

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LUMA GODOY MAGALHAES

Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina
candidatos a fármacos para o tratamento do câncer

São Carlos

2019

LUMA GODOY MAGALHAES

Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Versão Corrigida
(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Magalhães, Luma Godoy

Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer / Luma Godoy Magalhães; orientador Adriano Defini Andricopulo - versão corrigida -- São Carlos, 2019.

132 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2019.

1. Câncer. 2. Tubulina. 3. Química medicinal. 4. Planejamento de fármacos. I. Andricopulo, Adriano Defini , orient. II. Título.

A todos que me apoiaram nessa jornada

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos e Laboratório de Química Medicinal e Computacional, por todas as minhas etapas de formação acadêmica.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, por todo incentivo, confiança ao longo de todos os anos em que trabalhamos juntos e às inúmeras e valiosas oportunidades que me foram oferecidas.

Ao Prof. Dr. Cedric Graebin e sua aluna Marina Brandão pela síntese dos compostos e inestimável colaboração sem a qual esse trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho e seu aluno Dr. Ralph da Costa Gomes pela síntese da colchicina conjugada com fluoresceína e auxílio no isolamento dos enantiômeros.

A todos os professores que tive em minha vida, que em sua nobre missão me permitiram ser o ser humano que sou hoje.

Às técnicas do LQMC Dra. Renata Krogh Andricopulo e Ma. Simone Michelin pela amizade, por todo o suporte no dia a dia do laboratório e da vida, por todos os cafés e conversas necessárias à manutenção da sanidade mental.

Às minhas queridas doutoras: Ivani Pauli, Mariana Laureano e Karina Matos por fazer dessa jornada um caminho muito mais agradável, por me ensinarem, me inspirarem e por toda a amizade que levaremos para a vida.

Aos membros atuais e egressos do LQMC pela amizade, discussões científicas e colaborações. Uma longa lista de pessoas queridas que tiveram papel fundamental no meu desenvolvimento.

À Dr. Annemarie Wehenkel pelas as linhagens HEK recombinantes e pela ajuda no estabelecimento do método para purificação da tubulina.

À Suze Farrell, coordenadora do programa de treinamento do *Wellcome Centre for Anti-Infectives Research* - Universidade de Dundee, pela oportunidade e por todo o apoio e amizade.

À incrível equipe de mentores do WCAIR por todo o conhecimento compartilhado, paciência e confiança durante meu período na Universidade de Dundee. Ao Dr. Ola Epemolu pela jornada na equipe DMPK e por toda gentileza. À Ma. Sandra O'Neill por compartilhar seu conhecimento sobre desenvolvimento de ensaios e por todos os doces ao longo do ano. À Dra. Lauren Webster pelos ensinamentos em química, “*power and speed*”. Gostaria de também agradecer à Lauren pela amizade, por todos os bate-papos no final do dia, por ser a melhor vizinha de mesa e por todas as cervejas, #*winning*.

A equipe DMPK da DDU pela a orientação, suporte e paciência. Agradeço ao Prof. Dr. Kevin Read, chefe do departamento de Metabolismo e Farmacocinética da Universidade de Dundee, pela oportunidade inestimável. À Nicole Mutter e Jennifer Riley pelo apoio nos ensaios *in vitro*. À Dra. Yoko Shishikura, Maria Osuna-Cabello e Dr. Paul Scullion por todo o apoio e orientação em bioanálise. Ao Me. Laste Stojanovski, Me. Liam Ferguson, Fred Simeons e Dra. Erika Pinto pelos estudos *in vivo* e conhecimento compartilhado. Gostaria de agradecer à equipe *in vivo* também por me fazer sentir bem-vinda, por todos os cafés e conversas que fizeram meus dias mais fáceis e felizes. À Erika pela amizade, por ser uma pessoa tão incrível, por tudo o que vivemos juntos, os shows, as cervejas, os jantares, as aranhas, o cara morto, o *stalker*, as conversas sobre a vida, foi ótimo para compartilhar meus dias com ela. Ao Fred por ter sido uma grata surpresa, por tudo o que ele fez para me fazer sentir em casa, segura e feliz, por ser uma pessoa maravilhosa, por me apoiar e cuidar de mim.

À equipe de Bioquímica da DDU pela confiança e conhecimento compartilhado. À Dra. Leah Torrie, Líder da Equipe de Bioquímica da DDU, pela oportunidade e orientação. Ao Dr. João Pisco por toda a ajuda no desenvolvimento de ensaios. Ao Dr. Fabio Tamaki por toda a ajuda e amizade. À Lesley-Anne Pearson, Karen Dowers, John Post e Dr. Filip Zmuda pelo conhecimento compartilhado. Ao Dr. Manu De Rycker e ao Dr. Michael Thomas pela oportunidade.

A todos os membros do WCAIR que não foram nomeados, mas foram importantes durante a minha jornada.

Ao Guilherme e Mattia, dois presentes que Dundee me deu, obrigado por todo o bom tempo juntos, apoio e amizade.

A tantos amigos que a vida me deu e que sempre me apoiaram e foram uma extensão da minha família. Infelizmente não conseguirei nominar a todos mas gostaria de agradecer especialmente àqueles que são parte do meu alicerce, Murilo, Bruno Barnabé, Raísa, Tamires e Mineira.

Ao Bruno por tantos anos de companheirismo e por ter me dado a base sólida que tenho hoje, eu não seria possível sem ele.

Aos meus pais e família, por serem responsáveis por quem sou hoje e por sempre acreditarem e torcerem por mim.

Ao apoio das agências de fomento para a realização do presente trabalho:

Da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES)
- Código de Financiamento 001;

Da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP),
(2013/07600-3 – CEPID-CIBFar);

Do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

The Wellcome Trust Centre Award [203134/Z/16/Z] - Wellcome Centre for Anti-Infective Research (WCAIR).

RESUMO

MAGALHAES, L. G. **Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer**. 2019. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

O câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo, sendo os tumores de mama os mais prevalentes e letais entre as mulheres. Apesar de vasta quimioterapia disponível, os tratamentos apresentam problemas como alta toxicidade e resistência. Dentre os tumores de mama, o subtipo triplo negativo (TNBC) apresenta o pior prognóstico e a maior limitação de tratamentos. O presente trabalho de doutorado visa o desenvolvimento de novos candidatos para tratamento de tumores de mama triplo-negativos. Fármacos que têm como alvo a proteína tubulina estão entre as terapias anticâncer mais bem-sucedidas e representam a primeira linha de tratamento para tumores do tipo TNBC. Neste contexto, foram desenvolvidas acridinonas que inibem a polimerização da tubulina e são capazes de impedir os principais mecanismos de resistência aos fármacos desta classe. O composto líder não interage com a bomba de efluxo glicoproteína-P, além de ser igualmente potente contra a linhagem celular superexpressando a tubulina β III, uma isoforma clinicamente relevante. O mecanismo de ação revelou a interação desses compostos com o sítio da colchicina da proteína alvo. Os compostos apresentaram valores de IC_{50} entre 10 e 12.000 nM contra a linhagem tumoral TNBC MDA-MB-231. Em contrapartida, não foi observada citotoxicidade na linhagem normal de fibroblastos humanos (HFF1). Ensaio de imunofluorescência reforçaram a ação seletiva dos compostos, mostrando que os mesmos perturbaram a rede de microtúbulos nas células MDA-MB-231, mas não nas células HFF1. As substâncias também inibiram a migração celular e a angiogênese *in vitro*. Os enantiômeros do composto líder foram separados, levando a identificação de um eutômero 10 vezes mais potente contra as células tumorais e 2 vezes mais potente contra a tubulina quando comparado com a mistura racêmica. Um candidato a fármaco, eficaz e seguro, deve apresentar um balanço favorável entre a sua potência e seus parâmetros farmacocinéticos. Dessa forma, o metabolismo e a farmacocinética das acridinonas bioativas foram investigados. Em geral, os compostos foram metabolicamente estáveis, mas requerem otimização da solubilidade e permeabilidade para o desenvolvimento de fármacos administrados por via oral. A avaliação do composto líder revelou propriedades promissoras que justificam a sua

consideração em modelos pré-clínicos de prova de conceito. O objetivo é a geração de candidatos a novos fármacos moduladores da tubulina com ação anticâncer.

Palavras-chave: Câncer. Tubulina. Química medicinal. Planejamento de fármacos.

ABSTRACT

MAGALHAES, L. G. **Development of new tubulin modulators as antitumor candidates**. 2019. 132 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2019.

Cancer is the second most common cause of death globally, being the breast tumors the leading cause of death in women. The number of anticancer medicines grows yearly but still exhibits problems such as high toxicity and resistance. The breast cancer has a number of subtypes and the one presenting the poorest prognosis and biggest therapeutic limitation is called triple negative breast cancer (TNBC). This PhD work aims to develop new small molecules as candidates to the treatment of the triple negative breast cancer. Drugs that target the protein tubulin are among the most successful anticancer therapies and represent the first line treatment to TNBC tumors. In this context, we developed a series of acridinones as tubulin inhibitors that can circumvent common resistance mechanisms to tubulin modulators. The lead compound did not interact with the P-glycoprotein and presented same effectiveness against cell lines overexpressing a clinically relevant tubulin isotype (β III). In this work, we determined the mechanism of action of these compounds, that bind to the colchicine site in the tubulin. The compounds presented IC_{50} cytotoxicity values between 10 – 12000 nM against the TNBC cell line MDA-MB-231, with no cytotoxicity against a normal fibroblast cell line (HFF1). Immunofluorescence studies reinforced the compounds selectivity showing they disrupted the microtubules network on MDA-MB-231 cells but not on the HFF1 ones. The substances also inhibited cell migration and angiogenesis *in vitro*. The enantiomers of the lead compound were purified, and we identified an eutomer 10-fold more potent against the tumor cells and 2-fold more potent against the tubulin when compared to the racemic mixture. The metabolism and pharmacokinetics of the compounds were also studied aiming the development of agents with a favourable balance between potency and pharmacokinetic parameters, essential feature of an effective and safe drug. In general, the compounds were metabolically stable but need an improvement in the solubility and permeability properties to be developed as oral drugs. In summary, the lead compound presents promising properties to be assessed in preclinical proof of concept studies for further development as next-generation antitubulin drugs.

Keywords: Cancer. Tubulin. Medicinal chemistry. Drug discovery.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	(A) Dímeros livres de tubulina, núcleo de microtúbulos, e microtúbulos. (B) Posições dos sítios de interação dos moduladores de microtúbulos vimblastina, colchicina e paclitaxel.	27
Figura 2 -	Moduladores de microtúbulos.	29
Figura 3 -	Figura 3 – Efeitos dos moduladores de microtúbulos nas células tumorais. As transições do ciclo celular estão indicadas por setas verdes. Setas vermelhas indicam atividade sobre a mitose, o efeito mais bem caracterizados dos MIA. As setas azuis indicam mecanismos secundários envolvidos na eficácia terapêutica destes fármacos.	30
Figura 4 -	Representação estrutural da tubulina (PDB ID: 1Z2B) ligada a três moduladores: paclitaxel (amarelo), vimblastina (azul) e colchicina (verde). A subunidade α está representada em cinza e a subunidade β em magenta.	32
Figura 5 -	Processo de identificação e otimização de novos compostos bioativos.	34
Figura 6 -	Influência dos parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos na dose eficaz de um fármaco.	35
Figura 7 -	Fluxo iterativo de trabalho empregado na caracterização dos compostos.	61
Figura 8 -	Modo de ligação predito pelo programa de docagem molecular GOLD. (A) Compostos 13 e 14 sobrepostos à colchicina. (B) Composto 12 sobreposto à colchicina.	62
Figura 9 -	Predição dos sítios de metabolismo de fase I para o composto 1. (A) Os pontos de metabolização preditos estão destacados com círculos rosa. Em verde está destacado o ponto que foi predito como aquele com maior probabilidade de sofrer metabolização. (B) Principal metabólito predito.	63
Figura 10 -	(A) Resultado das triagens no ensaio wound healing. As porcentagens de inibição são apresentadas como a média das triplicatas. (B) Exemplo de resultado para o controle negativo e para o composto 6 (10 μ M).	66
Figura 11 -	Fotomicrografias representativas das membranas do ensaio em câmara de Boyden. As células coradas podem ser observadas em roxo. As fotografias foram obtidas com o auxílio de uma objetiva de 10 X em um microscópio Axio Vert.A1 (Zeiss). (A) Controle negativo. (C) Composto 6 10 μ M. (C) Composto 6 3 μ M. D. Composto 6 1 μ M. (E) Composto 6 0,3 μ M. (F) Composto 6 0,1 μ M. (G) Composto 6 0,025 μ M. (H) Curvas concentração x resposta para a determinação do IC50 para os compostos 5 (verde), 6 (roxo) e 8 (azul).	67

Figura 12 -	(A) Resultado do ensaio de citotoxicidade contra a linhagem MDA-MB-231. (B) Curvas para determinação de IC50 dos compostos ativos 5 (verde), 6 (roxo) e 8 (azul).	68
Figura 13 -	(A) Resultado da triagem dos compostos no ensaio de polimerização da tubulina. (B) Curvas para determinação de IC50 dos compostos ativos 5 (verde), 6 (roxo) e 8 (azul).	70
Figura 14 -	(A) Resultados do ensaio competitivo pelo sítio da colchicina. Os dados são representativos de dois experimentos. (B) Inibição de ligação da colchicina fluorescente.	71
Figura 15 -	Imagens representativas do efeito dos compostos no citoesqueleto das células MDA-MB-231 (A) e HFF1 (B).	73
Figura 16 -	Imagens representativas dos efeitos dos compostos na tubulogênese de células HUVEC. Os tempos de incubação e objetivas utilizadas estão indicados nas fotomicrografias. As imagens das células tratadas no tempo de 24 h foram omitidas porque apresentaram padrão semelhante ao observado no controle negativo (DMSO 0,1%) em 24 h.	74
Figura 17 -	Imagens representativas do efeito dos compostos na tubulogênese de células HUVEC após 120 h de incubação. No detalhe, as células cultivadas na superfície sem recobrimento com Matrigel. As fotografias foram obtidas com o auxílio da objetiva de 10X em um microscópio com fluorescência Axio Vert.A1 (Zeiss). Apenas as células viáveis (coradas com calceína-AM) podem ser observadas.	75
Figura 18 -	Resultado do acúmulo de calceína fluorescente em relação ao controle. Significância estatística em relação ao controle * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Todos os compostos foram avaliados a 100 μM	76
Figura 19 -	Porcentagem de células fluorescentes após a indução da expressão com 2 $\mu\text{g/mL}$ de doxiciclina por 48 h.	78
Figura 20 -	Efeitos dos compostos em diferentes linhagens HEK. (A) Comparação da citotoxicidade nas linhagens selvagem (azul) e t5 (rosa).	79
Figura 21 -	(A) Gel SDS PAGE 10% (1) Marcador. (2) Sobrenadante após a primeira ultracentrifugação. (3) Pellet após a primeira etapa de polimerização. (4) Sobrenadante após a primeira etapa de polimerização. (5) Sobrenadante após a primeira etapa de despolimerização. (6) Pellet após a primeira etapa de despolimerização. (7) e (8) Pellet após a polimerização em tampão de alta molaridade. (B) Atividade de polimerização da proteína comercial na presença de DMSO (azul), paclitaxel (alaranjado) e colchicina (verde). (C) Atividade de polimerização da proteína purificada de cérebro de porco na presença de DMSO (azul), paclitaxel (alaranjado) e colchicina (verde). (D) Atividade de polimerização da proteína purificada da cultura de células HEK na presença de DMSO (azul), paclitaxel (alaranjado) e colchicina (verde).	80
Figura 22 -	Cromatogramas para: (A) 60 mg em 4 mL da mistura racêmica do composto 1. (B) primeiro enantiômero 1a obtido em 6,8 min (11 mg) e (C) Segundo enantiômero 1b obtido a 8,8 min (9,7mg).	82

Figura 23 -	Polimerização da tubulina na presença dos controles e dos compostos 1, 1a e 1b.	83
Figura 24 -	Distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular para o controle negativo (DMSO 0.1%) e após 48 h de tratamento com colchicina, doxorubicina, 1, 1a e 1b.	85
Figura 25 -	Curva de calibração utilizando os compostos referência paracetamol, teofilina, cafeína, benzimidazol, colchicina, carbamazepina, indol, propiofenona, butirofenona, valerofenona e heptanofenona.	87
Figura 26 -	Solubilidade aquosa x CHILogD.	88
Figura 27 -	Identificação de metabólitos após incubação com hepatócitos de camundongo. Cromatogramas e gráficos de abundância de espécies x tempo para os compostos (A) 1 e (B) 6.	95
Figura 28 -	Esquemas de SAR (A e B) e SPR (C e D).	98
Figura 29 -	Curva de calibração para o composto 1 em sangue de camundongo. O eixo x corresponde à concentração do composto em ng/mL e o eixo y à resposta obtida por MS.	100
Figura 30 -	Controle de qualidade das condições estabelecidas para determinação da concentração do composto 1 em sangue.	100
Figura 31 -	Estudo farmacocinético do composto 1 após administração intravenosa (dose única 3 mg/kg) e via oral (dose única 10 mg/kg) em fêmeas de camundongo BALB/c.	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Fármacos moduladores de microtúbulos aprovados como terapias antitumorais.	28
Tabela 2 -	Condições do sistema UPLC-MS/MS empregadas na análise dos compostos.	50
Tabela 3 -	Gradiente empregado na eluição dos compostos.	50
Tabela 4 -	Preparação dos substratos empregados na avaliação da atividade de diferentes isoformas das enzimas CYP.	56
Tabela 5 -	Concentrações de proteína e substrato empregadas nos ensaios de atividade.	56
Tabela 6 -	Comprimentos de onda utilizados no monitoramento da fluorescência dos diferentes substratos.	57
Tabela 7 -	Série de acridinonas.	64
Tabela 8 -	Resultados dos ensaios celulares e bioquímicos.	70
Tabela 9 -	Avaliação biológica dos enantiômeros puros.	84
Tabela 10 -	Tempos de retenção e índices de hidrofobicidade para os compostos estudados.	87
Tabela 11 -	Classificação de substâncias de acordo com suas propriedades de solubilidade/permeabilidade.	88
Tabela 12 -	Parâmetros ADME in vitro.	93
Tabela 13 -	Atividade inibitória contra um conjunto de enzimas CYP.	96
Tabela 14 -	Concentração média de composto nas amostras de sangue de camundongos Balb/c.	101
Tabela 15 -	Parâmetros farmacocinéticos após administração do composto 1 em camundongos Balb/c.	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D	Tridimensional
ACN	Acetonitrila
ADC	Anticorpo conjugado à fármaco
ADH	Álcool desidrogenase
ADME	Absorção distribuição metabolismo excreção
AUC	Área sobre a curva
CC ₅₀	Concentração de composto requerida para observação de 50% da resposta citotóxica
CHI	Índice hidrofóbico cromatográfico
Cl	Clearance
CL _{int}	Clearance intrínseco
CYP	Citocromo P450
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenil-indol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
ER	Receptor de estrógeno
F	Biodisponibilidade
FDA	U.S Food and Drug Administration
FMO	Flavina monooxigenase
fu	Fração livre
GTP	Guanosina trifosfato
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HTS	Triagem biológica em larga escala
IC ₅₀	Concentração de composto requerida para inibir em 50% a atividade biológica observada
INCA	Instituto Nacional de Câncer
iv	Intravenosamente
IVIVC	Correlação <i>in vivo in vitro</i>
LBDD	Planejamento baseado na estrutura do ligante
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada e espectrometria de massas
MAP	Proteína associada a microtúbulos
MDR	Resistência à fármacos múltiplos
MIA	Agente modulador de microtúbulos
MPT	Modificações pós traducionais

MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio
NCE	Nova entidade química
OMS	Organização mundial da saúde
PAMPA	Ensaio em membrana paralela artificial
PD	Farmacodinâmica
PDB	Banco de dados de proteínas
P _e	Permeabilidade
Pgp	Glicoproteína-P
PK	Farmacocinética
po	Per os
PR	Receptor de progesterona
QSAR	Relações quantitativas entre a estrutura e a atividade
QSPR	Relações quantitativas entre a estrutura e a propriedade
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNAse	Ribonuclease A
SAR	Relações entre a estruturas e a atividade
SBDD	Planejamento baseado na estruturas do receptor
SFB	Soro Fetal Bovino
SOM	Sítio de Metabolismo
SPR	Relações entre a estrutura a propriedade
T _{1/2}	Meia Vida
TNBC	Câncer de mama triplo negativo
TPP	Perfil alvo do produto
T _R	Tempo de retenção
UPLC	Cromatografia líquida de ultra performance
VDA	Desestabilizadores da vascularização tumoral
VS	Triagem virtual

SUMÁRIO

1	Introdução	25
1.1	Câncer	25
1.1.1	Câncer de mama	26
1.2	Tubulina como alvo terapêutico	26
1.2.1	Sítios de interação da tubulina	31
1.3	Desenvolvimento de fármacos	33
1.3.1	Desenvolvimento de antitumorais	35
2	Objetivos	37
3	Materiais e métodos	39
3.1	Modelagem molecular	39
3.2	Reagentes	39
3.3	Linhagens celulares	39
3.4	Preparação dos compostos	40
3.5	Ensaio de migração celular <i>wound healing</i>	40
3.6	Ensaio de migração celular em câmara de Boyden	41
3.7	Ensaio de citotoxicidade	41
3.8	Ensaio de polimerização da tubulina	42
3.9	Ensaio de competitividade pelo sítio da colchicina	43
3.10	Imunofluorescência	43
3.11	Ensaio de atividade anti-angiogênica <i>in vitro</i>	44
3.12	Ensaio de efluxo de calceína	44
3.13	Progressão do ciclo celular	45

3.14	Produção e purificação de tubulina humana recombinante	46
3.15	Análise estatística	47
3.16	Separação dos enantiômeros	47
3.17	Desenvolvimento de método para detecção dos compostos por LC- MS/MS	48
3.18	Determinação da solubilidade aquosa	48
3.19	Determinação do CHLogD	49
3.20	Ligação a proteínas do plasma	50
3.21	Estabilidade em plasma	51
3.22	Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA)	52
3.23	Estabilidade metabólica em microsomas de camundongo e humano	53
3.24	Estabilidade metabólica em hepatócitos de camundongo e humano	54
3.25	Identificação de metabólitos formados após incubação com hepatócitos	55
3.26	Inibição de enzimas CYP recombinantes	56
3.27	Perfil farmacocinético <i>in vivo</i>	57
3.27.1	Estudos de formulação para administração intravenosa	57
3.27.2	Administração intravenosa	58
3.27.3	Administração via oral	58
3.27.4	Bioanálise	59
3.27.5	Parâmetros farmacocinéticos	60
4	Resultados e discussão	61
4.1	Estratégia para triagens experimentais	61
4.2	Série de compostos	61
4.3	Planejamento dos compostos	62

4.4	Ensaio Biológicos	65
4.4.1	Ensaio de migração celular	65
4.4.2	Ensaio de citotoxicidade	67
4.4.3	Ensaio de inibição da polimerização da proteína tubulina	69
4.4.4	Ensaio de competitividade pelo sítio da colchicina	71
4.4.5	Imunofluorescência	72
4.4.6	Atividade anti-angiogênica <i>in vitro</i>	73
4.4.7	Ensaio de efluxo de calceína	75
4.4.8	Tubulina e suas isoformas	77
4.5	Separação dos enantiômeros	80
4.6	Avaliação biológica dos enantiômeros puros	82
4.7	Estudos de metabolismo e farmacocinética	85
4.7.1	Solubilidade aquosa	86
4.7.2	CHILogD	86
4.7.3	Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA)	88
4.7.4	Estabilidade metabólica em microsomas de camundongo e humano	89
4.7.5	Estabilidade metabólica em hepatócitos de camundongo e humano	91
4.7.6	Estabilidade em plasma e ligação a proteínas plasmáticas	92
4.7.7	Identificação de metabólitos formados após incubação com hepatócitos	93
4.7.8	Inibição de enzimas CYP recombinantes	96
4.7	SAR e SPR	97
4.8	Perfil farmacocinético <i>in vivo</i>	99
4.8.1	Estudos de formulação para administração intravenosa	99

4.8.2	Bioanálise	99
4.8.3	Parâmetros farmacocinéticos	101
5	Conclusões e perspectivas	105
	Referências	107
	Apêndice A Controle de qualidade dos compostos	115
	Anexo A Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros puros	125
	Anexo B Estrutura do metabólito dessaturado do composto 1	127
	Anexo C Determinação da pureza para administração <i>in vivo</i> e análise da dose administrada iv	129

1 Introdução

1.1 Câncer

O Câncer constitui um conjunto de doenças caracterizadas pela existência de tumores originados a partir da multiplicação de células atípicas. Estas células são insensíveis aos mecanismos de controle e defesa do organismo e são capazes de invadir e migrar por diversos tecidos, originando tumores secundários (metástase).¹ De acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se cerca de um novo caso por minuto no Brasil.² Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que o câncer é atualmente a segunda maior causa de mortes no mundo, tendo causado 9,6 milhões de óbitos em 2018, 70% dos quais em países em desenvolvimento.³⁻⁴

As células cancerosas são atípicas devido a mutações em seu material genético (DNA), que as tornam insensíveis aos mecanismos de auto reparação, levando a alterações responsáveis por sua natureza maligna. As principais alterações relacionadas à malignidade são: (i) autossuficiência em sinais de crescimento; (ii) insensibilidade a sinais inibidores do crescimento; (iii) evasão da apoptose; (iv) potencial replicativo ilimitado; (v) angiogênese sustentada e (vi) invasão de tecidos e metástase.⁵ Estas características envolvem uma complexa rede de vias bioquímicas, entre as quais podem-se identificar múltiplos alvos para ações terapêuticas que podem ser modulados pela ação de moléculas pequenas (fármacos).⁶

Apesar da remoção cirúrgica ser uma das opções terapêuticas, essa abordagem somente é eficaz no caso de tumores localizados bem delineados. Entretanto, os casos mais complexos e letais, tais quais os tumores metastáticos, exigem outros tipos de tratamentos, como a radioterapia e/ou a quimioterapia.⁶ Apesar de vasta, a quimioterapia disponível apresenta problemas, por exemplo, como alta toxicidade, que se deve principalmente as dificuldades de diferenciação entre as células saudáveis e malignas do organismo. Além disso, muitos fármacos estão associados a diversos mecanismos de resistência, reduzindo sua eficácia.⁷ Diante deste cenário, fica evidenciada a necessidade do desenvolvimento de novos compostos mais eficazes e seguros.

1.1.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o mais prevalente e letal entre as mulheres no Brasil e no mundo.⁸⁻⁹ São estimados cerca de 60 mil novos casos no Brasil para 2019, ao passo que 2 milhões de novos casos foram registrados no mundo em 2018.⁹⁻¹⁰ Dentre os mais de 100 tipos de câncer descritos, o câncer de mama é o quinto mais letal, e, dentre seus subtipos, os que apresentam pior prognóstico são os tumores de mama triplo negativo (TNBC, do inglês, *Triple Negative Breast Cancer*), caracterizados pela ausência dos receptores de estrógeno (ER, do inglês, *Estrogen Receptor*), progesterona (PR, do inglês, *Progesteron Receptor*) e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2, do inglês, *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*).^{8,10}

A agressividade do câncer de mama triplo negativo reside no fato de os mesmos serem altamente invasivos, apresentarem elevada taxa de metástases, sobretudo cerebrais, e exibirem alta taxa de reincidência. Além disso, estes tumores geralmente se desenvolvem em mulheres jovens (pré-menopausa) e não há tratamento específico, uma vez que as principais estratégias terapêuticas para o tratamento dos cânceres de mama têm como alvo os receptores hormonais ausentes nas células triplo negativas.¹⁰

As diretrizes de agências de saúde ao redor do mundo indicam terapias citotóxicas como primeira linha para tratamento dos tumores TNBC, com destaque para o papel central de fármacos moduladores de tubulina, tais quais os taxanos.¹⁰⁻¹¹ Apesar de alguns fármacos desta classe estarem disponíveis (e.g. paclitaxel, docetaxel, ixabepilona), os mesmos apresentam limitações como elevada toxicidade e farmacocinética inadequada, e estão sujeitos à mecanismos de resistência associados à bombas de efluxo e isoformas específicas da proteína alvo.¹²⁻¹⁵ Assim, o desenvolvimento de novos agentes moduladores de tubulina se faz necessário e é uma área em constante foco de pesquisa e desenvolvimento, como será melhor ilustrado na seção 1.2.

1.2 Tubulina como alvo terapêutico

Os microtúbulos são estruturas poliméricas proteicas do citoesqueleto envolvidas em processos celulares essenciais, tais como transporte intracelular, migração celular e mitose. São um sistema de polimerização dinâmica, composto

por heterodímeros de α e β tubulina. Estes heterodímeros se associam longitudinalmente, sendo adicionados ao chamado terminal (+), que possui uma molécula de guanosina trifosfato (GTP) ligada à β -tubulina; e são removidos do chamado terminal (-), que possui uma unidade de α -tubulina. A associação longitudinal das unidades de tubulina dá origem aos chamados protofilamentos, os quais se associam lateralmente para formar os microtúbulos (figura 1A).^{12,16-20}

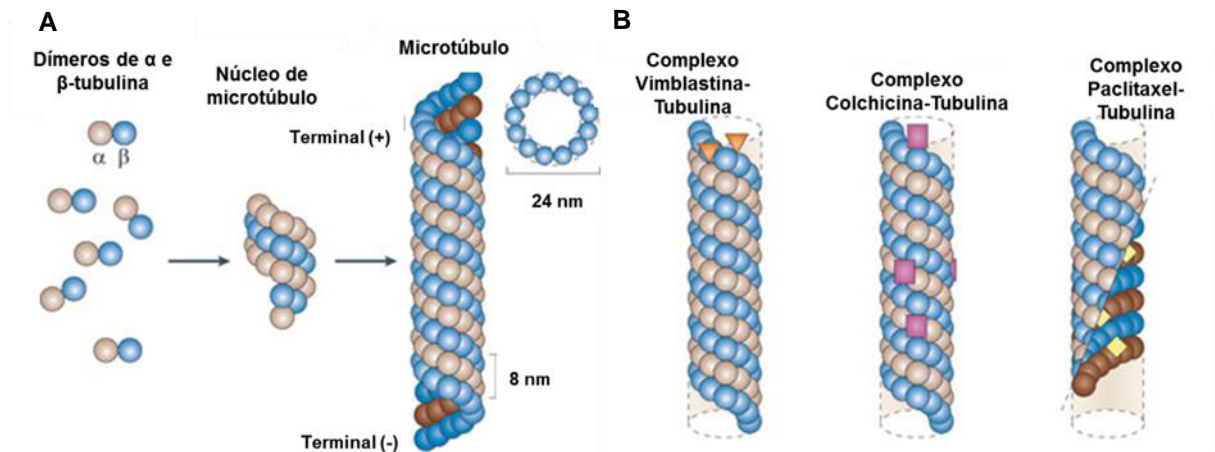


Figura 1 - (A) Dímeros livres de tubulina, núcleo de microtúbulos, e microtúbulos. (B) Posições dos sítios de interação dos moduladores de microtúbulos vimblastina, colchicina e paclitaxel. Fonte: Adaptada de DUMONTET et al.¹²

A supressão da instabilidade dinâmica dos microtúbulos interfere em suas funções, incluindo a formação das fibras do fuso mitótico, bloqueando a mitose e interrompendo o ciclo celular na fase G_2/M , o que leva as células à apoptose.^{12,17,21} Por este e outros mecanismos, a tubulina é considerada um dos alvos anticâncer mais importantes. O paclitaxel, um estabilizador de microtúbulos, foi o primeiro fármaco anticâncer a atingir a marca de 1 bilhão de dólares em venda em um ano.^{12,21-25} Ilustra-se, também, a relevância dos fármacos da classe de moduladores de microtúbulos (MIA, do inglês, *Microtubule-Interfering Agents*) pela sua presença na lista de medicamentos essenciais da OMS, na qual constam o paclitaxel, a vimblastina e a vincristina (figura 2).²⁶⁻²⁷ Estes agentes (MIA) são classificados em duas categorias, de acordo com o seu mecanismo de ação: (i) agentes estabilizadores e (ii) agentes desestabilizadores de microtúbulos.²⁸

Atualmente, existem 10 fármacos antitubulina aprovados pelo FDA (tabela 1) e o interesse no desenvolvimento de novos compostos permanece elevado, como pode ser ilustrado pelo número de substâncias que estão atualmente nas fases de desenvolvimento pré-clínico e clínico.²⁹⁻³¹ Alguns exemplos de compostos em fases

avançadas de desenvolvimento clínico são a vinflunina, EC145, ABT-751, tesataxel, TPI 287, EPO906 e ZK-EPO.

Uma das limitações apresentadas pelos fármacos moduladores de microtúbulos é sua alta toxicidade, uma vez que os mesmos são classificados como terapias citotóxicas. Estas são substâncias letais às células do organismo que, apesar de eficientes, apresentam pouca seletividade resultando em uma estreita janela terapêutica.²⁵ Outros tipos de fármacos anticâncer são os classificados como terapias alvo. Estes fármacos modulam proteínas especificamente envolvidas no processo de tumorigênese e, embora apresentem maior janela terapêutica, sua eficácia é reduzida e melhores resultados são obtidos em combinação com as terapias citotóxicas.²⁵

Uma estratégia moderna que busca unir as vantagens das terapias alvo e citotóxicas são os denominados fármacos conjugados a anticorpos (ADC, do inglês, *Antibody Drug Conjugate*). Os mesmos conjugam agentes citotóxicos a anticorpos que se ligam especificamente à receptores de células tumorais, melhorando a seletividade da terapia e mantendo sua eficácia. Presentemente existem 2 ADCs aprovados para o tratamento do câncer, e ambos utilizam como agentes citotóxicos compostos inibidores de polimerização da tubulina (tabela 1).²⁵

Tabela 1 - Fármacos moduladores de microtúbulos aprovados como terapias antitumorais.

Composto	Mecanismo
Paclitaxel	Estabilizador de microtúbulos
Vinblastina	Inibidor de microtúbulos
Vincristina	Inibidor de microtúbulos
Vinorelbina	Inibidor de microtúbulos
Ixabepilona	Estabilizador de microtúbulos
Eribulina	Inibidor de microtúbulos
Docetaxel	Estabilizador de microtúbulos
Cabazitaxel	Estabilizador de microtúbulos
Ado-Trastuzumab	Inibidor de microtúbulos conjugado a anticorpo (anti-HER2)
Brentuximab	Inibidor de microtúbulos conjugado a anticorpo (anti-CD30)

Fonte: Elaborada pela autora.

Outro exemplo da importância desta classe de medicamentos pode ser visto no recente desenvolvimento do rigosertib. Este composto foi desenvolvido em um projeto fenotípico (ou seja, sem alvo molecular previamente definido) e está atualmente em fase de desenvolvimento clínico 3. Desde o início dos testes clínicos

diversos esforços para elucidar seu mecanismo de ação vêm sendo feitos. Em 2016 foi publicado que este composto seria o primeiro inibidor da oncoproteína RAS a ser aprovado.³² Entretanto, em 2017, outro estudo foi publicado demonstrando que o efeito terapêutico do rigosertib se dá, na verdade, pela inibição da polimerização dos microtúbulos.³³ Fica claro que, em diversos cenários, o desenvolvimento de novos agentes moduladores de tubulina é de grande utilidade.

Vale ressaltar ainda, o papel dos produtos naturais como fármacos ou inspiração para os compostos moduladores de microtúbulos. Todos os compostos ilustrados na figura 1B são de origem natural, bem como a maior parte dos fármacos moduladores de microtúbulos aprovados e muitos outros compostos descritos na literatura.³⁴⁻³⁵ Assim, neste trabalho de doutorado, o produto natural podofilotoxina foi escolhido como estrutura de partida para o desenvolvimento de uma série de inibidores de polimerização da tubulina.

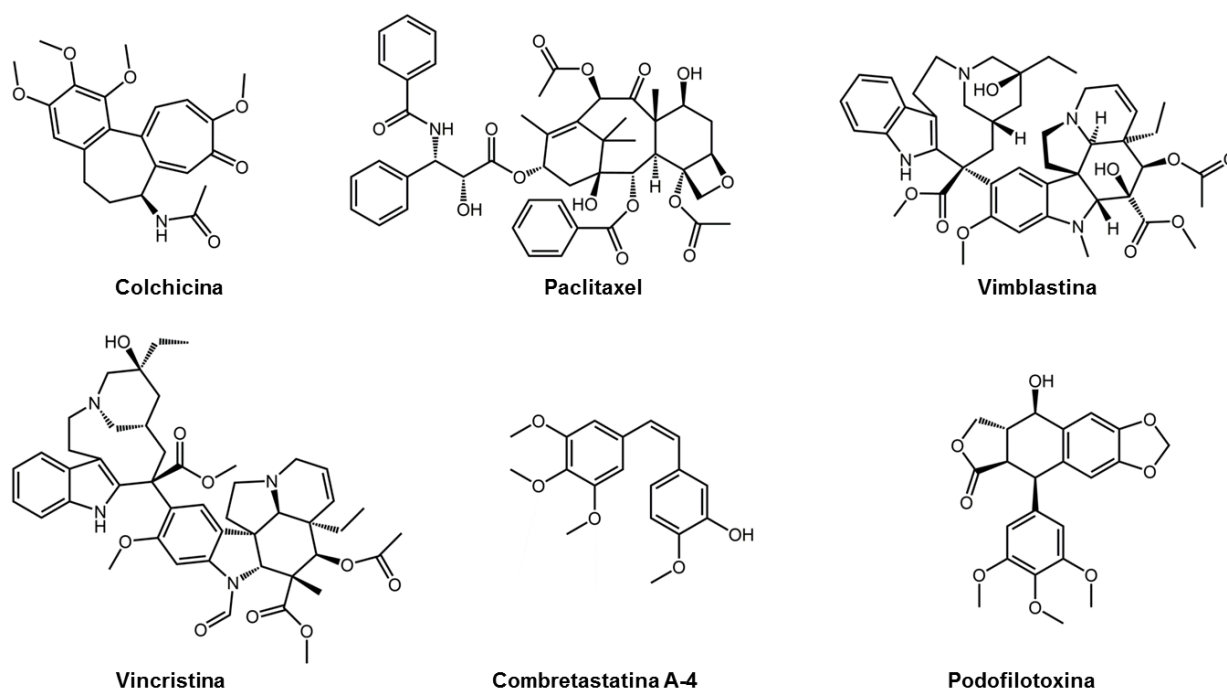


Figura 2 – Moduladores de microtúbulos.

Fonte: Elaborada pela autora.

Até recentemente se acreditava que a eficácia terapêutica dos MIA era função exclusiva da sua capacidade antimetabólica. Com o objetivo de avançar na descoberta de moduladores com menos efeitos colaterais, foram desenvolvidos compostos que agem em alvos exclusivos do processo mitótico, como, por exemplo, a proteína cinesina-5. No entanto, apesar dos resultados promissores *in vitro*, os estudos *in vivo* relevaram baixa atividade anticâncer.³⁶ Estas e outras evidências indicam que,

embora a interrupção da mitose seja fundamental para a ação terapêutica dos MIA, a interação destes agentes com os microtúbulos ao longo do ciclo celular gera efeitos secundários importantes (figura 3) em processos essenciais ao câncer, como a metástase e a angiogênese.^{29,36-39}

A metástase, processo responsável por 90% das mortes por câncer, consiste no estabelecimento de tumores secundários em tecidos distantes do tumor original, exigindo que as células invadam e migrem por tecidos adjacentes.⁴⁰⁻⁴² Por essa razão, propriedades antimigratórias têm sido consideradas desejáveis em novos agentes antitumorais.⁴³⁻⁴⁴ O processo de migração celular é diretamente afetado pelos microtúbulos, levando ao efeito antimetastático dos MIA.⁴⁵ Assim, o fenótipo migratório das células tumorais também foi selecionado como alvo de estudo deste trabalho.

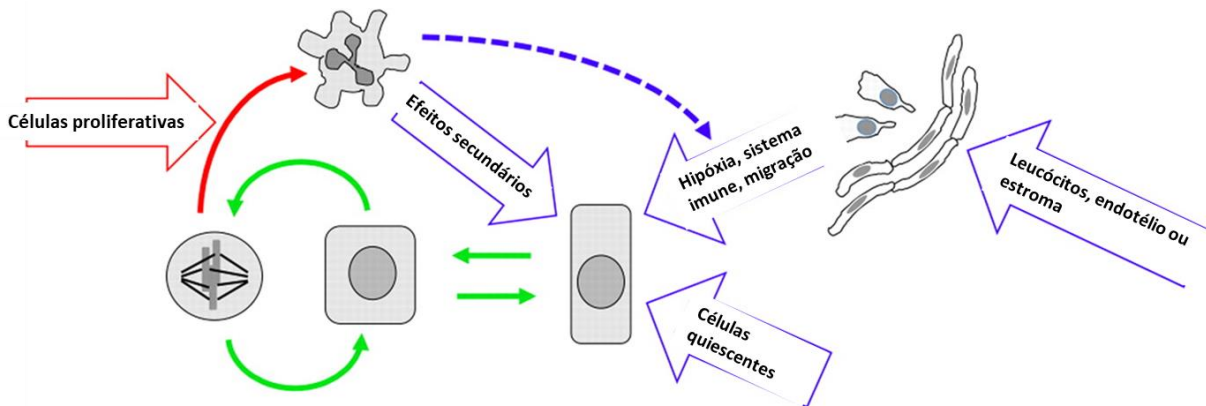


Figura 3 – Efeitos dos moduladores de microtúbulos nas células tumorais. As transições do ciclo celular estão indicadas por setas verdes. As setas vermelhas indicam atividade sobre a mitose, o efeito mais bem caracterizado dos MIA. As setas azuis indicam mecanismos secundários envolvidos na eficácia terapêutica destes fármacos.

Fonte: Adaptada de MITCHISON et al.³⁶

Outra cascata biológica fundamental para a sobrevivência do neoplasma é a formação de novas redes de vasos sanguíneos capazes de suprir os tumores com oxigênio e nutrientes. Tumores sólidos não crescem além de 1 mm³ sem estímulos à neovascularização. Além disso, estes novos vasos diferem daqueles encontrados nos tecidos adultos normais.³⁹ Uma variedade de inibidores de polimerização dos microtúbulos vem sendo desenvolvido como desestabilizadores da vascularização tumoral (VDA, do inglês, *Vascular-Disrupting Agents*), tais como a combretastatina A-4 e a ombrabulina.³⁹ Nesse contexto, modelos celulares foram utilizados para o estudo dos efeitos de MIA na angiogênese.

A tubulina é um alvo molecular complexo que apresenta grande diversidade de isoformas e modificações pós-traducionais (MPTs). Além do papel destas isoformas na resistência clínica à fármacos moduladores de tubulina, como a bem documentada resistência de tumores superexpressando a tubulina β III ao tratamento com paclitaxel,⁴⁶⁻⁴⁸ essa heterogeneidade pode ser explorada como fonte de seletividade tecidual.⁴⁹ Por exemplo, a indibulina, um inibidor de polimerização da tubulina, possui neurotoxicidade reduzida devido à sua diferença de afinidade pelas tubulinas neuronal (rica em modificações MPTs) e não neuronal.⁵⁰ Sendo assim, linhagens celulares recombinantes superexpressando diferentes isoformas ou MPTs da proteína tubulina foram estudadas neste trabalho de doutorado. Também foram avaliadas outras propriedades dos MIA, como a interferência no ciclo celular, citotoxicidade e seletividade frente às células saudáveis.

1.2.1 Sítios de interação da tubulina

Como mencionado anteriormente, os agentes perturbadores de microtúbulos podem ser classificados como estabilizadores ou desestabilizadores. Os diferentes mecanismos de ação são resultado da interação dos compostos em sítios distintos da proteína. Há ao menos 5 cavidades bem caracterizadas nas subunidades α , β e na interface entre as mesmas. Os 3 sítios mais bem descritos são o do paclitaxel, no qual se ligam estabilizadores, e os da vimblastina e colchicina, nos quais se ligam desestabilizadores (figura 4).²⁸

O sítio do paclitaxel localiza-se na subunidade β em uma região denominada alça M, a qual é fundamental para a interação lateral entre os protofilamentos. A interação dos compostos com a alça M consolida uma conformação reta entre as subunidades dos dímeros, estabilizando os microtúbulos e impedindo sua dissociação.⁵¹ O sítio da vimblastina localiza-se na região interdímero e a interação de compostos nesta cavidade promove a formação de protofilamentos curvos impedindo o correto processo de polimerização da proteína.⁵¹

O sítio da colchicina localiza-se na região intradímero, a ligação a esse sítio estabiliza a conformação curva dos dímeros o que impede a associação longitudinal dos mesmos, inibindo o processo de polimerização.⁵¹ Todos os fármacos moduladores de microtúbulos aprovados se ligam ao sítio do paclitaxel ou da vimblastina. Entretanto, o sítio da colchicina é alvo de intensa pesquisa pois seus

inibidores apresentam vantagens em relação aos ligantes dos outros sítios. Em geral, compostos que interagem com o sítio do paclitaxel e vimblastina possuem alto peso molecular e elevada complexidade estrutural, com propriedades farmacocinéticas que limitam a sua biodisponibilidade oral e exigem formulações complexas. Além disso, são susceptíveis a mecanismos de resistência por serem substratos da bomba de efluxo glicoproteína-P (Pgp).⁵²

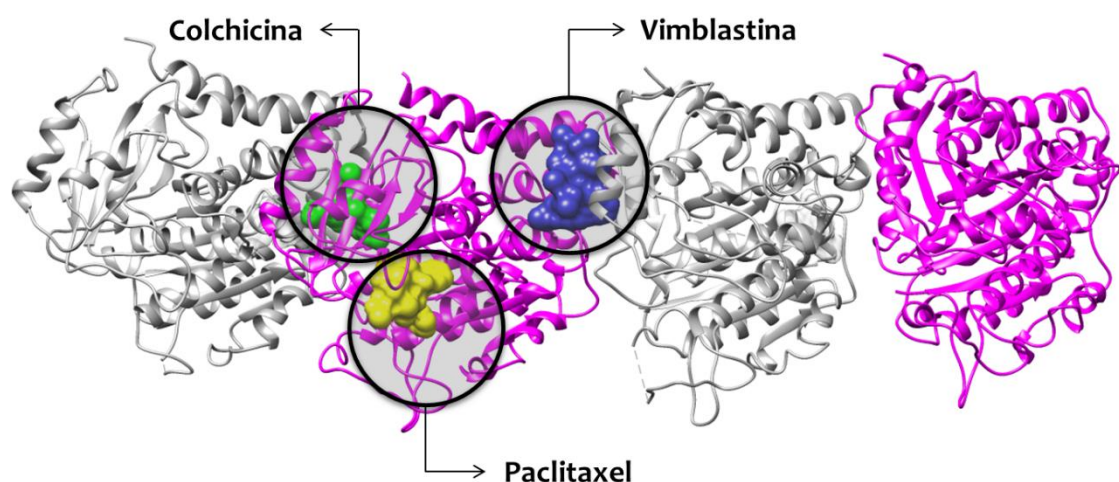


Figura 4 – Representação estrutural da tubulina (PDB ID: 1Z2B) ligada à três moduladores: paclitaxel (amarelo), vimblastina (azul) e colchicina (verde). A subunidade α está representada em cinza e a subunidade β em magenta.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os ligantes do sítio da colchicina, por outro lado, apresentam menor peso molecular e baixa complexidade estrutural, o que favorece a otimização de propriedades farmacocinéticas. Além disso, são menos sujeitos a mecanismos de resistência como a interação com a Pgp ou a superexpressão de isoformas. Por essa razão, essa classe tem recebido grande atenção na última década.⁵³ A combretastatina A4 é um exemplo dessa classe que chegou em fases clínicas de desenvolvimento como agente anti-angiogênico. Outros exemplos incluem o ZD6126, BNC-105p, CDK-516, AVE8062 e o rigosertib.⁵³⁻⁵⁴ Todos esses compostos, bem como a colchicina e a podofilotoxina, apresentam o grupo trimetoxibenzeno, grupo farmacofórico para a interação com o sítio da colchicina.

Apesar dos esforços, ainda não há fármacos dessa classe aprovados para o tratamento do câncer. Os principais desafios residem na melhora de propriedades farmacocinéticas, solubilidade aquosa e estabilidade metabólica.⁵³⁻⁵⁴ Nesta tese,

uma série de ligantes do sítio da colchicina foi desenvolvida e teve suas propriedades biológicas e farmacocinéticas caracterizadas.

1.3 Desenvolvimento de fármacos

O desenvolvimento de um composto químico, desde sua identificação como um *hit*, até a sua otimização como nova entidade química (NCE, do inglês, *New Chemical Entity*), integra conceitos e estratégias de disciplinas como química, biologia, farmacologia, física e quimio- e bioinformática. O desenvolvimento de um novo fármaco, desde a sua concepção até a chegada no mercado, leva cerca de 11 anos com custos superiores a 2 bilhões de dólares.⁵⁵ Este período envolve a fase de descoberta pré-clínica, na qual é realizada, a partir da seleção do alvo terapêutico, a identificação de compostos bioativos (*hit*), a otimização de propriedades até a descoberta de um composto líder e, finalmente, a otimização do líder a um candidato clínico. A fase pré-clínica é seguida pela fase de desenvolvimento clínico do candidato a fármaco (fases I, II e III). Após a comercialização do medicamento, tem início a fase IV.

Uma variedade de estratégias pode ser empregada na fase de desenvolvimento pré-clínico. A seleção inicial dos compostos pode ser feita por meio de triagens experimentais em larga escala (HTS, do inglês, *High Throughput Screening*) ou virtuais (VS, do inglês, *Virtual Screening*) de grandes coleções de compostos.⁵⁶ A otimização da potência dos compostos por ciclos iterativos de síntese de análogos e avaliação experimental pode ser baseada em um alvo fenotípico ou molecular. As particularidades e complexidade de cada projeto dependem das características da doença e população alvo. Estas características devem guiar a elaboração inicial de um perfil alvo do produto (TPP, do inglês, *Target Product Profile*) e de uma cascata de testes alinhada com o mesmo, de forma a dirigir as características relevantes do composto ao escopo do projeto. A definição clara destes objetivos e o desenho experimental aumentam significativamente as chances de êxito.⁵⁷

As cascatas de testes atuais incluem, nas fases iniciais, a otimização de propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas (figura 5). Este tipo de estratégia é relativamente recente e surgiu em resposta à alta incidência de insucesso de

fármacos nas fases clínicas de desenvolvimento, devido a propriedades farmacocinéticas inadequadas (ADME, para Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção).⁵⁸ Em 1991, cerca de 40% dos candidatos à fármacos que não tiveram sucesso falharam devido à biodisponibilidade inadequada. O acompanhamento de propriedades como absorção e permeabilidade fez com que as taxas de insucesso associadas à biodisponibilidade fossem reduzidas a 5% em 2001.⁵⁹ Apesar disso, o insucesso no processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos permanece alto. Atualmente, a maior parte (62%) dos candidatos é eliminado na fase de desenvolvimento clínico II, por conta de problemas com eficácia e/ou toxicidade.⁵⁹⁻⁶⁰

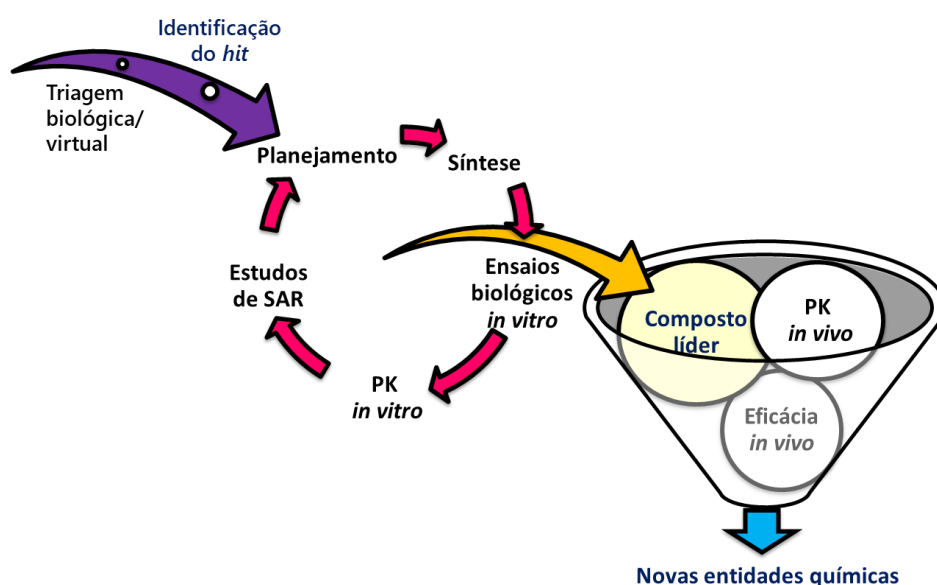


Figura 5 – Processo de identificação e otimização de novos compostos bioativos.

Fonte: Elaborada pela autora.

A importância da otimização múltipla de parâmetros pode ser melhor compreendida quando analisamos os parâmetros relevantes para a obtenção de uma dose eficaz *in vivo* (figura 6). A atividade do composto contra o alvo é indispensável para que se alcance o efeito terapêutico desejado. Entretanto, para que se atinja concentrações necessárias no tecido alvo para que ocorra a modulação do alvo, o composto deve ser estável (*clearance*), permeável e adequadamente distribuído. Não é incomum que, em séries de análogos, compostos com menor potência *in vitro*, mas com melhores propriedades ADME, mostrem-se mais eficazes *in vivo*.⁶¹

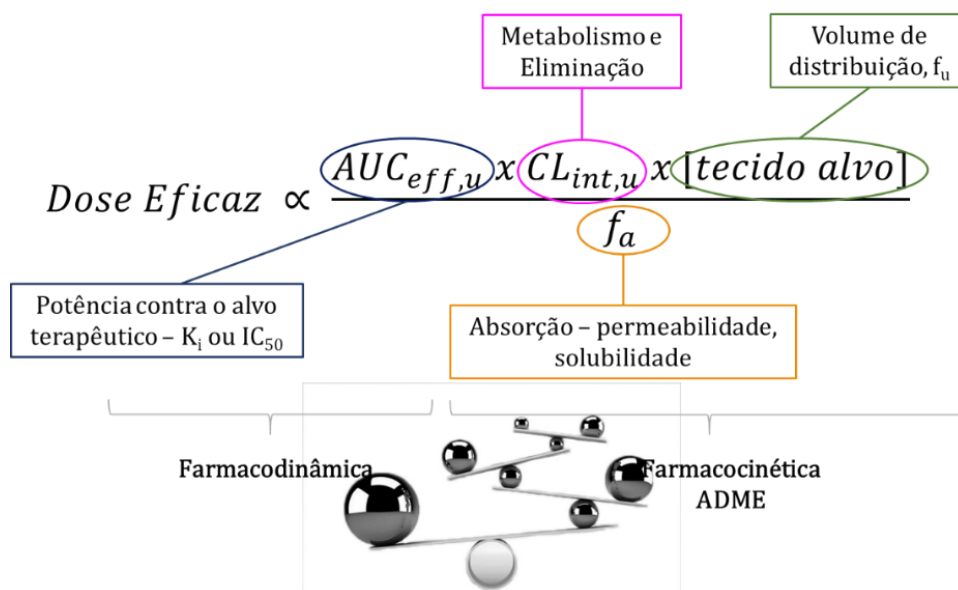


Figura 6 – Influência dos parâmetros farmacodinâmicos e farmacocinéticos na dose eficaz de um fármaco.

Fonte: Elaborada pela autora.

Durante as etapas de otimização molecular, diversas ferramentas auxiliam na proposição de novos análogos, e assim, contribuem para a redução de tempo e recursos experimentais. Metodologias de planejamento baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês, *Structure Based Drug Design*) e planejamento baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês, *Ligand Based Drug Design*) têm sido amplamente exploradas na academia e na indústria. As estratégias de SBDD utilizam informações estruturais sobre o receptor com o qual as moléculas interagem e compreendem metodologias como docagem e dinâmica molecular. As abordagens de LBDD utilizam informações sobre a pequena molécula e a atividade biológica e compreendem metodologias como modelos farmacofóricos ou modelos de relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR, do inglês, *Quantitative Structure Activity Relationship*) e de relações quantitativas entre a estrutura e propriedades (QSPR, do inglês, *Quantitative Structure Property Relationship*).⁶²

1.3.1 Desenvolvimento de antitumorais

O desenvolvimento de antitumorais é especialmente desafiador devido à complexidade das doenças. Os principais obstáculos são a correta validação dos alvos terapêuticos, a alta toxicidade associada à dificuldade de eliminar seletivamente o tecido neoplásico e o desenvolvimento de mecanismos de

resistência diversos.²⁵ Além disso, apenas 5% dos candidatos a agentes antitumorais demonstram eficácia suficiente em fases de desenvolvimento clínico III. As razões para essa taxa de insucesso são complexas, no entanto, uma limitação importante reside na falta de modelos animais preditivos para eficácia. Alguns problemas dos modelos atuais residem no fato de os tumores xenográficos se multiplicarem mais rapidamente que os tumores reais, exacerbando o efeito de terapias antimitóticas. Ainda, os animais utilizados nestes modelos são imunossuprimidos, eliminando as respostas do sistema imune ao tratamento. Além disso, os tecidos de sustentação do tumor possuem características diferentes do real; estes tecidos são fundamentais para a adesão e metástase do neoplasma.⁶³ Vale ressaltar que as limitações destes modelos e o insucesso na translação da eficácia de terapias alvo antimitóticas, ajudaram a reforçar as evidências de que o sucesso dos agentes moduladores de microtúbulos vai muito além dos seus efeitos sobre a interrupção da mitose (seção 1.2).

Por estes motivos, embora o investimento na pesquisa e desenvolvimento de antitumorais seja alto, resultando em um aumento médio do lançamento de 2 novos fármacos por ano, entre as décadas de 1950 e 1980, para 10 novas terapias por ano, entre 2011 e 2016, os tratamentos existentes ainda não são suficientes ou ideais.^{25,64} Neste contexto, o presente trabalho de doutorado tem como objetivo contribuir com o desenvolvimento e entendimento de estratégias para a geração de novos candidatos a fármacos antitumorais.

2 Objetivos

Os objetivos gerais desse trabalho de doutorado incluem a identificação e otimização de novas moléculas com atividade citotóxica contra células tumorais. Os objetivos específicos são:

- Planejamento molecular utilizando métodos *in silico*;
- Avaliação biológica por meio de ensaios celulares de migração, citotoxicidade e angiogênese;
- Determinação da seletividade frente às células cancerígenas, por meio de ensaios de citotoxicidade empregando células saudáveis;
- Avaliação bioquímica da proteína tubulina utilizando ensaios de polimerização baseados em fluorescência;
- Estudo do mecanismo de ação frente à tubulina com ensaios de competição;
- Investigação de efeitos celulares por meio de ensaios de citometria de fluxo;
- Avaliação dos efeitos de diferentes isoformas da proteína tubulina com o emprego de um sistema de células humanas recombinantes;
- Determinação das propriedades biológicas dos enantiômeros puros;
- Investigação *in vitro* e *in vivo* do metabolismo e farmacocinética dos compostos.

3 Materiais e métodos

3.1 Modelagem molecular

Métodos de docagem molecular foram empregados a fim de predizer as interações proteína-ligante. As estruturas tridimensionais (3D) dos compostos foram geradas na plataforma SYBYL-X (Certara, *Princeton*, Estados Unidos) e minimizadas utilizando o campo de força *Tripos*. As cargas parciais foram calculadas pelo método Gasteiger-Hückel. A estrutura da tubulina em complexo com a colchicina (código: 4O2B) foi obtida no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês, *Protein Data Bank*). As simulações de docagem foram realizadas no programa Gold 5.2⁶⁵ (*Cambridge Crystallographic Data Centre, Cambridge, Reino Unido*). As estruturas proteicas foram preparadas para a docagem com a remoção dos ligantes e a adição de átomos de hidrogênios. As coordenadas do ligante original foram usadas como referência para a localização do sítio de docagem. O sítio da colchicina foi definido como os resíduos presentes em um raio de 8 Å a partir das coordenadas dos ligantes originais. A função de pontuação empregada foi a *GoldScore*, que é baseada em campos de força e considera as contribuições energéticas das interações de van der Waals e das interações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares (entre a proteína e o ligante). O método foi validado por meio da docagem com o ligante original.

3.2 Reagentes

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram adquiridos de fontes comerciais apresentando certificado de qualidade e pureza. As principais empresas fornecedoras foram: Sigma, Promega, Invitrogen, Cultilab, Gibco e Cytoskeleton.

3.3 Linhagens celulares

Para avaliação dos efeitos antitumorais dos compostos foi utilizada a linhagem celular MDA-MB-231, de câncer de mama metastático, triplo negativa. Para avaliação da atividade anti-angiogênica foi utilizada a linhagem HUVEC, de tecido normal endotelial. Para a produção da tubulina recombinante, utilizamos a

linhagem HEK, de tecido normal de rim embrionário. E, por fim, para a avaliação da seletividade das substâncias testadas empregamos a linhagem HFF1, de tecido normal epitelial. Todas as linhagens foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*, Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), o meio de cultivo da HEK também foi suplementado com mais 3,5 g/L de glicose. As células foram mantidas em estufa a 37° C em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de umidade. Todas as linhagens foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ).

3.4 Preparação dos compostos

As soluções-estoque dos compostos foram preparadas a 25 e 10 mM em 100% de DMSO. As soluções utilizadas nos ensaios celulares foram preparadas em meio de cultura, a partir das soluções-estoque, de modo a se obter a concentração de composto desejada e uma concentração final de DMSO de 1%. As soluções utilizadas nos ensaios bioquímicos foram preparadas em tampão geral de tubulina (descrito no item 3.7), a partir das soluções-estoque, de modo a obter-se a concentração de composto desejada e uma concentração final de DMSO de 1%. As soluções utilizadas nos ensaios de farmacocinética foram preparadas conforme requerimentos de cada procedimento experimental. O grau de pureza dos compostos pode ser verificado no apêndice A.

3.5 Ensaio de migração celular *wound healing*

O ensaio celular *wound healing*⁶⁶⁻⁶⁷ foi realizado para avaliar semi-quantitativamente a capacidade de inibição da migração celular. Células MDA-MB-231 foram plaqueadas a uma densidade de $1,0 \times 10^5$ células por poço, em placas de 24 poços (TPPTM, *Trasadingen*, Suíça) e cultivadas por 48 h. Após esse período, foi infligida uma fenda na monocamada celular, com o auxílio de uma régua e uma ponteira p100 estéril. Os poços foram lavados com meio de cultura por três vezes. A seguir, soluções contendo meio de cultura, 10% de SFB e os compostos-teste (10 µM) ou controles (colchicina e podofilotoxina, 10 µM) foram adicionados aos poços em duplicata. As placas foram incubadas por 24 h em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. As fendas foram fotografadas com o auxílio de um microscópio

óptico invertido utilizando a objetiva de 4x. As imagens foram obtidas no início ($t_1 = 0$ h) e ao final do experimento ($t_2 = 24$ h). Empregando-se o software *Image J*, as áreas das fendas em t_1 e t_2 foram determinadas. Os valores das áreas no início e no final dos experimentos foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição da migração celular. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

3.6 Ensaio de migração celular em câmara de Boyden

Para a quantificação da inibição da migração celular foi realizado o ensaio de migração celular em câmara de Boyden.⁶⁸ Neste ensaio, foram utilizadas placas de 24 poços contendo insertos com membranas de $0,3 \text{ cm}^2$ de área e poros de $8 \mu\text{m}$ (Corning FalconTM). Foram adicionadas 4×10^4 células MDA-MB-231 aos insertos com $300 \mu\text{L}$ de uma solução contendo meio de cultura sem SFB, os compostos-teste ($10 - 0,025 \mu\text{M}$) ou controles (colchicina e podofilotoxina). No compartimento inferior (poços da placa suporte), foram adicionados $700 \mu\text{L}$ de meio de cultura com 10% de SFB (quimioatratante) e os compostos-teste ou controles. Este sistema foi incubado por 6 h em estufa a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 e 95% de umidade. A seguir, o meio de cultura foi retirado dos insertos e as células que não migraram, contidas na face interna da membrana, foram removidas com o auxílio de uma haste de algodão. As membranas foram fixadas em metanol por 5 min e coradas em uma solução de toluidina (10 mg/mL) em bórax 1% por 5 min. As membranas coradas foram fotografadas com o auxílio de um microscópio invertido (objetiva de 10x) e as células que migraram através da membrana foram contadas. A porcentagem de inibição da migração celular foi determinada em relação às membranas dos controles negativos. Os valores de IC_{50} foram determinados como descrito na seção 3.13. Foram realizados dois experimentos independentes em duplicata.

3.7 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio MTS.⁶⁷ Células MDA-MB-231 e HFF1 foram plaqueadas a uma densidade de 2×10^3 células por poço em placas de 96 poços (TPPTM). 48 h após a indução da expressão da tubulina recombinante com doxiciclina a $2 \mu\text{g/mL}$, células HEK-293 T-RExTM foram

plaqueadas a uma densidade de 3×10^3 células por poço. Em todos os casos, após 24 h de incubação em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, os compostos-teste e controles foram adicionados aos poços (100 – 0,01 µM) e incubados por 72 h a 37 °C. Após esse período, as soluções dos poços foram substituídas por uma solução contendo 80 µL de DMEM sem vermelho de fenol, 10% de SFB e 20 µL do reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfonil)-2H-tetrazolio (MTS) (Promega). As placas foram incubadas por 3 h em estufa a 37 °C. A seguir, a absorbância dos poços em comprimento de onda de 490 nm foi medida em um espectrofotômetro SpectraMax Plus384 (Molecular Devices). A determinação dos parâmetros de CC₅₀ foi feita como descrito no item 3.13.

3.8 Ensaios de polimerização da proteína tubulina

A modulação da tubulina foi avaliada por meio de ensaios de polimerização da proteína *in vitro*. Foram realizados ensaios de fluorescência⁶⁸ utilizando kits de polimerização da tubulina (código: BK011P, *Cytoskeleton Inc*). O kit contém 10 mg de tubulina liofilizada purificada de cérebro de porco com pureza superior a 99%, GTP e paclitaxel liofilizados, e tampões de reconstituição (tampão 1) e polimerização (tampão glicerol). O tampão 1 é constituído por: 80 mM PIPES (piperazina-1,4- bis (ácido 2-etanosulfônico); 2 mM cloreto de magnésio (MgCl₂); 0,5 mM EGTA (ácido etileno glicol-bis (β-amino-etil-éter) N,N,N₉,N₉- tetra-acético) e 10 µM de DAPI em pH 6,9. O tampão glicerol contém: 80 mM PIPES; 2 mM MgCl₂; 0,5 mM EGTA e 60% de glicerol em volume em pH 6,9. Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços pretas e de meia área fornecidas junto com o kit. Em cada poço foram adicionados 5 µL de composto teste solubilizado em 10% de DMSO e 45 µL de mistura reacional (2 mg/mL de tubulina; 80 mM PIPES; 0,5 mM EGTA; 1 mM GTP; 2 mM MgCl₂, 15% de glicerol e 10 µM de DAPI; em pH 6,9). Esta mistura foi adicionada aos poços da placa logo após seu preparo, com o auxílio de uma pipeta multicanal. A concentração final de DMSO no ensaio foi de 1%, o que minimiza a interferência do solvente na polimerização dos microtúbulos. Em seguida, a placa foi colocada no fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices) pré-aquecido a 37 °C. As placas foram analisadas utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão de, respectivamente, 340 e 460 nm. Foram executados 70 ciclos de leitura com intervalos de 45 s entre duas leituras do mesmo poço. Para a

determinação de IC₅₀ foram empregadas 7 concentrações dos compostos-teste, em duplicata.

3.9 Ensaio de competitividade pelo sítio da colchicina

Para confirmar o sítio de interação dos compostos, ensaios de competição pelo sítio da colchicina foram realizados, com colchicina conjugada com fluoresceína como marcador.⁶⁹ A mistura de reação foi preparada com 1960 µL de tubulina a 1 mg/mL (> 97% de pureza, HTS03, *Cytoskeleton*) em tampão contendo 0,25 mM de PIPES, 0,05 mM de GTP e 0,25 mM de MgCl₂ em pH 6,9. Esta mistura foi incubada por 30 min a 37 °C com DMSO (controle negativo), colchicina a uma concentração final de 50 µM (controle positivo) ou o composto-teste a uma concentração final de 50 µM. A seguir, colchicina fluorescente a uma concentração final de 0,5 µM foi adicionada à mistura, que foi incubada por mais 30 min a 37 °C. Esta solução foi aplicada em uma coluna de exclusão molecular (Sephadex G25 *fine*) com 5 cm de comprimento. 150 µL do eluato (aproximadamente 6 gotas) foram coletados em uma placa preta de 96 poços (OptiPlate-1536 *F-Black*, PerkinElmer). Após o preenchimento de 24 poços, a fluorescência foi medida em um fluorímetro de placa (Victor3, PerkinElmer) utilizando os filtros de 485 nm para excitação e de 535 nm para emissão.

3.10 Imunofluorescência

Para o ensaio de imunofluorescência, 5 x 10⁴ células MDA-MB-231 foram cultivadas em lâminas de vidro por 24 h (354118, BD Falcon). Após a adesão celular, as células foram incubadas com os compostos-teste (2 µM) por 48 h. Ao término deste período, as células foram fixadas com *p*-formaldeído a 4 % em PBS (tampão fosfato salino: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4), por 20 min. As células fixadas foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1 % por 5 min. Para minimizar a interferência do fundo, as células foram tratadas com albumina de soro bovino (BSA) a 2 % durante 30 min. O anticorpo primário anti- α-tubulina (T8203, Sigma Aldrich) foi incubado com as células por 1 h, no escuro. Subsequentemente, as células lavadas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário Alexa FluorTM 488 (Invitrogen, *anti-mouse* IgG) na presença de

4',6-diamidino-2-fenil-indol (DAPI). As lâminas foram lavadas em PBS e montadas com Vectashield™ (Vector Laboratories). As imagens de microscopia confocal de fluorescência foram obtidas em um microscópio Zeiss 780 invertido, com laser de diodo para 405 nm e laser de hélio-neônio para 555 nm, objetiva 63x /1.4 NA Oil Plan Apochromat. A fluorescência do DAPI foi excitada por laser em comprimento de 405 nm e a emissão foi coletada em 434 nm. A fluorescência do Alexa Fluor™ 488 foi excitada por laser em comprimento de 488 nm e a emissão foi coletada em 534 nm. O software ZEN 2.3™ (Zeiss) foi utilizado para a manipulação das imagens.

3.11 Ensaios de atividade anti-angiogênica *in vitro*

O modelo de tubulogênese foi empregado para a avaliação anti-angiogênica dos compostos.⁷⁰⁻⁷¹ Primeiramente, os poços de uma placa de 96 poços foram recobertos com uma camada de matriz extracelular (Matrigel®, BD Biosciences). Para tanto, 40 µL de Matrigel foram adicionados aos poços de uma placa de 96 poços (as ponteiras e placa utilizadas foram previamente refrigeradas a -20 °C e mantidas em gelo durante o processo). A seguir, a placa foi incubada a 37 °C por 30 min para permitir a polimerização da Matrigel. Após este período, adicionou-se aos poços 100 µL de uma suspensão contendo $1,5 \times 10^4$ células HUVEC em meio DMEM com 2% de SFB e 30 ng/mL de fator de crescimento epidérmico (EGF, E9644, Sigma). Os compostos-teste e controles foram adicionados aos poços em concentrações subtóxicas e fotomicrografias foram obtidas a cada 24 h durante 5 dias. Ao final do quinto dia, as células foram incubadas com 1 µM de calceína-AM (56496, Sigma) por 30 min para marcação das células viáveis. Fotomicrografias foram obtidas com o auxílio de um microscópio óptico invertido Axio Vert.A1 (Zeiss). As imagens foram qualitativamente avaliadas utilizando o software ZEN 2.3. Foram conduzidos três ensaios independentes em duplicatas.

3.12 Ensaio de efluxo de calceína

Para avaliar a ação dos compostos na atividade de bombas de efluxo foi realizado o ensaio de efluxo de calceína.⁷² Para tanto, células MDA-MB-231 foram cultivadas por 48 h em placas de 12 poços (TPP™) a uma densidade de $1,0 \times 10^5$ células/poço em estufa a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após esse período,

os compostos-teste e controles foram adicionados a uma concentração de 100 μM e incubados por 2 h. Em seguida, o meio foi removido e os poços foram lavados com solução balanceada de Hank's (HBSS). Adicionou-se aos poços 1 mL de uma solução contendo 50 nM de calceína-AM (56496, Sigma) e 100 μM dos compostos em meio de cultura sem SFB. A placa foi incubada por 30 min em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 . O meio foi removido dos poços e as células foram retiradas da placa através da adição de 200 μL de tripsina e centrifugadas por 10 min a 170 rcf. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado por 2 vezes com uma solução contendo 0,09% de SBF em PBS. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em 500 μL de PBS e analisadas em citômetro de fluxo BD Accuri C5 (BD Biosciences™) por meio de excitação por luz laser a 488 nm e emissão utilizando filtro 533/30 nm. Foram coletados 15 mil eventos por amostra e os dados foram tratados utilizando o programa BD CSampler (BD Biosciences™). Três ensaios independentes em duplicatas foram conduzidos.

3.13 Progressão do ciclo celular

A avaliação da progressão do ciclo celular foi feita por meio da quantificação de DNA presente nas células por citometria de fluxo. 5×10^4 células/poço foram cultivadas por 24 h em uma placa de 24 poços. Os compostos-teste e controles (0,5 μM ou 6 μM) foram adicionados aos poços e incubados por 48 h em uma estufa a 37 °C e 5% de CO_2 . As células foram então tripsinizadas e centrifugadas por 10 min a 300 rcf. Os *pellets* foram fixados em uma solução a 4 °C contendo 70% de etanol e 10% de PBS. As amostras foram levadas ao freezer (-20 °C) por 30 min e a seguir centrifugadas por 10 min a 500 rcf. Os *pellets* foram ressuspensos em uma solução de permeabilização (0,2 M Na_2HPO_4 , 0,001% Triton X-100, pH 7,8) e novamente centrifugados a 500 rcf por 10 min. Finalmente, o DNA das células foi corado com uma solução contendo iodeto de propídeo (30 μM) e RNase (20 μM) por 30 min no escuro a temperatura ambiente. O conteúdo de DNA foi analisado utilizando um citômetro de fluxo BD Accuri C5, com laser de 488 nm para excitação e filtro de emissão 670 LP.

3.14 Produção e purificação de tubulina humana recombinante

Linhagens celulares recombinantes foram utilizadas para avaliar o efeito dos compostos sobre diferentes isoformas e diferentes modificações pós-traducionais da proteína tubulina. As linhagens celulares foram estabelecidas por nossa colaboradora, Dra. Annemarie Wehenkel, no Instituto Pasteur (Paris, França) empregando-se o sistema recombinante Flp-In™ HEK-293 T-REx™ (Invitrogen). Foram estabelecidas linhagens transformadas com genes codificando as seguintes proteínas: (t1) tubulina glicina ligase (TTLL3); (t2) tubulina α 1B; (t3) tubulina β I; (t4) tubulina β 2A e (t5) tubulina β III. Para a purificação da tubulina a partir das linhagens HEK, as células foram cultivadas em garrafas de cultura de 175 cm². Após 5 dias, a indução da expressão foi feita por 48 h com 2 μ g/mL de doxiciclina. A seguir, as células foram transferidas para frascos de cultura do tipo *spinner*, contendo 800 mL de meio DMEM com 10% de SFB e 2,8 g de glicose e incubadas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 7 dias. Os *spinners* foram mantidos sob rotação a 140 rpm com o auxílio de um agitador magnético. A expressão da proteína foi verificada por citometria de fluxo por meio da incubação das células com o anticorpo primário StrepMAB (2-1507-001, IBA) por 1 h seguida da incubação com o anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor™ 555 (*anti-mouse* IgG, Invitrogen)

Após o cultivo em larga escala, o conteúdo dos frascos foi centrifugado por 20 min a 250 rcf, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular (1 g) foi lisado em gelo com uma solução contendo tampão BRB80 (80 mM K-Pipes pH 6,8; 1 mM de EGTA e 1 mM de MgCl₂), β -mercaptoetanol, 2% de Triton-X, 1 μ M de PMSF (P7626, Sigma), 0,02 μ g/mL de leupeptina (L2884, Sigma) e 0,02 μ g/mL de aprotinina (A1153, Sigma). Após 30 min, células foram centrifugadas a 155.000 rcf a 4 °C por 30 min em uma ultracentrífuga (*Optima Max-XP Ultracentrifuge*, Beckman Coulter) equipada com o rotor TLA-110. O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo no qual foi adicionado 30% de glicerol pré-aquecido a 37 °C e 1 mM de GTP. Com o auxílio de uma seringa, adicionou-se ao fundo do tubo um volume correspondente a 10% do volume da solução de um tampão de sacarose (100 mg/mL de sacarose; 33% de glicerol; 66% de BRB80 e 1mM de GTP). Esta solução foi incubada em banho úmido a 37 °C por 30 min para permitir a polimerização dos microtúbulos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 155.000 rcf e 30 °C por 30 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em tampão

BRB80 (50 μ L por grama de *pellet* inicial). Esta solução foi incubada a 4 °C por 30 min para permitir a despolimerização dos microtúbulos. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 155.000 rcf e 4 °C por 20 min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se um volume igual a 50% do volume do sobrenadante (50 μ L) de um tampão com alta concentração de sais (1 M K-Pipes; 10 mM $MgCl_2$, pH 6,9) para remoção das proteínas associadas a microtúbulos (MAPs). Além disso, foram adicionados 50 μ L de glicerol e GTP 1mM. Esta mistura foi incubada a 37 °C por 30 min. A amostra foi centrifugada a 155.000 rcf e 30 °C por 30 min. O *pellet* foi ressuspendido em tampão BRB80 (50 μ L por grama de *pellet* inicial) e incubado a 4 °C por 30 min. Esta solução final foi alíquotada e congelada em nitrogênio líquido.⁴⁹ A concentração de proteína foi determinada utilizando o sistema *SpectraDrop™ Micro-Volume Microplate* (Molecular Devices).

3.15 Análise estatística

Os valores de IC_{50} foram determinados por meio do método de regressão não-linear de melhor ajuste em curvas do tipo concentração x resposta. A significância estatística dos resultados obtidos por citometria de fluxo foi determinada por meio do teste *t*, no qual valores * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ foram considerados significativos. Ambas as determinações foram realizadas com o auxílio do programa Sigmaplot 11.0 (*Systat Software Inc.*, Chicago, Estados Unidos).

3.16 Separação dos enantiômeros

O composto **1** foi submetido à resolução quiral por cromatografia líquida de alta performance (HPLC), utilizando uma coluna analítica Chiralpak IA (4.6 x 250 mm, 5 μ m) na elaboração da metodologia. Em seguida, o escalonamento da separação foi realizado em coluna semi-preparativa quiral Chiralpak IA SFC semi-preparative HPLC column, 5 μ m, 250 mm x 10 mm. Para a separação, 60 mg da mistura racêmica do composto foi diluída em 7 mL de acetato de etila, o volume de injeção utilizado foi de 3 mL e os compostos foram separados sob eluição isocrática a 1 mL/min de n-hexano/isopropanol (70:30 v/v). As amostras foram monitoradas por absorvância no comprimento de onda de 210 nm.

3.17 Desenvolvimento de método para detecção dos compostos por LC-MS/MS

Para desenvolvimento de método de detecção por UPLC acoplado a MS/MS, uma solução de cada composto a 5 μM em ACN/H₂O (50/50) foi preparada em poços de uma placa de 96 poços (código: 186002482, Waters). As amostras foram injetadas em um Acquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S micro (Waters) e cada composto foi submetido ao método de otimização automática de 3 min. Todos os compostos apresentaram resultados satisfatórios e as condições do sistema UPLC-MS/MS estão sumarizadas na tabela 2.

Tabela 2 – Condições do sistema UPLC-MS/MS empregadas na análise dos compostos.

Ionização	ESI, positivo		
Temperatura de dissolvatação	350°C		
Coluna	Acquity UPLC BEH C18 50 x 2,1mm, 1.7 μM		
Temperatura do forno	45°C		
Fases móveis	A: H ₂ O Milli-Q + 0,1% ácido fórmico B: Metanol + 0,1% ácido fórmico		
Fluxo	0,6 mL/min		
Tempo de corrida	1,8 min		
	Time (min)	%A	%B
	0	95	5
Gradiente	0.1	95	5
	1.2	5	95
	1.6	5	95
	1.8	95	5

Fonte: Elaborada pela autora

3.18 Determinação da solubilidade aquosa

Para derminação da solubilidade aquosa dos compostos, 75 μL das soluções estoque a 10 mM (100% DMSO) foram adicionados a uma placa de 96 poços. As amostras foram diluídas em água até as concentrações finais de 250, 188, 150, 95, 63, 48, 33, 23 and 13 μM (2,5% DMSO) com o auxílio de um sistema automático (Hamilton STAR, Microlab) seguindo os seguintes passos: A solução de compostos a 10 mM foi diluída em 100% DMSO até as concentrações: 7,5; 5; 3,8; 2,5; 1,9; 1,3; 0,94; 0,63 e 0,47 mM. Estas soluções foram então diluídas 40 x em água por meio da transferência de 12.5 μL das soluções em DMSO para uma placa de 96 poços (código: 186002482, Waters) contendo 487,5 μL de água Milli-Q em cada poço. 100 μL destas soluções finais foram transferidos em triplicata para uma placa de

nefelometria, a qual foi analisada em um nefelometro NEPHELOstar (BMG Labtech).⁷³

3.19 Determinação do CHLogD

O valor experimental de $\log D$ dos compostos foi determinado utilizando o índice hidrofóbico cromatográfico (CHI, do inglês, *Chromatographic Hydrophobic Index*). O índice deriva do tempo de retenção (t_r) dos compostos em uma coluna cromatográfica de fase reversa utilizando HPLC. Para tanto uma curva de calibração foi construída utilizando um conjunto de 11 compostos referência que possuem o valor $\log D$ determinado pelo método de partição octanol/água e o valor de CHLogD descrito na literatura.⁷⁴ Os compostos utilizados foram paracetamol, teofilina, cafeína, benzimidazol, colchicina, carbamazepina, indol, propiofenona, butirofenona, valerofenona e heptanofenona. Uma solução a 1 mg/mL de cada composto referência foi preparada em 100% de DMSO. O mix de calibração foi preparado por meio da diluição das soluções a uma concentração final de 10 µg/mL em ACN/H₂O (50/50). Os compostos testes foram diluídos de uma solução estoque (10 mM, 100% DMSO) a uma concentração final de 250 µM por meio da adição de 5 µL das soluções estoques a 195 µL de ACN/H₂O (50/50) em placas de 96 poços (V-bottom, Greiner 651161). Além do mix de calibração, foram usados como controles soluções contendo 50/50 ACN/H₂O e 50/50 ACN/A no início e fim de cada corrida. O tampão A consistiu em 10 mM de acetato de amônio, pH 7,4. O tempo de retenção dos compostos em uma coluna HiChrom ACE 3 SuperC18, 50 x 2.1 mm, 3 µm foi registrado utilizando um detector de fotodiodo Shimadzu SPD-30 MA e comprimentos de onda entre 190 e 450 nm. A absorbância a 254 nm foi utilizada para identificação e normalização da área dos picos. O tempo de corrida foi de 7 min a 25°C, com volume de injeção de 2 µL, fluxo de 0,6 mL/min e eluição por gradiente utilizando as fases móveis A (tampão acetato de amônio) e B (100% ACN) seguindo o seguinte esquema (tabela 3):

Tabela 3 – Gradiente empregado na eluição dos compostos.

Tempo (min)	%A	%B
0	98	2
1,0	98	2
4,5	2	98
5,7	2	98
6,0	98	2
7,0	98	2

Fonte: Elaborada pela autora

O tempo de retenção (t_r) e o índice hidrofóbico cromatográfico do mix de calibração foram utilizados para calcular a inclinação (m) e intercepto (b) da seguinte reta, a qual foi utilizada para a determinação do CHI dos compostos teste:

$$CHI = (t_r * m) - b \quad (1)$$

O valor de CHI_{LogD} foi calculado segundo a relação:

$$CHI_{LogD} = (0,0525 * CHI) - 1,467 \quad (2)$$

As constantes desta equação foram calculadas utilizando valores de $LogD$ previamente determinados pelo método *shake flask*.⁷⁵

3.20 Ligação a proteínas do plasma

A fração de compostos ligados às proteínas do plasma foi determinada em um sistema de diálise em equilíbrio de 96-poços (HTD 96b, HT Dialysis). No dia anterior ao experimento, as membranas de diálise foram hidratadas em 400 mL de água Milli-Q por 1 h, 100 mL de etanol foram adicionados após esse período e as membranas foram deixadas nesta solução *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, 30 mL de Plasma de camundongo (CD-1 código: IGMS-N, Innovative Research) foram centrifugados (2800 rpm, 10 min) para remoção de excesso de fibrina e gordura. Soluções estoque dos compostos teste e controles (nicardipina e varfarina) foram preparadas a 1 mg/mL em 100% DMSO. 10 µL destas soluções-estoque foram adicionadas a 990 µL de plasma (concentração final 10 µg/mL) e incubadas a temperatura ambiente por 20 min. As membranas foram então lavadas em tampão isotônico (60 mM Na₂HPO₄; 14 mM KH₂PO₄; 70 mM NaCl, pH 7,4) e montadas no aparato de diálise. 150 µL deste mesmo tampão foram adicionados à metade inferior de todos os poços e 150 µL do plasma controle foram adicionados à metade superior de metade dos poços. 150 µL de plasma contendo os compostos foram adicionados (em triplicata) à metade superior dos poços remanescentes. O aparato

foi então selado com filme adesivo e incubado por 5 h sob agitação (100 rpm) à 37 °C. 2 amostras de 150 µL de plasma contendo os compostos-teste foram incubadas à 4 °C e 37 °C para controle de estabilidade térmica.

Após a incubação, a integridade das membranas foi checada medindo-se a concentração de proteína (utilizando kit BCATM protein assay reagent - código: 23225, Thermo Scientific) em 5 µL de todas as soluções contendo tampão isotônico. Após esta verificação, 50 µL das soluções contendo buffer foram transferidos para uma placa de *quenching*, a estes mesmos poços foram adicionados 50 µL de plasma-controle dialisado. O mesmo foi feito para as soluções de plasma + compostos, 50 µL foram transferidos para a placa de *quenching* e 50 µL de buffer-controle dialisado foram adicionados a estes poços. Os controles negativos e controles de degradação foram transferidos e tratados da mesma maneira. 200 µL de acetonitrila contendo padrão interno (donepezil, 50 ng/mL) foram adicionados a todos os poços e a placa foi centrifugada por 10 min a 3750 rpm. 150 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa e 50 µL de água Milli-Q foram adicionados a todos os poços, e estas amostras foram analisadas por LC-MS/MS.

A análise dos compostos foi feita em um Acquity UPLC acoplado a um Xevo TQ-S micro (Waters). O método de detecção previamente estabelecido (seção 3.16) foi empregado e o fator de resposta calculado como a razão entre a área do pico do composto teste e do padrão interno. A recuperação dos compostos foi calculada a partir da seguinte equação:

$$\% \text{ recuperação} = \left(\frac{\text{área do pico no tampão} + \text{área do pico no plasma}}{\text{área do pico na amostra mantida a } 4^{\circ}\text{C}} \right) \times 100 \quad (4)$$

A fração livre foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{ livre} = 100 - \left(\frac{(Pl - Bu)}{Pl} \right) \times 100 \quad (5)$$

Onde, *Pl* é o fator resposta do analito em plasma e *Bu* o fator resposta do analito em tampão.

3.21 Estabilidade em plasma

Os compostos teste e o controle (Procaína, código: P9879, Sigma) foram avaliados a uma concentração final de 50 µM por meio da adição de 2,5 µL das

soluções estoque (10 mM) aos poços de uma placa de 96 poços (código: 186002482, Waters) contendo 350 µL de plasma de camundongo (CD-1 código: IGMS-N, Innovative Research) e 147,5 µL de tampão fosfato (50 mM; pH 7,4).⁷⁶ A placa foi incubada sob agitação (100 rpm) à 37 °C e amostras de 80 µL foram coletadas nos tempos 0, 30, 60, 120 e 180 min e transferidas para uma placa de *quenching* contendo 200 µL de acetonitrila e padrão interno (donepezil 50 ng/mL). A placa foi então centrifugada por 10 min a 3750 rpm. 150 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa e 50 µL de água Milli-Q foram adicionados a todos os poços, estas amostras foram analisadas por LC-MS/MS. A análise foi feita da mesma forma descrita na seção 3.19. A meia vida dos compostos foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$T_{1/2} = \ln(2) / k \quad (6)$$

Onde k é a taxa de decaimento exponencial calculada a partir de gráficos do tipo tempo x resposta.

3.22 Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA)

Para a avaliação da permeabilidade passiva dos compostos foi utilizada uma placa de 96 poços contendo insertos pré-revestidos com fosfolipídeos (código: 353015, Corning). Antes do início do experimento, a placa foi retirada do freezer (-20 °C) e deixada a temperatura ambiente por 30 min. As soluções estoque (10 mM) dos compostos teste e controles (verapamil – alta permeabilidade, atenolol – baixa permeabilidade e propranolol – média permeabilidade) foram diluídas a 1 mM em DMSO e em seguida a 10 µM em PBS.

Uma placa (código: 186002482, Waters) controle para $t = 0$ (C_0) foi preparada adicionando-se aos poços (triplicatas) 100 µL das soluções a 10 µM e 80 µL de acetonitrila contendo padrão interno (donepezil 50 ng/mL). 300 µL das soluções a 10 µM contendo os compostos e controles foram transferidos (triplicata) aos poços doadores (inferiores) da placa pré-revestida e 200 µL de PBS foram adicionados aos poços aceptores (superiores). O sistema foi então incubado por 5 h a temperatura ambiente.

Após o período de incubação, 100 µL dos poços aceptores e 100 µL dos poços doadores foram transferidos para duas placas de *quenching* distintas. A todos

os poços foram adicionados 80 µL de acetonitrila contendo padrão interno (donepezil 50 ng/mL). Estas placas e a placa C₀ foram centrifugadas por 10 min a 1800 rpm e analisadas por LC-MS/MS da mesma forma descrita na seção 3.19.

A permeabilidade P_e (nm/s) e a retenção de massa (R) dos compostos foram calculadas segundo as seguintes equações:

$$P_e = 10^7 x \left(\frac{-\ln\left[1 - \left(\frac{C_A(t)}{C_{equi}}\right)\right]}{A x \left(\frac{1}{V_D} + \frac{1}{V_A}\right) x t} \right) \quad (7)$$

$$R = 1 - \left[\frac{C_D(t) x V_D + C_A(t) x V_A}{C_0 x V_D} \right] \quad (8)$$

Onde,

C₀ = área média dos compostos na placa controle

C_D(t) = área média dos compostos nos poços doadores no tempo t

C_A(t) = área média dos compostos nos poços aceptores no tempo t

V_D = volume do poço doador: 0,3 mL

V_A = volume do poço acceptor: 0,2 mL

C_{equi} = [C_D(t) x V_D + C_A(t) x V_A] / (V_D + V_A)

A = área da membrana de hexadecano do inserto: 0,3 cm²

t = tempo de incubação: 18000 s (5 h)

3.23 Estabilidade metabólica em microssomos de camundongo e humano

A estabilidade metabólica dos compostos foi estudada em microssomos de camundongo (código: MSMCPL, GIBCO) e humanos (código: HMMCPL, GIBCO). Os compostos-teste e controle (verapamil) foram preparados a 50 µM por meio da diluição de 2,5 µL da solução estoque (10 mM) em 497,5 µL de ACN/H₂O (50/50). As suspensões de microssomos foram descongeladas em banho úmido a 37 °C e cada alíquota de 0,5 mL (20 mg/mL) foi diluída em 17,5 mL de tampão fosfato (50 mM pH 7,4) pré-aquecido a 37 °C resultando em uma concentração final de 0,57 mg/mL. Uma solução de NADPH 10 mM foi preparada em tampão fosfato imediatamente antes do uso. A cada poço de uma placa de 96 poços (código: 186002482, Waters)

foi adicionado o mix de reação na seguinte ordem: 5 µL da solução de compostos a 50 µM, 445 µL da suspensão de microsomas a 0,57 mg/mL e 50 µL da solução de NADPH a 10 mM. As concentrações finais de cada componente foram: compostos a 0,5 µM; microsomas a 0,5 mg/mL e NADPH a 1 mM.

A placa foi incubada a 37 °C sob agitação (100 rpm) e alíquotas de 70 µL foram coletadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 15 e 30 min e transferidas para uma placa de *quenching* contendo em cada poço 200 µL de acetonitrila com padrão interno (donepezil 50 ng/mL). Ao final dos 30 min a placa de *quenching* foi centrifugada a 3750 rpm por 10 min, 150 µL do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa, a qual foram adicionados 50 µL de água Milli-Q. A análise foi feita por LC-MS/MS da mesma forma descrita na seção 3.19.

Curvas de decaimento exponencial ($y = e^{-k}$) foram ajustadas a gráficos tempo x resposta. A taxa de decaimento (k) foi utilizada para calcular o *clearance* intrínseco (CL_{int}) em mL/min/g de fígado utilizando a seguinte equação:

$$CL_{int} = k \times V \times r_p \quad (9)$$

Onde,

V (mL/mg) = volume de incubação/mg de microsomas adicionados

r_p = rendimento de proteína microsomal (52,5 mg/g de fígado – todas as espécies)

A meia vida *in vitro* ($T_{1/2}$) foi calculada utilizando a equação 6.

3.24 Estabilidade metabólica em hepatócitos de camundongo e humano

A estabilidade metabólica dos compostos também foi estudada em hepatócitos criopreservados de camundongo (código: M1500, XenoTech) e humanos (código: HPCH10, XenoTech).⁷⁷ Meio de cultura *Williams Media E* (WME) sem glutamina ou vermelho de fenol foi borbulhado por 30 min com CO₂ e suplementado com uma solução de manutenção para hepatócitos primários (código: CM4000, GIBCO). Esta solução contém dexametasona, penicilina-estreptomicina, insulina, transferrina, complexo de selênio, BSA, ácido linoleico, HEPES e GlutaMAXTM. O meio suplementado foi então pré-aquecido por 30 min a 37 °C. Os hepatócitos foram descongelados em banho úmido a 37 °C e resuspendidos em 50 mL meio de

recuperação CHRM (código: CM7000, GIBCO). A suspensão foi centrifugada a 55 rcf por 5 min para os hepatócitos de camundongo e a 100 rcf por 10 min para os hepatócitos humanos. O *pellet* foi então resuspendido em 1 mL de meio WME suplementado e as células contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan para atestar a viabilidade celular. A concentração foi então ajustada para $0,3 \times 10^5$ células viáveis/mL e 200 μ L da suspensão foram adicionados aos poços de uma placa estéril de 48 poços. A placa foi incubada sob agitação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ por 10 min.

Os compostos e controles (verapamil e propranolol) foram preparados a concentração final de 1 μ M em 1 mL de meio WME suplementado. 200 μ L destas soluções foram adicionadas (em triplicata) aos poços da placa previamente incubada com as células resultando concentrações finais de 0,5 μ M para os compostos e de $0,15 \times 10^5$ células/poço. O sistema foi incubado sob agitação em estufa a 37 °C e 5% de CO₂ e alíquotas de 20 μ L foram coletadas nos tempos 0, 3, 6, 9, 15, 30, 45 e 60 min e transferidas para uma placa de *quenching* contendo 80 μ L de acetonitrila com padrão interno (donepezil 50 ng/mL). Ao final do experimento, 100 μ L de água Milli-Q foram adicionados aos poços da placa de *quenching*, a qual foi centrifugada a 3750 rpm por 10 min. 150 μ L do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa e a análise foi feita por LC-MS/MS da mesma forma descrita na seção 3.19.

Curvas de decaimento exponencial ($y = e^{-k}$) foram ajustadas a gráficos tempo x resposta. A taxa de decaimento (k) foi utilizada para calcular o *clearance* intrínseco (CL_{int}) em mL/min/g de fígado utilizando a seguinte equação:

$$CL_{int} = k \times V \times H_s \quad (10)$$

Onde,

$$V = (\text{células} \times 10^{-6}) / \text{mL}$$

H_s = fator de escala para hepatócitos (120 para ratos, humanos e camundongos)

A meia vida *in vitro* ($T_{1/2}$) foi calculada utilizando a equação 6.

3.25 Identificação dos metabolitos formados após incubação com hepatócitos

Para identificação dos metabólitos formados, os compostos foram incubados com hepatócitos de camundongo de forma similar à descrita na seção 3.23. As

diferenças consistiram nas concentrações finais de composto e células, que foram de 5 μM e $0,25 \times 10^6$ células/poço, respectivamente. As amostras foram analisadas por espectrometria de massas em um equipamento Xevo QTof MS (Waters) e a análise dos cromatogramas foi realizada no programa Metabolyx (Waters).

3.26 Inibição de enzimas CYP recombinantes

A inibição de isoformas da família CYP450 foi estudada em *Bactosomes* expressando as enzimas humanas CYP1A2 (código: CYP/EZ001, Cypex™), CYP2C9 (código: CYP/EZ037, Cypex™), CYP2C19 (código: CYP/EZ008, Cypex™), CYP2D6 (código: CYP/EZ007, Cypex™), CYP3A4 (código: CYP/EZ005, Cypex™) e membrana controle (código: CYP/EZ003, Cypex™). Substratos fluorescentes para cada isoforma foram preparados segundo a tabela 4.

Tabela 4 – Preparação dos substratos empregados na avaliação da atividade de diferentes isoformas das enzimas CYP.

Substrato	CYP	Concentração (mM)	Solvente
Etoxrresorufina (ER)	1A2	1	Acetonitrila
7-metóxi-4-(trifluorometil)-cumarina (MFC)	2C9	10	Acetonitrila
3-Ciano-7-Etoxicumarina (CEC)	2C19	25	DMSO
7-metóxi-4-(aminomethyl)-cumarina (MAMC)	2D6	10	Metanol
Dietoxifluoresceína (DEF)	3A4	1	Acetonitrila
7-Benziloxiquinolina (7BQ)	3A4	25	Metanol

Fonte: Elaborada pela autora

O mix de incubação foi preparado diluindo-se as enzimas e substratos em tampão fosfato (50 mM, pH 7,4) segundo a tabela 5:

Tabela 5 – Concentrações de proteína e substrato empregadas nos ensaios de atividade.

CYP	Concentração (pmol/mL)	Substrato	Concentração (μM)
CYP1A2	5	ER	35
CYP2C9	10	MFC	30
CYP2C19	5	CEC	25
CYP2D6	10	MAMC	6
CYP3A4	10	DEF	1
CYP3A4	10	7-BQ	15

Fonte: Elaborada pela autora

O composto teste e o controle positivo (miconazol) foram diluídos serialmente em DMSO (0,5 – 500 μ M) e 5 μ L destas soluções foram transferidos para uma placa preta de 96 poços. A seguir, 220 μ L de cada mix de incubação foram adicionados aos poços da placa que foi incubada a 37 °C por 5 min. Após esse período, 25 μ L de solução de regeneração (bicarbonato de sódio 2% (m/v); 27,65 mM glicose-6-fosfato; 2,22 mM NADP e 6 U/mL glicose-6-fosfato desidrogenase) foram adicionados a todos os poços e a placa foi inserida em um fluorímetro PHERAstar (BMG Labtech) a 37 °C. A análise foi feita utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão especificados na tabela 6. Foram executados 10 ciclos de leitura com intervalos de 1 min entre duas leituras do mesmo poço. O composto teste e controle foram avaliados em 7 concentrações finais entre 0.01 e 10 μ M.

Tabela 6 – Comprimentos de onda utilizados no monitoramento da fluorescência dos diferentes substratos.

CYP	Substrato	Metabólito	Excitação (nm)	Emissão (nm)
CYP1A2	Etoxrresorufina	Resorufina	540	590
CYP2C9	7-metóxi-4-(trifluorometil)-cumarina	7-hidróxi-4-(trifluorometil)-cumarina	430	540
CYP2C19	3-Ciano-7-Etoxicumarina	3-Ciano-7-metoxicumarian	405	450
CYP2D6	7-metóxi-4-(aminomethyl)-cumarina	7-hidróxi-4-(aminometil)-cumarina (HAMC)	405	450
CYP3A4	Dietoxifluoresceína	Fluoresceína	430	540
CYP3A4	7-Benziloxiquinolina	7-Hidroxiquinoloina	485	520

Fonte: Elaborada pela autora

3.27 Perfil farmacocinético *in vivo*

3.27.1 Estudos de formulação para administração intravenosa

Cinco amostras do composto selecionado para determinação dos parâmetros farmacocinéticos *in vivo* foram pesadas e soluções a 0,6 mg/mL foram preparadas nos seguintes veículos: i) solução salina (0,9% NaCl); ii) Captisol[®] (CyDex Pharmaceuticals, Inc.); iii) Captisol[®] pH 4,0; iv) 5% DMSO, 45% PEG400 e 50% H₂O Milli-Q e v) 10% DMSO, 50% PEG400 e 50% H₂O Milli-Q.

3.27.2 Administração intravenosa

Uma solução do composto teste foi preparada a 0,6 mg/mL no veículo **v** (seção 3.27.1) e administrada intravenosamente em fêmeas de camundongo BALB/c (n=3) a uma dose de 3 mg/kg (5 mL/kg). O peso dos animais (cerca de 20 g) foi utilizado para calcular o volume a ser administrado utilizando a seguinte equação:

$$Dose (mL) = \frac{W \times V}{1000} \quad (11)$$

Onde,

W = peso dos animais (g). V = dose desejada (mL/kg)

Os animais foram posicionados em um *restrainer* e a dose administrada pela veia lateral da cauda. 10 µL de sangue foram coletados nos tempos 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 min por meio de uma incisão na cauda ao lado oposto da administração. As amostras foram diluídas em 90 µL de H₂O Milli-Q e armazenadas a -20 °C. A determinação da concentração de composto no sangue foi determinada por UPLC-MS/MS segundo descrito na seção 3.26.4.

3.27.3 Administração via oral

Uma solução do composto teste foi preparada a 1 mg/mL em 1% carboximetilcelulose (CMC) e administrada oralmente, via gavagem, em fêmeas de camundongo BALB/c (n=3) a uma dose de 10 mg/kg (10 mL/kg). O peso dos animais (cerca de 20 g) foi utilizado para calcular o volume a ser administrado da mesma forma descrita na seção 3.26.2. Uma amostra de sangue (10 µL) de cada animal foi retirada anteriormente à dosagem. Após a administração, os animais foram posicionados em um *restrainer* e 10 µL de sangue foram coletados nos tempos 5, 15, 30, 60, 120, 240, 360 e 480 min por meio de uma incisão na cauda. As amostras foram diluídas em 90 µL de H₂O Milli-Q e armazenadas a -20 °C. A determinação da concentração de composto no sangue foi determinada por UPLC-MS/MS segundo descrito na seção 3.26.4.

3.27.4 Bioanálise

Para análise do sangue coletado nos experimentos de farmacocinética foi utilizado um sistema UPLC-MS/MS Xevo TQ-S equipado com *stepwave*. Após o desenvolvimento de método para a detecção do composto, um padrão interno adequado para que não ocorra *cross-talk* foi selecionado (DDD41029).

Para construção da curva de calibração, uma solução de composto a 1 mg/mL foi preparada em DMSO e então diluída a 0,2 mg/mL em ACN/H₂O 50/50. Esta foi diluída serialmente em ACN/H₂O resultando em 12 soluções secundárias com concentrações entre 4 e 20.000 ng/mL. 5 µL de cada solução secundária foram adicionados a 95 µL de sangue de camundongo BALB/c, resultando em 12 soluções finais com concentrações entre 0,2 e 1000 ng/mL.

A partir de uma segunda solução estoque do composto (1 mg/mL), soluções para controle de qualidade (QC's) foram preparadas em sangue em concentrações finais de 2, 40 e 100 ng/mL. Os controles branco e branco duplo foram preparados por meio da adição de 5 µL de ACN/H₂O a 95 µL de sangue.

Com exceção do branco duplo, as soluções preparadas anteriormente em sangue foram precipitadas por meio da adição de 300 µL de acetonitrila contendo padrão interno (DDD41029 100 ng/mL). O branco duplo foi precipitado por meio da adição de 300 µL de acetonitrila. 30 µL das amostras de sangue provenientes dos animais foram precipitadas por meio da adição de 90 µL de acetonitrila contendo padrão interno (DDD41029 100 ng/mL). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3750 rpm e 200 µL do sobrenadante das soluções da curva de calibração, QC's e brancos foram transferidos para um novo microtubo e adicionados de 100 µL de água Milli-Q. Das amostras provenientes dos animais, 80 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo microtubo e adicionados de 40 µL de de água Milli-Q.

Todas as soluções finais foram analisadas em um Acquity UPLC acoplado a um espectrômetro de massas Xevo TQ-S. A concentração de composto no sangue dos animais foi determinada por meio da interpolação da resposta obtida na curva de calibração construída.

3.27.5 Parâmetros farmacocinéticos

A análise de dados e o cálculo de parâmetros farmacocinéticos foram realizados com o auxílio do programa *Microsoft Excel*. As áreas sobre as curvas foram calculadas utilizando o método dos trapézios. O *clearance* (Cl) foi calculado dividindo-se a dose administrada intravenosamente pela área sobre a curva (AUC_{iv}). A taxa de eliminação (k_{iv}) foi determinada pelo ajuste de uma curva de decaimento exponencial ($y = e^{-k}$) a um gráfico do tipo tempo x concentração. A meia vida foi calculada como $t_{1/2} = \ln(2)/k_{iv}$. A biodisponibilidade (F) foi calculada utilizando-se a seguinte equação:

$$F = \left(\frac{AUC_{po} \times Dose_{iv}}{AUC_{iv} \times Dose_{po}} \right) \times 100 \quad (12)$$

Onde,

AUC_{iv} = área sobre a curva para administração intravenosa

$Dose_{iv}$ = dose administrada intravenosamente

AUC_{po} = área sobre a curva para administração oral

$Dose_{po}$ = dose administrada oralmente

4 Resultados e discussão

4.1. Estratégia para triagens experimentais

Com o objetivo de desenvolver um composto candidato a agente antitumoral para o tratamento do câncer de mama do tipo triplo negativo, que seja capaz de evitar os principais mecanismos de resistência associados aos fármacos moduladores de tubulina atuais e que possa ser administrado via oral, a cascata de testes apresentada na figura 7 foi utilizada.

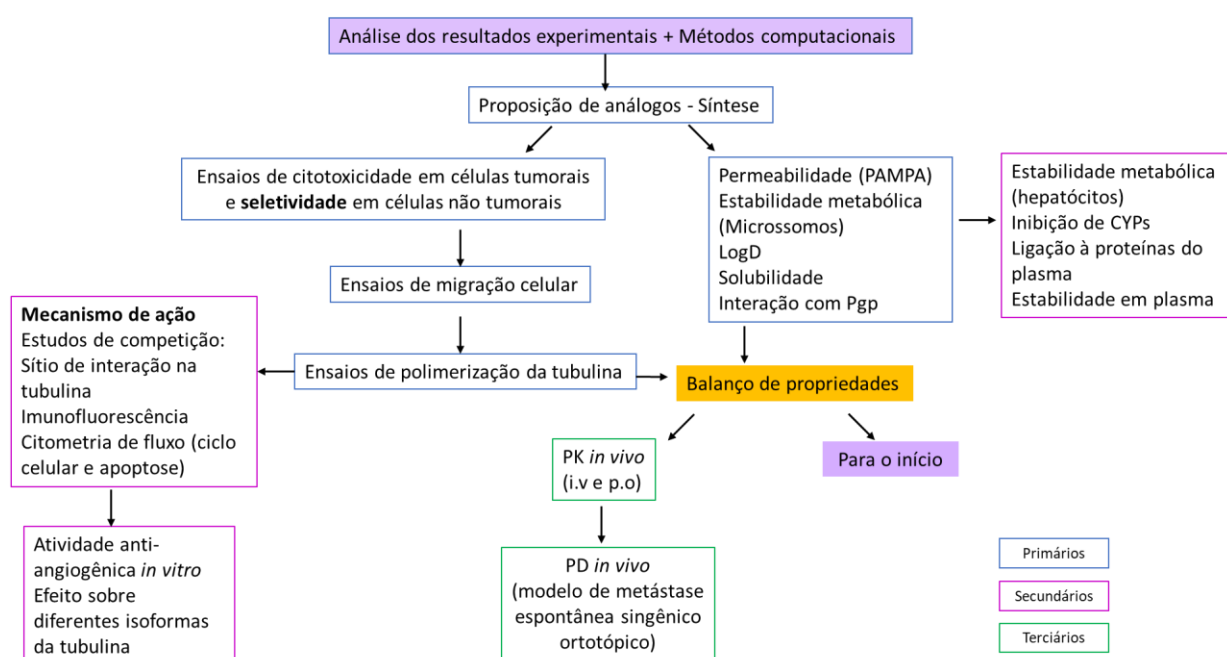


Figura 7 – Fluxo iterativo de trabalho empregado na caracterização dos compostos.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Série de compostos

A série de acridinonas (tabela 7) investigada nesse trabalho foi obtida a partir de uma colaboração com o Prof. Dr. Cedric S. Graebin do Instituto de Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Os compostos foram obtidos por simplificação molecular, tendo como modelo o produto natural podofilotoxina, que possui quatro centros estereogênicos.

4.3 Planejamento dos compostos

As acridinonas **1–4** foram identificadas durante o desenvolvimento de um trabalho de mestrado em nosso grupo, a partir de uma série de 16 compostos.^{51,78} Estes compostos apresentaram atividades inibitórias da migração celular e da polimerização da tubulina e foram seletivamente citotóxicos contra linhagens celulares tumorais (tabela 8). Além disso, estas substâncias foram capazes de interromper o ciclo celular na fase G₂/M e de provocar apoptose.⁷⁸ A partir destes resultados, uma nova série de 10 compostos (tabela 7, **5–14**) foi proposta para a realização de estudos de relações entre a estrutura e a atividade (SAR, do inglês, *Structure-Activity Relationship*). Além das considerações sobre a estrutura do ligante, algumas modificações moleculares foram propostas para melhorar a complementaridade entre os ligantes e a cavidade da colchicina, na qual os compostos interagem (seção 4.7).

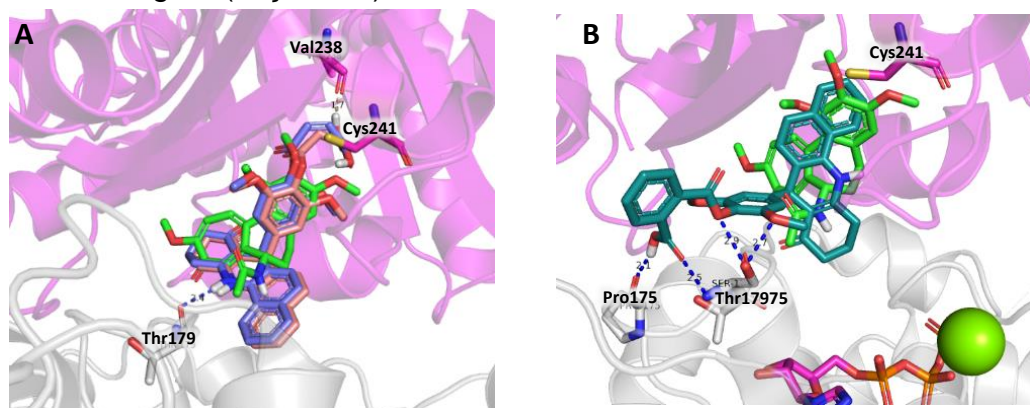


Figura 8 – Modo de ligação predito pelo programa de docagem molecular GOLD. (A) Compostos **13** e **14** sobrepostos à colchicina. (B) Composto **12** sobreposto à colchicina.
Fonte: Elaborada pela autora.

Planejou-se a avaliação de cadeias mais longas, contendo grupos volumosos e doadores de ligação de hidrogênio, para os compostos **12–14**. Estudos de docagem molecular mostraram que estes compostos podem ser bem acoplados no sítio da colchicina. Os compostos **13** e **14** tiveram seus anéis benzênicos tri-substituídos sobrepostos ao anel tri-metóxi da colchicina, podendo ainda realizar uma ligação de hidrogênio com o aminoácido Thr179 – interação igualmente presente entre este resíduo e a podofilotoxina (figura 8A). Embora os resultados para o composto **12** indiquem o anel benzênico tri-substituído em uma posição distinta (figura 8B), o esqueleto acridinona ficou bem acomodado no bolsão hidrofóbico do sítio da colchicina, composto pelos aminoácidos Leu248, Leu252,

Leu255 e Cys241. A cadeia volumosa adicionada à hidroxila do anel benzênico acomodou-se em direção oposta ao sítio do GTP. Além disso, os grupos hemi-ftalato e metóxi podem estabelecer ligações de hidrogênio adicionais com aminoácidos da cadeia alfa (Figura 8B).

O composto **5** foi planejado para avaliação da influência de um halogênio volumoso como substituinte do anel, o que alteraria a distribuição eletrônica no sistema. O composto **6** foi planejado para avaliar se a substituição da metoxila do anel benzênico provocaria alterações na atividade, já que o grupo 3,4,5-trimetoxibenzeno está presente na colchicina, no composto **1** e em diversos outros moduladores de tubulina descritos na literatura.²¹ A substituição do grupo *p*-metóxi por uma hidroxila foi selecionada. De acordo com a predição do software MetaSite (*Molecular Discovery Ltd.*, Londres, Inglaterra),⁷⁹ o principal sítio de metabolismo hepático do composto **1** seria o grupo *p*-metóxi, que teria uma hidroxila como resultado da reação de desalquilação. Ou seja, o composto **6** seria o principal produto do metabolismo de fase I do composto **1** (figura 9).

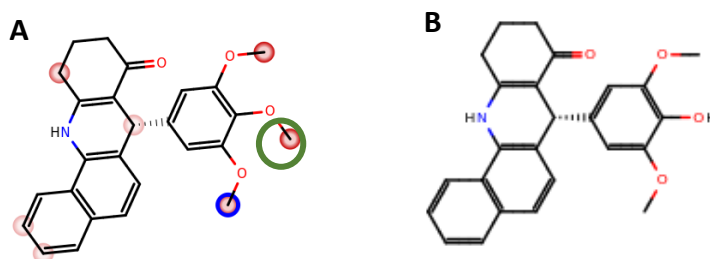
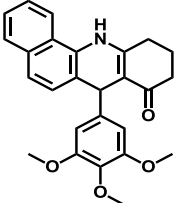
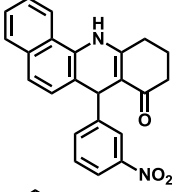
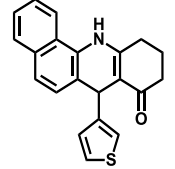
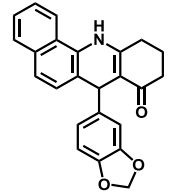
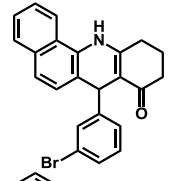
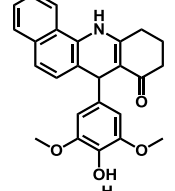
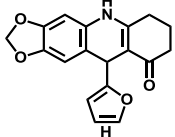
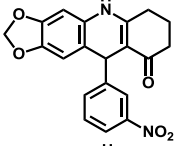
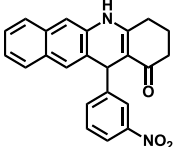


Figura 9 – Predição dos sítios de metabolismo de fase I para o composto **1**. (A) Os pontos de metabolização preditos estão destacados com círculos rosa. Em verde está destacado o ponto que foi predito como aquele com maior probabilidade de sofrer metabolização. (B) Principal metabólito predito.

Fonte: Elaborada pela autora.

O composto **7** foi planejado para verificar a influência de diferentes heterocíclis no lugar do anel benzênico, já que o composto ativo **3** possui um anel heterocíclico de 5 membros nesta posição. O composto **8** foi planejado para verificar se a substituição da fenila pelo dioxalano seria tolerável. O interesse nessa substituição reside na redução do valor de *clogP* (4,91 para composto **2** e 3,62 para composto **8**). O composto **9** foi planejado com o objetivo de avaliar a influência da posição da fenila no sistema de anéis. Os compostos **10** e **11** foram planejados para avaliação da influência do aumento de volume do sistema de anéis.

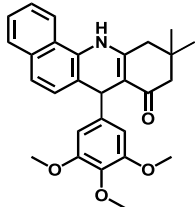
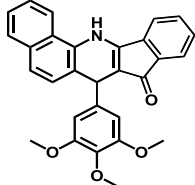
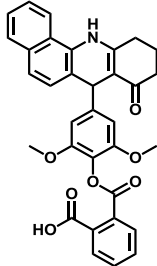
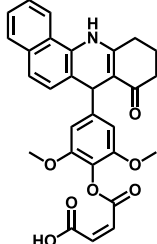
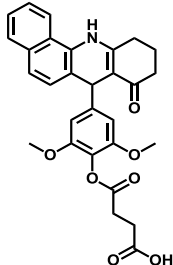
Tabela 7 – Série de acridinonas.

Composto	Estrutura	Massa Molecular* (g/mol)	clogP*	PSA* (Å ²)	nHD*	nHA*
1		415,49	4,61	56,80	1	5
2		370,41	4,91	74,92	1	5
3		331,44	4,56	29,10	1	2
4		369,42	4,87	47,57	1	4
5		404,31	5,76	29,10	1	2
6		401,46	4,33	67,79	2	5
7		309,32	2,94	60,71	1	5
8		364,36	3,62	93,39	1	7
9		370,41	4,91	74,92	1	5

(continua)

(continuação)

Tabela 7 – Série de acridinonas.

Composto	Estrutura	Massa Molecular* (g/mol)	clogP*	PSA* (Å ²)	nHD*	nHA*
10		443,54	5,26	56,80	1	5
11		449,51	6,10	56,80	1	5
12		549,58	5,60	111,17	2	8
13		499,52	3,66	111,17	2	8
14		501,54	3,68	111,17	2	8

*Valores calculados com o programa molinspiration. clogP: coeficiente de partição octanol/água calculado. PSA: Área de Superfície Polar (do inglês, Polar Surface Area). nHD: número de doadores de ligação de hidrogênio. nHA: número de aceptores de ligação de hidrogênio.

Fonte: Elaborada pela autora

4.4 Ensaios biológicos

4.4.1 Ensaios de migração celular

A inibição da migração celular é uma característica desejável em novos candidatos a antitumorais, pois esta é essencial no processo de metástase.⁴¹⁻⁴⁴ O ensaio celular *wound healing* permite a avaliação semi quantitativa da migração celular por meio da realização de uma fenda na monocamada celular. Esta fenda se fecha após determinado período de incubação devido à migração das células. Para a triagem de inibição da migração celular, os compostos **5–11** foram avaliados a uma concentração de 10 μM , que garante a viabilidade das células após 24 h de incubação. Os compostos **5**, **6**, **8** e **10** (figura 10) foram identificados como ativos e a podofilotoxina e colchicina foram utilizadas como controles positivos.

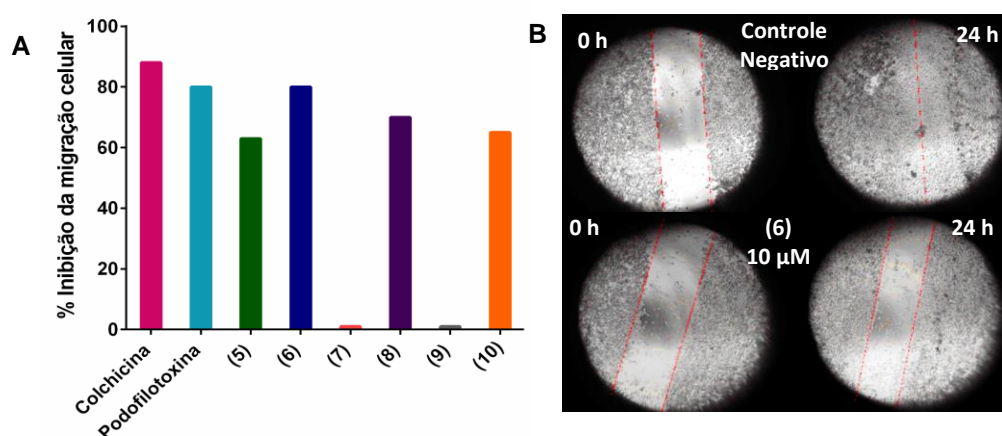


Figura 10 – (A) Resultado das triagens no ensaio *wound healing*. As porcentagens de inibição são apresentadas como a média das triplicatas. Os compostos teste foram avaliados a 10 μM e controles a 1 μM (B) Exemplo de resultado para o controle negativo e para o composto **6** (10 μM).

Fonte: Elaborada pela autora.

Para quantificar os efeitos dos compostos ativos na inibição da migração celular foram realizados ensaios de migração em câmara de Boyden. Neste ensaio, as células que migram através de uma membrana porosa em direção a um compartimento contendo um quimioatraente (SFB) são coradas e quantificadas (figura 11). Os valores de IC_{50} para migração celular (tabela 8) mostram que os compostos **5**, **6** e **8** estão na mesma ordem de potência, com o composto **6** sendo o mais potente, mantendo-se equipotente ao composto **1**, a colchicina e a podofilotoxina. Além disso, são mais potentes que os análogos **3** e **4**. Sendo assim, as substituições do nitro (**2**) por um bromo (**5**), da fenila (**2**) por um dioxalano (**8**) e do *p*-metóxi (**1**) por uma hidroxila (**6**) se mostraram toleráveis no modelo de migração celular. Entretanto, a substituição do tiofeno (**3**) pelo furano (**7**) se mostrou deletéria para a atividade, assim como a substituição da α -naftila (**2**) por uma β -naftila (**9**).

Resta ainda elucidar a relevância da mudança do heteroátomo ou da mudança de posição do mesmo.

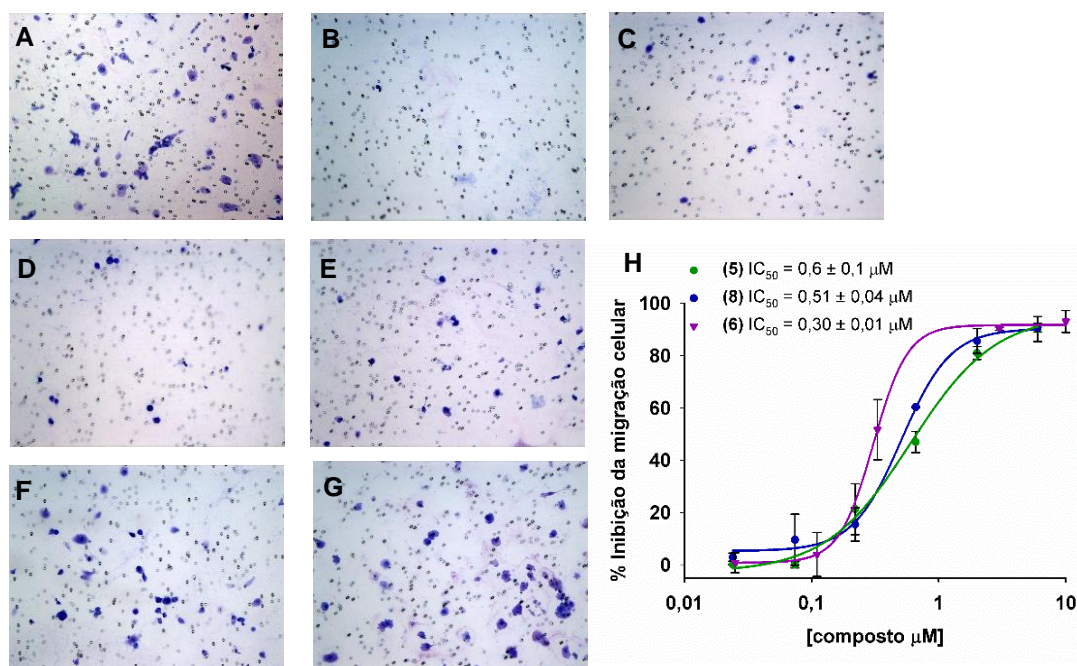


Figura 11 – Fotomicrografias representativas das membranas do ensaio em câmara de Boyden. As células coradas podem ser observadas em roxo. As fotografias foram obtidas com o auxílio de uma objetiva de 10 X em um microscópio Axio Vert.A1 (Zeiss). (A) Controle negativo. (C) Composto **6** 10 µM. (C) Composto **6** 3 µM. (D) Composto **6** 1 µM. (E) Composto **6** 0,3 µM. (F) Composto **6** 0,1 µM. (G) Composto **6** 0,025 µM. (H) Curvas concentração x resposta para a determinação do IC_{50} para os compostos **5** (verde), **6** (roxo) e **8** (azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 Ensaios de citotoxicidade

Para a avaliação da viabilidade celular foram realizados ensaios colorimétricos que se baseiam na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais reduzirem o composto MTS, que possui coloração amarela, em formazan, com coloração roxa. A triagem da série **5–11**, em 3 concentrações (50, 15 e 1,5 µM), permitiu a identificação dos compostos ativos **5**, **6**, **8** e **10** e dos inativos **7**, **9** e **11** (figura 12). Destaca-se o mesmo padrão verificado nos ensaios de migração celular (seção 4.3).

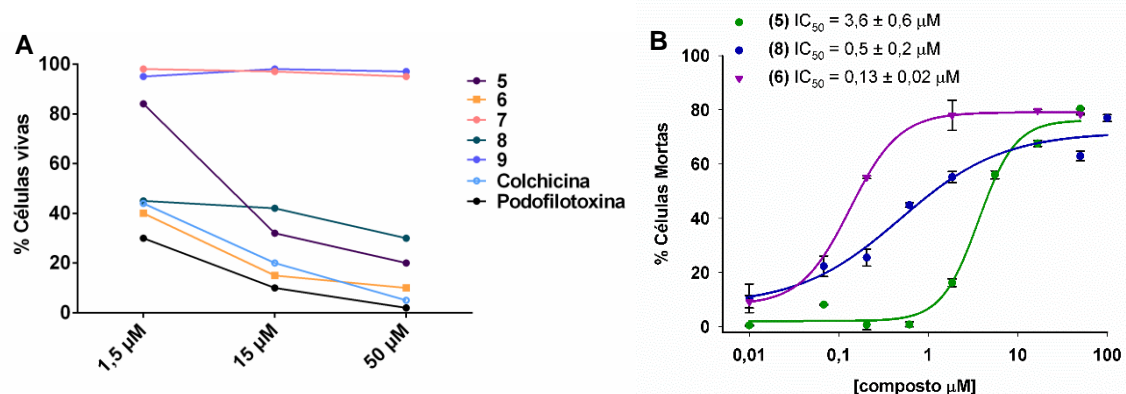


Figura 12 – (A) Resultado do ensaio de citotoxicidade contra a linhagem MDA-MB-231. (B) Curvas para determinação de IC₅₀ dos compostos ativos **5** (verde), **6** (roxo) e **8** (azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de IC₅₀ determinados nos ensaios de citotoxicidade com a linhagem tumoral MDA-MB-231 (tabela 8) mostram que o composto **6** (IC₅₀ = 0,13 μM) foi equipotente ao **1** (IC₅₀ = 0,11 μM). O composto **8** (IC₅₀ = 0,5 μM), embora cerca de 2 vezes menos potente que o **2** (IC₅₀ = 0,19 μM), não apresentou uma redução significativa da atividade citotóxica. Isto indica que as substituições da fenila (**2**) por um dioxalano (**8**), e do *p*-metóxi (**1**) por uma hidroxila (**6**), também são toleráveis no modelo de citotoxicidade. Entretanto, o composto **5**, apesar de apresentar uma boa atividade citotóxica (IC₅₀ = 3,6 μM), foi quase vinte vezes menos potente que o composto **2**, indicando que a substituição do grupo nitro (**2**) por um bromo (**5**) não é tão bem tolerada no modelo de citotoxicidade. O composto **10** apresentou uma redução de 100 vezes em sua potência (IC₅₀ = 12 μM) em relação ao composto **1**, indicando que a adição do grupo dimetil no anel ciclohexanona é prejudicial à atividade.

Em seguida, os compostos mais potentes, **5**, **6** e **8** tiveram sua citotoxicidade avaliada contra a linhagem de fibroblastos humanos normais HFF1 para verificar a seletividade dos compostos para células tumorais. Nenhum destes compostos apresentaram citotoxicidade contra a linhagem saudável (tabela 8), até a concentração limite de 50 μM (concentração máxima em que os compostos apresentam solubilidade adequada). Os resultados apontam que os compostos são seletivos, o que é uma característica fundamental no desenvolvimento de candidatos a agentes antitumorais.

4.4.3 Ensaios de inibição da polimerização da proteína tubulina

A avaliação da modulação da tubulina foi realizada para os compostos **5–11** por meio de um ensaio de polimerização *in vitro* da proteína, que se fundamenta na propriedade do composto fluorescente DAPI se ligar aos microtúbulos com uma afinidade maior do que aos dímeros livres de tubulina. Assim, conforme os microtúbulos são polimerizados *in vitro* há um aumento no sinal de fluorescência quando se excita a amostra a 350 nm e esta emite a 460 nm. Estas medidas permitem a visualização de perfis bem característicos referentes à atuação de estabilizadores e desestabilizadores de microtúbulos, bem como a quantificação da interferência destes compostos na polimerização da tubulina.

A triagem em concentração única (50 μM) nos levou a identificar os compostos **5**, **6**, **8** e **10** como inibidores de polimerização da tubulina, e os compostos **7**, **9** e **11** como inativos (figura 13), mantendo o perfil de atividade observado nos ensaios celulares. Em conjunto com os resultados anteriormente obtidos para os compostos **1–4**,⁷⁸ estes resultados reforçam o envolvimento da modulação da tubulina nos efeitos celulares apresentados. A determinação de IC_{50} para os compostos ativos (tabela 8) mostrou que a substituição do *p*-metóxi (**1**) ($\text{IC}_{50} = 0,9 \mu\text{M}$) por uma hidroxila (**6**) ($\text{IC}_{50} = 1,3 \mu\text{M}$) é tolerável, não levando à alteração da atividade biológica. Em contrapartida, o composto **5** ($\text{IC}_{50} = 7 \mu\text{M}$) foi cerca de 3 vezes menos ativo que o composto **2** ($\text{IC}_{50} = 2,4 \mu\text{M}$), o que pode explicar a redução da citotoxicidade observada quando se substitui o nitro (**2**) pelo bromo (**5**). O composto **10** foi 50 vezes menos ativo ($\text{IC}_{50} = 45 \mu\text{M}$) que o composto **1**, estando de acordo com a redução de sua atividade citotóxica. Finalmente, a substituição da fenila (**2**) ($\text{IC}_{50} = 2,4 \mu\text{M}$) pelo dioxalano (**8**) ($\text{IC}_{50} = 24 \mu\text{M}$) resultou em uma potência dez vezes menor.

Surpreendentemente, a redução da atividade contra a tubulina não levou a uma diferença tão acentuada nas atividades de inibição da migração celular e de citotoxicidade para o composto **8**. Os valores de $\text{clog}P$ desses compostos podem ajudar a compreender essa observação. O $\text{clog}P$ é uma propriedade físico-química fundamental no desenvolvimento de compostos bioativos, fornecendo uma medida comparativa da lipofilia dos compostos. Esta propriedade influencia diretamente o comportamento farmacocinético, farmacodinâmico e toxicológico de fármacos. Um dos mecanismos influenciados diretamente pelo $\text{log}P$ é a permeabilidade dos

compostos através da membrana celular.⁸⁰ Para permear passivamente pela membrana, o valor de $\log P$ deve ser moderado, ou seja, não muito baixo, a ponto de não interagir com a membrana, e nem elevado, a ponto de penetrar a membrana e não sair. Tipicamente, valores adequados estão na faixa $1,5 < \log P < 3,5$.⁸⁰ Pode-se notar que o valor predito (3,6) para o $\log P$ do composto **8** está mais próximo da faixa ótima do que o predito (4,9) para o composto **2**. Desta forma, é possível que o composto **8** penetre em maior quantidade no interior das células compensando a sua menor atividade contra o alvo molecular isolado e levando à uma resposta celular semelhante à observada para o composto **2**. Esta hipótese foi avaliada por meio da determinação da permeabilidade celular desses compostos empregando-se o modelo PAMPA (do inglês, *Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*),⁵⁶ os resultados estão descritos na seção 4.6.3 e confirmam que o composto **8** demonstrou ser, inclusive, aquele com a melhor capacidade de permear passivamente por uma membrana lipídica.

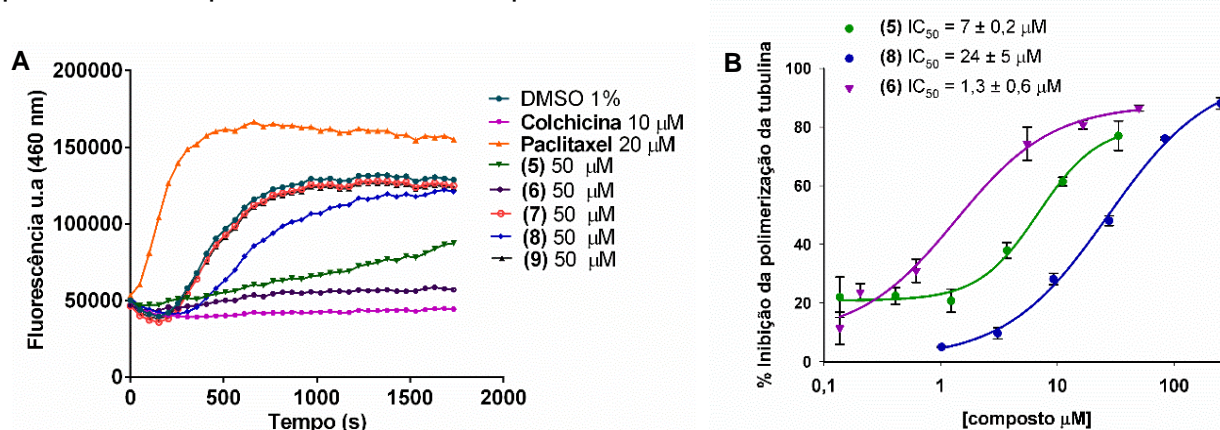


Figura 13 – (A) Resultado da triagem dos compostos no ensaio de polimerização da tubulina. (B) Curvas para determinação de IC_{50} dos compostos ativos **5** (verde), **6** (roxo) e **8** (azul).

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 8 – Resultados dos ensaios celulares e bioquímicos.

Composto	IC_{50} (μM)					Polimerização da tubulina
	Migração celular ^a	Citotoxicidade ^b				
		MDA-MB-231	HFF1	SI ^c		
Colchicina	0,320 ± 0,003	0,02 ± 0,01	< 0,02	1	0,03 ± 0,01	0,99 ± 0,01 ^d
Podofilotoxina	0,33 ± 0,06	0,011 ± 0,001	> 50	> 1000	n.d.	0,37 ± 0,05 ^d
1	0,33 ± 0,02	0,11 ± 0,02	> 50	> 400	0,120 ± 0,08	0,9 ± 0,2 ^d
2	0,294 ± 0,005	0,190 ± 0,007	> 50	> 200	n.d.	2,4 ± 0,2 ^d
3	1,345 ± 0,007	1,1 ± 0,2	> 50	> 40	n.d.	5 ± 2 ^e
4	1,7 ± 0,7	3 ± 1	> 50	> 15	n.d.	13 ± 2 ^d
5	0,6 ± 0,1	3,6 ± 0,6	> 50	> 10	n.d.	7,0 ± 0,2 ^d
6	0,30 ± 0,01	0,13 ± 0,02	> 50	> 300	0,15 ± 0,04	1,3 ± 0,6 ^d
8	0,51 ± 0,04	0,5 ± 0,2	> 50	> 100	1,1 ± 0,9	24 ± 5 ^d
10	n.d.	12 ± 6	n.d.	n.d.	n.d.	45 ± 7 ^d

^{a,b} Média ± DP de dois experimentos independentes em duplicata.

^c Índice de seletividade ($IC_{50}^{MDA-MB-231} / IC_{50}^{HFF1}$). ^d Ensaio de fluorescência. Dados são apresentados como Média ± DP de duplicatas. ^e Ensaio de espalhamento. Dados são apresentados como Média ± DP de duplicatas. n.d. não determinado.

Fonte: Elaborada pela autora

4.4.4 Ensaios de competitividade pelo sítio da colchicina

Como apresentado na seção 1.2.1, compostos que atuam como inibidores de polimerização dos microtúbulos podem se ligar ao sítio da colchicina, da vimblastina, ou ainda, atuar em outros sítios. Desta forma, é essencial determinar o mecanismo de atuação dos compostos. Para comprovar que as acridinonas ativas inibem a polimerização da tubulina interagindo com o sítio da colchicina, como proposto por nossos estudos preliminares de docagem molecular,⁷⁸ foram realizados ensaios de competição pelo sítio da colchicina utilizando como marcador fluorescente a colchicina conjugada com fluoresceína.

O composto-teste ou controles foram pré-incubados com a tubulina por 30 min. Em seguida, houve incubação com a colchicina fluorescente por mais 30 min. O controle negativo (DMSO 1%) permitiu a ligação da colchicina fluorescente, como pode ser visto na figura 14. Como esperado, a pré-incubação com a colchicina reduziu a ligação da colchicina fluorescente em 70%. Comportamento também observado no caso da pré-incubação com o composto **1**, que reduziu a ligação da colchicina fluorescente em 72% (figura 14). Este resultado evidencia a interação das acridinonas com o sítio da colchicina, o que nos permite explorar com maior confiança os métodos de modelagem molecular baseados na estrutura do receptor.

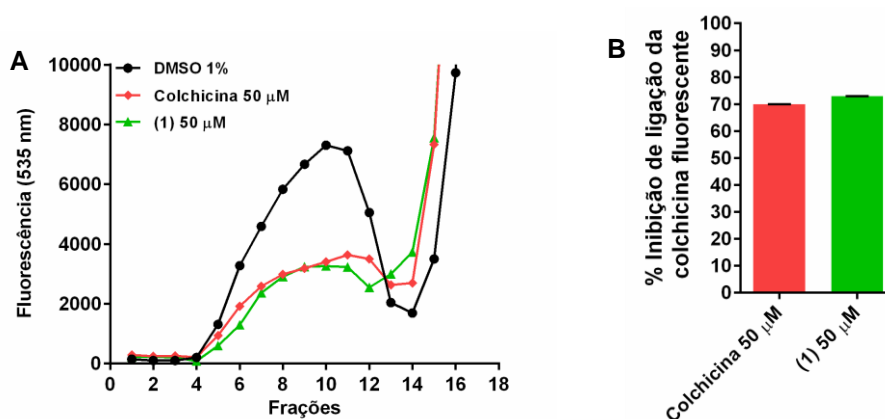


Figura 14 – (A) Resultados do ensaio competitivo pelo sítio da colchicina. Os dados são representativos de dois experimentos. (B) Inibição de ligação da colchicina fluorescente.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.5 Imunofluorescência

Para verificar os efeitos *in situ* dos compostos contra o alvo molecular, foram feitos ensaios de imunofluorescência por meio da imunomarcção da tubulina. Células MDA-MB-231 (tumorais) ou HFF1 (normais) foram incubadas com os compostos **1**, **6** e colchicina na concentração de 2 μ M, o controle negativo foi incubado com 1% de DMSO. A marcação do citoesqueleto e do núcleo celular permitiu a visualização de alterações morfológicas causadas pela ação dos compostos (figura 15). Pode-se observar que as células controle (DMSO 1%) apresentam uma rede extensa de microtúbulos, com morfologia alongada e núcleos regulares, tanto nas células MDA-MB-231 quanto nas HFF1.

As células MDA-MB-231 e HFF1 tratadas com colchicina apresentaram um citoesqueleto desorganizado e menos denso, além de células polinucleadas devido à inibição da formação das fibras do fuso. As células MDA-MB-231 tratadas com os compostos **1** e **6** apresentaram características semelhantes às tratadas com a colchicina. Um citoesqueleto bem menos denso e células cuja divisão celular foi interrompida puderam ser observadas, o que evidencia que os compostos são capazes de modular a tubulina intracelular. Outra proeminência da atuação *in situ* dos compostos reside na interrupção do ciclo celular na fase G₂/M, fato comprovado anteriormente por experimentos em citometria de fluxo para os compostos **1–4**.⁷⁸

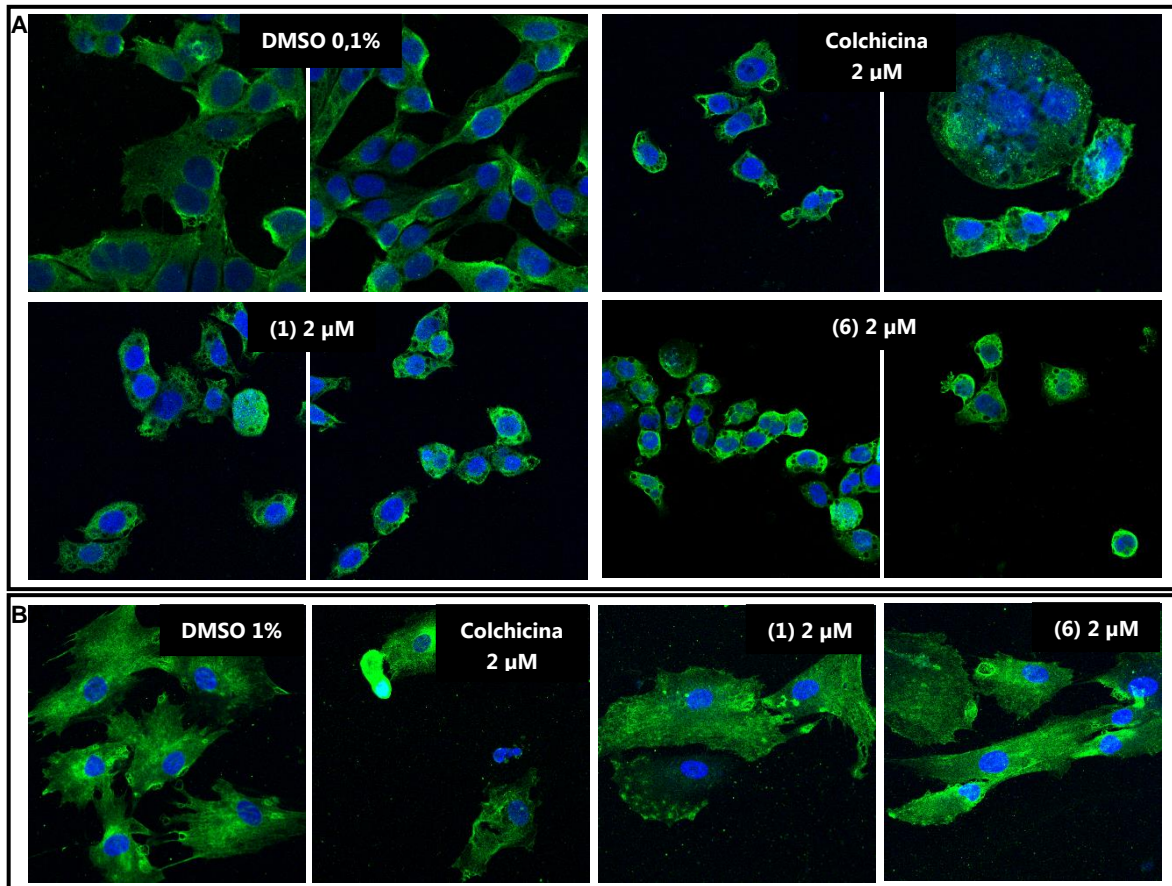


Figura 15 – Imagens representativas do efeito dos compostos no citoesqueleto das células MDA-MB-231 (A) e HFF1 (B). Em verde podem ser visualizados os microtúbulos e o material genético em azul.

Fonte: Elaborada pela autora.

Diferentemente do observado no caso da colchicina, as células HFF1 tratadas com os compostos **1** e **6** não sofreram alterações morfológicas significativas, corroborando novamente a seletividade destes compostos frente às células tumorais.

4.4.6 Atividade anti-angiogênica *in vitro*

Para estudo dos efeitos dos compostos sobre a angiogênese *in vitro* foi utilizado um modelo qualitativo de formação tubular.⁷² Neste ensaio, células endoteliais HUVEC foram cultivadas sobre uma camada de Matrigel® (matriz extracelular). Em condições normais, estas células formam estruturas tubulares tridimensionais. A formação destas estruturas *in vitro* é um modelo que simula a geração de novos vasos sanguíneos por células endoteliais.⁷⁰ Por meio de

fotomicrografias, agentes perturbadores do processo de diferenciação e formação tubular endotelial (essenciais ao processo de angiogênese) são identificados.

Antes da realização do ensaio de tubulogênese, a citotoxicidade dos compostos nas células HUVEC foi determinada. Portanto, para garantir que a inibição da organização da rede tubular não seja devida à morte celular, concentrações subtóxicas devem ser empregadas. Para tanto, foi realizado o ensaio de MTS e os valores de IC_{50} foram determinados para os compostos **1** e **6** (tabela 8).

Após a incubação, o sistema foi acompanhado por fotomicrografias a cada 24 h por 5 dias. Três ensaios independentes foram conduzidos. No último, as células foram coradas com calceína-AM para garantir a visualização apenas de células viáveis. Como controle positivo foi utilizada a colchicina e os compostos selecionados para teste foram os mais potentes no conjunto dos ensaios biológicos (**1** e **6**).

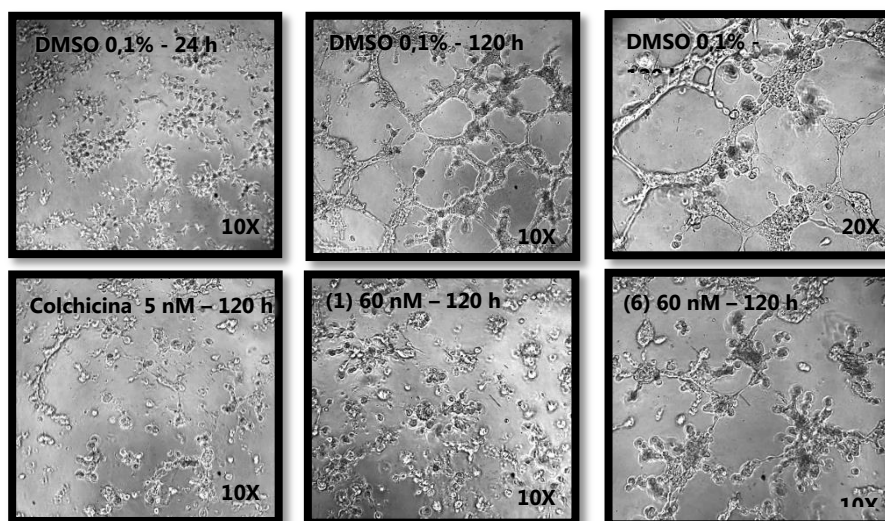


Figura 16 – Imagens representativas dos efeitos dos compostos na tubulogênese de células HUVEC. Os tempos de incubação e objetivas utilizadas estão indicados nas fotomicrografias. As imagens das células tratadas no tempo de 24 h foram omitidas porque apresentaram padrão semelhante ao observado no controle negativo (DMSO 0,1%) em 24 h.

Fonte: Elaborada pela autora.

Pode ser observado nas figuras 16 e 17 que as células não tratadas se reorganizam em estruturas tubulares quando cultivadas sobre a matriz extracelular (o que não ocorreu quando cultivadas sobre a superfície sem Matrigel). É evidente que a colchicina impede essa reorganização, como esperado, mantendo as células em pequenos grumos.⁷¹ Esta capacidade, de impedir a formação da rede tubular,

também foi observada para os compostos **1** e **6**. Estes resultados demonstram que estes compostos podem ser investigados como agentes anti-angiogênicos.

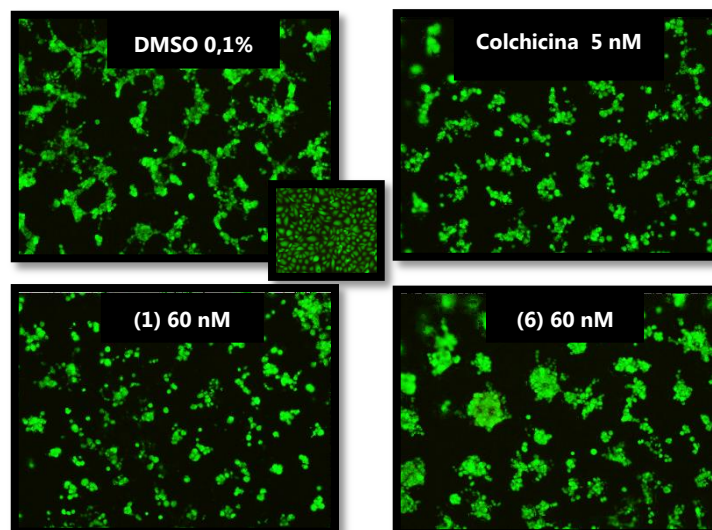


Figura 17 – Imagens representativas do efeito dos compostos na tubulogênese de células HUVEC após 120 h de incubação. No detalhe, as células cultivadas na superfície sem recobrimento com Matrigel. As fotografias foram obtidas com o auxílio da objetiva de 10X em um microscópio com fluorescência Axio Vert.A1 (Zeiss). Apenas as células viáveis (coradas com calceína-AM) podem ser observadas.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.7 Ensaios de efluxo de calceína

A glicoproteína-P (Pgp) é uma proteína de membrana que funciona como uma bomba de efluxo ATP-dependente. Esta proteína é codificada pelo gene de resistência a múltiplos fármacos (MDR, do inglês, *multidrug resistance*) e afeta a absorção, distribuição e excreção de diversos medicamentos.⁷² O paclitaxel, por exemplo, é excretado no intestino devido à ação da proteína, colaborando para os casos de resistência deste fármaco.⁷² Portanto, é importante a avaliação de novos compostos quanto à interação com a Pgp. O reconhecimento desta interação nas etapas iniciais do planejamento de fármacos pode auxiliar na seleção de candidatos com maiores chances de sucesso em estudos *in vivo*.

O ensaio de efluxo de calceína permite a avaliação da interação de compostos com a Pgp de forma simples e em larga escala. Neste ensaio, a calceína-AM, que não é fluorescente, penetra passivamente pela membrana celular. Uma vez intracelular, a calceína-AM é hidrolisada por esterases e a calceína livre pode ter sua fluorescência detectada. A calceína livre não penetra passivamente

pela membrana e é acumulada no interior das células. Entretanto, a calceína-AM é substrato da Pgp e, portanto, seu efluxo é inversamente proporcional à quantidade de calceína livre acumulada. Assim, na presença de substratos ou inibidores da glicoproteína-P, pode ser observada uma taxa maior de acúmulo de calceína.⁷² Esta avaliação foi feita para as acridinonas ativas **1–6** e **8**. Como controles positivos foram utilizados substratos/inibidores de Pgp conhecidos, tais como colchicina, podofilotoxina, paclitaxel e verapamil.

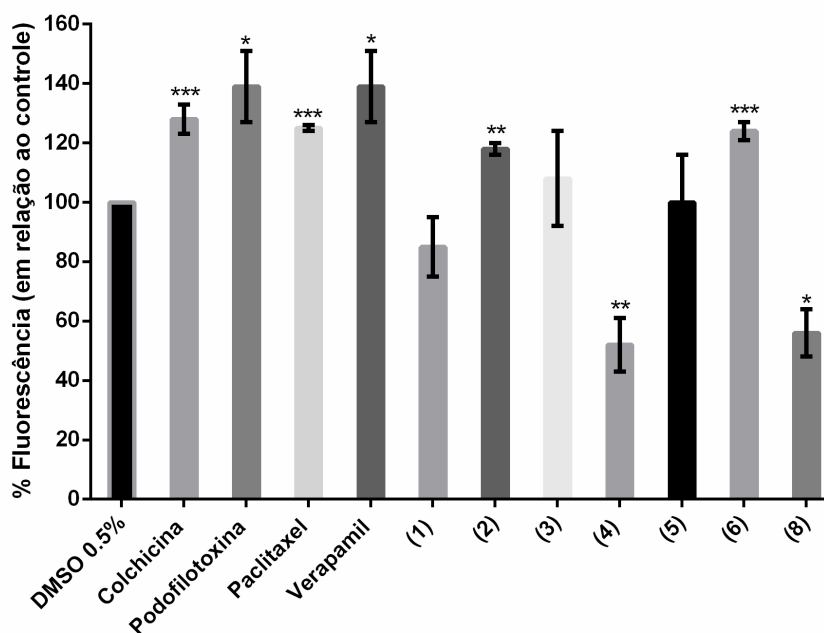


Figura 18 – Resultado do acúmulo de calceína fluorescente em relação ao controle. Significância estatística em relação ao controle * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$. Todos os compostos foram avaliados a 100 μM

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos resultados dos ensaios de efluxo de calceína (figura 18), os controles positivos permitiram um maior acúmulo de calceína, como esperado, exibindo entre 30 e 40% de aumento na fluorescência intracelular. Os compostos **2** e **6** exibiram um padrão de resposta semelhante à dos controles positivos, aumentando a fluorescência intracelular entre 20 e 30%, o que sugere que estes compostos são prováveis substratos de Pgp. Os compostos **1**, **3** e **5** não causaram alterações significativas no acúmulo de calceína, indicando que não interagem com a Pgp. Os compostos **4** e **8** causaram significativa redução na fluorescência intracelular (de quase 50%), o que mostra que estes compostos são substratos da Pgp. Entretanto, estes compostos modulam positivamente a atividade da Pgp, aumentando a sua taxa de efluxo.

Os compostos **1**, **3** e **5** exibiram esqueletos privilegiados em relação à não interação com a Pgp, e seus valores de PSA inferiores a 60 \AA^2 podem ser um dos fatores que contribuem para isso.⁸¹ Além disso, é curioso notar que a substituição do *p*-metóxi (**1**) pela hidroxila (**6**) foi suficiente para transformar um não-substrato em um substrato. O doador de ligação de hidrogênio adicional e o consequente aumento da PSA podem ter contribuído para este efeito.⁸¹

4.4.8 Tubulina e suas isoformas

Apesar de a tubulina ser uma proteína bem conservada em todas as espécies eucarióticas, os microtúbulos podem ser constituídos por diferentes isoformas da tubulina, ou ainda, podem exibir diferentes modificações pós-traducionais (MPTs). Compreender a heterogeneidade da tubulina e o efeito de moduladores pode auxiliar no desenvolvimento de ligantes mais específicos. Além disso, a superexpressão de algumas isoformas, com a $\alpha 1B$, βIII e βIV , estão relacionadas ao desenvolvimento de tumores resistentes a tratamentos.⁸²⁻⁸³

Uma das razões para a falta de informações sobre isoformas específicas da tubulina advém da dificuldade na produção da proteína em um sistema heterólogo não-endógeno. Tipicamente, a proteína empregada em ensaios de atividade é purificada de cérebro bovino ou suíno. A tubulina obtida por essa metodologia é bastante heterogênea em termos de isoformas/MPTs e representa a constituição média da proteína no tecido cerebral. Desta forma, um sistema para produção heteróloga de tubulina empregando a linhagem celular humana HEK-293 foi desenvolvido com o objetivo de superexpressar isoformas ou MPTs específicas da tubulina. As cinco linhagens estáveis, descritas na metodologia (seção 3.12) foram empregadas em estudos de citotoxicidade. A linhagem não transformada, ou selvagem, e a linhagem t5 (superexpressando a tubulina βIII) foram empregadas no estabelecimento do protocolo de purificação. A proteína purificada da linhagem selvagem foi utilizada em testes de atividade e comparada com a proteína comercial (Cytoskeleton). Para caracterizar as linhagens, a expressão das isoformas foi verificada por citometria de fluxo. Após a indução da expressão com doxiciclina, as células foram incubadas com um anticorpo primário anti-strep tag com anticorpo secundário fluorescente (figura 19).

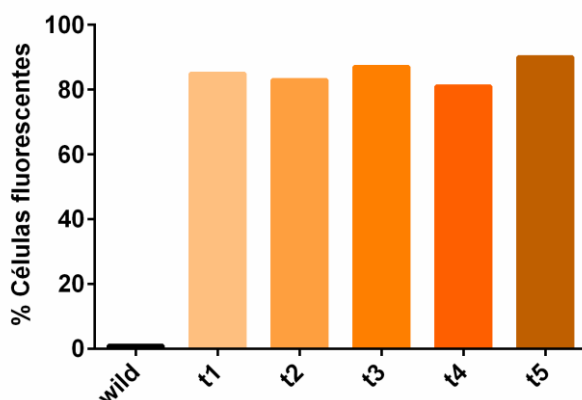


Figura 19 – Porcentagem de células fluorescentes após a indução da expressão com 2 µg/mL de doxiciclina por 48 h.

Fonte: Elaborada pela autora.

As diferentes linhagens foram avaliadas no ensaio de MTS para verificar possíveis diferenças no perfil de citotoxicidade de moduladores conhecidos de tubulina (paclitaxel, colchicina e podofilotoxina) e de dois compostos representativos da série de acridinonas (**1** e **6**). Como controle, foi utilizado um agente citotóxico cujo mecanismo de ação é independente dos microtúbulos (doxorubicina). Os resultados estão sumarizados na figura 20.

Pode-se observar que a linhagem superexpressando a tubulina β III (t5) foi mais resistente ao paclitaxel do que a linhagem selvagem. No entanto, a sensibilidade à doxorubicina foi a mesma em todas as linhagens, de acordo com o esperado. As células t5 também foram menos sensíveis à colchicina e à podofilotoxina, que interagem com o mesmo sítio e possuem um modo de ligação semelhante. Todavia, as células selvagens e t5 foram igualmente sensíveis aos compostos **1** e **6**. A principal alteração da tubulina β III no sítio da colchicina é a substituição da cisteína 241 por uma serina. Nas estruturas cristalográficas da tubulina com a colchicina e podofilotoxina, esta cisteína é responsável por uma interação de hidrogênio com o ligante. Todas as estruturas de tubulina com ligante disponíveis no PDB são da tubulina β II. Para melhor compreender o modo de ligação dos compostos com a tubulina β III está em desenvolvimento, em um projeto de um aluno de doutorado do nosso grupo, modelos de interação do sítio da colchicina. Estes modelos serão empregados em estudos de dinâmica molecular e são baseados em uma estrutura da tubulina β III (5IJ0) e em uma estrutura cristalizada em complexo com a colchicina (4O2B).

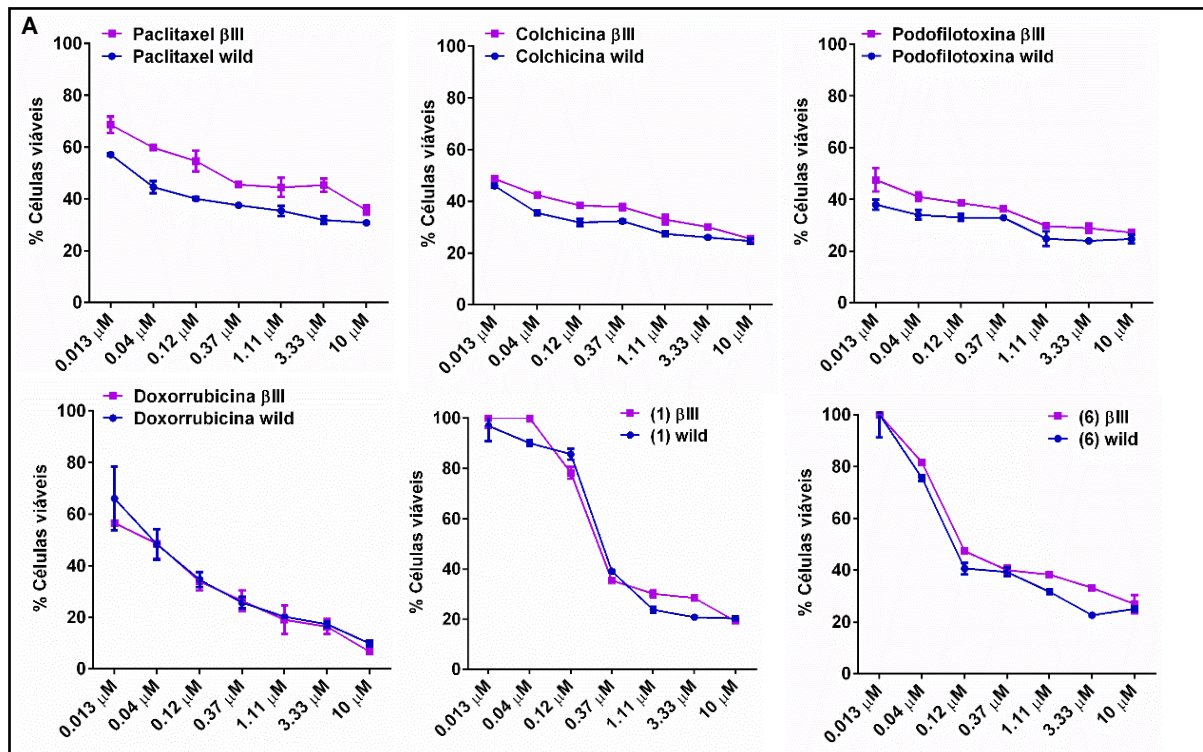


Figura 20 – Efeitos dos compostos em diferentes linhagens HEK. (A) Comparação da citotoxicidade nas linhagens selvagem (azul) e t5 (rosa).

Fonte: Elaborada pela autora.

As células superexpressando a tubulina poliglicilada (t1) foram, ao contrário da linhagem t5, mais sensíveis ao paclitaxel, colchicina e podofilotoxina. Os compostos 1 e 6, entretanto, apresentaram mesmo perfil de atividade. As linhagens superexpressando as tubulina $\alpha 1B$, βI e βII não apresentaram diferença de sensibilidade a nenhum dos compostos. Mesmo que as células transformadas não expressem exclusivamente as isoformas investigadas, detectou-se alterações na sensibilidade aos diversos moduladores de tubulina nestes modelos celulares. Assim, podem ser empregados como ponto de partida para a escolha de uma isoforma específica para estudos mais detalhados.

A partir dos resultados obtidos nos testes de citotoxicidade, elegeu-se investigar mais a fundo a isoforma βIII . Para tanto, primeiramente foi estabelecido o protocolo de purificação utilizando a linhagem selvagem. Seguindo um protocolo baseado em ciclos de polimerização/despolimerização e ultracentrifugação, obteve-se a proteína pura (figura 21) com um rendimento de 4 mg/mL em um volume final de 50 μL . A atividade dessa proteína foi avaliada por meio da realização de um ensaio de polimerização seguindo o protocolo descrito na seção 3.7. Para comparação, avaliamos concomitantemente a proteína comercial e uma amostra de

proteína de cérebro de porco purificada utilizando o mesmo protocolo e pode-se observar que a proteína purificada apresenta padrão de atividade adequado quando incubada com o controle negativo (DMSO) e com os controles positivos (paclitaxel e colchicina) (Figura 21). Após a validação do protocolo, cultivamos a linhagem t5 e purificamos a proteína. A amostra obtida apresentou uma concentração de 3 mg/mL e demonstrou atividade no ensaio de polimerização *in vitro*.

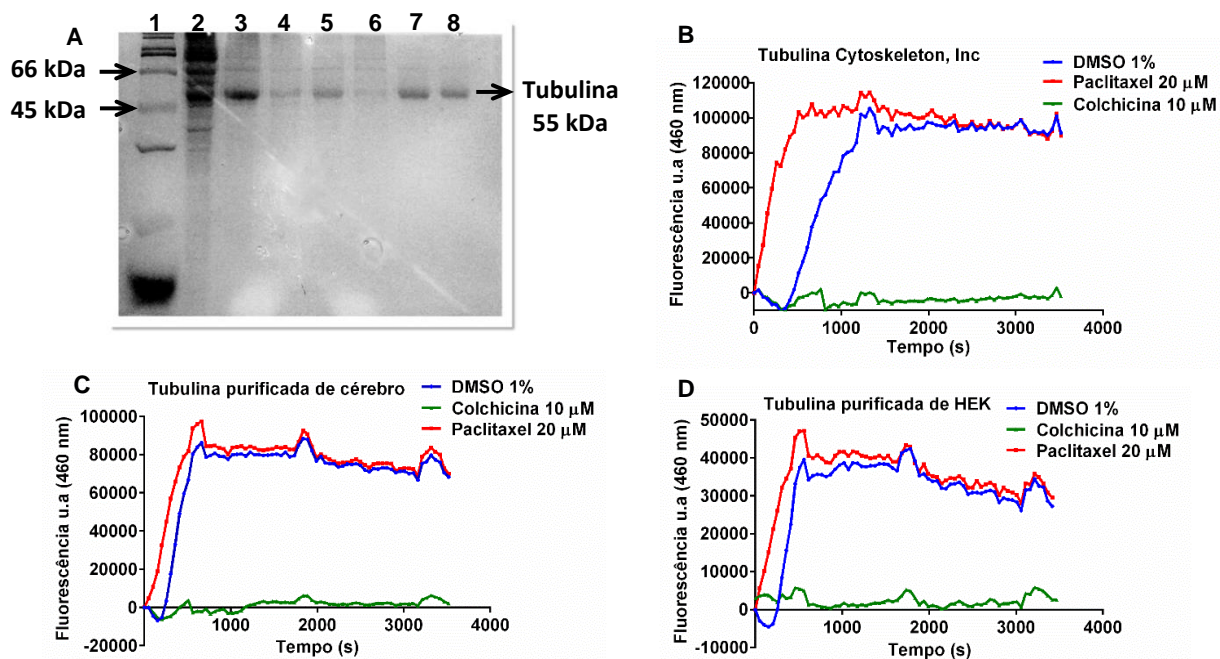


Figura 21 – (A) Gel SDS PAGE 10% (1) Marcador. (2) Sobrenadante após a primeira ultracentrifugação. (3) *Pellet* após a primeira etapa de polimerização. (4) Sobrenadante após a primeira etapa de polimerização. (5) Sobrenadante após a primeira etapa de despolimerização. (6) *Pellet* após a primeira etapa de despolimerização. (7) e (8) *Pellet* após a polimerização em tampão de alta molaridade. (B) Atividade de polimerização da proteína comercial na presença de DMSO (azul), paclitaxel (alaranjado) e colchicina (verde). (C) Atividade de polimerização da proteína purificada de cérebro de porco na presença de DMSO (azul), paclitaxel (alaranjado) e colchicina (verde). (D) Atividade de polimerização da proteína purificada da cultura de células HEK selvagem na presença de DMSO (azul), paclitaxel (alaranjado) e colchicina (verde).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.5 Separação dos enantiômeros

Os enantiômeros de um composto quiral podem apresentar propriedades biológicas distintas. O isômero apresentando as propriedades biológicas mais potentes e desejadas é denominado eutômero, enquanto aquele apresentando efeitos inócuos é denominado distômero.⁸⁴ A presença de distômeros impacta diretamente na dosagem necessária para obtenção de eficácia *in vivo* e o controle

de qualidade garantindo a proporção entre os enantiômeros pode ser desafiador. Ainda mais preocupante é o caso em que o distômero apresenta propriedades tóxicas e deve ser completamente eliminado do produto final.⁸⁴⁻⁸⁵

Um caso histórico que chamou a atenção para o estudo da quiralidade de produtos farmacêuticos foi o da talidomida. Este fármaco era comercializado como mistura racêmica e, após diversos defeitos congênitos apresentados por neonatos cujas mães haviam utilizado talidomida, o fármaco foi retirado do mercado.⁸⁶ Verificou-se em estudos posteriores que o isômero (*R*) era o responsável pelas propriedades terapêuticas (sedativas e hipnóticas) enquanto o isômero (*S*) apresentava propriedades teratogênicas.⁸⁷ Existem ainda casos, como o da própria talidomida, em que pode ocorrer racemização *in vivo* de um composto enantiomericamente puro.

Devido à importância do estudo dos efeitos da quiralidade em compostos bioativos, selecionamos o composto **1** para separação dos enantiômeros pois o mesmo apresentou o melhor conjunto de atividades biológicas. Sua vantagem sobre o composto **6**, que apresenta perfil muito semelhante, foi a demonstrada não interação com a Pgp (seção 4.3.7).

O composto **1** foi então submetido à resolução quiral por cromatografia líquida, um dos enantiômeros foi eluído entre 6 e 7,5 min e o segundo entre 8 e 10 min. Os cromatogramas para a mistura e amostras purificadas podem ser observados na figura 22. A configuração absoluta foi determinada pela técnica de dicroísmo circular (anexo A) e o enantiômero **1a** foi identificado como sendo o *S* e o enantiômero **1b** foi identificado como o *R*.

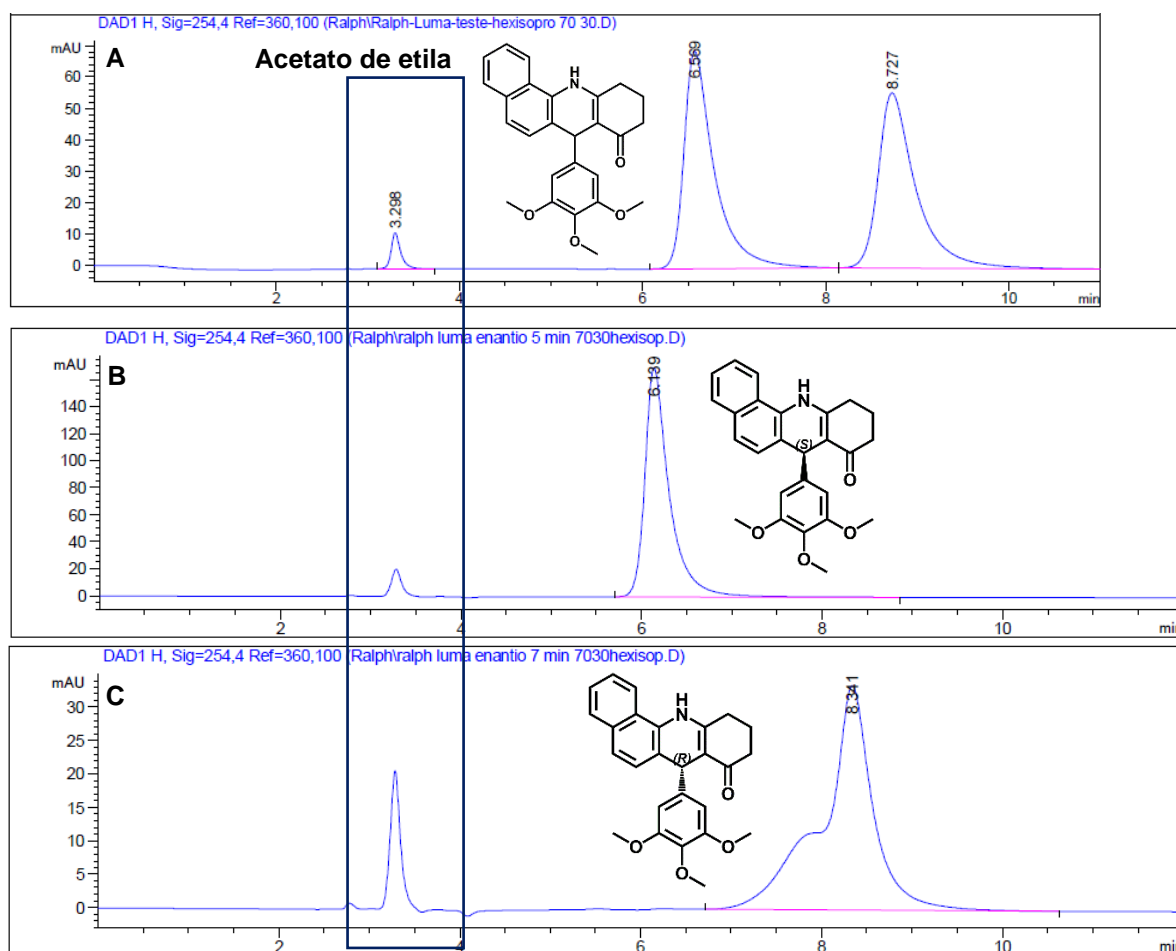


Figura 22 – Cromatogramas para: (A) 60 mg em 4 mL da mistura racêmica do composto **1**. (B) primeiro enantiômero **1a** obtido em 6,8 min (11 mg) e (C) Segundo enantiômero **1b** obtido a 8,8 min (9,7mg).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.6 Avaliação biológica dos enantiômeros puros

Os enantiômeros **1a** e **1b** foram avaliados nos ensaios *wound healing*, de citotoxicidade contra a linhagem MDA-MB-231, de polimerização da tubulina e de progressão do ciclo celular. A mistura **1** foi reavaliada paralelamente em todos os ensaios (tabela 9).

No ensaio *wound healing*, os compostos **1a** e **1** inibiram a migração celular em 90% e 80%, respectivamente, enquanto o composto **1b** não apresentou nenhum efeito em relação ao controle negativo. O ensaio de polimerização da tubulina foi realizado em 5 concentrações para cada composto (25 – 0,3 μ M, diluição 1:2). A mistura **1** apresentou IC_{50} de 1,35 μ M, estando de acordo com os resultados obtidos anteriormente (tabela 8). O enantiômero **1a** apresentou IC_{50} de 0,78 μ M enquanto o

1b não apresentou atividade (figura 23), sendo, portanto, o isômero **S** o eutômetro para a atividade antitubulina. Vale ressaltar que o composto **1a** foi cerca de 2 vezes mais potente que mistura, de acordo com o esperado quando temos a presença de um distômero em uma mistura racêmica.

Os resultados de inibição da polimerização da tubulina corroboram os estudos de docagem molecular que realizamos anteriormente.⁷⁸ As poses geradas para os isômeros **S** em geral apresentaram energias de ligação mais favoráveis. Além disso, a inspeção visual dos resultados também nos levou a concluir que este seria o isômero com maior probabilidade de interagir com o sítio da colchicina. Este resultado mostra a importância da integração de técnicas *in silico* no processo de desenvolvimento de novas entidades químicas.

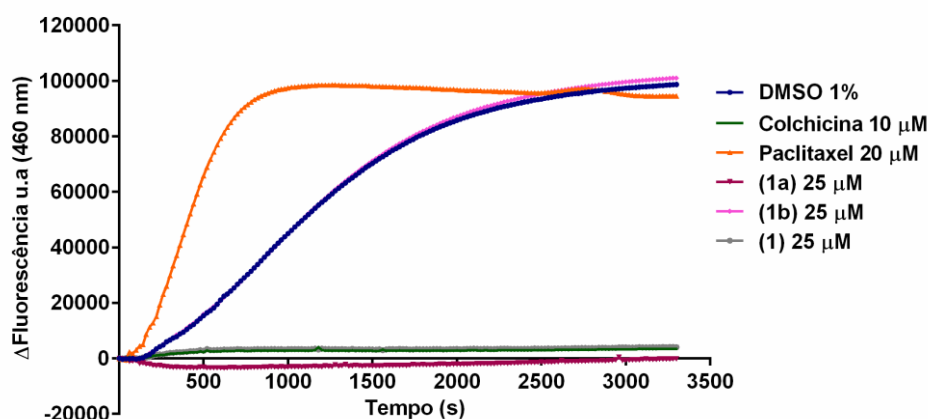


Figura 23 – Polimerização da tubulina na presença dos controles e dos compostos **1**, **1a** e **1b**.
Fonte: Elaborada pela autora.

Nos ensaios de citotoxicidade, a mistura **1** apresentou CC_{50} de $0,12 \mu\text{M}$, novamente de acordo com os resultados anteriores (tabela 8). O composto **1a** apresentou CC_{50} de $0,013 \mu\text{M}$ enquanto o composto **1b** apresentou CC_{50} de $6 \mu\text{M}$. A potência do composto **1a** foi aumentada em 10 vezes em relação à mistura **1**, muito além do esperado. Ainda, o composto **1b** apresentou atividade 50 vezes menor que a mistura, entretanto apresentou citotoxicidade mesmo sendo inativo contra o alvo molecular proposto, a proteína tubulina. Estes resultados indicam que os compostos podem atuar em um segundo alvo molecular.

A identificação de um segundo alvo é de grande interesse por duas razões: i) caso seja um alvo não terapêutico, modificações moleculares capazes de reduzir essa interação poderiam reduzir potenciais efeitos colaterais. ii) caso seja um alvo terapêutico, o caráter de inibidor dual poderia ser explorado e otimizado. Terapias

multi-alvo apresentam os benefícios das terapias combinatórias (e.g. evitar mecanismos de resistência) com a vantagem de apresentarem menos efeitos colaterais.⁸⁸ A completa elucidação destes efeitos vai além do escopo desta tese, no entanto publicações recentes descrevem inibidores duais de tubulina e histonas desacetilases,⁸⁸⁻⁸⁹ o que poderia ser um ponto de partida para posterior investigação.

Tabela 9 – Avaliação biológica dos enantiômeros puros.

Composto	IC ₅₀ (µM)	
	Citotoxicidade (MDA-MB-231)	Polimerização da tubulina
1	0,12 ± 0,02	1,35 ± 0,06
1a	0,013 ± 0,003	0,78 ± 0,03
1b	6 ± 2	inativo

Dados são apresentados como Média ± DP de dois ensaios independentes em duplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Para melhor compreender o efeito dos enantiômeros na tubulina intracelular, o efeito dos compostos sobre a progressão do ciclo celular foi estudado por meio da quantificação do conteúdo de DNA das células tratadas. Como controles positivos de perturbação do ciclo celular foram utilizadas a colchicina, que leva a um acúmulo de células na fase G₂/M e a doxorubicina, que leva a um acúmulo de células na fase S, devido à inibição da enzima topoisomerase II.

Podemos observar (figura 24) que os compostos **1** e **1a** apresentam um perfil similar ao obtido para a colchicina, causando um acúmulo de células na fase G₂/M devido a perturbação do fuso mitótico. Observamos também um aumento no número de células tetraploides (4n) pois, devido à natureza tumoral das células e à comportamentos anômalos inerentes de culturas *in vitro*, algumas células continuam a multiplicar seu material genético mesmo em condições adversas.

Uma característica comum a todos os agentes citotóxicos é o aumento do número de células Sub-G₁, ou seja, células mortas ou apoptóticas. Podemos observar esse efeito nas células tratadas com doxorubicina, colchicina, **1** e **1a**. O tratamento com o composto **1b** em concentrações subtóxicas não causou nenhum efeito significativo em relação ao controle negativo. No entanto, o tratamento com o composto **1b** a 6 µM levou à um aumento no número de células em Sub-G₁, confirmando sua natureza citotóxica. Contudo, o perfil de distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular não sofreu alterações em relação ao controle. O que indica que seu mecanismo citotóxico não está relacionado a nenhuma via envolvida

na progressão do ciclo celular e confirma que o enantiômero *R* não se liga à tubulina tanto *in vitro* quanto *in situ*.

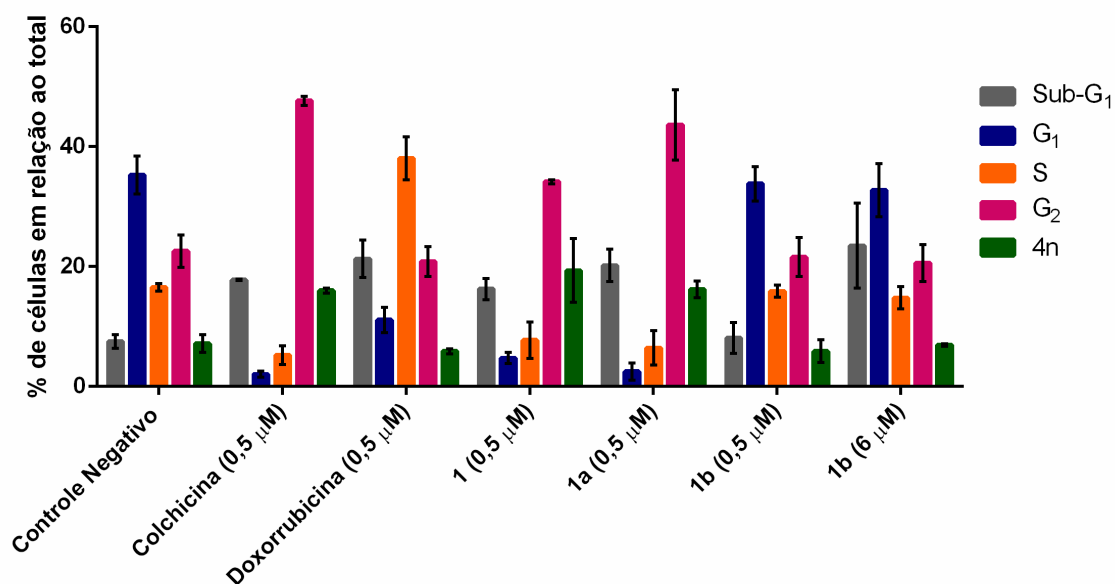


Figura 24 – Distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular para o controle negativo (DMSO 0.1%) e após 48 h de tratamento com colchicina, doxorubicina, **1**, **1a** e **1b**.
Fonte: Elaborada pela autora.

4.7 Estudos de metabolismo e farmacocinética

Como exposto na seção 1.3, a dose eficaz de um fármaco depende de sua atividade biológica contra o alvo terapêutico e de suas propriedades ADME. Um fármaco efetivo deve apresentar uma rota de administração adequada, deve atingir a concentração necessária para observação do efeito biológico no tecido alvo e deve possuir um tempo de residência suficiente para que o efeito seja observado. Nesse contexto, a modulação de múltiplos parâmetros farmacocinéticos paralelamente aos parâmetros farmacodinâmicos é a estratégia central aplicada ao desenvolvimento de fármacos atualmente. Portanto, para compreender as vantagens e limitações da série de compostos desenvolvida durante esse trabalho de doutorado e priorizar compostos para avaliação *in vivo*, suas propriedades farmacocinéticas e de metabolismo foram avaliadas.

Os estudos foram realizados durante um estágio sanduíche de 11 meses na *Drug Discovery Unit* da Universidade de Dundee (Dundee, Reino Unido). Esse estágio foi viabilizado com uma bolsa de estudos da agência de fomento britânica *Wellcome Trust*. Os resultados experimentais coletados serão apresentados nos subitens seguintes.

4.7.1 Solubilidade aquosa

A solubilidade aquosa é um parâmetro fundamental no desenvolvimento de candidatos a fármacos influenciando diretamente a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade oral destas substâncias.⁹⁰ Compostos com baixa solubilidade aquosa, além de exigirem formulações mais complexas, oferecem riscos de toxicidade devido à possibilidade de formação de cristais no organismo.⁹⁰ Ademais, causam problemas de reprodutibilidade ou falsos resultados em estudos *in vitro* além de tornar administração intravenosa para estudos *in vivo* desafiadora. Estes fatores explicam o porquê diversos casos de desenvolvimento de fármacos tiveram insucesso devido à baixa solubilidade aquosa⁹¹ e a importância de se acompanhar este parâmetro desde as fases iniciais de um projeto. A determinação da solubilidade cinética dos compostos **1–6**, **8**, **10**, **1a** e **1b** se deu por meio de nefelometria, que utiliza a medida do espalhamento de luz laser quando essa incide sobre partículas insolúveis.⁷³ Os resultados (tabela 12) mostram que os compostos apresentaram solubilidade aquosa entre 20 e 219 μM . Os compostos **5**, **6**, **8**, **1a** e **1b** apresentaram adequada solubilidade aquosa, com resultados acima do valor de corte de 100 μM . Os compostos **1**, **2** e **3** foram agrupados em uma categoria intermediária, apresentando valores sub ótimos. Os compostos **4** e **10** apresentaram valores de solubilidade abaixo do limite de 70 μM .

4.7.2 CHLogD

A solubilidade de um composto é dependente, entre outros fatores, de sua lipofilia, ou seja, de seu parâmetro $\log P$. A lipofilia também influencia diretamente outras propriedades importantes como absorção e biodisponibilidade, sendo um parâmetro que deve ser controlado durante todo o processo de desenvolvimento de um fármaco. Experimentalmente, foram determinados os valores de $\log D$ ($\log P$ medido a um determinado pH, neste caso, 7,4). Os valores $m = 0,25$ e $b = 1,59$, obtidos a partir da curva de calibração (figura 25) foram substituídos na equação 2 para determinação dos valores de CHI dos compostos (tabela 10).

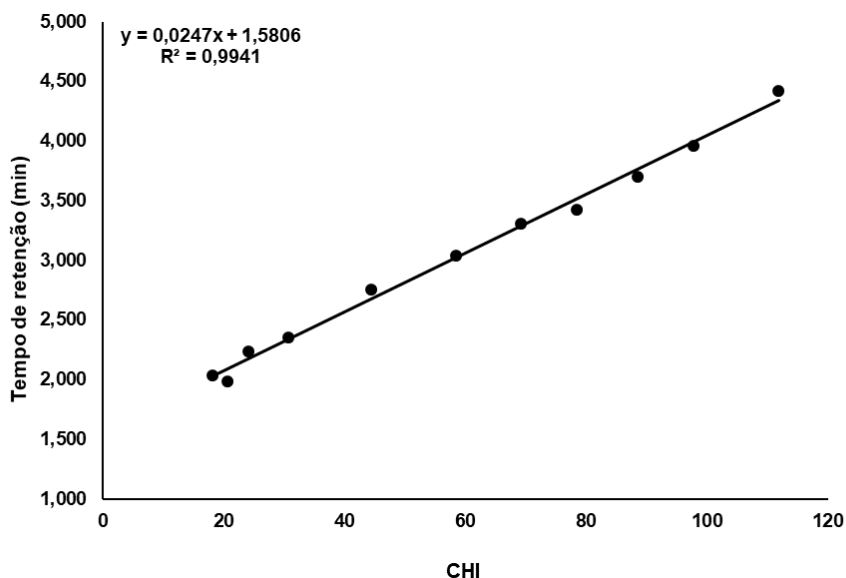


Figura 25 – Curva de calibração utilizando os compostos referência paracetamol, teofilina, cafeína, benzimidazol, colchicina, carbamazepina, indol, propiofenona, butirofenona, valerofenona e heptanofenona.

Fonte: Elaborada pela autora.

A partir dos valores da tabela 10 e da equação 3, foram determinados os valores de $CHILogD$ que estão sumarizados na tabela 12.

Tabela 10 – Tempos de retenção e índices de hidrofobicidade para os compostos estudados.

Composto	T_r (min)	CHI	Composto	T_r (min)	CHI
1	3,525	78,8	6	3,281	68,9
2	*	*	8	3,372	72,6
3	3,695	85,7	10	3,750	88,0
4	3,702	86,0	1a	3,526	78,9
5	4,038	99,6	1b	3,527	78,9

Fonte: Elaborada pela autora.

Como descrito na seção 4.3.3, a faixa de valores de $\log D$ deve ficar entre 1,5 e 3,5 para adequada absorção via oral. Entretanto, dependendo de outras características da molécula, compostos com valores de $\log D$ até 5 ainda podem ser absorvidos após administração via oral. Como visto na tabela 12, todos os compostos estão abaixo do valor de corte de *Lipinski* (5) e os compostos **1**, **6**, **8**, **1a** e **1b** apresentaram valores na faixa ideal para absorção via oral. Interessantemente, não observamos correlação entre os valores de $CHILogD$ e de solubilidade aquosa (figura 26), o que indica que para alterar o perfil de solubilidade desta série, além da adição de grupos polares, características estruturais como planaridade e arranjo tridimensional (cristalino ou amorfo) devem possuir papel fundamental.

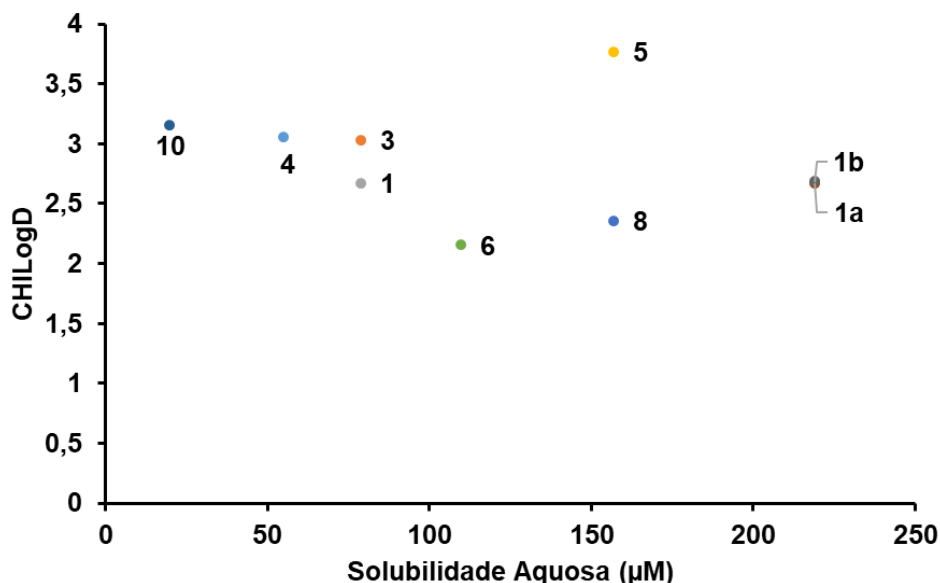


Figura 26 – Solubilidade aquosa x CHILogD.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esta hipótese é reforçada quando comparamos os parâmetros dos enantiômeros puros (**1a** e **1b**) com sua mistura racêmica (**1**). Embora os valores de $CHILogD$ sejam os mesmos para os três ($CHILogD = 2,6$), a solubilidade aquosa de **1a** e **1b** ($219 \mu M$) é superior ao valor obtido para a mistura **1** ($79 \mu M$).

4.7.3 Ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial (PAMPA)

Um segundo parâmetro determinante na absorção de fármacos é a permeabilidade passiva através de uma membrana lipídica. Comumente, agrupa-se substâncias em 4 classes de acordo com a combinação das propriedades solubilidade/permeabilidade (tabela 11).⁹²

Tabela 11 - Classificação de substâncias de acordo com suas propriedades de solubilidade/permeabilidade.

Classe	Solubilidade	Permeabilidade	Absorção esperada via oral
I	Alta	Alta	Alta e rápida
II	Baixa	Alta	Dependente da taxa de dissolução <i>in vivo</i>
III	Alta	Baixa	Variável
IV	Baixa	Baixa	Baixa

Fonte: Elaborada pela autora.

Dessa forma, o acompanhamento da permeabilidade passiva dos compostos também se faz fundamental desde as etapas iniciais do desenvolvimento de uma substância bioativa. O ensaio de permeabilidade em membrana paralela artificial foi empregado na determinação da permeabilidade dos compostos **1–6, 8, 10, 1a** e **1b** e os resultados estão sumarizados na tabela 12. Os compostos **2, 4** e **10** apresentaram baixa recuperação (< 10%), inviabilizando a confiabilidade dos resultados. Esta alta retenção de massa pode ser explicada por agregação dos compostos em solução (**4** e **10** possuem baixa solubilidade aquosa) ou interação com a membrana lipídica. Os demais compostos foram classificados de acordo com sua permeabilidade em relação ao verapamil ($\leq 49\%$ = Baixa; 50 – 99% = Média; $\geq 100\%$ = Alta). Os compostos **1, 3, 5, 6, 1a** e **1b** apresentaram baixa permeabilidade (% em relação ao verapamil entre 0,5 e 24,1%), classificando-os na categoria III (tabela 11). O composto **5**, que apresentou a permeabilidade mais baixa, também é aquele com maior valor de $CHLogD$ (3,76). O composto **8** foi o único classificado como possuindo média permeabilidade (60% em relação ao verapamil). Como discutido na seção 4.3.3, apesar de o composto **8** apresentar atividade 10 vezes inferior contra o alvo molecular em relação ao composto **2**, as atividades nos ensaios celulares não foram alteradas significativamente. A diferença de permeabilidade destes compostos explica este comportamento, confirmando a hipótese de que uma melhor capacidade de penetração através da membrana celular teria sido responsável pela manutenção das atividades celulares. Isto também evidência a importância da otimização múltipla de parâmetros em todos os estágios de desenvolvimento.

4.7.4 Estabilidade metabólica em microssomos de camundongo e humano

O *clearance* reflete o volume de plasma do qual um composto é removido de forma irreversível por unidade de tempo. É dos principais parâmetros farmacocinéticos a ser considerado em projetos de química medicinal. Isto porque o *clearance* determina outros parâmetros fundamentais, tais quais, meia-vida, biodisponibilidade oral e dose eficaz. O metabolismo é a principal rota de *clearance* de 75% dos fármacos,⁹³ sendo o fígado o órgão predominante neste processo. Embora processos metabólicos possam produzir metabólitos farmacologicamente

ativos ou tóxicos, em geral, as reações de biotransformação produzem metabólitos inativos e mais polares, facilitando sua excreção.⁹⁴

As reações de biotransformação são subdivididas em Fases I e II. As principais famílias de enzimas de Fase I são as citocromo P450 (CYPs), flavinas monooxigenases (FMOs), álcool desidrogenases (ADH), redutases e esterases, que são responsáveis por reações de oxidação, redução e hidrólise. As enzimas de fase II realizam reações de conjugação, sendo as mais comuns a glucorinidação, sulfonação, metilação e acetilação.⁹⁴

Devido ao papel central do fígado nestes processos, diversos ensaios *in vitro* utilizando frações hepáticas são utilizados para predição do *clearance in vivo* e otimização da estabilidade de séries químicas. Hepatócitos e microsossomos constituem as duas principais ferramentas para estudos do *clearance in vitro*. O fígado de animais ou doadores humanos pode ser utilizado para o isolamento de células hepáticas (hepatócitos), que possuem enzimas de fases I e II e todos os cofatores necessários para as reações. A homogeneização do tecido hepático, seguido de etapas de ultracentrifugação permite o isolamento de artefatos subcelulares denominados microsossomos. Os microsossomos são estruturas esféricas constituídas por membranas do retículo endoplasmático contendo a maior parte das enzimas de fase I, predominantemente CYPs e algumas enzimas de fase II, como a UDP-glucuronil transferase (UDPGT).⁹⁴⁻⁹⁵

Devido a facilidade de obtenção e armazenamento, custo mais baixo e empregabilidade em HTS, os microsossomos são amplamente utilizados tanto na indústria quanto na academia nas fases iniciais de desenvolvimento de novas entidades químicas. Neste contexto, os compostos **1 – 6, 8, 10, 1a** e **1b** foram incubados com microsossomos de camundongo e humano para a avaliação do *clearance* intrínseco (CL_{int}), os resultados estão sumarizados na tabela 12. Os compostos **1, 1a, 1b** e **6** apresentaram boa estabilidade metabólica, abaixo do valor de corte de 5 mL/min/g, tanto em microsossomos humanos quanto de camundongos.

Os compostos **8** e **10** apresentaram estabilidade metabólica intermediária tanto no sistema humano quanto de camundongos enquanto os compostos **2 – 5** apresentaram média estabilidade metabólica em microsossomos de camundongo e boa estabilidade metabólica em microsossomos humanos. De acordo com o esperado, os valores de *clearance* obtidos nos sistemas de camundongos são mais altos devido ao metabolismo mais acelerado dos roedores quando comparados com

humanos. Diferentemente do observado para atividade biológica, não houveram diferenças entre o metabolismo dos enantiômeros puros, **1a** e **1b** e a mistura racêmica **1**.

4.7.5 Estabilidade metabólica em hepatócitos de camundongo e humano

Hepatócitos representam um modelo *in vitro* mais completo para estudos de metabolismo, contendo as enzimas de fase I e II, todos os cofatores necessários, a membrana celular como barreira física e bombas de transporte e efluxo ativos. Apesar de suas vantagens, é um sistema usado para compostos pré-selecionados por serem mais caros e permitirem avaliação de um menor número de compostos por placa. A comparação dos resultados com os obtidos em microsossomos auxiliam na compreensão das vias de eliminação dos compostos.

Os compostos **1–6**, **8**, **10**, **1a** e **1b** foram avaliados em hepatócitos de camundongo e humanos e os resultados podem ser vistos na tabela 12. A maior parte dos compostos apresentou valores de *clearance* similares em microsossomos e hepatócitos para ambas espécies, sugerindo que os mesmos são metabolizados majoritariamente por enzimas de fase I. As exceções à esta tendência foram os compostos **6** e **8**. O composto **6** apresentou valores de CL_{int} quatro vezes maior em hepatócitos quando comparado aos microsossomos para ambas espécies. Este resultado demonstra que este composto sofre metabolismo de fase II. A análise estrutural deste composto sugere o hidroxibenzeno como provável sítio de conjugação, o que foi confirmado por estudos de identificação de metabólitos (seção 4.6.7). O composto **8**, embora tenha apresentado valores intermediários de CL_{int} em microsossomos, mostrou-se estável após incubação com hepatócitos de ambas espécies. Em geral, este tipo de diferença ocorre quando há limitação de penetração do composto nas células hepáticas. Entretanto, uma vez que o composto **8** apresentou o melhor valor de permeabilidade no ensaio PAMPA (tabela 12), a simples difusão através da membrana plasmática não explicaria este comportamento. Isto sugere que este composto pode ser um substrato de transportadores enzimáticos. Foi demonstrado (seção 4.3.7) que o composto **8** modula a atividade da bomba de efluxo Pgp, entretanto, o mesmo modula positivamente a atividade da mesma e esta interação não prejudicou sua permeação nas células MDA-MB-231. Estes resultados sugerem que o composto **8** deve ser

substrato de transportadores exclusivos de células hepáticas, tais como as bombas de efluxo dependentes de ATP codificadas pelo gene ABCC2.⁹⁶

4.7.6 Estabilidade em plasma e ligação a proteínas plasmáticas

A estabilidade dos compostos em plasma deve ser estudada antes da seleção de compostos para estudo *in vivo*, uma vez que compostos instáveis podem levar à interpretação errônea dos resultados. Por esse motivo, os compostos **1–6**, **8**, **10**, **1a** e **1b** tiveram sua estabilidade avaliada em plasma de camundongo e todos foram estáveis durante o período de incubação (180 min). A procaína, utilizada como controle positivo, é metabolizada em plasma pela enzima pseudocolinesterase e apresentou meia vida de 1,3 min.

Outro parâmetro importante de ser determinado para a correta interpretação dos resultados *in vivo* é a ligação às proteínas plasmáticas. Apenas a fração de composto livre (ou seja, a fração não ligada às proteínas plasmáticas) é capaz de ser distribuída por diferentes tecidos, atingir o alvo terapêutico e ser metabolizada. Sendo assim, este não é um parâmetro utilizado para priorização de compostos, mas sim para correção da correlação *in vivo* x *in vitro* (IVIVC). Como pode ser observado na tabela 12, todos os compostos apresentam uma alta proporção de ligação às proteínas plasmáticas. Os compostos com maiores frações livres foram o **1** (3%) e **6** (4%).

O enantiômero puro **1b** apresentou uma fração livre duas vezes maior que o enantiômero **1a**. Como discutido na seção 4.5, comumente, diferentes estereoisômeros possuem diferentes afinidades de interação molecular com proteínas.

Tabela 12 – Parâmetros ADME *in vitro*.

ID	Solubilidade Aquosa (μM)	CHI LogD _{7.4}	T _{1/2} Plasma (min)	Fu (%)	Pe (nm/s) PAMPA	CL _{int} (mL/min/g) Mics Camun	CL _{int} (mL/min/g) Heps Camun	CL _{int} (mL/min/g) Mics Humano	CL _{int} (mL/min/g) Heps Humano
1	79	2,67	> 180	3,0	33,22	3,9	4,2	3,8	3,9
2	79	*	> 180	0,6	**	13,6	14,4	4,1	< 0,5
3	79	3,03	> 180	0,9	18,56	13,7	12,7	3,4	< 0,5
4	55	3,05	> 180	0,7	**	18,2	16,1	2,9	< 0,5
5	n.d.	3,76	> 180	0,1	0,74	9,5	7,7	4,2	5,4
6	110	2,15	> 180	4,0	18,24	1,8	8,3	0,7	3,1
8	157	2,35	> 180	2,0	82,50	14,5	< 0,5	6,4	< 0,5
10	20	3,15	> 180	2,0	**	10,5	12	8,7	8,1
1a	219	2,67	> 180	1,4	31,44	4,1	4,3	3,8	< 0,5
1b	219	2,68	> 180	3,5	33,20	5,1	7,7	4,4	< 0,5
Vera	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	137,97	10,5	16,4	7,5	9,0

* Sinal UV não detectado. ** Baixa recuperação. n.d. não determinado. Fu – porcentagem de composto livre em plasma. Vera - verapamil

Fonte: Elaborada pela autora

4.7.7 Identificação dos metabolitos formados após incubação com hepatócitos

A análise coletiva dos dados biológicos e farmacocinéticos *in vitro* nos levou a selecionar o composto **1** para avaliação do perfil farmacocinético *in vivo*. Dessa forma, alguns estudos adicionais para melhor compreender o comportamento deste composto foram realizados. A identificação dos metabólitos formados após a incubação com hepatócitos de camundongo foi realizada para identificação dos sítios de metabolismo (SOM) e para verificação da hipótese computacional (seção 4.2) de que o composto **6** seria um possível metabólito ativo do composto **1**. Devido à esta possível correlação, ao fato de o composto **6** possuir propriedades biológicas muito próximas do composto **1** e para confirmar se o hidroxibenzeno seria o sítio de conjugação no composto **6** (seção 4.6.5), seus metabólitos também foram identificados.

O composto **6** apresentou como único metabólito a espécie conjugada com ácido glucorônico (figura 27). Embora o sítio de glucoronidação não possa ser determinado apenas pelos dados de espectrometria de massas, a reação provavelmente ocorre no grupo hidroxila. O composto **1**, que possui a hidroxila metilada, não apresentou espécies glucoronizadas, indicando que esta reação é improvável de ocorrer no nitrogênio, o único outro sítio de conjugação possível.

Diferentemente do esperado, a espécie dealquilada proposta não foi identificada como metabólito do composto **1**, o principal metabólito identificado

corresponde à uma espécie reduzida (figura 27). Incubações com soluções-estoque distintas foram realizadas para este composto pois, após a primeira incubação, a amostra correspondente a $t = 0$ min apresentou dois picos de igual intensidade correspondentes ao composto parental e ao metabólito reduzido. A análise do estoque (10 mM em 100% DMSO) apresentou um padrão similar, indicando a degradação do composto em solução. Para efeitos de comparação, uma solução recém preparada do composto **1** foi analisada anteriormente a realização dos estudos *in vitro* e *in vivo* e demonstrou pureza > 99% (anexo C).

Dessa forma, uma nova solução estoque foi preparada e a incubação realizada novamente, este resultado mostrou apenas a presença do composto parental em $t = 0$. Após 90 min de incubação foi verificada a presença do metabólito reduzido (figura 27). Para elucidar a estrutura do metabólito formado e confirmar se a presença do mesmo se deve à atividade enzimática e não à degradação em solução, estudos de RMN foram conduzidos (anexo B). Os resultados indicaram que o composto reduzido é formado a partir da perda de dois hidrogênios do anel diidropiridínico central levando a formação de um anel piridínico aromático.

Soluções recém preparadas do composto e com até dez dias de armazenamento à temperatura ambiente não apresentaram quantidades significativas da espécie reduzida, indicando que as espécies identificadas após a incubação com hepatócitos são produtos de reação enzimática. Entretanto, após 14 dias a presença do produto reduzido começou a ser verificada e após dois meses a solução era constituída principalmente pelo produto de degradação (anexo B). Conclui-se assim que a mesma espécie é formada espontânea e enzimaticamente. A redução espontânea do anel diidropiridínico é termodinamicamente favorecida devido à aromatização do sistema e deve ocorrer por meio da abstração do próton ligado ao nitrogênio do anel central que interage com o par de elétrons livres do oxigênio do dimetilsulfóxido.

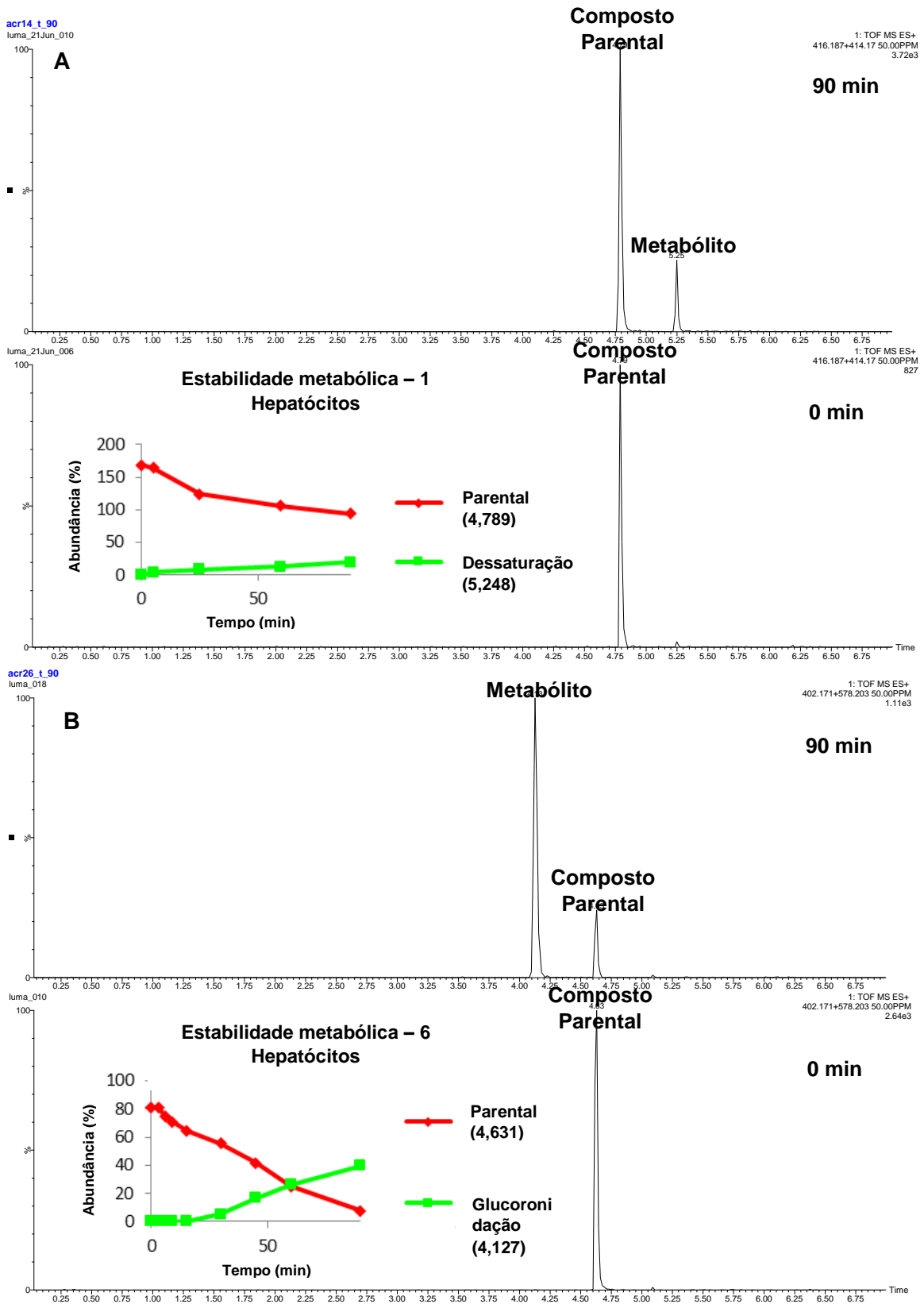


Figura 27 – Identificação de metabólitos após incubação com hepatócitos de camundongo. Cromatogramas e gráficos de abundância de espécies x tempo para os compostos (A) 1 e (B) 6.

Fonte: Elaborada pela autora.

4.7.8 Inibição de enzimas CYP recombinantes

Há 57 enzimas P450 humanas caracterizadas, das quais cerca de metade são responsáveis pelo metabolismo de substâncias endógenas, tais quais esteroides e ácidos graxos. A outra metade está envolvida no metabolismo de xenobióticos, incluindo fármacos.⁹⁷ Destas enzimas, as isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 são responsáveis pela biotransformação de cerca de 90% dos fármacos disponíveis comercialmente, sendo a CYP3A4 responsável por 50% destas reações.⁹⁸⁻⁹⁹ O fato de a maior parte das substâncias serem metabolizadas por um conjunto restrito de enzimas faz com que interações medicamentosas seja um risco associado à administração concomitante de terapias múltiplas. Estas interações podem ocorrer devido à inibição ou indução das enzimas metabólicas por parte dos fármacos. Dessa forma, o estudo de inibição das isoformas principais das CYPs nas etapas iniciais de um projeto de desenvolvimento de fármacos é importante para a predição de mecanismos de toxicidade e desenvolvimento de estratégias para administração *in vivo* destas substâncias.¹⁰⁰ Além disso, interações medicamentosas devem ser especialmente avaliadas no desenvolvimento de fármacos anti-câncer, uma vez que estas substâncias são frequentemente coadministradas com diversas terapias paliativas.

Para compreender o perfil de interação do composto **1** com as principais enzimas metabólicas, a inibição das isoformas CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 e CYP3A4 foi avaliada. A versatilidade da CYP3A4 se deve ao seu sítio ativo ser grande e dinâmico, sendo constituído por diferentes subsítios.¹⁰¹ Assim, a inibição desta enzima foi estudada utilizando substratos para diferentes subsítios da CYP3A4 (DEF e 7BQ). O miconazol foi utilizado como controle positivo de inibição e os resultados estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13 – Atividade inibitória contra um conjunto de enzimas CYP.

Composto	IC ₅₀ (µM)					
	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4 (DEF)	CYP3A4 (7BQ)
Miconazol	0,49	0,11	0,0079	0,11	0,020	0,030
1	5,5	0,77	0,75	8,1	> 10	> 10

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostram que o composto **1** não é inibidor da CYP3A4, o que é uma vantagem sobre o composto protótipo podofilotoxina, que é um potente inibidor desta isoforma, bem como das isoformas 2C9 e 2C19.¹⁰²⁻¹⁰³ Entretanto, as demais isoformas avaliadas foram inibidas pelo composto **1**, indicando que algumas considerações e estudos subsequentes devem ser feitos caso este composto seja levado a fases mais avançadas de desenvolvimento. Estudos *in vitro* acerca do mecanismo de inibição e inibição tempo-dependente se fazem necessários, além disso, o potencial risco associado à inibição destas enzimas deve ser avaliado *in vivo*. Deve-se também comparar a concentração plasmática necessária para obtenção de efeito terapêutico *in vivo* com a concentração capaz de inibir as CYPs para verificar a dimensão de uma janela terapêutica segura.

4.8 SAR e SPR

Com base nos resultados apresentados e discutidos nas seções anteriores, SAR e relação entre a estrutura e propriedade (SPR) foram estabelecidos e estão apresentados na figura 28. As conclusões dos esquemas de SAR levam em conta os resultados dos ensaios de polimerização da tubulina, citotoxicidade e migração celular.

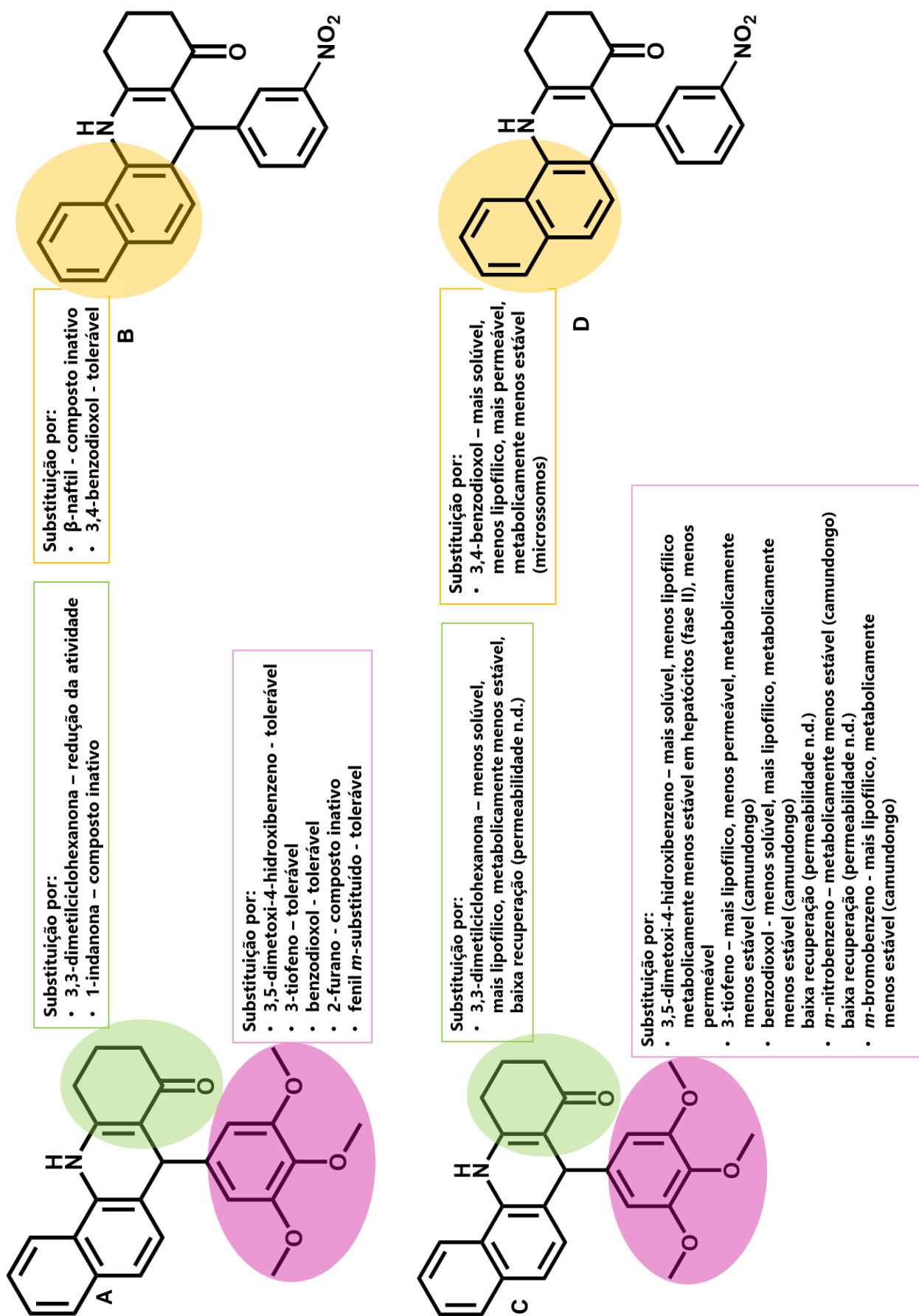


Figura 28 – Esquemas de SAR (A e B) e SPR (C e D).

Fonte: Elaborada pela autora.

4.9 Perfil farmacocinético *in vivo*

O estudo do perfil farmacocinético *in vivo* de um composto nas fases iniciais de desenvolvimento busca responder diversas questões, tais quais: i) os resultados *in vitro* são preditivos *in vivo* para a série avaliada? Caso não sejam, comportamentos como metabolismo extra-hepático, papel de transportadores ativos na absorção entre outros processos devem ser considerados e subsequentemente avaliados; ii) qual o regime de dose (concentração e frequência) e melhor via de administração a serem empregados em estudos de eficácia *in vivo*?; iii) a concentração mínima para eficácia é atingida no modelo animal?

Dessa forma, o composto **1** foi avaliado *in vivo* para validarmos a correlação das propriedades estudadas *in vitro* e dimensionarmos aquelas que devem ser priorizadas em possíveis etapas de otimização. Além disso, os resultados ajudarão na elaboração de um desenho experimental efetivo para prova de conceito de eficácia em modelos animais.

4.9.1 Estudos de formulação para administração intravenosa

Como exposto na seção 4.6.7, o composto **1** foi selecionado para ter seu perfil farmacocinético *in vivo* avaliado. O preparo de soluções nos veículos descritos na seção 3.26.1, nos levou a selecionar o veículo **v** (10% DMSO, 50% PEG400 e 50% H₂O Milli-Q) para administração intravenosa. Esta foi a única solução que não apresentou agregados e permaneceu límpida após incubação de um dia para o outro a temperatura ambiente.

4.9.2 Bioanálise

Para determinação da concentração de composto nas amostras de sangue coletadas após as administrações via oral e intravenosa, uma curva de calibração com concentrações conhecidas do composto em sangue foi construída (figura 29)

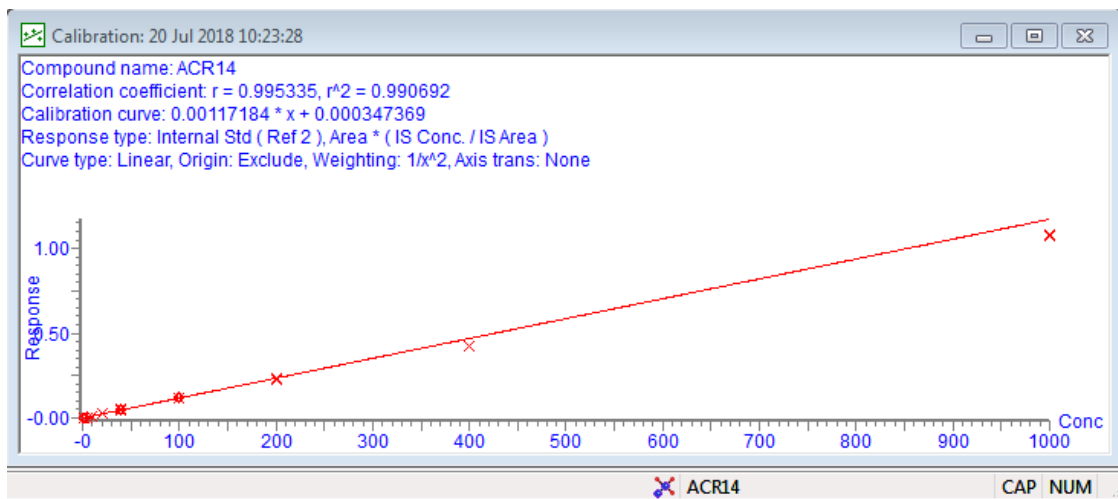


Figura 29 – Curva de calibração para o composto **1** em sangue de camundongo. O eixo x corresponde à concentração do composto em ng/mL e o eixo y à resposta obtida por MS.

Fonte: Elaborada pela autora.

Novas amostras foram preparadas para o composto **1** nas mesmas concentrações utilizadas para a construção da curva de calibração. As concentrações destas soluções foram determinadas experimentalmente e comparadas com as concentrações esperadas (figura 30). Os resultados indicam que as condições estabelecidas para a análise são adequadas. Estas condições foram empregadas na determinação da concentração de composto presente nas amostras provenientes dos camundongos utilizados no estudo. Os resultados (tabela 14) foram utilizados na determinação dos parâmetros farmacocinéticos (seção 4.8.3).

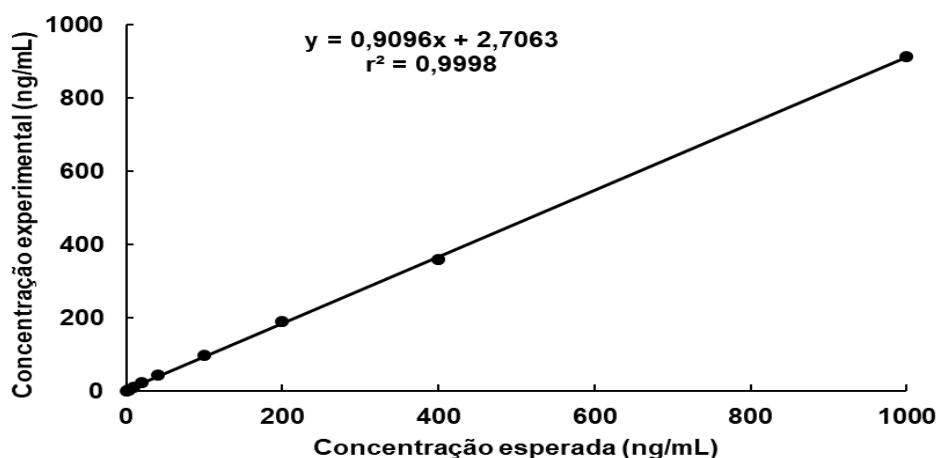


Figura 30 – Controle de qualidade das condições estabelecidas para determinação da concentração do composto **1** em sangue.

Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 14 – Concentração média de composto nas amostras de sangue de camundongos Balb/c.

Composto	Tempo (min)	IV 3.0mg/kg	PO 10mg/kg
		Concentração média (ng/mL)	Concentração média (ng/mL)
1	pre-dose		≤ 10
	5	1018	≤ 10
	15	964	≤ 10
	30	885	18
	60	693	30
	120	415	54
	240	131	25
	360	38	10
	480	10	12

Fonte: Elaborada pela autora.

4.9.3 Parâmetros farmacocinéticos

O perfil farmacocinético do composto **1** em camundongos após as administrações por via intravenosa e oral podem ser vistos na figura 31 e os parâmetros farmacocinéticos determinados na tabela 15.

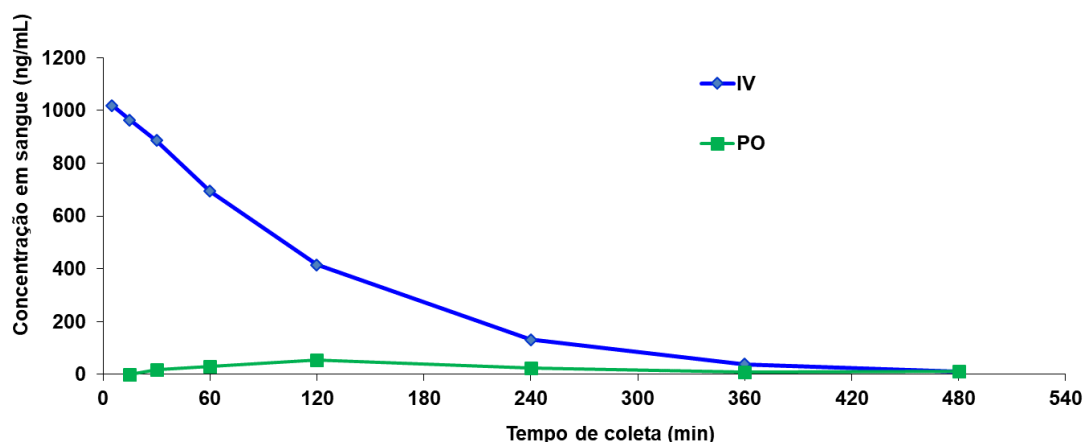


Figura 31 – Estudo farmacocinético do composto **1** após administração intravenosa (dose única 3 mg/kg) e via oral (dose única 10 mg/kg) em fêmeas de camundongo BALB/c.

Fonte: Elaborada pela autora.

O composto **1** apresentou boa estabilidade metabólica, como esperado pelos resultados *in vitro* (tabela 12), e alto volume de distribuição (2 L/kg), implicando em uma meia vida de 1,1 horas. A biodisponibilidade oral foi baixa (3%) com concentração plasmática máxima de 54 ng/mL. Considerando-se a ligação deste composto às proteínas do plasma (97%), a concentração máxima de composto livre seria de aproximadamente 1,6 ng/mL. O valor de CC_{50} determinado para este composto em células tumorais foi de 0,1 μ M, ou 41,5 ng/mL. Para uma comparação

precisa, a fração de composto livre no meio utilizado nos ensaios de citotoxicidade deveria ser determinada, uma vez que o meio de cultura é suplementado com 10% de proteínas de soro fetal bovino. Ainda assim, é seguro dizer que dificilmente o composto atingiria concentrações plasmáticas terapêuticas após a administração via oral.

Tabela 15 - Parâmetros farmacocinéticos após administração do composto **1** em camundongos Balb/c.

	IV	PO
C_{max} (ng/mL)		54
T_{max} (h)		2
$T_{1/2}$ (h)	1,1	
AUC_{0-8} (ng*min/mL)	136574	11650
Clb (mL/min/kg)	22	
Vdss (L/kg)	2,0	
F (%)		3

C_{max} – concentração plasmática máxima. T_{max} – tempo para atingir C_{max} . $T_{1/2}$ – meia vida plasmática. AUC_{0-8} – área sobre a curva. Clb – clearance. Vdss – volume de distribuição no equilíbrio. F – biodisponibilidade.

Fonte: Elaborada pela autora.

O perfil obtido *in vivo* nos indica que o comportamento do composto **1** está de acordo com o esperado por suas propriedades determinadas *in vitro*. Sua solubilidade sub ótima e permeabilidade baixa no modelo PAMPA explicam a baixa biodisponibilidade oral observada. Como predito pelos ensaios em hepatócitos e microsomas, o composto apresentou adequada estabilidade metabólica, o que pode ser destacada como uma vantagem desta série.

Do ponto de vista de ADME, os principais desafios para a continuidade de desenvolvimento deste composto são a realização de estudos de acompanhamento *in vitro* e *in vivo* acerca das consequências da inibição das enzimas CYP (seção 4.6.8), além da melhora do seu perfil de absorção visando maior biodisponibilidade oral. Para tanto, estratégias de modificação molecular visando aumentar sua solubilidade, sem reduzir o valor de $\log D$ a ponto de prejudicar sua permeabilidade passiva, devem ser empregadas buscando melhorar as propriedades fármaco-similar do composto líder **1**.

Por outro lado, o conjunto de resultados biológicos para o composto **1** é promissor. Associado a isso, o perfil metabolicamente estável e amplo volume de distribuição apresentados são suficientes para justificar a prova de conceito de eficácia *in vivo*. Por razões técnicas e devido à semelhança no perfil farmacocinético *in vitro* da mistura racêmica (**1**) e dos enantiômeros puros (**1a** e **1b**), o perfil da

mistura foi avaliado *in vivo*. Entretanto, em um modelo de eficácia animal, o enantiômero biologicamente relevante (**1a**) deverá ser avaliado.

5 Conclusões e perspectivas

Nesta tese de doutorado foi desenvolvida uma série de compostos que se ligam ao sítio da colchicina, inibindo a polimerização da tubulina. As substâncias são inibidoras da migração celular, metabolicamente estáveis e seletivamente citotóxicas contra as células tumorais do tipo TNBC.

Os compostos mais potentes (**1** e **6**) apresentaram atividade anti-angiogênica *in vitro*, modularam a tubulina *in situ* e são capazes de evitar, *in vitro*, os principais mecanismos de resistência associados aos fármacos moduladores de microtúbulos.

Dada a relevância da investigação dos efeitos da quiralidade na bioatividade de substâncias químicas, os enantiômeros do composto **1** foram separados e avaliados. De maneira notável, a existência de um eutômero (**1a**) foi determinada, sendo 2 vezes mais potente contra o alvo molecular e 10 vezes mais citotóxico contra as células tumorais.

A boa estabilidade metabólica da série, conjuntamente com os promissores resultados biológicos, justifica a avaliação da eficácia do composto **1** em modelos *in vivo* para prova de conceito. Sugere-se, para tanto, o uso de um modelo de metástase espontânea singênico ortotópico, utilizando a linhagem 4T1.13ch5T1 para indução tumoral em camundongos BALB/c.

Por fim, o desenvolvimento deste trabalho de doutorado levou ao estabelecimento de uma cascata de testes que tem como objetivo o desenvolvimento de compostos com perfil mais equilibrado entre as propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas. Esta é uma estratégia moderna e eficiente para o progresso de projetos de planejamento de candidatos a novos fármacos.

REFERÊNCIAS

- 1 INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Câncer**: o que é?. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 16 jan. 2019.
- 2 _____. **Estimativa 2017**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2017/>>. Acesso em: 8 nov. 2018.
- 3 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global health estimates** (GHE). Disponível em: <http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/>. Acesso em: 16 jan. 2019.
- 4 WORLD HEALTH ORGANIZATION **Cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 18 jan. 2019.
- 5 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 2011.
- 6 CHABNER, B. A.; CALABRESI, P. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 12a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2012.
- 7 LONGLEY, D. B.; JOHNSTON, P. G. Molecular mechanisms of drug resistance. **Journal of Pathology**, v. 205, n. 2, p. 275–92, 2005.
- 8 MUSTACCHI, G.; DE LAURENTIIS, M. The role of taxanes in triple-negative breast cancer: literature review. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 9, p. 4303–18, 2015. doi: 10.2147/DDDT.S86105.
- 9 INSTITUTO NACIONAL DO CANCER. **Estimativa 2018**: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- 10 WCRF. **Breast cancer statistics**. Disponível em: <<https://www.wcrf.org/dietandcancer/cancer-trends/breast-cancer-statistics>>. Acesso em: 20 jan. 2019.
- 11 SANTANA-DAVILA, R.; PEREZ, E. A. Treatment options for patients with triple-negative breast cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 3, n. 1, p. 42, 2010.
- 12 DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 790–803, 2010.
- 13 KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 3, p. 194–204, 2010.

- 14 SPARREBOOM, A. et al. Limited oral bioavailability and active epithelial excretion of paclitaxel (Taxol) caused by P-glycoprotein in the intestine. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 5, p. 2031–2035, 1997.
- 15 BATES, S. E. et al. A phase I/II study of infusional vinblastine with the P-glycoprotein antagonist valspodar (PSC 833) in renal cell carcinoma. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 14, p. 4724–4733, 2004.
- 16 WADE, R. H. On and around microtubules: an overview. **Molecular Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 177–191, 2009.
- 17 JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 4, p. 256–265 2004.
- 18 CHECCHI, P. M. et al. Microtubule-interacting drugs for cancer treatment. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 7, p. 361–365, 2003.
- 19 LI, Y.-J. et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling of 1,3,4-thiadiazol-2-amide derivatives as novel antitubulin agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 15, p. 4312–4322, 2014.
- 20 PROTA, A. E. et al. The novel microtubule-destabilizing drug BAL27862 binds to the colchicine site of tubulin with distinct effects on microtubule organization. **Journal of Molecular Biology**, v. 426, n. 8, p. 1848–1860, 2014.
- 21 NEGI, A. S. et al. Natural antitubulin agents: Importance of 3,4,5-trimethoxyphenyl fragment. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 373–389, 2015.
- 22 JORDAN, M. A.; KAMATH, K. How do microtubule-targeted drugs work?. **Current Cancer Drug Targets**, v. 7, n. 8, p.730-742, 2007.
- 23 VINDYA, N. G. et al. Tubulins - the target for anticancer therapy. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 73–82, 2015.
- 24 STANTON, R. A. et al. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. **Medicinal Research Reviews**, v. 31, n. 3, p. 443–481, 2011.
- 25 MAGALHAES, L. G.; FERREIRA, L. L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v. 90, n. 1, p. 1233-1250, 2018.
- 26 SCHIFF, P. B.; FANT, J.; HORWITZ, S. B. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. **Nature Letters**, v. 277, n. 22, p. 665–667, 1979.
- 27 HIMES, R. H. Interactions of the catharanthus (vinca) alkaloids with tubulin and microtubules. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 51, p. 257–267, 1991.
- 28 XI, J. et al. Development of a novel class of tubulin inhibitors with promising anticancer activities. **Molecular cancer research**, v. 11, n. 8, p. 856–864, 2013.

29 FURST, R.; VOLLMAR, A. M. A new perspective on old drugs: Non-mitotic actions of tubulin-binding drugs play a major role in cancer treatment. **Pharmazie**, v. 68, n. 7, p. 478–483, 2013.

30 KAUR, R. et al. Recent developments in tubulin polymerization inhibitors: An overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 89–124, 2014.

31 PENNA, L. S.; HENRIQUES, J. A. P.; BONATTO, D. Anti-mitotic agents: Are they emerging molecules for cancer treatment? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 173, p. 67–82, 2017.

32 ATHULURI-DIVAKAR, S. K. et al. A Small molecule RAS-mimetic disrupts RAS association with effector proteins to block signaling. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 643–655, 2016.

33 JOST, M. et al. Combined CRISPRi/a-based chemical genetic screens reveal that rigosertib is a microtubule-destabilizing agent. **Molecular Cell**, v. 68, n. 1, p. 210–223, 2017.

34 MUKHTAR, E.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, v.13, n. 2, p. 275–285, 2014.

35 MILLER, J. H. et al. Marine invertebrate natural products that target microtubules. **Journal of Natural Products**, v. 81, n. 3, p. 691–702, 2018.

36 MITCHISON, T. J. The proliferation rate paradox in antimetabolic chemotherapy. **Molecular Biology of the Cell**, v. 23, n. 1, p. 1–6, 2012.

37 COLLEY, H. E. et al. An orally bioavailable, indole-3-glyoxylamide based series of tubulin polymerization inhibitors showing tumor growth inhibition in a mouse xenograft model of head and neck cancer. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 23, p. 9309–9333, 2015.

38 SIEMANN, D. W.; CHAPLIN, D. J.; HORSMAN, M. R. Vascular-targeting therapies for treatment of malignant disease. **Cancer**, v. 100, n. 12, p. 2491–2499, 2004.

39 OGDEN, A. et al. Interphase microtubules: Chief casualties in the war on cancer? **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 7, p. 824–829, 2014.

40 RAVELLI, R. B. et al. Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. **Nature**, v. 428, n. 6979, p. 198–202, 2004.

41 WELLS, A. et al. Targeting tumor cell motility as a strategy against invasion and metastasis. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 5, p. 283–289, 2013.

42 ECKHARDT, B. L. et al. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 6, p. 479–497, 2012.

43 JOY, M. E. et al. A high-content, multiplexed screen in human breast cancer cells identifies profilin-1 inducers with anti-migratory activities. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e88350, 2014.

44 DEAKIN, N. O.; TURNER, C. E. Paxillin inhibits HDAC6 to regulate microtubule acetylation, Golgi structure, and polarized migration. **Journal of Cell Biology**, v. 206, n. 3, p. 395–413, 2014.

45 SMALL, J. V. et al. How do microtubules guide migrating cells? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 957–964, 2002.

46 STENGEL, C. et al. Class III B-tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 2, p. 316–324, 2010.

47 DU, J. et al. Overexpression of class III β -tubulin, sox2, and nuclear Survivin is predictive of taxane resistance in patients with stage III ovarian epithelial cancer. **BMC Cancer**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2015.

48 DURAN, G. E. et al. Mechanisms of Resistance to Cabazitaxel. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 1, p. 193–202, 2015.

49 SIRAJUDDIN, M.; RICE, L. M.; VALE, R. D. Regulation of microtubule motors by tubulin isoforms and post-translational modifications. **Nature Cell Biology**, v. 16, n. 4, p. 335–344, 2014.

50 WIENECKE, A.; BACHER, G. Indibulin, a novel microtubule inhibitor, discriminates between mature neuronal and nonneuronal tubulin. **Cancer Research**, v. 69, n. 1, p. 171–177, 2009.

51 MAGALHAES, L. G. **Identificação e caracterização de novos agentes com propriedades anticâncer**. 2014. 120 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

52 PEREZ, E. A. Microtubule inhibitors: differentiating tubulin-inhibiting agents based on mechanisms of action, clinical activity, and resistance. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 8, p. 2086–2095, 2009.

53 LI, L. et al. Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 482–494, 2018. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.04.011.

54 KUMAR, A.; SHARMA, P. R.; MONDHE, D. M. Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview. **Anti-Cancer Drugs**, v. 28, n. 3, p. 250–262, 2016.

55 DIMASI, J. A.; GRABOWSKI, H. G.; HANSEN, R. W. Innovation in the pharmaceutical industry: new estimates of R&D costs. **Journal of Health Economics**, v. 47, n. 1, p. 20–33, 2016.

56 MOFFAT, J. G.; RUDOLPH, J.; BAILEY, D. Phenotypic screening in cancer drug discovery — past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 8, p. 588–602, 2014.

57 TYNDALL, A.; DU, W.; BREDER, C. D. Regulatory watch: the target product profile as a tool for regulatory communication: advantageous but underused. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 156, 2017.

58 COLOMBO, M.; PERETTO, I. Chemistry strategies in early drug discovery: an overview of recent trends. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 15–16, p. 677–684, 2008.

59 ZHONG, H. Editorial (Hot Topic: ADME and Toxicity in Early Drug Discovery). **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 11, p. 1255–1256, 2013.

60 WARING, M. J. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 7, p. 475–486, 2015.

61 SITTAMPALAM, G. S. et al. (Ed.). **Assay guidance manual**. Bethesda: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2018.

62 MERZ, K. M.; RINGE, D.; REYNOLDS, C. (Ed.). **Drug design: structure- and ligand-based approaches**. New York: Cambridge University Press, 2010.

63 HUTCHINSON, L.; KIRK, R. High drug attrition rates-where are we going wrong? **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 4, p. 189–190, 2011.

64 KINCH, M. S. An analysis of FDA-approved drugs for oncology. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 12, p. 1831–1835, 2014.

65 JONES, G. et al. Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. **Journal of Molecular Biology**, v. 267, n. 3, p. 727–748, 1997.

66 BÜRK, R. R. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 2, p. 369–372, 1973.

67 LIANG, C.-C.; PARK, A. Y.; GUAN, J.-L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329–333, 2007.

68 ALBINI, A. et al. A Rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer research**, v. 47, n. 12, p. 3239–3245, 1987.

69 MULLIGAN, J. M. et al. Identification of tubulin as the molecular target of proapoptotic pyrrolo-1,5-benzoxazepines. **Molecular Pharmacology**, v. 70, n. 1, p. 60–70, 2006.

70 ISAACS, J. T. The long and winding road for the development of tasquinimod as an oral second-generation quinoline-3-carboxamide antiangiogenic drug for the treatment of prostate cancer. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 19, n. 10, p. 1235–1243, 2010.

71 TOZER, G. M.; KANTHOU, C.; BAGULEY, B. C. Disrupting tumour blood vessels. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 6, p. 423–435, 2005.

72 POLLI, J. W. et al. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 2, p. 620–628, 2001.

73 HOELKE, B. et al. Comparison of nephelometric , UV-spectroscopic , and HPLC methods for high-throughput determination of aqueous drug solubility in microtiter plates. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 8, p. 3165–3172, 2009.

74 CAMURRI, G.; ZARAMELLA, A. High-throughput liquid chromatography / mass spectrometry method for the determination of the chromatographic hydrophobicity index. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 15, p. 3716–3722, 2001.

75 VALKO, K. et al. Fast gradient HPLC method to determine compounds binding to human serum albumin . relationships with octanol / water and immobilized artificial membrane lipophilicity. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 11, p. 2236–2248, 2003.

76 KERNS E. H.; DI L. (Ed.). **Drug-like properties: concepts, structure design and methods**. Cambridge: Academic Press, 2008.

77 ARIAS I. M. et al (Ed.). **The Liver: biology and pathology**. 2nd ed. New York: Raven Press, 1988.

78 MAGALHAES, L. G. et al. Discovery of a series of acridinones as mechanism-based tubulin assembly inhibitors with anticancer activity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160842, 2016.

79 CRUCIANI, G. et al. MetaSite: understanding metabolism in human cytochromes from the perspective of the chemist. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 22, p. 6970–6979, 2005.

80 HANN, M. M.; KESERÜ, G. M. Finding the sweet spot: the role of nature and nurture in medicinal chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, n. 5, p. 355–365, 2012.

81 DESAI, P. V.; RAUB, T. J.; BLANCO, M. J. How hydrogen bonds impact P-glycoprotein transport and permeability. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 21, p. 6540–6548, 2012.

82 LU, C. et al. Increased α -tubulin1b expression indicates poor prognosis and resistance to chemotherapy in hepatocellular carcinoma. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 58, n. 9, p. 2713–2720, 2013.

83 KANOJIA, D. et al. β III-Tubulin regulates breast cancer metastases to the brain. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 14, n. 5, p. 1152–1161, 2015.

84 BROOKS, W. H.; GUIDA, W. C.; DANIEL, K. G. The significance of chirality in drug design and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 7, p. 760–770, 2011.

85 ZHANG, Y. et al. Enantioselective chromatography in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 8, p. 571–577, 2005.

86 MORO, A.; INVERNIZZI, N. A tragédia da talidomida: a luta pelos direitos das vítimas e por melhor regulação de medicamentos. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 24, n. 3, p. 603–622, 2017.

87 FABRO, S.; SMITH, R. L.; S.; WILLIAMS, R. T. Toxicity and teratogenicity of optical isomers of thalidomide. **Nature**, v. 215, p. 296, 1967. doi: 10.1038/215296a0.

88 LAMAA, D. et al. Design and synthesis of tubulin and histone deacetylase inhibitor based on iso-combretastatin A-4. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 61, n. 15, p. 6574–6591, 2018.

89 WU, Y. W. et al. A novel dual HDAC6 and tubulin inhibitor, MPT0B451, displays anti-tumor ability in human cancer cells in vitro and in vivo. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p. 1–16, 2018.

90 ISHIKAWA, M.; HASHIMOTO, Y. Improvement in aqueous solubility in small molecule drug discovery programs by disruption of molecular planarity and symmetry. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, n.6, p. 1539–1554, 2011.

91 STEGEMANN, S. et al. When poor solubility becomes an issue: From early stage to proof of concept. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 31, n. 5, p. 249–261, 2007.

92 AMIDON, G. L. et al. A Theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 413–420, 1995.

93 DI, L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 379–393, 2014.

94 CYPROTEX. **Guides: ADME**. Disponível em: <<https://www.cyprotex.com/guides>>. Acesso em: 10 dez. 2018.

95 SMITH, D. et al. Clearance in drug design. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, n. 5, p. 2245–2255, 2019.

96 NIES, A. T.; KEPPLER, D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 453, n. 5, p. 643–659, 2007.

97 NEBERT, D. W.; WIKVALL, K.; MILLER, W. L. Human cytochromes P450 in health and disease. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: biological sciences**, v. 368, n. 1612, p. 20120431, 2013.

98 OBACH, R. S. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 1, p. 336–348, 2005.

99 PAULI, I. **Planejamento de inibidores da enzima cruzaina candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Chagas**. 2016. 131 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

100 NETTLETON, D. O.; EINOLF, H. J. Assessment of cytochrome P450 enzyme inhibition and inactivation in drug discovery and development. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 4, p. 382–403, 2011.

101 NARASIMHULU, S. New cytochrome P450 mechanisms: implications for understanding molecular basis for drug toxicity at the level of the cytochrome. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2010.

102 SONG, J. H. et al. Inhibition of CYP3A4 and CYP2C9 by podophyllotoxin: implication for clinical drug-drug interactions. **Journal of Biosciences**, v. 36, n. 5, p. 879–885, 2011.

103 BARNABA, C. et al. Mechanism-based inhibition of CYP3A4 by podophyllotoxin: aging of an intermediate is important for in vitro/in vivo correlations. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 2833–2843, 2016.

APÊNDICE A – Controle de qualidade dos compostos

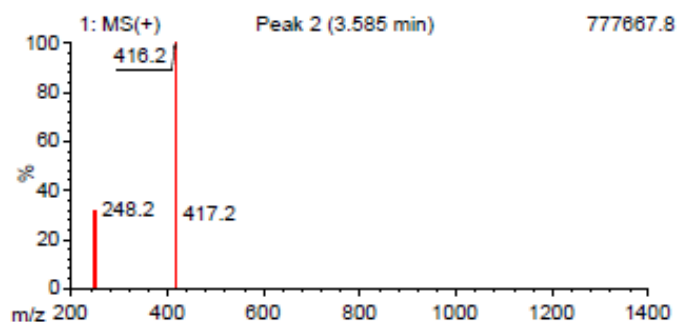
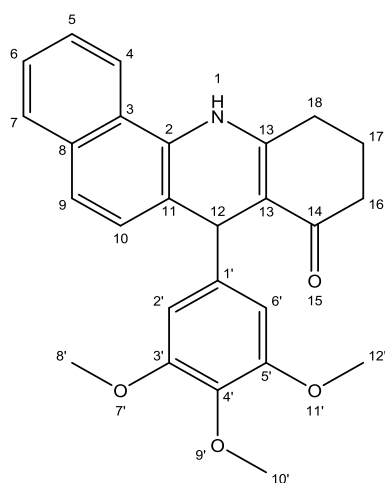
Métodos

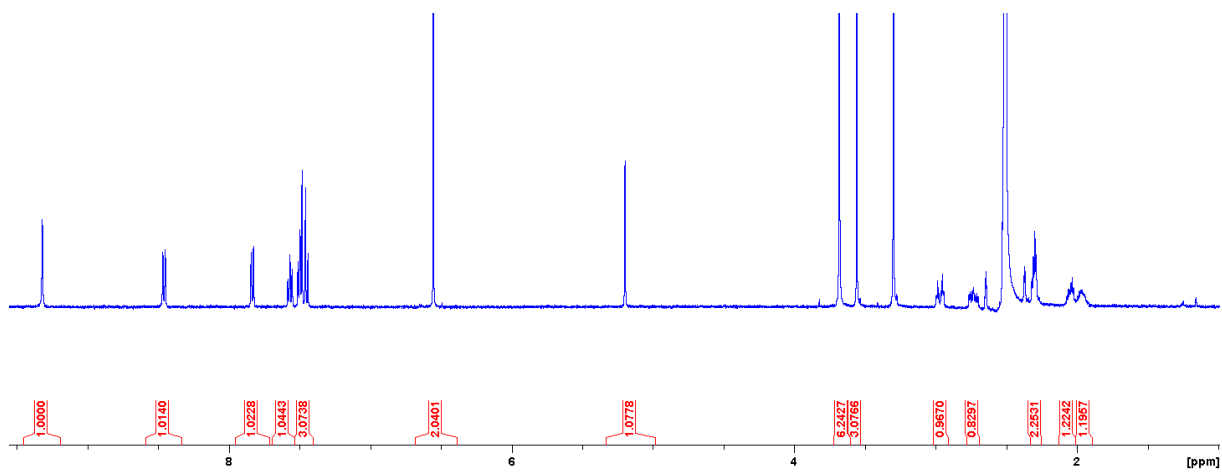
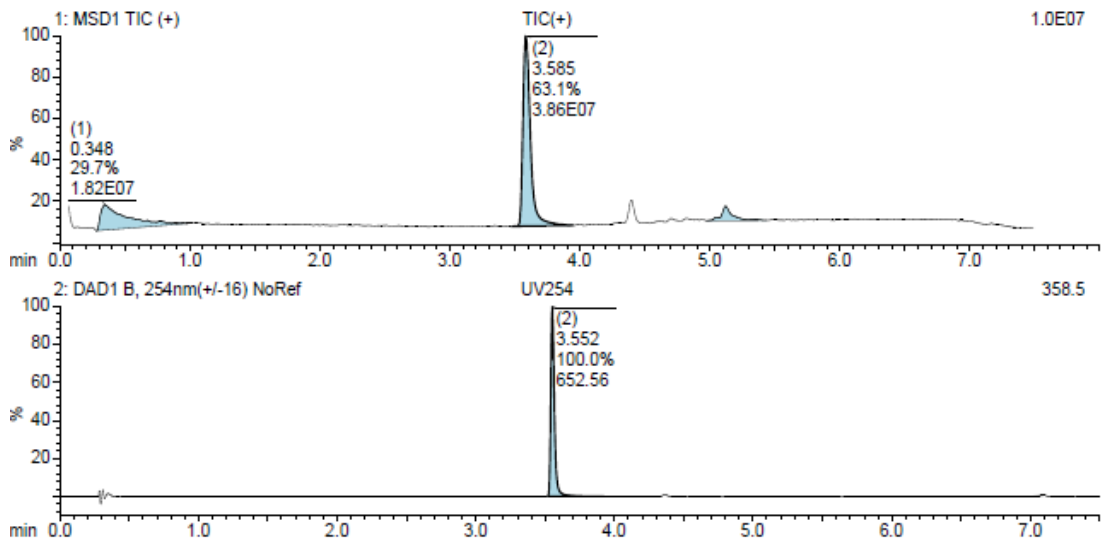
A análise da pureza por LCMS e separação cromatográfica foram realizadas em um Agilent Technologies 6130 quadrupolo LC/MS conectado a um detector DAD Agilent. A coluna empregada foi uma Waters XBridge (50 mm × 2.1 mm, 3.5 µm partícula) ou Waters XSelect (30mm x 2.1 mm, 2.5 µm partícula). Os compostos foram eluídos com um gradiente 5–95% acetonitrila/água + 0,1% ácido fórmico.

Os espectros de RMN foram gerados em um espectrometro Bruker Avance DPX 500 (1H a 500 MHz e 13C a 125 MHz) utilizando *tuning* e *matching* automáticos. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em ppm, o solvente residual foi utilizado como referência em todos os casos. O desdobramento dos sinais são descritos como singletos (s), dubletos (d), tripletos (t), quartetos (q), multipletos (m), *broad* (br), ou uma combinação destes. As constantes de acoplamentos (J) foram expressas em Hz.

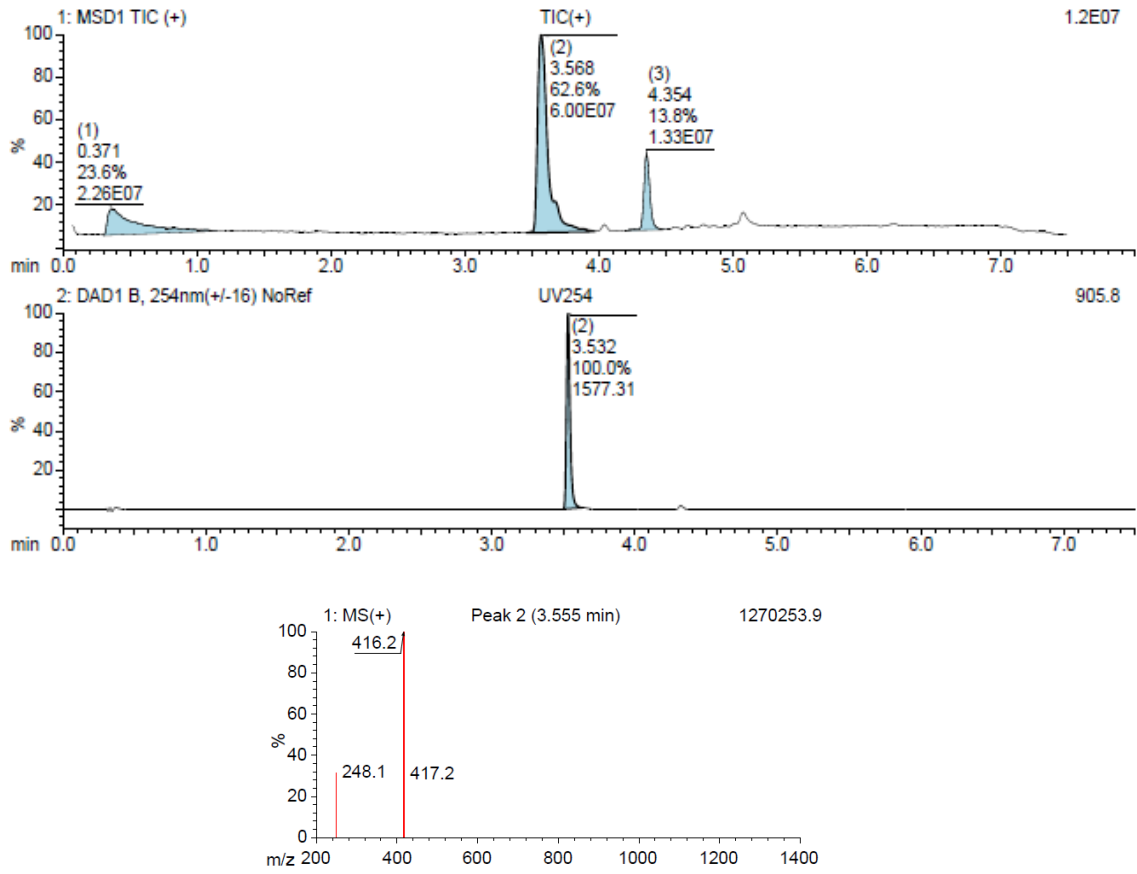
Resultados

1

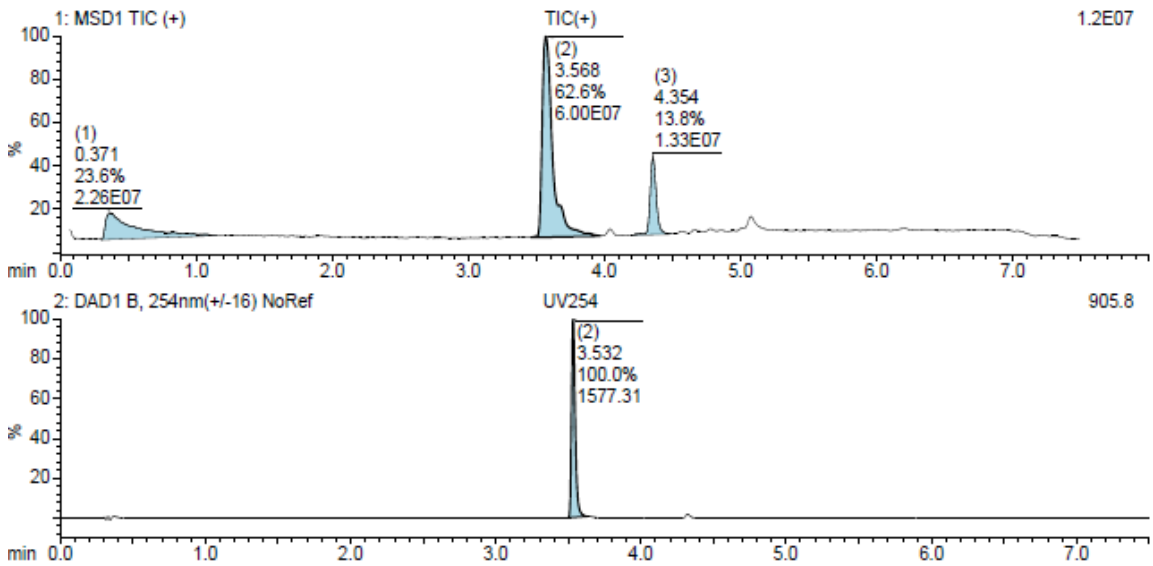




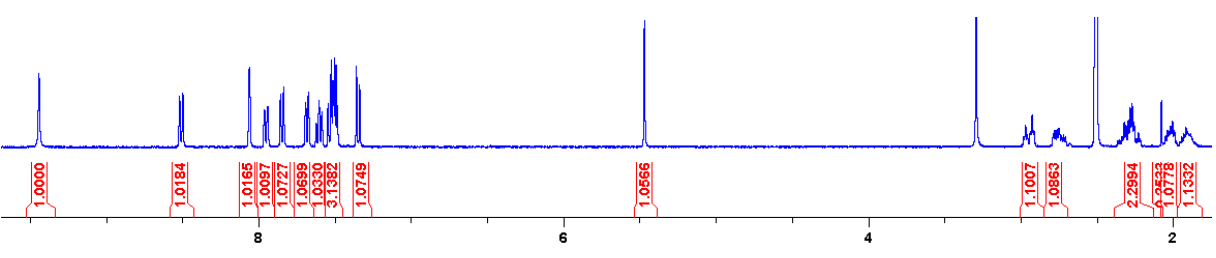
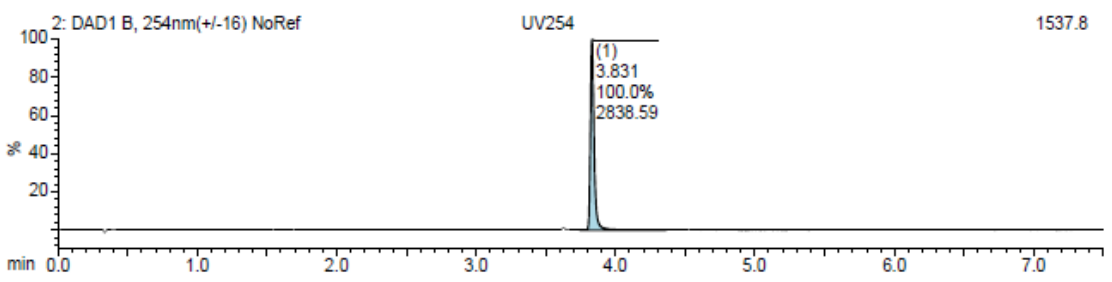
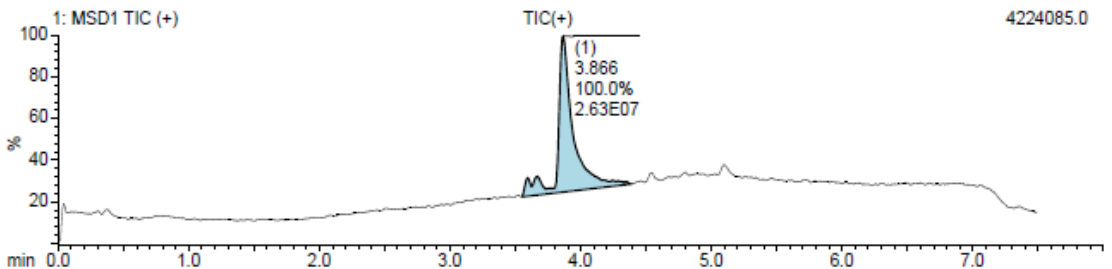
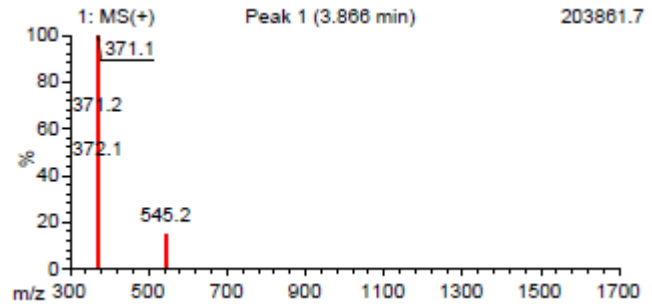
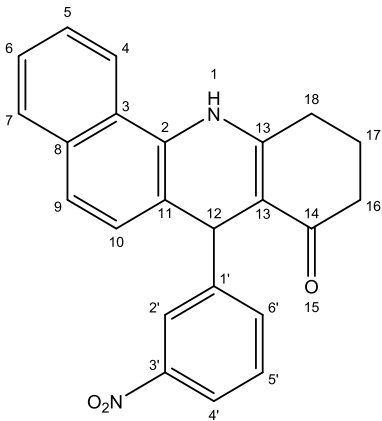
1a



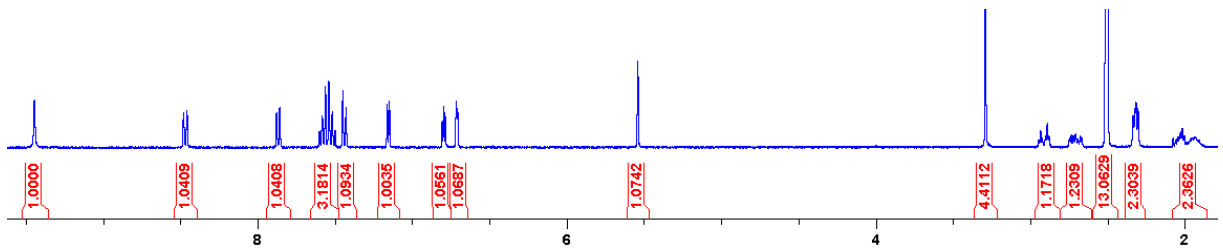
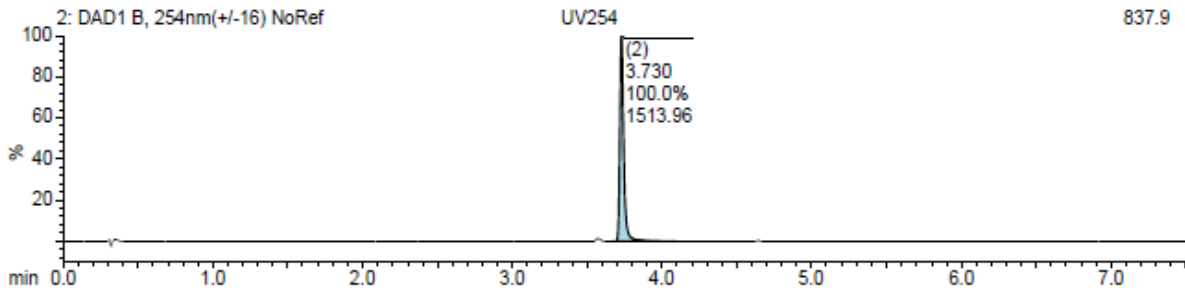
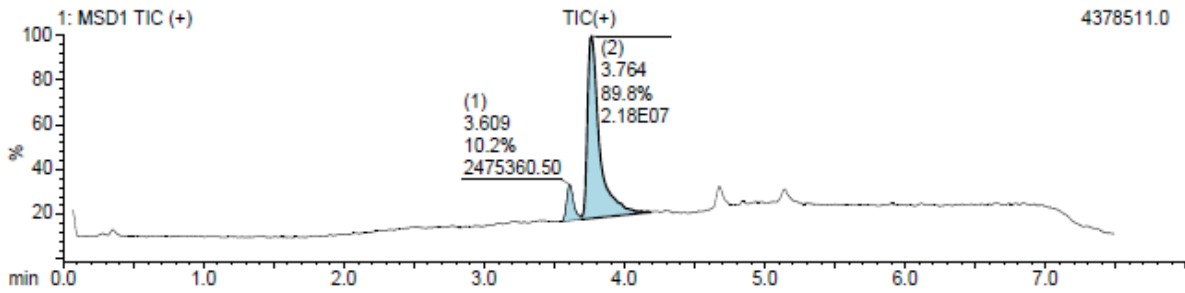
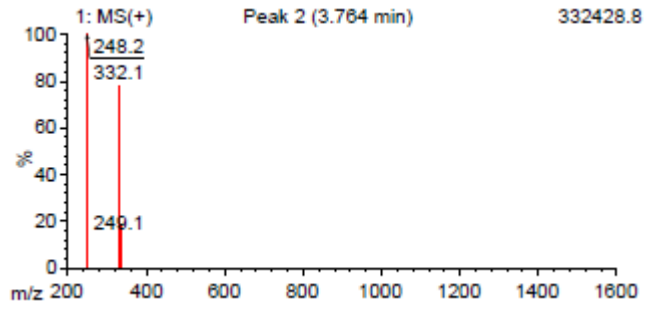
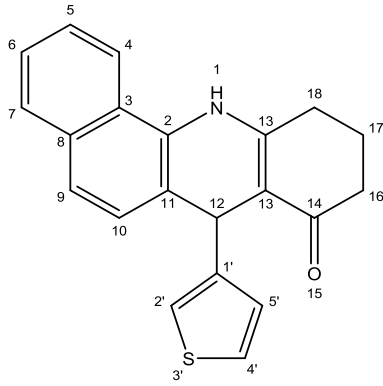
1b



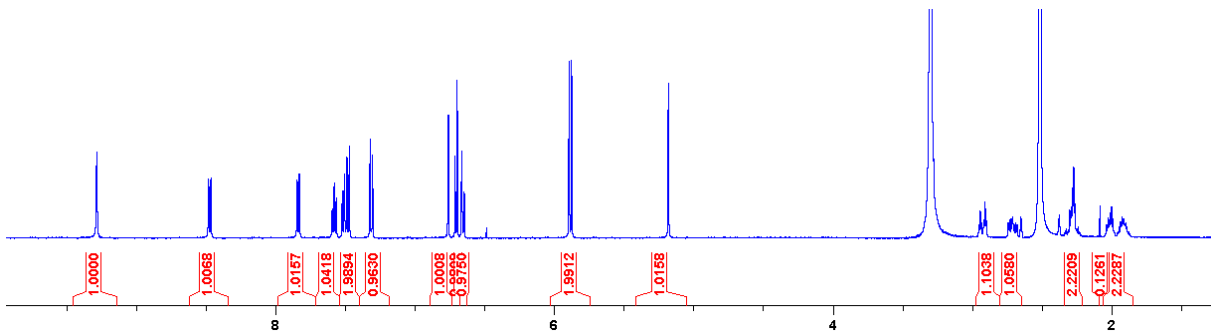
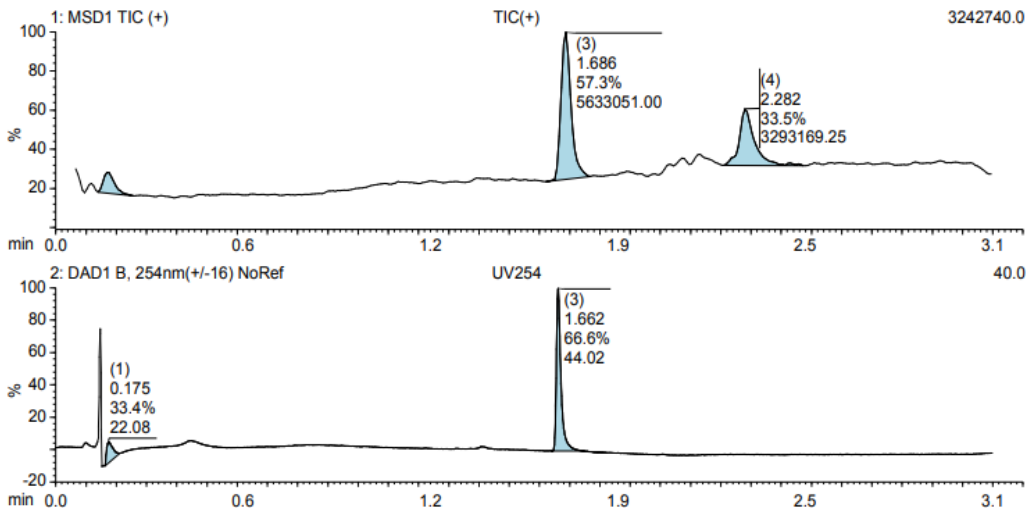
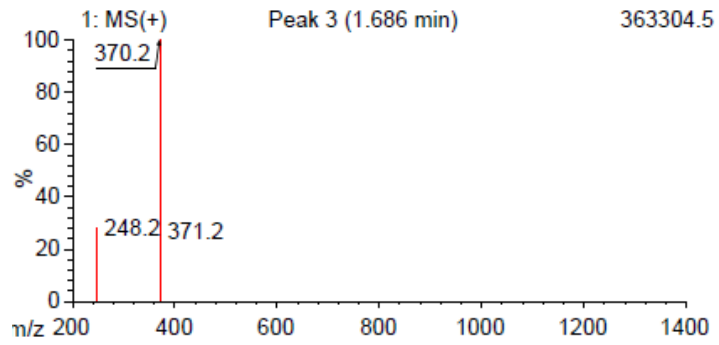
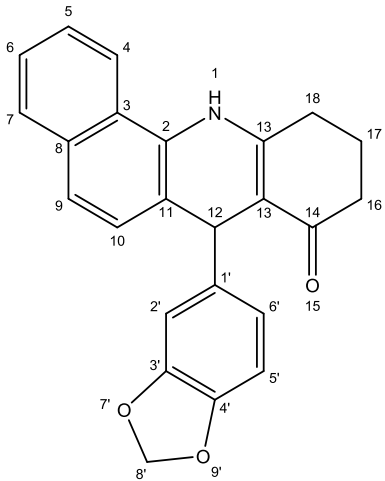
2

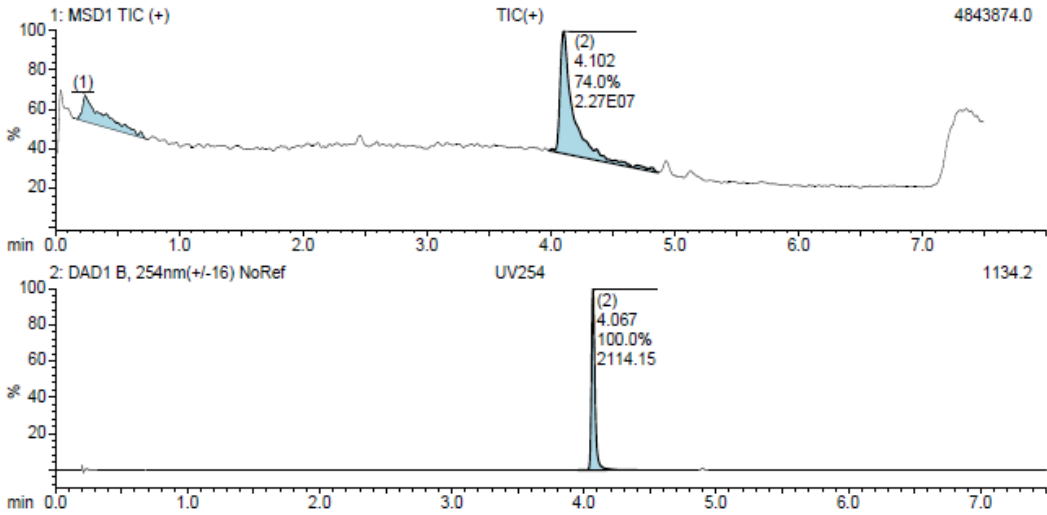
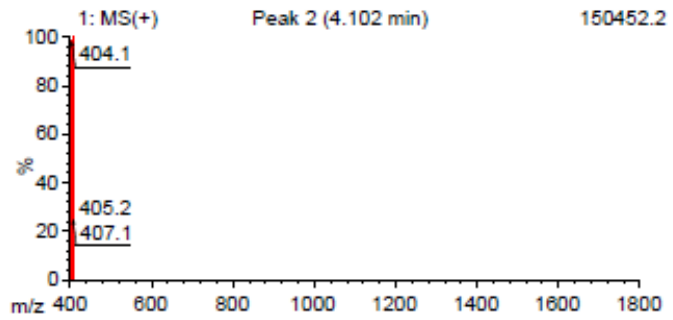
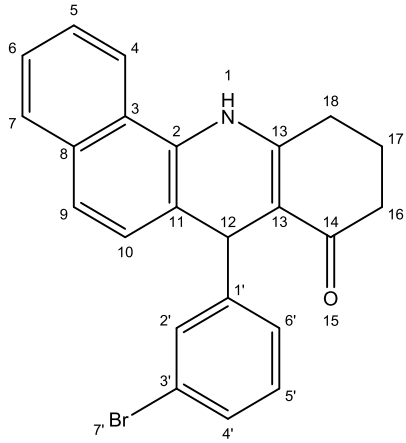


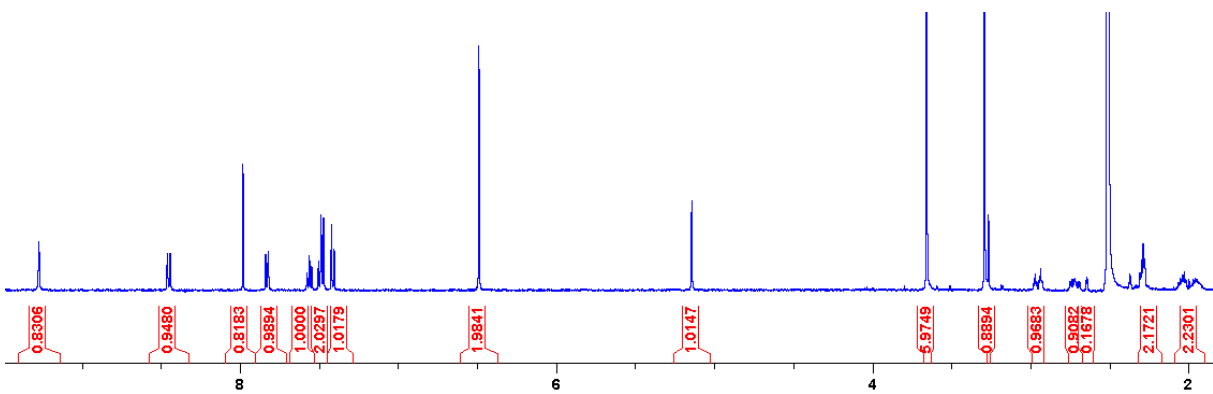
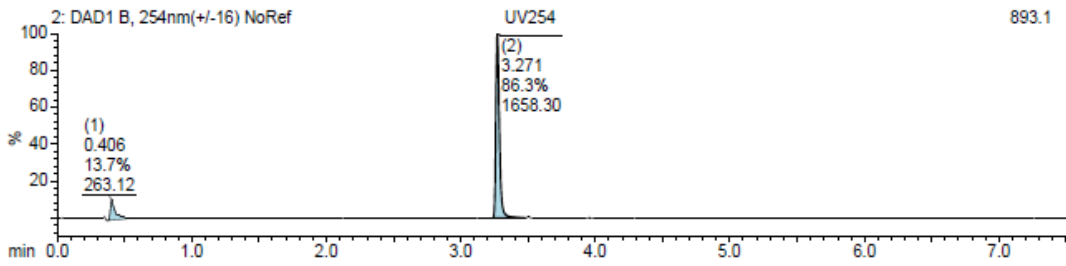
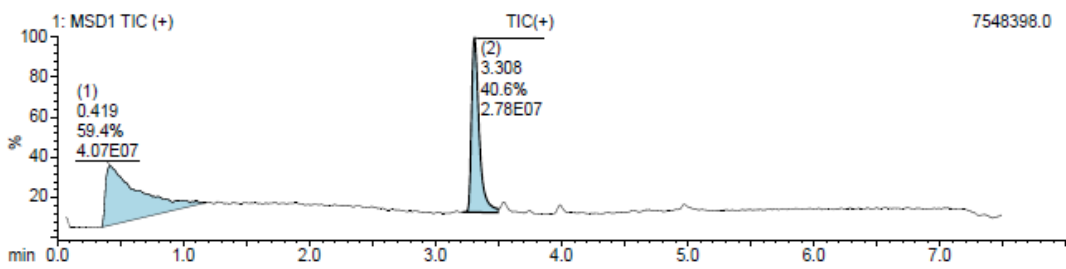
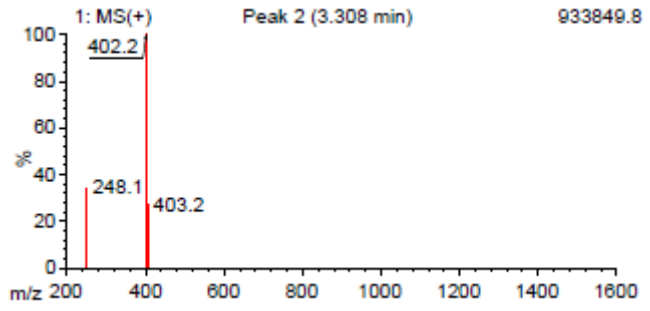
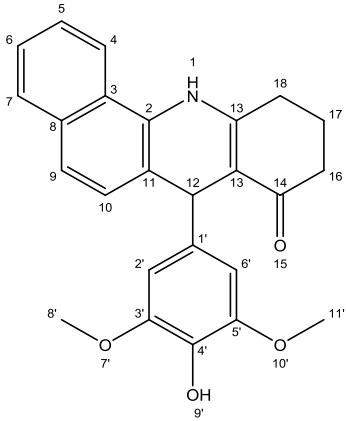
3

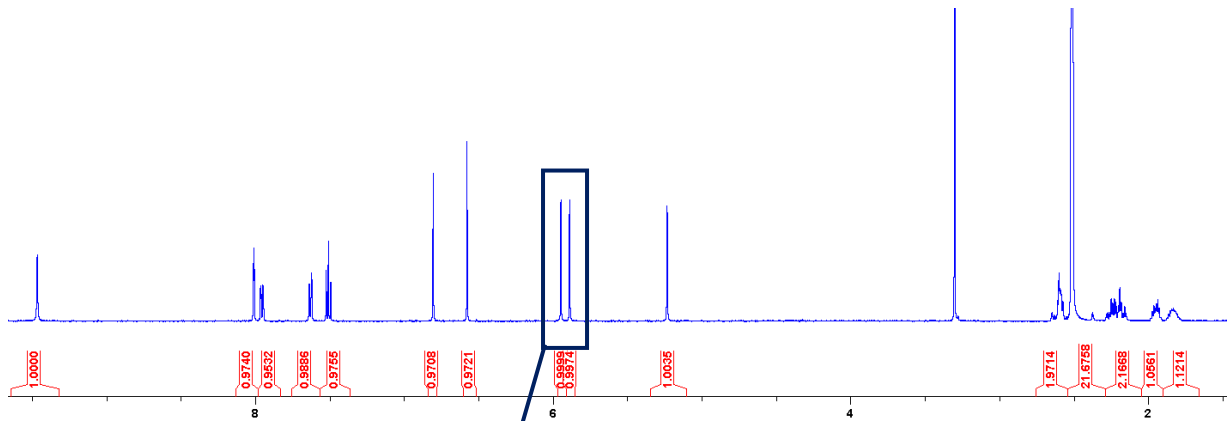
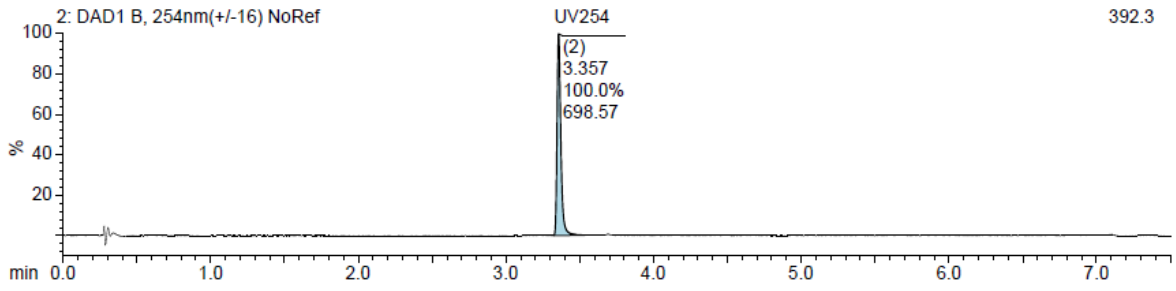
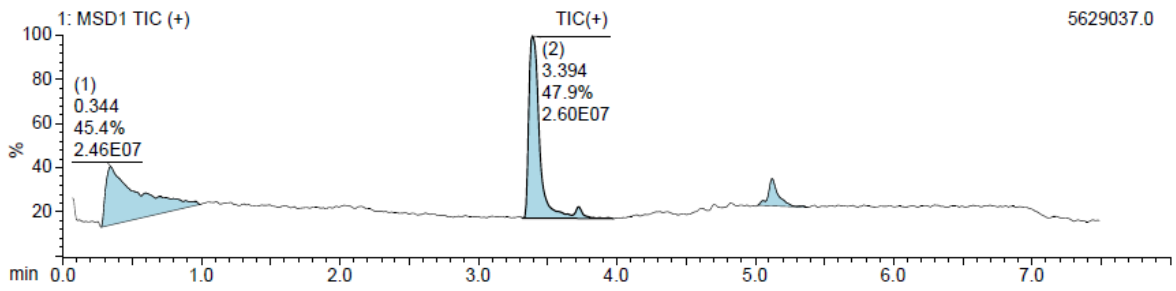
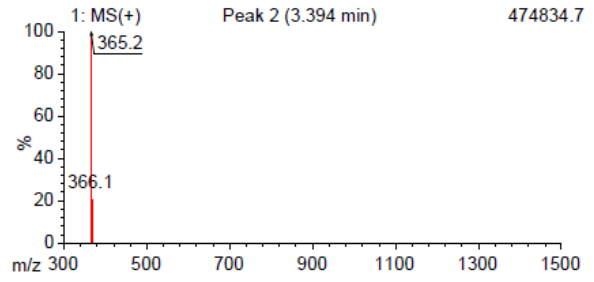
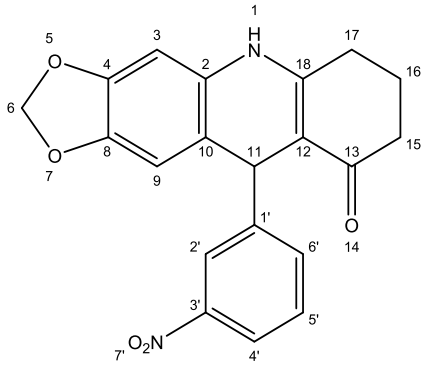


4



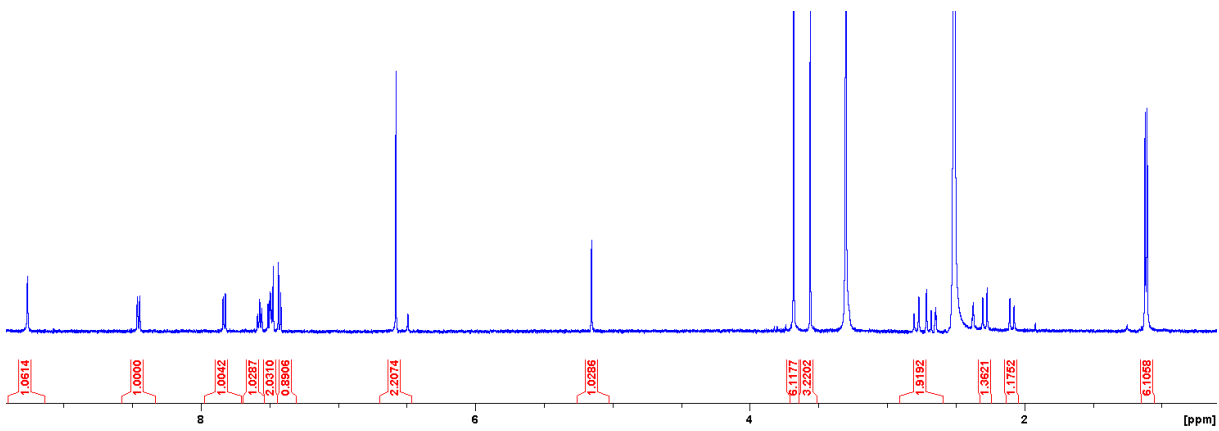
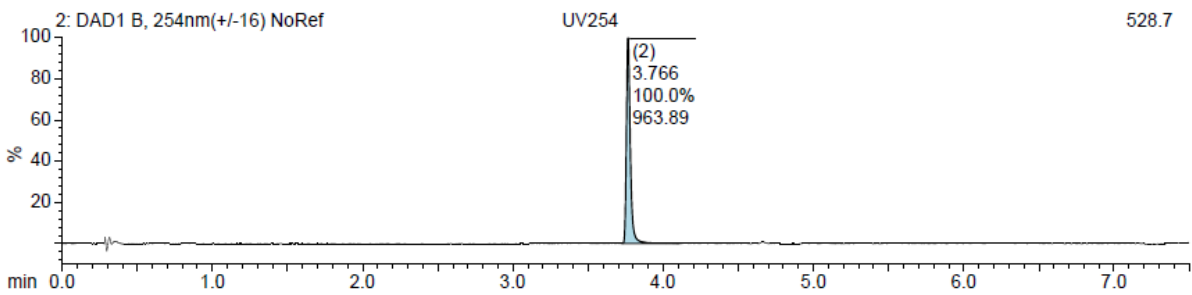
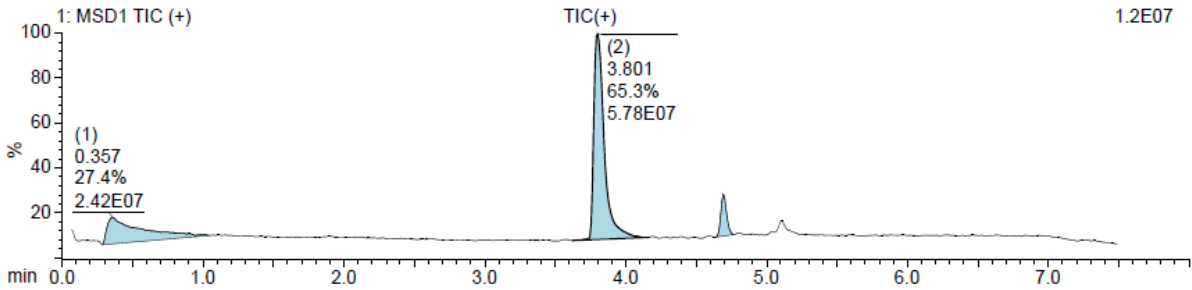
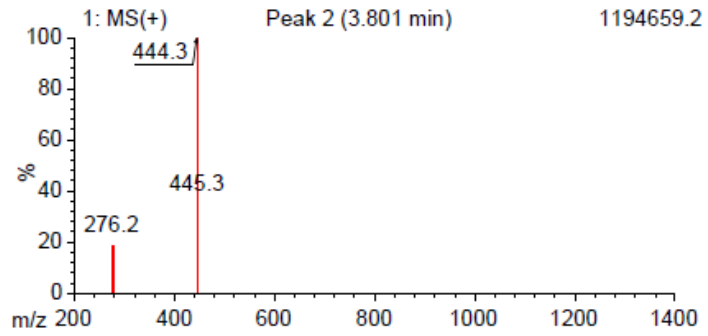
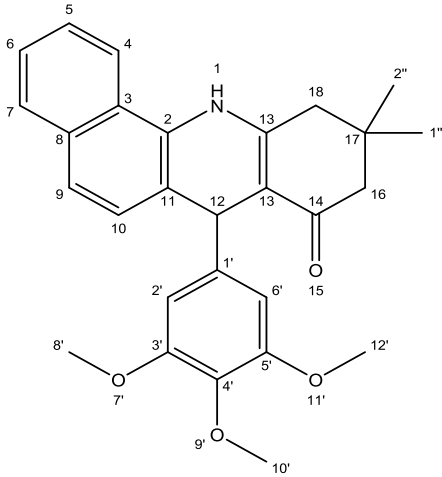






CH₂ confirmado por HSCQ





ANEXO A – Determinação da configuração absoluta dos enantiômeros puros

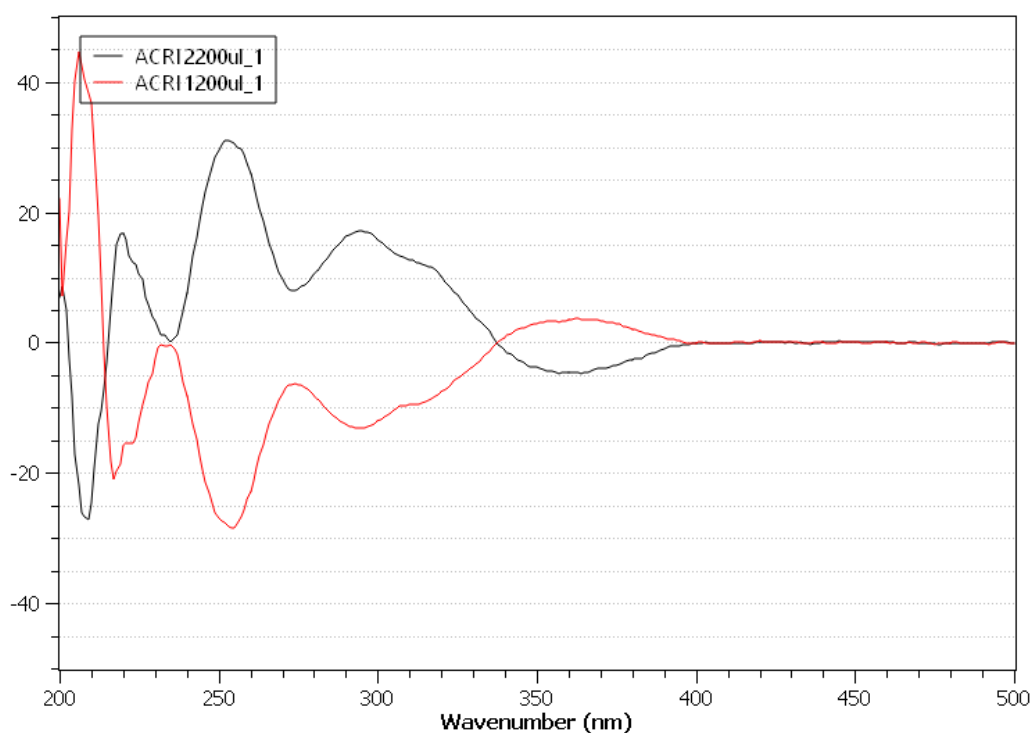
Métodos

O equipamento utilizado foi Jasco J-815 CD Spectrometer, com termostato acoplado. O software utilizado foi o SpectraManager. Utilizou-se cubeta de quartzo 1,0 x 1,0 e 3 mL de volume. Todos os solventes utilizados foram de grau espectroscópico.

Preparo de amostra: 2,15mg de amostra de cada enantiômero foi solubilizada em 4mL de etanol e 1mL de isopropanol. Levou-se ao aquecimento em banho com água a cerca de 50°C com agitação de 5 em 5 minutos. O aquecimento se deu por cerca de uma hora. Deixou-se as soluções chegarem a temperatura ambiente e levou-se ao equipamento de dicroísmo.

Foi realizada uma análise previa para determinar a linha de base utilizando somente etanol (aproximadamente 2,8mL) na cubeta. Posteriormente, fizeram-se as análises de cada solução separadamente utilizando 200µL da solução, e completando a cubeta com etanol.

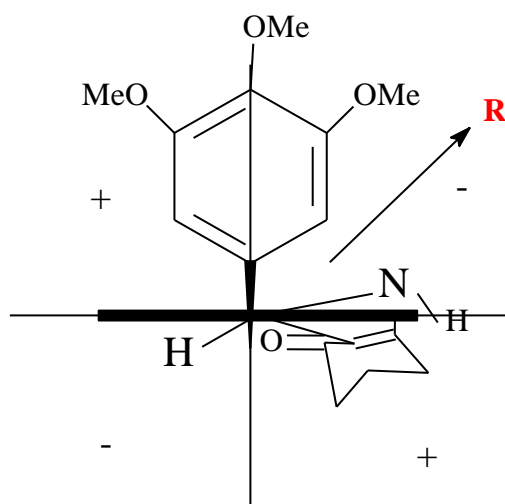
Resultados



Os dados foram obtidos e os espectros correspondentes aos dois enantiômeros foram plotados juntos. Pode-se observar uma boa semelhança nos perfis das bandas dos dois enantiômeros, sendo o efeito Cotton contrário como se é esperado para enantiômeros.

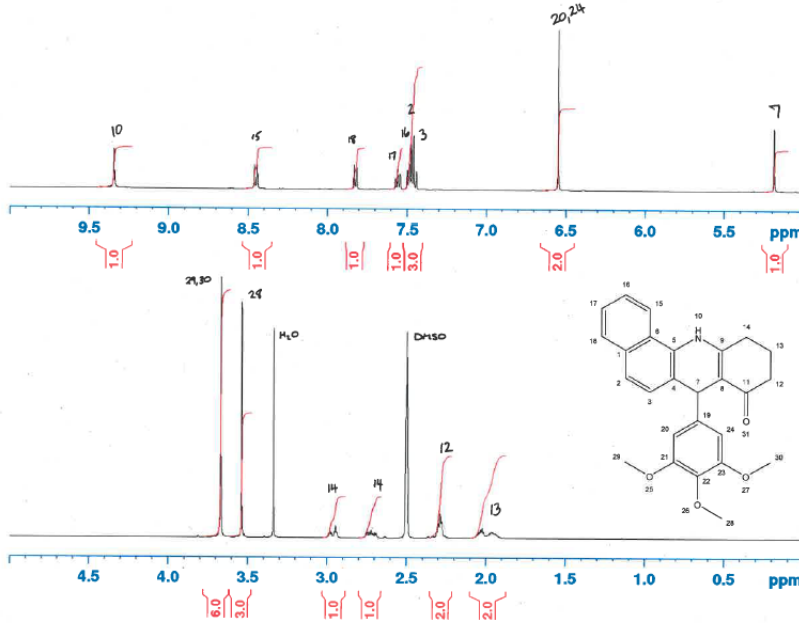
O comprimento de onda que gera a banda maior intensidade é 254 nm, portanto, essa foi a banda utilizada para analisar a diferença de efeito Cotton nos dois enantiômeros. A primeira acridinona analisada tem efeito Cotton negativo e a segunda acridinona analisada tem efeito Cotton negativo.

Seguindo a regra do quartante para aromáticos descrita por De Angelis e Wildman (1969), considerou-se o anel naftalênico como o plano A, pois é o cromóforo com maior planaridade, rigidez e tem o efeito Cotton mais significativos, uma vez que as partes das moléculas estão mais distantes dos planos, e considerou-se o anel benzênico trimetoxilado como o plano B. Pode-se observar que, quando utiliza-se o enantiômero R, a maior porção da molécula que se encontra longe do plano (enona), está no quadrante a direita e pra baixo, ou seja, um quadrante positivo, o que indica que esse enantiômero tem uma maior contribuição para o efeito Cotton é positivo, logo, no espectro de dicroísmo, a banda mais significativa terá o aspecto positivo (enantiômero 2). Quando se analisa o enantiômero S, o efeito Cotton é mais significativo no quadrante negativo, logo, no dicroísmo, ele é o que tem a banda mais significativa com aspecto negativo (enantiômero 1).



ANEXO B – Estrutura do metabólito reduzido do composto 1

ACR14 3.5 mg in DMSO d-6



UNIVERSITY OF DUNDEE

Current Data Parameters
 NAME ACR14
 EXPNO 30
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180627
 Time 14.54
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm CPQCI 1H/
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.276799 sec
 RG 63.01
 DW 50.000 usec
 DE 10.00 usec
 TE 293.1 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

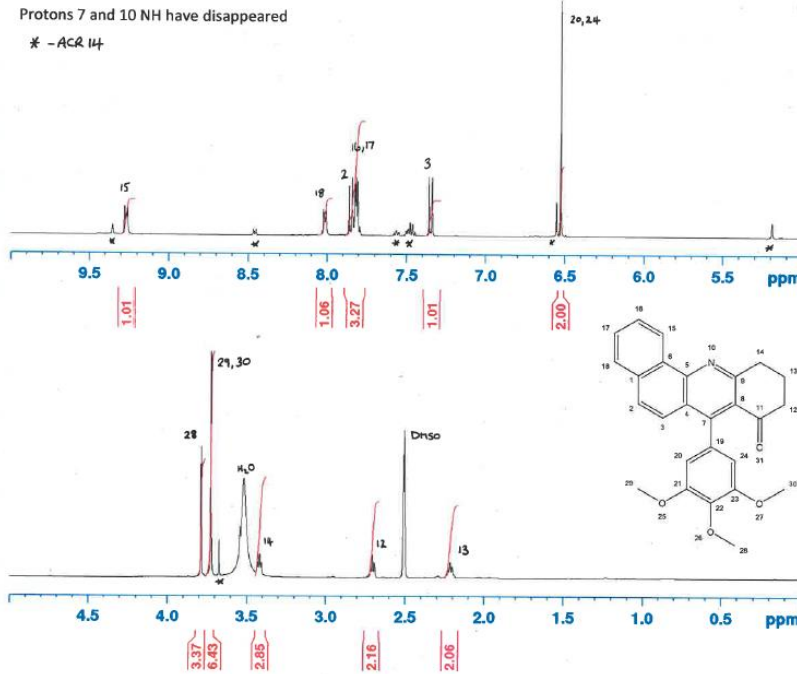
CHANNEL f1 -----
 SF01 500.1330885 MHz
 NUC1 1H
 P1 11.00 usec
 PLW1 5.1999981 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 500.1300040 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 FC 1.00

ACR14 3.5 mg in DMSO d-6

Decomposition Product

Protons 7 and 10 NH have disappeared
 * -ACR 14



UNIVERSITY OF DUNDEE

Current Data Parameters
 NAME ACR14
 EXPNO 90
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180827
 Time 11.41
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm CPQCI 1H/
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT DMSO
 NS 16
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.276799 sec
 RG 63.01
 DW 50.000 usec
 DE 10.00 usec
 TE 293.2 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

CHANNEL f1 -----
 SF01 500.1330885 MHz
 NUC1 1H
 P1 11.00 usec
 PLW1 5.1999981 W

F2 - Processing parameters
 SI 131072
 SF 500.1300000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 FC 1.00

ANEXO C – Determinação da pureza para administração *in vivo* e análise da dose administrada iv

Estimativa de pureza do composto 1

Procedimento

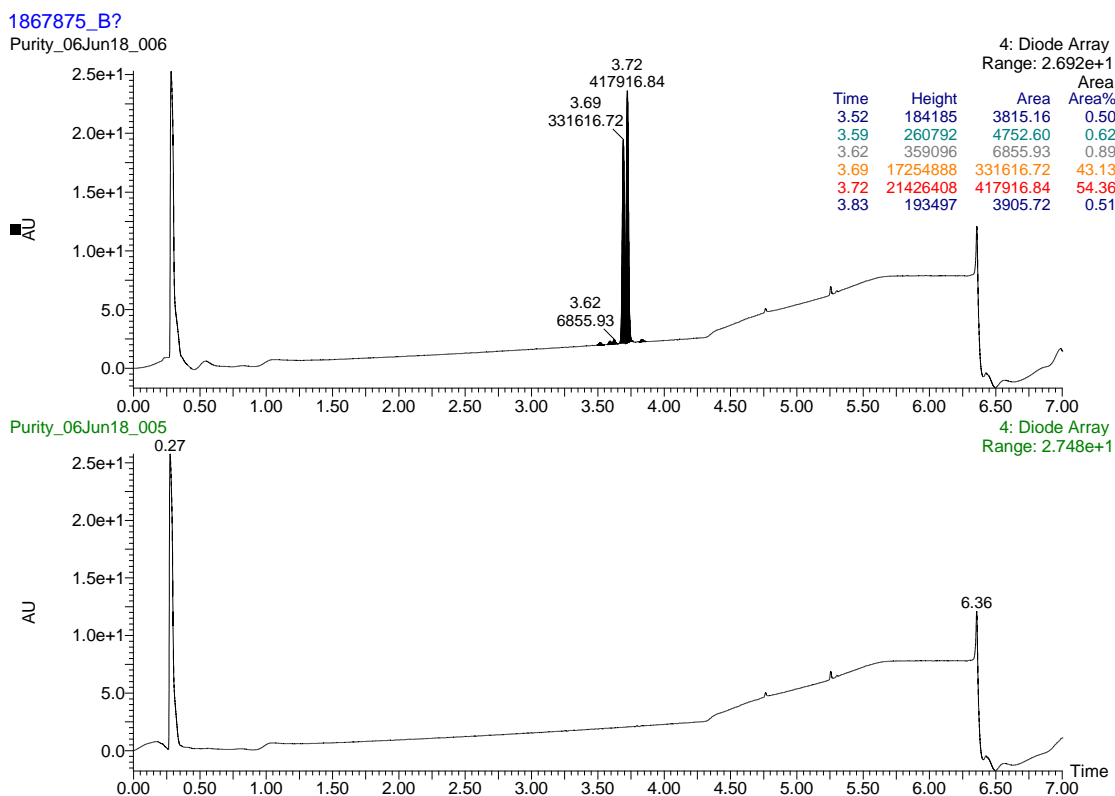
1.0 mg de compost foi dissolvido em 1 mL de DMSO, 50 μ L desta solução foi então diluída em 1 mL de ACN/H₂O (50/50), resultando em uma concentração de 50 μ g/mL. 1 μ L de amostra foi injetado no Sistema UPLC-MS/MS para determinação da massa exata e estimativa da pureza por UV.

Resultados

Para determinar a pureza por UV, medidas foram realizadas no espectro $\lambda = 210-400$ nm, e nos comprimentos de onda $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 275$ nm e comparadas a uma solução de solvente puro..

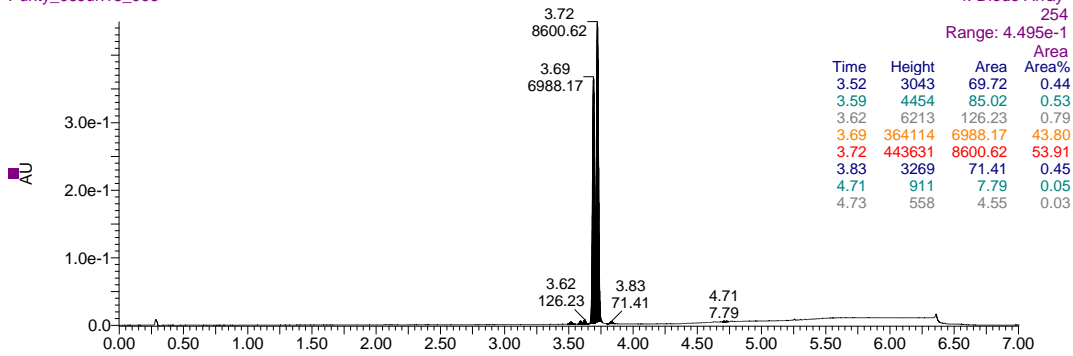
Cromatogramas para o composto e solvente. a) *Diode Array* b) $\lambda = 254$ nm and c) $\lambda = 275$ nm

a)

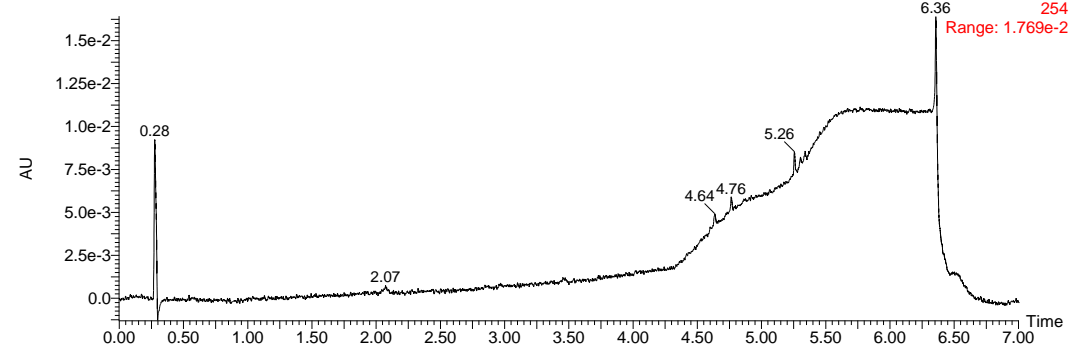


b)

1867875_B?
Purity_06Jun18_006

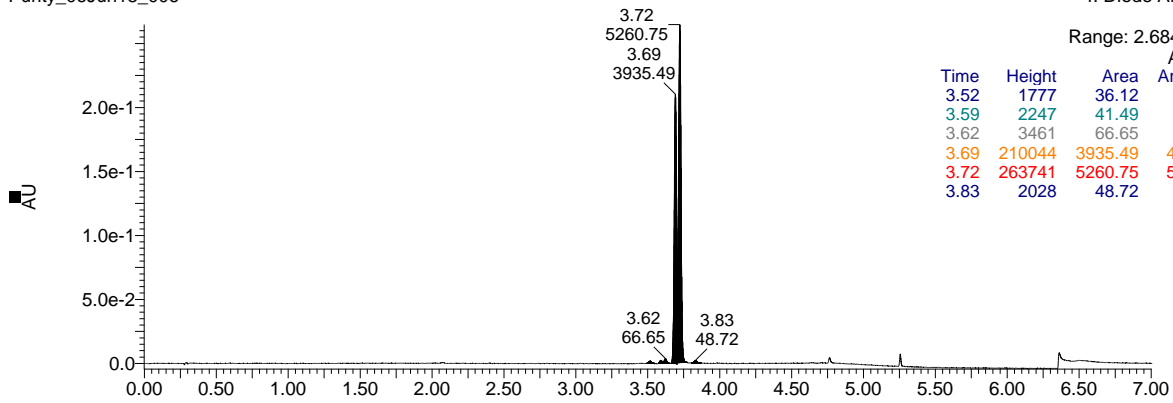


Purity_06Jun18_005

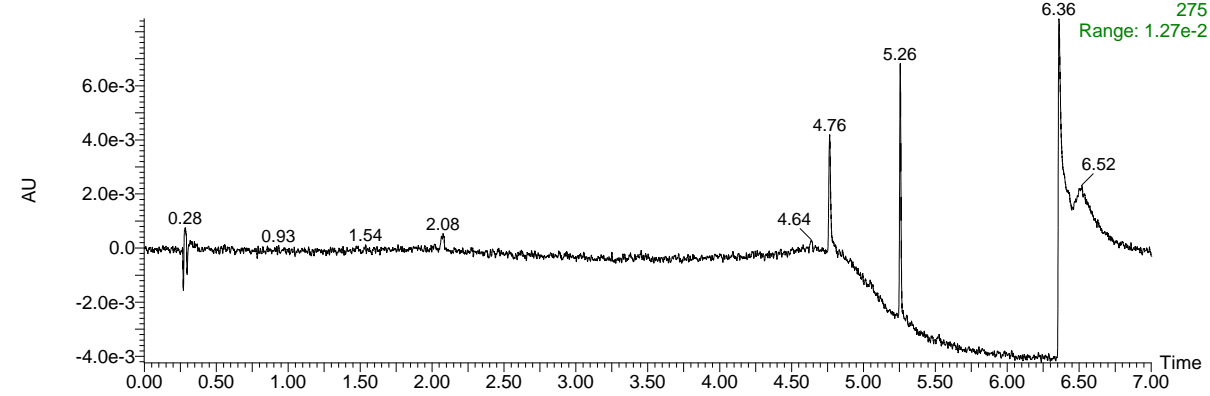


c)

1867875_B?
Purity_06Jun18_006



Purity_06Jun18_005

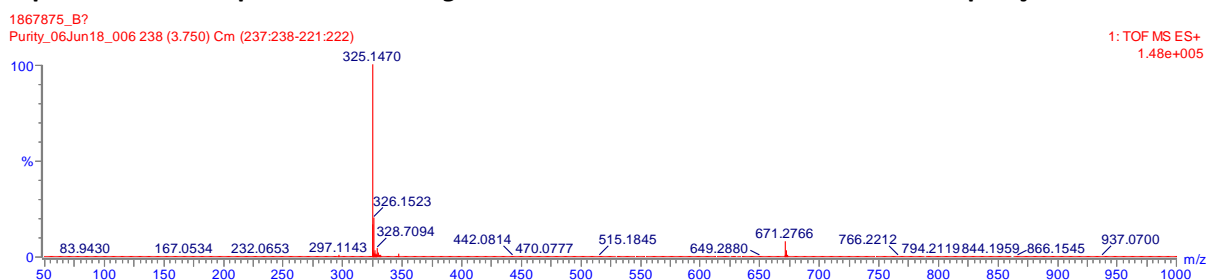


Pureza estimada baseada nas medidas UV

	RT min	Altura do pico	Area do pico	% of Area total do pico
Diode Array	3,52	184185	3815	0,5
	3,59	260792	4753	0,6
	3,62	359096	6856	0,9
	3,69	17254888	331617	43,1
	3,72	21426408	417917	54,4
	3,83	193497	3906	0,5
$\lambda = 254\text{nm}$	3,52	3043	70	0,4
	3,59	4454	85	0,5
	3,62	6213	126	0,8
	3,69	364114	6988	43,8
	3,72	443631	8601	53,9
	3,83	3269	71	0,4
	4,71	911	8	0,0
	4,73	558	5	0,0
$\lambda = 317\text{nm}$	3,52	1777	36	0,4
	3,59	2247	41	0,4
	3,62	3461	67	0,7
	3,69	210044	3935	41,9
	3,72	263741	5261	56,0
	3,83	2028	49	0,5

O composto é uma mistura de diastereoisômeros (approx, 55/45) com uma impureza adicional < 0,5% em RT 3,62,

Espectro do compost com *background* subtraído e resultado de composição elemental.



Mass	Calc, Mass	mDa	PPM	DBE	i-FIT	i-FIT (Norm)	Formula
325,147	325,1476	-0,6	-1,8	7,5	196,2	2,7	C15 H19 N4 O2 F2

Conclusão

O composto corresponde à estrutura proposta e apresenta pureza adequada para dosagem *in vivo*.

Análise de dose administrada PK2018-025_CR14

Procedimento

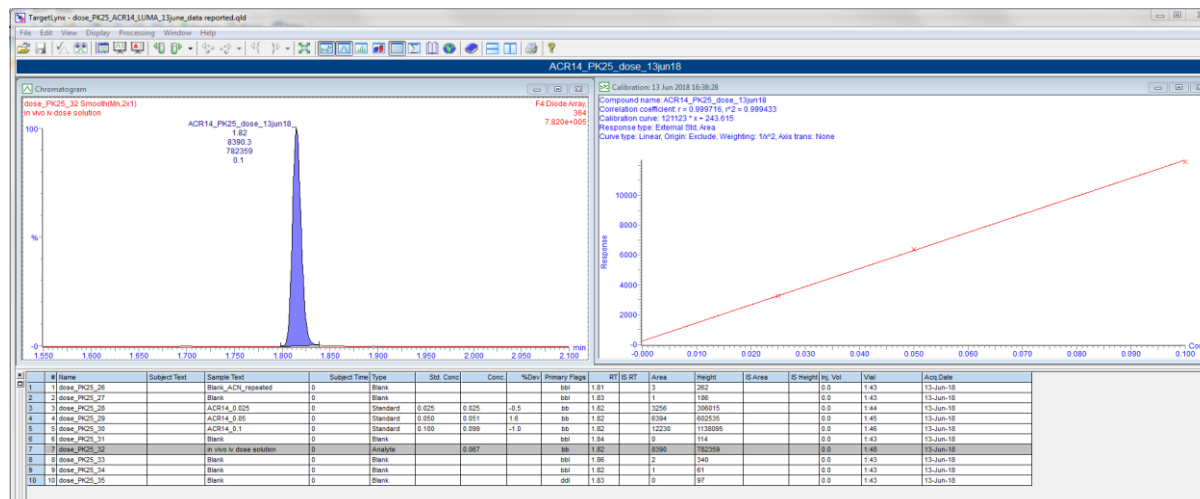
Uma solução estoque foi preparada a 1,0mg/mL diluindo 1,95 mg de compost em 1950 μ L de DMSO, A solução diluente foi preparada pela adição de 120 μ L PEG400/150 μ L H₂O a 2,73 mL de DMSO, Uma linha de calibração de três pontos foi preparada de acordo com o esquema a seguir:

Sample	Std, used	Volume of Std, - μ L	Volume of Diluent - μ L	Final conc, mg/mL
Std-1	Stock	100	900	0,100
Std-2	0,100 mg/mL	250	250	0,050
Std-3	0,050 mg/mL	250	250	0,025

A solução dosada nos animais (0,6 mg/mL) foi diluída pela adição de 100 μ L da mesma a 900 μ L de DMSO resultando em uma concentração de 0,060 mg/mL,

Resultados

A quantificação baseou-se a área do pico UV a λ_{\max} = 364 nm no Rt= 1,82 min,



Data saved as path follows:

- Acquired data on QToF: systemc> project> june 2018
- Processing data and saved on Premier:

systemc > project > june 2018 > dose_PK25_ACR14_Luma_13june_data reported

Conclusões

A dose diluída apresentou uma concentração de 0,067 mg/mL [bias=5%], estando de acordo com a dose esperada (0,060mg/mL).