



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

EUDER KACIO SILVA SOUSA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE PIRROLIDINODIONAS NA ATIVIDADE DA
GLUTATIONA S-TRANSFERASE- π E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES
CITOTÓXICAS E FARMACOCINÉTICAS**

Barreiras – BA

2022

EUDER KACIO SILVA SOUSA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE PIRROLIDINODIONAS NA ATIVIDADE DA
GLUTATIONA S-TRANSFERASE- π E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES
CITOTÓXICAS E FARMACOCINÉTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como
requisito parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.

Orientador: Prof.^aDr^aStefânia Neiva Lavorato

Coorientador: Prof. MscWagner Luis da Cruz Almeida.

Barreiras – BA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S725 Sousa, Euder Kacio Silva.

Estudo da influência de pirrolidinodionas na atividade da glutathione S-transferase- π e avaliação de suas propriedades citotóxicas e farmacocinéticas. / Euder Kacio Silva Sousa– 2022.

43f.

Orientador: Prof. Dr^a Stefânia Neiva Lavorato.

TCC (Graduação) – Bacharelado em Farmácia. Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. Barreiras, BA, 2022.

1. Câncer. 2. Antineoplásicos. 3. Glutathione S-transferase. 4. Pirrolidinodionas.
I. Lavorato, Stefânia Neiva. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia - Centro das Ciências Biológicas e da Saúde. III. Título.

CDD 616.04703

Biblioteca Universitária de Barreiras - UFOB

EUDER KACIO SILVA SOUSA

**ESTUDO DA INFLUÊNCIA DE PIRROLIDINODIONAS NA ATIVIDADE DA
GLUTATIONA S-TRANSFERASE- π E AVALIAÇÃO DE SUAS
PROPRIEDADES CITOTÓXICAS E FARMACOCINÉTICAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Universidade Federal do
Oeste da Bahia, como requisito parcial para
obtenção do Diploma de Graduação no
Curso de Farmácia.

Aprovado em 26 de julho de 2022.

BANCA EXAMINADORA:

Stefania Neiva
Laborato:01535224
614

Assinado de forma digital por
Stefania Neiva
Laborato:01535224614
Dados: 2022.10.02 09:51:15 -03'00'

Prof.^a Dr.^a Stefânia Neiva Lavorato
(Orientadora)



Documento assinado digitalmente
WAGNER LUIS DA CRUZ ALMEIDA
Data: 29/07/2022 08:59:36-0300
Verifique em <https://verificador.iti.br>

Prof. MSc. Wagner Luis Da Cruz Almeida
(Coorientador)

Rafael da Conceicao
Simoes:8121987350

Assinado digitalmente por Rafael da Conceicao
Simoes:81219873500
ND: CN=Rafael da Conceicao Simoes:81219873500,
OU=UFOB - Universidade Federal do Oeste da Bahia,
O=ICPEdu, C=BR
Razão: Eu sou o autor deste documento
Localização:
Data: 2022.08.22 11:31:50-03'00'
Foxit PDF Reader Versão: 12.0.1

Prof. Dr. Rafael da Conceição Simões
(Membro)

SAULO FEHELBERG
PINTO
BRAGA:10629839719

Assinado de forma digital por
SAULO FEHELBERG PINTO
BRAGA:10629839719
Dados: 2022.07.29 10:48:12 -03'00'

Prof. Dr. Saulo Fehelberg Pinto Braga
(Membro)

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir chegar até aqui, sempre ouvindo minhas orações e me dar força e sabedoria para enfrentar todos os desafios no caminho, me amparando em todos momentos desse ciclo.

A toda a minha família e por todo o apoio durante toda minha vida acadêmica, não só na graduação, principalmente meus pais João Eudes e Fabiana pelo incentivo, apoio incondicional e todo o suporte financeiro durante todo meu processo de educação.

Ao coorientador Professor Msc. Wagner Luiz Almeida por me iniciar na pesquisa na universidade e pela orientação, pelos ensinamentos e conselhos ao longo da graduação.

A minha orientadora Professora Dr^a Stefânia Neiva Lavorato pela orientação, conselhos e ensinamentos. Pelo acolhimento, paciência e dedicação ao assumir um trabalho já em andamento, norteando da melhor maneira para que possa ser concluído com êxito.

A todos meus amigos que fiz dentro da universidade por todo apoio e conselhos que ajudaram a chegar até aqui e fazer os dias de estudo mais leves e prazerosos.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Diversos trabalhos científicos têm buscado alternativas terapêuticas para o tratamento de neoplasias, principalmente na descoberta de novos compostos capazes de melhorar a relação risco-benefício do tratamento. As pirrolidinodionas são substâncias bioativas que já demonstraram atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral elucidadas, porém nada se conhece sobre o efeito dessa classe química em inibir a atividade da Glutathione S-transferase- π (GST- π). Essa enzima é responsável pela detoxificação e eliminação dos quimioterápicos utilizados na terapia antineoplásica e se encontra superexpressa em alguns tipos de tumores. Dessa forma, substâncias que inibem essa enzima, se usadas de forma adjuvante a tratamentos quimioterápicos poderiam diminuir a resistência dos tumores à ação dos antitumorais. Com este trabalho, objetivou-se identificar, dentre catorze pirrolidinodionas em teste, potenciais inibidores competitivos da GST- π , com baixa toxicidade e propriedades farmacocinéticas adequadas. Estudos *in silico* indicam que todas as pirrolidinodionas em estudo se mostram viáveis em uso por via oral, com biodisponibilidade adequada, e que algumas delas ainda têm capacidade de acesso ao sistema nervoso central, porém baixa afinidade por glicoproteína-P, diminuindo as chances delas de sofrerem efluxo por essa via. A toxicidade *in vitro* dos compostos foi avaliada em modelo de *Artemia salina*, pelo qual se identificou nove compostos com baixa toxicidade pré-clínica. Três desses compostos com baixa toxicidade tiveram sua capacidade inibitória aparente da GST- π determinada, promovendo de 61,98 a 93,33% de inibição na concentração de 0,150 mM. O composto RFMB85 ((3*E*)-3-[(2*E*)-2-metil-3-fenilprop-2-en-1-ilideno]-1-fenilpirrolidino-2,5-diona) foi submetido a um estudo de cinética enzimática, demonstrando-se que ele atua como um inibidor misto, apresentando inibição não competitiva em relação aos substratos 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e inibição mista em relação a glutationa reduzida GSH.

Palavras-chave: Câncer. Antineoplásicos. Glutathione S-transferase. Pirrolidinodionas

ABSTRACT

Several scientific studies have sought therapeutic alternatives for the treatment of neoplasms, mainly in the discovery of new compounds capable of improving the risk/benefit ratio of the treatment. Pyrrolidinediones are bioactive substances that have already demonstrated elucidated antimicrobial, anti-inflammatory and antitumor activity, but nothing is known about the effect of this chemical class in inhibiting the activity of Glutathione S-transferase- π (GST- π). This enzyme is responsible for detoxification and elimination of chemotherapeutic agents used in antineoplastic therapy and is overexpressed in some types of tumors. Thus, substances that inhibit this enzyme, if used as an adjuvant to chemotherapy treatments, could reduce tumor resistance to the action of antitumor agents. With this work, the objective was to identify, among fourteen pyrrolidinediones in test, potential competitive inhibitors of glutathione S-transferase, with low toxicity and adequate pharmacokinetic properties. In silico studies indicate that all pyrrolidinediones under study are viable for oral use, with adequate bioavailability, and that some of them still have access to the central nervous system, but low affinity for P-glycoprotein, reducing their chances of efflux through this route. The in vitro toxicity of the compounds was evaluated in a model of *Artemia salina*, which identified nine compounds with low preclinical toxicity. Three of these compounds with low toxicity had their apparent GST- π inhibitory capacity determined, promoting 61.98 to 93.33% inhibition at a concentration of 0.150 mM. The compound RFMB85 ((3E)-3-[(2E)-2-methyl-3-phenylprop-2-en-1-ylidene]-1-phenylpyrrolidine-2,5-dione) was submitted to an enzyme kinetics study, demonstrating It is believed to act as a mixed inhibitor, showing non-competitive inhibition towards 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) substrates and mixed inhibition towards reduced glutathione (GSH)

Key words: Cancer. Antineoplastics. Glutathione S-transferase. Pyrrolidinodiones.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-LOX	5-Lipoxigenase
BBB	Blood Brain Barrier
CDK	Quinase
CDNB	1-cloro-2,4-dinitrobenzeno
clogP	Coeficiente de partição calculado
COX	Cicloxigenase
COX-2	Cicloxigenase 2
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNP-SG	2,4-dinitrofenil-S-glutationa
CYP450	Citocromo P450
GSH	Glutationa reduzida
GST	Glutationa S-transferase
GS-5NESF	glutationa-5-nitrobenzenosulfonilfluoreto
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LogP	Coeficiente de partição
mGST1	Glutationamicrossomal 1
mGST2	Glutationamicrossomal 2
mGST3	Glutationamicrossomal 3
MlogP	Coeficiente de partição de Moriguchi
NBDHEX	(6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio)hexanol)
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde

SNC Sistema Nervoso Central

UV-Vis Ultravioleta-visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo tridimensional da glutathione S-transferase complexada com seu substrato GSH (PDB ID: GSS).....	19
Figura 2. Possível mecanismo de ação mediado por GST na resistência a drogas anticâncer em células de câncer de pulmão.....	20
Figura 3. Compostos com ação inibitória da GST- π . A: GS-5NESF (glutathione-5-nitrobenzenofulfonylfluorenyl); B: Amitriptilina; C: 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio)hexanol (NBDHEX); D: LAS17.....	22
Figura 4. Estrutura básica de uma 2,5-pirrolidinodiona.....	22
Figura 5. Derivados 2,5-pirrolidinodionas acoplados a sistema dibenzobarreleno com atividade antimicrobiana.....	23
Figura 6. Derivados 2,5-pirrolidinodionas substituídos nas posições 1 e 3 com atividade anti-inflamatória.....	24
Figura 7. Híbridos pirazolina-pirazolidinodionas com ação antitumoral.....	24
Figura 8. Estruturas químicas das 2,5-pirrolidinodionas-1,3-dissubstituídas avaliadas quanto à ação inibitória frente à GST- π	25
Figura 9. Porcentagem de sobrevivência de náuplios de <i>Artemia salina</i> quando expostos às 2,5-pirrolidinodionas em estudo.	33
Figura 10. Percentual de inibição da atividade enzimática da GST pelos compostos RFBM85, RFBM87 e RFBM89.	35
Figura 11. Avaliação de cinética enzimática para GST- π com GSH como substrato de concentração fixa (1 mM) e CDNB como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFBM85. Os dados foram submetidos à regressão segundo a equação de Michaelis-Menten.	37
Figura 12. Avaliação de cinética enzimática para GST- π com GSH como substrato de concentração fixa (1 mM) e CDNB como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFBM85.....	37

Figura 13. Avaliação de cinética enzimática para GST- π com CDNB como substrato de concentração fixa (1 mM) e GSH como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFBM85. Os dados foram submetidos à regressão segundo a equação de Michaelis-Menten.38

Figura 14. Avaliação de cinética enzimática para GST- π com CDNB como substrato de concentração fixa (1 mM) e GSH como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFMB85.....38

LISTA DE SÍMBOLOS

α	alfa
π	pi
μ	mi
ω	ômega
θ	teta
ζ	zeta
%	porcentagem

LISTADE TABELAS

Tabela 1. Dados de previsão de propriedades físico-químicas e estruturais das pirrolidinodinas em estudo.....	30
Tabela 2. Dados de previsão de inibição de isoformas do CYP450, de atuação como substrato da glicoproteína-P e propriedades de permeabilidade à barreira hematoencefálica.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
3 OBJETIVOS	21
3.1 Objetivo geral	21
3.2 Objetivos específicos	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 Materiais e equipamentos	22
4.2 Métodos	22
4.2.1 Previsão <i>in silico</i> de propriedades farmacocinéticas	22
4.2.2 Ensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i>	22
4.2.3 Atividade de inibição enzimática <i>in vitro</i>	23
4.2.4 Estudo de cinética enzimática	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1 Previsão <i>in silico</i> de propriedades farmacocinéticas das pirrolidinodionas	24
5.2 Testes de toxicidade contra <i>Artemia salina</i>	27
5.3 Estudo de inibição da enzima GST- π <i>in vitro</i>	29
5.4 Estudo de cinética enzimática	30
6 CONCLUSÃO	34
REFERÊNCIAS	35

1 INTRODUÇÃO

O tratamento antineoplásico é, em boa parte, realizado com o uso de medicamentos quimioterápicos, com objetivo de combater o crescimento desordenado de células que geram tumores, combatendo sua rápida proliferação, sendo esta a principal característica desse conjunto de doenças denominado câncer (MARTÍNEZ-JIMÉNEZ et al., 2020). Porém, a resistência a quimioterápicos é algo que pode ocorrer em muitos casos, podendo ser intrínseca ao tumor ou adquirida. A ocorrência de resistência adquirida pode se dar por diversas mutações em células tumorais que ativam algumas vias de proteção, com distintos mecanismos, a exemplo de controle de influxo e efluxo do fármaco através de proteínas transportadoras, como a glicoproteína-P, inativação de drogas ou processos para ação da droga (ROCHA, 2015). Um dos mecanismos possíveis é que dentro do meio celular, o fármaco pode passar por processos de detoxificação que o impede de interagir com seu alvo terapêutico. A glutathione em sua forma reduzida (GSH) está entre as substâncias capazes de interagir com um fármaco, normalmente de caráter eletrofílico, ligando-se covalentemente pela ação da enzima glutathione S-transferase (GST), formando um complexo GSH-fármaco (SINGH; REINDL, 2021).

A GST possui em sua estrutura dois sítios de ligação, onde cada um é responsável por reconhecer um tipo diferente de substrato. O sítio G é um local de ligação específico para a GSH, enquanto o sítio H é um bolso hidrofóbico no qual se liga a maior parte dos xenobióticos eletrofílicos (WANG, 2017). Estudos mostram que o silenciamento da isoforma π da GST pode aumentar a susceptibilidade da célula cancerosa a substâncias eletrofílicas. Dessa forma, o uso de substâncias adjuvantes, capazes de inibir essa enzima, pode vir a ser uma alternativa no tratamento de tumores resistentes a esses fármacos (KANWAL, 2014).

Durante o desenvolvimento de novas substâncias candidatas a fármacos diversos parâmetros devem ser analisados a fim de orientar quais compostos sintetizar, visando aqueles que se sairiam melhores em ensaios clínicos. Compostos devem apresentar boa atividade biológica atrelada a baixa toxicidade. Atualmente, é possível prever certas características

farmacocinéticas das substâncias analisando sua estrutura química, visto que esses parâmetros, quando descobertos nas fases iniciais de estudo, diminuem consideravelmente falhas relacionadas às propriedades farmacocinéticas nas fases clínicas (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Sob essa perspectiva, no presente trabalho, foram testados compostos da classe das pirrolidinodionas, classe que já tem demonstrado diversas atividades biológicas, como antimicrobianas, anti-inflamatórias e antitumorais. Quatorze compostos dessa classe tiveram suas propriedades farmacocinéticas, testadas *in silico*, analisando sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Foram realizados testes *in vitro* a fim de avaliar seu perfil de toxicidade frente à *Artemia salina*, teste escolhido devido a sua boa reprodutibilidade e ser bastante difundido na farmacologia, neurologia, ecologia, química, dentre outros (HIROTA et al., 2012). Aqueles com maior destaque nesse teste, seguiram para o teste de inibição enzimática frente à GST- π , com a finalidade de eleger as substâncias com maior potencial de inibição aparente dentre os que apresentaram menor toxicidade. Por fim, selecionou-se um dos compostos ativos para realização de estudo de cinética enzimática para investigar o mecanismo de inibição apresentado por tal composto. As substâncias utilizadas foram selecionadas de um banco de substâncias sintetizadas pelo professor Silvio do Desterro Cunha, do Laboratório de Síntese Orgânica do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

O câncer é um conjunto de doenças que tem como principal característica o crescimento anormal ou inadequado de células, geralmente devido a erros de transcrição na reprodução celular causados por proteínas sinalizadoras levando a mutações genéticas (MARTÍNEZ-JIMÉNEZ et al., 2020). O processo de carcinogênese compreende diversas etapas até uma célula adquirir novas propriedades biológicas, como maior capacidade de proliferação, mecanismos de fuga do envelhecimento celular e apoptose (LEMAIRE et al., 2020). Esse processo decorre de alterações genéticas a nível de ácido desoxirribonucleico (DNA), como mutações pontuais, amplificações, deleções e rearranjos nos genes. Estas alterações, muitas vezes são causadas por falhas espontâneas no sistema de reprodução celular ou exposição contínua a agentes químicos e físicos como a radiação ultravioleta (NARAYANAN; SALADI; FOX, 2010), benzeno (SNYDER, 2012), fuligem (RAASCHOU-NIELSEN et al., 2013), vírus (RINGEHAN, 2017), dentre outros (LEMAIRE et al., 2020).

Para que haja o surgimento de um tumor, uma célula saudável deve burlar diversas barreiras biológicas e mecanismos de controle de crescimento em seu processo de replicação. No processo de divisão celular, existem pontos de controle que garantem a produção de células normais. As etapas do ciclo celular são reguladas por proteínas que indicam se a replicação deve seguir ou não para a próxima etapa, como por exemplo receptores acoplados à proteína G, proteíno-quinases, fatores de transcrição e quinases dependentes de ciclinas (CDK). Cada proteína envolvida no ciclo celular é codificada por um gene diferente e mutações em tais genes levam à desregulação do processo (WARD, 2002). Os proto-oncogenes são responsáveis por estimular e inibir a divisão celular. No entanto, quando há mutação nesses genes, eles se tornam oncogenes e passam a estimular, de forma descontrolada, a produção de proteínas estimuladoras de crescimento, levando conseqüentemente a formação do tumor (LEMAIRE et al., 2020). Existem também proteínas supressoras de tumor que são responsáveis em inibir a replicação celular defeituosa e que, ao sofrerem mutações, podem perder sua função, não impedindo o crescimento celular desenfreado (WARD, 2002).

As mutações que ocorrem nas células variam de cada tipo de câncer, podendo ser algo de 1.000 a 20.000 mutações pontuais somáticas entre deleções, inserções e rearranjos de genes nas células. A quantidade de mutações que as células podem sofrer varia de acordo com o que a desencadeou, sendo maiores quando causadas por agentes mutagênicos externos (MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015).

Neoplasias malignas são reconhecidas dentre as principais causas de morbimortalidade na população mundial, estando entre as quatro principais causas de morte em pessoas com menos de 70 anos de idade em 135 países (SUNG, 2021). Segundo dados da Organização Pan-americana de Saúde (OPAS) e Organização Mundial de Saúde (OMS), o câncer representou uma das principais causas de morte no mundo, responsável por cerca de 9,6 milhões de casos em 2018. Dentre os casos identificados, os mais comuns foram o de pulmão e de mama, com 2,09 milhões de ocorrências cada, ficando em terceiro lugar o câncer colorretal com 1,8 milhão de casos (OMS, 2022). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que em 2020 no Brasil tenham surgido ao total 626.030 novos casos de neoplasias, dos quais 176.940 se tratam de câncer de pele não melanoma. Em homens, o câncer de próstata é o segundo mais comum, com 65.840 novos casos, enquanto, entre as mulheres, o câncer de mama foi o segundo mais comum, com 66.280 novos casos (INCA, 2022).

A farmacoterapia antineoplásica tem se colocado como a principal forma de tratamento de tumores malignos, que em muitos casos, é composta por dois ou mais fármacos com efeitos sinérgicos ou que combinem seus mecanismos de ação visando retardar as mutações celulares e o processo de adaptação do tumor (SILVA; CARLOTTO; ROTTA, 2018). Pelo fato do câncer se tratar de uma doença complexa multifatorial, se faz necessário entender as alterações genômicas, o microambiente celular e a forma como ele pode ser alterado junto com informações pessoais de cada indivíduo, sendo essa uma estratégia terapêutica promissora para o tratamento (MIRANDA FURTADO et al., 2019).

O uso de adjuvantes no tratamento do câncer pode ser uma alternativa para a modulação de biomacromoléculas que não estejam relacionadas diretamente com as células defeituosas, mas com algum outro mecanismo

importante para sua replicação ou defesa perante fármacos, tal como a modulação da expressão e função de enzimas (BRANDÃO DIAS; SOUZA KUDO; GARCIA, 2020).

A glutathione S-transferase (GST) compreende uma família de enzimas que atuam no metabolismo de fase II, responsável pela desintoxicação celular de metabólitos tóxicos endógenos e exógenos e radicais superóxidos (RAZA, 2011). A GST apresenta diferentes isoformas, divididas em duas famílias, citosólicas e microsossomais. As citosólicas se dividem em GST- α , GST- μ , GST- π , GST- ω , GST- θ e GST- ζ , cada uma delas decodificada em cromossomos diferentes. Há também GST microsossomais ligadas a membrana, que possui três isoformas diferentes, mGST1, mGST2 e mGST3, com participação direta no metabolismo de eicosanóides e da glutathione (TEW et al, 2011). Dentre os vários tipos de GST, todas possuem um sítio G de ligação específico para a GSH e um bolso de ligação hidrofóbico menos semelhante, o sítio H, o qual reconhece xenobióticos de característica eletrofílica (**Figura 1**) (WANG et al., 2017).

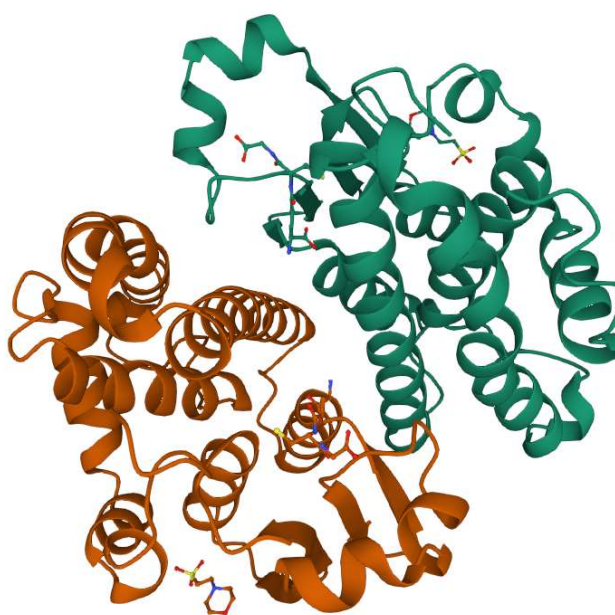


Figura 1. Modelo tridimensional da glutathione S-transferase complexada com seu substrato GSH (PBD ID: 6GSS).

A GST já foi encontrada em concentrações aumentadas em células cancerígenas, contribuindo para a resistência a medicamentos antineoplásicos,

como em células de melanoma (BALYAN et al., 2015) e pulmão (WANG et al., 2011). Na **Figura 2** é mostrado um possível mecanismo de ação da GST em células de câncer de pulmão. Mais especificamente, a isoforma π da GST já foi encontrada em diferentes tumores com resistência à quimioterapia, catalisando a reação com seu substrato GSH, na ligação a espécies químicas responsáveis por iniciar a apoptose celular (DONG, 2018). Foi observado que a superexpressão da GST- π está diretamente associada à progressão do tumor e sua capacidade de resistência a fármacos. Essa superexpressão também está correlacionada com tumores em estágios avançados, agressividade da doença e baixa taxa de sobrevivência. No entanto, o controle precoce da expressão da GST- π pode resultar em um aumento da susceptibilidade ao câncer (KANWAL et al., 2014).

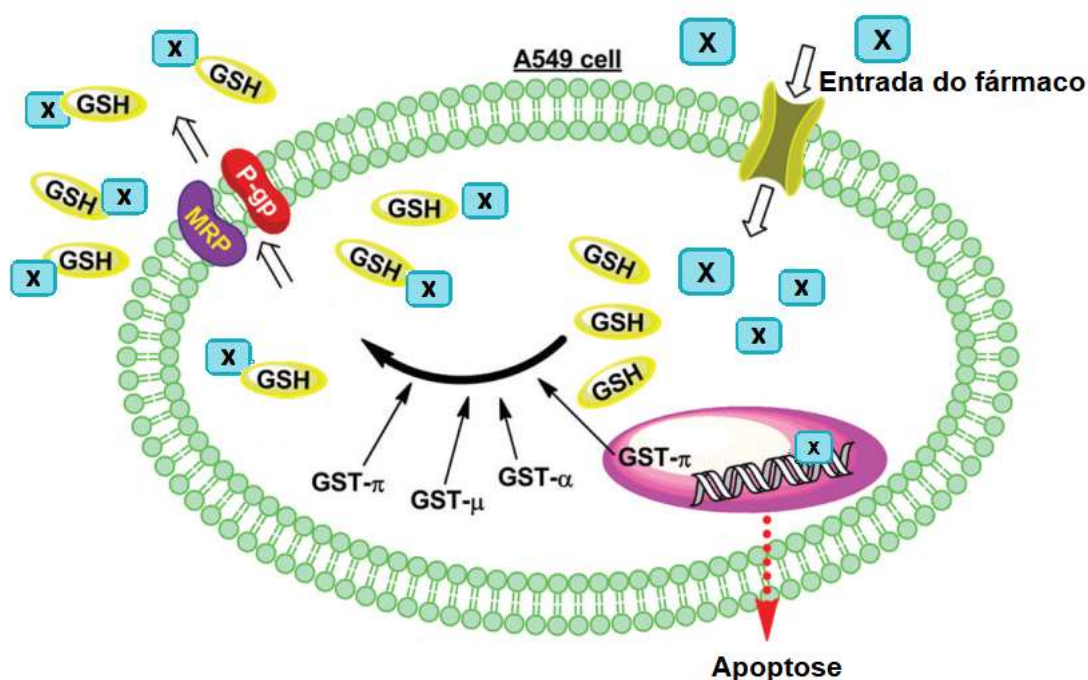


Figura 2. Possível mecanismo de ação mediado pela GST na resistência a agentes antitumorais em células de câncer de pulmão (Adaptado de WANG, 2011).

A inibição da GST é uma proposta para superar a resistência das neoplasias aos medicamentos e tem se pesquisado por inibidores de tal enzima,

na intenção de desenvolvê-los como adjuvantes no tratamento do câncer como sensibilizadores à quimioterapia (WANG et al., 2017).

O desenvolvimento de inibidores para enzimas no geral pode ser feito com base em seus substratos naturais e sítios de ligação. O sítio G da GST aceita apenas como substrato a própria glutatona, sendo utilizada sua própria estrutura para se desenvolver inibidores competitivos em sua grande maioria, que se liguem a esse sítio (SINGH; REINDL, 2021). O composto GS-5NESF (glutathione-5-nitrobenzenesulfonilfluoreto) (**Figura 3-A**) foi desenvolvido como um potencial inibidor do sítio G baseado na estrutura da GSH, contendo uma cadeia aromática substituindo o grupo sulfidrila da GSH, que se mostrou capaz de inibir irreversivelmente a GST- π . Os ensaios foram realizados em culturas celulares de adenocarcinoma pulmonar, para as quais foi observado uma inibição prolongada da GST (SHISHIDO et al., 2019).

Já foi demonstrado também que a amitriptilina (**Figura 3-B**) apresentava atividade na inibição da GST- π 1 e GST- α 1, ao se ligar no sítio G (KULAKSIZ-ERKMEN et al., 2013).

Por sua vez, o sítio H da GST- π pode ser ocupado por uma grande variedade de substratos, tornando difícil o desenvolvimento de inibidores específicos (SIGNH, 2021). Turella e colaboradores (2006) desenvolveram um composto nomeado de NBDHEX (6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio)hexanol) (**Figura 3-C**), que se mostrou eficaz ao inibir GST- π e GST- μ , interagindo-se com cadeias aromáticas de resíduos de tirosina do sítio H.

Crawford e colaboradores (2016) propuseram a síntese de um composto denominado de LAS17 (**Figura 3-D**), que foi capaz de reconhecer especificamente um resíduo de tirosina (TYR108) do sítio H da GST- π , agindo como um inibidor irreversível e seletivo para esta enzima.

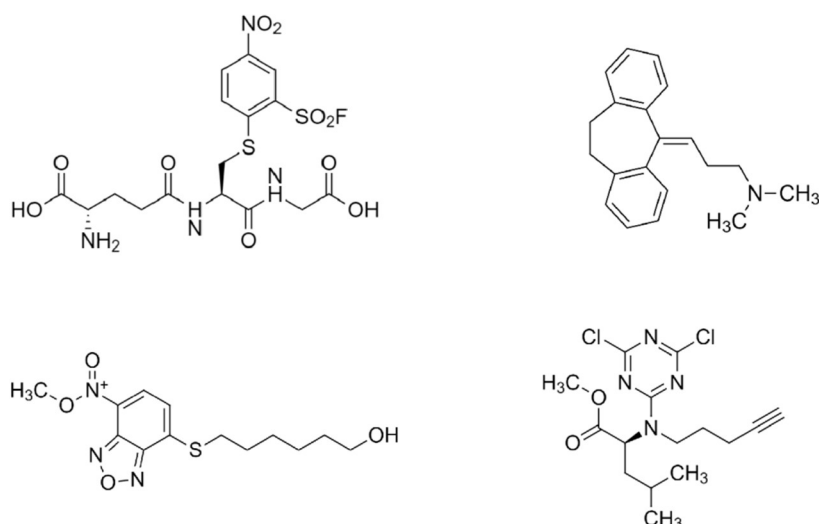


Figura 3. Compostos com ação inibitória da GST- π . A: GS-5NESF (glutathiona-5-nitrobenzenofulfonylfluoreno); B: Amitriptilina; C: 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-iltio)hexanol (NBDHEX); D: LAS17.

Diversas classes de compostos ainda não tiveram suas capacidades inibitórias testadas frente a GST- π , dentre elas estão as 2,5-pirrolidinodionas, uma classe de compostos com diversas propriedades biológicas. Se caracterizam pela presença de um sistema heterocíclico nitrogenado de cinco ligações contendo uma imida cíclica, sendo por isso conhecidas também como derivados de succinimida (**Figura 4**). Têm apresentado boa versatilidade como compostos bioativos voltados à química medicinal, incluindo entre as propriedades biológicas já demonstradas capacidade antimicrobiana (SOPBUÉ FONDJO et al., 2022), anti-inflamatória (JAN et al., 2020) e antitumoral (TILEKAR, 2020).

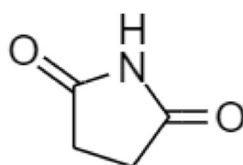


Figura 4. Estrutura básica de uma 2,5-pirrolidinodiona.

Foram sintetizados compostos derivados de 2,5-pirrolidinodionas integrados a um sistema dibenzobarreleno, os quais foram testados quanto a suas propriedades antimicrobianas frente a cepas de diversos microrganismos. Os dois compostos com atividades de destaque nos estudos, cujas estruturas são mostradas na **Figura 5**, apresentaram atividade antimicrobiana de moderada a baixa contra cepas de *Vibrio cholerae* e *Staphylococcus aureus*. O composto identificado como A na **Figura 5** demonstrou melhor atividade bactericida contra *S. aureus*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*, enquanto o composto identificado como B apresentou melhor atividade contra duas cepas de *V. cholerae* e *S. aureus*, além de marcante atividade fungicida frente a *Candida neoformans* e *Candida tropicalis* (SOPBUÉ FONDJO et al., 2022).

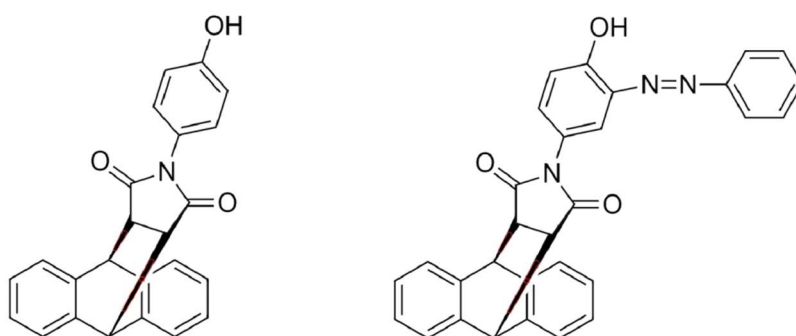


Figura 5. Derivados 2,5-pirrolidinodionas acoplados a sistema dibenzobarreleno com atividade antimicrobiana. (SOPBUÉ FONDJO et al., 2022).

Derivados 2,5-pirrolidinodionas substituídos nas posições 1 e 3 (**Figura 6**) demonstraram boa atividade na modulação da resposta inflamatória, analisada frente às enzimas cicloxigenase (COX) e lipoxigenase humana (5-LOX). Em ensaios *in vitro*, os compostos identificados como A, B e D na **Figura 6** apresentaram maior seletividade na inibição da COX-2. Quando testados frente a 5-LOX, os derivados identificados como C e D na **Figura 6** demonstraram excelente inibição desta enzima. Na análise *in vivo*, avaliando-se ação frente a edema de pata em camundongos, os compostos B e D mostraram um bom potencial anti-inflamatório (JAN et al., 2020).

Compostos híbridos contendo uma unidade pirazolina conectada a uma unidade 2,5-pirrolidinodiona (**Figura 7**) foram sintetizados e testados em culturas de células de câncer de cólon (HT29), câncer de mama (MCF7) e leucemia mielóide crônica (K562), contra as quais apresentaram ótima atividade antitumoral. As moléculas identificadas como A, B, C e D na figura 7 demonstraram boa atividade contra células de câncer de mama e de cólon e atividade moderada contra células de leucemia mielóide crônica. O composto B foi o que demonstrou melhor atividade inibitória da divisão celular devido à inibição da proteína BCL-2, com atividade anti-apoptótica (TILEKAR et al., 2020).

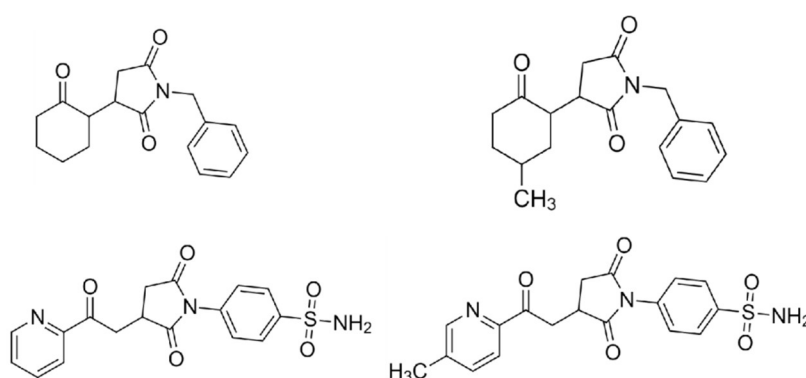


Figura 6. Derivados 2,5-pirrolidinodionas substituídos nas posições 1 e 3 com atividade anti-inflamatória (JAN et al., 2020).

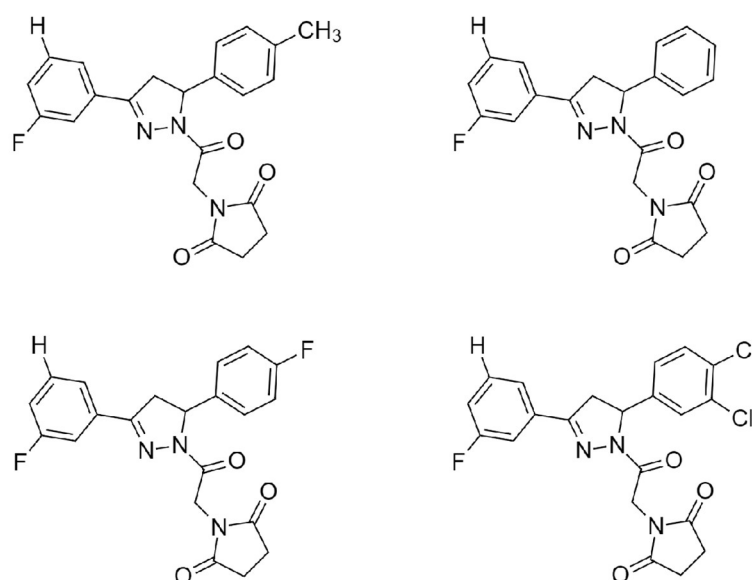


Figura 7. Híbridos pirazolina-pirazolidinodionas com ação antitumoral (TILEKAR et al., 2020).

Os ensaios descritos anteriormente mostram atividades biológicas de compostos da classe das 2,5-pirrolidinodionas para diferentes fins. No entanto, não se tem estudos que mostrem o poder inibitório desses compostos sobre a GST- π . Diante disso, este trabalho foi desenvolvido com o objetivo de se identificar compostos da classe das 2,5-pirrolidinodionas, substituídos nas posições 1 e 3, com potencial de inibição competitiva da GST- π , com baixo potencial de toxicidade humana e que pudessem ser utilizados como adjuvantes no tratamento quimioterápico no sentido de se reduzir a resistência tumoral aos fármacos vigentes. Nesse sentido, uma série de compostos dessa classe (**Figura 8**) foi gentilmente cedida pelo grupo de pesquisas coordenado pelo professor Silvio Cunha, da Universidade Federal da Bahia, e estudadas nesse trabalho.

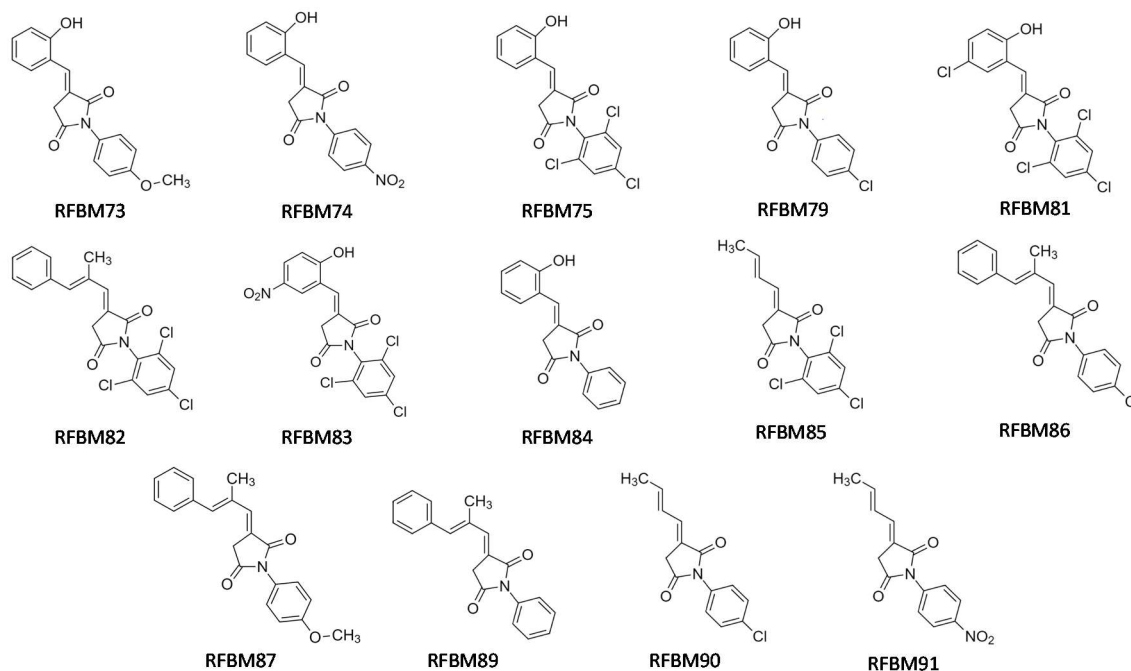


Figura 8. Estruturas químicas das 2,5-pirrolidinodionas-1,3-dissubstituídas avaliadas quanto à ação inibitória frente à GST- π .

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Identificar, dentre os compostos testados, potenciais inibidores competitivos da glutathione S-transferase, com baixa toxicidade, propriedades farmacocinéticas adequadas e viáveis para eventuais testes *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

- Prever por ensaios *in silico* propriedades farmacocinéticas das 2,5-pirrolidinodionas.
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos estudados, por meio de ensaios com o microcrustáceo *Artemia salina*.
- Avaliar a interferência dos compostos testados sobre a atividade enzimática da glutathione S-transferase em diferentes concentrações de 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) e glutathione reduzida (GSH)
- Elucidar, por meio de estudos de cinética enzimática, a o mecanismo de inibição da GST- π perante à presença das 2,5-pirrolidinodionas em estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

Os reagentes, ovos de *Artemia salina* e kits para ensaio enzimático com GST foram obtidos de fontes comerciais. Os compostos sintéticos descritos na **Figura 8** foram cedidos pelo grupo de pesquisas coordenado pelo professor Silvio Cunha, da Universidade Federal da Bahia. Os compostos já tiveram sua pureza confirmada e foram elucidados estruturalmente, porém tais dados ainda não foram publicados.

4.2 Métodos

4.2.1 Previsão *in silico* de propriedades farmacocinéticas

As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação foram previstas utilizando o servidor online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>).

4.2.2 Ensaios de toxicidade em *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* foi realizado em triplicata com todos os compostos, em concentrações de 0,15 mL⁻¹ em triplicada.

Foi utilizada metodologia de Meyer e colaboradores (1982) adaptada com a preparação de solução salina na concentração de 30 g/L. O pH foi ajustado entre 8,0 – 9,0 adicionando-se gotas de uma solução 0,1 mol/L de NaOH. Os oocistos de *Artemia salina* foram colocados para eclodir na solução salina, por 48 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25 °C. Após eclosão, os náuplios de *Artemia salina* foram transferidos com uma micropipeta para tubos de ensaio (dez por tubo) contendo 1 mL de solução salina e amostras de 2,5-pirrolidodionas testadas em concentração fixa de 0,150mM em triplicata. Após 24 horas da adição do composto testado, foi verificada a mobilidade dos

náuplios em cada tubo, para identificação do número de indivíduos mortos em comparação com o controle negativo.

4.2.3 Atividade de inibição enzimática *in vitro*

A atividade catalítica da GST- π foi determinada usando metodologia de Van Haaften e colaboradores (2001) modificada. O ensaio tinha como objetivo determinar a absorbância da amostra em análise no comprimento de onda de 340 nm, indicativo da formação do produto 2,4-dinitrofenil-S-glutathiona (DNP-SG) oriundo da reação entre 2,4-dinitroclorobenzeno (CDNB) e GSH, a qual é catalisada pela GST. Para isso, CDBN e GSH são adicionados no meio na concentração de 1 mM e avalia-se a atividade enzimática na presença ou na ausência da 2,5-pirrolidinodiona na concentração fixa de 0,150 mM. A atividade enzimática foi determinada como percentual de atividade em relação ao controle (sem a 2,5-pirrolidinodiona). Os espectros de absorção foram realizados em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico em espectrofotômetro UV-Vis Global Trade Technology. Os experimentos foram realizados em triplicata.

4.2.4 Estudo de cinética enzimática

Para investigação do mecanismo de inibição dos compostos da classe das 2,5-pirrolidinodionas, foi realizado um estudo de cinética enzimática, em que a velocidade de reação de formação do conjugado DNP-SG, referente à interação dos substratos CDBN e GSH, foi mensurada na ausência e na presença do inibidor na concentração fixa de 0,1 mM, utilizando duas condições: variando-se as concentrações de CDBN (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 mM), com concentração fixa de GSH em 1 mM; e variando-se as concentrações de GSH (0,0625; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 mM) em concentração de CDBN fixa em 1 mM (OLIVEIRA, 2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Previsão *in silico* de propriedades farmacocinéticas das pirrolidinodionas

O uso de medicamentos por via oral é preferencial devido a sua praticidade, maior adesão do paciente e segurança na utilização. Porém, a administração por esta via depende diretamente da capacidade do fármaco em atravessar membranas celulares, da absorção na mucosa intestinal e solubilização em fluidos intestinais (DOS ANJOS SANTOS; DE ASSIS GONSALVES; ARAÚJO, 2018). No desenvolvimento de substâncias candidatas a fármacos são empregadas ferramentas que permitem predizer as capacidades de absorção oral dos compostos, como a regra dos 5 formulada por ChistopherLipinski (LIPINSKI et al., 1997).

Segundo a regra dos 5 de Lipinski, a biodisponibilidade oral de um fármaco está diretamente ligada às suas propriedades físico-químicas e assim foi observado que para que um fármaco tenha uma boa absorção no trato gastrointestinal, garantindo uma adequada biodisponibilidade oral, ele deve respeitar pelo menos três dessas propriedades: possuir massa molecular inferior a 500 Da; coeficiente de partição calculado (ClogP) menor que 5 [ou coeficiente de partição de Moriguchi (MlogP) < 4,15]; possuir 5 ou menos grupos doadores de ligação de hidrogênio; e 10 ou menos grupos aceptores de ligações de hidrogênio (LIPINSKI et al., 1997).

No presente trabalho, foi realizada uma análise estrutural das 2,5-pirrolidinodionas em estudo a fim de observar como suas características físico-químicas e estruturais poderiam interferir na absorção das substâncias, avaliando-as pelos critérios elaborados da regra de Lipinski. Tais dados são mostrados na **Tabela 1** e foram obtidos utilizando o servidor online SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>).

Dentre eles, apenas tem RFBM81, RFBM82 e o RFBM86 (**Tabela 1**) violaram um dos parâmetros da regra de Lipinski, apresentando o MlogP um pouco acima de 4,15. No entanto, para que uma substância seja considerada

inadequada segundo os parâmetros de Lipinski, ela deve violar ao menos dois dos parâmetros. Dessa forma, todos os compostos em estudo têm grande probabilidade de apresentar uma boa absorção intestinal. O logP de uma substância diz respeito ao seu caráter lipofílico e hidrofílico, que está relacionado com a capacidade de tal substância em transpor membranas biológicas. Quando um fármaco apresenta lipofilicidade muito elevada, situação das substâncias supramencionadas, sua absorção oral no organismo pode ser baixa devido a sua insolubilidade em líquidos na biofase. Porém, se uma substância tem uma lipofilia muito baixa também será pouco absorvida no trato gastrointestinal por não ser capaz de atravessar membranas ricas em lipídios. Ou seja, há um equilíbrio a ser respeitado que contribua para sua absorção quando usada por via oral (BARREIRO; FRAGA, 2015) (WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016).

Tabela 1. Dados de previsão de propriedades físico-químicas e estruturais das pirrolidinonas em estudo.

Composto	Massa Molecular	ALH ^a	DLH ^b	MlogP ^c	Violação Regra Lipinski
RFBM73	309,32	4	1	1,83	0
RFBM74	324,29	5	1	1,19	0
RFBM75	385,63	3	1	3,66	0
RFBM79	313,74	3	1	2,66	0
RFBM81	417,07	3	1	4,55	1
RFBM82	406,69	2	0	5,23	1
RFBM83	427,62	5	1	3,10	0
RFBM84	279,29	3	1	2,56	0
RFBM85	330,59	2	0	4,10	0
RFBM86	337,80	2	0	4,26	1
RFBM87	333,38	3	0	3,41	0
RFBM89	303,35	2	0	3,77	0
RFBM90	261,70	2	0	3,07	0
RFBM91	272,26	4	0	1,53	0

^aALH: grupos aceptores de ligação de hidrogênio; ^bDLH – grupos doadores de ligação de hidrogênio; ^cMlogP: coeficiente de partição de Moriguchi

Outra propriedade farmacocinética que impacta na atividade de um novo fármaco é sua capacidade de interferir na atividade das enzimas que compõem o citocromo P450 (CYP450), responsável pelo metabolismo de fármacos e xenobióticos, e a perda da função destas enzimas pode resultar em manifestação de efeitos tóxicos decorrente dos compostos metabolizados por

elas (PAIXÃO, 2016). Dessa forma, previu-se *in silico* também, utilizando o servidor SwissADME, a capacidade de inibição de isoformas importantes no metabolismo de fármacos apresentada pelas substâncias em estudo. É possível observar na **Tabela 2** que as pirrolidinodionas testadas apresentam diferentes potenciais de inibição das enzimas do CYP450.

Tabela 2. Dados de previsão de inibição de isoformas do CYP450, de atuação como substrato da glicoproteína-P e propriedades de permeabilidade à barreira hematoencefálica.

Composto	Permeação BBB ^a	Substrato P-gp ^b	CYP1A2 _i ^c	CYP2C19 _i ^d	CYP2C9 _i ^e	CYP2D6 _i ^f	CYP3A4 _i ^g
RFBM73	sim	não	não	sim	sim	não	não
RFBM74	não	não	não	não	sim	não	não
RFBM75	sim	não	sim	sim	sim	não	sim
RFBM79	sim	não	sim	sim	sim	não	não
RFBM81	sim	não	não	sim	sim	não	não
RFBM82	sim	não	não	sim	sim	não	não
RFBM83	não	não	sim	sim	sim	não	sim
RFBM84	sim	não	sim	não	não	não	não
RFBM85	sim	não	sim	não	sim	não	não
RFBM86	sim	não	não	sim	sim	não	não
RFBM87	sim	não	não	sim	sim	não	sim
RFBM89	sim	não	não	sim	sim	não	não
RFBM90	sim	não	sim	sim	sim	não	não
RFBM91	não	não	sim	não	não	não	não

^aPermeação BBB: capacidade de permeação da barreira hematoencefálica; ^bP-gp: glicoproteína P; ^cCYP1A2_i: potencial de inibição da isoforma CYP1A2; ^dCYP2C19_i: potencial de inibição da isoforma CYP2C19; ^eCYP2C9_i: potencial de inibição da isoforma CYP2C9; ^fCYP2D6_i: potencial de inibição da isoforma CYP2D6; ^gCYP3A4_i: potencial de inibição da isoforma CYP3A4.

A CYP3A4 é a enzima mais abundante no fígado adulto, responsável por metabolizar aproximadamente 60% dos fármacos (PAIXÃO, 2016). Como mostrado na **Tabela 2**, três dos compostos estudados, RFBM75, RFBM83 e RFBM87, apresentam potencial em inibir essa isoforma. Já a isoforma CYP2D6, capaz de metabolizar fármacos em sua maioria lipofílicos (PAIXÃO, 2016), não teria sua atividade alterada por nenhuma das substâncias analisadas. Quase todas as pirrolidinodionas pesquisadas apresentam potencial em inibir a isoforma CYP2C9, não sofrendo efeitos apenas de RFBM84 e RFBM91. A isoforma CYP2C19 é expressa em grande maioria no fígado e no intestino e atua

no metabolismo de fármacos em geral (PAIXÃO, 2016). No estudo realizado, foi previsto o potencial de inibição dessa isoforma para a maioria das pirrolidinodionas testadas, exceto para RFBM74, RFBM84, RFBM85 e RFBM91. Já contra a isoforma CYP1A2, foi previsto potencial de ser inibida pelos compostos RFBM75, RFBM79, RFBM83, RFBM84, RFBM85, RFBM90 e RFBM91.

A glicoproteína-P é uma proteína de membrana expressa na superfície celular, que atua no efluxo de substâncias, como fármacos e demais xenobióticos, do interior das células quando estas substâncias atuam como seu substrato. Sua atividade e expressão dessa proteína está relacionada com casos de múltipla resistência a fármacos demonstrados por células tumorais (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Dos compostos analisados, nenhum deles demonstrou provável interação com a glicoproteína-P, havendo menor possibilidade de que células tumorais desenvolvam esse tipo de resistência a compostos com esse padrão estrutural.

De modo geral, boa parte das 2,5-pirrolidinodionas avaliadas demonstraram potencial em acessar o sistema nervoso central (SNC), conforme parâmetro “permeação BBB” na **Tabela 2**, podendo ser utilizadas com adjuvantes em processos oncológicos que afetassem o cérebro. Por outro lado, em casos de neoplasias periféricas, seria necessária uma melhor investigação quanto à possibilidade de tais compostos causarem efeitos adversos centrais. Para os compostos RFBM74, RFBM83, RFBM88 e RFBM91 não foi observado permeação à barreira hematoencefálica (BBB), o que limitaria seu uso no tratamento adjuvante em neoplasias no SNC (MARTINS et al., 2021).

5.2 Testes de toxicidade contra *Artemia salina*

Os ensaios de toxicidade realizados com *Artemia salina* foram propostos inicialmente por Meyer e colaboradores (1982) para avaliar o potencial tóxico de extratos de plantas e substâncias isoladas. A grande versatilidade do método permite realizar análises de maneira rápida, com resultados em

aproximadamente 24 horas, além de ser econômico devido à baixa quantidade de equipamentos necessários para realização da técnica e possuir boa reprodutibilidade, sendo aplicada na farmacologia, neurologia, ecologia, química, dentre outros (HIROTA et al., 2012).

A primeira análise *in vitro* realizada com as 2,5-pirrolidinodionas consistiu em uma abordagem experimental com o intuito de avaliar a toxicidade dos compostos observando a taxa de sobrevivência dos náuplios de *A. salina* após 24 horas de exposição às pirrolidinodionas. As porcentagens de sobrevivência de náuplios observadas no experimento na presença de cada composto são mostradas na **Figura 9**.

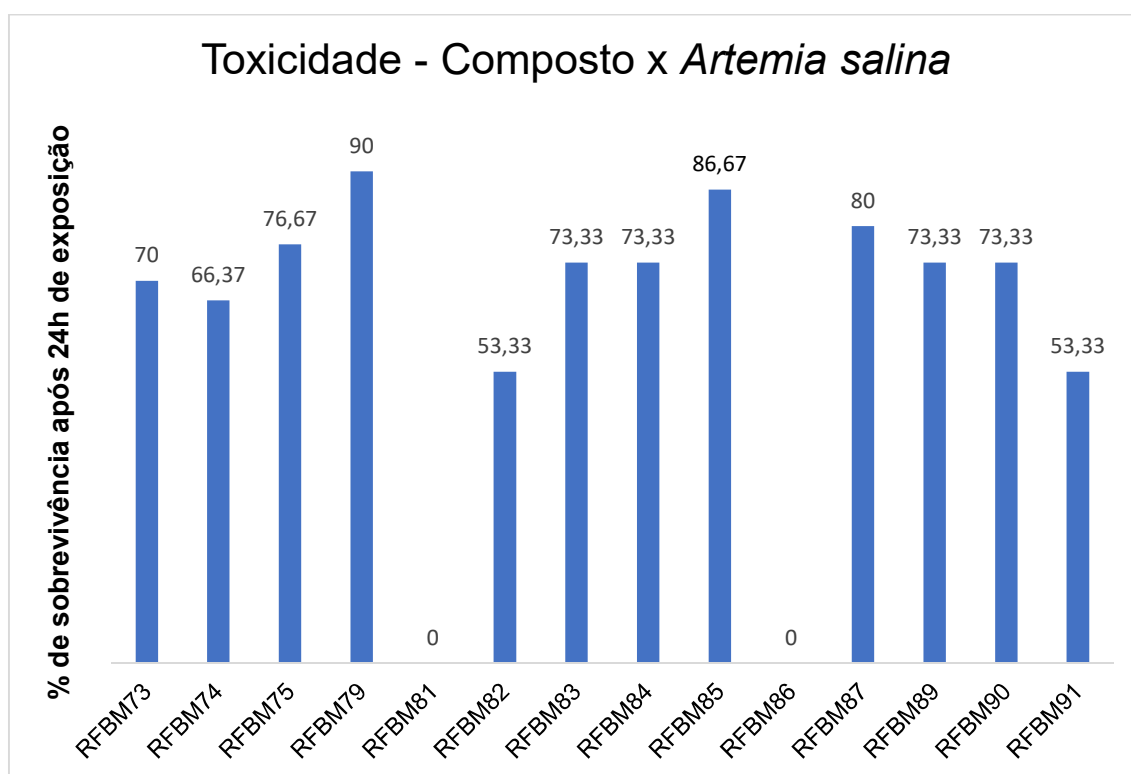


Figura 9. Porcentagem de sobrevivência de náuplios de *Artemia salina* quando expostos às 2,5-pirrolidinodionas em estudo.

Dentre os catorze compostos testados, os compostos RFBM81 e RFBM86 expressaram alta toxicidade, eliminando 100% das artemias incubadas no teste. Já os demais compostos demonstraram potencial tóxico mais reduzido,

com taxa de sobrevivência acima de 50%. Para nove compostos - RFBM73, RFBM75, RFBM79, RFMB83, RFMB84, RFMB85, RFMB87, RFMB89, RFBM90 – observou-se uma taxa de sobrevivência de pelo menos 70% dos náuplios expostos, sendo esses selecionados para avaliação de atividade enzimática.

5.3 Estudo de inibição da enzima GST- π *in vitro*

Considerando o teste de toxicidade contra *Artemia salina*, as substâncias que obtiveram taxa de sobrevivência maior que 70%, definido para esse estudo, seguiram adiante para os ensaios da atividade enzimática. Durante a execução do experimento, para os compostos RFBM73, RFBM75, RFBM79, RFMB83, RFMB84 e RFBM90, observou-se turvação do meio de teste contendo GST- π , CDNB e GSH quando a solução do composto era adicionada, não apresentando solubilidade à temperatura ambiente, em grandeza suficiente para garantir a realização de leitura no espectrofotômetro, mesmo com adição de dimetilsulfóxido. Considerando que, quando o meio de análise se apresenta turvo, a leitura no espectrofotômetro pode ficar comprometida, esses compostos foram descartados da análise e por questão de disponibilidade de enzima para realização dos testes, não foi possível a execução dos ensaios para esses compostos em concentrações menores.

Assim, foram realizadas análises espectrofotométricas em espectrofotômetro no UV-Vis para avaliar a atividade inibitória do RFBM85, RFBM87 e RFBM89 frente a GST- π , nas quais os compostos foram utilizados na concentração de 0,150 mM, na presença dos substratos GSH e CDNB em concentrações de 0,100 mM cada, sendo avaliada a capacidade desses compostos em inibir a formação do produto de reação entre CDNB e GSH mediante catálise da GST- π .

Como mostrado na **Figura 10**, os compostos avaliados inibiram em pelo menos 60% a atividade catalítica da GST- π , quando testados na concentração de 0,150 mM. A melhor atividade observada foi do composto RFBM85, que conseguiu inibir em 90% a atividade da enzima na concentração de teste. Esse maior potencial de inibição provavelmente ocorreu devido à diferença de

substituinte na posição 3 do sistema pirrolidinodiona, visto que esse composto apresenta em sua estrutura uma cadeia (1*E*,3*E*)-pentadienila ligada ao anel 2,5-pirrolidinodiona, enquanto que os compostos RFBM87 e RFBM89 possuem estrutura semelhante, ambos com uma cadeia fenilalilideno. Cada um dos compostos apresenta anéis aromáticos diferentes na posição 1. O RFBM85 tem ligado ao nitrogênio do anel da pirrolidinodiona um grupo triclorofenila, enquanto o RFBM87 possui um anel derivado de anisol e o RFBM89 tem na mesma posição um grupo fenila não substituído. A presença desses substituintes nesses compostos pode contribuir na ligação ao sítio ativo da enzima.

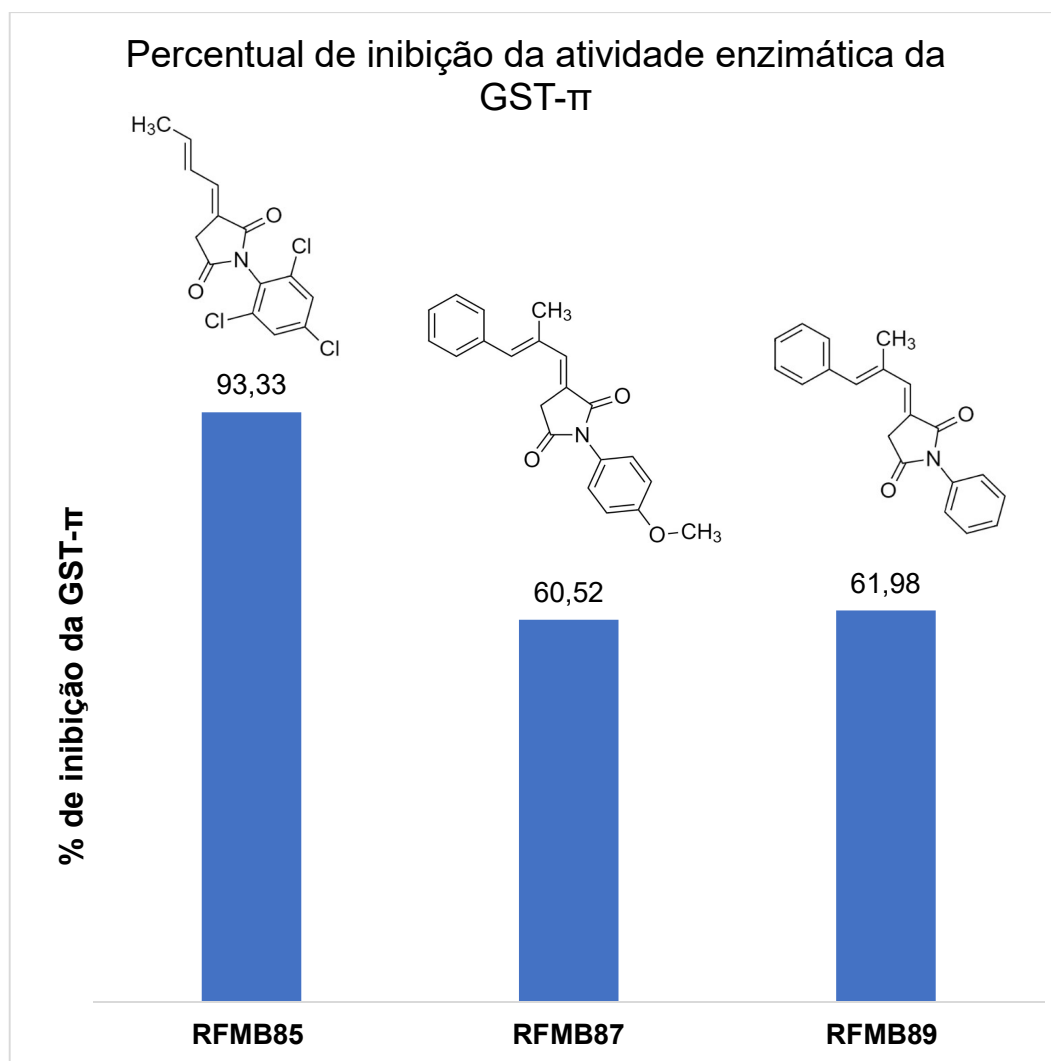


Figura 10. Percentual de inibição da atividade enzimática da GST pelos compostos RFBM85, RFBM87 e RFBM89.

5.4 Estudo de cinética enzimática

Para avaliar como se dá o mecanismo de inibição das 2,5-pirrolidinodionas-1,3-dissubstituídas, o composto RFMB85 foi selecionado, considerando-se o bom perfil de toxicidade entre os três testados e a capacidade de inibição aparente da GST- π demonstrada.

O estudo de cinética enzimática com o composto RFMB89 foi realizado em duas diferentes condições: uma trabalhando-se com concentrações fixas de GSH (1 mM) e do inibidor (0,1 mM) e variando-se as concentrações de CDNB para estabelecer a relação entre essa variação com a velocidade de formação do conjugado DNP-SG catalisada pela GST- π ; e outra em que se trabalhou com concentrações fixas de CDNB (1 mM) e do inibidor (0,1 mM) e variou-se as concentrações de GSH.

Os resultados foram expressos em gráfico de Lineweaver-Burk, considerando que a enzima catalisaria a reação de conjugação de forma randômica, e analisado pela equação de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{K_m + [S]}$$

Na qual V_0 representa a velocidade inicial da reação catalisada pela enzima, V_{max} a velocidade máxima, $[S]$ a concentração do substrato e K_m a concentração dos substratos em que a velocidade da reação é metade da velocidade máxima.

Na análise da cinética enzimática do composto RFMB85 (**Figura 11**), quando o CDNB teve sua concentração variada, observou-se que as curvas que representam o comportamento da enzima na presença e na ausência do inibidor não se cruzaram no eixo das ordenadas do gráfico duplo recíproco de Lineweaver-Burk (**Figura 12**), caracterizando inibição do tipo não competitiva com relação ao sítio H da enzima. Quando a GSH foi o substrato de concentração variável, é observado que as linhas do gráfico se cruzam direita do eixo das ordenadas, considerando uma linha de tendência para ambas as curvas, indicando inibição do tipo mista em relação ao sítio G da enzima (**Figuras 13 e 14**).

Tais resultados apontam que o composto RFBM85 age como um inibidor do tipo misto da GST- π , interagindo com a enzima e causando a diminuição aparente de sua atividade, porém os dados sugerem que também haja a interação do composto estudado com CDNB e com o GSH.

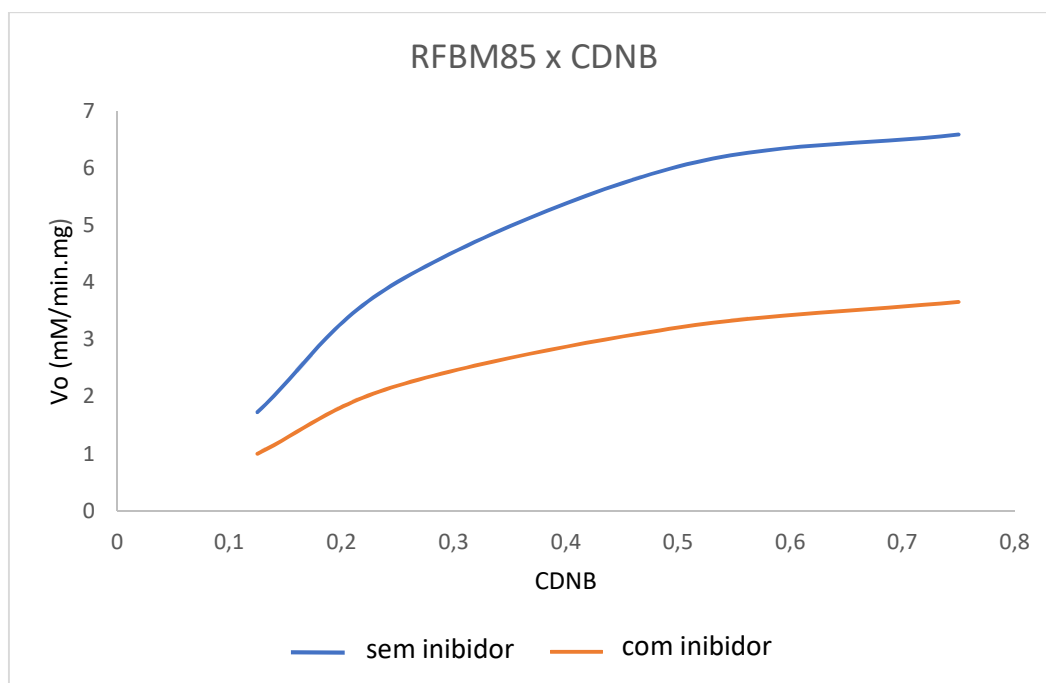


Figura 11. Avaliação de cinética enzimática para GST- π com GSH como substrato de concentração fixa (1 mM) e CDNB como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFBM85. Os dados foram submetidos à regressão segundo a equação de Michaelis-Menten.

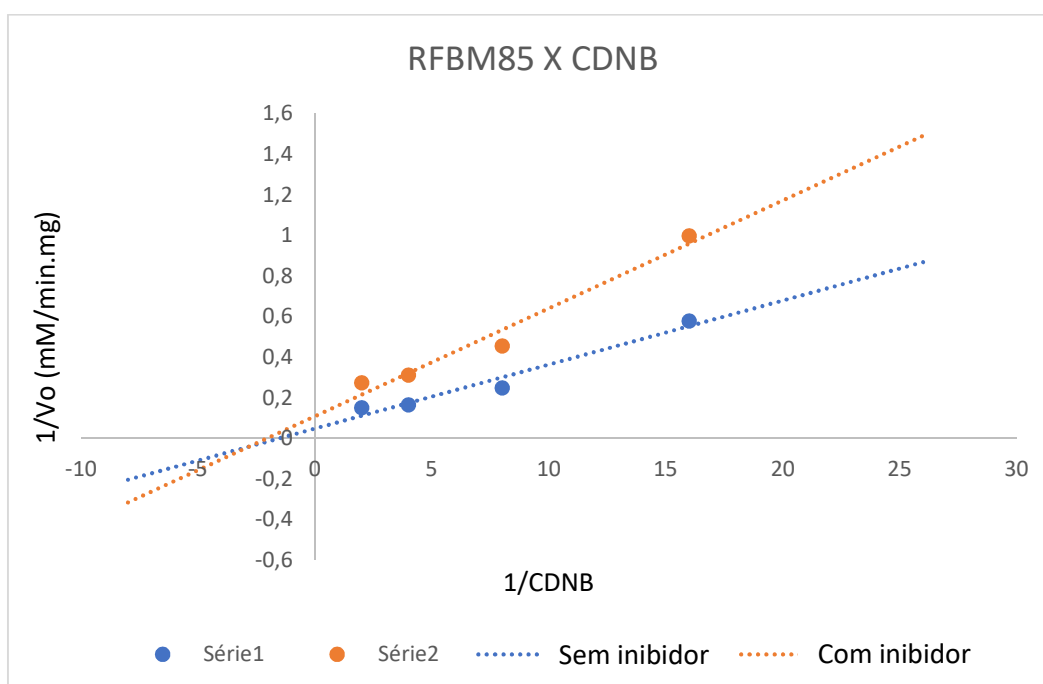


Figura 12. Avaliação de cinética enzimática (método do duplo recíproco) para GST- π com GSH como substrato de concentração fixa (1 mM) e CDNB como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFMB85.

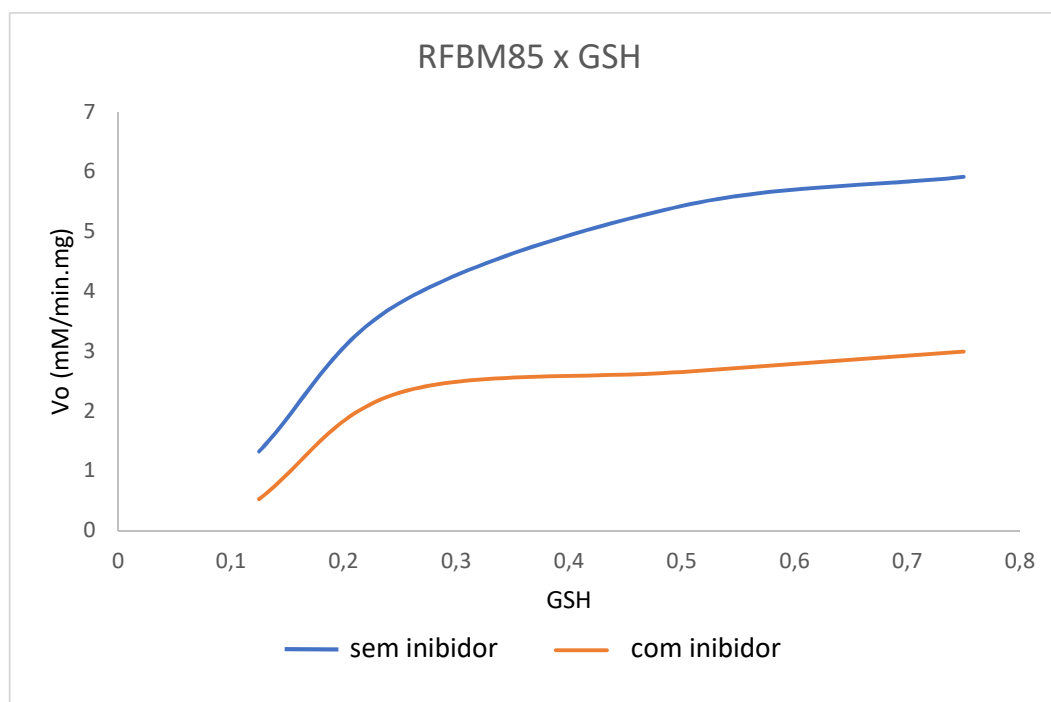


Figura 13. Avaliação de cinética enzimática para GST- π com CDNB como substrato de concentração fixa (1 mM) e GSH como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFMB85. Os dados foram submetidos à regressão segundo a equação de Michaelis-Menten.

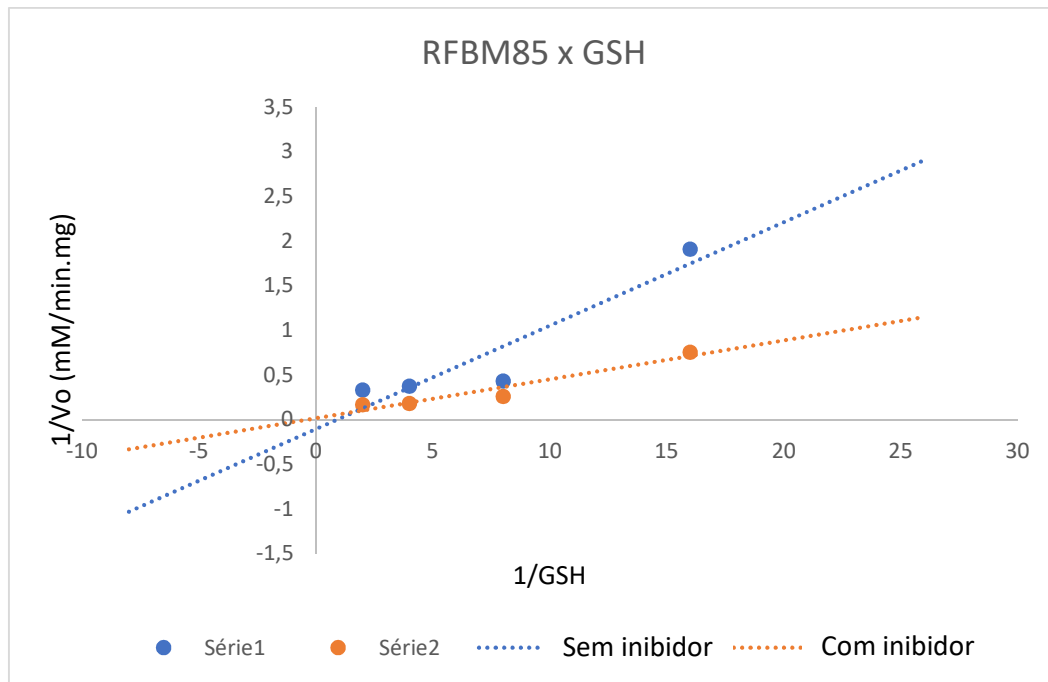


Figura 14. Avaliação de cinética enzimática (método do duplo recíproco) para GST- π com CDNB como substrato de concentração fixa (1 mM) e GSH como substrato de concentração variável, na ausência e presença de 0,1 mM de RFBM85.

6 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, foi avaliada a toxicidade de catorze 2,5-pirrolidinodionas, das quais nove apresentaram baixa toxicidade e três delas tiveram sua capacidade inibitória da GST- π avaliada, obtendo-se de 61,98 a 93,33% de inibição enzimática aparente na concentração testada. Em análises *in silico*, previu-se que todas as pirrolidinodionas testadas se mostraram viáveis em uso por via oral, com biodisponibilidade adequada, além de que algumas delas tem capacidade de acesso ao sistema nervoso central. Outro ponto importante observado foi que todas elas têm baixa afinidade por glicoproteína-P, diminuindo as chances dessas substâncias em sofrerem efluxo por essa via.

Para o composto RFBM85, com maior potencial inibitório da GST- π , foi realizado um estudo de cinética enzimática, a fim de entender melhor seu mecanismo. Foi constatado neste ensaio que o composto estudado atua como um inibidor misto, apresentando inibição não competitiva em relação ao CDNB e inibição mista em relação ao GSH, sendo capaz de diminuir a atividade enzimática, porém não interagindo com os sítios ativos da enzima. Diante desse comportamento, cabe reavaliações, como testes com mais variações de concentração de enzima-inibidor, análise de interação entre as espécies estudadas, dentre outras técnicas de análises desse composto e de sua classe no sentido de seu uso como compostos *hit* para o desenvolvimento de fármaco adjuvantes do tratamento de câncer.

REFERÊNCIAS

- BALYAN, R. et al. Bioactivation of luteolin by tyrosinase selectively inhibits glutathione S-transferase. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 208–218, 2015.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Química medicinal – As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2015.
- BRANDÃO DIAS, D. Q.; SOUZA KUDO, C. R.; GARCIA, D. M. Impacto de medicamentos bioequivalentes utilizados na imunoterapia contra o câncer de mama no Brasil. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 3, n. 1, p. 274, 2020.
- CRAWFORD, L. A.; WEERAPANA, E. A tyrosine-reactive irreversible inhibitor for glutathione S-transferase π (GSTP1). **Molecular BioSystems**, v. 12, n. 6, p. 1768–1771, 2016.
- DAINA, A.; MICHIELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. March, p. 1–13, 2017.
- DONG, S. C. et al. Glutathione S-transferase π : A potential role in antitumor therapy. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 12, p. 3535–3547, 2018.
- DOS ANJOS SANTOS, V. L.; DE ASSIS GONSALVES, A.; ARAÚJO, C. R. M. Didactic approach for the development of bioactive molecules: Lipinski's five-rule and preparation of 1,3,4-oxadiazol heterocyclic in domestic microwave oven. **Química Nova**, v. 41, n. 1, p. 110–115, 2018.
- HIROTA, B. C. et al. TOXICITY EVALUATION IN VITRO: APPLICABILITY OF BRINE SHRIMP *Artemia salina* ETHALITY ASSAY. **Visão Acadêmica**, v. 13, n. 2, p. 43–48, 2012.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estatísticas do câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2022. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer>
- JAN, M. S. et al. Design, synthesis, in-vitro, in-vivo and in-silico studies of pyrrolidine-2,5-dione derivatives as multitarget anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 186, p. 111863, 2020.
- KANWAL, R. et al. Protection against oxidative DNA damage and stress in human prostate by glutathione S-transferase P1. **Molecular Carcinogenesis**, v. 53, n. 1, p. 8–18, 2014.
- KULAKSIZ-ERKMEN, G. et al. Amitriptyline may have a supportive role in cancer treatment by inhibiting glutathione S-transferase π (GST- π) and α (GST- α). **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 28, n. 1, p. 131–136, 2013.
- LEMAIRE, J. et al. Fundamental aspects of oncogenesis. **Bulletin du Cancer**, v. 107, n. 11, p. 1148–1160, 2020.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 2012.

MARTINCORENA, I.; CAMPBELL, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, v. 349, n. 6255, p. 1483–1489, 2015.

MARTÍNEZ-JIMÉNEZ, F. et al. A compendium of mutational cancer driver genes. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 10, p. 555–572, 2020.

MARTINS, A. C. et al. Revisão Da Literatura: Avanços E Perspectivas No Tratamento De Alzheimer Em Idosos Com Ênfase Na Barreira Hematoencefálica. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 624–642, 2021.

MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brineshrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.

MIRANDA FURTADO, C. L. et al. Epidrugs: targeting epigenetic marks in cancer treatment. **Epigenetics**, v. 14, n. 12, p. 1164–1176, 2019.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 9, p. 978–986, 2010.

OAKLEY, A., PARKER, M. Crystal structures of human glutathione S-transferase p1-1, complexed with glutathione. 6GSS. PDB Data Bank.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Câncer. Brasília (DF): 2022. Disponível em <<https://www.paho.org/pt/topicos/cancer>>.

PAIXÃO, C. . et al. Polimorfismos Genéticos Da Família Citocromo P450 E O Câncer. **Saúde & Ciência Em Ação**, v. 3, n. 1, p. 118–133, 2016.

RAZA, H. Dual localization of glutathione S-transferase in the cytosol and mitochondria: Implications in oxidative stress, toxicity and disease. **FEBS Journal**, v. 278, n. 22, p. 4243–4251, 2011.

RAASCHOU-NIELSEN, O. et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: Prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 9, p. 813–822, 2013.

ROCHA, Clarissa Ribeiro Reyle. **Mecanismos de resistência à quimioterapia em células tumorais**. 2015. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

SHISHIDO, Y. et al. A Covalent Inhibitor for Glutathione S-Transferase Pi (GSTP 1-1) in Human Cells. **ChemBioChem**, v. 20, n. 7, p. 900–905, 2019.

SINGH, R. R.; REINDL, K. M. Glutathione S-transferases in cancer. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, 2021.

SNYDER, R. Leukemia and benzene. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 9, n. 8, p. 2875–2893, 2012.

SILVA, A. A. DA; CARLOTTO, J.; ROTTA, I. Standardization of the infusion sequence of antineoplastic drugs used in the treatment of breast and colorectal cancers. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 16, n. 2, p. eRW4074, 2018.

SOPBUÉ FONDJO, E. et al. Synthesis, characterization and antimicrobial properties of two derivatives of pyrrolidine-2,5-dione fused at positions-3,4 to a dibenzobarrelene backbone. **BMC Chemistry**, v. 16, n. 1, p. 1–10, 2022.

SUNG, H. et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021.

TEW, K. D. et al. The role of glutathione S-transferase P in signaling pathways and S-glutathionylation in cancer. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 299–313, 2011.

TILEKAR, K. et al. Synthesis and Biological Evaluation of Pyrazoline and Pyrrolidine-2,5-dione Hybrids as Potential Antitumor Agents. **ChemMedChem**, v. 15, n. 19, p. 1813–1825, 2020.

TURELLA, P. et al. A strong glutathione S-transferase inhibitor overcomes the P-glycoprotein-mediated resistance in tumor cells: 6-(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-ylthio)hexanol (NBDHEX) triggers a caspase-dependent apoptosis in MDR1-expressing leukemia cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 33, p. 23725–23732, 2006.

VAN HAAFTEN, R. I.; DEN HARTOG, G. J.; EVELO, C. T.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Hypochlorous acid is a potent inhibitor of GST P1-1. **Chemical and Biological Interactions**, v. 138, p. 77–83, 2001.

WANG, C. H. et al. Inhibition of glutathione S-Transferase M1 by new gabosine analogues is essential for overcoming cisplatin resistance in lung cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n. 24, p. 8574–8581, 2011.

WANG, H. B. et al. Developing piperlongumine-directed glutathione S-transferase inhibitors by an electrophilicity-based strategy. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 126, p. 517–525, 2017.

WARD, L. S. Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 4, p. 351–360, 2002.

WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T. A. Farmacologia ilustrada. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.