



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

FELIPE RAMOS ALEXANDRE

**PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA E EFEITO PROTETOR DO ANÁLOGO
SINTÉTICO DA CURCUMINA (1E,4E)-1,5-DIFENILPENTA-1,4-DIEN-3-ONA NA
LESÃO CELULAR RENAL CAUSADA POR GENTAMICINA E NA INTERAÇÃO
COM NADPH OXIDASE-4**

FORTALEZA

2023

FELIPE RAMOS ALEXANDRE

PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA E EFEITO PROTETOR DO ANÁLOGO SINTÉTICO
DA CURCUMINA (1E,4E)-1,5-DIFENILPENTA-1,4-DIEN-3-ONA NA LESÃO
CELULAR RENAL CAUSADA POR GENTAMICINA E NA INTERAÇÃO COM NADPH
OXIDASE-4

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Linha de pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- A369p Alexandre, Felipe Ramos.
Predição farmacocinética e efeito protetor do análogo sintético da curcumina (1e,4e)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona na lesão celular renal causada por gentamicina e na interação com NADPH oxidase-4 / Felipe Ramos Alexandre. – 2023.
66 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Mestrado Profissional em Saúde da Família, Fortaleza, 2023.
Orientação: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.
1. Curcumina. 2. Gentamicina. 3. Lesão renal. 4. NADPH oxidase. 5. Docking molecular. I. Título.
CDD 610
-

PREDIÇÃO FARMACOCINÉTICA E EFEITO PROTETOR DO ANÁLOGO
SINTÉTICO DA CURCUMINA (1E,4E)-1,5-DIFENILPENTA-1,4-DIEN-3-ONA NA
LESÃO CELULAR RENAL CAUSADA POR GENTAMICINA E NA INTERAÇÃO
COM NADPH OXIDASE-4

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia,
Odontologia e Enfermagem, da
Universidade Federal do Ceará.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC) – Orientador

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Glayciane Bezerra de Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”

Carl Sagan

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha companheira e esposa Geórgia por sempre está do meu lado e me apoiar durante todo esse percurso.

Agradeço aos meus pais Edmilson e Leuda por terem me criado e dado todo o suporte para que nunca me faltasse nada, durante todos esses anos.

Agradeço a minha irmã Sabrina pelos bons momentos e por ter estado sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu avô paterno Francisco e minha avó materna Maria, por todos os bons momentos e lembranças que me deram.

Agradeço ao meu orientador professor Ramon Pessoa por ter me recebido e me acolhido para ser meu orientador durante todo o processo que me levou até aqui. Agradeço por todo o conhecimento e pela confiança depositada em mim.

Agradeço a professora Alice Maria, por todo apoio e desenvolvimento desse trabalho e por ter cedido o espaço do laboratório.

Agradeço aos professores Tiago Sampaio e Janete Eliza por todo o conhecimento que me passaram para concluir minha formação.

Agradeço aos amigos Emanuel, Igor, Lyanna, Felipe, Mac, Mateus, Pedro, Yasmin, Izabell por toda a ajuda que me forneceram para a conclusão do meu mestrado.

Agradeço a todos do LBFBC e do LabTOX pelo acolhimento e ajuda durante todas as etapas do mestrado.

Agradeço aos laboratórios LabTOX e LBFBC por disponibilizar o espaço e dar todo suporte necessário para conclusão desse trabalho.

Agradeço a toda a minha família que sempre me apoia e me ajuda.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela promoção do meu crescimento pessoal e intelectual.

A Universidade Federal do Ceará, por toda a estrutura e suporte que fornece a ciência do estado e do Brasil.

A todos que contribuíram nessa jornada e me acompanharam, muito obrigado!

RESUMO

Os aminoglicosídeos são uma classe de antimicrobianos úteis no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Apesar disso, o uso desses fármacos, incluindo a gentamicina (GT), é limitado devido à ocorrência de nefrotoxicidade. Dessa forma, o desenvolvimento de fármacos nefroprotetores pode ser uma estratégia válida para a prevenção da nefrotoxicidade associada a esse fármaco. A curcumina é um composto extraído da cúrcuma (*Curcuma longa* L.) que, apesar de possuir diversas bioatividades, apresenta baixa biodisponibilidade. Nesse sentido, análogos sintéticos têm sido desenvolvidos, como o derivado (1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (DBA), que se apresenta um grupo monocarbonil na cadeia aberta e ausência de substituições nos anéis. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivo analisar as características farmacocinéticas e o efeito protetor de DBA sobre a lesão celular renal induzida por gentamicina em modelo *in vitro*, e as interações teóricas entre DBA e a enzima NADPH oxidase-4 (NOX4). As características físico-químicas e farmacocinéticas preditivas foram investigadas através métodos computacionais *in silico* e comparadas às observadas para a curcumina. Células HK2 foram expostas a GT e submetidas ao pré- e pós-tratamento com DBA, para avaliação do efeito protetor, através do ensaio de redução do MTT. O estresse oxidativo foi medido pela determinação dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona reduzida (GSH), e alterações na função mitocondrial, pela marcação com rodamina 123. A interação *in silico* de DBA com NOX4 foi avaliada por docking molecular. O curcuminoide DBA apresentou boas características farmacocinéticas nos ensaios *in silico*. Nos ensaios *in vitro* o curcuminoide DBA melhorou a viabilidade celular e o potencial transmembrânico, nas concentrações de 31,25 e 15,62 μM . Foi observado diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio e da despolarização mitocondrial, além de aumento de GSH e diminuição de TBARS. Dessa forma, o curcuminoide DBA protegeu as células HK2 contra o dano oxidativo causada por GT. No ensaio de docking molecular, DBA interagiu em região semelhante ao inibidor apocinina, com melhor energia de interação. Em conclusão, DBA apresentou efeito protetor sobre a lesão celular renal induzida por gentamicina, com redução da lesão mitocondrial e do estresse oxidativo. Esse efeito pode estar relacionado à inibição de NOX4.

Palavras-chave: Curcumina; aminoglicosídeos; Lesão renal; NADPH oxidase; Docking molecular.

ABSTRACT

Aminoglycosides are a class of antimicrobial drugs useful in the treatment of infections caused by Gram-negative bacteria. However, the use of these drugs, including gentamicin (GT), is limited due to the occurrence of nephrotoxicity. Therefore, the development of nephroprotective drugs may be a valid strategy for preventing nephrotoxicity associated with this drug. Curcumin is a compound extracted from turmeric (*Curcuma longa* L.) that, despite having various bioactivities, has low bioavailability. In this sense, synthetic analogs have been developed, such as the derivative (1E,4E)-1,5-diphenylpent-1,4-dien-3-one (DBA), which has a monocarbonyl group in the open chain and no substitutions in the rings. Thus, the present study aimed to analyze the pharmacokinetic characteristics and protective effect of DBA on gentamicin-induced renal cell injury in an *in vitro* model, as well as the theoretical interactions between DBA and the enzyme NADPH oxidase-4 (NOX4). The physicochemical and predictive pharmacokinetic characteristics were investigated using *in silico* computational methods and compared to those observed for curcumin. HK2 cells were exposed to GT and subjected to pre- and post-treatment with DBA to evaluate the protective effect using the MTT reduction assay. Oxidative stress was measured by determining the levels of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and reduced glutathione (GSH), and changes in mitochondrial function were assessed by staining with rhodamine 123. The *in silico* interaction of DBA with NOX4 was evaluated by molecular docking. The curcuminoid DBA showed good pharmacokinetic characteristics in the *in silico* assays. In the *in vitro* assays, the curcuminoid DBA improved cell viability and transmembrane potential at concentrations of 31.25 and 15.62 μM . Decreased production of reactive oxygen species and mitochondrial depolarization were observed, along with increased GSH and decreased TBARS. Thus, the curcuminoid DBA protected HK2 cells against oxidative damage caused by GT. In the molecular docking assay, DBA interacted in a region similar to the inhibitor apocynin, with a better interaction energy. In conclusion, DBA exhibited a protective effect on gentamicin-induced renal cell injury, reducing mitochondrial damage and oxidative stress. This effect may be related to the inhibition of NOX4.

Keywords: Curcumin; Aminoglycosides; Renal injury; NADPH oxidase; Molecular docking.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ΔG – Energia de afinidade

ADME – Absorção, distribuição, metabolização e excreção.

AIH – Absorção intestinal humana.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BHE – Barreira hematoencefálica.

CUR – Curcumina.

DBA – (1*E*,4*E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona.

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium.

DMSO – Dimethylsulfóxido.

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio.

ESOL – *Estimated Solubility*.

FDA – *Food and Drug Administration*

GSH – Glutathiona Reduzida.

GSSG – Glutathiona oxidada.

GT – Gentamicina.

IND – *Investigational New Drug*.

HK2 – Células Human Kidney 2.

LOGP – Coeficiente de partição octanol-água

MDA – Malondialdeído.

MTT – 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide.

NADPH – Nicotinamida e Adenina Dinucleotídeo Fosfato.

NO – Óxido nítrico.

NOX4 – NADPH Oxidase Isoforma 4.

PBS – Phosphate Buffer Solution.

PDB – *Protein Data Bank*.

RE – Retículo endoplasmático.

Rho123 – Rodamina 123.

RMSD – *Root Mean Square Deviation*.

SDS – Dodecilsulfato de Sódio.

SOD – Superóxido dismutase.

TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances.

TGF – Taxa de filtração glomerular.

TGF- β – Fator transformador de crescimento β .

TPSA – Superfície polar topológica.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1 – Representação estrutural de curcumina e DBA.....	30
Tabela 1 – Absorção no trato gastrintestinal para pH 7,4.....	31
Tabela 2 – Taxa de ligação a proteínas plasmáticas.....	32
Tabela 3 – Permeação pela barreira hematoencefálica.....	32
Tabela 4 – Propriedades físico-químicas de DBA e CUR.....	39
Tabela 5 – Predição de solubilidade em água e lipofilicidade de DBA e CUR.....	40
Tabela 6 – Absorção gastrintestinal, permeação pela barreira hematoencefálica, ligação a proteínas plasmáticas, interação com glicoproteína-P e <i>druglikeness</i>	41
Tabela 7 – Energia de afinidade e valores RMSD dos complexos formados por DBA e apocinina na enzima NADPH-oxidase-4 (NOX4).....	46
Tabela 8 – Interações entre DBA e apocinina com NADPH-oxidase 4 (NOX4).....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da Gentamicina (A), Tobramicina (B) e Amicacina (C).....	17
Figura 2 – Principais curcuminoides naturalmente encontrados no rizoma de <i>Curcuma longa</i> L.....	21
Figura 3 – Representação estrutural de DBA.....	23
Figura 4 – Predição de biodisponibilidade oral e permeação pela BHE pelo método BOILED Egg.....	40
Figura 5 – Efeito de GT sobre a viabilidade de células HK2.....	42
Figura 6 – Efeito citotóxico de DBA em células HK2.....	42
Figura 7 – Viabilidade celular de células HK2 pré-tratadas com DBA e submetidas a lesão tubular renal com GT.....	43
Figura 8 – Viabilidade celular de células HK2 submetidas à lesão celular renal induzida por GT e, em seguida, tratadas com DBA.....	43
Figura 9 – Avaliação dos níveis celulares de TBARS e GSH em células HK2 submetidas à lesão celular induzida por GT e tratadas com DBA.....	44
Figura 10 – Potencial transmembrânico mitocondrial de células HK2 submetidas à lesão celular renal induzida por GT e tratadas com DBA.....	45
Figura 11 – Simulação de acoplamento da molécula DBA com a isoforma NOX4 por <i>Docking</i> molecular.....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
1.1 Aminoglicosídeos, gentamicina e nefrotoxicidade.....	16
1.1.1 <i>Mecanismos de nefrotoxicidade induzida por gentamicina.....</i>	18
1.1.2 <i>Papel da enzima NADPH-oxidase no mecanismo nefrotóxico da gentamicina.....</i>	19
1.2 Curcumina e análogos sintéticos.....	21
1.3 Desenvolvimento de novos fármacos e modelos preditivos de avaliação farmacocinética.....	23
2. Justificativa.....	26
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo Geral.....	28
3.2 Objetivos Específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
4.1 Moléculas em estudo.....	30
4.2 Predição <i>in silico</i> ADME.....	30
4.2.1 <i>Predição de características físico-químicas.....</i>	31
4.2.2 <i>Predição de características farmacocinéticas.....</i>	31
4.2.3 <i>Druglikeness.....</i>	32
4.3 Ensaio com cultura de células.....	33
4.3.1 <i>Obtenção, cultivo e manutenção da linhagem celular HK2.....</i>	33
4.3.2 <i>Avaliação de viabilidade celular.....</i>	33
4.3.3 <i>Avaliação do efeito protetor do derivado curcuminoide DBA na lesão celular renal induzida por GT em modelos de pré-tratamento e pós-tratamento.....</i>	34
4.3.4 <i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial.....</i>	34
4.3.5 <i>Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células renais.....</i>	35
4.4 Docking molecular.....	36
4.5 Análise Estatística.....	37

5. RESULTADOS	39
5.1 Predição farmacocinética	39
5.2 Ensaio <i>in vitro</i>	41
5.2.1 <i>Efeito citotóxico da GT sobre células HK2</i>	41
5.2.2 <i>Citotoxicidade do derivado curcuminoide DBA</i>	42
5.2.3 <i>Efeito protetor de DBA contra a lesão em células tubulares renais induzida por GT induzida por GT</i>	43
5.2.4 <i>Avaliação de estresse oxidativo</i>	44
5.2.5 <i>Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial</i>	44
5.3 Ensaio de <i>Docking</i> molecular	45
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS	60

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

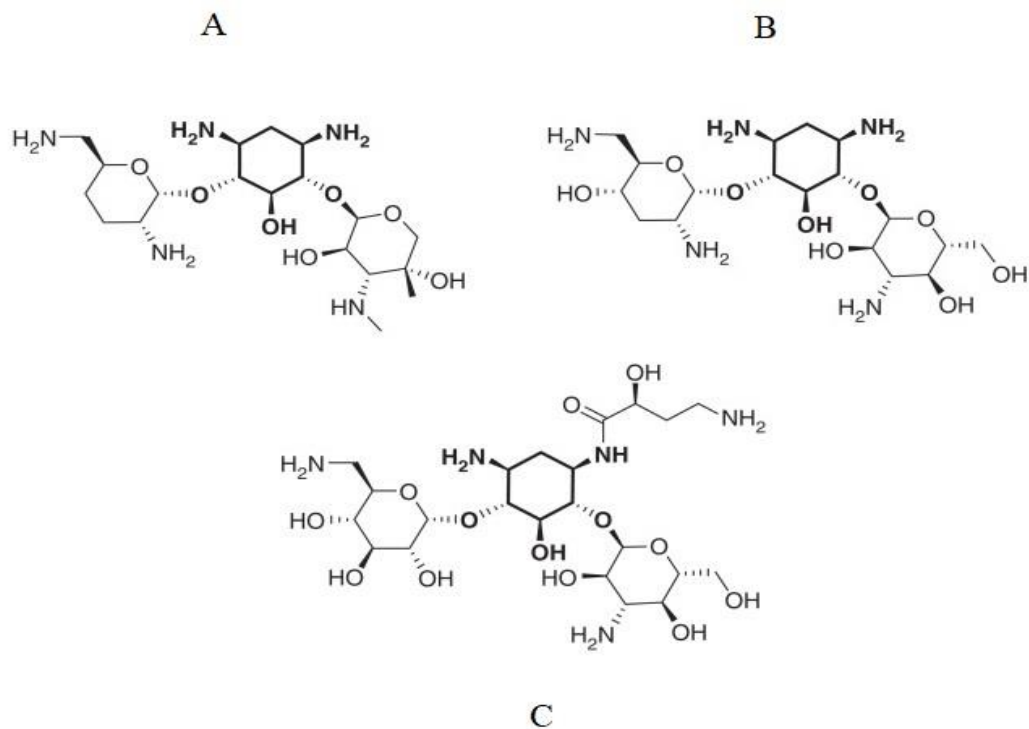
1.1 Aminoglicosídeos, gentamicina e nefrotoxicidade

Os aminoglicosídeos são compostos básicos devido os grupos aminos a depender do pH do meio. Na presença de pH ácidos formam cátions a partir da protonação dos nitrogênios de grupos aminos adquirindo uma forma protonada, dessa forma estabelecem ligações eletrostáticas com resíduos carregados negativamente na membrana externa de bactérias Gram-negativas (KUDO; EGUCHI, 2009).

O transporte através da membrana citoplasmática bacteriana, que depende de oxigênio, é prejudicado em ambientes anaeróbios, limitando a eficácia dos aminoglicosídeos. Além disso, condições de alta osmolaridade e baixo pH também inibem esse processo, afetando potencialmente a atividade dos aminoglicosídeos nos tecidos pulmonares. Por sua vez, esses compostos interagem com a subunidade 30S dos ribossomos procarióticos, induzindo alterações na estrutura do sítio A do rRNA 16S. Essa modificação permite a ligação de moléculas de tRNA não compatíveis, resultando em erros de tradução do código genético. Os produtos proteicos defeituosos resultantes estimulam a formação de radicais livres que levam à morte bacteriana (JACKSON; CHEN; BUISING, 2013).

Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos têm sido empregados no manejo de infecções causadas por bacilos Gram-negativos em indivíduos há quase 50 anos. Alguns dos principais agentes aminoglicosídeos que ainda são utilizados são a gentamicina, tobramicina e amicacina (Figura 1) (CRAIG, 2011).

Figura 1 – Estrutura da Gentamicina (A), Tobramicina (B) e Amicacina (C).



Fonte: Adaptado de (KRAUSE et al., 2016)

Os aminoglicosídeos, como a gentamicina, tobramicina e amicacina são os principais antibióticos usados no tratamento de infecções graves, mas seu uso é limitado devido aos efeitos adversos. A ototoxicidade e a nefrotoxicidade são os principais efeitos colaterais associados ao uso desses medicamentos. A ototoxicidade se manifesta como perda de audição e pode ser irreversível. A nefrotoxicidade é caracterizada pela lesão renal, causando danos aos túbulos renais, redução da taxa de filtração glomerular e diminuição do fluxo sanguíneo renal. Apesar desses efeitos adversos, os aminoglicosídeos ainda são usados como opção de tratamento devido à sua eficácia contra bactérias resistentes a outros antibióticos, mas seu uso deve ser cuidadosamente monitorado para evitar danos aos rins e à audição do paciente (YAO et al., 2020).

Os fármacos nefrotóxicos podem exercer seus efeitos por um ou mais mecanismos patogênicos comuns. Apesar da ação bactericida rápida e baixo custo dos aminoglicosídeos, os efeitos adversos e nefrotoxicidade tem reduzido o seu uso clínico (BALAKUMAR; ROHILLA; THANGATHIRUPATHI, 2010).

1.1.1 Mecanismos de nefrotoxicidade induzida por gentamicina

Os mecanismos envolvidos na nefrotoxicidade da gentamicina (GT) e de outros aminoglicosídeos não estão completamente elucidados. Existem evidências de que aminoglicosídeos, como a GT, exercem seus efeitos nefrotóxicos por meio de três mecanismos principais: toxicidade tubular renal, redução da filtração glomerular e redução do fluxo sanguíneo (WARGO; EDWARDS, 2014).

A toxicidade tubular renal é considerada o principal mecanismo pelo qual esse grupo de fármacos causam nefrotoxicidade. No túbulo proximal, esses agentes sofrem endocitose e se concentram nos lisossomos, no complexo de Golgi e no retículo endoplasmático (RE) (WARGO; EDWARDS, 2014). O RE é uma organela celular eucariótica que possui um importante papel no dobramento, exportação e processamento de proteínas e na regulação da homeostase de Ca^{2+} e apoptose. Tem sido demonstrado que o acúmulo de GT no retículo endoplasmático pode levar ao estresse do RE e à ativação da resposta de proteína desdobrada (ZHANG et al., 2006).

Após a endocitose, uma vez atingido um limiar, os aminoglicosídeos esvaziam-se no citosol das células do túbulo proximal e agem nas mitocôndrias induzindo apoptose e necrose. Além disso, inibem vários transportadores no túbulo proximal, o que afeta a reabsorção tubular e compromete a viabilidade celular. Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas após tratamento com GT, que são importantes mediadores na indução de dano renal (CUZZOCREA et al., 2002). A GT aumenta a produção de ânions superóxido, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio nas mitocôndrias corticais renais (SAID, 2011). As ERO induzem lesão e morte celular, ligados ao estresse do RE (CROW et al., 2004).

O estresse do RE também leva ao aumento dos níveis de cálcio citosólico que induzem a ativação da calpaína e a ativação da caspase-12 (FRIBLEY; ZHANG; KAUFMAN, 2009). O estresse prolongado do RE causa um aumento da proteína homóloga do fator de transcrição C/EBP (CHOP), essa por sua vez leva à ativação de Bax/Bak e caspase (SZEGEZDI et al., 2006), com consequente morte celular das células dos tubos proximais por apoptose.

Um dos primeiros sinais clínicos de dano renal durante tratamento com GT são o aumento na excreção urinária de cálcio, magnésio, proteínas e outros ânions orgânicos, resultando em quadros de hipocalcemia, hipomagnesemia e proteinúria. O aumento da excreção de potássio e sódio pode ser observado junto ao aumento da creatinina sérica, à medida que o dano renal continua. No glomérulo, os aminoglicosídeos causam contração mesangial, que leva

à diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG) (MARTÍNEZ-SALGADO; LÓPEZ-HERNÁNDEZ; LÓPEZ-NOVOA, 2007; WARGO; EDWARDS, 2014).

Os aminoglicosídeos causam aumentos nos níveis de cálcio nas células mesangiais por vários mecanismos, levando a contração mesangial, que incluem a indução da secreção do fator ativador de plaquetas, ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, produção de vasoconstritores, como endotelina 1 e tromboxano A2, e aumento de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. Ao aumentar os níveis de cálcio intracelular por meio desses mecanismos, as células mesangiais se contraem, levando à diminuição da TFG (WARGO; EDWARDS, 2014).

Por fim, temos o último mecanismo de nefrotoxicidade da GT que é a redução do fluxo sanguíneo renal secundária ao aumento da resistência vascular no leito vascular renal, que ocorre inicialmente após o dano ao túbulo proximal, como uma forma de prevenir a perda de fluidos e eletrólitos. Conseqüentemente, à medida que a endotelina 1 e o tromboxano A2 são liberados, ocorre uma redução no fluxo sanguíneo renal, dessa forma, diminuindo a TFG. (WARGO; EDWARDS, 2014).

Cerca de 30% dos pacientes que receberam GT por mais de sete dias apresentam sinais de nefrotoxicidade, caracterizados por aumento nos níveis séricos de creatinina e ureia, diminuição na depuração renal e no volume de urina, além de necrose tubular renal proximal grave, levando ao quadro de disfunção e insuficiência renal grave (ABDEL-RAHEEM; ABDEL-GHANY; MOHAMED, 2009). Dessa forma, seu uso tem sido menos frequente, apesar de seu amplo espectro antimicrobiano e baixo custo.

Nesse sentido, autores tem se preocupado em manejar a nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeos, seja pela prevenção ou tratamento de dano renal em pacientes sujeitos à farmacoterapia com essa classe de fármacos (HAKYEMEZ et al., 2022; ZAIDI; USMAN, 2021). Dessa maneira, almeja-se aumentar a utilização dessa classe de fármacos, uma vez que seu uso é importante no tratamento de infecções em ambiente hospitalar.

1.1.2 Papel da enzima NADPH-oxidase no mecanismo nefrotóxico da GT

A gentamicina induz estresse oxidativo por diferentes mecanismos. Quando a concentração intracelular de GT nos endossomos de células do tubo proximal e alcança um limiar específico, ocorre a ruptura de suas membranas, resultando na liberação do seu conteúdo, incluindo a própria GT, para o citoplasma. No citoplasma, GT exerce efeitos diretos e indiretos nas mitocôndrias. Por um lado, GT desencadeia a ativação da via de apoptose intrínseca,

levando à perturbação do equilíbrio celular e à ativação de cascatas apoptóticas, além disso a GT pode interferir na função do retículo endoplasmático levando ao estresse oxidativo (RANDJELOVIĆ et al., 2017).

Dessa forma, GT interfere com a função da cadeia respiratória mitocondrial direta e indireta, levando a uma interrupção na produção de ATP, o principal combustível energético celular. Esses efeitos culminam em um estado de estresse oxidativo, caracterizado pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), como ânion superóxido e radical hidroxila (RANDJELOVIĆ et al., 2017).

Os mecanismos antioxidantes celulares têm um papel crucial na proteção dos tecidos contra danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ERO). As ERO são produzidas durante o metabolismo celular normal e podem causar lesão celular e tecidual quando presentes em excesso. Entretanto, as células possuem um sistema de defesa abrangente que inclui enzimas antioxidantes, como superóxido dismutase (SOD), peroxidase e substâncias endógenas, como glutathiona (GSH) e vitamina E, que têm a capacidade de neutralizar as ERO. Além disso, o óxido nítrico (NO) também desempenha um papel importante como antioxidante celular, interagindo com as ERO para formar espécies reativas de nitrogênio menos prejudiciais. Esses mecanismos antioxidantes ajudam a manter a homeostase redox e protegem os tecidos contra danos oxidativos, contribuindo para a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como câncer, diabetes, neurodegeneração e envelhecimento (HE et al., 2017).

A NADPH-oxidase (Nicotinamida e Adenina Dinucleotídeo Fosfato) é uma enzima que desempenha um papel crucial na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo. Sua principal reação é a transferência de elétrons do NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) para o oxigênio molecular, resultando na geração de ERO, como o superóxido (O_2^-). Essa reação ocorre nas membranas celulares, mais especificamente nas membranas fagossômicas e plasmáticas, onde as diferentes isoformas da NADPH oxidase estão localizadas (CHOCRY; LELOUP, 2019a).

Diversas isoformas da NADPH oxidase foram identificadas, incluindo a NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 e DUOX2. Cada isoforma tem uma distribuição específica nos tecidos. Por exemplo, a NOX2 é amplamente expressa em células do sistema imunológico, como neutrófilos e macrófagos, enquanto a NOX4 é encontrada em vários tecidos, incluindo rins, pulmões e vasos sanguíneos. A DUOX1 e a DUOX2 estão presentes em tecidos secretórios, como glândulas salivares, tireoide e trato respiratório (GRASBERGER; REFETOFF, 2006; KIKUCHI et al., 2000; SUMIMOTO; MIYANO; TAKEYA, 2005).

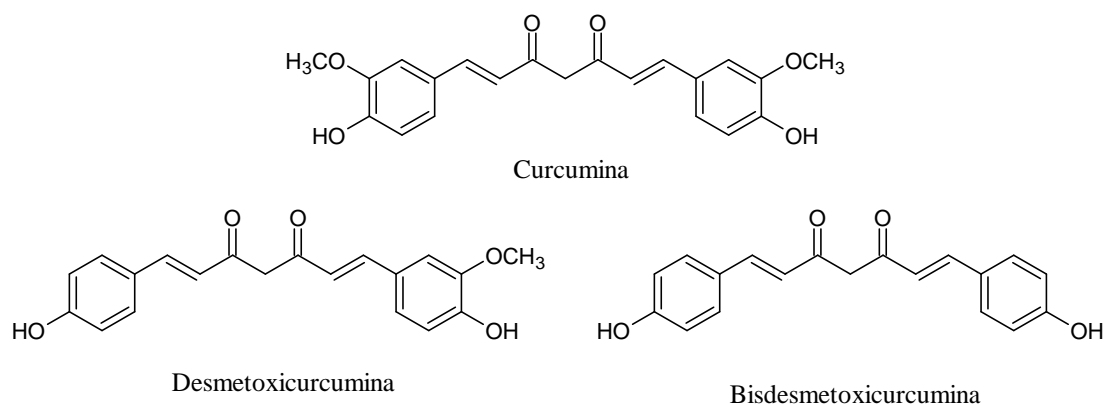
A associação entre a NADPH oxidase e o dano renal tem sido bastante estudada. A produção excessiva de ERO pela NADPH oxidase nos rins tem sido observada em várias doenças renais, como a nefropatia diabética e a doença renal crônica (YAO et al., 2022). O estresse oxidativo causado pelos altos níveis de ERO leva à disfunção renal, inflamação e fibrose (WU et al., 2018). Além disso, a ativação desregulada da NADPH oxidase pode contribuir para a progressão da lesão renal induzida por fatores como hipertensão, obesidade e inflamação (CHEN et al., 2020). Diante disso, a inibição seletiva da NADPH oxidase tem sido considerada uma abordagem terapêutica promissora para o tratamento de doenças renais.

A GT pode ativar NOX em células mesangiais, levando a um aumento na produção de ERO e consequentemente ao estresse oxidativo. Esse aumento de ERO pode contribuir para o desenvolvimento da nefrotoxicidade induzida por GT (MORALES et al., 2006). Portanto, direcionar a atividade da NOX pode ser uma estratégia terapêutica potencial para prevenir ou tratar a nefrotoxicidade induzida pela GT (MARTÍNEZ-SALGADO et al., 2002).

1.2 Curcumina e análogos sintéticos

A curcumina (CUR) é um composto fenólico extraído naturalmente da cúrcuma (*Curcuma longa L.*), também conhecido como açafrão-da-Índia. O uso da cúrcuma como especiaria tem um registro histórico de mais de 2000 mil anos, porém apenas em 1910 foi caracterizada quimicamente pela primeira vez. A cúrcuma é caracterizada como um pó de aspecto amarelado devido a presença de curcuminoides em sua composição tais como CUR, desmetoxicurcumina e bisdesmetoxicurcumina (Figura 2) (CHAINOGLU; HADJIPAVLOU-LITINA, 2019).

Figura 2 – Principais curcuminoides naturalmente encontrados no rizoma de *Curcuma longa L.*



Fonte: Adaptado de (SUETH-SANTIAGO et al., 2015)

A CUR possui uma vasta utilização em ações biológicas e farmacológicas, sendo suas principais aplicações como antioxidante, anti-inflamatória, anti-câncer e antimicrobiana. Também apresenta efeito hepatoprotetor e neuroprotetor, assim como causa supressão da trombose, proteção contra o infarto do miocárdio, efeito hipoglicêmico e anti-reumático (ANAND et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2020).

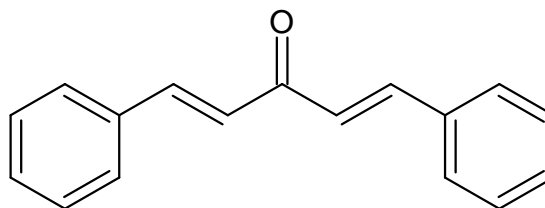
Estudos recentes têm mostrado que a CUR possui a capacidade de diminuir a geração de ERO, dessa forma, reduzindo o dano oxidativo em células tubulares renais a partir da ativação de fatores antioxidantes (CAI et al., 2022). Além disso a CUR é capaz de recuperar a homeostase mitocondrial e diminuir a expressão de proteína 1 e atenuar a lesão renal inibindo a via apoptótica da caspase-3 (AL FAYI et al., 2020). A CUR é capaz de inibir a ação da isoforma NOX4, a partir da inibição da ativação do fator transformador de crescimento β (TGF- β) (DENG; WU; KUO, 2022); que é uma citocina que induz a fibrogênese, o TGF- β aumenta a expressão de NOX4 em células tubulares renais (JIANG et al., 2014).

Apesar de seus inúmeros benefícios, a CUR apresenta baixa biodisponibilidade, uma vez que o grupamento dicetona presente na estrutura o torna instável em pH maior que 6,5 (SUETH-SANTIAGO et al., 2015). A solubilidade da CUR em solução aquosa aumenta em condições alcalinas, porém a CUR degrada rapidamente ao ser inserida em condições neutras e alcalinas (KOTHA; LUTHRIA, 2019). Estudos relacionados à absorção, distribuição, metabolismo e excreção da CUR tem demonstrado que a CUR, administrada pela via oral, possui uma baixa absorção e um rápido metabolismo, causando problemas na biodisponibilidade, o que levou a CUR ter baixos níveis séricos, distribuição limitada nos tecidos, metabolismo aparentemente rápido e meia-vida curta (ANAND et al., 2007).

Ensaio *in vivo* revelaram que a CUR, após ter sua administrada por via oral em ratos, têm uma grande parcela excretada através das fezes. Estudos conduzidos em seres humanos evidenciaram que a concentração máxima plasmática de CUR é apenas de 11,1 nmol/L, alcançada entre 1 e 2 horas após a ingestão de 3,6 g. Consequentemente, a biodisponibilidade reduzida da CUR causa significativas restrições às suas aplicações clínicas; dessa forma são necessários esforços direcionados à melhoria dessa biodisponibilidade (LIU et al., 2022).

Nesse sentido, análogos sintéticos têm sido desenvolvidos. Em especial, a substituição da porção dicetona por um grupo mono-carbonil gera derivados mais estáveis. Além disso, a substituição dos anéis aromáticos parece aumentar sua atividade biológica (WOO et al., 2005). Dentre essas moléculas, se destaca o derivado (1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (DBA) (Figura 3), que foi recentemente sintetizado (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 3 – Representação estrutural de DBA



Fonte: Adaptado de Santos *et al.* (2023) e OLIVEIRA *et al.* (2020).

1.3 Desenvolvimento de novos fármacos e modelos preditivos de avaliação farmacocinética

Para o desenvolvimento de novos fármacos, moléculas candidatas devem passar por diversas etapas de pesquisa, agrupadas em: fase pré-clínica e fase clínica. Na fase pré-clínica, o candidato a fármaco é submetido a diversas etapas, como: abordagem do problema médico, seleção de alvo, desenvolvimento de estratégias, estudos *in silico*, síntese e caracterização de moléculas, ensaios *in vitro* e *in vivo*, avaliação do potencial toxicológico, síntese industrial de princípios ativos, proteção da propriedade intelectual e análise do mercado farmacêutico, documentação e formulação da IND (IND, do inglês, *Investigational New Drug*) junto à FDA nos Estados Unidos (FDA, do inglês, *Food and Drug Administration*) (MODA, 2007). No Brasil, o órgão equivalente a FDA, para regulação de medicamentos, é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2020).

Na pesquisa clínica, a substância é submetida à testagem em seres humanos, em estudos divididos em quatro fases. Nos ensaios clínicos de fase I, a substância inovadora é administrada em um pequeno número de indivíduos saudáveis, e são avaliados parâmetros farmacocinéticos, bem como de toxicidade. Na fase II, são realizados testes farmacológicos em um pequeno número de indivíduos doentes, com o objetivo de avaliar a dosagem, eficácia e segurança. Na fase III, são realizados testes multicêntricos com um grande número de indivíduos, onde a substância é avaliada quanto à sua eficácia e segurança considerando as diferenças de resposta em populações diferentes. Por fim, os estudos de fase IV acontecem quando a substância inicia sua comercialização, e os efeitos associados ao seu uso em situação não controlada são monitorados (LOMBARDINO; LOWE, 2004).

Todo o processo de desenvolvimento de um novo fármaco é demorado, caro e de grande risco, podendo ocorrer perdas em qualquer uma das fases, principalmente devido a características farmacocinéticas (DIMASI; HANSEN; GRABOWSKI, 2003). Nos últimos

anos, houve um aumento significativo no valor estimado necessário para a comercialização de um novo fármaco, alcançando valores que se aproximam de 1,8 bilhão de dólares. Além disso, observa-se que a taxa de rejeição de candidatos a medicamentos chega a atingir alarmantes 96%. As principais causas dessa elevada taxa de rejeição estão relacionadas à baixa eficácia terapêutica do medicamento, além de problemas nos processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção do fármaco, juntamente com questões de toxicidade (ADME) (SHAKER et al., 2021). Dessa forma, apenas um pequeno número de moléculas candidatas são efetivamente inseridas no mercado, de forma que é necessária uma seleção criteriosa de moléculas para reduzir o tempo e o custo associado a esse desenvolvimento.

Diante das dificuldades no desenvolvimento de novos medicamentos, abordagens de descoberta de drogas auxiliadas por computador estão cada vez mais sendo utilizadas, pois ajudam a se esquivar de problemas relacionados com tempo e custo que são enfrentados pelas estratégias convencionais. Entre as principais estratégias utilizadas nas abordagens computacionais para os possíveis alvos de drogas, estão a triagem virtual de grandes bibliotecas químicas para candidatos a drogas eficazes, otimização adicional de compostos candidatos e avaliação *in silico* de sua toxicidade (SHAKER et al., 2021).

Outras estratégias *in silico* para a descoberta de novas drogas incluem, a descoberta de drogas com base em suas estruturas e seus ligantes, a modelagem, que é utilizada para prever a estrutura 3D da proteína alvo desde que a estrutura esteja disponível, e a triagem virtual baseada em estrutura e o encaixe molecular são possíveis (CHAN; NISLOW; EMILI, 2010; JENKINS; BENDER; DAVIES, 2006; KUBOTA; FUNABASHI; OGURA, 2019; LAVECCHIA, 2015). Diante do que foi exposto, fica claro que é de suma importância o desenvolvimento e aperfeiçoamento de técnicas para que se reduza os riscos durante o processo de desenvolvimento de novos medicamentos.

O conhecimento sobre os mecanismos de Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção (costumeiramente chamados ADME) de um fármaco são essenciais para definição dos critérios de prescrição e monitoramento (HODGSON, 2001; MODA, 2007). Assim, modelos matemáticos têm sido continuamente desenvolvidos e aprimorados para avaliação de moléculas candidatas. Esses modelos tentam prever as características de ADME e permitir a seleção de compostos líderes.

As ferramentas on-line utilizam modelos matemáticos de predição previamente criados e validados utilizando bancos de dados de moléculas conhecidas. A partir de então, as substâncias-teste são analisadas por similaridade estrutural e descritores moleculares, e são classificadas quanto a diferentes parâmetros, como: absorção oral, permeação pela barreira

hematoencefálica (BHE), ligação a proteínas plasmáticas, interação com enzimas da família citocromo P 450 (CYP450), entre outras.

2. JUSTIFICATIVA

A curcumina (CUR) possui uma vasta utilização em ações biológicas e farmacológicas, e mesmo em doses elevadas os estudos demonstram que entre as principais ações do princípio ativo estão ações antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígeno e antimicrobiana. Apesar de seus benefícios serem comprovados por vários ensaios *in vitro*, *in vivo* e clínicos, seu potencial terapêutico possui uma limitação devido seu perfil farmacocinético apresentar uma baixa solubilidade e biodisponibilidade fraca (ANAND et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2020).

Diversos estudos demonstraram que a CUR possui ótimas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, capacidade de inibir a geração de radicais livres, como também a capacidade de eliminar ERO e induzir uma resposta antioxidante, além inibir a ação da isoforma NOX4 (DENG; WU; KUO, 2022). A CUR também apresentou efeito nefroprotetor em diferentes modelos experimentais como nefropatia diabética, insuficiência renal crônica, isquemia reperfusão, além de combater a nefrotoxicidade impedindo lesão renal mediada por estresse oxidativo (TRUJILLO et al., 2013). A CUR é capaz de inibir a ação da isoforma NOX4, dessa forma, podendo regular os níveis de ERO em células tubulares renais (DENG; WU; KUO, 2022);

Visando melhorar suas características farmacocinéticas, tem-se buscado sintetizar moléculas análogas a sua estrutura, além da utilização de formulações que combinam a CUR com lipídios, polímeros e nanopartículas, visando a otimização do seu perfil farmacocinético (ANAND et al., 2007). Essa parece ser uma estratégia promissora que merece ser melhor explorada.

Logo, surgiu o interesse de investigar derivados curcuminóides em modelos experimentais *in silico* e *in vitro*, buscando novas opções terapêuticas úteis no manejo da nefrotoxicidade induzida por aminoglicosídeos. Essa premissa associa a aplicação de conhecimentos de química orgânica, *design* racional de fármacos e farmacologia. Os resultados desse estudo poderão abrir perspectivas para o desenvolvimento de tecnologias que possam ser utilizadas nas áreas da saúde e biotecnologia, além de permitir o avanço e a difusão do conhecimento científico no Estado do Ceará.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar as características farmacocinéticas e o efeito protetor *in vitro* do derivado sintético curcuminoide DBA sobre a lesão em células tubulares renais induzida por gentamicina e a inibição teórica de NADPH oxidase-4.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar as características físico-químicas e farmacocinéticas *in silico* da curcumina (CUR) e de seu derivado curcuminoide DBA;
- Analisar o efeito protetor de DBA em células tubulares renais submetidas à lesão celular por gentamicina (GT);
- Investigar a interação teórica entre o derivado curcuminoide DBA e a enzima NADPH oxidase-4 (NOX4) por *docking* molecular.

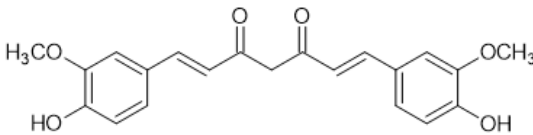
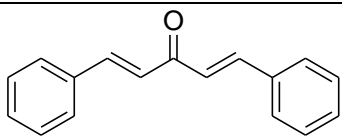
MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Moléculas em estudo

Para realizar o estudo, foi selecionado um análogo sintético da CUR, que apresenta substituição da estrutura dicetona para um mono-carbonil (OLIVEIRA *et al.*, 2020). As estruturas foram desenhadas utilizando o software *Marvin Sketch* (<http://www.chemaxon.com/>) (Quadro 1). O curcuminoide DBA foi sintetizado, caracterizado e gentilmente cedido pelo Laboratório de Síntese Orgânica da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos.

Quadro 1 – Representação estrutural de curcumina e DBA.

SIGLA	NOME IUPAC	REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL
CUR	(1E,6E)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)hepta-1,6-diene-3,5-dione	
DBA	(1E,4E)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona	

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Predição *in silico* ADME

As estruturas químicas do derivado curcuminoide DBA e da própria curcumina (CUR) foram submetidas à análise preditiva de suas características físico-químicas e farmacocinéticas utilizando plataformas on-line. As seguintes propriedades foram preditas utilizando a plataforma SwissADME (<http://www.swissadme.ch>): número de átomos pesados, de átomos aromáticos pesados, de ligações rotáveis, de aceptores e doadores de ligações de hidrogênio, área de superfície topológica polar (TPSA), solubilidade em água e lipofilicidade. Além disso, a absorção oral e a permeação pela barreira hematoencefálica foram estimadas pelo método BOILED-Egg (DAINA; ZOETE, 2016).

Através da plataforma PreADMET (<https://preadmet.webservice.bmdrc.org>), as seguintes características foram obtidas: percentual de absorção oral, estimativa de permeação

pela BHE pela relação $C_{\text{cérebro}}/C_{\text{sangue}}$ e ligação a proteínas plasmáticas (AJAY; BEMIS; MURCKO, 1999).

4.2.1 Predição de características físico-químicas

- Solubilidade

A solubilidade em água foi obtida a partir do modelo ESOL (*Estimated Solubility*), que é um método utilizado para estimar a solubilidade aquosa de um composto diretamente de sua estrutura a partir de uma regressão linear entre o LogS de solubilidade da molécula que está sendo avaliada e parâmetros moleculares como peso molecular, número de ligações rotativas, fração de átomos pesados aromáticos e o coeficiente de partição de hidrofobicidade (DELANEY, 2004). Os valores previstos são fornecidos em logaritmo decimal da solubilidade molar em água (log S) e solubilidade em mol/L.

- Lipofilicidade

No que diz respeito a lipofilicidade, foram obtidos os dados a partir do modelo XLogP3, que é um método que prevê o logP de um composto utilizando um valor de log P conhecido de um composto de referência (CHENG *et al.*, 2007)

4.2.2 Predição de características farmacocinéticas

Para a predição da absorção intestinal humana (AIH), a simulação foi feita em comparação a dados de modelos *in vivo* para estruturas químicas no pH de 7,4, e a interpretação foi feita conforme a Tabela 1. Os dados para AIH são a soma da biodisponibilidade e absorção avaliada a partir da razão de excreção ou da excreção cumulativa na urina, bile e fezes (ZHAO *et al.*, 2001).

Tabela 1 – Absorção no trato gastrointestinal para pH 7,4.

Classificação	AIH (Absorção Intestinal Humana)
Compostos mal absorvidos	0 ~ 20%
Compostos moderadamente absorvidos	20 ~ 70%
Compostos bem absorvidos	70 ~ 100%

Fonte: <https://preadmet.bmdrc.kr/adme-prediction/>

A Tabela 2 apresenta a classificação atribuída às substâncias conforme o percentual de ligação às proteínas plasmáticas, obtidas por comparação estrutural no servidor PreADMET.

Tabela 2 – Taxa de ligação a proteínas plasmáticas.

Classificação	Ligação à proteína plasmática (% LPP)
Produtos fortemente ligados	Acima de 90%
Produtos fracamente ligados	Abaixo de 90%

Fonte: (<https://preadmet.bmdrc.kr/adme-prediction/>)

Foram obtidos dados sobre penetração pela BHE através do PreADMET (Tabela 3), onde $BB = [\text{cérebro} / \text{sangue}]$, onde [cérebro] e [sangue] representam a concentração em estado estacionário de compostos radiomarcados no cérebro e sangue periférico respectivamente (AJAY; BEMIS; MURCKO, 1999).

Tabela 3 – Permeação pela barreira hematoencefálica.

Classificação	BB (<i>Cbrain</i> / <i>Cblood</i>)	logBB
Alta permeação	mais de 2,0	mais de 0,3
Média permeação	2,0 ~ 0,1	0,3 ~ -1,0
Baixa permeação	menos de 0,1	menos de -1,0

Fonte: (<https://preadmet.bmdrc.kr/adme-prediction/>)

4.2.3 Druglikeness

Para realizar a análise *Druglikeness* (semelhança com fármaco), foi utilizado o algoritmo conhecido como Regra de Lipinski, desenvolvido pela indústria farmacêutica Pfizer. (EGAN; MERZ; BALDWIN, 2000; GHOSE; VISWANADHAN; WENDOLOSKI, 1999; MUEGGE; HEALD; BRITTELLI, 2001; VEBER *et al.*, 2002). As regras de Lipinski incluem: 1) lipofilicidade, em que o logP (partição octanol-água) deve ser inferior a 5; 2) massa molecular (MM) inferior a 500 g/mol; 3) número de doadores de ligações de hidrogênio (OH + NH) inferior a 5; 4) número de aceptores de ligações de hidrogênio (O + N) inferior a 10; (LIPINSKI *et al.*, 2001).

4.3 Ensaio com cultura de células

4.3.1 Obtenção, cultivo e manutenção da linhagem celular HK2

Os experimentos *in vitro* foram realizados com células HK2, que são uma linhagem imortalizada de células epiteliais renais de túbulo proximal humano (RYAN et al., 1994). As células foram cultivadas em garrafas estéreis de 75 cm² em estufa de CO₂, em ambiente a 37 °C e 5% de CO₂. As células HK2 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, pH 7,4), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), estreptomicina (130 mg/L) e penicilina (200 UI/mL). O crescimento das células foi acompanhado diariamente através da observação em microscópio óptico de inversão.

Quando as células atingiram confluência de 80%, o meio de cultura foi removido, então as células foram lavadas com 5 mL de PBS estéril e deslocadas com 1 mL de tripsina/EDTA (0,25 %) por 7 a 10 minutos a 37°C. As células descoladas foram transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM.

Para realização dos experimentos, as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e transferidas para tubos de fundo cônico, onde foram centrifugadas a 4000 RPM por 5 minutos. Em seguida, a densidade celular foi determinada em câmara de Neubauer e foi ajustada para 1×10^5 células/mL. As células foram então plaqueadas em placas de 96 ou 24 poços. As placas foram incubadas *overnight* para permitir sua aderência e proliferação. Após esse período, as placas foram submetidas aos diferentes protocolos experimentais.

4.3.2 Avaliação de viabilidade celular

Para avaliação do efeito citotóxico de GT e do curcuminoide DBA, as células foram tratadas com diferentes concentrações das substâncias. GT (8,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 mM) foi incubado por 6, 24 e 48 horas, enquanto DBA (1000; 500; 250; 125; 62,5; e 31,25 µM) foi incubado durante 24 horas. Os experimentos com GT foram realizados para selecionar o melhor tempo de incubação e concentração para assim validá-los para uso nos experimentos posteriores. Por sua vez, DBA foi testado para identificação das concentrações não tóxicas.

Após os períodos de incubação, foi realizado o ensaio de MTT para avaliação de viabilidade celular. Esse ensaio consiste na utilização do MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-Diphenyltetrazolium Bromide), que é um sal de tetrazólio de cor amarela (MOSMANN, 1983). Quando esse sal entra em contato com células viáveis, é internalizado por endocitose e clivado

por desidrogenase citoplasmáticas e mitocondriais, produzindo um sal insolúvel de cor arroxeada chamado formazan. Em seguida, os cristais de formazan são extraídos e são solubilizados com a utilização de surfactantes como dimetilsulfóxido (DMSO) ou dodecilsulfato de sódio (SDS) (NGA et al., 2020). Células não viáveis não são capazes de internalizar e clivar o MTT, de forma que a concentração de formazan produzido é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis. A medição é realizada pela leitura em espectrofotômetro a 570 nm.

Para isso, 100 µL do sobrenadante dos poços foram retirados e, em seguida, foram adicionados 10 µL da solução de MTT (2,5 mg/mL em PBS). As placas foram incubadas a 37°C no escuro por 4 horas para completa solubilização dos cristais de formazan, e enfim foi adicionado 100 µL de DMSO. Após solubilização dos cristais, foi realizada leitura fotométrica a 570 nm. Células não tratadas foram utilizadas como grupo controle.

A viabilidade celular foi calculada como percentual de células viáveis em relação ao grupo controle. Para definição das concentrações tóxicas de GT, foi estimado o valor de IC₅₀ (concentração capaz de causar 50% de citotoxicidade), por regressão não-linear.

4.3.3 Avaliação do efeito protetor do derivado curcuminoide DBA na lesão celular renal induzida por GT em modelos de pré-tratamento e pós-tratamento

Em seguida, o efeito de DBA sobre a citotoxicidade induzida por GT em células HK2 foi avaliado pelo ensaio de redução do MTT, em modelos de pré e pós-tratamento. Para o modelo de pré-tratamento foi em que as células foram tratadas inicialmente com DBA (nas concentrações de 62,5; 31,25; 15,62 e 7,8 µM) por 24 horas e, em seguida, incubado com GT (5 mM) por 24 horas. Para o modelo de pós-tratamento, as células foram incubadas primeiramente com GT por 24 horas e, em seguida, tratadas com DBA por 24 horas. Em ambos os casos, células não tratadas foram usadas como controle negativo, e células tratadas unicamente com GT foram utilizadas como controle positivo de lesão celular. Em seguida, a viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT, como descrito no subtópico anterior.

4.3.4 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

A avaliação do impacto de GT e do tratamento com DBA sobre a função mitocondrial de células HK2 foi avaliada por citometria de fluxo, utilizando a rodamina 123 (Rho123) como marcador fluorescente. A citometria é uma técnica de análise de células em suspensão que

permite a análise de características bioquímicas, estruturais e funcionais por meio de marcadores fluorescentes (VIGNALI *et al.*, 2000). A Rho123 é um corante catiônico fluorescente que tende a se acumular no espaço intermembrana de mitocôndrias viáveis. Processos lesivos que causem alteração nesse potencial causam redução do acúmulo do corante e consequente redução da emissão de fluorescência (CHAZOTTE, 2011).

Para realização do experimento foi utilizado apenas o modelo de pós-tratamento devido a resultados em pré-tratamento não apresentarem resultados satisfatórios, para isso, as células HK2 foram cultivadas em placas de 24 poços e submetidas ao modelo lesão celular por GT seguida de pós-tratamento com DBA por 24 horas. Após o final do tempo de incubação, os poços foram lavados, tripsinizados, e as células foram coletadas. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas com Rho123 (10 µg/mL) por 15 minutos no escuro. Por fim, as células foram lavadas duas vezes com PBS e então a fluorescência (emissão a 488 nm e detecção a 563-606 nm) dos grupos foi analisada utilizando o citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences, New Jersey, USA) e o software CellQuest Pro. Foram analisados pelo menos 10^4 eventos por leitura e o resultado foi expresso como fluorescência relativa em comparação ao grupo controle (SAMPAIO *et al.*, 2019).

4.3.5 Avaliação do equilíbrio óxido-redutor em células renais

A análise de estresse oxidativo nas células renais submetidas ao modelo de lesão celular e pós-tratamento com as moléculas em estudo foi realizada por meio da determinação quantitativa de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e de glutathiona reduzida (GSH). Para isso, as células submetidas ao modelo experimental foram lisadas, utilizando tampão apropriado (fosfato de potássio 0,1 M, EDTA 5 mL, Triton X-100 0,1% e 0,6% de ácido sulfossalicílico, pH 7,5) e passaram por sonicação em água gelada por 3 minutos. Em seguida, para potencializar a lise e a liberação do conteúdo intracelular, as misturas foram submetidas a ciclo de congelamento e descongelamento a -80 °C. Após isso, as suspensões obtidas foram centrifugadas a 3000 g por 4 minutos e o sobrenadante foi armazenado a -80 °C até a realização das análises (SAMPAIO *et al.*, 2019). A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976).

- Substâncias Reativas ao Acido Tiobarbitúrico (TBARS)

Para realizar a mensuração de TBARS (MIHARA; UCHIYAMA; FUKUZAWA, 1980), foi utilizado 100 µL do sobrenadante misturado a 100 µL de ácido tricloroacético 40%

e 400 μL de ácido tiobarbitúrico 60%. A mistura foi incubada a 96 °C por 30 minutos, seguido do interrompimento da reação pela adição de 200 μL de ácido acético glacial e centrifugação a 1700 g por 30 minutos. Por fim, o sobrenadante obtido foi analisado em fotômetro a 530 nm (SAMPAIO *et al.*, 2019). A concentração de TBARS foi calculada por interpolação em uma curva padrão de MDA (malondialdeído) e expressa como μg de TBARS/mg de proteínas (SAMPAIO *et al.*, 2019).

- Glutathiona Reduzida (GSH)

Para determinação da concentração de GSH, 400 μL de lisado celular foram adicionados a 800 μL de tampão Tris-HCl (0,4 M, pH 8,9) e 20 μL do cromógeno DTNB (5,5'-ditiobis-(ácido 2- nitrobenzóico). A absorvância foi medida a 412 nm e as leituras foram analisadas utilizando curva-padrão de GSH. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteínas (SAMPAIO *et al.*, 2019).

4.4 Docking molecular

Os ensaios de *docking* molecular foram realizados para a avaliação teórica das interações do curcuminoide no presente estudo DBA com ligantes de inibição presentes na NADPH oxidase, sendo realizado pelo laboratório de Química Teórica e Eletroquímica da Universidade Estadual do Ceará, coordenado pelo prof. Dr. Emmanuel Silva Marinho.

A otimização geométrica de DBA foi realizada pela Teoria do Funcional da Densidade (DFT) com o nível computacional B3LYP/6-311++G(d,p) (DITCHFIELD; HEHRE; POPLE, 1971) em fase gasosa, utilizando o software Gaussian 09 (FRISCH *et al.*, 2009) e o software Avogadro 1.2.0 (HANWELL *et al.*, 2012) para desenhar as moléculas de entrada.

As simulações de *docking* molecular foram realizadas para avaliar a interação teórica dos ligantes com a NADPH oxidase em comparação com o sítio ocupado pela apocinina, um inibidor da NADPH oxidase (KANEGAE *et al.*, 2010). A estrutura tridimensional da p47phox autoinibida da NADPH oxidase foi obtida do repositório *Protein Data Bank* (PDB 1NG2). A p47phox está identificada como “estrutura da p47phox autoinibida” (GROEMPING *et al.*, 2003). A estrutura proteica foi determinada através do método de difração de raio-X, com valor de 170 Å.

A identificação do sítio de ligação entre as moléculas otimizadas dos ligantes e a NADPH oxidase foi realizada por *docking* molecular com o software Autodocking Vina (TROTT; OLSON, 2009). Os parâmetros do *grid* gerados foram centralizados de maneira a

envolver toda a estrutura da proteína utilizando os eixos (25.765 x, 42.613 y, 11.711 z), *size* (92 x, 108 y, 120 z). Os gráficos moleculares foram construídos usando o pacote de software UCSF Chimera 1.8 (PETTERSEN et al., 2004).

Foi utilizada a energia de afinidade (ΔG) como parâmetro para a avaliação da estabilidade dos complexos ligante-proteína, com os complexos selecionados aqueles com valores de ΔG inferiores a $-6,0 \text{ kcal.mol}^{-1}$ (SHITYAKOV; FOERSTER, 2014). Para a validação estatística foram feitas simulações através da medida do RMSD (*Root Mean Square Deviation*) sendo utilizado como critério de aceitabilidade valores com $\text{RMSD} < 2,0 \text{ \AA}$ (KADELA-TOMANEK et al., 2021). As interações de ligante-proteína e interações de hidrogênio foram classificadas conforme as distâncias entre ligantes e resíduos de aminoácidos, assim foram classificadas como fortes (entre $2,50 \text{ \AA}$ e $3,10 \text{ \AA}$), intermediárias (entre $3,10 \text{ \AA}$ e $3,55 \text{ \AA}$) e fracas ($>3,55 \text{ \AA}$) (IMBERTY et al., 1991).

4.5 Análise Estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n=3$). Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM), sendo a análise estatística entre os grupos experimentais, utilizando one-way ANOVA, com pós-teste de Dunnet ou de Bonferroni, a depender do método. Foi assumido $p < 0,05$ como critério de significância. As análises estatísticas foram feitas utilizando os softwares Microsoft Office® Excel e GraphPad Prism® versão 8.0.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Predição farmacocinética

Inicialmente, as moléculas em estudo foram submetidas às plataformas on-line SwissADME e PreADMET, onde suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e de *druglikeness* foram determinadas. Essas informações são úteis para a identificação de candidatos com características adequadas para futuro uso como fármacos.

As propriedades físico-químicas das moléculas em estudo estão apresentadas na tabela 4. No geral, as moléculas apresentaram número diferente de átomos pesados, mas resultados similares ao número de átomos aromáticos ou não, com DBA contendo 18 átomos pesados sendo 12 aromáticos, e CUR contendo 27 átomos pesados, sendo 12 aromáticos. As moléculas apresentaram o número de ligações rotáveis e o número de aceptores de ligação de hidrogênio diferentes com DBA com 4 ligações rotáveis e 1 aceptores de hidrogênio, quanto CUR com 8 ligações rotáveis e 6 aceptores de hidrogênio; quanto ao número de doadores de ligação de hidrogênio, DBA não apresentou doadores e CUR apresentou 2 doadores de ligação de hidrogênio. No que diz respeito a área de superfície polar topológica (TPSA), DBA apresentou um valor de 17,07 e CUR 96,06, sendo assim com CUR possuindo maior polaridade molecular.

Tabela 4 – Propriedades físico-químicas de DBA e CUR.

	Nº de átomos pesados	Nº de átomos aromáticos	Nº de ligações rotáveis	Nº de Aceptores de Lig-H	Nº de doadores de Lig-H	TPSA Å
DBA	18	12	4	1	0	17,07
CUR	27	12	8	6	2	96,06

TPSA: Área de superfície polar topológica.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação a solubilidade em água e lipofilicidade, foram encontrados os resultados apresentados na tabela 5. Os valores de LogS para as moléculas testadas foram de -4,12 para DBA a -3,94 para CUR. A molécula DBA foi classificada como moderadamente solúvel, enquanto CUR foi classificada como solúvel. Quanto à lipofilicidade, foram obtidos valores de logP de 2,87 e 3,27, para DBA e CUR respectivamente.

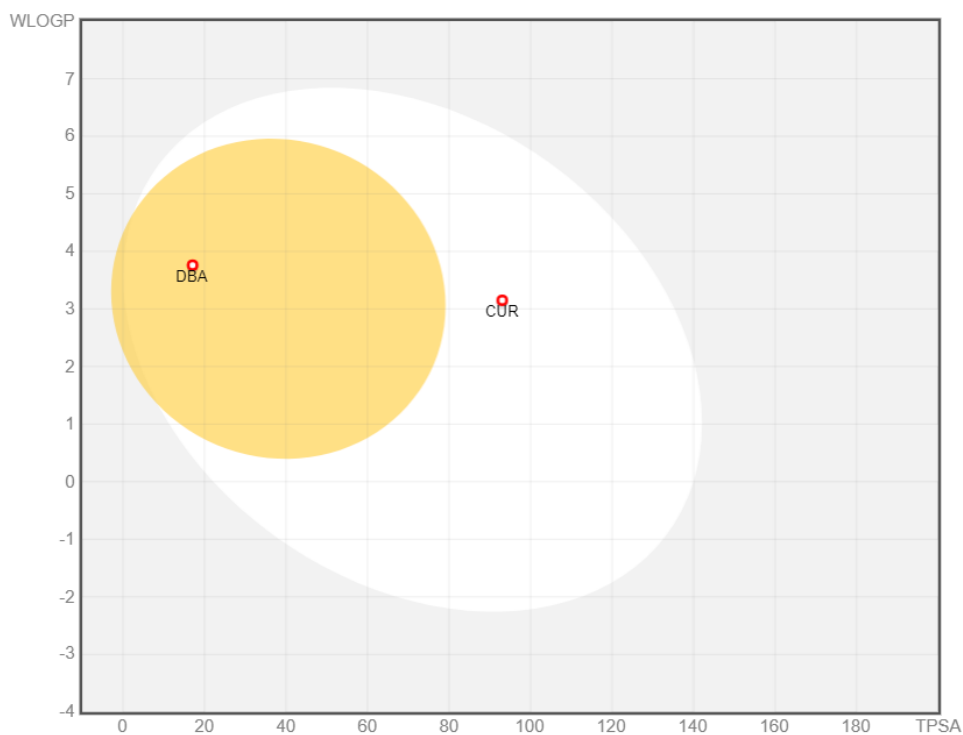
Tabela 5 – Predição de solubilidade em água e lipofilicidade de DBA e CUR.

Sigla	Solubilidade em água			Lipofilicidade (LogP)
	LogS	Classificação	Solubilidade (mmol/L)	
DBA	-4.12	Moderadamente solúvel	0,0763	2,87
CUR	-3.94	Solúvel	0,115	3,27

Elaborado pelo autor.

Em relação às características farmacocinéticas, a capacidade das substâncias em serem absorvidas por via oral e de permearem a barreira hematoencefálica (BHE) foram inicialmente avaliadas de forma qualitativa pelo método BOILED-Egg, que leva em consideração os valores de TPSA e logP. O resultado (Figura 4) indica que todas a molécula DBA é bem absorvida e possuem boa biodisponibilidade oral e pode permear a BHE, já CUR apresentou uma boa biodisponibilidade oral, mas não chegou a atravessar a BHE.

Figura 4 – Predição de biodisponibilidade oral e permeação pela BHE pelo método BOILED-Egg.



Fonte: Elaborado pelo autor, através do website www.swissadme.ch.

Em seguida, utilizando as plataformas online SwissADME e PreADMET, foram determinados alguns parâmetros farmacocinéticos para caracterizar de forma quantitativa esses parâmetros. Em relação à absorção oral, DBA apresentou um valor percentual de 100% enquanto CUR apresentou 94,04% (Tabela 6). A permeação no SNC foi medida pela estimativa da razão entre a concentração cerebral e a sanguínea ($C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}$). Como observado na Tabela 6, DBA e CUR apresentaram valores de 1,385 e 0,091, respectivamente. Além disso, não foi observada interação teórica de nenhuma das moléculas com glicoproteína-P (P-gp). Adicionalmente, o percentual de ligação às proteínas plasmáticas também foi previsto, com DBA apresentando uma alta taxa de ligação de 100% e CUR com 88,03%.

Por fim, as moléculas foram avaliadas quanto à Regra de Lipinski (LIPINSKI et al., 2001), que elenca características ideais para uma molécula se assemelhar aos fármacos atualmente disponíveis no mercado. Conforme a Regra de Lipinski, são considerados 4 critérios: massa molar ≤ 500 g/mol; $\log P \leq 5,0$; aceptores de ligação de hidrogênio ≤ 10 ; e doadores de ligação de hidrogênio ≤ 5 . São consideradas moléculas aprovadas por essa regra aquelas que apresentarem no máximo 1 violação. DBA e CUR foram aprovados quanto a esse critério, sem nenhuma violação.

Tabela 6 – Absorção gastrintestinal, permeação pela barreira hematoencefálica, ligação a proteínas plasmáticas, interação com glicoproteína-P e *druglikeness*.

	AIH (%)	Ligação a proteínas plasmáticas (%)	Substrato de P-gp?	Violações à Regra de Lipinski	Permeabilidade SNC	
					Razão $C_{\text{brain}}/C_{\text{blood}}$	Nível de permeabilidade
DBA	100,00	100,00	Não	0	1,385	Média
CUR	94,40	88,03	Não	0	0,091	Baixa

AIH: Absorção intestinal humana. P-Gp: Glicoproteína P.

Fonte: Elaborado pelo autor.

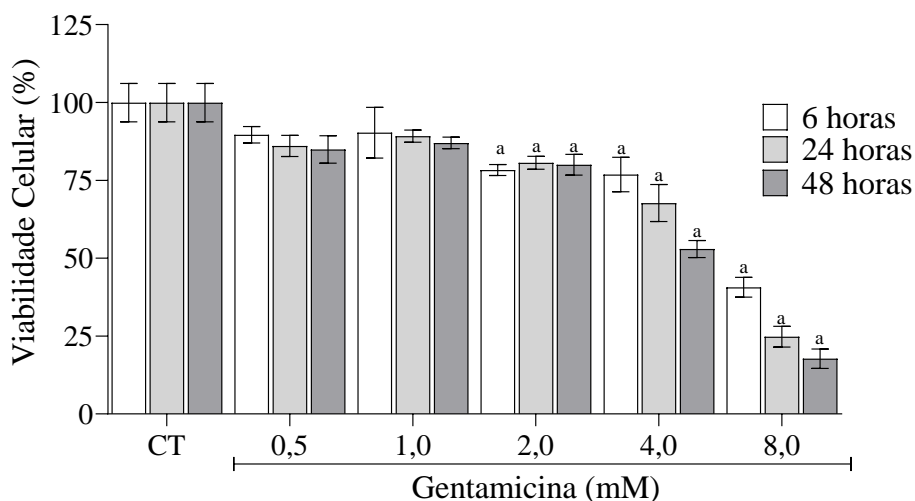
5.2 Ensaios *in vitro*

5.2.1 Efeito citotóxico de GT sobre células HK2.

A avaliação do efeito da GT sobre a viabilidade celular de células HK2 foi realizada com o objetivo de determinar o tempo e a concentração ideal para os ensaios subsequentes, utilizando o ensaio do MTT. GT causou efeito citotóxico nos 3 tempos testados (6, 24 e 48 horas), nas concentrações de 8,0; 4,0; 2,0; 1,0 e 0,5 mM (Figura 5). Os valores de IC_{50} foram $IC_{50}/6h = 7,11 \pm 1,56$ mM; $IC_{50}/24h = 5,0 \pm 0,73$ mM; e $IC_{50}/48h = 3,94 \pm 0,5$ mM. Com base

nesse resultado, a concentração de 5 mM foi escolhida para os ensaios posteriores, com tempo de incubação de 24 horas.

Figura 5 – Efeito de GT sobre a viabilidade de células HK2.



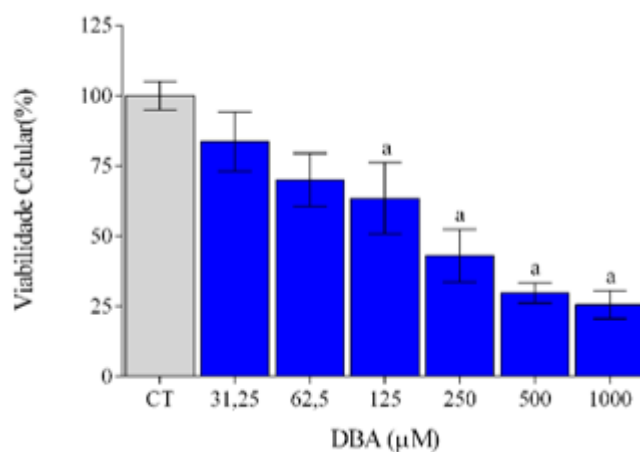
Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio. Para comparação, foi utilizado ANOVA com pós-teste de Dunnet. ^a $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.2 Citotoxicidade do derivado curcuminoide DBA

O ensaio do MTT foi realizado em seguida com o objetivo de avaliar as concentrações não tóxicas das moléculas em estudo em células HK2, a serem utilizadas nos ensaios posteriores. DBA apresentou citotoxicidade nas concentrações de 125, 250, 500 e 1000 μ M (Figura 6). Dessa forma essas concentrações foram descartadas dos ensaios posteriores.

Figura 6 – Efeito citotóxico de DBA em células HK2.



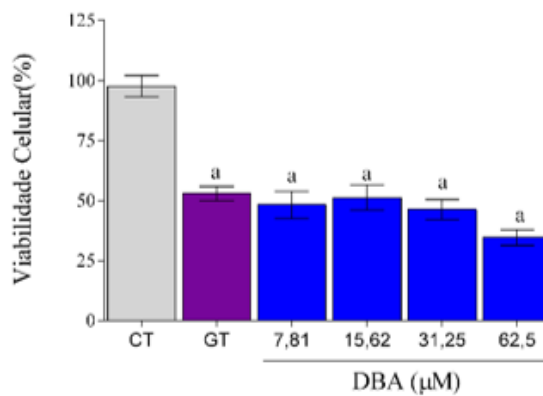
Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio. Para comparação, foi utilizado ANOVA com pós-teste de Dunnet. ^a $p < 0,05$ vs. grupo controle (CT).

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3 Efeito protetor de DBA contra a lesão em células tubulares renais induzida por GT

As células HK2 foram submetidas à lesão celular pela incubação com GT (5 mM) e o efeito protetor de DBA foi avaliado em modelo de pré- e pós-tratamento. Como observado na figura 7, DBA não causou efeito protetor quando as células foram pré-tratadas por 24 horas e, em seguida, incubadas com GT.

Figura 7 – Viabilidade celular de células HK2 pré-tratadas com DBA e submetidas a lesão tubular renal com GT.

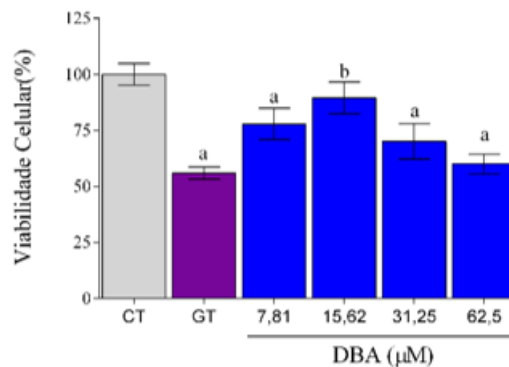


Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio. CT: grupo controle; GT: células tratadas com gentamicina (5 mM). ^a $p < 0,05$ vs. CT.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em contraste, foi observado que DBA apresentou efeito protetor em pós-tratamento de células HK2 previamente incubadas com GT por 24 horas. Como observado na Figura 8, DBA causou efeito protetor nas concentrações de 7,81 e 15,62 μ M.

Figura 8 – Viabilidade celular de células HK2 submetidas à lesão celular renal induzida por GT e, em seguida, tratadas com DBA.



Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio. CT: grupo controle; GT: células tratadas com gentamicina (5 mM). ^a $p < 0,05$ vs. CT; ^b $p < 0,05$ vs. GT.

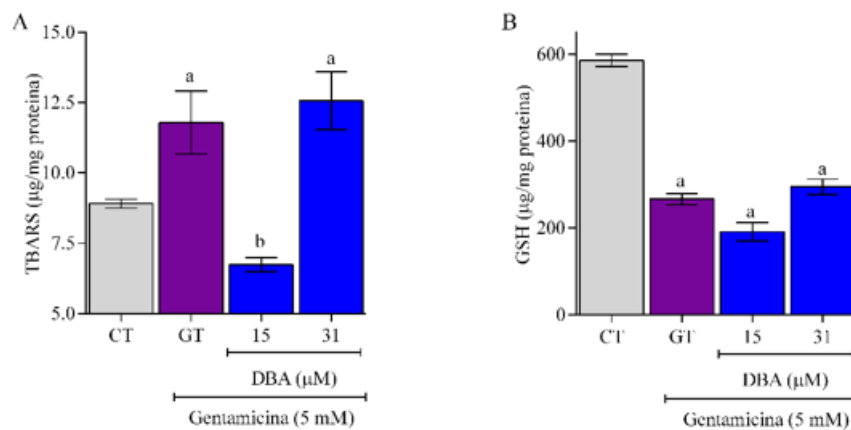
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Avaliação de estresse oxidativo

Com o objetivo de avaliar a presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) e os danos causados pelo estresse oxidativo nas células, foram mensurados os níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e glutatona reduzida (GSH).

Assim foi possível observar que DBA na concentração de 15,62 μM foi capaz de reduzir as concentrações de TBARS e causar um aumento nas concentrações de GSH na concentração de 31,25 μM , o que indica um efeito antioxidante em células HK2 (figura 9).

Figura 9 – Avaliação dos níveis celulares de TBARS e GSH em células HK2 submetidas à lesão celular induzida por GT e tratadas com DBA.



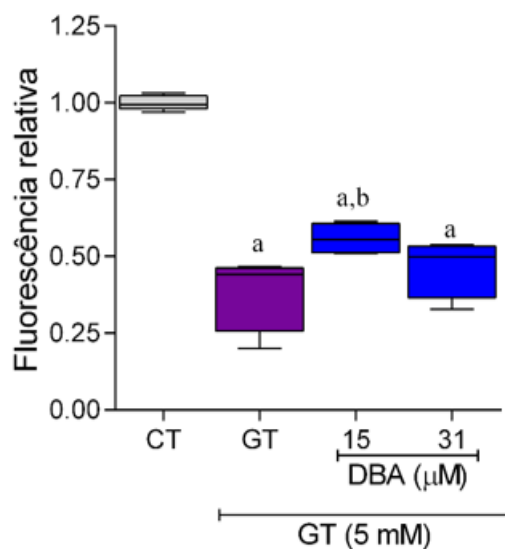
Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio. CT: grupo controle; GT: células tratadas com gentamicina (5 mM); TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; GSH: glutatona reduzida. ^a $p < 0,05$ vs. CT; ^b $p < 0,05$ vs. GT.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.5 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial

O efeito de DBA na alteração do potencial transmembrânico mitocondrial induzido por GT foi avaliado por citometria de fluxo, através da marcação com Rho123. Como observado na figura 10, o tratamento com GT causou uma redução do acúmulo de Rho123 em cerca de 50%. DBA atenuar esse efeito na concentração de 15 μM .

Figura 10 – Potencial transmembrânico mitocondrial de células HK2 submetidas à lesão celular renal induzida por GT e tratadas com DBA.



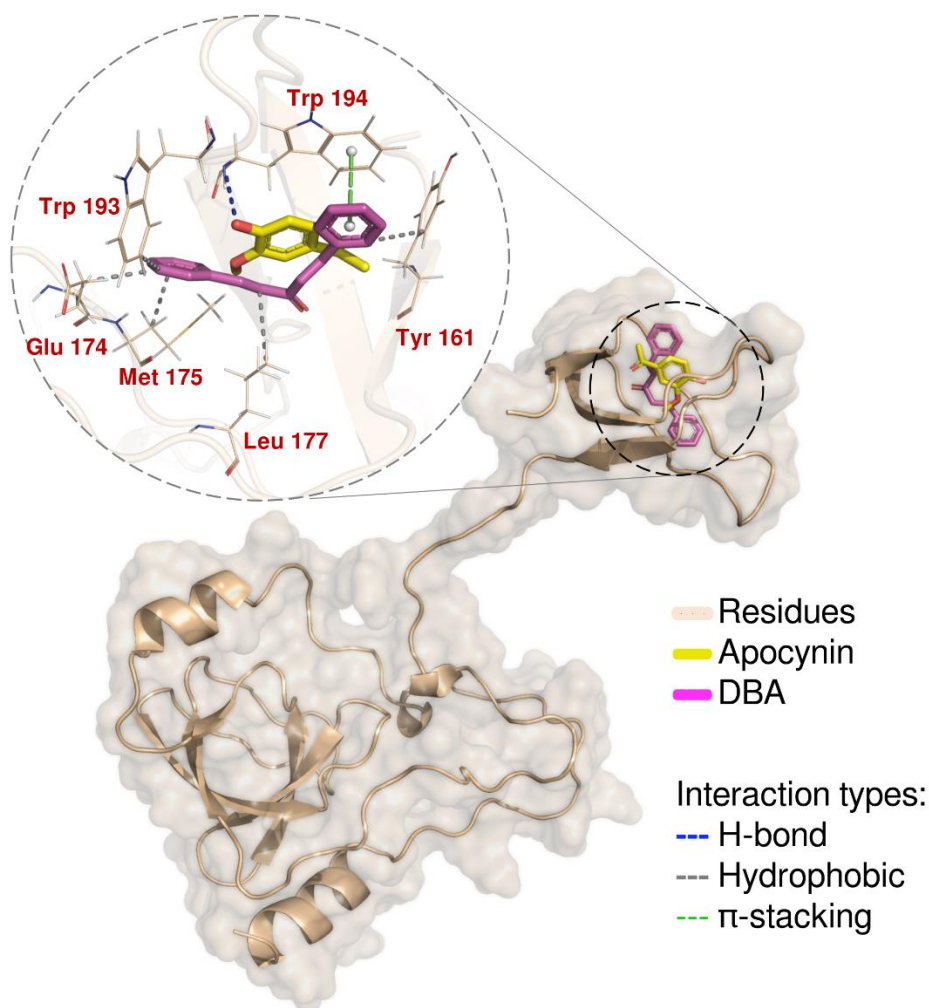
Os dados estão expressos como média \pm erro padrão médio. CT: grupo controle; GT: células tratadas com gentamicina (5 mM). ^ap < 0,05 vs. CT; ^bp < 0,05 vs. GT.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Ensaio de *Docking* molecular

No ensaio *de docking* molecular, foi analisada a interação teórica de DBA com o domínio SH3A de NOX4. A Figura 11 apresenta em detalhe o sítio de ligação de DBA com NOX4 e os principais resíduos que estão envolvidos na interação. Como demonstrado na figura, DBA se encaixou no mesmo sítio de ligação que apocinina, o inibidor cocrystalizado. Além disso, foi observado que DBA tem uma maior estabilidade na ligação em comparação com apocinina (Tabela 7).

Figura 11 – Simulação de acoplamento da molécula DBA com a isoforma NOX4 por *Docking* molecular.



Indicação em perspectiva da interação do DBA com os aminoácidos do sítio p47phox presente na isoforma NOX4.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 7 – Energia de afinidade e valores RMSD dos com completos formados por DBA e apocinina na enzima NADPH-oxidase-4 (NOX4).

Complexos	Energia de afinidade (kcal/mol)	RMSD (Å)
Apocinina/NOX4	-5.1	1.920
DBA/NOX4	-6.9	0.869

Fonte: Elaborado pelo autor

Em relação aos tipos de interações, DBA formou interações hidrofóbicas com os resíduos Met175A, Tyr161A, Glu174A, Leu177A, Trp193A e interações π -stacking com

Trp194A. Já apocinina formou interações hidrofóbicas com Tyr161A e Trp194A, e formou ligação de hidrogênio com Trp194A (Tabela 8).

Tabela 8 – Interações entre DBA e apocinina com NADPH-oxidase 4 (NOX4).

Complexos	Resíduos	Interação	Distância (Å)
Apocinina/NOX	Tyr 161A	hidrofóbica	3.74
	Trp 194A	hidrofóbica	3.71
	Trp 194A	Ligação de H	2.27
DBA/NOX	Tyr 161A	hidrofóbica	3.79
	Glu 174A	hidrofóbica	3.57
	Met 175A	hidrofóbica	3.89
	Leu 177A	hidrofóbica	3.76
	Trp 193A	hidrofóbica	3.86
	Trp 194A	π -stacking	3.76

Fonte: Elaborado pelo autor.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A GT induz a nefrotoxicidade devido à inibição da síntese proteica nas células renais, resultando especificamente na necrose das células do túbulo proximal renal, o que leva à necrose tubular aguda e, conseqüentemente, à insuficiência renal aguda. Além disso, promove o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) no córtex renal, resultando em danos renais (BALAKUMAR; ROHILLA; THANGATHIRUPATHI, 2010).

Apesar de sua nefrotoxicidade, a GT é amplamente utilizada na prática clínica devido a seu efeito bactericida eficaz e baixa ocorrência de resistência bacteriana. Apesar de seus benefícios, é importante utilizar esse fármaco com cautela, especialmente em pacientes de risco para desenvolvimento de doença renal, além de monitorar regularmente a função renal durante o tratamento. Diversas intervenções farmacológicas têm como objetivo prevenir o desenvolvimento da nefrotoxicidade induzida pela GT, principalmente por meio da redução do estresse oxidativo renal, da morte celular tubular e da inflamação renal (BALAKUMAR; ROHILLA; THANGATHIRUPATHI, 2010).

Diversos estudos demonstram que a curcumina possui ótima propriedade antioxidante e anti-inflamatória, capaz de inibir a geração de radicais livres, eliminar ERO e induzir uma resposta antioxidante. Também é capaz de exercer efeito nefroprotetor em diversos modelos experimentais (TRUJILLO et al., 2013). No entanto, a curcumina possui uma baixa biodisponibilidade o que dificulta em sua aplicação clínica (ANAND et al., 2007). Devido a isso, tem-se buscado o uso de análogos que possuam biodisponibilidade elevada e que mantenham as propriedades terapêuticas da curcumina (DANDAWATE et al., 2012).

Inicialmente, as moléculas em estudo foram submetidas à predição de características farmacocinéticas utilizando o modelo *in silico* ADME. Trata-se de um modelo computacional que prevê características de absorção, distribuição, metabolismo e excreção de uma substância, assim podendo estimar essas propriedades com base em sua estrutura química, e suas propriedades físico-químicas já conhecidas. Dessa forma, pode-se auxiliar na seleção de compostos promissores para o desenvolvimento de medicamentos identificando potenciais problemas de toxicidade, compreendendo a biodisponibilidade e otimizando as propriedades farmacocinéticas de substâncias inovadoras (ALQAHTANI, 2017).

A solubilidade desempenha um papel fundamental na farmacocinética de um fármaco; em especial, fármacos com baixa solubilidade encontram dificuldade em se dissolver na solução aquosa presente no trato gastrintestinal e serem bem absorvidos. Esse fator pode resultar em uma absorção reduzida e, conseqüentemente, em níveis sanguíneos baixos. Entretanto,

fármacos altamente solúveis podem ser absorvidos mais rapidamente, atingindo concentrações plasmáticas mais elevadas (MERISKO-LIVERSIDGE; LIVERSIDGE, 2011).

A solubilidade em água foi estimada através do modelo ESOL (*Estimated Solubility*) (DELANEY, 2004). Trata-se de um método computacional usado para prever a solubilidade de compostos químicos em solventes específicos. O método ESOL utiliza descritores moleculares, como logP (coeficiente de partição octanol-água), número de átomos doadores de ligação de hidrogênio, número de átomos receptores de ligação de hidrogênio e outros parâmetros relacionados à polaridade da molécula. Esses descritores são combinados em um modelo estatístico, usando técnicas de regressão linear para calcular a solubilidade estimada (DELANEY, 2004). Sabe-se que a curcumina é praticamente insolúvel em água (LESTARI; INDRAYANTO, 2014), com solubilidade em água definida pela Farmacopeia Americana como 0,0085 mmol/L (LESTARI; INDRAYANTO, 2014). O derivado DBA apresentou uma melhora importante em sua solubilidade. É importante notar que CUR se apresentou como solúvel em água no modelo, apesar de estudos anteriores mostrarem sua baixa solubilidade em água (LESTARI; INDRAYANTO, 2014). Em estudos anteriores, foi mostrado que a síntese de análogos a partir de substituições em seus grupos funcionais hidrofóbicos melhoram a capacidade de solubilização em água (NOUREDDIN; EL-SHISHTAWY; AL-FOOTY, 2019).

Em relação à distribuição, fármacos altamente solúveis possuem uma maior probabilidade de se dispersarem de forma uniforme pelos compartimentos teciduais. Em contraste, fármacos pouco solúveis tendem a ter dificuldade de distribuição e/ou se acumulam em tecidos de depósito (DEI CAS; GHIDONI, 2019).

A estimativa de lipofilicidade das moléculas em estudo foi obtida por meio do modelo XLogP3 (CHENG *et al.*, 2007). O modelo utiliza princípios de química quantitativa-estrutura-relação (QSAR) e observa descrições moleculares como tamanho, forma, polaridade e outros parâmetros físico-químicos para assim prever o logP de estruturas químicas. A lipofilicidade desempenha um papel importante na toxicocinética. Compostos lipofílicos tem uma maior capacidade de atravessar as barreiras gastrointestinais, hematoencefálica (BHE) e placentária, além de se depositarem em tecidos ricos em lipídios, como o tecido adiposo (WATERHOUSE, 2003). Isso pode resultar em uma maior concentração da substância em certos tecidos, o que pode estar associado a manifestações tóxicas. Os resultados mostraram que DBA apresentou um logP de 2,87 e CUR um logP de 3,27. Estudos anteriores demonstraram que a lipofilicidade está relacionada com a toxicidade *in vitro*, substâncias com logP > 3 possuem 2,5 vezes mais chances de serem tóxicas, enquanto substâncias com logP < 3 tinham 2,5 vezes menos chances de serem tóxicas (ARNOTT; PLANEY, 2012).

Para estimar absorção gastrointestinal e permeação pela BHE, foi utilizado o modelo BOILED-Egg, que se baseia em cinco parâmetros principais: a lipofilicidade, o tamanho molecular, a carga elétrica, a polaridade e a energia de ligação das moléculas. Esses parâmetros são avaliados e combinados para determinar a probabilidade de uma molécula atravessar eficientemente a BHE. O modelo BOILED-Egg fornece uma estrutura útil para a triagem inicial de compostos candidatos a fármacos, permitindo uma previsão rápida e confiável da sua capacidade de atravessar a BHE e alcançar o sistema nervoso central (DAINA; ZOETE, 2016). Adicionalmente, a absorção oral e a permeabilidade por BHE foram estimadas de forma quantitativa. Os resultados demonstram que tanto DBA quanto CUR são potencialmente bem absorvidos por via oral e que DBA é capaz de atingir o SNC (MYTHRI; BHARATH, 2012). Esse aparente aumento na absorção oral é uma característica promissora para esse derivado curcuminóide, considerando que a baixa absorção e consequente baixa biodisponibilidade oral da curcumina tem sido descrita como um dos principais fatores limitantes para seu uso clínico. ANAND et al., (2007), em trabalho de revisão, apontou que a curcumina, após administração oral, gera baixas concentrações séricas. Além disso, apenas traços são encontrados em tecidos como fígado e rim, indicando que essa molécula possui distribuição tecidual limitada. A melhora nesse processo pode ser uma ferramenta importante para otimizar os efeitos biológicos observados para curcumina.

Os dados do PreADMET em relação a absorção intestinal humana (AIH) de DBA e CUR, todos apresentaram uma elevada taxa de absorção com valores superando 94% de absorção com DBA alcançando um valor de 100%. Compostos com alta absorção costumam apresentar grupos hidrofóbicos em sua estrutura que permitem interação com o epitélio intestinal. Assim a presença de anéis aromáticos em sua estrutura tende a aumentar a taxa de absorção desses compostos (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Em relação a taxa de ligação a proteínas plasmáticas as moléculas apresentaram um valor de 100% para DBA e 88,03% para CUR. A alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas está associada à lipofilicidade das substâncias, pois a proporção da fração de fármaco livre e a fração do fármaco nas células sanguíneas diminuem com o aumento da lipofilicidade, enquanto a fração ligada a proteínas plasmáticas aumenta, o que interfere na distribuição do fármaco (NAU; SÖRGEL; EIFFERT, 2010).

Baseado nas características avaliadas, é possível definir sua adequação em critérios de *druglikeness* (“semelhança com fármaco”, tradução livre). Existem disponíveis diferentes ferramentas, baseadas em regras definidas por indústrias farmacêuticas, para a identificação de candidatos promissores para desenvolvimento de novos fármacos. Essas regras advêm

normalmente de análises realizadas com o objetivo de melhorar seus fármacos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Dentre elas as regras de Lipinski, desenvolvidas pela Pfizer, são as mais comumente utilizadas por pesquisadores do mundo inteiro.

As moléculas DBA e CUR foram submetidos à regra de Lipinski (WALTERS, 2012). A regra de Lipinski trata-se de um conjunto de quatro regras para identificar as propriedades físico-químicas ideais para compostos orais alcançarem a máxima biodisponibilidade. Essas regras incluem: 1) lipofilicidade, em que o logP (partição octanol-água) deve ser inferior ou igual a 5; 2) massa molecular (MM) inferior ou igual a 500 g/mol; 3) número de doadores de ligações de hidrogênio (OH + NH) inferior ou igual a 5; 4) número de aceptores de ligações de hidrogênio (O + N) inferior ou igual a 10 (CHAGAS; MOSS; ALISARAIE, 2018; OMRAN; RAUCH, 2014).

No presente estudo, o derivado DBA e a própria CUR não violaram nenhuma regra de Lipinski, demonstrando que essas moléculas são viáveis para síntese em grande escala, e compartilham de características físico-químicas consideradas ótimas para fármacos. Estudos anteriores já demonstraram que compostos derivados da curcumina apresentaram resultados promissores ao serem submetidos as regras de Lipinski, não violando nenhuma das regras propostas (FÜLLBECK et al., 2005).

Em seguida, as substâncias foram submetidas a ensaios *in vitro* utilizando células HK2. Essa é uma linhagem de células tubulares proximais renais humanas amplamente utilizada em estudos de citotoxicidade renal, além de ser consideradas como modelo ótimo para investigação farmacológica (CAO et al., 2021). Inicialmente, as concentrações de GT tóxicas para HK2 foram identificadas.

A avaliação da viabilidade celular após tratamento com GT demonstrou que esse fármaco causou dano celular de forma relativamente constante durante os tempos de incubação, levando em consideração que houve pouca diferença nos valores de IC₅₀ entre os grupos tratados em diferentes tempos. Dessa forma, o tempo de 24 horas na concentração de 5mM foi selecionado por ser o mais conveniente para realização dos experimentos posteriores.

A citotoxicidade da GT foi previamente relatada em diferentes estudos e descrito por muitos autores ao longo dos anos (ALI, 1995; SJ, 1978; RANDJELOVIC et al., 2012). Estudos utilizando a linha celular de rim de rato normal 52E (NRK-52E) e HK2 mostraram que a viabilidade celular foi diminuída em até 50% quando expostas a GT por 24 horas em concentração de 3 mM (YUE et al., 2022).

A GT possui dois mecanismos de nefrotoxicidade conhecidos, envolvendo lesões tubulares e glomerulares. Os mecanismos de morte celular tubular causam apoptose e necrose

em células renais (LOPEZ-NOVOA et al., 2011). Quando ocorre um aumento da concentração de aminoglicosídeo nas estruturas endossomais, excedendo o limiar, a membrana é rompida e seu conteúdo junto com o fármaco é liberado no citosol. Em seguida, a GT age nas mitocôndrias, de forma direta e indireta, ativando assim a via intrínseca da apoptose, interrompendo a cadeia respiratória e prejudicando a produção de ATP. Como consequência, há o desenvolvimento de estresse oxidativo, pelo aumento de ânions superóxido e radicais hidroxila (CUZZOCREA et al., 2002; EL MOUEDDEN et al., 2000; LOPEZ-NOVOA et al., 2011).

Para a análise da citotoxicidade o derivado DBA, foi utilizado ensaio de redução do MTT, onde DBA apresentou citotoxicidade apenas nas concentrações mais elevadas. Em estudos anteriores, tem sido mostrado que diferentes tipos de células expostas a derivados curcuminoides apresentam perda de viabilidade em concentrações elevadas (LIANG et al., 2021; LIN XINYU AND BAI, 2019; WU et al., 2019). As concentrações tóxicas encontradas no presente trabalho se assemelham às concentrações obtidas para outros derivados, mostrando que essas moléculas podem ser utilizadas em estudos posteriores, utilizando concentrações não-tóxicas (WU et al., 2019).

Em seguida, foram realizados novos ensaios de MTT com o objetivo de observar o efeito protetor do derivado DBA frente à lesão celular induzida por GT em modelos de pré e pós-tratamento. Nos ensaios de pré-tratamento DBA não causou efeito protetor; em contrapartida, no pós-tratamento DBA apresentou efeito protetor em células tratadas por 24 horas em baixas concentrações. Usualmente, experimentos similares de indução de dano por GT em células renais e bloqueio farmacológico são realizados em modelos de pós-tratamento, indicando que esse é mais reprodutível e melhor simula o possível efeito protetor de substâncias bioativas (ABD-ELHAKIM et al., 2022; TOMŞA et al., 2023). Já foi demonstrado que curcumina é capaz de combater a lesão renal aguda inibindo o estresse oxidativo, reduzindo a apoptose e melhorando a função mitocondrial (CAI et al., 2022).

Os mecanismos associados à lesão renal induzida por aminoglicosídeos estão intimamente relacionados à indução de estresse oxidativo, gerando respostas celulares e teciduais que culminam na lesão celular glomerular e tubular com consequente alteração de função renal (MAHMOUD et al., 2021). A CUR possui propriedades antioxidantes amplamente descritas, como anteriormente relatado neste estudo. Portanto, é de suma importância abordar a investigação dos efeitos da curcumina no equilíbrio óxido-redutor, a fim de compreender os mecanismos subjacentes ao seu efeito nefroprotetor no contexto do modelo de nefroproteção.

Em baixas concentrações, a CUR causa efeito antioxidante e de proteção contra a lesão mitocondrial (CHEN et al., 2019; TAN et al., 2019). Da mesma forma, o derivado curcuminoide DBA em estudo pode ter agido de forma semelhante, reduzindo o estresse oxidativo nas células renais.

A partir dos resultados obtidos, foi decidido avaliar a alteração mitocondrial nas células renais por citometria de fluxo. Foi utilizado Rho123 como marcador mitocondrial, que se acumula no espaço intermembranar de mitocôndrias íntegras. A perda do potencial transmembrânico mitocondrial causa redução do acúmulo de Rho123. DBA, em sua menor concentração, melhorou o potencial transmembrana mitocondrial em comparação às células tratadas com GT. Isso demonstra a capacidade dessa molécula em proteger a célula renal do efeito lesivo de GT.

A CUR pode promover a proteção mitocondrial e diminuir os processos inflamatórios através de diferentes mecanismos, como por meio da neutralização de ERO e aumento da concentração de mediadores antioxidantes mitocondriais (SALIMI; JAMALI; SHIRMARD, 2023). Em altas concentrações, a CUR parece causar o efeito oposto, com indução de dano mitocondrial e apoptose, como observado para células cancerígenas (LIU et al., 2014). Assim, DBA pode exercer seu efeito em baixas concentrações.

Um estudo realizado *in vivo* observou que a disfunção mitocondrial é o principal fator para o aumento de ERO mitocondrial da cadeia respiratória, onde a GT promove a agregação de Bax e a translocação para a mitocôndria, causando a ativação da caspase-9 e consequente ativação de caspase-3. Esses eventos levam a uma perda do potencial de membrana mitocondrial e iniciam o processo apoptótico (ABUELEZZ; HENDAWY; ABDEL GAWAD, 2016). O aumento de ERO mitocondrial leva conseqüentemente à indução de peroxidação lipídica, que é detectável pela mensuração de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (ORTIZ et al., 2013).

Visando observar esse efeito, o nível de estresse oxidativo nas células foi mensurado utilizando a determinação quantitativa de GSH e TBARS. Em ambientes celulares e teciduais sob condições oxidantes, observa-se uma transformação da glutatona reduzida (GSH) em glutatona oxidada (GSSG) por meio da doação de elétrons pelas moléculas de GSH-peroxidase. Esse processo é mediado pela enzima GSH-redutase, que tem a capacidade de reduzir GSSG de volta para GSH. A presença de ambientes oxidantes tende a esgotar os estoques de GSH, resultando em um aumento na relação GSSG/GSH. Essa relação é um indicador do estado redox celular e está intimamente relacionada ao estresse oxidativo e ao equilíbrio oxidativo-antioxidativo no sistema biológico estudado (GIUSTARINI et al., 2013).

O curcuminoide DBA conseguiu aumentar os níveis de GSH em células HK2 expostas a GT por 24 horas, o que indica uma característica antioxidante. Em estudos prévios, a CUR e seus derivados conseguiram eliminar ERO através da modulação da atividade das enzimas antioxidantes celulares e dos níveis de GSH (ALTINTOPRAK et al., 2016).

Foi observado que DBA conseguiu reduzir os níveis de TBARS em células expostas a GT por 24 horas. Em um estudo utilizando curcuminoides foi demonstrado que esses compostos possuem fortes propriedades antioxidantes (LOZADA-GARCÍA et al., 2017). A administração *in vivo* de curcumina resultou em redução significativa nos níveis plasmáticos de TBARS em ratos diabéticos. O potencial antioxidante conhecido da curcumina pode ser responsável pela sua capacidade de inibir a peroxidação lipídica (ROXO et al., 2019).

No contexto do manejo clínico e farmacológico do estresse oxidativo, tem sido considerado cada vez mais importante o desenvolvimento de substâncias capazes de interferir na produção de ERO ao invés de simplesmente neutralizar mediadores oxidantes pré-formados (ALTENHÖFER et al., 2014). Dessa forma, enzimas envolvidas no estabelecimento de um microambiente tecidual oxidado têm sido consideradas alvo para a ação de substâncias antioxidantes. A NADPH-oxidase 4 (NOX4) é uma das enzimas mais importantes para a manutenção do equilíbrio redox no tecido renal, e a administração de GT parece aumentar a expressão e a atividade dessa enzima, causando produção excessiva de ERO (FAN et al., 2021).

A NOX está diretamente ligada ao excesso de produção de ERO. A NOX é capaz de transferir elétrons do NADPH para o oxigênio molecular, resultando na formação do radical superóxido. Esse radical superóxido é uma das principais ERO produzidas pela NOX. Posteriormente, o radical superóxido pode ser convertido em outras ERO, como peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, por meio de reações enzimáticas adicionais ou pela participação de íons metálicos, como o ferro (CHOCRY; LELOUP, 2019b).

Além disso, curcumina tem apresentado efeito modulador sobre a expressão e atividade de isoformas de NOX em diferentes tecidos, como endotélio (KARIMIAN et al., 2017), células cancerígenas (FAN et al., 2015), micróglia (HE et al., 2010) e intestino (HALES et al., 2022). Foi observado ainda que a curcumina causou redução do estresse oxidativo associado a NOX4 em vesícula seminal de camundongos (LI et al., 2019). Adicionalmente, o tratamento com curcumina foi capaz de reduzir a expressão exacerbada de NOX4 observada em ratos idosos (AZIZ et al., 2022). Dessa forma, o presente trabalho avaliou o efeito teórico do curcuminoide DBA sobre a interação com NOX4, o que pode contribuir para o entendimento dos mecanismos de proteção dessas moléculas no tecido renal mediante a lesão celular induzida por GT.

No ensaio de *Docking* molecular, DBA exibiu interações teóricas com NOX4, sendo o encaixe molecular ocorrendo no mesmo sítio de ligação de apocinina, um inibidor já conhecido de NOX4 (KANEGAE et al., 2010). Dessa forma, a inibição de NOX4 por DBA pode ser um mecanismo envolvido no efeito biológico dessa molécula. Previamente, tem sido demonstrado que a inibição de NOX4 consegue prevenir dano celular renal (YAO et al., 2022).

A apocinina age bloqueando a subunidade p47phox, se ligando ao domínio SH3A. Dessa forma, tem sido demonstrado que esse domínio é fundamental na interação de p47phox-p22phox, levando a inibição da NOX (AHMAD et al., 2021; KANEGAE et al., 2010).

Em relação à estabilidade dos complexos ligante-proteína, foi observado que apocinina teve um valor de energia de afinidade (ΔG) de -5.1 kcal/mol, enquanto o análogo sintético DBA obteve uma energia de afinidade de -6.9 kcal/mol. É considerado que valores de ΔG menores que -6.0 kcal/mol indicam alta estabilidade na interação e são consideradas superiores (SHITYAKOV; FOERSTER, 2014).

O análogo DBA conseguiu realizar interações hidrofóbicas com os resíduos Met175A, Tyr161A, Glu174A, Leu177A, Trp193A e interações π -stacking com Trp194A. Já apocinina formou interações hidrofóbicas com Tyr161A e Trp194A, e formou ligações de hidrogênio com Trp194A. O resíduo Trp193A desempenha um papel central na interação com o peptídeo p22 (GROEMPING et al., 2003). Foi demonstrando que substituições no resíduo Trp193A no domínio SH3A é capaz de reduzir a produção de superóxido (MIZRAHI et al., 2010; SUMIMOTO et al., 1996). Além disso, a curcumina consegue reduzir a expressão da subunidade p47phox da NADPH-oxidase da mesma forma que o inibidor enzimático apocinina (YOUSEFIAN et al., 2019). Assim, o análogo sintético DBA apresenta a mesma característica, no controle da expressão de NOX4 e conseqüentemente nos níveis de estresse oxidativo.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, é possível concluir que o derivado curcuminoide sintético (*1E,4E*)-1,5-difenilpenta-1,4-dien-3-ona (DBA) apresentou características farmacocinéticas preditas melhoradas em relação à curcumina (CUR) natural, além de demonstrarem efeito protetor em modelo *in vitro* de lesão celular renal induzida por GT. Esse efeito está associado à redução do dano mitocondrial e do estresse oxidativo. Além disso, DBA se mostrou capaz de inibir a ação da isoenzima NADPH-oxidase na sua isoforma NOX4, em *Docking* molecular, que está associado aos níveis de ERO, sendo um alvo importante no contexto da nefroproteção.

REFERÊNCIAS

8. REFERENCIAS

- ABD-ELHAKIM, Y. M. et al. Curcumin attenuates gentamicin and sodium salicylate ototoxic effects by modulating the nuclear factor-kappaB and apoptotic pathways in rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 60, p. 89954–89968, 2022.
- ABDEL-RAHEEM, I. T.; ABDEL-GHANY, A. A.; MOHAMED, G. A. Protective Effect of Quercetin against Gentamicin-Induced Nephrotoxicity in Rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 1, p. 61–67, 2009.
- ABUELEZZ, S. A.; HENDAWY, N.; ABDEL GAWAD, S. Alleviation of renal mitochondrial dysfunction and apoptosis underlies the protective effect of sitagliptin in gentamicin-induced nephrotoxicity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 523–532, 1 abr. 2016.
- AHMAD, A. et al. Apocynin ameliorates NADPH oxidase 4 (NOX4) induced oxidative damage in the hypoxic human retinal Müller cells and diabetic rat retina. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 5, p. 2099–2109, 30 maio 2021.
- AJAY; BEMIS, G. W.; MURCKO, M. A. Designing libraries with CNS activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 42, n. 24, p. 4942–4951, dez. 1999.
- AL FAYI, M. et al. Thymoquinone and curcumin combination protects cisplatin-induced kidney injury, nephrotoxicity by attenuating NFκB, KIM-1 and ameliorating Nrf2/HO-1 signalling. **Journal of Drug Targeting**, v. 28, n. 9, p. 913–922, 20 out. 2020.
- ALI, B. H. Gentamicin nephrotoxicity in humans and animals: Some recent research. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 26, n. 7, p. 1477–1487, 1995.
- ALQAHTANI, S. In silico ADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 11, p. 1147–1158, 2017.
- ALTENHÖFER, S. et al. Evolution of NADPH Oxidase Inhibitors: Selectivity and Mechanisms for Target Engagement. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 23, n. 5, p. 406–427, 2 jan. 2014.
- ALTINTOPRAK, N. et al. Antioxidant activities of curcumin in allergic rhinitis. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 273, n. 11, p. 3765–3773, 2016.
- ANAND, P. et al. Bioavailability of curcumin: problems and promises. **Molecular pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807–818, 2007.
- ARNOTT, J. A.; PLANEY, S. L. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 10, p. 863–875, 2012.
- AZIZ, S. G.-G. et al. Effect of exercise and curcumin on cardiomyocyte molecular mediators associated with oxidative stress and autophagy in aged male rats. **Microvascular research**, v. 143, p. 104380, set. 2022.
- BALAKUMAR, P.; ROHILLA, A.; THANGATHIRUPATHI, A. **Gentamicin-induced nephrotoxicity: Do we have a promising therapeutic approach to blunt it?** **Pharmacological Research**, set. 2010.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976.
- CAI, Y. et al. Role of curcumin in the treatment of acute kidney injury: research challenges and opportunities. **Phytomedicine**, v. 104, p. 154306, set. 2022.

- CAO, J.-Y. et al. Exosomal miR-125b-5p deriving from mesenchymal stem cells promotes tubular repair by suppression of p53 in ischemic acute kidney injury. **Theranostics**, v. 11, p. 5248–5266, 2021.
- CHAGAS, C. M.; MOSS, S.; ALISARAIE, L. Drug metabolites and their effects on the development of adverse reactions: Revisiting Lipinski's Rule of Five. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 549, n. 1, p. 133–149, 2018.
- CHAINOGLU, E.; HADJIPAVLOU-LITINA, D. Curcumin analogues and derivatives with anti-proliferative and anti-inflammatory activity: Structural characteristics and molecular targets. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 14, n. 8, p. 821–842, 2019.
- CHAN, J. N. Y.; NISLOW, C.; EMILI, A. Recent advances and method development for drug target identification. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 31, n. 2, p. 82–88, 1 fev. 2010.
- CHAZOTTE, B. Labeling mitochondria with rhodamine 123. **Cold Spring Harbor protocols**, v. 2011, n. 7, p. 892–4, 1 jul. 2011.
- CHEN, B. et al. Curcumin attenuates MSU crystal-induced inflammation by inhibiting the degradation of I κ B α and blocking mitochondrial damage. **Arthritis Research & Therapy**, v. 21, n. 1, p. 193, 2019.
- CHEN, Z. et al. ELABELA attenuates deoxycorticosterone acetate/salt-induced hypertension and renal injury by inhibition of NADPH oxidase/ROS/NLRP3 inflammasome pathway. **Cell Death & Disease**, v. 11, n. 8, p. 698, 2020.
- CHOCRY, M.; LELOUP, L. The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 33, n. 5, p. 332–353, 11 dez. 2019a.
- CHOCRY, M.; LELOUP, L. The NADPH Oxidase Family and Its Inhibitors. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 33, n. 5, p. 332–353, 11 dez. 2019b.
- CRAIG, W. A. Optimizing Aminoglycoside Use. **Critical Care Clinics**, v. 27, n. 1, p. 107–121, 1 jan. 2011.
- CROW, M. T. et al. **The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. Circulation Research**, 12 nov. 2004.
- CUZZOCREA, S. et al. A role for superoxide in gentamicin-mediated nephropathy in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 450, n. 1, p. 67–76, 2002.
- DAINA, A.; ZOETE, V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. **ChemMedChem**, p. 1117–1121, 2016.
- DANDAWATE, P. R. et al. Inclusion Complex of Novel Curcumin Analogue CDF and β -Cyclodextrin (1:2) and Its Enhanced In Vivo Anticancer Activity Against Pancreatic Cancer. **Pharmaceutical Research**, v. 29, n. 7, p. 1775–1786, 2012.
- DEI CAS, M.; GHIDONI, R. Dietary Curcumin: Correlation between Bioavailability and Health Potential. **Nutrients**, v. 11, n. 9, 2019.
- DELANEY, J. S. ESOL: Estimating Aqueous Solubility Directly from Molecular Structure. **Journal of Chemical Information and Computer Sciences**, v. 44, n. 3, p. 1000–1005, 1 maio 2004.
- DENG, Y.; WU, K.; KUO, M. Y. Phenytoin induces connective tissue growth factor (<sc>CTGF</sc> / <sc>CCN2</sc>) production through <sc>NADPH</sc> oxidase 4- <sc>mediated latent TGF β 1</sc> activation in human gingiva fibroblasts: Suppression by curcumin. **Journal of Periodontal Research**, v. 57, n. 6, p. 1219–1226, 7 dez. 2022.

- DIMASI, J. A.; HANSEN, R. W.; GRABOWSKI, H. G. The price of innovation: new estimates of drug development costs. **Journal of health economics**, v. 22, n. 2, p. 151–185, mar. 2003.
- DITCHFIELD, R.; HEHRE, W. J.; POPLE, J. A. Self-Consistent Molecular-Orbital Methods. IX. An Extended Gaussian-Type Basis for Molecular-Orbital Studies of Organic Molecules. **The Journal of Chemical Physics**, v. 54, n. 2, p. 724–728, 15 jan. 1971.
- EL MOUEDDEN, M. et al. Gentamicin-Induced Apoptosis in Renal Cell Lines and Embryonic Rat Fibroblasts. **Toxicological Sciences**, v. 56, n. 1, p. 229–239, 1 jul. 2000.
- FAN, X. et al. Daphnetin ameliorated GM-induced renal injury through the suppression of oxidative stress and apoptosis in mice. **International Immunopharmacology**, v. 96, p. 107601, 1 jul. 2021.
- FAN, Z. et al. Curcumin inhibits the invasion of lung cancer cells by modulating the PKC α /Nox-2/ROS/ATF-2/MMP-9 signaling pathway. **Oncology reports**, v. 34, n. 2, p. 691–8, ago. 2015.
- FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Medicamentos e tratamentos para a Covid-19. **Estudos Avancados**, v. 34, n. 100, p. 7–27, 2020.
- FRIBLEY, A.; ZHANG, K.; KAUFMAN, R. J. Regulation of apoptosis by the unfolded protein response. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 559, p. 191–204, 2009.
- FRISCH, M. et al. Gaussian 09 (Revision A02). **Gaussian Inc. Wallingford CT**, 1 jan. 2009.
- FÜLLBECK, M. et al. Novel curcumin- and emodin-related compounds identified by in silico 2D/3D conformer screening induce apoptosis in tumor cells. **BMC Cancer**, v. 5, n. 1, p. 97, 2005.
- GIUSTARINI, D. et al. Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. **Nature Protocols**, v. 8, n. 9, p. 1660–1669, 2013.
- GRASBERGER, H.; REFETOFF, S. Identification of the Maturation Factor for Dual Oxidase: *EVOLUTION OF AN EUKARYOTIC OPERON EQUIVALENT**. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 27, p. 18269–18272, 7 jul. 2006.
- GROEMPING, Y. et al. Molecular Basis of Phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. **Cell**, v. 113, n. 3, p. 343–355, maio 2003.
- HAKYEMEZ, I. N. et al. Protective effects of *p*-coumaric acid against gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 6, p. 2825–2832, 2 nov. 2022.
- HALES, D. et al. Curcumin-Loaded Microspheres Are Effective in Preventing Oxidative Stress and Intestinal Inflammatory Abnormalities in Experimental Ulcerative Colitis in Rats. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 27, n. 17, 2 set. 2022.
- HANWELL, M. D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, n. 1, p. 17, 13 dez. 2012.
- HE, L. et al. Curcumin protects pre-oligodendrocytes from activated microglia in vitro and in vivo. **Brain research**, v. 1339, p. 60–9, 21 jun. 2010.
- HE, L. et al. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 17 nov. 2017.
- HODGSON, J. ADMET--turning chemicals into drugs. **Nature biotechnology**, v. 19, n. 8, p. 722–726, ago. 2001.
- IMBERTY, A. et al. Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1991.

- JACKSON, J.; CHEN, C.; BUISING, K. **Aminoglycosides: How should we use them in the 21st century? Current Opinion in Infectious Diseases**, dez. 2013.
- JENKINS, J. L.; BENDER, A.; DAVIES, J. W. In silico target fishing: Predicting biological targets from chemical structure. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 3, n. 4, p. 413–421, 1 dez. 2006.
- JIANG, F. et al. NADPH oxidase-dependent redox signaling in TGF- β -mediated fibrotic responses. **Redox Biology**, v. 2, p. 267–272, 2014.
- KADELA-TOMANEK, M. et al. Lipophilicity, Pharmacokinetic Properties, and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1,4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 781, 23 maio 2021.
- KANEGAE, M. P. P. et al. Diapocynin versus apocynin as pretranscriptional inhibitors of NADPH oxidase and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 393, n. 3, p. 551–4, 12 mar. 2010.
- KARIMIAN, M. S. et al. Curcumin and Endothelial Function: Evidence and Mechanisms of Protective Effects. **Current pharmaceutical design**, v. 23, n. 17, p. 2462–2473, 2017.
- KIKUCHI, H. et al. NADPH oxidase subunit, gp91phox homologue, preferentially expressed in human colon epithelial cells. **Gene**, v. 254, n. 1, p. 237–243, 2000.
- KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: Biological, Pharmaceutical, Nutraceutical, and Analytical Aspects. **Molecules**, v. 24, n. 16, 2019.
- KRAUSE, K. M. et al. Aminoglycosides: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 6, n. 6, 1 jun. 2016.
- KUBOTA, K.; FUNABASHI, M.; OGURA, Y. Target deconvolution from phenotype-based drug discovery by using chemical proteomics approaches. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1867, n. 1, p. 22–27, 1 jan. 2019.
- KUDO, F.; EGUCHI, T. Biosynthetic genes for aminoglycoside antibiotics. **The Journal of Antibiotics**, v. 62, n. 9, p. 471–481, 31 set. 2009.
- LAVECCHIA, A. Machine-learning approaches in drug discovery: methods and applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 3, p. 318–331, 1 mar. 2015.
- LESTARI, M. L. A. D.; INDRAYANTO, G. **Curcumin**. [s.l.: s.n.]. v. 39
Letters to the Editor. **Nephron**, v. 22, n. 4–6, p. 596–597, 1978.
- LI, R. et al. Curcumin ameliorates atrophy of seminal vesicle via reduction of oxidative stress in castrated mice. **PeerJ**, v. 7, p. e7192, 2019.
- LIANG, W.-F. et al. Curcumin Activates ROS Signaling to Promote Pyroptosis in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. **In vivo (Athens, Greece)**, v. 35, n. 1, p. 249–257, 2021.
- LIN XINYU AND BAI, D. A. N. D. W. Z. A. N. D. Z. Y. A. N. D. H. Y. A. N. D. D. H. A. N. D. H. X. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2-Keap1 pathway. **PLOS ONE**, v. 14, n. 5, p. 1–13, jun. 2019.
- LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.

- LIU, S. et al. A Comprehensive Review on the Benefits and Problems of Curcumin with Respect to Human Health. **Molecules**, v. 27, n. 14, 2022.
- LIU, X. et al. Curcumin inhibits proliferation of gastric cancer cells by impairing ATP-sensitive potassium channel opening. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 12, n. 1, p. 389, 2014.
- LOMBARDINO, J. G.; LOWE, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.
- LOPEZ-NOVOA, J. M. et al. New insights into the mechanism of aminoglycoside nephrotoxicity: an integrative point of view. **Kidney International**, v. 79, n. 1, p. 33–45, 1 jan. 2011.
- LOZADA-GARCÍA, M. C. et al. Synthesis of Curcuminoids and Evaluation of Their Cytotoxic and Antioxidant Properties. **Molecules**, v. 22, n. 4, 2017.
- MAHMOUD, A. M. et al. Agomelatine prevents gentamicin nephrotoxicity by attenuating oxidative stress and TLR-4 signaling, and upregulating PPAR γ and SIRT1. **Life Sciences**, v. 278, p. 119600, 2021.
- MARTÍNEZ-SALGADO, C. et al. Involvement of reactive oxygen species on gentamicin-induced mesangial cell activation. **Kidney international**, v. 62, n. 5, p. 1682–92, nov. 2002.
- MARTÍNEZ-SALGADO, C.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, F. J.; LÓPEZ-NOVOA, J. M. **Glomerular nephrotoxicity of aminoglycosides. Toxicology and Applied Pharmacology**, 15 ago. 2007.
- MERISKO-LIVERSIDGE, E.; LIVERSIDGE, G. G. Nanosizing for oral and parenteral drug delivery: A perspective on formulating poorly-water soluble compounds using wet media milling technology. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 6, p. 427–440, 2011.
- MIHARA, M.; UCHIYAMA, M.; FUKUZAWA, K. Thiobarbituric acid value on fresh homogenate of rat as a parameter of lipid peroxidation in aging, CCl₄ intoxication, and vitamin E deficiency. **Biochemical Medicine**, v. 23, n. 3, p. 302–311, jun. 1980.
- MIZRAHI, A. et al. A Prenylated p47 -p67 -Rac1 Chimera Is a Quintessential NADPH Oxidase Activator. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25485–25499, ago. 2010.
- MODA, T. L. Desenvolvimento de Modelos In Silico de Propriedades de ADME Para a Triagem de Novos Candidatos a Fármacos. p. 82, 2007.
- MORALES, A. I. et al. Resveratrol inhibits gentamicin-induced mesangial cell contraction. **Life sciences**, v. 78, n. 20, p. 2373–7, 11 abr. 2006.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983.
- NAU, R.; SÖRGEL, F.; EIFFERT, H. Penetration of Drugs through the Blood-Cerebrospinal Fluid/Blood-Brain Barrier for Treatment of Central Nervous System Infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 858–883, 2010.
- NGA, N. T. H. et al. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. **Analytical Biochemistry**, v. 610, p. 113937, 2020.
- NOUREDDIN, S. A.; EL-SHISHTAWY, R. M.; AL-FOOTY, K. O. Curcumin analogues and their hybrid molecules as multifunctional drugs. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, p. 111631, 2019.
- OLIVEIRA, M. M. et al. Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of Molecular Structure**, v. 1215, 2020.

- OMRAN, Z.; RAUCH, C. Acid-mediated Lipinski's second rule: application to drug design and targeting in cancer. **European Biophysics Journal**, v. 43, n. 4, p. 199–206, 2014.
- ORTIZ, M. DEL C. et al. Mitochondrial Dysfunction in Brain Cortex Mitochondria of STZ-Diabetic Rats: Effect of L-Arginine. **Neurochemical Research**, v. 38, n. 12, p. 2570–2580, 2013.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- RANDJELOVIC, P. et al. Salicylic acid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **The Scientific World Journal**, v. 2012, 2012.
- RANDJELOVIĆ, P. et al. **Gentamicin nephrotoxicity in animals: Current knowledge and future perspectives**. **EXCLI Journal** Leibniz Research Centre for Working Environment and Human Factors, , 24 maio 2017.
- ROXO, D. F. et al. Curcumin combined with metformin decreases glycemia and dyslipidemia, and increases paraoxonase activity in diabetic rats. **Diabetology & Metabolic Syndrome**, v. 11, n. 1, p. 33, 2019.
- RYAN, M. J. et al. HK-2: An immortalized proximal tubule epithelial cell line from normal adult human kidney. **Kidney International**, v. 45, n. 1, p. 48–57, 1994.
- SAID, M. M. The protective effect of eugenol against gentamicin-induced nephrotoxicity and oxidative damage in rat kidney. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 708–716, dez. 2011.
- SALIMI, A.; JAMALI, Z.; SHIRMARD, L. R. Chapter 18 - Curcumin for protecting mitochondria and downregulating inflammation. Em: OSTOJIC, S. M. (Ed.). **Molecular Nutrition and Mitochondria**. [s.l.] Academic Press, 2023. p. 461–500.
- SAMPAIO, T. L. et al. Involvement of NADPH-oxidase enzyme in the nephroprotective effect of (-)- α -bisabolol on HK2 cells exposed to ischemia – Reoxygenation. **European Journal of Pharmacology**, v. 855, p. 1–9, 15 jul. 2019.
- SHAKER, B. et al. In silico methods and tools for drug discovery. **Computers in Biology and Medicine**, v. 137, p. 104851, 2021.
- SHITYAKOV, S.; FOERSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, p. 23, set. 2014.
- SUETH-SANTIAGO, V. et al. **Curcumin, the golden powder from turmeric: Insights into chemical and biological activities**. **Quimica Nova** Sociedade Brasileira de Quimica, , 1 maio 2015.
- SUMIMOTO, H. et al. Assembly and Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 36, p. 22152–22158, set. 1996.
- SUMIMOTO, H.; MIYANO, K.; TAKEYA, R. Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 677–686, 2005.
- SZEGEZDI, E. et al. **Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis**. **EMBO Reports**, set. 2006.
- TAN, R.-Z. et al. Curcumin relieved cisplatin-induced kidney inflammation through inhibiting Mincle-maintained M1 macrophage phenotype. **Phytomedicine**, v. 52, p. 284–294, 2019.

- TOMŠA, A. M. et al. Curcumin and Vitamin C Attenuate Gentamicin-Induced Nephrotoxicity by Modulating Distinctive Reactive Species. **Metabolites**, v. 13, n. 1, 2023.
- TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, p. NA-NA, 2009.
- TRUJILLO, J. et al. **Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. Redox Biology** Elsevier B.V., , 2013.
- WALTERS, W. P. Going further than Lipinski's rule in drug design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 99–107, 1 fev. 2012.
- WARGO, K. A.; EDWARDS, J. D. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 27, n. 6, p. 573–577, 11 dez. 2014.
- WATERHOUSE, R. N. Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. **Molecular Imaging and Biology**, v. 5, n. 6, p. 376–389, nov. 2003.
- WOO, H. B. et al. Synthesis of novel curcumin mimics with asymmetrical units and their anti-angiogenic activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 16, p. 3782–3786, 2005.
- WU, L.-Y. et al. Curcumin Attenuates Adipogenesis by Inducing Preadipocyte Apoptosis and Inhibiting Adipocyte Differentiation. **Nutrients**, v. 11, n. 10, p. 2307, 28 set. 2019.
- WU, M. et al. NLRP3 deficiency ameliorates renal inflammation and fibrosis in diabetic mice. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 478, p. 115–125, 15 dez. 2018.
- YAO, L. et al. Mechanisms and pharmacokinetic/pharmacodynamic profiles underlying the low nephrotoxicity and ototoxicity of etimicin. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 41, n. 6, p. 866–878, 2020.
- YAO, W. et al. Inhibition of the NADPH Oxidase Pathway Reduces Ferroptosis during Septic Renal Injury in Diabetic Mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2022, p. 1193734, 2022.
- YOUSEFIAN, M. et al. The natural phenolic compounds as modulators of NADPH oxidases in hypertension. **Phytomedicine**, v. 55, p. 200–213, mar. 2019.
- YUE, L. et al. Epigallocatechin Gallate Attenuates Gentamicin-Induced Nephrotoxicity by Suppressing Apoptosis and Ferroptosis. **Molecules**, v. 27, n. 23, 2022.
- ZAIDI, S. N. F.; USMAN, S. M. Salicylic acid attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rabbits. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 34, n. 1, p. 165–170, jan. 2021.
- ZHANG, F. et al. Ribosomal stress couples the unfolded protein response to p53-dependent cell cycle arrest. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30036–30045, 6 out. 2006.