

Potencial de inibição de tirosina quinase de cafeatos fenólicos idealizados

Potential for inhibiting tyrosine kinase from idealized phenolic caffeates

RESUMO

Bruno Pereira Gabriel
brunogabriel0399@outlook.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Mayara Fernanda Strada
mayarastrada@outlook.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Adriano Lopes Romero
adrianoromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

Rafaelle Bonzanini Romero
rbromero@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campo Mourão, Paraná, Brasil.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, em 2018 foram registrados 582.590 novos casos de neoplasias no Brasil, configurando-se um problema de saúde pública. Esse cenário estimula a pesquisa e desenvolvimento (P&D) de novos agentes antineoplásicos. No entanto, a P&D é demorada e de alto custo quando realizado por métodos convencionais, de modo que a abordagem *in silico* tem se mostrado uma alternativa viável, tornando-a menos dispendiosa e demorada. Nessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um estudo *in silico* para avaliar as propriedades farmacocinéticas e o potencial de inibição de tirosina quinase de cafeatos fenólicos idealizados. Conforme os resultados obtidos, os compostos submetidos à análise apresentaram propriedades moleculares e farmacocinéticas condizentes para candidatos a fármacos. O estudo de ancoragem molecular mostrou que o cafeato de fenila, cafeato de *p*-salicilaldeida e cafeato de carvacrila interagiram no sítio ativo da tirosina quinase com energia, em kcal.mol⁻¹, foi -99,20, -88,07 e -99,90, respectivamente. Por conseguinte, os três cafeatos fenólicos mencionados apontaram potencial de inibição de tirosina quinase e são candidatos a agentes antineoplásicos.

PALAVRAS-CHAVE: Estudo *in silico*. Híbridos de ácido cafeico. Inibição enzimática.

ABSTRACT

According to the National Cancer Institute, 582.590 new cases of cancer were registered in Brazil in 2018, constituting a public health problem. This picture progressively stimulates research and development (R&D) of new antineoplastic agents. However, the R&D is disrupted and costly when carried out by application methods, so the *in silico* approach is shown as a viable alternative to these methodologies, making it less expensive and collapsed. In this perspective, the objective of this work was to develop an *in silico* study aiming to evaluate the pharmacokinetic properties and the potential of tyrosine kinase inhibition of idealized phenolic caffeates. According to the results obtained, the compounds used for analysis of the molecular and pharmacokinetic properties of drug candidates. The molecular anchorage study showed that caffeic acid: phenol, *p*-salicylaldehyde and carvacrol interacted in active site of tyrosine kinase with energy, in kcal.mol⁻¹, of -99.20, -88.07 and -99.90, respectively. By considering, the three phenolic caffeates indicated have potential for tyrosine kinase inhibition and are candidates for antineoplastic agents.

KEYWORDS: *In silico* study. Caffeic acid hybrids. Enzymatic Inhibition.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a estimativa global do câncer em 2018 foi de 18.078.957 casos (WHO, 2020). No Brasil, no mesmo ano, 582.590 casos de neoplasias foram registrados no país segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2019). O câncer é a segunda principal causa de morte e nos próximos anos a expectativa é que o número de casos de pessoas com câncer aumente no mundo em função do aumento da expectativa de vida, epidemiológica e demográfica da população. Atualmente, existem diversos procedimentos para tratamento de câncer (cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonoterapia, terapia alvo, imunoterapia, entre outros). Entretanto, apesar dos avanços alcançados na terapêutica oncológica, ainda hoje não há um sistema eficaz para tratamentos de todos os tipos de câncer, impulsionando a busca por antineoplásicos mais eficazes e seguros para quimioterapia oncológica (CARVALHEIRO et al., 2002). Como Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de fármacos requer altos investimentos do setor farmacêutico, é importante que se tenha uma otimização a fim de torná-lo viável. Neste contexto, nosso Grupo de Pesquisa tem trabalhado com estudos *in silico* (estudos computacionais) visando à obtenção de substâncias bioativas, derivadas de produtos naturais, de forma mais rápida e barata que as metodologias clássicas de P&D.

Diante disso, visando contribuir para o desenvolvimento de fármacos para quimioterapia oncológica, este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, a partir de estudos *in silico*, de híbridos moleculares do ácido cafeico com compostos fenólicos naturais (cafeatos fenólicos). Diversos estudos foram descritos na literatura especializada (e ainda são publicados atualmente) apresentando novos fármacos baseados em moléculas derivadas de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016). Dentre os produtos naturais bioativos, destacam-se os fenilpropanóides, como o ácido cafeico, que possui ação anti-inflamatória, antimutagênica, antimicrobiana e anticarcinogênica.

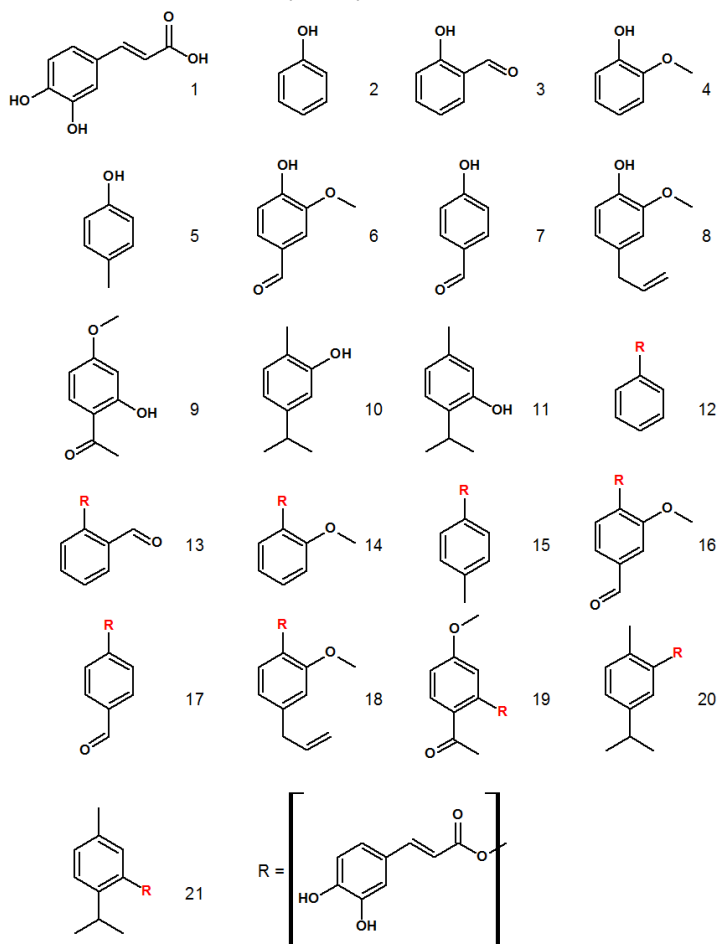
MATERIAS E MÉTODOS

Existem diversas ferramentas computacionais e banco de dados disponíveis para estudar atividades biológicas, propriedades ADMET e toxicidades de metabólitos de compostos bioativos. Neste estudo, utilizamos os seguintes ferramentas computacionais e banco de dados para realizar o estudo *in silico*: **ACD/ChemSketch**, para modelagem das estruturas moleculares; **Mollinspiration** e o **Swiss Target Prediction**, para predição das propriedades moleculares e bioatividades; **Protein Data Bank**, para *download* da enzima a ser utilizada no estudo de ancoragem molecular; **iGEMDOCK**, para estudo de ancoragem molecular; **admetSAR**, para predição de propriedades farmacocinéticas; **MetaTox**, para predição de metabólitos e suas toxicidades.

Por meio das ferramentas computacionais mencionadas anteriormente, avaliou-se *in silico* o potencial farmacológico de dez cafeatos fenólicos, **12-21**, derivados do ácido cafeico (**1**). Esses cafeatos fenólicos foram idealizados a partir da hibridação do ácido cafeico com os seguintes fenóis: fenol (**2**), *o*-salicilaldeído

(3), guaiacol (4), *p*-cresol (5), vanilina (6), *p*-salicilaldeído (7), eugenol (8), paeonol (9), carvacrol (10) e timol (11) (Figura 1).

Figura 1 – Representação do ácido cafeico (1), dos fenóis (2-11) e dos cafeatos fenólicos (12-21).



Fonte: Autoria própria (2020).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

PROPRIEDADES MOLECULARES E PREDIÇÃO DE BIOATIVIDADE

Os resultados obtidos na ferramenta *Molinspiration* indicam que nenhuma das moléculas em estudo (12-21) violaram os parâmetros de Lipinski (1997). De acordo com Lipinski (1997), a não violação da “regra dos cinco” garante a biodisponibilidade se administrado por via oral. Desse modo, é improvável que as substâncias avaliadas apresentem problemas por essa via de administração. Este resultado é importante considerando que a via de administração oral é econômica, fácil e auto administrada pelo paciente.

A predição de bioatividades, calculados na ferramenta *Molinspiration*, indicaram que o modelo mais promissor é o ligante em receptor nuclear, no qual todos os cafeatos apresentaram escores positivos. Vale ressaltar que, como a expressão de vários genes é regulada por receptores nucleares, os ligantes que

ativam esses receptores podem ter efeitos significativos no organismo. Muitos desses genes estão associados a doenças. Segundo Sladek (2011), os receptores nucleares estão entre os alvos de medicamentos mais populares para doenças humanas, tais como diabetes (tiazolenedionas), câncer (tamoxifeno), doenças cardíacas (fenofibratos), bem como para o estilo de vida (pílulas anticoncepcionais) e condições comportamentais (esteroides).

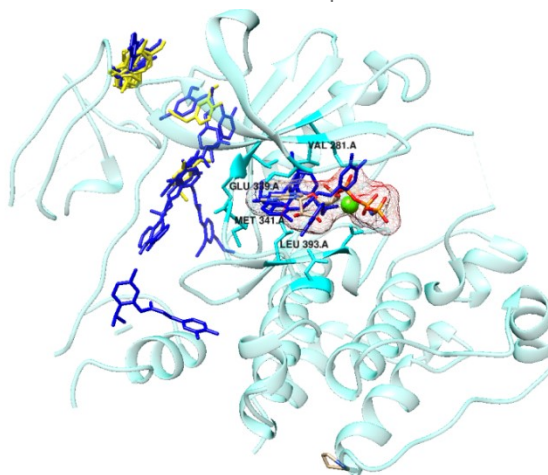
A partir da ferramenta *Swiss Target Prediction* (responsável por estimar potenciais alvo de um composto biologicamente ativo com base em uma quimioteca mantida pelo *SIB* (*Swiss Institute of Bioinformatics*) verificou-se que os compostos **12**, **17**, **18**, **20** e **21** são potenciais inibidores de proteínas tirosina quinase, que estão associadas ao câncer. Assim, é provável que essas substâncias apresentem atividade anticancerígena ao inibir esse tipo de enzima. A associação das proteínas tirosinas quinases com o câncer está bem estabelecida na literatura (AVILA; ROMEIRO, 2010), que tem demonstrado que essas proteínas se encontram desreguladas em tumores, mantendo o processo de fosforilação, que leva os sinais de transdução a um estado permanentemente ativado.

ESTUDO DE ANCORAGEM MOLECULAR EM DOMÍNIO TIROSINA QUINASE

O estudo de ancoragem molecular foi realizado na ferramenta *iGEMDOCK*, os cafeatos fenólicos (**12-21**) foram estudados frente ao receptor tirosina quinase (PDB: 1AD5). Vale ressaltar que, em um estudo de ancoragem molecular, quando as moléculas em estudo se ancoram no sítio ativo da enzima significa que as mesmas possuem potencial de inibição da enzima-alvo por um mecanismo competitivo.

O sítio ativo do receptor tirosina quinase avaliado neste trabalho é envolto pelos resíduos de aminoácidos Met-341, Glu-339, Leu-393 e Val-281 (SICHERI; MOAREFI; KURIYAN, 1997). Nota-se (Figura 2) que os compostos [destacados em amarelo (**1-11**) e em azul (**12-21**) na Figura 2] se aglomeraram em diferentes regiões da enzima e apenas alguns interagiram no sítio ativo especificado para o domínio.

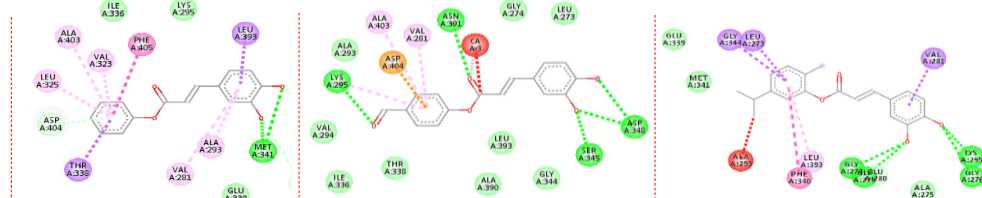
Figura 2 – Resultado do estudo de ancoragem molecular dos compostos **1-21** com o domínio tirosina quinase.



Fonte: Autoria própria (2020).

Os compostos **12**, **17** e **20** (Figura 3) interagiram com alguns dos resíduos de aminoácidos (Met-341, Glu-339, Leu-393 e Val-281) do sítio ativo do receptor tirosina quinase, assim, possuem potencial para inibir essa enzima. A energia livre da interação enzima-ligante (-99,20; -88,07 e -99,90 kcal.mol⁻¹, respectivamente) para essas substâncias é constituída majoritariamente por interações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Leu-393 e Val-281 e, também, em menor intensidade, por ligações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos Glu-339 e Met-341. Os valores de energia de interação enzima-ligante indicam que os compostos **12** e **20** apresentam interações mais efetivas no sítio ativo da enzima em relação ao composto **17**. Por conseguinte, os compostos **12**, **17** e **20** competem com o substrato natural pelo acesso ao sítio ativo da tirosina quinase, o que implica em um mecanismo de inibição competitiva dessa enzima, impossibilitando sua atividade enzimática.

Figura 3 – Representação 2D das interações do sítio ativo da tirosina quinase com os compostos **12**, **17** e **20**, respectivamente.



Fonte: Autoria própria (2020).

PROPRIEDADES ADMET (ABSORÇÃO, DISTRIBUIÇÃO, METABOLISMO, EXCREÇÃO E TOXICIDADE)

Os resultados obtidos na ferramenta *admetSAR* mostram que os compostos **12-21** possuem baixa toxicidade, logo, é improvável que esses compostos sejam nocivos para o organismo. Além disso, os valores foram negativos para o modelo de carcinogenicidade e mutagenese (Teste AMES). Os seguintes cafeatos fenólicos devem inibir isoformas da proteína P450 (CYP2C9 e CYP1A2): **14**, **15**, **16**, **18**, **20** e **21**, o que não é vantajoso para o organismo, pois a inibição de isoformas de CYP450 minimiza o sistema de defesa contra agentes químicos. Entretanto, o bloqueio de somente duas isoformas de CYP450 é insustentável para avaliar sua nocividade para o organismo.

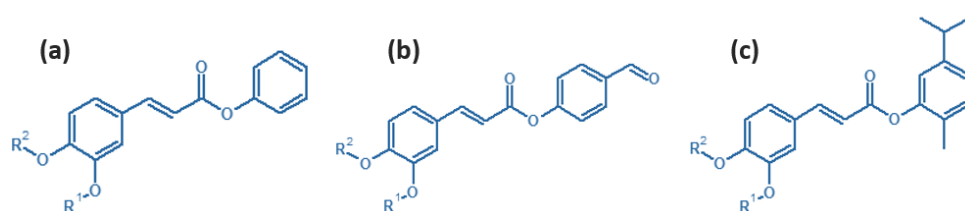
Os modelos de células Caco-2 e de Glicoproteína-P estão relacionados à absorção dos compostos se administrado por via oral. Observou-se que os compostos **13**, **17** e **18** não permeiam células Caco-2, logo, se não forem absorvidos no estômago, não podem ser administrados por via oral (YEE, 1997). Segundo Lin e Yamazaki (2003), moléculas substratos da Glicoproteína-P diminuem sua magnitude de permeabilidade de células Caco-2, dessa forma elas interferem na fase de absorção. As substâncias **12-21** não são substratos da Glicoproteína-P, nem mesmo inibidores, portanto os resultados indicam boa permeabilidade para maioria dos candidatos, excetuando-se os compostos **13**, **17** e **18**, como foi mencionado.

PREDIÇÃO E TOXICIDADE DE METABÓLITOS

O estudo dos metabólitos foi feito somente para os compostos que demonstraram potencial farmacológico nos estudos *in silico* mencionados anteriormente.

A ferramenta *MetaTox* apontou seis possíveis metabólitos para cada cafeato fenólico avaliado. Os grupos hidroxilas (R^1 e R^2) – pertencentes a estrutura do ácido cafeico (Figura 4) – sofreram reações de metilação, sulfuração e glucuronidação, dando origem aos respectivos metabólitos.

Figura 4 - Representação do (a) cafeato de fenila, (b) cafeato de salicilaldeila e (c) cafeato de carvacrila indicando os pontos de metabolização (R^1 e R^2).



Fonte: Autoria própria (2020).

Assim, para os metabólitos de **1** a **6** do cafeato de fenila {figura 3(a)}: (**1**) R^1 = metila e R^2 = H; (**2**) R^1 = H e R^2 = metila; (**3**) R^1 = sulfurila e R^2 = H; (**4**) R^1 = H e R^2 = sulfurila; (**5**) R^1 = glucuronida e R^2 = H; (**6**) R^1 = H e R^2 = glucuronida. Analogamente, tem-se as estruturas dos metabólitos do cafeato de salicilaldeila {Figura 3(b)} e do cafeato de carvacrila {figura 5(c)}. Dentre os cafeatos fenólicos em estudo, o cafeato de carvacrila formou os metabólitos mais tóxicos (Quadro 1), principalmente aqueles que são produtos da metilação dos radicais OH, como é o caso dos compostos **1** e **2**. Mesmo assim, a toxicidade oral aguda deles está dentro do padrão (categoria III, $500 \text{ mg/kg} \leq \text{LD}_{50} \leq 5000 \text{ mg/kg}$) e não é nociva ao organismo. Os cafeatos de fenila e salicilaldeila formaram metabólitos cuja toxicidade foi ainda menor que a do cafeato de carvacrila. Portanto, os metabólitos derivados dos cafeatos fenólicos demonstraram não apresentar toxicidade ao ser humano, logo não devem causar reações adversas graves ao organismo a princípio. Vale ressaltar que não há trabalhos na literatura especializada sobre estudo dos metabólitos para os referidos cafeatos. Assim, considera-se no âmbito do estudo *in silico* que o limite teórico para LD_{50} aceito deve ser no mínimo entre 500 mg/kg e 5000 mg/kg .

Quadro 1 – Toxicidade oral aguda dos metabólitos dos cafeatos fenólicos avaliados.

Metabólito	Reação	Cafeato de Fenila	Cafeato de Salicilaldeila	Cafeato de Carvacrila
		Toxicidade Oral Aguda (mg/kg)		
1	Metilação	1.182,00	2.336,00	556,85
2		1.193,00	2.320,84	560,71
3	Sulfuração	4.204,00	5.451,00	2.326,00
4		4.234,00	5.489,00	2.237,00
5	Glucuronidação	6.395,00	8.474,00	8.930,00
6		6.336,00	8.416,00	8.868,00

Fonte: Autoria própria (2020).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados neste trabalho, pode-se constatar que as substâncias **12**, **17** e **20** possuem características (propriedades ADMET, de inibição da enzima tirosina quinase e baixa toxicidade dos possíveis metabólitos gerados) adequadas para novos fármacos para o tratamento de câncer. Tais fatos estimulam a continuidade de pesquisas complementares visando a síntese e, posteriormente, a avaliação *in vivo* dos três cafeatos fenólicos mencionados para confirmar o potencial antitumoral e os efeitos colaterais dessas substâncias.

REFERÊNCIAS

CARVALHEIRO, J. R. et al. O crucial debate da ciência no limiar do século 21. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 7, n. 1, p. 17-41, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil** / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

LIN, J. H.; YAMAZAKI, M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics. **Clinical pharmacokinetics**, v. 42, n. 1, p. 59-98, 2003.

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. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

SICHERI, F.; MOAREFI, I.; KURIYAN, J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. **Nature**, v. 385, n. 6617, p. 602-609, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. 2020.