiros e grandes riscos de perda desses investimentos, enquanto no reposicionamento, boa parte desses estudos já estão realizados. Além de possibilitar o aperfeiçoamento da molécula para novos usos (FERREIRA, 2014).

Estudos comprovam que o reposicionamento de fármacos pode reduzir significativamente o tempo do estudo até sua inserção no mercado. Isso porque etapas como estudos de otimização da molécula, eficácia, segurança, estudos de absorção, distribuição, eliminação e toxicidade já foram realizados previamente (LI; JONES, 2012).

Vários estudos de reposicionamento de fármacos veem sendo realizados com o intuito de diminuir o tempo de estudos e recursos gastos para se chegar a um fármaco. Alguns exemplos são fármacos destinados ao tratamento de doenças como HIV, câncer, obesidade, fibromialgia, entre outras (LI; JONES, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Identificar proteínas ligantes à Nitazoxanida (NTZ) e avalia-las do ponto de vista da modelagem molecular.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar revisão bibliográfica das proteínas acopladas á NTZ a fim de verificar o papel das mesmas como alvos moleculares;
- Selecionar uma proteína que possa ser utilizada como alvo molecular no tratamento de câncer;
- Realizar estudo de modelagem molecular da proteínas selecionada com a NTZ como ligante;
- Avaliar as interações realizadas entre NTZ e proteína comparando com substrato e inibidores.

3. METODOLOGIA

O trabalho em questão foi realizado no Laboratório de Enzimologia e Proteômica do *Campus* Morro do Cruzeiro da Universidade Federal de Ouro preto (UFOP), coordenado pelo professor doutor Milton Hércules Guerra de Andrade. Foram utilizados os dados da pesquisa de mestrado de Nauhara Castro Barroso, que envolve a pesquisa de proteínas ligantes à NTZ em homogenatos teciduais preparados a partir de fígado, encéfalo, intestino e rins de ratos *Wistar*, identificação destas proteínas por meio de espectrometria de massas e análise da relação entre elas com possíveis alvos farmacológicos da NTZ, que ainda não foram bem elucidados. Esses dados foram utilizados para análise por modelagem molecular em busca do reposicionamento do uso da NTZ.

4.1 Modelagem Molecular

Utilizando os dados das proteínas que interagiram com a Nitazoxanida, realizou-se o estudo das mesmas por pesquisas de artigos científicos em plataformas de busca como PubMed e Scielo, com o intuito de identificar proteínas que caracterizassem possíveis alvos moleculares, ou seja, proteínas ou enzimas que estão modificadas em sua forma ou quantidade normal em determinada doença.

Para realização da modelagem molecular foi utilizado, novamente, o UniProtKB (UniProt Knowledgebase), para pesquisa das proteínas encontradas. Neste banco de dados, que também traz artigos científicos sobre os dados da busca, foram realizadas buscas mais aprofundadas sobre a proteína. Além disso, através do UniProtKB foi determinado o cristal que melhor representa a proteína analisando sua resolução e sua interação com o substrato.

Uma vez determinado o cristal da proteína, e seu código PDB (Protein Data Bank) foi realizada a busca deste código no banco de dados RCSB PDB (Protein Data Bank), que detalha características do cristal e possui a estrutura e interações do substrato com a enzima em questão.

Para análise dos dados da enzima (código PDB do cristal) com os do ligante, que foram obtidos através da busca do nome “Nitazoxanide” no banco de dados ZINC, utilizou-se a

plataforma Swissdock (Swiss Institute of Bioinformatics), enviando o código PDB do cristal da enzima e o número ZINC do ligante. Após algumas horas de análise a plataforma encaminhou um email com os dados para análise.

No programa Chimera 1.13.1 foi realizada a análise da enzima em três dimensões, sobrepondo o ligante com o substrato natural da enzima. Nele, foi verificado também quais as interações realizadas entre o ligante e a proteína, quais aminoácidos eram envolvidos e se a posição do ligante coincidia com o substrato da enzima. As sobreposições realizadas foram salvas em PDB e o arquivo salvo foi usado para análise das interações em duas dimensões no programa Discovery Studio 2019 Client.

Através de análises das proteínas identificadas por Barroso et. al., 2019, as sulfotransferases foram caracterizadas como possíveis alvos moleculares da nitazoxanida para o tratamento do câncer. A partir disso, realizou-se modelagens da enzima sulfotransferase, mais especificamente SULT1A1. O código PDB do cristal da proteína utilizado foi 2D06, no qual a enzima estava naturalmente ligada ao estradiol, e a NTZ foi incluída como ligante. Além disso, comparou-se as interações do fármaco com inibidores já elucidados da enzima, como Meclofenamato e Nimesulida.

Comparou-se os locais de ligação da NTZ com o substrato da enzima, estradiol, e verificou-se se as posições coincidiam ou não. Além disso, o Chimera revela qual o ΔG de ligação a substância tem com a enzima, mostrando se essa interação é favorável ou não. Foi confrontado, também, as posições de interação dos inibidores da sulfotransferase, já elucidados, Meclofenamato e Nimesulida.

4. RESULTADOS

Mobilizada em colunade afinidade

As proteínas do material biológico dos homogenatos teciduais de fígado de ratos *Wistar*, que interagiram em maior proporção com a Nitazoxanida imobilizada em colun de afinidade, detectadas pelo software Xcalibur v.3.0.63.3 e posteriormente buscadas na plataforma UniprotKB foram as seguintes:

Quadro 1: Proteínas ligantes à Nitazoxanida e suas respectivas isoformas.

Proteína	Isoforma
Sulfotransferases	SULT1A1, SULT1B1; SULT1C1
Glutationa S-transferases	GSTP1, GSTA1, GSTA2, GSTA4, GSTA5, GSTK1, GSTT1, GSTZ1, GSTM7, GSTM1, GSTM2, GSTM6
Aldo-cetoreduases	AKR1C14, AKR7A2
Hidroxiesteróides	HSD17B4, HSD17B10
Citocromo P450	CYP2C6V1, CYP2D2, CYP2D3, CYP2D5, CYP2C11,
Aldeído desidrogenase	ALDH1B1, ALDH1L1, ALDH2, ALDH4A1, ALDH9A1
Acil Coenzima A desidrogenase	ACAD11, ACADM, ACADL, ACOX1, ACOX2, ACOX3

5.2 Modelagem Molecular

A modelagem molecular, realizada nos programas Chimera 1.13.1 e Discovery Studio 2019 Client, mostrou que a Nitazoxanida se liga na enzima em um sítio que sobrepõe à ligação enzima-substrato (sulfotransferase-estradiol).

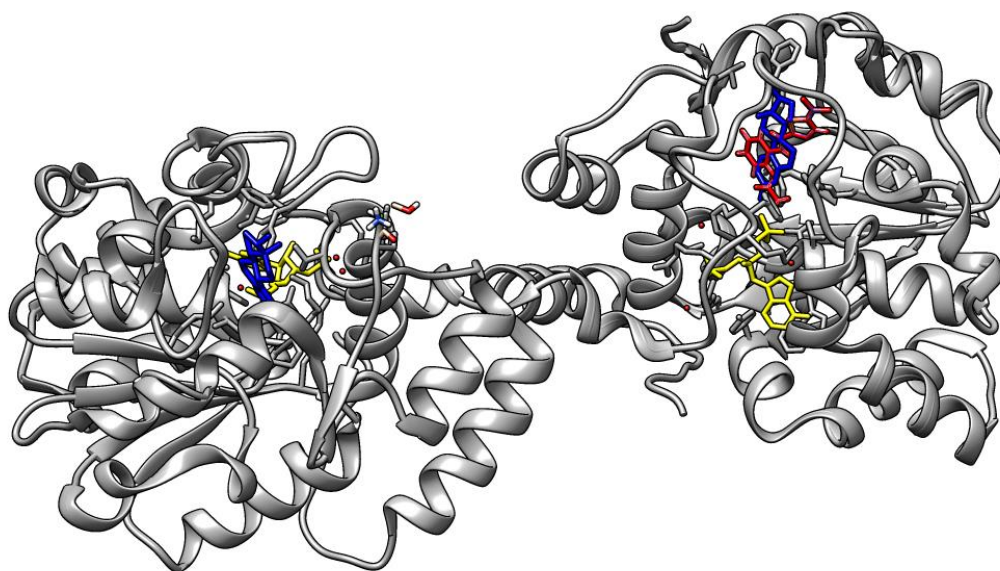


Figura 3: Sulfotransferase 1A1 na presença de seu substrato, Estradiol (em azul), do produto do cofator, PAP – 3'-phosphoadenosina 5'-phosphato (em amarelo) e do ligante Nitazoxanida sobreposto (em vermelho). Fonte: Próprio autor.

A ligação da NTZ com a SULT1A1, cujo código PDB do cristal é 2D06, de acordo com a modelagem molecular, possui ΔG no valor de -7,8 Kcal/mol. E, apresentou interações com resíduos catalíticos da enzima, que são Fenilalanina 142 e Lisina 106, além de interagir com outros resíduos de aminoácidos, como Fenilalanina 76, 81, 84; Metionina 248; Lisina 48 e Histidina 108.

S	Cluster	deltaG	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Atoms
V	0	-7.807702	2	2	2
V	0	-7.8061686	2	2	2
V	0	-7.805858	2	2	2
V	0	-6.9580336	0	0	0
V	0	-6.9579935	0	0	0
V	0	-6.8848166	1	1	1
V	0	-7.253948	2	2	1
V	0	-7.2520013	2	2	1
V	1	-7.099414	1	1	1
V	1	-7.099414	1	1	1
V	1	-7.099414	1	1	1
V	1	-7.099414	1	1	1
V	1	-7.1015015	1	1	1
V	1	-7.1015015	1	1	1

Chimera Model #1.1

Figura 4: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular da NTZ com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.

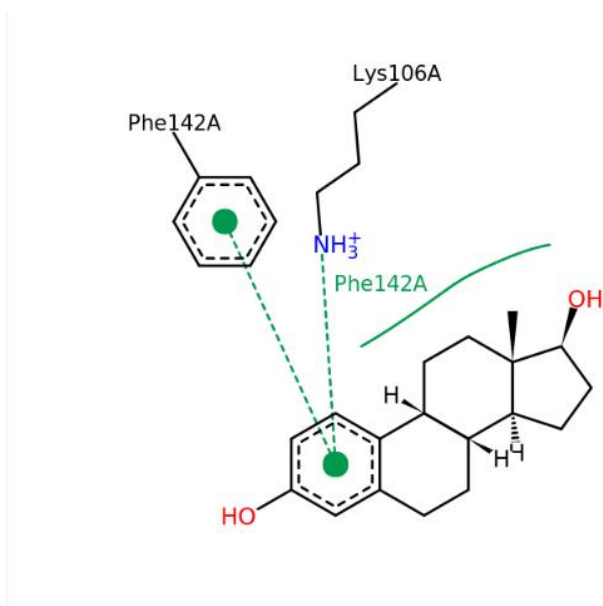


Figura 5: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular da NTZ com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.

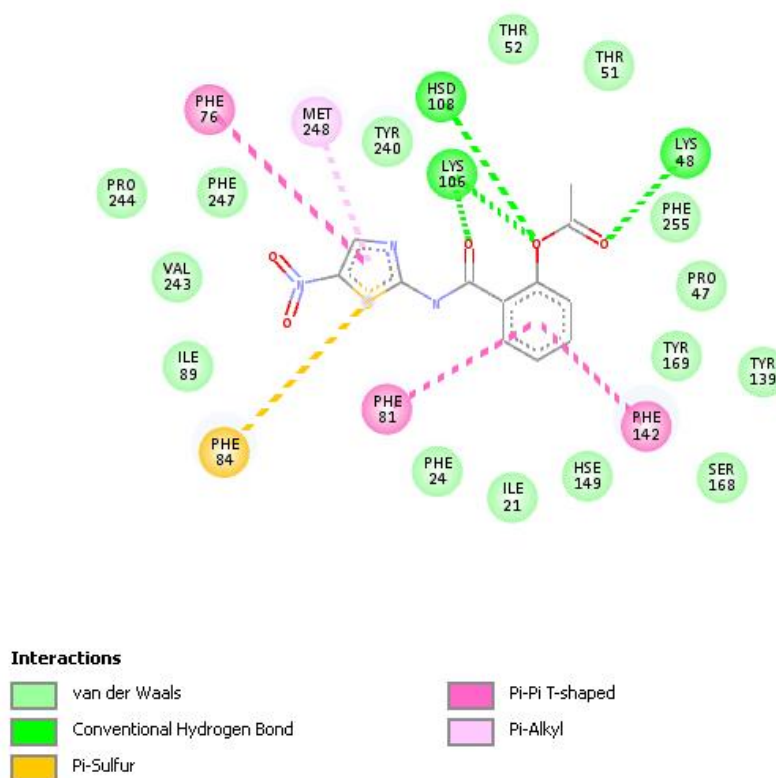


Figura 6: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular da NTZ com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.

Além disso, as comparações com os inibidores Meclofenamato e Nimesulida, cuja inibição da sulfotransferase já foi elucidada em pesquisas, mostraram que estes compostos também se ligam à mesma região que Nitazoxanida, e também possuem interação com os sítios catalíticos Fenilalanina 142 e Lisina 106. O Meclofenamato, de acordo com a modelagem molecular apresentou ΔG de -10,34 Kcal/mol e a Nimesulida de -9,66 Kcal/mol.

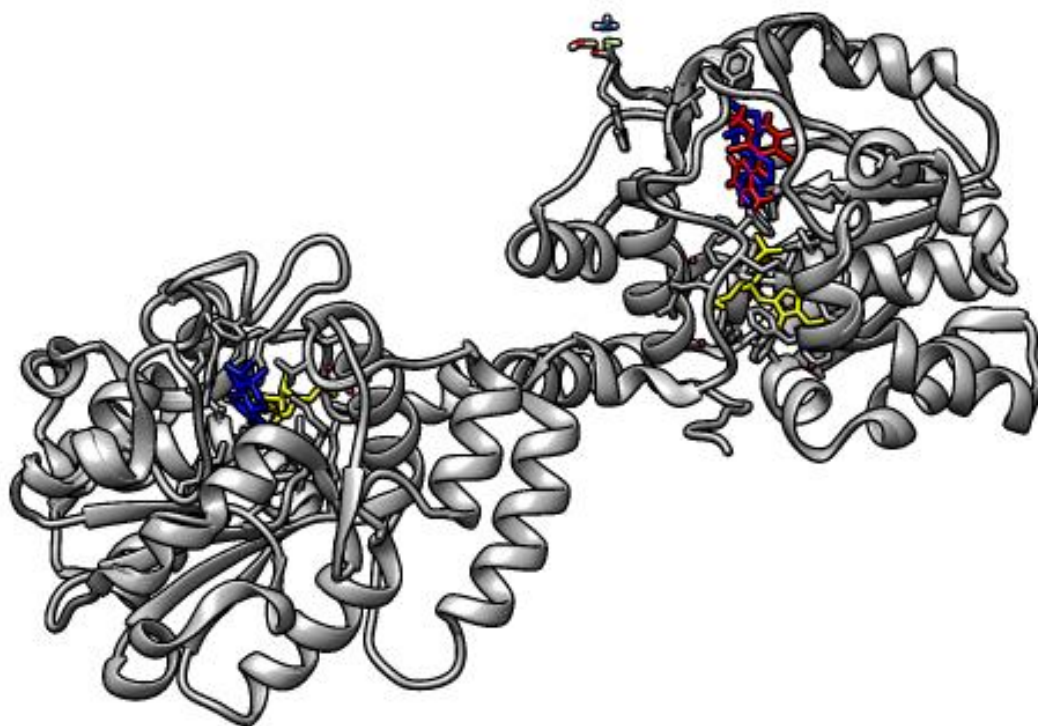


Figura 7: Sulfotransferase 1A1 na presença de seu substrato, Estradiol (em azul), do produto do cofator, PAP (em amarelo) e do ligante Meclofenamato sobreposto (em vermelho). Fonte: Próprio autor.

S	Cluster	deltaG▲	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Atoms
V	0	-10.343983	0	0	0
V	0	-10.334805	1	1	1
V	1	-10.33301	0	0	0
V	1	-10.3231	0	0	0
V	1	-10.322613	0	0	0
V	0	-10.314156	1	1	1
V	1	-10.289833	0	0	0
V	1	-10.289323	0	0	0
V	2	-9.904165	1	1	1
V	2	0.006544	1	1	1

Figura 8: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.

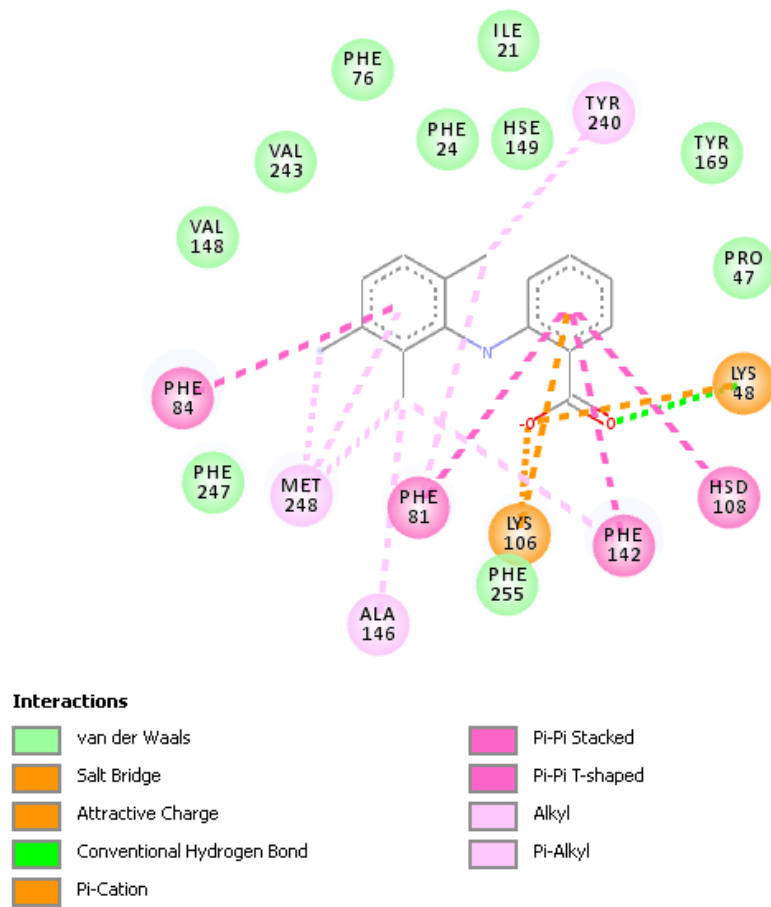


Figura 9: Quadro com os valores de *G* encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SUL1A1. Fonte: Próprio autor.

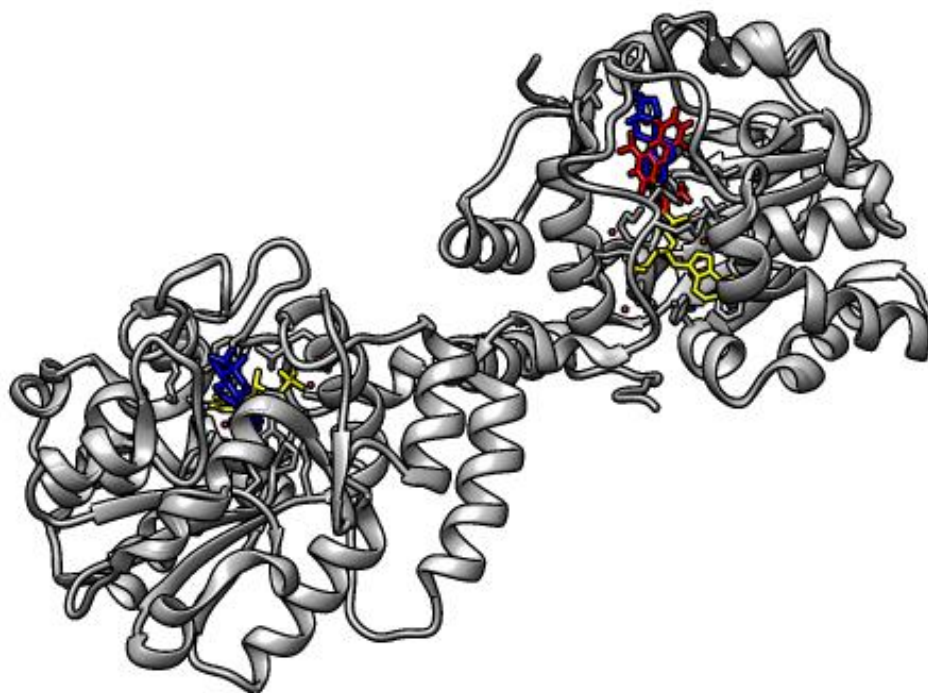


Figura 10: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.

S	Cluster	deltaG▲	HBonds (all)	HBond Ligand Atoms	HBond Receptor Atoms
V	17	-9.667531	2	2	2
V	17	-9.667101	2	2	2
V	17	-9.666596	2	2	2
V	17	-9.661634	2	2	2
V	0	-9.634474	6	4	5
V	20	-9.522343	0	0	0
V	20	-9.476954	1	1	1
V	20	-9.476048	1	1	1
V	20	-9.461653	1	1	1
..

Figura 11: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SULT1A1. Fonte: Próprio autor.

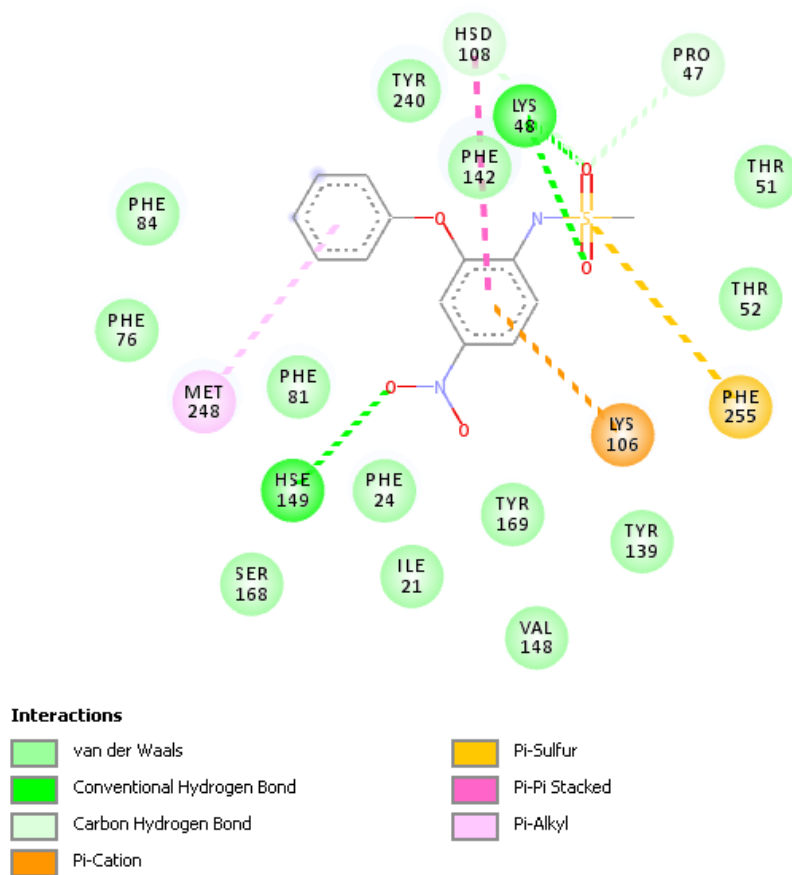


Figura 12: Quadro com os valores de G encontrados na modelagem molecular do Meclofenamato com SUL1A1. Fonte: Próprio autor.

5. DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou que a Nitazoxanida tem a capacidade de se ligar às enzimas da família sulfotransferases. Deste modo, foi possível realizar a análise destas enzimas como prováveis alvos moleculares do fármaco em questão, relacionando o mesmo com uma atividade antitumoral.

5.1 Sulfotransferases

As sulfotransferases (SULTS) são enzimas que pertencem a uma superfamília, classificada em cinco famílias, 1 a 5, de acordo com seu substrato e prevalência em cada espécie. Essas enzimas são responsáveis pela transferência de um grupo polar, sulfonato, através do cofator 3'-fosfoadenosina-5'-fosfosulfato (PAPS) para um substrato hidrofóbico, a fim de facilitar sua excreção e promover a desintoxicação do organismo (HARRIS; WARING, 2008).

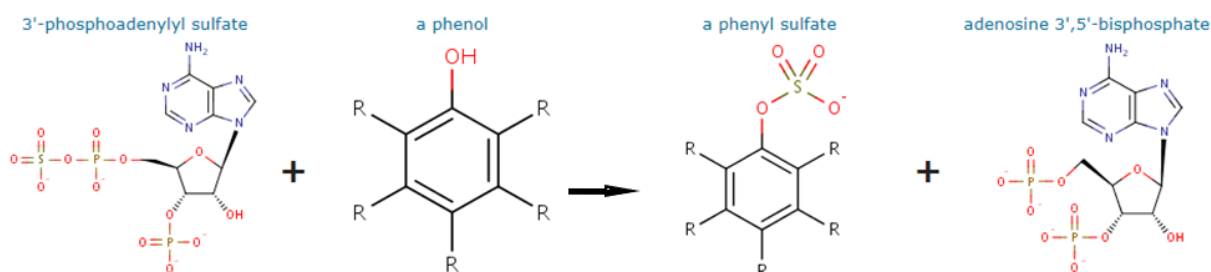


Figura 13: Catálise da Sulfotransferase. Modificado. Fonte: UniProtKB.

As SULTS são importantes na metabolização de hormônios, componentes endógenos e xenobióticos. As isoformas mais importantes para os seres humanos são as da família 1 e 2. A sulfotransferase 1A1, por exemplo, é encontrada em fígado, placenta, cólon, plaquetas e cérebro. Esta, possui uma variedade de substratos que podem sofrer sulfonação através de sua ação, como compostos fenólicos, incluindo drogas, estrogênios, iodotironinas e flavonoides (HARRIS; WARING, 2008).

As sulfotransferases são responsáveis por cerca de um terço do metabolismo de fase II nos seres humanos. O metabolismo de fase II ou conjugação consiste na formação de ligação covalente de um grupo funcional polar com o metabólito em questão. A SULT1A1 é uma das isoformas mais presentes no trato gastrointestinal, principalmente no fígado, portanto possui grande importância da metabolização desses compostos endógenos e xenobióticos (WANG; COOK; LEYH, 2016).

Estudos mostram que a SULT1A1 permite a ligação a duas moléculas de substrato em virtude de uma flexibilidade de sua estrutura cristalina quando ligada a cofator PAPS. Ela possui uma região de interação com o substrato muito hidrofóbica e de característica plástica, explicando sua capacidade de acomodar diferentes tipos de moléculas. Essa enzima possui como sítios catalíticos resíduos de fenilalanina 142 e lisina 106, considerando o estradiol como substrato. Os resíduos catalíticos são importantes parâmetros para definição da interação de uma substância com a enzima (GAMAGE et al., 2003, 2005).

5.2 Inibição da Sulfotransferase

A sulfonação de substratos endógenos e exógenos confere a eles um caráter mais polar e facilita sua excreção via renal. Em contrapartida, pode ocasionar bioativação de xenobióticos potencialmente cancerígenos, como produtos químicos que dependem da sulfonação para gerar espécies adutoras de DNA. Álcoois benzílicos de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são exemplos desses compostos dependentes da sulfonação para gerar essas espécies reativas ao DNA. O trato gastrointestinal está constantemente exposto a compostos químicos com potencial cancerígeno, em virtude disso, a presença de sulfotransferases neste local, pode-se tornar um problema, visto que essas enzimas possuem a capacidade de bioativar essas substâncias através da sulfonação (COUGHTRIE; JOHNSTON, 2001).

Estudos indicam que as sulfotransferases estão super expressas em alguns tipos de câncer, como por exemplo colorretal e câncer gástrico. Li et al (2018), sugere que a super expressão de algumas isoformas das sulfotransferases pode promover a perda de equilíbrio dos estrogênios metabolizados por essas enzimas, o que leva ao aumento da

susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor em questão, além de indicar que o aumento da expressão dessas enzimas pode desencadear em maior crescimento celular e angiogênese no câncer gástrico e no colorretal. Deste modo, a inibição das sulfotransferases pode ser considerada como um potencial tratamento contra esses tipos de câncer.

A expressão desregulada das sulfotransferases em tumores leva a um desequilíbrio entre estas e as sulfatases. As sulfatases são enzimas responsáveis pela retirada de um grupo sulfato de precursores de estrogênios, e deste modo, a regulação desses hormônios depende do equilíbrio entre essas enzimas. A desregulação hormonal está associada ao desenvolvimento e evolução de várias doenças, como o câncer. Alguns estudos veem associando a presença de estrogênios e seus receptores à regulação da apoptose das células, podendo interferir no processo de tumorigênese. E, portanto, em tumores em que as sulfotransferases estão super expressas, justifica-se sua inibição (MIRANDA, 2007).

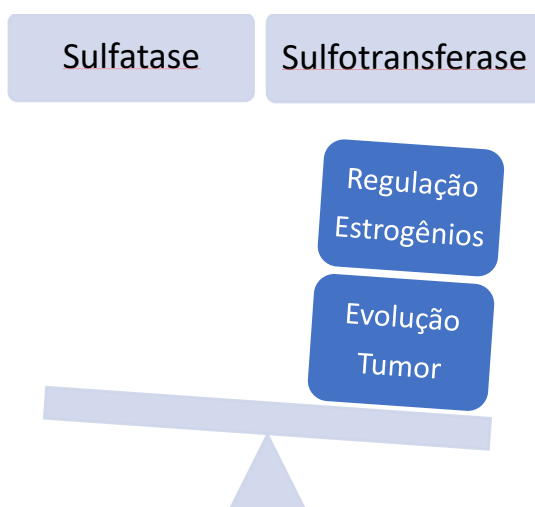


Figura 14: Fluxograma da relação entre Sulfotransferase, Sulfatase no mecanismo de manutenção de tumores.

Além disso, essa super expressão de sulfotransferase pode levar ao aumento da sulfonação de Glicosaminoglicanos (GAG). Os GAG são polissacarídeos lineares que compõem os proteoglicanos. Esses polissacarídeos interagem com variadas moléculas de sinalização, como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e componentes da matriz extracelular. Desta forma, os proteoglicanos são considerados importantes no controle de

processos do ciclo celular como angiogênese e metástases em casos nos quais esse ciclo está desordenado. A sub expressão das sulfatases também interferem na dessulfatação desses GAG, podendo estimular muitos fatores de crescimento, o que consequentemente sinaliza progressão de angiogênese e migração de tumores (XU; TANG; ZHANG, 2019).

5.2.1 Inibidores da Sulfotransferase

Pesquisas demonstram que alguns antiinflamatórios não esteroidais (AINES) possivelmente atuam na redução da carcinogênese através da inibição das sulfotransferases. Alguns dos AINES citados nos estudos como inibidores da SULT são o meclofenamato (ou ácido meclofenâmico) e a nimesulida (VIETRI et al., 2000).

Um outro estudo demonstrou uma maior seletividade do meclofenamato e da nimesulida para SULT1A1. Além de evidenciar que esses ligantes inibem a enzima de forma não competitiva., ou seja, se ligam à um sítio próximo ao do substrato, alterando a conformação da enzima e evitando a catálise. Embora, sugira-se que seja possível a ligação do inibidor e do substrato na enzima ao mesmo tempo (KING; GHOSH; WU, 2006).

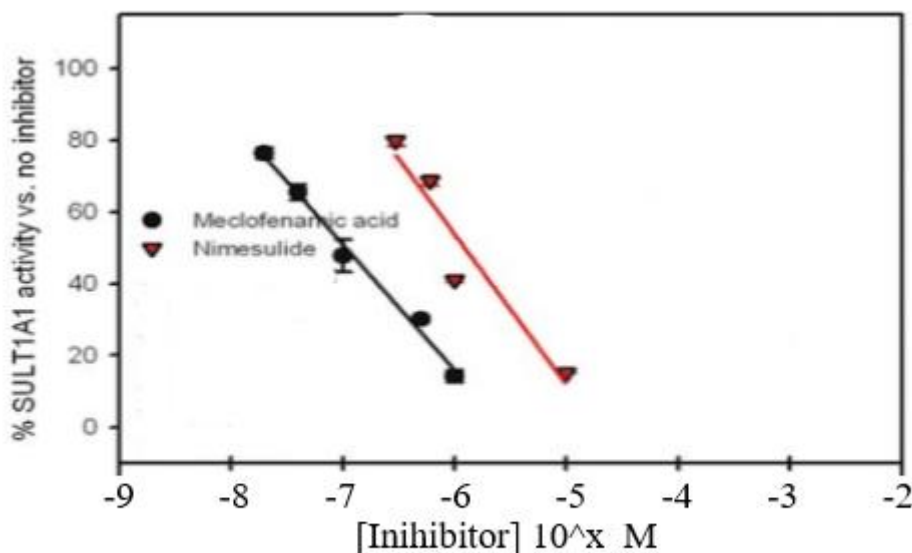


Figura 15: Gráfico Atividade da SULT1A1 X Concentração dos Inibidores, meclofenamato e nimesulida. Modificado (KING; GHOSH; WU, 2006).

Os AINES são antiinflamatórios que agem inibindo as ciclooxigenases (COX), enzimas responsáveis pela formação dos prostanóides, e estes são produzidos excessivamente durante o processo inflamatório, agindo como pró-inflamatórios (GOODMAN; GILMAN, 2012)

O meclofenamato representa um AINE seletivo para COX-1, enquanto a nimesulida não apresenta seletividade. Os dois fármacos possuem meia vida plasmática curta, portanto têm rápida absorção. Em relação à distribuição, geralmente, se ligam às proteínas plasmáticas, e desta forma podem deslocar outros fármacos que também possuem afinidade por essas proteínas. São eliminados, principalmente, por via renal e, para tal, normalmente sofrem reações de conjugação (metabolismo de fase II) (GOODMAN; GILMAN, 2012).

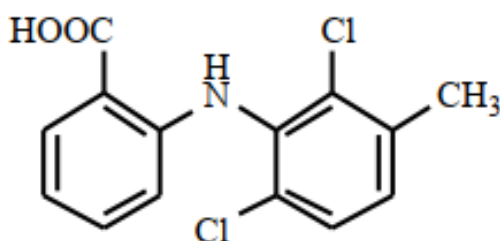


Figura 16: Gráfico Atividade da *SULT1A1* X Concentração dos Inibidores, meclofenamato e nimesulida. Modificado (KING; GHOSH; WU, 2006).

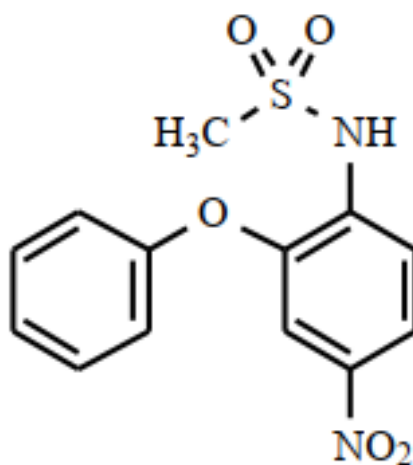


Figura 17: Gráfico Atividade da *SULT1A1* X Concentração dos Inibidores, meclofenamato e nimesulida. Modificado (KING; GHOSH; WU, 2006).

5.2.2 A Nitazoxanida

De acordo com os resultados de modelagem molecular, utilizando a SULT1A1 como base para estudo, já que esta isoforma é a mais expressa em humanos, e o estradiol como substrato da enzima, constatou-se que a NTZ possui interação com os mesmos resíduos catalíticos da enzima com o substrato, que são Lisina 106 e Fenilalanina 142, o que demonstra que o fármaco pode ter alguma ação sobre a enzima (WANG; COOK; LEYH, 2016).

Em comparação com inibidores da sulfotransferase já elucidados em estudos, meclofenamato e nimesulida, a NTZ ocupou o mesmo sítio catalítico. Os três ligantes tiveram interações em comum com os resíduos de aminoácidos Lisina 106, Lisina 48, Fenilalanina 142, Histidina 108 e Metionina 248. O que também sugere uma inibição da sulfotransferase pela Nitazoxanida.

Esses inibidores da sulfotransferases pertencem à classe dos antiinflamatórios não esteroidais. Estudos recentes comprovam a ação desses AINES no tratamento contra o câncer. Essa ação pode ser explicada pela relação da doença com processos inflamatórios. A presença de um tumor no organismo, geralmente leva à inflamações, seja por fatores extrínsecos, como maior susceptibilidade a ação de agentes externos, ou intrínsecos, que é quando a inflamação é desencadeada por oncogenes, por exemplo (ANTUNES et al., 2019).

Pesquisas demonstram que a inibição de enzimas que são super expressas no câncer podem contribuir para o tratamento da doença e evitar o desenvolvimento da mesma, inibindo seu potencial metastático. E neste caso, esses inibidores das sulfotransferases, agem no processo inflamatório inibindo a ciclooxigenase (COX) também. As COX são enzimas responsáveis pela produção de prostanóides, agentes pró-inflamatórios, e elas, da mesma forma que as sulfotransferases, estão expressas em maiores quantidades no desenvolvimento do câncer (ANTUNES et al., 2019)(ANTUNES et al., 2019).

A nimesulida foi apontada em um estudo como detentora de efeito antiproliferativo, promovendo a parada do ciclo celular em linhagens de células de câncer gástrico. Isso ocorre porque o fármaco além da ação inibitória sobre as ciclooxigenases, essa droga tem efeito sobre a expressão de oncogenes como c-Myc e no ciclo celular, interferindo no crescimento das células (PERIASAMY et al., 2013).

Com base nessa atividade da nimesulida, alguns trabalhos veem sendo realizados com o intuito de aprimorar a veiculação do fármaco e consolidar seu uso no tratamento do câncer. Como por exemplo inserir o fármaco em nanocápsulas, a fim aumentar a biodisponibilidade do mesmo. Este mesmo estudo indicou que a associação da nimesulida com fármacos antitumorais como fluorouracil e cisplatina apresentou efeito sinérgico, em ambos os casos, na inibição do crescimento tumoral e indução da apoptose (CATARRO et al., 2019).

As semelhanças das interações da Nitazoxanida, do meclofenamato e da nimesulida com a sulfotransferase da família 1 (SULT1A1), nos sugerem o potencial da NTZ como antitumoral. A inibição da sulfotransferases veem sendo utilizada com o objetivo de reduzir a formação de produtos sulfonados pela SULT, que atuam como agentes genotóxicos e cancerígenos, além de manter o equilíbrio entre sulfotransferases e sulfatases (ISHII et al., 2018).

Em decorrência disso, a Nitazoxanida também vem sendo alvo de pesquisas relacionadas ao seu potencial no tratamento e prevenção do câncer. Em uma pesquisa a NTZ foi apontada como potencial coadjuvante no tratamento de câncer de ovário, através de sua capacidade de inibição da proteína dissulfeto isomerase (PDI), uma enzima envolvida na transferência do grupo dissulfeto às proteínas, facilitando seu dobramento. A PDI é uma enzima que está super expressa no câncer de ovário, motivo pelo qual sua inibição foi benéfica no tratamento da doença (SANTO; EHRISMAN, 2013).

Levando em conta a busca de vários autores por um tratamento alternativo relacionado à inibição dessas enzimas super expressas na presença de certos tumores, a inibição da sulfotransferase pode, então, ser uma abordagem ainda não mencionada em outros estudos, para o tratamento do câncer (SANTO; EHRISMAN, 2013).

As sulfotransferases, mais especificamente SULT1A1, estão presentes em quantidades maiores que o normal em células de linhagem leucêmica, células cancerígenas da mama, em carcinoma hepatocelular e câncer colorretal. E portanto, podem ser usadas como alvos moleculares no tratamento desses tipos de câncer (HUANG et al., 2014).

Em relação à afinidade de ligação da enzima com o fármaco, a partir de análises no programa Chimera, foi possível determinar o ΔG de ligação da Nitazoxanida com a SULT1A1, que foi de -7,80 Kcal/mol, enquanto que a determinação para meclofenamato e nimesulida foram -10,34 e -9,66 Kcal/mol, respectivamente. Os valores de constante de equilíbrio (K_{eq}) encontrados foram para NTZ igual a $5,3 \times 10^{-5}$, para o meclofenamato $4,2 \times 10^{-7}$ e para nimesulida $1,3 \times 10^{-7}$.

Quadro 2: Quadro com os valores de Constante de Dissociação (Kd) de Nitazoxanida, Meclofenamato e Nimesulida.

	Nitazoxanida	Meclofenamato	Nimesulida
K_D (M)	$1,69 \times 10^{-6}$	$0,24 \times 10^{-7}$	$0,76 \times 10^{-7}$

Um inibidor competitivo se liga à enzima e impede que o substrato se ligue ao sítio catalítico. E assim, uma concentração baixa do inibidor, é capaz de deslocar o substrato do sítio ativo. Sabendo disso, foi calculado, por meio de estudos de modelagem molecular, a constante de dissociação da NTZ, meclofenamato e nimesulida. A constante de dissociação calculada da NTZ foi $1,69 \times 10^{-6}$ M, do meclofenamato foi $0,24 \times 10^{-7}$ M e da nimesulida foi $0,76 \times 10^{-7}$ M. Um estudo mostrou que os inibidores meclofenamato e nimesulida revelaram valores consistentes com os dados de IC50, sendo 0,11 μ M e 1,2 μ M, respectivamente (KING; GHOSH; WU, 2006).

A partir desses dados pode-se prever que em concentrações aproximadas de 1 μ M a NTZ se liga à SULT1A1, gerando inibição da enzima. Outros estudos comprovaram essa mesma faixa de concentração da substância como inibidora de diferentes enzimas super expressas no câncer, indispensáveis para a manutenção do tumor. A Glutathione S-Transferase P1, considerada alvo molecular no tratamento de vários tipos de câncer,

está entre essas enzimas inibidas pela NTZ, cuja concentração de inibidor se aproxima dos valores apresentados para sulfotransferase, com ΔG de -7,05 para Tizoxanida que corresponde a um K_D de $3,17 \times 10^{-6}$ M (BARROSO, 2019).

Embora o K_D encontrado para a Nitazoxanida tenha sido maior que os valores encontrados para os inibidores, a concentração na faixa de $1\mu\text{M}$ possui relevância para utilização da substância como inibidor, uma vez que a NTZ possui tempo de meia vida de eliminação curto (aproximadamente 1,5 horas), o que garante a segurança do fármaco em relação à toxicidade em sua utilização como antitumoral. Além disso, a NTZ já possui eficiência como antitumoral, esclarecida em estudos, inibindo enzimas essenciais para o desenvolvimento do câncer, como GSTP1 e Proteína Dissulfeto Isomerase (BARROSO, 2019).

A proximidade dos valores experimentais do estudo citado acima com os valores teóricos obtidos pela modelagem molecular para os inibidores nos confirmam que os parâmetros cinéticos encontrados para Nitazoxanida também devem seguir essa mesma tendência. Em virtude desses resultados e sabendo a importância da busca de novos alvos farmacológicos no tratamento do câncer, a Nitazoxanida se mostrou um fármaco em potencial para o tratamento da doença, uma vez que seus valores de constante de dissociação estão próximos a valores de K_D apresentado na inibição de outras enzimas, como a GSTP1. Considerando, como dito anteriormente, a enzima super expressa em alguns tipos de tumores.

6. CONCLUSÃO

Em suma, as análises deste trabalho demonstraram que a Nitazoxanida se liga a uma ampla gama de proteínas, quando em contato com proteínas do extrato de fígado de ratos *Wistar*, incluindo a enzima de interesse sulfotransferase. A interação que a NTZ faz com a sulfotransferase (SULT1A1) ocorre nos mesmos resíduos de aminoácidos que a interação da enzima com seu substrato, estradiol, que são Lisina 106 e Fenilalanina 142. Além de ocorrer no mesmo local, ou seja, a modelagem molecular sobrepõe o ligante ao substrato.

Ademais, a comparação da interação da NTZ com SULT1A1 e demais fármacos inibidores da enzima, meclofenamato e nimesulida, revelou que as ligações desses fármacos à enzima se estabelecem com os aminoácidos citados acima envolvidos na catálise. E demonstrou ΔG de ligação favorável para que a ligação entre a substância e a enzima aconteça. Para mais, as análises desse trabalho demonstram que as interações ocorrem em elevada afinidade, apresentando constantes de dissociação na ordem de 10^{-6} M, o que significa que é necessária uma baixa concentração do inibidor (NTZ) para deslocar o substrato da enzima.

Assim, os resultados dos estudos de modelagem molecular reforçam as evidências que a Nitazoxanida pode ser uma alternativa como droga inibidora da sulfotransferase, visto que suas interações com a enzima se assemelham a de outros inibidores já elucidados, e portanto, tem potencial para o tratamento de câncer em células que super expressam essa enzima, como é o caso de, células de linhagem leucêmica, câncer colorretal, células cancerígenas da mama e em carcinoma hepatocelular.

7. REFERÊNCIAS

ANNITA: nitazoxanida. Rio de Janeiro: Farmoquímica, 2018. Bula do medicamento. Disponível em http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=12019262018&pIdAnexo=10907523>. Acesso em:28.abr.2019.

ANTUNES, D. M. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs modulate gene expression of inflammatory mediators in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 39, n. 5, p. 2385–2394, 2019.

BARBOSA, E. B. et al. Proteômica: Metodologias e aplicações no estudo em doenças humanas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, p. 366–375, 2012.

BARROSO, Nauhara Vieira de Castro. **ESTUDO DA INTERAÇÃO MOLECULAR DA NITAZOXANIDA POR MEIO DE UMA ABORDAGEM PROTEÔMICA E EFEITOS SOBRE DANOS TECIDUAIS**. 2019. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, [S. l.], 2019.

BRAGA, D. A. DE O. et al. Atividade Antimicrobiana Da Nitazoxanida: Revisão De Literatura. **Encontro de Extensão, Docência e Iniciação Científica**, v. 12, p. 2446–6042, 2016.

CATARRO, M. et al. Bioorganic Chemistry Nimesulide analogues: From anti-inflammatory to antitumor agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 88, n. March, p. 102966, 2019.

COUGHTRIE, M. W. H.; JOHNSTON, L. E. INTERACTIONS BETWEEN DIETARY CHEMICALS AND HUMAN SULFOTRANSFERASES — MOLECULAR MECHANISMS AND CLINICAL SIGNIFICANCE. **DRUG METABOLISM AND DISPOSITION**, v. 29, n. 4, p. 522–528, 2001.

DE CARVALHO, L. P. S. et al. Nitazoxanide disrupts membrane potential and intrabacterial pH homeostasis of Mycobacterium tuberculosis. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 2, n. 11, p. 849–854, 2011.

ESPOSITO, M. et al. In Vitro Efficacies of Nitazoxanide and Other Thiazolides against Neospora caninum Tachyzoites Reveal Antiparasitic Activity Independent of the Nitro Group. **American Society for Microbiology**, v. 49, n. 9, p. 3715–3723, 2005.

FERREIRA, D. D. **Reposicionamento de fármacos e estudo de novas combinações terapêuticas no tratamento etiológico da doença de Chagas TT - Repositioning of drugs and**

study of new therapeutic combinations in the etiological treatment of Chagas disease. [s.l: s.n.].

FOX, L. M.; SARAVOLATZ, L. D. Nitazoxanide: A New Thiazolide Antiparasitic Agent. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 8, p. 1173–1180, 2005.

GAMAGE, N. U. et al. Structure of a Human Carcinogen-converting Enzyme , SULT1A1. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 278, n. 9, p. 7655–7662, 2003.

GAMAGE, N. U. et al. The Structure of Human SULT1A1 Crystallized with Estradiol. **THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY**, v. 280, n. 50, p. 41482–41486, 2005.

GEKONGE, B.; BARDIN, M. C.; MONTANER, L. J. Short Communication: Nitazoxanide Inhibits HIV Viral Replication in Monocyte-Derived Macrophages. **AIDS Research and Human Retroviruses**, v. 31, n. 2, p. 237–241, 2014.

GILLES, H. M.; HOFFMAN, P. S. Treatment of intestinal parasitic infections: A review of nitazoxanide. **Trends in Parasitology**, v. 18, n. 3, p. 95–97, 2002.

GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica.** [s.l: s.n.].

HARRIS, R. M.; WARING, R. H. Sulfotransferase Inhibition: Potential Impact of Diet and Environmental Chemicals on Steroid Metabolism and Drug Detoxification. **Current Drug Metabolism**, v. 9, p. 269–275, 2008.

HOFFMAN, P. S. et al. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 868–876, 2007.

HUANG, X. et al. Expression of sulfotransferase SULT1A1 in cancer cells predicts susceptibility to the novel anticancer agent NSC-743380. **Oncotarget**, v. 6, n. 1, 2014.

ISHII, Y. et al. Effects of inhibition of hepatic sulfotransferase activity on renal genotoxicity induced by lucidin - 3 - O - primeveroside. **Journal of Wiley Applied Toxicology**, v. 3, n. 2018, p. 650–657, 2018.

JAMES, M. O.; AMBADAPADI, S. Interactions of cytosolic sulfotransferases with xenobiotics. **Drug Metabolism Reviews**, v. 45, n. 4, p. 401–414, 2013.

KING, R. S.; GHOSH, A. A.; WU, J. Inhibition of Human Phenol and Estrogen Sulfotransferase by Certain Non-Steroidal Anti-Inflammatory Agents. **Current Drug Metabolism**, v. 7, p. 745–753, 2006.

LI, Y. Y.; JONES, S. J. Drug repositioning for personalized medicine. **Genome Medicine**,

v. 4, n. 3, p. 27, 2012.

MALESUIK, M. D. **Nitazoxadina: Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos e Estudo da Estabilidade**, 2010.

MENG, X.-Y. et al. Molecular Docking: A powerful approach for structure-based drug discovery. **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2012.

MIRANDA, Nadjane Barbosa de Amorim. **Expressão de p53 e receptor de estrogênio em Linfoma de Hodgkin**. 2007. Dissertação (Mestrado em Patologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, [S. l.], 2007.

PERIASAMY, J. et al. Nimesulide and Celecoxib Inhibits Multiple Oncogenic Pathways in Gastric Cancer Cells. **Journal of Cancer Science & Therapy**, v. 5, p. 126–136, 2013.

SANTO, N. DI; EHRISMAN, J. Research Perspective: Potential Role of Nitazoxanide in Ovarian Cancer Treatment. Old Drug, New Purpose? **Cancers**, v. 5, p. 1163–1176, 2013.

SHIGYO, K. et al. Efficacy of Nitazoxanide against Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 6, p. 2834–2837, 2013.

TORRES, P. H. M.; SODERO, A. C. R.; JOFILY, P. Key Topics in Molecular Docking for Drug Design. **International Journal of Molecular Science**, p. 1–29, 2019.

VIETRI, M. et al. Inhibition of human liver phenol sulfotransferase by nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **PHARMACOKINETICS AND DISPOSITION**, v. 56, p. 81–87, 2000.

WANG, T.; COOK, I.; LEYH, T. S. Design and Interpretation of Human Sulfotransferase 1A1 Assays. **DRUG METABOLISM AND DISPOSITION**, v. 44, p. 481–484, 2016.

XU, L.; TANG, L.; ZHANG, L. **Proteoglycans as miscommunication biomarkers for cancer diagnosis**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2019. v. 162

ZHANG, Y.; WU, W.; QU, H. A. O. Integrated Analysis of the Gene Expression Changes During Colorectal Cancer Progression by Bioinformatic Methods. **JOURNAL OF COMPUTATIONAL BIOLOGY**, v. 26, p. 1–9, 2019.