

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE POLIFENÓIS NAFTOQUINÔNICOS RACIONALMENTE DESENHADOS NA ENZIMA PI3K

**Caroline Damascena Cardoso¹, Vivian Terra Decupero¹, Eclair Venturini Filho²,
Mariana Klein Antonazi², Heberth de Paula¹, Sandro José Greco², Klesia Pirola
Madeira¹**

¹Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário,
sem número, 29.500-000 - Guararema, Alegre/ES – Brasil, caroline.d.cardoso@edu.ufes.br,
vivian.decupero@edu.ufes.br, heberth.paula@edu.ufes.br, kleopirola@yahoo.com.br,

²Universidade Federal do Espírito Santo/Departamento de Química- CCE, Av. Fernando Ferrari, 514 -
Goiabeiras, Vitória - ES, 29075-910, Brasil, sandrogreco.ufes@gmail.com,
mariana.kleina@hotmail.com, efilho@salesiano.br.

Resumo

Para o Brasil, estimam-se 73.610 casos novos de câncer de mama, em cada ano do triênio 2023-2025. As naftoquinonas já possuem atividade antitumoral descrita para essa neoplasia maligna. Propõem-se polifenóis naftoquinônicos inéditos como moléculas promissoras racionalmente desenhadas como possíveis estratégias terapêuticas para atuarem na via de PI3K, que é uma via ativada em muitos cânceres, inclusive no de mama. Para tanto utilizou-se o Kit ADP-GLO *Lipid Kinase Systems*. Os resultados apontaram que dos 6 polifenóis testados, dois apresentaram maior capacidade de inibição da subunidade p110 α /p85 α da classe IA da via PI3K em comparação com o *wortmannin*, inibidor clássico da enzima.

Palavras-chave MDA-MB 231. Câncer de mama. Polifenóis natoquinônicos.

Área do Conhecimento: Bioquímica – Enzimologia.

Introdução

O câncer de mama representa o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo, com exceção dos tumores de pele, sendo o que mais acomete as mulheres, configurando, dessa maneira, um grande desafio à saúde mundial (INCA, 2021). No Brasil a distribuição geográfica para o CAM se mostra principalmente nas Regiões Sul e Sudeste, representando 70% da incidência de novos casos (INCA, 2023). A área da cancerologia tem urgência por abordagens diagnósticas, prognósticas e terapêuticas inovadoras capazes de promover melhoria da qualidade de vida das portadoras de câncer de mama.

A enzima PI3K desencadeia uma cascata de reações de natureza química dentro das células, com finalidade de transmitir sinais para realização de determinadas funções celulares, as quais pode-se citar o crescimento celular, proliferação celular e resistência em tumores de mama (PAPLOMATA; O'REGAN, 2014), logo, compostos que inibem a ação dessa enzima seriam favoráveis para a terapia do câncer de mama.

As naftoquinonas já possuem atividade antitumoral descrita para essa neoplasia maligna (CHEN *et al.*, 2004; AFRASIABI *et al.*, 2004; ROY, 2021), dessa forma, propõem-se os polifenóis naftoquinônicos inéditos como moléculas promissoras racionalmente desenhadas como possíveis estratégias terapêuticas para atuarem na subunidade da enzima PI3K.

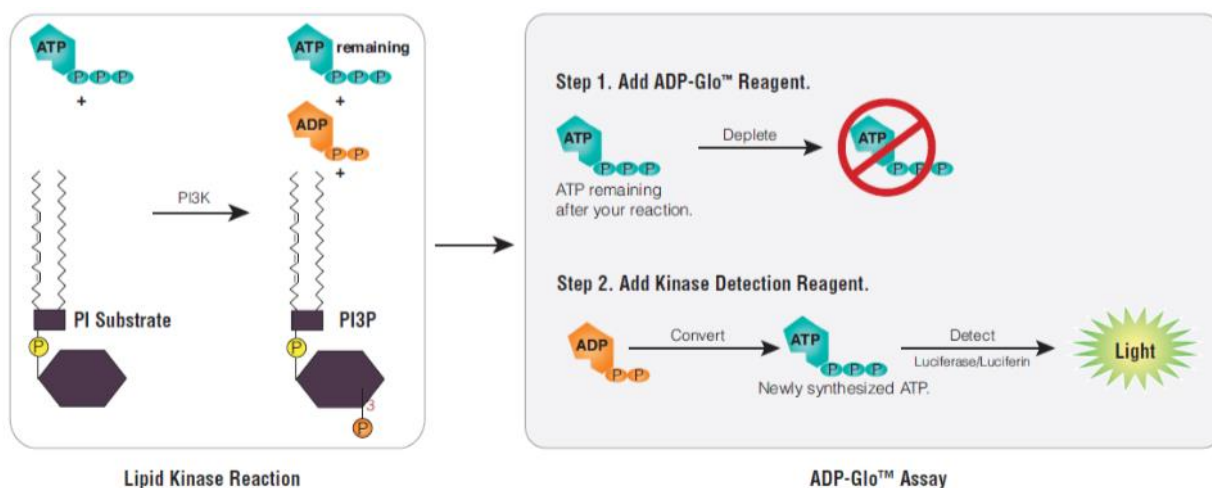
O contexto de previsibilidade que trazem os estudos da bioquímica das atividades enzimáticas, e dos recentes avanços da química computacional, auxiliam na busca de agentes antineoplásicos baseados em planejamentos racionais (MONTANARI; BOLZANI, 2001), resultando na obtenção de substâncias com maior seletividade e eficiência antineoplásica. Assim, o presente projeto visa a realização de ensaios que busquem avaliar a ação dos polifenóis em 3 subunidades da enzima PI3K, pertencentes à classe IA.

A tecnologia selecionada para o presente estudo foi o kit ADP-GLO *Lipid Kinase Systems*, por apresentar excelente sensibilidade em uma ampla faixa de concentrações de ATP (LI *et al.*, 2019). Esse ensaio mede a produção de ADP a partir de uma reação de quinase por enzimas acopladas, que

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

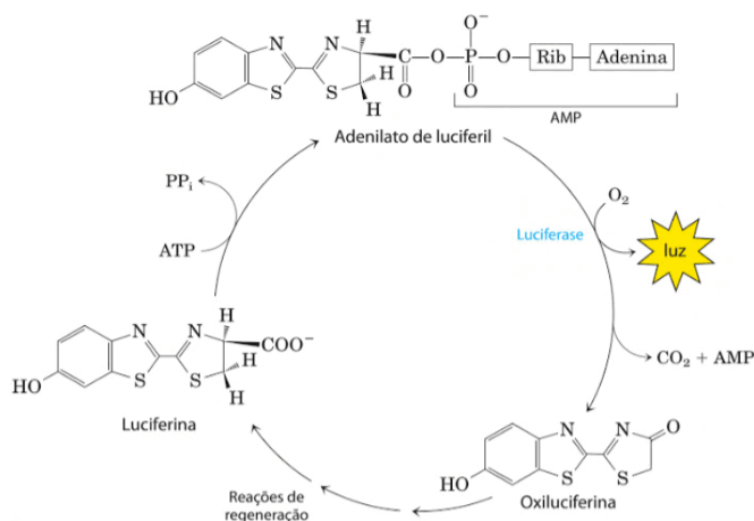
primeiro convertem ADP em ATP e posteriormente quantificam o ATP utilizando luciferase na presença de luciferina. O referido kit possui princípio elucidado na Figura 1. Esse princípio pode ser subdividido em duas etapas: Etapa 1 → Reação da quinase: Reação da enzima PI3K com seu substrato e gasto de ATP, gerando os produtos PI3P, ADP e ATP remanescente. Etapa 2 → Ensaio do ADP-Glo: Nessa etapa ocorre a depleção do ATP remanescente da etapa 1 por meio da adição de ADP-GLo, tornando inviabilizada a utilização desse ATP na Etapa 2. A seguir, com o ADP formado na etapa 1, é feita uma conversão dele para ATP, de modo que seja possível medir essa quantidade de ATP, por meio da luz emitida na reação que ocorre na presença da luciferase (Figura 2), com gasto de ATP, de modo que, esse ADP formado na etapa 1 convertido a ATP na etapa 2 gerará sinal luminescente proporcional à concentração de ADP produzida, que estará correlacionada com a atividade da quinase.

Figura 1 – Princípio do kit ADP-GLO *Lipide Kinase Assay*.



Fonte: Manual Técnico ADP-Glo *Lipid Kinase Systems* (2020).

Figura 2 – Reação da Luciferina.



Fonte: Adaptado de LENINGHER (2014).

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Metodologia

Para a realização dos experimentos que verificam a interação dos polifenóis com as subunidades da enzima PI3K, foi utilizado o Kit ADP-GLO *Lipid Kinase Systems* (Promega). Foram seguidas as instruções do fabricante do kit e para processamento das análises foi feita uma parceria com a UNESP de Bauru-SP para utilização do luminômetro *Synergy 2 Multimode*, *BioTek, USA*, o *Software* utilizado para a obtenção dos dados foi o Gen5.

Foi feita a avaliação da atividade dos 6 polifenóis naftoquinônicos (PM-PIR-PANI, PM-PIR-NAF, PM-PIR-SAL, PM-PIR-PNB, PM-MORF-NAF, PM-MORF-SAL) em 3 subunidades da enzima PI3K, da Classe IA, a saber: p110 α /p85 α , p110 δ /p85 α , p110 β /p85 α . Os referidos polifenóis foram desenhados e sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica & Medicinal da UFES (CCE-UFES).

A reação foi feita em microplacas de 384 poços para otimizar o gasto dos reagentes do Kit, de modo que, em cada poço houve um volume final de reação equivalente a 20 μ L, provenientes da adição de:

- 2 μ L de enzima diluída 1:30;
- Adição de 1 μ L inibidor clássico (controle), *wortmannin* (*Sigma Aldrich*), ou adição de 1 μ L dos polifenóis em 4 diluições diferentes (1,52x10⁻⁵mM, 0,000244mM, 0,0036mM, 0,0625mM e 1mM), seguido de 15 minutos de agitação;
- Adição de 2 μ L de Mix Substrato (PIP2 3Pi), seguido de agitação por 1 hora;
- Adição de 5 μ L de reagente ADP-GLO, seguido de agitação por 40 minutos;
- Adição de 10 μ L de reagente de detecção, seguido de agitação por 40 minutos;
- Leitura no equipamento.

As leituras foram obtidas na forma de RLU (*Relative Light Units*), e as mesmas utilizaram os dados sem inibidor como 100% e os demais foram calculados proporcionalmente ao valor obtido sem o inibidor, para normalização dos resultados. As análises foram feitas como regressão não linear do tipo log do inibidor *versus* resposta normalizada, gerando um valor de IC₅₀, que corresponde à concentração de inibidor necessária para reduzir a atividade enzimática em 50%, de modo que nas definidas concentrações de cada polifenol em cada subunidade da enzima seja possível inibir a atividade da enzima PI3K, tendo em vista que, quanto menor o IC₅₀, mais potente o composto será em agir na atividade enzimática. Para construção de gráficos e cálculos de IC₅₀ foi utilizado o software *graph Pad Prisma* versão 8.

Resultados

Tabela 1- IC₅₀ dos polifenóis naftoquinônicos e do *wortmannin* para três subunidades da enzima PI3K. Valor obtido através de regressão não linear log do inibidor *versus* resposta.

Compostos	CLASSE IA IC ₅₀ (μ mol/L)		
	p110 α /p85 α	p110 δ /p85 α	p110 β /p85 α
PM-PIR-PANI	0,0124 $\pm$ 0,0001*	80,31 $\pm$ 0,0002*	56590 $\pm$ 0,0435 [#]
PM-PIR-PNB	157,9 $\pm$ 0,0002*	36,87 $\pm$ 0,0001*	153,60 $\pm$ 0,0004*
PM-PIR-NAF	41950 $\pm$ 0,0124 [#]	1911 $\pm$ 0,0153*	253,60 $\pm$ 0,0003*
PM-MORF-SAL	249,2 $\pm$ 0,0012*	ERRO	328,30 $\pm$ 0,0003*
PM-MORF-NAF	1478 $\pm$ 0,0016*	8,3200 $\pm$ 0,0001*	687,10 $\pm$ 0,0139*
PM-PIR-SAL	1,383 $\pm$ 0,0001*	237,100 $\pm$ 0,0006*	27460 $\pm$ 0,0156 [#]
WORTMANNIN	130,2 $\pm$ 0,0006*	ERRO	55,40 $\pm$ 0,0003*

Fonte: o autor 2023.

Símbolos diferentes diferem-se entre si no teste ANOVA seguido do Teste de *Tukey* ($p < 0,05$). Os dados da Tabela 1 apontam os resultados de IC₅₀ obtidos para os polifenóis naftoquinônicos. A

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

resposta luminescente é diretamente proporcional à atividade de PI3K, que culmina na produção de ADP. E se a atividade da PI3K, mesmo na presença dos polifenóis naftoquinônicos, acontece com mesma eficiência, mostra que eles são ineficazes em inibir a atividade da enzima. Considerando os dados obtidos, levando-se em conta o IC₅₀ do inibidor clássico (*wortmannin*), foi possível observar que PM-PIR-PANI e PM-PIR-SAL apresentaram uma maior capacidade de inibição da subunidade p110 α /p85 α da classe IA da enzima PI3K em comparação com o *wortmannin*, bem como o PM-PIR-NAF exibiu o pior resultado dentre todos os outros compostos. Na subunidade p110 β /p85 α os compostos PM-PIR-PANI e PM-PIR-SAL apresentaram resultados insatisfatórios, caracterizando semelhança entre si após análise estatística dos dados. Nesse contexto, propõe-se que esses referidos compostos possuem potencial para suprimir a atividade dessa subunidade e, conseqüentemente, modular a via de sinalização PI3K/AKT/mTOR associada ao câncer de mama, mostrando-se promissores como agentes inibidores seletivos da via PI3K. Os resultados destacados, preconizam a possibilidade de novos fármacos anticâncer baseados nos polifenóis PM-PIR-PANI e PM-PIR-SAL para atuarem na subunidade p110 α /p85 α , que são moléculas inéditas racionalmente desenhadas.

Discussão

Os estudos bioquímicos das atividades enzimáticas permitem uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares envolvidos nas vias de sinalização associadas ao câncer. No caso específico do câncer de mama, entender a função e a regulação da enzima PI3K é crucial, uma vez que ela desempenha um papel central nessa doença. Através desses estudos, é possível identificar alvos terapêuticos potenciais e avaliar a eficácia de compostos na modulação dessas vias de sinalização (VANHAESEBROECK *et al.*, 2021).

Além disso, os avanços da química computacional têm revolucionado a descoberta de fármacos ao permitir uma triagem virtual rápida e eficiente de um grande número de compostos em busca de moléculas com potencial atividade terapêutica (FERREIRA, R. S.; GLAUCIUS, O.; ANDRICOPULO, A. D., 2011). Através de métodos computacionais, como modelagem molecular, simulações de dinâmica molecular e técnicas de docking molecular, é possível prever a atividade e o potencial de interação de compostos com as proteínas alvo, como a enzima PI3K (HENCKEL, J. G.; BILLINGS, E. M., 1995).

A via de sinalização do PI3K/AKT/mTOR é ativada por diferentes tipos de estímulos celulares ou tóxicos e regula fundamentalmente funções celulares como transcrição, tradução, proliferação, e a sobrevivência (OSAKI *et al.*, 2004). Alterações na ativação da via PI3K/AKT/mTOR estão associadas com o desenvolvimento de diversas patologias, como doenças autoimunes e crescimento tumoral (OSAKI *et al.*, 2004). O desenvolvimento e progressão do tumor maligno, como já referido, está associado, na grande maioria dos casos, a um desequilíbrio entre o excesso de proliferação celular e a falta de resposta apoptótica, dois processos intimamente ligados à via do PI3K/AKT/mTOR (OSAKI *et al.*, 2004).

A via de sinalização PI3K/AKT/mTOR é frequentemente hiperativada em câncer de mama, e está associada à resistência a terapias convencionais. Portanto, a inibição da enzima PI3K tem sido uma estratégia terapêutica promissora no tratamento desse tipo de câncer. Estudos pré-clínicos e clínicos têm mostrado que a inibição seletiva das diferentes subunidades da enzima PI3K, como p110 α , p110 β e p110 δ , pode reduzir a proliferação celular, induzir apoptose e inibir a angiogênese, suprimindo assim o crescimento tumoral (RAZIS, E *et al.*, 2011). Além disso, a inibição da via de sinalização PI3K/AKT/mTOR também pode aumentar a resposta a outros tratamentos, como a terapia hormonal e a quimioterapia, melhorando assim os resultados clínicos (BERNS, K *et al.*, 2007).

O *wortmannin* é um metabólito produzido pelo fungo *Penicillium wortmannii*, que inibe irreversivelmente a PI3K e outras proteínas relacionadas a ela, por meio de ligação covalente (KNIGHT, 2010). Ao contrário de muitos inibidores de quinase, *wortmannin* inibe PI3K de maneira não competitiva com ATP por ligação covalente com PI3K (NAKANISHI *et al.*, 1992; OKADA *et al.*, 1994; POWIS *et al.*, 1994). Esses compostos apresentam propriedades inibitórias específicas da PI3K, o que pode abrir caminho para o desenvolvimento de tratamentos mais direcionados e menos tóxicos para o câncer de mama. Tais achados apontam a importância de permanecer investigando os mecanismos de ação dos polifenóis na inibição da PI3K, bem como avaliar sua eficácia e segurança em modelos pré-clínicos e estudos clínicos. A compreensão aprofundada desses polifenóis naftoquinônicos e sua aplicação no tratamento do câncer de mama podem levar ao desenvolvimento de novas terapias personalizadas e mais efetivas no futuro.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

Nesse sentido, após realizar o experimento, e obter os resultados obtidos pode-se analisar os seguintes compostos, o PM-PIR-PANI demonstra uma potente inibição seletiva para a isoforma p110 α /p85 α com um valor de IC50 extremamente baixo, indicando alta afinidade e eficácia na inibição desta isoforma. Para as outras isoformas, a afinidade é muito menor. PIR-PNB também mostra atividade inibitória significativa contra todas as isoformas da enzima, mas é mais eficaz contra a isoforma p110 δ /p85 α . O composto PM-PIR-NAF tem uma alta afinidade pela isoforma p110 β /p85 α e uma afinidade moderada pela isoforma p110 δ /p85 α , a sua afinidade pela isoforma p110 α /p85 α é significativamente menor. PM-MORF-SAL exibe atividade inibitória moderada contra p110 α /p85 α e p110 β /p85 α , mas não foi possível determinar o valor de IC50 para p110 δ /p85 α . O polifenol naftoquinônico PM-MORF-NAF mostra atividade inibitória moderada contra todas as isoformas, com uma afinidade mais alta pela isoforma p110 δ /p85 α . PM-PIR-SAL exibe uma forte afinidade pela isoforma p110 α /p85 α , enquanto tem uma afinidade moderada pela isoforma p110 β /p85 α e uma afinidade menor pela isoforma p110 δ /p85 α . O inibidor WORTMANNIN demonstra uma alta afinidade pela isoforma p110 β /p85 α e uma afinidade moderada pela isoforma p110 α /p85 α , mas não foi possível determinar o valor de IC50 para p110 δ /p85 α e consequentemente, não foi possível realizar as análises dos polifenóis nessa subunidade, fazendo-se necessário maiores estudos acerca dessa subunidade para atribuir parâmetros de análise.

Conclusão

O tratamento do câncer de mama, na maioria dos casos, envolve uma abordagem multidisciplinar que pode incluir cirurgia, quimioterapia, terapia hormonal e terapia-alvo, a depender do estágio e das características individuais do tumor.

Nesse contexto, a busca de novos fármacos é de relevância fundamental para contribuir com a melhoria das taxas de sobrevida e qualidade de vida das pacientes com câncer de mama. Dessa forma, os avanços da química computacional têm revolucionado a descoberta de fármacos ao permitir uma triagem virtual rápida e eficiente de muitos compostos em busca de moléculas com potencial atividade terapêutica. Por meio de métodos computacionais, como modelagem molecular, simulações de dinâmica molecular e técnicas de docking molecular, é possível prever a atividade e o potencial de interação de compostos com seus respectivos alvos, como a enzima PI3K. Assim, os polifenóis naftoquinônicos mostraram potente atividade inibitória sobre a enzima PI3K que é hiperativada em câncer de mama. Deste modo, a molécula que apresentar um menor valor de IC50, terá uma maior eficiência como inibidor da via PI3K/AKT/mTOR, como é o caso dos compostos PM-PIR-PANI e PM-PIR-SAL, abrindo perspectivas promissoras para futuras pesquisas e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas contra o câncer de mama.

Referências

AFRASIAB, Z. et al. Appended 1,2-naphthoquinones as anticancer agents 1: synthesis, structural, spectral and antitumor activities of ortho-naphthoquinone thiosemicarbazone and its transition metal complexes. **Inorganica Chimica Acta.**, v. 35, p. 271-278, 2004.

BERNS, K, et al. A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast. **Cancer Cell.**, v.12, p. 395-402, 2007.

CANTLEY, L.C. The phosphoinositide 3-kinase pathway. **Science** **296**, p. 1655-7, 2002.

CANTINELLI, FS; CAMACHO, RS; SMALETZ, O; GONSALES, BK; BRAGUITTONI, E; RENNÓ, JR. A oncopsiquiatria no câncer de mama: considerações a respeito de questões do feminino. **Rev Psiquiatr Clín.**, v. 33, n. 3, p. 124-33, 2006.

CHEN, J. et al. Chemically induced immunotoxicity in a medium-term multiorgan bioassay for carcinogenesis with Wistar rats. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 194, n. 2, p. 132-140, 2004.

FERREIRA, R. S; GLAUCIUS, O; ANDRICOPULO, A. D. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, v. 34, n.10, p.1770–1778, 2011.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

HENCKEL, J. G.; BILLINGS, E. M. Molecular modeling. **Principles of medicinal chemistry**, v.4, p. 57-58, 1995.

KNIGHT, Z. A. Small molecule inhibitors of the PI3-kinase family. **Curr Top Microbiol Immunol.**, v. 347, p. 263-78, 2010. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20473788>. Acesso em: 20 jul. 2023.

LEHNINGER, T. M., NELSON, D. L. & COX, M. M. Princípios de Bioquímica. 6ª Ed. **Artmed**. 2014

LI, H et al. Evaluation of an antibody-free ADP detection assay: ADP-Glo. **Assay Drug Dev. Technol.** v.7, p. 598-605, 2009.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em Produtos Naturais. **Quím Nova**, v. 24, n. 1, p. 105-111, 2001.

Manual Técnico ADP-Glo TM Lipid kinase Systems. Disponível em: <https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-manuals/101/adp-glo-lipid-kinase-assay-protocol/>. Acesso em: 15 jul. 2023.

MARTINI, M., VECCHIONE, L., SIENA, S., TEJPAR, S., BARDELLI A. Targeted therapies: How personal should we go? **Nat Rev Clin Oncol.** v.10, n.3, p.184-197, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2020 incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 10 jul. 2023.

NAKANISHI, S; KAKITA, S.; TAKAHASHI, I. et al. Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. **J Biol Chem.**, v. 267, p. 2157-2163, 1992.

OSAKI, M., OSHIMURA, M., & Ito, H. PI3K-Akt pathway: Its functions and alterations in human cancer. **Apoptosis.**, v 9, p. 667-676, 2004.

OKADA, T.; SAKUMA, L.; FUKUI, Y.; HAZEKI, O.; UI, M. Blockage of chemotactic peptide-induced stimulation of neutrophils by wortmannin as a result of selective inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase. **J Biol Chem.**, v.269 p.3563-3567, 1994.

PAPLOMATA E, O'REGAN R. The PI3K/AKT/mTOR pathway in breast cancer: targets, trials and biomarkers. **Ther Adv Med Oncol.** v.6, n.4, p.154-166, 2014.

RAZIS, E et al. Evaluation of the association of PIK3CA mutations and PTEN loss with efficacy of trastuzumab therapy in metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** v.128, p. 447 – 456, 2011.

ROY A. Plumbagin: A Potential Anti-cancer Compound. **Mini Rev Med Chem.** v.21, n.6, p.731-737, 2021.

VANHAESEBROECK, B; PERRY, MWD; BROWN, JR, ANDRE, F; OKKENHAUG, K. PI3K Inhibitors are Finally Coming of Age. **Nat Rev Drug Discov.** v.20, n.10, p.741-69, 2021.

ZEGZOUTI H, et al. ADP-Glo: A Bioluminescent and homogeneous ADP monitoring assay for kinases. **Assay Drug Dev Technol.** v.7, n.6, p.560-572, 2009.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e inovação do Espírito Santo (Edital Programa Primeiros Projetos nº 22-2018).