

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

MATHEUS DA SILVA SOUZA

Investigação de moduladores da tubulina com propriedades anticâncer

São Carlos

2024

MATHEUS DA SILVA SOUZA

Investigação de moduladores da tubulina com propriedades anticâncer

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

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

Versão Original

São Carlos

2024

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.

Souza, Matheus da Silva
Investigação de moduladores da tubulina com
propriedades anticâncer / Matheus da Silva Souza;
orientador Adriano Defini Andricopulo -- São Carlos, 2024.
116 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física
Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São
Carlos, Universidade de São Paulo, 2024.

1. Câncer. 2. Dinâmica celular. 3. Descoberta de
fármacos. 4. CBSIs. I. Defini Andricopulo, Adriano,
orient. II. Título.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Matheus da Silva Souza

Tese apresentada ao Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Física Aplicada – Opção: Física Biomolecular

Aprovado (a) em: 11/04/2024

Comissão Julgadora

Dr(a).: Adriano Defini Andricopulo

Instituição: (IFSC/USP)

Dr(a).: Josué de Moraes

Instituição: (UNG/Guarulhos)

Dr(a).: Rafaela Salgado Ferreira

Instituição: (UFMG/Belo Horizonte)

Dr(a).: Gustavo Henrique Goulart Trossini

Instituição: (FCF/USP)

Dr(a).: Luma Godoy Magalhães

Instituição: (University of Dundee/Escócia)

**AOS QUE, DE DIVERSAS FORMAS, CONTRIBUÍRAM PARA A CONCLUSÃO DESTA TESE,
EXPRESSO MEU MAIS SINCERO AGRADECIMENTO.**

AGRADECIMENTOS

Expresso minha sincera gratidão à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro concedido através do processo 2018/25289-7, crucial para o desenvolvimento desta pesquisa voltada à descoberta de fármacos anticâncer.

Meu profundo agradecimento ao Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo, meu orientador, pelo inestimável suporte, orientação e constante estímulo à excelência acadêmica. Seu conhecimento foi imprescindível para a realização deste estudo.

Agradeço também à Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE/FAPESP, processo 2022/00219-1) que possibilitou minha estadia na *Universiteit Utrecht*, na Holanda. Sob a supervisão da Profa. Dra. Anna Akhmanova, na divisão de pesquisa em Biologia Celular, Neurobiologia e Biofísica do Departamento de Biologia da Faculdade de Ciências, adquiri conhecimentos essenciais para este trabalho. Em holandês, expresso minha gratidão para àqueles que tiveram acesso a este documento: *Heel erg bedankt voor al jullie behulpzame gastvrijheid gedurende het jaar dat ik daar in Nederland woonde. Ik mis het om brood en koffie uit de automaat te eten en samen met jullie te genieten van kazen en biertjes!* (Muito obrigado por toda a hospitalidade e ajuda de vocês durante o ano em que morei aí na Holanda. Sinto falta de almoçar pão com café de máquina, e de saborear queijos e cervejas com vocês!).

Meu sincero agradecimento aos colegas do Laboratório de Química Medicinal e Computacional pelo apoio, incentivo, valiosas discussões que contribuíram significativamente para esta jornada e, obviamente, pelos incontáveis e incansáveis cafezinhos.

À minha querida mãe, Dircéia, sua inestimável presença foi meu alicerce, oferecendo amor, sabedoria e apoio incondicional em cada etapa desta jornada acadêmica. Suas palavras de encorajamento foram minha força nos momentos mais desafiadores.

Estendo meus agradecimentos aos meus amados avós Jandira e Sebastião, cujo amor, apoio e sabedoria moldam de forma significativa minha vida.

Àqueles que enfrentam a batalha contra o câncer, expresso minha admiração por sua coragem e determinação incansáveis na busca por tratamento. Aos que persistem nessa trilha desafiadora, meu profundo respeito. Minhas condolências às famílias daqueles que faleceram durante essa luta. Que suas vidas sejam lembradas pelo legado e coragem demonstrados.

Aos profissionais engajados no enfrentamento do câncer, tanto na área clínica quanto na pesquisa, minha sincera gratidão. Seu empenho é vital na busca por tratamentos mais eficazes e na melhoria da qualidade de vida dos pacientes.

O PRESENTE TRABALHO FOI REALIZADO COM O APOIO DA FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO – PROCESSOS FAPESP 2018/25289-7 E 2022/00219-1

“QUANDO O HOMEM DECIDIR REFORMAR A SUA CONSCIÊNCIA,

O MUNDO TOMARÁ OUTRO ROTEIRO.”

MARIA CAROLINA DE JESUS

RESUMO

SOUZA, M. S. **Investigação de moduladores da tubulina com propriedades anticâncer.** 2024. 116 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

A presente tese aborda a crescente preocupação global relacionada ao câncer, conforme indicado pelo recente relatório da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, que estima a notificação de 21.9 milhões de casos e 11.4 milhões de mortes em 2025. Entre os cânceres sólidos mais prevalentes, destacam-se aqueles que afetam o pulmão, mama feminina, intestino e próstata. A invasão celular no tecido circundante é um evento comum na evolução tumoral, sendo um precursor essencial para a metástase. Este fenômeno implica a migração celular, uma atividade mediada pela modulação de estruturas proteicas, notadamente os microtúbulos (MTs), polímeros intracelulares cruciais nas células eucarióticas. O avanço recente nas técnicas de purificação de proteínas tem proporcionado *insights* significativos sobre as propriedades dinâmicas intrínsecas dos MTs, incluindo seu crescimento e encolhimento, processos regulados por motores moleculares e proteínas associadas. Esta instabilidade dinâmica desempenha um papel crucial na divisão celular e na motilidade, processos centrais no desenvolvimento anormal do câncer. No âmbito deste estudo de doutorado, denominado "Descoberta de Novos Ligantes Bioativos com Propriedades Anticâncer" (**processo FAPESP nº 2018/25289-7**), foram investigados agentes direcionados aos MTs para o tratamento de cânceres metastáticos de mama triplo-negativo e próstata refratário à terapia hormonal. Dentre trinta e dois compostos avaliados, dois representantes sintéticos, *cis-2e* e *para-3d*, destacaram-se por apresentar valores de $IC_{50} \leq 10 \mu M$ em linhagens tumorais de mama e próstata, respectivamente. Esses compostos não apenas evitaram a resistência relacionada à superexpressão da isoforma β_{III} da tubulina em células humanas recombinantes, mas também não demonstraram toxicidade em linhagens não-tumorais, incluindo tecidos locais e fibroblastos. Os compostos em questão inibiram a migração, invasão e desestabilizaram a divisão celular, promovendo a fragmentação nuclear. A investigação do mecanismo de ação revelou a inibição da polimerização da tubulina por meio de interação alostérica com o sítio da colchicina ou, de maneira vicinal, bloqueando o acesso a ele. Durante uma estadia no exterior (**processo FAPESP nº 2022/00219-1**), sob a supervisão da Professora Dra. Anna Akhmanova (*Universiteit Utrecht*, Holanda), foram acessadas instalações não disponíveis no Brasil. Essa oportunidade permitiu a quantificação de parâmetros de instabilidade dinâmica dos MTs. Após o retorno, juntamente com a determinação experimental do perfil farmacocinético, uma análise integrada dos dados foi realizada, possibilitando a priorização dos compostos-líderes para futuros estudos *in vivo* e a prova de conceito.

Palavras-chave: Câncer. Dinâmica celular. Descoberta de fármacos. CBSIs.

ABSTRACT

SOUZA, M. S. **Research into tubulin modulators with anticancer properties.** 2024. 116 p. Thesis (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

This thesis addresses the escalating global concern related to cancer, as indicated by the recent report from the International Agency for Research on Cancer, estimating 21.9 million cases and 11.4 million deaths in 2025. Prevalent among solid cancers are those affecting the lung, female breast, intestine, and prostate. Cellular invasion of surrounding tissue is a common event in tumor evolution, serving as an essential precursor to metastasis. This phenomenon involves cell migration, an activity mediated by the modulation of protein structures, notably microtubules (MTs), intracellular polymers crucial to eukaryotic cells. Recent advances in protein purification techniques have provided significant insights into the intrinsic dynamic properties of MTs, including their growth and shrinkage, processes regulated by molecular motors and associated proteins. This dynamic instability plays a crucial role in cell division and motility, central processes in the abnormal development of cancer. Within the scope of this doctoral study, titled "Discovery of Novel Bioactive Ligands with Anticancer Properties" (FAPESP grant #2018/25289-7), agents targeted at MTs were investigated for the treatment of metastatic triple-negative breast cancer and hormone-refractory prostate cancer. Among thirty-two evaluated compounds, two synthetic representatives, *cis-2e* and *para-3d*, stood out by exhibiting IC_{50} values $\leq 10 \mu\text{M}$ in breast and prostate tumor cell lines, respectively. These compounds not only circumvented resistance related to the overexpression of the β_{III} tubulin isoform in recombinant human cells but also demonstrated no toxicity in non-tumor cell lines, including local tissues and fibroblasts. The aforementioned compounds inhibited migration, invasion, and destabilized cell division, promoting nuclear fragmentation. Investigation into the mechanism of action revealed the inhibition of tubulin polymerization through allosteric interaction with the colchicine binding site or, vicinally, by blocking access to it. During a period abroad (FAPESP grant #2022/00219-1), under the supervision of Professor Dr. Anna Akhmanova (Utrecht University, Netherlands), facilities unavailable in Brazil were accessed. This opportunity enabled the quantification of dynamic instability parameters of MTs. Upon return, coupled with the experimental determination of the pharmacokinetic profile, an integrated analysis of the data was conducted, enabling the prioritization of lead compounds for future *in vivo* studies and proof of concept.

Keywords: Cancer. Cellular dynamics. Drug discovery. CBSIs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Modelo estocástico vs modelo de célula-tronco cancerígena em câncer sólido.....	25
Figura 2 –	Cinco principais subtipos intrínsecos ou moleculares do câncer de mama.....	27
Figura 3 –	Estágios do câncer de mama.	28
Figura 4 –	História natural do câncer de próstata.	31
Figura 5 –	Estrutura e instabilidade dinâmica dos microtúbulos. A instabilidade dinâmica do microtúbulo é impulsionada pela hidrólise do GTP nas subunidades β -tubulina, que permite que ele alterne entre catástrofe e resgate (α -tubulina, bege; β -tubulina, azul).....	33
Figura 6 –	Oito sítios de ligação de agentes moduladores de microtúbulos (α -tubulina, bege; β -tubulina, azul).....	33
Figura 7 –	Padrões estruturais dos compostos sintetizados pelos colaboradores da UNICAMP e da UFRGS.	42
Figura 8 –	Estruturas utilizadas para resumo das relações entre as substituições e a atividade antitumoral.....	59
Figura 9 –	Estrutura dos compostos-líderes e suas respectivas seletividades para os cânceres de mama e próstata.....	63
Figura 10 –	Ensaio <i>wound healing</i> do tipo concentração vs efeito em linhagem de CM (MDA) e CaP (DU).....	65
Figura 11 –	Curvas de polimerização da tubulina na presença dos controles e compostos selecionados.	66
Figura 12 –	Ensaio de competição pelo sítio da colchicina. Compostos e podofilotoxina diminuem a fluorescência intrínseca da colchicina, enquanto paclitaxel e vimblastina não.	67
Figura 13 –	Efeitos dos compostos na morfologia, conteúdo e distribuição nuclear. As setas indicam as irregularidades genéticas observadas. Núcleos corados com o marcador azul Hoechst 33342 e registrados em aumento de 20x. Barra de escala = 50 μ m.	68
Figura 14 –	Imagens de fluorescência de campo amplo de células MDA-MB-231 expressando de maneira estável o EB3-GFP. Tratamentos: (1) controle negativo. (2) veículo: DMSO 0,1%. (3) colchicina. (4) <i>cis-2e</i> e (5) <i>para-3d</i> . Todos os compostos a 100 nM. Barra de escala: 10 μ m.....	72
Figura 15 –	A: A dinâmica dos microtúbulos foi monitorada em células MDA-MB-231 expressando de forma estável o EB3-GFP na extremidade (+) na presença de colchicina, <i>cis-2e</i> e <i>para-3d</i> , utilizando microscopia em células vivas e sendo ilustrada em quimografias. As barras de tempo (vertical, 2 s) e de distância (horizontal, 2 μ m) aplicam-se a todas as imagens. B: Quantificação dos efeitos dos compostos nas taxas de crescimento dos microtúbulos celulares. C: Quantificação dos efeitos dos compostos nas frequências de catástrofes. Média \pm desvio padrão, n = 300 eventos; para todos os gráficos, * <i>P</i> < 0,0001, e <i>ns</i> , sem diferença significativa em relação ao veículo DMSO, teste de Mann–Whitney U.....	73
Figura 16 –	A: Quimografias representativas ilustrando a dinâmica <i>in vitro</i> dos MTs na presença da proteína de rastreamento da extremidade (+) EB3-GFP e dos compostos indicados. Para economizar espaço, as quimografias foram truncadas horizontalmente para as trilhas mais longas de MTs. A barra de tempo (vertical, 60 s) e a barra de distância (horizontal, 2 μ m) aplicam-se a todas as imagens. B: Quantificação das taxas de crescimento <i>in vitro</i> dos MTs. C: Quantificação das frequências de catástrofes derivadas de experimentos exemplificados em A , na ausência ou presença dos compostos indicados. Média \pm desvio padrão, n = 300 eventos; para todos os gráficos, * <i>P</i> < 0,05, e <i>ns</i> , sem diferença significativa em relação ao veículo DMSO, teste de Mann–Whitney U.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Inibidores de microtúbulos e a terapêutica do câncer.	37
Tabela 2 – Lactonas naturais e sintéticas que possuem atividades antitumorais.	40
Tabela 3 – Derivados de quinazolina aprovados pelo FDA como fármacos anticâncer.....	41
Tabela 4 – Chalconas inibidoras da polimerização da tubulina.....	41
Tabela 5 – <i>Cis</i> - e <i>trans</i> -indolizina lactona 1, e híbrido <i>meta</i> - e <i>para</i> -quinazolina-chalcona 2.	57
Tabela 6 – Valores de IC ₅₀ e CC ₅₀ nos ensaios de proliferação celular.	60
Tabela 7 – Resultados da triagem no ensaio <i>wound healing</i>	64
Tabela 8 – Valores de IC ₅₀ (μM) dos compostos nos ensaios de migração e invasão celular.....	65
Tabela 9 – Potência dos compostos no ensaio de polimerização do alvo.....	66
Tabela 10 – Distribuição da β-tubulina em células, tecidos e órgãos humanos.....	69
Tabela 11 – Atividade dos compostos em uma linhagem celular superexpressando tubulina β _{III}	71

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Sítios de ligação de agentes moduladores de microtúbulos na tubulina.....	34
Quadro 2 – Estudos clínicos das alterações na expressão de isoformas da tubulina, tipos de tumor, e resposta à fármacos.	70
Quadro 3 – Resumo dos dados de ADME <i>in vitro</i> para os compostos selecionados	76
Quadro 4 – Visualização da evolução dos compostos nas etapas de otimização <i>hit-to-lead</i>	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	<i>androgen receptor</i> (receptor de andrógeno)
BRCA	<i>breast cancer</i> (gene relacionado ao câncer de mama)
CaP	câncer de próstata
CaPHR	câncer de próstata hormônio refratário
CBSIs	<i>colchicine binding site inhibitors</i> (inibidores do sítio de ligação da colchicina)
CDK4/6	quinases dependentes de ciclinas
CM	câncer de mama
CMTN	câncer de mama triplo-negativo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHFR	diidrofolato redutase
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (Meio de Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico
ER	<i>estrogen receptor</i> (receptor de estrógeno)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i> (Administração Federal de Alimentos e Medicamentos)
FPPS	farnesil pirofosfato sintase
GDP	guanosine-5'-diphosphate
GnRHR	hormônio liberador de gonadotrofina
GTP	<i>guanosine triphosphate</i> (trifosfato de guanosina)
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i> (receptor tipo 2 do fator de crescimento)
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IS	índice de seletividade
LSO	Laboratório de Sínteses Orgânicas
LSPNF	Laboratório de Síntese de Produtos Naturais e Fármacos
MDAs	<i>microtubule-destabilizing agents</i> (agentes desestabilizadores de microtúbulos)
MSAs	<i>microtubule-stabilizing agents</i> (agentes estabilizadores de microtúbulos)
MSL	<i>mesenchymal stem-like</i> (semelhante à célula-tronco mesenquimal)
MT	microtúbulo
MTAs	<i>microtubule-targeting agents</i> (agentes direcionados a microtúbulos)
mTOR	alvo da rapamicina em mamíferos
PARP	poli (ADP-ribose) polimerase-1
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PD-1	proteína da morte celular programada 1
PDL-1	ligante-1 do receptor de morte celular programada
P_i	<i>phosphate ion</i> (ion fosfato)
PI3K	fosfatidilinositol-3-quinase
PR	<i>progesterone receptor</i> (receptor de progesterona)
PSA	<i>prostate-specific antigen</i> (antígeno prostático específico)
RNA	<i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
RPMI	<i>RoswellPark Memorial Intitute</i> (Instituto Memorial RoswellPark)
SD	<i>standard deviation</i> (desvio-padrão)
SFB	soro fetal bovino
SNC	sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i> (fluorescência por reflexão interna total)
TOP2	topoisomerase II
TROP-2	<i>tumor-associated calcium signal transducer 2</i> (transdutor de sinal de cálcio)
TS	timidilato sintetase
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	25
2 ESTUDO RACIONAL	39
3 OBJETIVOS	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	45
4.1 LINHAGENS CELULARES	45
4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS COMPOSTOS	46
4.3 TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA <i>IN VITRO</i>	46
4.4 MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR	47
4.4.1 ENSAIO <i>WOUND HEALING</i> EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA E PRÓSTATA	47
4.4.2 ENSAIOS <i>TRANSWELL</i> EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA E PRÓSTATA	48
4.5 ENSAIOS DE POLIMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TUBULINA	48
4.6 ENSAIO DE COMPETITIVIDADE PELO SÍTIO DA COLCHICINA	49
4.7 MARCAÇÃO DE DNA NUCLEAR COM HOECHST 33342	49
4.8 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DE RESISTÊNCIA	50
4.9 DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS	50
4.9.1 LINHAGEM E CULTIVO CELULAR	50
4.9.2 COMPOSTOS E TRATAMENTOS	50
4.9.3 IMUNOFLORESCÊNCIA EM CÉLULAS FIXADAS	51
4.9.3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CAMPO AMPLO	51
4.9.3.2 IMAGENS DE CÉLULAS VIVAS	51
4.9.4 ENSAIO DE RECONSTITUIÇÃO <i>IN VITRO</i>	51
4.9.4.1 PREPARAÇÃO DAS SEMENTES DE MICROTÚBULOS	51
4.9.4.2 ENSAIO DE RASTREAMENTO DA EXTREMIDADE POSITIVA DOS MICROTÚBULOS <i>IN VITRO</i>	52
4.9.5 MICROSCOPIA	52
4.9.5.1 MICROSCOPIA DE CAMPO AMPLO	52
4.9.5.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE REFLEXÃO INTERNA TOTAL (TIRF)	52
4.9.6 ANÁLISE DAS IMAGENS	53
4.9.6.1 ANÁLISE DA DINÂMICA DA EXTREMIDADE POSITIVA DOS MICROTÚBULOS EM CÉLULAS	53

4.9.6.2 ANÁLISE DA DINÂMICA DA EXTREMIDADE POSITIVA DOS MICROTÚBULOS <i>IN VITRO</i>	54
4.10 ESTUDO FARMACOCINÉTICO	54
4.10.1 DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO COEFICIENTE DE DISTRIBUIÇÃO (ELOGD)	54
4.10.2 PERMEABILIDADE DE MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA	54
4.10.3 ESTABILIDADE METABÓLICA	55
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
5.1 CITOTOXICIDADE	57
5.2 SELETIVIDADE	59
5.3 ATIVIDADE ANTIMIGRATÓRIA	64
5.4 IDENTIFICAÇÃO DO ALVO	65
5.4.1 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA PELOS COMPOSTOS ATRAVÉS DE UM SISTEMA TUBULÍNICO-MICROTUBULAR DIRECIONADO	65
5.4.2 AMOSTRAS LIGAM-SE À TUBULINA NO SÍTIO DA COLCHICINA	67
5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA	67
5.6 ISOFORMAS DA TUBULINA E RELAÇÃO DE RESISTÊNCIA	69
5.7 DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS	72
5.7.1 COMPOSTOS MODULAM A DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS EM CÉLULAS E EM RECONSTITUIÇÃO <i>IN VITRO</i>	72
5.8 PERFIL FARMACOCINÉTICO	74
6 VISUALIZAÇÃO DA EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS NO <i>PIPELINE</i> UTILIZADO PARA A OTIMIZAÇÃO <i>HIT-TO-LEAD</i>	77
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICES	93
APÊNDICE A MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024	95
APÊNDICE B QUIMIOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO	103
APÊNDICE C QUIMIOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA METASTÁTICO	105
APÊNDICE D ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO DOMÍNIO DA COLCHICINA	106
APÊNDICE E PUBLICAÇÕES RELACIONADAS COM CBSIS REGISTRADAS NO PUBMED NAS ÚLTIMAS DÉCADAS	107
ANEXO (ARTIGO)	109

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Na Grécia Antiga, o médico Hipócrates batizou os tumores que deformavam a pele sobre os vasos sanguíneos de *καρκίνο* (*karkinos*, caranguejo) e os tratou, segundo a teoria humoral. Esta teoria prevaleceu na medicina ocidental durante um vasto período da Antiguidade e tinha como base a saúde como um equilíbrio de fluidos corporais. Este tratado está contido em um compêndio denominado *Corpus Hippocraticum* (século IV a.C.) e um dos trechos deixa bem explícito a sua principal ideia: “*O corpo do homem tem dentro dele sangue, fleuma, bilis amarela e bilis negra. Eles constituem a natureza desse corpo e por eles surge a dor ou a saúde. Sente-se dor quando um desses elementos está em falta ou excesso, ou se isola no corpo sem se compor com todos os outros*”. O que se sabe até o momento é que os conceitos modernos de medicina de precisão pareciam já existir na prática médica hipocrática, levando em consideração as diferenças físicas e comportamentais entre as pessoas—explicando a variabilidade nas respostas ao tratamento e no prognóstico da doença. Esta heterogeneidade decorre justamente da natureza estocástica* de evolução Darwiniana, na qual eventos fortuitos dão origem a mutações que conferem mudanças no fenótipo e permitem a adaptação ao ambiente, resultando na seleção e sobrevivência do mais apto. Dois modelos foram propostos para explicar o crescimento do tumor e a heterogeneidade intratumoral. Na hipótese de seleção estocástica, o câncer inicia-se a partir de qualquer célula somática mutante com potencial de proliferar extensivamente, não apenas replicando a complexidade fenotípica. O modelo de célula-tronco, por sua vez, implica em organização celular hierárquica dentro do tumor e dita que uma única célula é capaz de recapitular completamente o fenótipo heterogêneo do tumor parental (**Figura 1**) (1–3). Estes modelos não são mutuamente exclusivos (4).

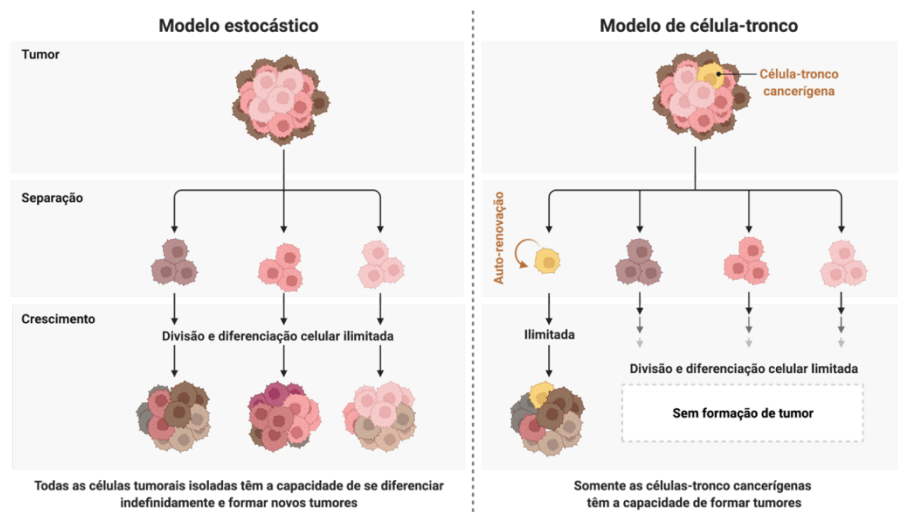


Figura 1 – Modelo estocástico vs modelo de célula-tronco cancerígena em câncer sólido.

Fonte: Adaptada de BIORENDER (5).

* Ter uma distribuição ou padrão de probabilidade aleatório que pode ser analisado estatisticamente, mas não pode ser previsto com precisão.

Após anos de investigação, o termo câncer ou cancro ainda preserva muitos mistérios, sendo utilizado para designar um conjunto complexo de doenças caracterizadas pela expansão e disseminação autônoma de clones somáticos. Para atingir este comportamento, estes clones devem cooptar várias vias celulares que lhes permitam ignorar as restrições normais ao seu crescimento, modificando assim o microambiente local para contornar o sistema imunológico. Favorecendo a sua própria proliferação e levando à migração e invasão através da matriz extracelular, as células atingem o fluxo sanguíneo e podem espalhar-se por todo o corpo. Muitas mortes são causadas por extravasamento e colonização de órgãos secundários, um processo multi-etapas altamente dinâmico chamado metástase. As células podem adotar muitas identidades diferentes durante a cascata metastática, em um fenômeno conhecido como plasticidade celular. Existem extremos em um contínuo estado de plasticidade em um universo de diversidade que afeta praticamente todos os aspectos do citoesqueleto. Assim, uma melhor compreensão da biologia desta terrível complicação, em consonância com a identificação de alvos moleculares[†], são estratégias promissoras para impulsionar a busca por novas terapias medicamentosas e reduzir a mortalidade por câncer, a qual estima-se ser de respectivamente 11,4 milhões no mundo (incidência: 21,9 milhões) e 307 mil no Brasil (incidência: 687 mil) para o ano de 2025 (6-7). Os quatro cânceres sólidos[‡] mais prevalentes no mundo são os que apresentam tumor maligno na mama feminina, pulmão, próstata e cólon. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, destas mortes previstas para o ano de 2025 no mundo, 769 mil deverão ser atribuídas ao câncer de mama e 445 mil ao câncer de próstata. Nos últimos anos, o progressivo impacto epidemiológico e a necessidade de maior cobertura das ações visando ao controle do câncer em território brasileiro têm colocado a doença no centro das discussões para o desenvolvimento de políticas públicas de prevenção e controle visando driblar uma possível sobrecarga do Sistema Único de Saúde (SUS)[§]. De acordo com o médico cirurgião Antônio Prudente (fundador do Hospital A. C. Camargo), em artigo publicado no jornal O Estado de S. Paulo em 1933, “...a mortalidade pelo câncer alarma a sociedade moderna! O número de óbitos, causados por ele, cresce ininterruptamente! Tem-se a impressão de que é o maior flagelo da humanidade atual, o destino obrigatório da humanidade do futuro”. No Brasil, a predição para o ano de 2025 e, seguindo uma tendência, revela que haverá significativa ocorrência dos cânceres de mama feminina** (CM – 99,8 mil casos / 23,8 mil mortes) e de próstata (CaP – 116 mil casos / 22,8 mil mortes) de acordo com o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). O tumor maligno mais incidente no Brasil é o de pele não melanoma, seguido pelos de mama feminina, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago (8–11).

[†] A drogabilidade (probabilidade de ser capaz de modular um alvo com uma pequena molécula) é crucial para determinar se um projeto de descoberta de fármacos progride de *hit* para *lead*.

[‡] Quando há existência de uma massa sólida capaz de crescer em órgãos.

[§] O SUS foi implantado pela Constituição Federal em 1988 sob as diretrizes de (i) universalização do acesso, (ii) equidade e (iii) integralidade, sendo atualmente a única forma de acesso à saúde para 75% da população brasileira.

**Em homens, tumores na mama são raros e representam 1% dos casos de CM e 0,3% dos casos de câncer, sendo responsáveis por menos de 0,2% das mortes.

O CM é diverso em sua história natural e em sua capacidade de resposta aos tratamentos. A heterogeneidade acarreta diferentes perfis clínicos, histopatológicos e moleculares e, portanto, tornou-se viável classificá-lo em cinco subtipos (**Figura 2**), chamados de: **(i)** luminal A; **(ii)** mama normal símile; **(iii)** luminal B; **(iv)** superexpressão de HER2; e **(v)** basaloide ou triplo-negativo. Esta classificação visa fornecer um diagnóstico preciso da doença e a predição do comportamento do tumor para facilitar a abordagem oncológica. O câncer de mama triplo-negativo (CMTN) representa cerca de 15 a 20% de todos os casos de CM diagnosticados e é responsável por aproximadamente 35% das mortes (12-13).

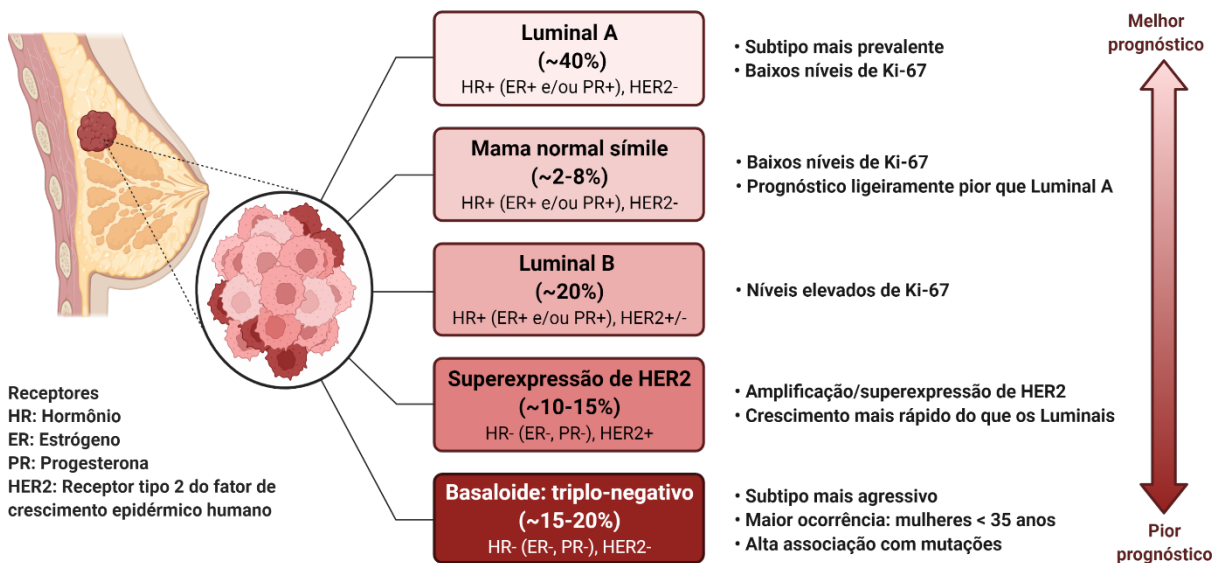


Figura 2 – Cinco principais subtipos intrínsecos ou moleculares do câncer de mama.^{††}
 Fonte: Adaptada de BIRENDER (14).

O CMTN apresenta também a sua divisão interna, sendo classificado em 6 subgrupos: **(i)** basal-símile tipo 1; **(ii)** basal-símile tipo 2; **(iii)** imunomodulador; **(iv)** mesenquimal; **(v)** mesenquimal similar às células tronco (*mesenchymal stem-like*, MSL) e **(vi)** receptor de andrógeno luminal. Os tumores do tipo MSL expressam genes relacionados à motilidade e diferenciação celular, além da elevada expressão de fatores de transcrição, marcadores específicos de células-tronco mesenquimais e de vias de sinalização de fator de crescimento. Isto faz com que as linhagens celulares pertencentes à esta classificação sejam utilizadas com frequência para modelar CM em estágio avançado e identificar novos alvos moleculares. O CMTN acomete principalmente mulheres na pré-menopausa com menos de 50 anos e seios densos, com uma prevalência nas que têm abaixo de 35 anos. Cerca de 15% destas são portadoras de mutações na linhagem germinativa do gene *breast cancer* (BRCA), as quais são responsáveis por um aumento na resistência a alguns medicamentos disponíveis no mercado. Sob o ponto de vista da imuno-histoquímica, as células não expressam os três marcadores prognósticos, fatores preditivos e alvos terapêuticos validados

^{††} Ki-67 é uma medida comumente utilizada para analisar a proliferação celular no tecido do câncer de mama.

e utilizados rotineiramente na prática clínica, que são: **(i)** receptor de estrógeno; **(ii)** receptor de progesterona e **(iii)** receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (15-16).

Aproximadamente 20% dos casos de CMTN diagnosticados são devidos à linhagem MSL intitulada MDA-MB-231, a qual é altamente silenciosa, agressiva, com limitadas opções de tratamento e prognóstico desfavorável. Segundo a histologia, esta linhagem é responsável pelo carcinoma ductal invasivo, ou seja, inicia-se em um ducto de leite, rompe a parede dele, infiltra e cresce no tecido adiposo da mama. A partir daí, pode se espalhar para outras partes do corpo através do sistema linfático e da circulação sanguínea. Cerca de 30% das pacientes acometidas por CMTN apresentam alto risco de metástases para o cérebro, pulmões, fígado e ossos e, conseqüentemente, de severas complicações terapêuticas. Este processo migratório é uma causa de morbidade e mortalidade constante na doença (**Figura 3**) (3).

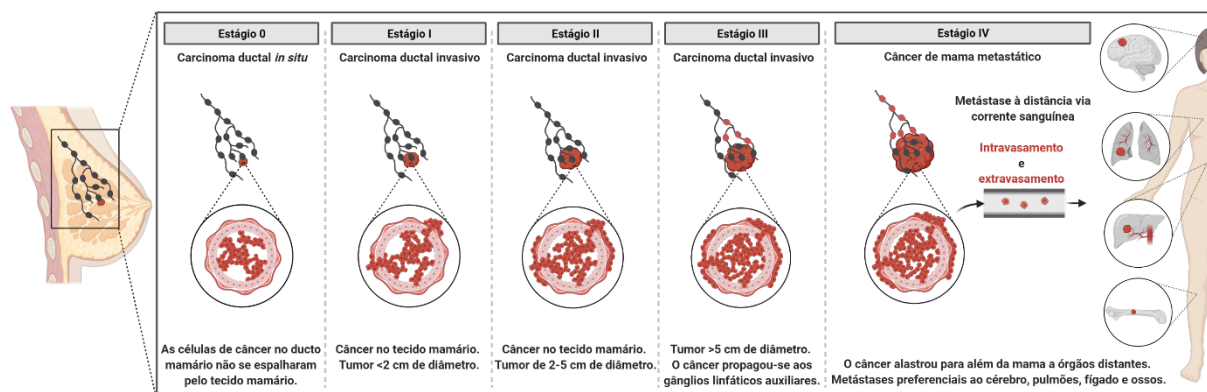


Figura 3 – Estágios do câncer de mama.

Fonte: Adaptada de BIORENDER (17).

Resultados de exames clássicos tais como mamografia e ultrassom são imprecisos em pacientes com CMTN, podendo até mesmo criar má interpretação de lesões com características benignas. Isto torna a detecção precoce da doença excepcionalmente difícil e faz com que a sobrevivência global média das pacientes seja baixa (por volta de um ano e meio). Por não responder aos protocolos de tumor de mama com fenótipo molecularmente definido, as pacientes com CMTN ainda vêm sendo submetidas às terapias citotóxicas tradicionais que para este subtipo foram reposicionadas, com diversas ocorrências de recidivas^{‡‡} dentro de cinco anos após o diagnóstico. Apesar da mutilação, da limitada eficácia e frequente resistência, o uso da cirurgia, radioterapia e da quimioterapia ainda são os procedimentos amplamente aceitos para o tratamento do CM. No entanto, garantir a adesão e persistência no tratamento é algo muito desafiador. Os fortes efeitos colaterais dos medicamentos disponíveis geram desconforto e diminuição da qualidade de vida, podendo muitas vezes ser intoleráveis e comumente sustentam a tomada de decisão que culmina na descontinuação por parte da paciente (18).

^{‡‡} O retorno do câncer após um tratamento bem-sucedido (recorrência tumoral).

Dos fármacos aprovados^{§§} pela Administração Federal de Alimentos e Medicamentos (*Food and Drug Administration*, FDA, **Apêndices A e B**) para o tratamento do CM, apenas 18% têm em sua bula a indicação para o subtipo CMTN. Esta porcentagem é representada pelos anticorpos monoclonais denominados atezolizumabe, pembrolizumabe e sacituzumabe govitecano-hziy. Todos os tratamentos são utilizados nos casos em que o câncer é localmente avançado, metastático, não pode ser removido por cirurgia e/ou em que a paciente já tenha recebido pelo menos duas quimioterapias, com o objetivo de melhorar a liberação de antígenos tumorais e, assim, proporcionar respostas mais efetivas da imunoterapia. Os anticorpos monoclonais direcionados a antígenos expressos na superfície das células tumorais são uma alternativa utilizada na prática clínica para o controle de alguns subtipos de CM, em conjunto com os medicamentos quimioterápicos de primeira-linha como terapias de longa data aprovadas nos regimes tradicionais de tratamento (cloridrato de doxorubicina, cloridrato de epirrubicina, docetaxel, olaparibe e paclitaxel) (19). Entretanto, os anticorpos apresentam baixa penetração no sistema nervoso central (SNC). Isto se deve principalmente à barreira hematoencefálica, a qual exclui substratos de alto peso molecular (> 200 kDa). Tal fato faz com que o SNC seja um santuário de disseminação metastática. Com isto, o tratamento de doenças sistêmicas e o concomitante aumento da sobrevida global de pacientes com CMTN podem ser metaforizados como uma “faca de dois gumes”, uma vez que há um aumento expressivo da probabilidade de propagação das células para o SNC. De fato, aproximadamente 50% das metástases cerebrais devidas ao CMTN se desenvolvem no cenário da doença sistêmica estável (20-21).

O CaP, por sua vez, é o carcinoma não cutâneo mais comum em homens no mundo todo. A próstata foi descrita pela primeira vez em 1536 pelo anatomista italiano Niccolò Massa. Esta glândula do sistema reprodutor masculino é responsável por produzir e armazenar o líquido prostático que juntamente com o líquido seminal e os espermatozoides formam o sêmen. Ela se encontra logo abaixo da bexiga e na frente do reto. É do tamanho de uma noz e envolve parte da uretra. O primeiro caso de CaP descoberto por exames histológicos ocorreu em 1853 pelo cirurgião britânico Joseph Adams. Na época, o médico chegou a afirmar que a doença era muito rara—possivelmente decorrente de subnotificação. 171 anos depois, o CaP é um problema significativo de saúde tendo feito 9,6 milhões de vítimas ao redor do mundo em 2018. Para o ano de 2025, a projeção é que o número de casos chegue a 1,7 milhão, com 445 mil mortes (22-23). As crescentes taxas de incidência nos últimos anos podem ser parcialmente justificadas pela **(i)** evolução dos métodos diagnósticos, **(ii)** melhoria na qualidade dos sistemas de informação e **(iii)** aumento na expectativa de vida (> 76 anos). Considerado como um câncer da terceira idade, cerca de 75% dos casos

^{§§} Alvos de medicamentos aprovados para o câncer de mama: **(i)** ácido desoxirribonucleico (DNA); **(ii)** alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR); **(iii)** aromatase; **(iv)** diidrofolato redutase (DHFR); **(v)** farnesil pirofosfato sintase (FPPS); **(vi)** fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K); **(vii)** hormônio liberador de gonadotrofina (GnRHR); **(viii)** ligante-1 do receptor de morte celular programada (PD-L1); **(ix)** metabolismo de nucleotídeos; **(x)** poli (ADP-ribose) polimerase-1 (PARP); **(xi)** proteína da morte celular programada 1 (PD-1); **(xii)** quinases dependentes de ciclinas (CDK4/6); **(xiii)** receptor de estrogênio (ER); **(xiv)** receptor de progesterona (PR); **(xv)** receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR); **(xvi)** receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2); **(xvii)** timidilato sintetase (TS); **(xviii)** topoisomerase II (TOP2); **(xix)** transdutor de sinal de cálcio associada a tumor 2 (TROP-2) e **(xx)** tubulina.

no mundo ocorrem acima dos 65 anos e é raro tê-lo antes dos 50^{***} (< 2%). A história familiar também é um fator relevante e pode mais que dobrar o risco do aparecimento da doença em 20% dos diagnosticados (10,24). Segundo a Organização Europeia de Pesquisa e Tratamento do Câncer, o CaP é tido como a “doença do homem silencioso”, o que se deve à baixa adesão aos exames regulares com finalidade preventiva. Somado a isto, os exames diagnósticos atuais e consagrados na prática clínica são limitados às fases iniciais da doença, não estratificando com precisão os estágios do CaP. Tal fato pode levar a problemas relacionados com medicamentos, como por exemplo quando o paciente faz uso de algo que não precisa e fica exposto à toxicidade por sobredosagem e desenvolvimento de resistência. Os fármacos anticâncer impõem uma forte pressão para a seleção de células. Existem vários mecanismos que podem ser utilizados para se tornar resistente à quimioterapia, como por exemplo: **(i)** aumentando o efluxo do fármaco; **(ii)** diminuindo a sua ingestão; **(iii)** aumentando o número de moléculas alvo dentro da célula; **(iv)** alterando o metabolismo do fármaco ou **(v)** os processos de reparação do DNA (25).

Segundo a sensibilidade hormonal, o CaP pode ser dividido em **(i)** andrógeno dependente ou sensível (responde à supressão de andrógeno); **(ii)** andrógeno independente ou insensível (resistente à supressão do andrógeno, mas, sensível à manipulação hormonal) e **(iii)** hormônio resistente (resistente a qualquer manipulação hormonal). A classificação do CaP pode ser ainda realizada com base nos 6 estágios clínicos da doença, os quais são: **(i)** CaP localizado; **(ii)** CaP localmente avançado; **(iii)** CaP não responsivo à terapia local e com PSA elevado; **(iv)** CaP não metastático resistente à castração; **(v)** CaP metastático recém diagnosticado e **(vi)** CaP metastático resistente à castração. Este último também é conhecido como câncer de próstata hormônio refratário (CaPHR). Este estágio representa cerca de 35% dos casos e permanece letal apesar dos avanços terapêuticos. Estima-se que 50% dos casos de CaP evoluam para CaPHR dentro de três anos após o diagnóstico. Dependendo da linhagem celular e do estágio da doença, a castração cirúrgica ou medicamentosa por bloqueio hormonal são as formas indicadas de tratamento, por mais invasivas que sejam. Em analogia à quimioterapia do CMTN, a utilizada para o CaPHR também apresenta limitada eficácia e é repleta de efeitos adversos. Ademais, o fenômeno de resistência surge frequentemente como mais um obstáculo à implementação de uma terapia de cura (**Figura 4**) (26–29). A resistência a uma terapia pode ser apenas intrínseca a uma célula e, portanto, presente num ambiente de tratamento-*naïve*^{†††} (resistência primária), ou ainda quando a heterogeneidade clonal em tumores tratados é resultante de respostas adaptativas às pressões seletivas dentro do microambiente tumoral (resistência adquirida). Apesar das razões pelas quais o CaP progride para a resistência à castração ainda não serem

^{***} O exame digital da próstata e a triagem regular do antígeno prostático específico (PSA) são os procedimentos básicos e complementares para o início do rastreamento do CaP e são sugeridos a partir dos 45 anos de forma anual. Embora o PSA elevado se correlacione com a presença do câncer, condições como a prostatite e a hiperplasia benigna também aumentam a concentração sérica deste antígeno. Consequentemente, há uma frequência relativamente elevada de biópsias de próstata desnecessárias, um procedimento invasivo que é caro e desconfortável ao indivíduo. De toda forma, mesmo com limitações, a detecção do CaP em fase inicial é determinante para uma terapia de cura, uma vez que ele é assintomático até que se espalhe pelo corpo, passando então a ser somente tratável.

^{†††} Uma pessoa é considerada *naïve* (ingênua) se nunca se submeteu a tratamento para uma determinada doença.

totalmente compreendidas, algumas hipóteses são encontradas na literatura: **(i)** alterações da expressão e sinalização do receptor de andrógeno (AR); **(ii)** mutações no gene do AR (que causam promiscuidade e ativação por glicocorticoides ou mesmo antagonistas), e **(iii)** variantes do AR que são constitutivamente ativas na ausência de ligantes (30).

Parte dos casos de CaPHR deve-se à linhagem independente de andrógeno humano DU-145, a qual foi isolada pela primeira vez em 1975 de um tumor metastático da próstata no cérebro (31). É uma das mais agressivas, com altas taxas de proliferação (sobrevida mediana que varia de 12 a 27 meses) e não expressa ambos PSA e AR, o que dificulta concomitantemente diagnóstico e tratamento (32). A taxa de sobrevivência em cinco anos⁺⁺⁺ para pacientes com CaP não-metastático é de 98,9%, contudo, quando a doença é metastática—e diagnosticada em fase inicial—este valor passa a ser inferior a 30%. Dos fármacos aprovados^{§§§} pelo FDA (**Apêndice A e C**) para o tratamento do CaP, 54% têm em sua bula a indicação para o subtipo CaPHR. Esta porcentagem é representada por 12 moléculas pequenas^{****} (92%) e 1 imunoterapia (8%). Das moléculas pequenas, 2 (17%) são taxanos de segunda geração utilizados como terapia sistêmica de primeira-linha para o tratamento da doença refratária e metastática. Até 2010, o docetaxel (4%) permaneceu como primeiro e único fármaco capaz de prolongar a vida dos pacientes acometidos pela doença apesar dos efeitos colaterais (mielossupressão, edemas e alopecia) (30).

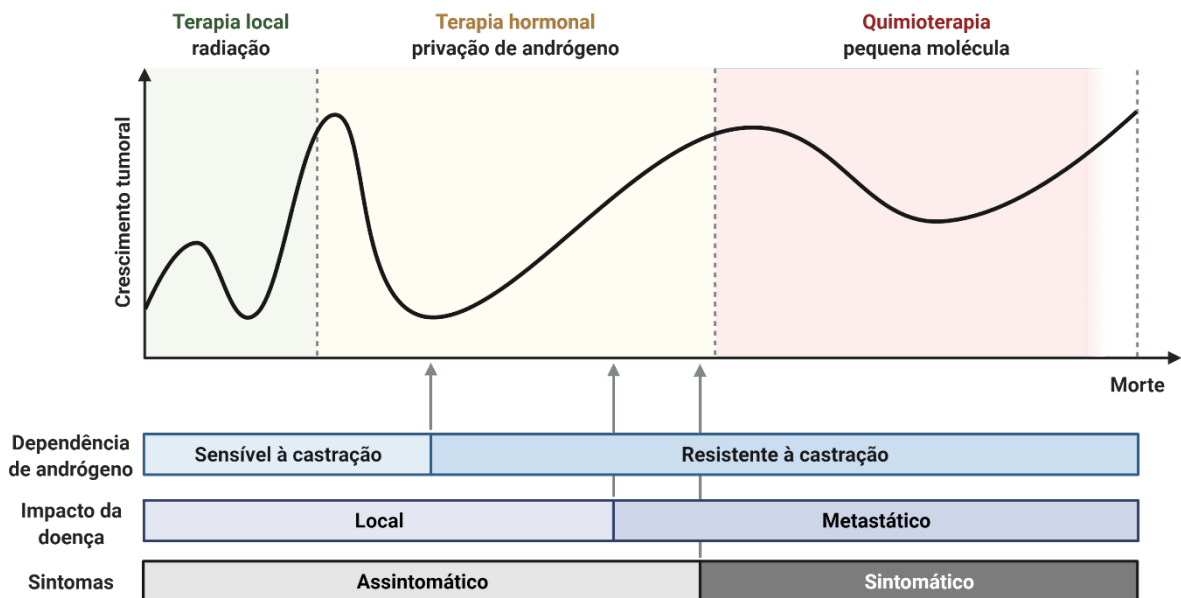


Figura 4 – História natural do câncer de próstata.

Fonte: Adaptada de BIOENDER (33).

⁺⁺⁺ Refere-se à porcentagem de pacientes que vivem pelo menos cinco anos após o diagnóstico da doença.

^{§§§} Alvos de medicamentos aprovados para o câncer de próstata: **(i)** AR; **(ii)** antígeno de membrana específico da próstata (PSMA); **(iii)** citocromo P450, família 17, subfamília A, polipeptídeo 1 (CYP17A1); **(iv)** DNA; **(v)** ER; **(vi)** GnRHR; **(vii)** PARP; **(viii)** PSA; **(ix)** TOP2 e **(x)** tubulina.

^{****} As moléculas pequenas são compostos orgânicos com peso molecular ≤ 1000 Da.

A interconversão de fenótipos das células cancerígenas é um processo dinâmico que resulta em padrões heterogêneos e na existência da ideia de um alvo móvel, onde o desafio é buscar meios para aperfeiçoar a mira e efetivamente acertar o tratamento. Nas células eucarióticas, um destes alvos é a rede de citoesqueleto, a qual é composta principalmente de filamentos de actina, filamentos intermediários e microtúbulos (MTs). Os componentes desta rede têm papéis distintos e abrigam diferentes propriedades mecânicas e dinâmicas (34). Um MT tem treze protofilamentos lineares montados em torno de um núcleo oco e dispostos em paralelo, compostos de um único tipo de proteína globular, que é um dímero de polipeptídeos polarizados estritamente relacionados: α - e β -tubulina. O citoesqueleto de MT é um dos responsáveis pela plasticidade acima referida; o seu *scaffold*, ao crescer e encolher, está envolvido em processos celulares tais como divisão, angiogênese, migração e invasão, para mencionar alguns. Há décadas que muitos compostos naturais ou derivados têm sido utilizados em estudos de investigação básica destinados a compreender a fisiologia celular através da interferência na função do citoesqueleto por pequenas moléculas—moléculas estas que desregulam o MT levando à interrupção da mitose^{†††} e à apoptose^{††††}. Estes estudos demonstram a dependência que os processos celulares têm em relação aos MTs, e alguns compostos tornaram-se populares como terapias citotóxicas clássicas (7,35–37).

A referida polarização da tubulina é um processo evolutivamente conservado que contribui para a instabilidade dinâmica do citoesqueleto (**Figura 5**), onde os MTs são reorganizados por motores moleculares e proteínas associadas tanto em células não tumorais como nas tumorais (38,39).

Esta instabilidade é desencadeada e altamente regulada em resposta a sinais celulares. É impulsionada pelo delicado balanço da incorporação e hidrólise do trifosfato de guanosina (GTP), equilíbrio este que também pode ser perturbado pela interação com agentes externos—agentes direcionados aos MTs (*microtubule-targeting agents*, MTAs)—em alguns dos sítios de ligação presentes na tubulina. Desta forma, torna-se possível tanto a determinação de taxas de crescimento e encolhimento do MT, quanto a frequência de transição de crescimento ou pausa para o encolhimento (catástrofe) e a frequência de transição de encolhimento para pausa ou crescimento (resgate) (40).

Em publicação recente na *Angewandte Chemie*, Mühlethaler e colaboradores identificaram vinte e sete possíveis locais distintos de ligação na tubulina utilizando triagem de fragmentos cristalográficos (41). Oito deles já foram descritos na literatura (colchicina, gatorbulina, laulimalida, maitansina, pironetina, taxano, todalam e vinca; **Figura 6, Quadro 1**), e as suas respectivas modulações por MTAs afetam pelo menos um dos *Hallmarks of Cancer*—descritos por Douglas Hanahan como uma ferramenta heurística^{§§§§} afim de destilar a vasta complexidade dos fenótipos e genótipos em um conjunto provisório de princípios

††† A mitose ocorre após o fim da intérfase, ou seja, após a replicação cromossômica responsável por gerar as cromátides-irmãs. Os eventos básicos da mitose incluem condensação dos cromossomos, formação do fuso mitótico e ligação dos cromossomos aos microtúbulos do fuso mitótico. Após isso, as cromátides-irmãs são separadas e se movem para lados opostos do fuso e a célula então é dividida em duas células-filhas (140).

†††† Série de passos meticulosamente coreografados que executam o programa de autodestruição celular (141).

§§§§ Método de investigação baseado na aproximação progressiva de um dado problema.

subjacentes ao desenvolvimento do câncer (42–50). Os MTAs são categorizados em dois grupos, que incluem os agentes desestabilizadores de microtúbulos (*microtubule-destabilizing agents*, MDAs) e estabilizadores de microtúbulos (*microtubule-stabilizing agents*, MSAs). O seu mecanismo subjacente está em discussão, mas, os MSAs supostamente evitam a despolimerização do MT através do bloqueio de contatos laterais e/ou longitudinais, enquanto os MDAs induzem a rápida desmontagem do MT e impedem a polimerização da tubulina por dois mecanismos moleculares diferentes: bloqueio e cunhagem (47,51).

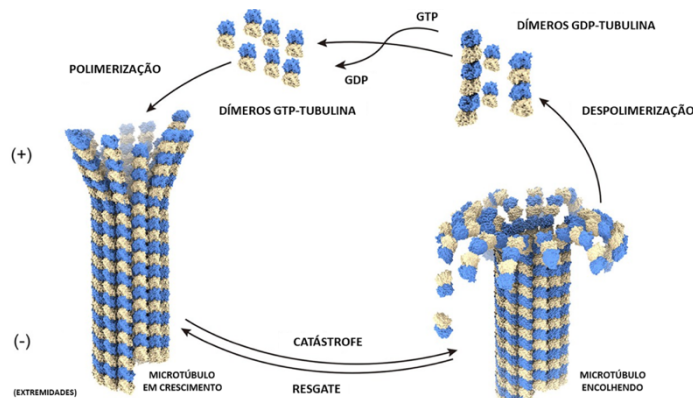


Figura 5 – Estrutura e instabilidade dinâmica dos microtúbulos *****. A instabilidade dinâmica do microtúbulo é impulsionada pela hidrólise do GTP nas subunidades β -tubulina, que permite que ele alterne entre catástrofe e resgate (α -tubulina, bege; β -tubulina, azul).
Fonte: Adaptada de SHUAI *et al.* (52)

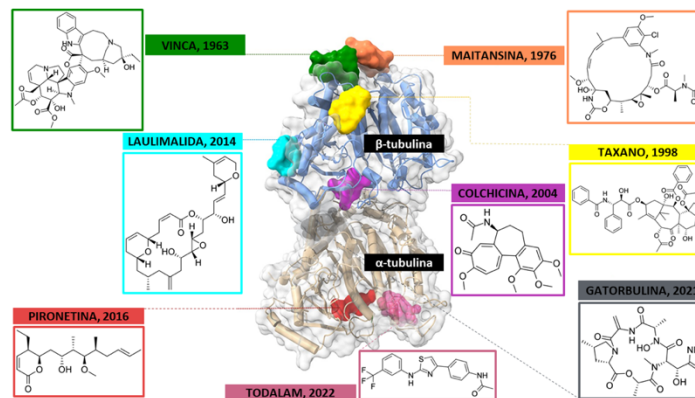


Figura 6 – Oito sítios de ligação de agentes moduladores de microtúbulos (α -tubulina, bege; β -tubulina, azul).
Fonte: Adaptada de SHUAI *et al.* (52)

***** A reação de hidrólise de GTP a GDP e Pi ocorre pouco após a polimerização, o que significa que quando a polimerização ocorre a uma velocidade elevada se forma um *cap* de GTP-tubulina na extremidade (+) dos microtúbulos. A hidrólise de GTP a GDP afeta a estrutura do polímero: enquanto os polímeros ligados a GTP são lineares, os polímeros associados a moléculas de GDP curvam-se ligeiramente. As interações laterais entre as moléculas de GTP-tubulina permitem que o filamento se mantenha linear, contrariando a sua tendência de se curvar. Quando ocorre a reação de hidrólise e os microtúbulos perdem o seu *cap* de GTP-tubulina, a GDP-tubulina relaxa para a sua conformação curvada, o que causa a perda de interações laterais entre os protofilamentos. Assim, os microtúbulos perdem a sua estrutura linear, despolimerizando rapidamente (142).

Quadro 1 – Sítios de ligação de agentes moduladores de microtúbulos na tubulina.

SÍTIO, DÍMERO, MTA ^a	MECANISMO DE AÇÃO MOLECULAR	REPRESENTANTE	ORIGEM
Colchicina, α/β, MDA	previnem alteração conformacional <i>curved-to-straight</i>	colchicina ^b , combretastatina A4, noscapina, podofilotoxina	planta
		halimida, plinabulina*	fungo
		nocodazol	sintético
Gatorbulina, α/β, MDA	previnem alteração conformacional <i>curved-to-straight</i>	gatorbulina-1 (único reportado)	cianobactéria marinha
Laulimalida, β, MSA	atuam como "pinças" moleculares que mantêm juntos os protofilamentos	laulimalida, perolusido A	esponja marinha
Maitansina, β, MDA	inibem a adição de mais dímeros de tubulina às extremidades positivas dos MTs ou formam complexos tubulina-ligantes incompetentes de montagem	maitansina, emtansina (DM1)* ^c	planta
		disorazol	bactéria
		espongistatina, plocabulina	esponja marinha

(continua)

MTs = microtúbulos.

*Sintético.

^a = MTA, de *microtubule-targeting agent* [classificação como desestabilizador (**MDA**) ou estabilizador (**MSA**) de microtúbulos].^b = utilizado no tratamento da artrite gotosa aguda e da febre mediterrânea familiar.^c = parte do conjugado anticorpo-fármaco ado-trastuzumabe emtansina, o qual é utilizado no tratamento do câncer de mama metastático.

Fonte: Elaborado pelo autor com base nos sítios reportados até janeiro/2024.

Quadro 1 – Sítios de ligação de agentes moduladores de microtúbulos na tubulina.
(conclusão)

SÍTIO, DÍMERO, MTA	MECANISMO DE AÇÃO MOLECULAR	REPRESENTANTE	ORIGEM
Pironetina, α, MDA	perturba a formação de contatos laterais da tubulina nos MTs por meio da formação de complexos tubulina-pironetina incompetentes de montagem	pironetina (único reportado)	bactéria
	ou inibe a adição de mais dímeros de tubulina nas extremidades negativas dos MTs que expõem as subunidades de α -tubulina		
Taxano, β, MSA	estabelecem ambos contatos longitudinais hidrofóbicos e polares da tubulina com elementos estruturais secundários a fim de promover a montagem e a estabilidade dos MTs através de um mecanismo alostérico	paclitaxel ^d , docetaxel ^{**e} , cabazitaxel ^{**f}	planta
	ou inibem hidrólise ou reduzem a afinidade do nucleotídeo de GTP localizado remotamente na tubulina	discodermolida, zampanolida	esponja marinha
		epotilona B, ixabepilona ^{**g}	bactéria
Todalam, α, MDA	impedem a formação do MT criando uma cunha na estrutura do oligômero de tubulina e promovem a formação de oligômeros de tubulina em forma de anel, diminuindo ainda mais o <i>pool</i> de tubulina disponível para polimerização	todalam: precursor 4* e derivado 10*	sintético
Vinca, α/β, MDA	introdução de uma cunha molecular na ponta dos MTs, que impede a transição <i>curved-to-straight</i>	dolastatina	molusco marinho
	ou por sequestro dos dímeros de tubulina em oligômeros em forma de anel (incompatíveis com a estrutura reta dos protofilamentos)	halicondrina B, eribulina*, mesilato de eribulina ^{*h}	esponja marinha
		vimblastina ⁱ , vincristina, vindesina ^{**} , vinorelbina ^{**j}	planta

MTs = microtúbulos. *Sintético. **Semissintético. Câncer de mama metastático = mCM. Câncer de próstata hormônio-refratário metastático = mCaPHR.

^{d, g, h, i, j} = utilizados no tratamento do mCM. ^e = utilizado no tratamento do mCM e do mCaPHR. ^f = utilizado no tratamento do mCaPHR.

Fonte: Elaborado pelo autor com base nos sítios reportados até janeiro/2024.

Conforme observado no **Quadro 1** acima, a maioria destes ligantes visa o monômero β ou sua interface com o monômero α (intra- ou interdímero), e esta preferência sobre a α -tubulina pode ser explicada pelo fato de o monômero β ser o local onde ocorre o ciclo de hidrólise de GTP, tornando-o um alvo favorável e justificando ainda a razão pelo qual os esforços de descoberta de fármacos foram direcionados para interferir com a dinâmica dos MTs, favorecendo as catástrofes (35,53). Um sítio bem povoado na β -tubulina é aquele ao qual a colchicina se liga. Este sítio preenche um volume total de 780 Å³ e é alvo de dezesseis fragmentos que povoam as suas três zonas. Eles interagem com a proteína através de contatos hidrofóbicos ou mistos hidrofóbicos e polares mediados por resíduos de hélice, *chains* e *loops*.

O sítio da colchicina é um bolsão alongado, onde compostos como colchicina, combretastatina A4, halimida, noscapina, plinabulina ou podofilotoxina ligam-se ao primeiro terço, interagindo com o *loop* T5 em α -tubulina ou com S9 e H7 em β -tubulina, enquanto outros compostos (como por exemplo o nocodazol) ligam-se mais profundamente e também interagem com a folha β do domínio N-terminal da β -tubulina (54–56). Observando mais à distância, estas moléculas ligam-se em uma bolsão enterrado na interface intra-dímero da tubulina α e β , virando o *loop* β T7 para fora de sua posição nativa. Ao ocupar esse local de ligação, elas impedem efetivamente a transição curva para reta, bloqueando a compactação da bolsa formada pelas fitas β S8 e β S9, e pelas hélices β H8 e α H7 (**Apêndice D**) (57). Desta forma, os ligantes do sítio da colchicina desestabilizam o MT por meio da inibição da formação de contatos tubulínicos nativos bem como pelo impedimento da transição conformacional “*curved-to-straight*” dentro do heterodímero de $\alpha\beta$ -tubulina que acompanha a formação do MT (45,54,58–60). Os inibidores do sítio de ligação da colchicina (*colchicine binding site inhibitors*, CBSIs) são estruturalmente menos complexos que os alcaloides da vinca e os taxanos em uso, e são promissores no desenvolvimento de medicamentos de administração oral que, em baixas concentrações, podem iniciar a supressão da dinâmica da tubulina. Para além de cumprirem os critérios de drogabilidade da “regra dos cinco” de Lipinski^{††††}, eles podem também superar mecanismos de resistência ao tratamento (61–64).

A pesquisa e o desenvolvimento de terapias sistêmicas contra o câncer não partiram de meras observações casuais, mas demonstraram ao longo dos anos um melhor entendimento da sua biologia e mudaram paradigmas na pesquisa clínica. Se a abordagem terapêutica recair sobre uma subpopulação, as chances são de que o espaço aberto pela morte das células tumorais, sensíveis a um dado tratamento, seja rapidamente ocupado por uma subpopulação intrinsecamente resistente ao tratamento proposto.

^{††††} A regra dos cinco é uma regra básica que descreve a drogabilidade de uma determinada molécula. Esta regra ajuda a determinar se um produto químico biologicamente ativo é susceptível de ter as propriedades químicas e físicas para estar oralmente biodisponível. A regra de Lipinski baseia-se tanto em propriedades farmacocinéticas, como por exemplo: **(i)** absorção; **(ii)** distribuição e **(iii)** metabolismo e excreção; quanto em propriedades moleculares específicas, tais como: **(iv)** não ter mais do que 5 doadores de ligações de hidrogênio; **(v)** não ter mais de 10 aceptores de ligações de hidrogênio; **(vi)** ter massa molecular inferior a 500 Da e **(vii)** não apresentar coeficiente de partição (logP) superior a 5. A violação de duas ou mais destas condições prevê uma molécula como um fármaco que não será disponível oralmente.

Evidências começam a se acumular e sugerem que este quadro seja tão mais provável quanto mais tardio na história natural da doença se for feito o diagnóstico. Para uma resposta satisfatória a um dado tratamento, este deve apresentar elevada capacidade de atingir as células-alvo e máxima abrangência possível sobre a heterogênea população celular, fato este que sustenta a descoberta e desenvolvimento de terapias clássicas como os inibidores de MTs (**Tabela 1**)—tais como os CBSIs—mesmo que com janelas terapêuticas menores (65,66).

Tabela 1 – Inibidores de microtúbulos e a terapêutica do câncer.

COMPOSTO	SÍTIO	FASE*	APLICAÇÃO/CÂNCER
2-Metoxiestradiol (2ME2)	colchicina	II	mama, ovário, próstata e rim
Análogos de combretastatina-A4	colchicina	III	ovário e tireoide
Batabulina	colchicina	III	fígado
Cemadotina	vinca	II	mama e pulmão
CP-461	colchicina	II	leucemia, próstata e rim
Criptoficina 52	colchicina	II	ovário
Crolibulina	colchicina	II	tumores sólidos
Denibulina	colchicina	I	tumores sólidos
Dolastatina-10	vinca	II	colorretal
E-7010	colchicina	II	colorretal, glândulas adrenais, mama, pulmão
ELR-510444	colchicina	pré-clínica	mama triplo-negativo
ENMD-1198	colchicina	I	tumores sólidos avançados e refratários
Eribulina	vinca	aprovado (2010 e 2016)	mama metastático e lipossarcoma irresecável
Exisulinda	vinca	II	mama, próstata e pulmão
Fosbretabulina	colchicina	III	ovário
Indibulina	ND	II	mama metastático
JG-0314	colchicina	pré-clínica	mama
Lexibulina (CYT-997)	colchicina	pré-clínica	mama, ossos e plasmócitos
Lisavanbulina	colchicina	II	tumores sólidos avançados e refratários

(continua)

Tabela 1 – Inibidores de microtúbulos e a terapêutica do câncer.
(conclusão)

COMPOSTO	SÍTIO	FASE*	APLICAÇÃO/CÂNCER
Mivobulina	colchicina	II	colorretal e ovário
MPC-6827	colchicina	II	gliomas e melanoma metastático
MPI-0441138	colchicina	pré-clínica	próstata metastático
N-acetil-colquinol	colchicina	pré-clínica	tumores sólidos
Ombrabulina	colchicina	III	sarcomas
OXI-4503	colchicina	II	leucemia
Plinabulina	colchicina	III	pulmão
Rigosertibe	colchicina	III	leucemia e pâncreas metastático
Risoxina	vinca	II	mama
Sintadotina	vinca	II	próstata e pulmão
Soblidotina	vinca	II	pulmão e sarcomas
T-900607	colchicina	II	estômago, fígado e linfoma não-Hodgkin
Tivantinibe	colchicina	II	mama triplo-negativo e próstata
Tubulisina A	vinca	pré-clínica	modelos de carcinoma multirresistentes
VERU-111	colchicina	I	próstata metastático
Vinflunina	vinca	III	bexiga e mama metastático
Vinorelbina	vinca	IV	mama metastático e pulmão
ZD-6126	colchicina	II	colorretal metastático

Fases de desenvolvimento de um novo medicamento. **Pré-clínica:** testes em laboratório (*in vitro* / *in vivo*). **Clínica:** composta por quatro fases sucessivas e necessárias. **I:** testado em pequenos grupos (de 20 a 100 pessoas) de voluntários sadios. **II:** o número de pacientes que participará nessa fase será maior (de 100 a 200). Nesta fase os voluntários são portadores da doença a ser tratada. **III:** nesta fase, o novo medicamento é comparado com o tratamento padrão existente (o número mínimo de participantes é de aproximadamente 800 pacientes). **IV:** esta fase se dá após a aprovação do medicamento, quando ele já é comercializado.

O processo de desenvolvimento de um novo medicamento geralmente leva de 10 a 15 anos, em média.

Última atualização realizada em janeiro/2024.

Fonte: Elaborada pelo autor.

2 ESTUDO RACIONAL

Colchicina é o agente antimitótico mais antigo que se tem conhecimento e tem sido monoterapia de primeira linha para o tratamento da artrite gotosa aguda e da febre mediterrânea familiar desde a sua aprovação pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) em 2009. Além disso, devido às atividades anti-fibróticas e anti-inflamatórias, o uso terapêutico desta molécula isolada a partir do extrato de açafrão-do-prado (*Colchicum autumnale*) tem se estendido à aterosclerose, à osteoartrite e à pericardite. Ao realizar uma busca no PubMed[®] utilizando as palavras-chave *colchicine binding site inhibitors*, um total de 812 referências foram encontradas de 1971 a 2024 e mostraram a tendência de aumento de interesse nos CBSIs ao longo destes 53 anos com destaque especial para a última década, a qual foi responsável por 64% do número total de publicações (**Apêndice E**). A colchicina em si se liga muito bem à tubulina, mas nem a própria molécula nem os compostos que compartilham do mesmo sítio de ligação ainda encontraram uso significativo no tratamento do câncer (67–70). O sítio de ligação da colchicina é posicionado na interface entre as subunidades α e β da proteína, com forma de funil. O 1º lado da cavidade é cercado pelos resíduos Val181 α , Asn101 α , Ala180 α , Thr179 α , Asn349 β , Asn350 β , Lys352 β e Thr314 β . O 2º, por sua vez, é rodeado pelos resíduos Val238 β , Tyr202 β , Thr239 β , Leu242 β , Leu252 β , Cys241 β , Ile378 β , Leu248 β , Val318 β e Leu255 β . O 3º e último é cercado pelos resíduos Asp251 β , Ala250 β , Met259 β , Lys254 β , Asn258 β , Ala316 β , Thr353 β , Ala354 β e Ala317 β . De acordo com diversos relatos científicos, os CBSIs têm sete características farmacofóricas principais, as quais são: três aceptores e um doador de ligações de hidrogênio, dois centros hidrofóbicos e um grupo planar (71,72). Lactonas (**Tabela 2**) (73–93), quinazolininas (**Tabela 3**) (94–98) e chalconas (**Tabela 4**) (99–109) têm sido reportadas ao longo dos últimos anos como agentes anticâncer.

Tabela 2 – Lactonas naturais e sintéticas que possuem atividades antitumorais.

COMPOSTO	ATIVIDADE BIOLÓGICA
100	suprime angiogênese em modelos de tumor de córnea
264	IC ₅₀ ~ 3 µM em câncer colorretal (SW-620)
19-triisopropil andrografolida	IC ₅₀ ~ 6 µM e ~ 2 µM em câncer de estômago (MKN-45 e AGS, respectivamente)
Alantolactona	IC ₅₀ = 40 µM em câncer de mama (MDA-MB-231)
Andrografolida	IC ₅₀ ~ 20 µM em câncer de próstata (PC3 e 22Rv1) e 0,5 nM em câncer de pulmão (A549)
Antrocina	IC ₅₀ = 0,6 µM em câncer de mama (MDA-MB-231) e supressão da tumorigênese pulmonar <i>in vivo</i> (modelo xenográfico)
Brevilin A	inibe seletivamente câncer mama (MDA-MB-468) e de próstata (DU-145)
Costunolida	IC ₅₀ ~ 8 µM em câncer colorretal (SW-620) e ~ 20 µM em câncer de estômago (BGC-823)
Desoxielefantopina	IC ₅₀ ~ 7 µg/mL em câncer colorretal (HCT-116), ~ 4 µg/mL em leucemia (K562) e ~ 2 µg/mL em câncer de mama (T47D)
DETD-35	IC ₅₀ = 3,5 µM em câncer de mama (MDA-MB-231) e supera mutação em modelo animal de melanoma
DMAPT	suprime tumor de próstata (PC-3) e pulmão (A549) em modelos <i>in vivo</i>
EM-23	IC ₅₀ ~ 6 µM em câncer de colo de útero (CaSki) e de pele (SiHa)
Hipotemicina	IC ₅₀ ~ 0,08 mM e 0,90 mM em câncer colorretal (HT-29 e HCT-116, respectivamente)
KF-25706	suprime tumor de mama em modelo <i>in vivo</i>
Nagilactona C	IC ₅₀ = 2-5 mM em câncer de colo de útero (Hela), estômago (AGS) e de mama (MDA-MB-231)
Nagilactona E	IC ₅₀ ~ 5 µM em câncer de pulmão (A549 e NCI-H1975); reduz em 62 % o crescimento tumoral e metástase (modelo xenográfico)
Partenolida	IC ₅₀ ~ 9 µM em câncer de mama (MCF-7) e de pele (SiHa); em combinação com docetaxel reduz metástase <i>in vivo</i> (câncer de mama)
SRJ-23	IC ₅₀ = 0,4 µM em câncer de próstata (PC-3, DU-145, LNCaP)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 3 – Derivados de quinazolina aprovados pelo FDA como fármacos anticâncer.

NOME		TIPO DE CÂNCER	ALVO
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL		
Dimaleato de afatinibe	Gilotrif TM (Boehringer Ingelheim)	câncer de pulmão de células não-pequenas metastático (mCPNPC)	EGFR
Ditosilato de lapatinibe	Tykerb TM (GlaxoSmithKline)	câncer de mama localmente avançado ou metastático	EGFR
Erlotinibe	Tarceva [®] (Roche)	mCPNPC e pancreático localmente avançado, irressecável ou metastático	EGFR
Gefitinibe	Iressa [®] (AstraZeneca)	câncer de pulmão de células não-pequenas localmente avançado ou metastático	EGFR
Vandetanibe	Caprelsa [®] (AstraZeneca)	câncer medular de tireoide localmente avançado, irressecável ou metastático	EGFR / VEGFR / RET

EGFR: receptor de fator de crescimento epidérmico. **VEGFR:** receptor do fator de crescimento endotelial vascular. **RET (proto-oncogene):** codifica um receptor de membrana associado à proliferação e diferenciação celulares. **Tipo de princípio ativo:** pequena molécula. **Mecanismo:** terapia-alvo. **Rota de administração:** oral.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 4 – Chalconas inibidoras da polimerização da tubulina.

COMPOSTO-LÍDER	ATIVIDADE BIOLÓGICA
4'-O-Metilbrousochalcona B	leucemia mieloide aguda (ML-2)
Chalconas bicíclicas	próstata (DU-145 e PC-3)
Chalconas ligadas a indol à base de fenstatina	boca (SCC-29B), esféroides e camundongos modelo de xenoenxerto
Chalconas tipo CA-4 SD400 e chalcona α-fenil	leucemia mieloide crônica (K562)
Chalconas α-fluorinadas	colo de útero (HeLa), estômago (MGC-803), linfoma (U937), mama (MCF-7), pulmão (A549)
Chalconas α-trifluorometil	colo de útero (HeLa), mama (MCF-7 e MDA-MB-231), próstata (DU-145), pulmão (A549)
Derivado de chalcona-1,2,3-triazol	fígado (HepG2)
Derivados de indol-chalcona	colo de útero (HeLa), fígado (MHCC-97H), mama (MCF-7), ovário (A2780), pulmão (A549)
Derivados de imidazol-chalcona	fígado (HepG2), mama (MCF-7), pulmão (A549)
Derivados de triazoloquinoxalina-chalcona	cólon (HCT-116), fígado (HepG2), mama (MCF-7)
Fenstatina/isocombretastatina-chalconas	painel de 60 linhagens humanas
Híbridos 2-arilbenzo[c]furano-chalcona	mama (MCF-7)
TUB091	modelos de xenoenxerto de mama e melanoma

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para estabelecer relações entre a estrutura e a atividade em torno destes *cores* farmacofóricos (**Figura 7**), a síntese de novos compostos com diferentes padrões estruturais torna-se relevante. Os representantes sintetizados e enviados para teste atenderam às características farmacofóricas essenciais dos CBSIs, e mesmo que com diferentes padrões estruturais e propriedades eletrônicas, estiveram unidos por um propósito único: a investigação de novos quimioterápicos moduladores dos MTs.

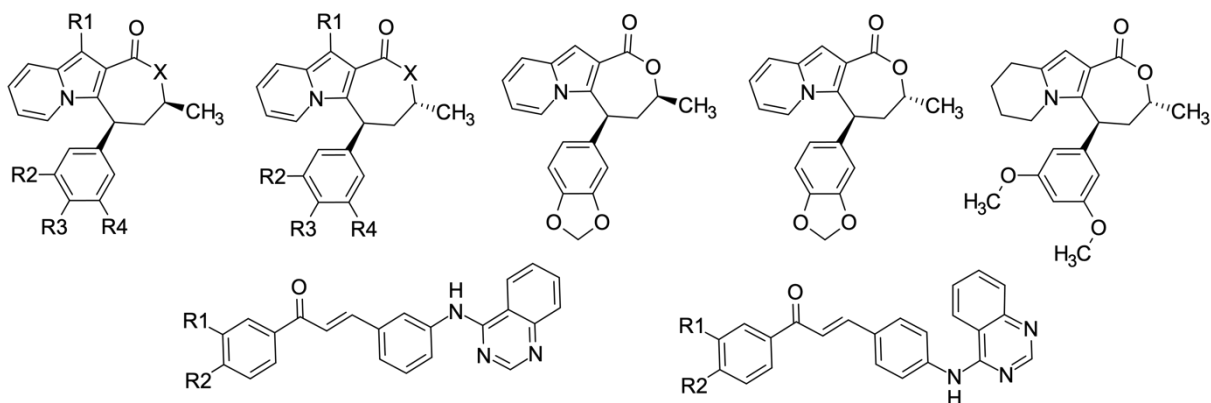


Figura 7 – Padrões estruturais dos compostos sintetizados pelos colaboradores da UNICAMP e da UFRGS. Primeira linha: indolizinas lactonas. Segunda linha: híbridos de quinazolina-chalcona mantidos por uma amina (*linker*).
Fonte: Elaborada pelo autor.

MTs são polímeros intracelulares que atuam como componentes fundamentais das células eucarióticas. Avanços recentes nas técnicas de purificação de proteínas começaram a lançar luz sobre a importância das propriedades dinâmicas intrínsecas dos MTs, tais como o crescimento e o encolhimento—ambos regulados por uma coorte de motores moleculares e proteínas associadas. A instabilidade dinâmica do citoesqueleto de MT é crucial para a divisão celular e motilidade, processos centrais que sustentam o comportamento anormal no desenvolvimento do câncer; e que têm ganhado cada vez mais atenção no que tange à pesquisa e desenvolvimento de novos moduladores da tubulina. Recentemente, resultados apresentados por Mühlethaler e colaboradores na *Angewandte Chemie*, descreveram pela primeira vez a geração de uma molécula pequena inibidora de tubulina totalmente projetada racionalmente a partir de um fragmento, a qual exibe um mecanismo de ação molecular exclusivo. Assim, eles demonstraram a utilidade dos fragmentos de ligação à tubulina como pontos de partida valiosos para campanhas inovadoras de descoberta de sondas químicas e de fármacos (50). O setor farmacêutico registrou um aumento notável nas aprovações da FDA em 2023, com 55 novos medicamentos (aumento de 62,5% em relação à 2022)—os tratamentos contra câncer lideraram o caminho e um destaque especial para a aprovação da primeira terapia genética para a distrofia muscular de Duchenne (110).

3 OBJETIVOS

Recorrendo a uma cascata de ensaios *in vitro* na presença de células e com a proteína isolada, o objetivo principal desta investigação científica é identificar e otimizar séries de moléculas sintéticas baseadas em produtos naturais que tenham propriedades anticâncer.

Os *objetivos específicos*, por sua vez, são:

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos em linhagem tumoral metastática de CMTN e de CaPHR;
- Determinar sua seletividade frente células do respectivo tecido local e sistêmicas;
- Avaliar o efeito dos compostos na capacidade migratória e invasiva das linhagens de câncer;
- Avaliar bioquimicamente a capacidade dos compostos em modular a polimerização da tubulina;
- Elucidar o mecanismo de ação frente ao alvo via ensaios de competição pelo sítio da colchicina;
- Avaliar a interferência dos compostos na morfologia, conteúdo e distribuição dos núcleos celulares;
- Determinar a relação de resistência na isoforma β_{III} expressa em células humanas recombinantes;
- Anotar e quantificar a dinâmica dos microtúbulos em células e em ensaios de reconstituição *in vitro*;
- Investigar as propriedades farmacocinéticas *in vitro* – perfil ADME.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Para alcançar uma compreensão mais abrangente sobre o impacto dos MTAs na dinâmica dos MTs é imperativo situar as compreensões mecanísticas obtidas a partir de experimentos *in vitro* no contexto intracelular—reconhecendo que a reciprocidade dessa relação é igualmente válida. Por tal motivo, numerosos estudiosos respaldam suas investigações conduzindo ambas as abordagens, como minuciosamente exposto nesta seção.

4.1 LINHAGENS CELULARES

Para os ensaios celulares foram utilizadas as seguintes linhagens:

- (i) Célula tumoral epitelial de próstata humana (DU-145 // ATCC HTB-81™);
- (ii) Célula tumoral epitelial de mama humana (MDA-MB-231 // ATCC HTB-26™);
- (iii) Fibroblasto não-tumoral de fígado de camundongo (FC3H // BCRJ 0082);
- (iv) Fibroblasto não-tumoral de pele humana (HFF-1 // ATCC SCRC-1041™);
- (v) Célula não-tumoral epitelial de próstata humana (RWPE-1 // BCRJ 0389);
- (vi) Célula não-tumoral epitelial de mama humana (MCF-10A // ATCC CRL-10317™);
- (vii) Célula não-tumoral epitelial de rim embrionário humano (T-REx™ HEK-293);
- (viii) MDA-MB-231 com expressão estável de EB3-GFP (MDA-MB-231 EB3-GFP).

As linhagens **i** e **iii** foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park *Memorial Intitute* – Cultilab®, Campinas, SP, BRA). As linhagens **ii** e **iv** em DMEM (Dulbecco's *modified eagle medium* – Cultilab®, Campinas, SP, BRA). Ambos foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco™, Waltham, MA, USA). A linhagem **v** em meio de queratinócito isento de soro (*keratinocyte serum-free medium*, K-SFM, Gibco™, Grand Island, NY, USA), suplementado com extrato de pituitária bovina (0,05 mg/ml) e fator de crescimento epidérmico recombinante humano (*epidermal growth factor*, EGF, 5 ng/ml). As células **vi** foram cultivadas em meio DMEM/F12, adicionado de 5% de soro de cavalo, EGF (20 ng/ml), hidrocortisona (0,5 µg/ml) e insulina (10 µg/ml). Por fim, as células **vii** e **viii** foram mantidas em DMEM *high glucose* (4,5 g/l) com 10% de SFB e—48h antes do plaqueamento—doxiciclina a 2 µg/ml foi adicionada para a indução da expressão da tubulina recombinante apenas no caso das células HEK. Em todos os casos supracitados foram adicionados penicilina (200 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml) e L-glutamina (2 mM) (Sigma-Aldrich®).

As células em cultura foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ até atingir 75–90% de confluência. Com o intuito de garantir que as células empregadas nos ensaios estivessem em condições semelhantes, inicialmente foi estabelecido um estoque de células por meio do congelamento nos seus respectivos números de passagem. O congelamento foi feito através da adição de 3x10⁶ células em uma solução de SFB contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO). Esta suspensão celular foi acondicionada em

criotubos em freezer a -80°C por 24h, o qual garantiu a redução gradual de temperatura. Após o congelamento, as células foram armazenadas em *dewar* com nitrogênio líquido (-196°C). Todos os procedimentos envolvendo a manipulação de células foram realizados em condições de assepsia. Os materiais foram manipulados em fluxo laminar previamente exposto à luz ultravioleta por 15min e desinfetado com etanol 70%. Para a realização dos ensaios, as células foram descongeladas em banho térmico a 37°C e cultivadas em garrafas de cultura de 75 cm^2 (Corning®, Corning, NY, USA). Uma vez alcançada a confluência da monocamada celular, as células foram sub-cultivadas e, quando necessário, congeladas e/ou plaqueadas.

4.2 PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES DOS COMPOSTOS

25 indolizinas lactonas foram sintetizadas no Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob supervisão do Prof. Fernando Coelho e 10 híbridos de quinazolina-chalconas no Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob supervisão do Prof. Dennis Russowsky. As moléculas são derivadas heterocíclicas e contêm prioritariamente em sua estrutura um dos *cores* supracitados na **Seção 2**. As soluções-estoque dos compostos foram preparadas a 20 mM em 100% de DMSO; e armazenadas a -80°C . Soluções de uso a 10 mM foram preparadas e armazenadas a -20°C . As soluções intermediárias foram preparadas no dia dos ensaios nos respectivos meios de cultura de acordo com a linhagem celular, a partir das soluções de uso, de modo a se obter uma concentração de composto desejada e, ao mesmo tempo, de DMSO (com a finalidade de que não ultrapassasse 1% no primeiro poço da placa). Este acompanhamento do solvente foi necessário para que a viabilidade celular na sua presença ficasse dentro do que é considerado seguro ($> 90\%$) e não comprometesse a análise dos dados e o cálculo do IC_{50} e do CC_{50} real dos compostos-teste. As concentrações utilizadas nos ensaios foram escolhidas a partir de estudos pilotos (dados não apresentados).

4.3 TRIAGEM DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA *IN VITRO*

O ensaio da resazurina também é conhecido como *AlamarBlue* e se baseia na capacidade das desidrogenases mitocondriais das células viáveis reduzirem o corante azul não fluorescente chamado resazurina (fenoxazin-3-ona) na rosa resorufina. A proporção de células viáveis pode ser quantificada usando um fluorímetro com leitor de microplaca equipado com um conjunto de filtros de excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. Para este ensaio foram adicionadas 4×10^3 (DU, MDA, FC3H, MCF-10A e RWPE-1), 3×10^2 (HFF-1) e 9×10^3 (HEK) células/100 μl de meio de cultura/poço em placas estéreis de 96 (TPP™, Trasadingen, Suíça). As placas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . No dia seguinte, 11 concentrações dos controles e dos compostos-teste foram adicionadas em diluição seriada com uma pipeta multicanal. Após incubação por 72h, o meio foi descartado e substituído por

120 μL /poço de uma mistura (5:1, v/v) composta por meio DMEM (sem fenol e sem SFB) e resazurina (0,15 mg/ml) em solução salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline*, 1x PBS). Em seguida, as placas foram novamente colocadas na estufa. O período de incubação necessário para gerar um sinal de fluorescência suficiente acima do *background* é geralmente cerca de 1 a 4h, dependendo da atividade metabólica das células, da densidade de células por poço e outras condições tais como o tipo de meio de cultura. Após o período, elas foram analisadas em fluorímetro SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), em $\lambda_{\text{emissão}}$ de 588 nm. A viabilidade das células tratadas foi expressa como porcentagem relativa com relação às células incubadas somente com meio de cultura e o veículo utilizado para solubilizar os compostos (controle negativo, DMSO). O índice de seletividade (IS) foi calculado como a razão do CC_{50} na célula não tumoral pelo IC_{50} na célula tumoral. Colchicina e doxorubicina foram utilizadas como controles positivos.

4.4 MIGRAÇÃO E INVASÃO CELULAR

4.4.1 ENSAIO *WOUND HEALING* EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA E PRÓSTATA

O ensaio celular *wound healing* foi realizado para avaliar qualitativamente e semi-quantitativamente a capacidade de inibição da migração celular. Células MDA-MB-231 e DU-145 foram plaqueadas a uma densidade de $1,2 \times 10^5$ células por poço em placas de 24 poços (*BD Falcon*TM, Trasadingen, Suíça) e cultivadas por 48h (24h com SFB e 24h sem SFB, com o intuito de sincronizar o ciclo celular). Após a cultura se tornar confluenta foi realizada uma lesão na monocamada celular, com o auxílio de uma ponteira p100 estéril. Os poços foram lavados uma vez com 1x PBS para a retirada completa dos resíduos celulares (*debris*). Os compostos foram diluídos em 1 ml de meio suplementado resultando na concentração de 10 μM . As soluções foram depositadas nos poços da placa de cultura em duplicata, sendo também utilizados dois controles negativos (sem e com DMSO a 1%) e um controle positivo (colchicina a 10 μM). As placas foram incubadas por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO_2 . Imagens das fendas foram coletadas com o auxílio de um microscópio óptico invertido utilizando a objetiva de 4x. O campo de visão a ser fotografado foi padronizado para que fosse o mesmo nos dois tempos. Para isso, foi utilizada uma placa autoclavável acoplada embaixo da placa de 24 poços. Este acessório com orifícios alinhados com a região central do poço permitiu a incidência da luz do microscópio sempre no mesmo ponto. As imagens foram obtidas no início ($t_1 = 0\text{h}$) e ao final do experimento ($t_2 = 24\text{h}$) e, empregando-se o *software ImageJ*, as áreas das fendas em t_1 e t_2 foram determinadas. Os valores das áreas ao início e final do experimento foram utilizados para determinar a porcentagem de inibição da migração celular através da **Equação (1)**. Inicialmente, o experimento foi realizado de forma qualitativa em concentração única. Apenas aquelas amostras com inibição do fechamento da fenda $\geq 50\%$ foram selecionadas para os ensaios quantitativos em câmara de Boyden para a determinação do IC_{50} . No entanto, a fim de definir a faixa de concentração a ser utilizada na

câmara, foi previamente analisado o efeito da concentração *vs* resposta dos compostos pré-selecionados sob a regeneração da fenda por meio do *wound healing* semiquantitativo a 5 e 1 μM .

$$\% \text{ inibição} = 100 - \left[\left(\frac{\text{área}_{0h} - \text{área}_{24h}}{\text{área}_{0h}} \right) \times 100 \right] \quad (1)$$

4.4.2 ENSAIOS *TRANSWELL* EM LINHAGENS DE CÂNCER DE MAMA E PRÓSTATA

Os efeitos dos compostos na migração e invasão celular foram quantificados com base nos princípios da câmara de Boyden e utilizando os *kits* QCM™ 8 μm *96-well Chemotaxis Cell Migration Assay* e QCM™ 8 μm *96-well Collagen Cell Invasion Assay* – ECM510 e ECM556, respectivamente – (Merck Millipore®, Darmstadt, Germany). Inicialmente, as placas de 96 poços foram deixadas à temperatura ambiente por 10min. Suspensões contendo 1×10^5 células por poço em 100 μl de meio sem fenol, sem SFB e com os compostos foram preparadas. MDA-MB-231 e DU-145 foram cultivadas sem SFB (*overnight starvation*) antes do ensaio. Sob condições estéreis, as tampas e as câmaras contendo as membranas foram separadas das placas suporte. 150 μl de meio sem fenol e suplementado com 10% de SFB foram adicionados nas placas inferiores (*feeder tray*). As câmaras foram acopladas novamente e foi certificado para que nenhuma bolha ficasse presa sob as membranas. 100 μl das respectivas suspensões celulares foram adicionados nas partes superiores das câmaras na ausência ou presença de *coating* de colágeno. Finalmente, a placa foi fechada e transferida para uma estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h. Imediatamente antes do final da incubação, 150 μl de solução de descolamento de células (*cell detachment solution*) pré-aquecido a 37°C foram adicionados nos poços da bandeja de colheita de células (*cell harvesting tray*). Em seguida, a placa de 96 poços com a câmara de migração/invasão foi removida cuidadosamente da estufa e separada, dentro do fluxo, do meio suplementado com SFB. As células do lado superior da membrana foram removidas aspirando o meio de cultura e a placa foi acoplada de forma a ficar em contato com a solução de descolamento previamente pipetada e incubada por 30min nas mesmas condições anteriores. Ao final deste período, as células foram desalojadas completamente inclinando suavemente a câmara repetidas vezes no líquido. Uma solução 4x *Lysis Buffer* / CyQuant® GR *dye* foi preparada por meio da diluição do corante (1:75) no tampão. 50 μl desta mistura foram adicionados em cada poço (já contendo 150 μl da solução de descolamento de células) e a placa foi incubada por 20min à temperatura ambiente. 150 μl da mistura foram transferidos para uma placa preta de 96 poços para a leitura da fluorescência a 520 nm.

4.5 ENSAIOS DE POLIMERIZAÇÃO DA PROTEÍNA TUBULINA

A modulação da tubulina foi avaliada por meio da polimerização da proteína *in vitro*. Foram realizados ensaios de fluorescência utilizando *kits* da *Cytoskeleton* (Denver, CO, USA, código BK011P). Cada *kit* contém 10 mg de tubulina liofilizada purificada de cérebro de porco (em suas isoformas α e β , pureza > 99%), alíquotas de GTP, paclitaxel, DMSO e soluções tamponantes específicas para

reconstituição (*buffer* 1) e polimerização (glicerol) da proteína. O tampão 1 [*general tubulin* (PEM) *buffer*] é constituído por: 80 mM PIPES (piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico); 2 mM cloreto de magnésio ($MgCl_2$); 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 $MgCl_2$; 0,5 mM EGTA e 60% de glicerol em volume em pH 6,9. Os ensaios foram realizados em microplacas pretas de meia área com 96 poços fornecidas junto com o *kit*. Em cada poço foram adicionados 5 μl de composto 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 $MgCl_2$, 15% de glicerol e 10 μM de DAPI; em pH 6,9) com o auxílio de uma pipeta multicanal. A concentração final de DMSO no ensaio foi de 1% a fim de permitir a solubilização dos compostos no meio reacional sem afetar a cinética de reação dos ensaios. Em seguida, a placa foi colocada no fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) pré-aquecido a 37°C. As placas foram analisadas utilizando-se os comprimentos de onda de excitação e emissão de 340 e 460 nm, respectivamente. Foram executados 70 ciclos de leitura com intervalos de 45s entre duas leituras do mesmo poço. Na triagem inicial, os compostos foram avaliados em concentração única (100 μM). Na determinação do IC_{50} , 7 concentrações foram empregadas com base na pré-triagem.

4.6 ENSAIO DE COMPETITIVIDADE PELO SÍTIO DA COLCHICINA

Tubulina (4 μM), proveniente do *kit* utilizado no ensaio de polimerização anterior (Seção 4.5), foi misturada com colchicina (4 μM) e incubada com quatro concentrações (25 / 5 / 1 e 0,2 μM) dos compostos ou dos controles (positivo: podofilotoxina; ou negativos: paclitaxel ou vimblastina) em PEM *buffer* a 37°C por 1h. Leituras de fluorescência ($\lambda_{excitação}$ 365 nm, $\lambda_{emissão}$ 435 nm) foram registradas usando um fluorímetro SpectraMax Gemini EM (Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA), e os valores foram normalizados em relação ao tampão e à fluorescência da própria amostra. Assim, a razão F/F_0 pode ser calculada, onde F_0 refere-se à fluorescência do complexo colchicina-tubulina e F a fluorescência de uma concentração indicada do composto na competição por este complexo.

4.7 MARCAÇÃO DE DNA NUCLEAR COM HOECHST 33342

Com o intuito de verificar alterações no material genético de células de CM e CaP causadas pela ação dos compostos, realizou-se um ensaio de marcação fluorescente de DNA com o corante azul núcleo-específico Hoechst 33342 (Invitrogen, Thermo Fisher Cientific Inc., Estados Unidos). Para isso, 1×10^5 células das linhagens MDA-MB-231 e DU-145 foram cultivadas em placas de Petri (SPL Life Sciences Inc., Coreia do Sul) durante 24h em estufa a 37°C com 5% de CO_2 . Uma vez aderidas, as células foram lavadas com 1x PBS e incubadas com os compostos a 10 μM , controle positivo (colchicina também a 10 μM) e dois controles negativos (sem DMSO e com DMSO 1%) por 48h nas mesmas condições anteriores. Finalizado o período de incubação, as células foram novamente lavadas com 1x PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído a 4% em 1x PBS e 0,05% de Triton X-100 durante

10min. Em seguida, após outra etapa de lavagem, as células foram tratadas e incubadas com uma solução do marcador Hoechst 33342 (5 µg/ml) em 1x PBS por 30min no escuro. Ao término do tempo destinado à marcação com Hoechst, as células foram lavadas com 1x PBS para retirar o excesso do corante e as placas levadas ao microscópio. As imagens foram capturadas por microscopia confocal de fluorescência com o auxílio de um microscópio invertido Axio Vert.A1 (ZEISS, Estados Unidos) na objetiva de 20x. O filtro DAPI foi escolhido em função das semelhanças existentes entre ambos os marcadores em relação aos seus comprimentos de excitação e emissão. Por essa razão, o corante foi excitado em comprimento de 358 nm e a emissão da fluorescência coletada em 461 nm. O software ZEN 2.3 (ZEISS, Estados Unidos) foi empregado para registro e manuseio das imagens, possibilitando a avaliação qualitativa da morfologia, distribuição e conteúdo dos núcleos devidamente corados.

4.8 DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO DE RESISTÊNCIA

A determinação do CC_{50} na célula recombinante não-tumoral epitelial de rim embrionário humano (HEK-293 T-RExTM) para cada composto foi realizada conforme descrito na seção 4.3 acima. A linhagem foi fornecida pela colaboradora Dra. Annemarie Wehenkel, do Instituto Pasteur (Paris, França) e foi transformada com gene que codifica para a isoforma β_{III} da proteína tubulina. A relação de resistência (*resistance ratio*, Rr) é a razão entre os valores de CC_{50} da célula mutante (T5, superexpressando β_{III}) pelo CC_{50} da linhagem parental (*wild*, não transformada).

4.9 DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS

Para obter uma visão mais abrangente de como os MTAs afetam a dinâmica dos MTs, as compreensões mecânicas obtidas a partir de experimentos *in vitro* devem ser contextualizadas dentro das células e, inversamente, os fenótipos observados nas células devem ser compreendidos mecanisticamente *in vitro*.

4.9.1 LINHAGEM E CULTIVO CELULAR

Células MDA-MB-231 expressando de maneira estável EB3-GFP foram cultivadas em DMEM com alta concentração de glicose, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e foram negativas para contaminação por micoplasma. Os cometas de EB3-GFP foram capturados por imagem após 1h (amostras fixas) ou dentro de 40min (células vivas) de tratamento, a fim de determinar os efeitos dos MTAs na dinâmica do extremo positivo (*plus-end*) dos MTs.

4.9.2 COMPOSTOS E TRATAMENTOS

O veículo DMSO e o insumo farmacêutico ativo colchicina (*Sigma-Aldrich*[®]) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Soluções estoque dos compostos *cis-2e* e *para-3d* foram preparadas a 20 mM em 100% de DMSO e armazenadas a -80°C. Soluções de uso a 10 mM foram preparadas e armazenadas a -20°C. Diluições seriadas foram preparadas no dia dos ensaios em

meio de cultura (células) ou tampão MRB80 (*in vitro*), a partir das soluções de uso, para obter uma concentração desejada do composto e não exceder 0,1% do veículo.

4.9.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA EM CÉLULAS FIXADAS

4.9.3.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CAMPO AMPLO

Células MDA-EB3-GFP foram cultivadas em lamínulas de vidro Ø12 mm em placas de 24 poços por 72h. As células foram incubadas por 1h em 500 µl/poço do meio de cultivo correspondente a cada tratamento. Em seguida, as células foram fixadas por 15min com metanol frio (-20°C), seguido por 10min com paraformaldeído a 4% em temperatura ambiente (bancada) em 1x PBS. Após isso, o fixativo foi aspirado, e as células foram lavadas 3 vezes por 5min com 1x PBS. Em seguida, as lamínulas foram imersas em etanol a 70%, seguido por 100%, e o excesso de solvente foi removido tocando levemente em um lenço de papel. As amostras foram deixadas secar ao ar em um ambiente escuro à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas com 2 µl/gota/lamínula de meio de montagem ProLong™ Diamond (*Thermo Fisher Scientific*) e seladas com esmalte de unha.

4.9.3.2 IMAGENS DE CÉLULAS VIVAS

O meio das células foi trocado por meio com o composto e, em seguida, elas foram capturadas ao vivo em um microscópio Nikon TIRF para os cometas EB3-GFP em movimento, com intervalos de quadro de 0,1s, em uma plataforma a 37°C para imagem de células vivas. Pequenos vídeos (1min) foram adquiridos, e os cometas foram analisados no *Fiji (ImageJ)* mediante a geração de quimiografias e medição manual do declive para calcular a velocidade dos cometas individuais. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois dias diferentes para o controle.

4.9.4 ENSAIO DE RECONSTITUIÇÃO *IN VITRO*

4.9.4.1 PREPARAÇÃO DAS SEMENTES DE MICROTÚBULOS

Sementes de MTs estabilizadas com GMPCPP (um análogo de GTP) em duplo ciclo foram utilizadas como modelos para a nucleação nos ensaios *in vitro*. As sementes de MT estabilizadas com GMPCPP foram preparadas conforme descrito anteriormente (111). Em resumo, uma mistura de tubulina composta por 70% de tubulina de cérebro de porco sem marcação, 18% de tubulina de porco marcada com biotina e 12% de tubulina de porco marcada com rodamina (todas da *Cytoskeleton*) foi incubada com 1 mM de GMPCPP (*Jena Biosciences*) a 37°C por 30min. Os MTs polimerizados foram sedimentados por centrifugação em um Airfuge por 5min a $199.000 \times g$ e, em seguida, despolimerizados em gelo por 20min. Em seguida, os MTs foram deixados para polimerizar novamente a 37°C com a adição de 1 mM de GMPCPP recém-preparado. As sementes de MT polimerizadas foram novamente sedimentadas como descrito acima e diluídas em dez vezes em tampão MRB80 (80 mM de Pipes, 4 mM de MgCl₂, 1 mM de EGTA, pH ajustado para 6,8 com KOH) contendo 10% de glicerol. Por fim, as

sementes de MT foram congeladas rapidamente em nitrogênio líquido e armazenadas em um freezer a -80°C até o uso.

4.9.4.2 ENSAIO DE RASTREAMENTO DA EXTREMIDADE POSITIVA DOS MICROTÚBULOS *IN VITRO*

Sementes de MTs estabilizadas com GMPCPP em duplo ciclo foram utilizadas como modelos para a nucleação. Os ensaios *in vitro* com MTs dinâmicos foram realizados conforme descrito anteriormente (40). Em resumo, lamínulas quadradas de vidro limpas a plasma foram fixadas em lâminas de microscópio por duas tiras de fita adesiva dupla face. As lamínulas foram funcionalizadas por incubação sequencial com 0,2 mg/ml de PLL-PEG-biotina (*Susos AG*) e 1 mg/ml de neutravidina (*Invitrogen*) em tampão MRB80. Em seguida, sementes de MTs estabilizadas com GMPCPP foram fixadas às lamínulas por meio de interações biotina–neutravidina. Durante a etapa de bloqueio subsequente com 1 mg/ml de κ -caseína, para evitar a ligação não específica de proteínas, a mistura de reação contendo o composto a ser avaliado foi centrifugada em um Airfuge por 5min a $119.000 \times g$. Para os MTs dinâmicos, a mistura de reação consistiu em tampão MRB80 suplementado com 15 μM de tubulina de cérebro de porco 100% escura (*dark tubulin*, tubulina não marcada) e 20 nM de GFP-EB3, 50 mM de KCl, 1 mM de GTP, 0,2 mg/ml de κ -caseína, 0,1% de metilcelulose e uma mistura captadora de oxigênio (50 mM de glicose, 400 $\mu\text{g/ml}$ de glicose oxidase, 200 $\mu\text{g/ml}$ de catalase e 4 mM de DTT). Após a centrifugação, a mistura de reação foi adicionada à câmara de fluxo e esta foi vedada com graxa de vácuo. Imagens em lapso de tempo da dinâmica dos MTs foram adquiridas imediatamente a 30°C usando um microscópio TIRF. Todo o produto de tubulina foi fornecido pela *Cytoskeleton Inc.* O crescimento dos MTs foi registrado ao longo do tempo a 2s por quadro. Os experimentos foram realizados em triplicata em dois dias diferentes para o controle.

4.9.5 MICROSCOPIA

4.9.5.1 MICROSCOPIA DE CAMPO AMPLO

Células MDA-MB-231 EB3-GFP fixadas e coradas foram capturadas utilizando iluminação de fluorescência em campo amplo em um microscópio Nikon Eclipse Ni invertido equipado com uma câmera Nikon DS-Qi2 (*Nikon*), um iluminador de fibra pré-centrado Intensilight C-HGFI (*Nikon*), filtro ET-EGFP (*Chroma*), controlado pelo *software Nikon NIS Br* e utilizando uma objetiva de óleo Plan Apo Lambda 100 \times NA 1.4 (*Nikon*). Para a apresentação, as imagens foram ajustadas em termos de brilho usando o software ImageJ 1.50b.

4.9.5.2 MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE REFLEXÃO INTERNA TOTAL (TIRF)

Células MDA-MB-231 EB3-GFP vivas e ensaios de reconstituição *in vitro* foram capturados em configurações de microscópio TIRF previamente descritas (iLas2) (112). Em resumo, foi utilizado um

microscópio de pesquisa invertido Nikon Eclipse Ti-E (*Nikon*) com o sistema de foco perfeito (*Nikon*), equipado com a objetiva de óleo Nikon CFI Apo TIRF 100× 1.49 N.A. (*Nikon*) e controlado pelo software MetaMorph 7.10.2.240 (*Molecular Devices*). O microscópio foi equipado com um iluminador TIRF-E motorizado modificado pela Gataca Systems (França). Para manter as amostras *in vitro* a 30°C, foi utilizado um incubador no topo do estágio, modelo INUBG2E-ZILCS (*Tokai Hit*). Para a excitação, foram utilizados lasers Vortran Stradus 488 de 490 nm com 150 mW (*Vortran*) e Cobolt Jive de 561 nm com 100 mW (*Cobolt*). Foi utilizado o conjunto de filtros ET-GFP 49002 (*Chroma*) para a imagem do EB3 marcado com GFP e o conjunto de filtros ET-mCherry 49008 (*Chroma*) para a imagem das sementes de tubulina marcadas com rodamina. O sistema iLas3 (*Gataca Systems*) é um iluminador de laser duplo para iluminação TIRF azimutal (ou Hilo) e uma opção direcionada de fotomanipulação. Este sistema foi instalado em um microscópio Nikon Ti (com o sistema de foco perfeito, *Nikon*), equipado com laser Vortran Stradus 488 de 150 mW (*Vortran*) e laser OBIS de 561 nm com 100 mW (*Coherent*), conjuntos de filtros 49002 e 49008 Chroma, câmera EMCCD Evolve DELTA 512 (*Teledyne Photometrics*) com lente intermediária 2.5X (*Nikon C mount adaptor 2.5X*), câmera CCD CoolSNAP MYO (*Teledyne Photometrics*) e controlado pelo software MetaMorph 7.10.2.240 (*Molecular Devices*). Para manter as células vivas a 37°C ou as câmaras *in vitro* a 30°C, foi utilizado um incubador no topo do estágio, modelo INUBG2E-ZILCS (*Tokai Hit*). A resolução final usando a câmera EMCCD foi de 0,064 µm/pixel e usando a câmera CCD foi de 0,045 µm/pixel.

4.9.6 ANÁLISE DAS IMAGENS

4.9.6.1 ANÁLISE DA DINÂMICA DA EXTREMIDADE POSITIVA DOS MICROTÚBULOS EM CÉLULAS

Células MDA-MB-231 expressando de maneira estável o EB3-GFP foram cultivadas em lamínulas por 48h. As células foram tratadas com compostos e imagens foram capturadas a cada 0,1s por quadro, no modo de aquisição contínua, utilizando um microscópio TIRF, dentro de um intervalo de 40min após a adição de cada respectivo composto. Os parâmetros dinâmicos dos microtúbulos foram mensurados a partir de quimiografias criadas utilizando o plugin *MTrackJ* v.1.5.1 (<https://github.com/imagescience/MTrackJ/>) no software *ImageJ*, a fim de facilitar o rastreamento de objetos em movimento nas sequências de imagens. Os parâmetros dinâmicos foram medidos exclusivamente para os MTs na parte interna da célula, excluindo-se o córtex celular. Para calcular as taxas de crescimento, considerou-se a velocidade dos deslocamentos dos extremos dos microtúbulos superiores a 0,5 mm. A frequência de catástrofes por minuto foi calculada dividindo-se o número total de eventos de crescimento pelo tempo total de crescimento em minutos.

4.9.6.2 ANÁLISE DA DINÂMICA DA EXTREMIDADE POSITIVA DOS MICROTÚBULOS *IN VITRO*

Filmes de MTs dinâmicos, adquiridos conforme descrito anteriormente, foram corrigidos para o desvio e quimiografias foram geradas utilizando o plugin *KymoResliceWide* v.0.4 do *ImageJ* (<https://github.com/ekatrukha/KymoResliceWide>). As extremidades dos MTs foram rastreadas com linhas, e os comprimentos e ângulos medidos foram utilizados para calcular os parâmetros de dinâmica dos MTs, como taxa de crescimento e frequência de catástrofe. Todos os eventos com taxas de crescimento superiores a 0,24 $\mu\text{m}/\text{min}$ foram categorizados como eventos de crescimento, enquanto todos os eventos com taxas de encolhimento superiores a 0,24 $\mu\text{m}/\text{min}$ foram categorizados como eventos de encolhimento. Os eventos com taxas de crescimento mais lentas ou taxas de encolhimento mais rápidas do que as taxas mencionadas anteriormente foram categorizados como eventos de pausa. Apenas eventos de crescimento com mais de 0,40 μm e eventos de pausa com mais de 20s foram incluídos na análise. A frequência de transição foi calculada dividindo a soma dos eventos de transição por experimento pelo tempo total em que esse evento poderia ter ocorrido.

4.10 ESTUDO FARMACOCINÉTICO

4.10.1 DETERMINAÇÃO EXPERIMENTAL DO COEFICIENTE DE DISTRIBUIÇÃO (ELOGD)

Para determinar a lipofilicidade dos compostos, foi utilizada uma metodologia baseada no tempo de retenção de moléculas em fase estacionária reversa (coluna de HPLC Ascentis® RP-*Amide*). O cromatograma foi obtido usando cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS/MS). Cetoconazol e atenolol foram usados para a construção da curva de calibração do ensaio. Os compostos foram preparados a 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ adicionando a solução estoque em (1:1) fases móveis A:B + padrão interno a 200 nM (A: 5% de metanol em 10 mM de acetato de amônio pH 7,4 / B: 100% de metanol). A concentração de DMSO não ultrapassou 2%. A lipofilicidade foi avaliada pela injeção individual dos compostos e de uma série de oito medicamentos comerciais para os quais os valores de LogD já foram determinados, cobrindo uma faixa de -1,86 a 6,1. O tempo de retenção, em minutos, de cada um dos padrões foi plotado contra seus valores de LogD. A equação resultante para a curva de calibração ($y = mx + b$) foi usada para determinar os valores para os compostos-teste e para os controles cloranfenicol e loratadina (113,114).

4.10.2 PERMEABILIDADE DE MEMBRANA ARTIFICIAL PARALELA

Para determinar a permeabilidade passiva dos compostos, foi usada uma placa de 96 poços contendo membranas pré-revestidas com lipídios (*Corning Gentest* #353015 – Glendale, Arizona, USA). As soluções dos compostos foram preparadas diluindo as soluções estoque (10 mM) em 1x PBS pH 6,5 a uma concentração final de 10 μM . As soluções diluídas foram então adicionadas à porção doadora da placa (300 $\mu\text{l}/\text{poço}$), enquanto na porção acceptora foi adicionado PBS pH 7,4 (200 $\mu\text{l}/\text{poço}$). As duas porções da placa foram então acopladas e o sistema foi incubado durante 5h a 37°C. No final

da incubação, as amostras foram coletadas das placas doadora e receptora e, em seguida, adicionadas às placas contendo solução de extinção (10% de água e 90% de metanol:acetonitrila (50:50) + tolbutamida 50 nM). As concentrações finais dos compostos nos poços doadores, receptores e da solução inicial (T_0) foram analisadas usando LC-MS/MS. Os resultados foram usados para calcular um valor de permeabilidade efetiva (P_e). O ensaio foi realizado em triplicata (115,116).

4.10.3 ESTABILIDADE METABÓLICA

A estabilidade metabólica dos compostos foi avaliada em um *pool* de microsossomos de fígado de camundongo CD-1 machos sexualmente maduros (*GIBCO*TM) e em microsossomos de fígado humano (*pool* de 200 doadores, *XenoTech*) ambos caracterizados por atividades relevantes das enzimas do citocromo (CYP) P450. Os compostos foram preparados na concentração de 0,5 μ M e incubados com 0,25 mg/ml de microsossomos de fígado a pH 7,4 e 37°C. A reação começou pela adição de NADPH a 0,5 μ M. As amostras foram retiradas aos 0, 5, 10, 15, 20 e 30min. A reação foi interrompida pela adição de acetonitrila:metanol (1:1) contendo tolbutamida a 50 nM como padrão interno. Os compostos foram quantificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com detector triplo quadrupolo (LC-MS/MS). As razões de área de pico (analito/padrão interno) foram convertidas em % restante usando a razão de área no tempo 0 como 100%. A meia-vida ($T_{1/2} = \ln(2)/k$) em minutos e depuração intrínseca ($CL_{int} = k \times 1000/(0,25)$) em μ l/min/mg foram calculados usando uma regressão não linear de % restante *versus* tempo de incubação. A partir deste gráfico, a inclinação (k) foi determinada. As condições de análise foram: coluna analítica (*Gemini C18*, 5062,0 mm, 3 mm, *Phenomenex*); fonte de ionização por *electrospray* (ESI) em modo positivo e negativo; fase móvel A (água + 0,1% de ácido fórmico) e B (acetonitrila + 0,1% de ácido fórmico); taxa de fluxo de 0,7 ml/min (117–119).

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

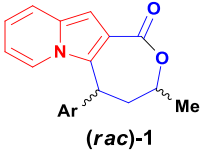
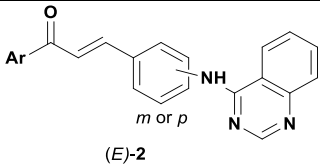
Os valores de IC_{50} e CC_{50} foram determinados usando o método de regressão não-linear mais adequado nas curvas de concentração *vs* resposta. Nos ensaios de dinâmica dos MTs, a significância estatística foi analisada utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney (teste U), conforme indicado nas legendas das figuras. Detalhes adicionais, como explicações, número de medidas e medidas de precisão, também podem ser encontrados nas legendas das figuras. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 9.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CITOTOXICIDADE

Esta medida quantitativa está relacionada à potência de uma determinada substância na inibição *in vitro* da função biológica em 50%. Os métodos *in vitro* são rápidos e permitem diferentes tipos de análises simultâneas associadas com a redução do número de animais utilizados para a pesquisa na fase inicial do desenvolvimento de novos fármacos. Os 32 compostos-teste (**Tabela 5**) foram inicialmente perfilados frente as linhagens de CM triplo-negativa (MDA-MB-231) e de CaP hormônio-refratária (DU-145) em ensaios de proliferação celular para a determinação dos seus valores de IC₅₀.

Tabela 5 – *Cis*- e *trans*-indolizina lactona **1**, e híbrido *meta*- e *para*-quinazolina-chalcona **2**.

 (<i>rac</i>)-1	 (<i>E</i>)-2
Ph (<i>cis</i> -1a)	-
Ph (<i>trans</i> -1a)	-
3-FPh (<i>cis</i> -1b)	-
3-FPh (<i>trans</i> -1b)	-
3-ClPh (<i>cis</i> -1c)	-
3-ClPh (<i>trans</i> -1c)	-
4-BrPh (<i>cis</i> -1d)	-
4-BrPh (<i>trans</i> -1d)	-
3-MeOPh (<i>cis</i> -1e)	-
3-MeOPh (<i>trans</i> -1e)	-
3,5-MeOPh (<i>cis</i> -1f)	-
3,5-MeOPh (<i>trans</i> -1f)	-
3,4,5-MeOPh (<i>cis</i> -1g)	-
3,4,5-MeOPh (<i>trans</i> -1g)	-
Piperonyl (<i>cis</i> -1h)	-
Piperonyl (<i>trans</i> -1h)	-
Piperonyl (<i>cis</i> -2a)	-
Piperonyl (<i>trans</i> -2a)	-
5,6,7,8-tetrahydro-indolizine (<i>cis</i> -2b)	-
Thiolated (<i>cis</i> -2c)	-
Trifluoromethyl ketone (<i>cis</i> -2d)	-
n-butyl acrylate (<i>cis</i> -2e)	-
-	Ph (<i>meta</i> -3a)
-	Ph (<i>para</i> -3a)
-	4-MePh (<i>meta</i> -3b)
-	4-MePh (<i>para</i> -3b)
-	3-(OCH ₂ C≡CH)Ph (<i>meta</i> -3c)
-	3-(OCH ₂ C≡CH)Ph (<i>para</i> -3c)
-	4-(OCH ₂ C≡CH)Ph (<i>meta</i> -3d)
-	4-(OCH ₂ C≡CH)Ph (<i>para</i> -3d)
-	3(OCH ₃)-4-(OCH ₂ C≡CH)Ph (<i>meta</i> -3e)
-	3(OCH ₃)-4-(OCH ₂ C≡CH)Ph (<i>para</i> -3e)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Considerando as estruturas, podem-se observar tendências interessantes baseadas em diferentes padrões de substituição. Exceto para *trans-1a*, *trans-1c* e *trans-1g*; todos os compostos das duas séries apresentaram atividade antiproliferativa em pelo menos uma das linhagens tumorais testadas.

Para CM (Tabela 6), os compostos ativos (*hit compounds*) identificados foram *cis-1a*, *cis-1b*, *trans-1b*, *cis-1c*, *cis-1d*, *trans-1d*, *cis-1e*, *trans-1e*, *cis-1f*, *trans-1f*, *cis-1h*, *trans-1h*, *cis-2a*, *trans-2a*, *cis-2b*, *cis-2c*, *cis-2d*, *cis-2e*, *meta-3a*, *para-3a*, *meta-3b*, *meta-3c*, *para-3c*, *meta-3d*, *meta-3e* e *para-3e*. Por outro lado, os análogos *trans-1a*, *trans-1c*, *cis-1g*, *trans-1g*, *para-3b* e *para-3d* revelaram-se inativos ($IC_{50} > 100 \mu M$). Os compostos *trans-1d*, *cis-1e* e *cis-1f* apresentaram IC_{50} na região do médio a alto micromolar ($20 \mu M < IC_{50} \leq 30 \mu M$), com valores tendendo a $20 \mu M$. *Cis-1d* apresentou bom perfil de atividade antiproliferativa, com valor de IC_{50} na faixa micromolar média ($10 \mu M < IC_{50} \leq 20 \mu M$). Os compostos *cis-2c*, *cis-2d*, *cis-2e*, *meta-3a*, *para-3a*, *meta-3b*, *meta-3c*, *para-3c*, *meta-3d*, *meta-3e* e *para-3e* por sua vez, foram os mais potentes entre os demais testados para CM, com valores de IC_{50} na faixa micromolar baixa ($\leq 10 \mu M$). Portanto, fazendo um resumo das relações entre estrutura e atividade (SARs) para as indolizina lactonas e para os híbridos quinazolina-chalconas foi possível observar o seguinte:

(i) Indolizinas lactonas (CM):

isômero cis > trans

X: O > N

R1: $-C_7H_{12}O_2 > -C_6H_5S > -C_2F_3O > -H > -C_3H_7NO$

R2: $-OCH_3 > -H$

R3: $-Br > -H > -OCH_3$

R4: $-OCH_3 > -Cl > -H > -F > -NO_2$

(ii) Híbridos (CM):

padrão meta > para

R1: $-OCH_2-C\equiv CH > -OCH_3 > -H$

R2: $-CH_3 > -H > -OCH_2-C\equiv CH$

(vide Figura 8)

O ensaio ainda permitiu a identificação dos compostos ativos (*hit compounds*) em linhagem de CaP (Tabela 6), os quais foram: *cis-1c*, *cis-1d*, *trans-1d*, *cis-1f*, *cis-1g*, *cis-1h*, *trans-1h*, *cis-2b*, *cis-2c*, *cis-2d*, *cis-2e*, *meta-3a*, *para-3a*, *meta-3b*, *para-3b*, *meta-3c*, *para-3c*, *meta-3d*, *para-3d* e *meta-3e*. Por outro lado, os análogos *cis-1a*, *trans-1a*, *cis-1b*, *trans-1b*, *trans-1c*, *cis-1e*, *trans-1e*, *trans-1f*, *trans-1g*, *cis-2a*, *trans-2a* e *para-3e* revelaram-se inativos. Os compostos *cis-2d*, *cis-2e*, *meta-3a*, *para-3a*, *meta-3b*, *para-3b*, *meta-3c*, *para-3c*, *meta-3d*, *para-3d* e *meta-3e* foram os que apresentaram as melhores atividades antiproliferativas dentre os demais para CaP, com valores de $IC_{50} \leq 10 \mu M$. Um resumo das SARs para as duas séries encontra-se na próxima página:

(i) Indolizinas lactonas (CaP):

isômero cis > trans

X: O > N

R1: -C₇H₁₂O₂ > -C₂F₃O > -C₆H₅S > -H > -C₃H₇NOR2: -OCH₃ > -HR3: -Br > -OCH₃ > -HR4: -Cl > -OCH₃ > -H = -NO₂ = -F

(ii) Híbridos (CaP):

padrão meta > para

R1: -OCH₃ > -OCH₂-C≡CH > -HR2: -OCH₂-C≡CH > -CH₃ > -H

(vide Figura 8)

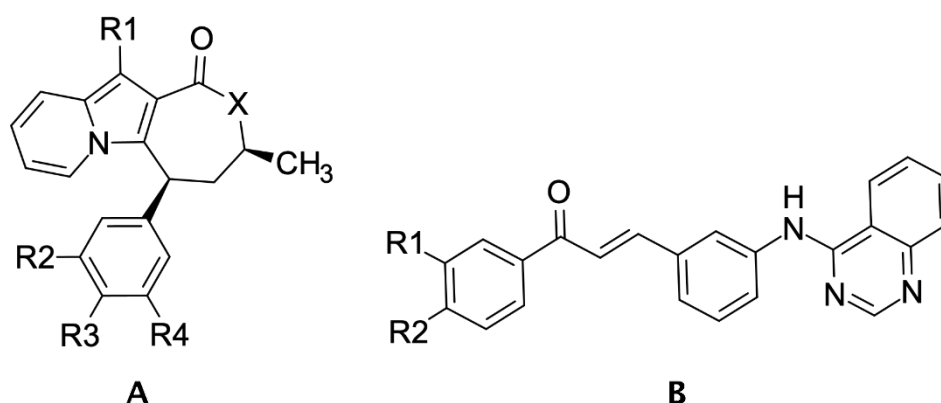


Figura 8 – Estruturas utilizadas para resumo das relações entre as substituições e a atividade antitumoral.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Usualmente, concentrações aceitas de um fármaco no plasma não devem ultrapassar 10 μM porque, acima deste *threshold*, questões de solubilidade e permeabilidade podem começar a surgir impedindo, por exemplo, a possibilidade de desenvolvimento deste para ser administrado de forma oral. Ademais, pode haver a inibição de enzimas necessárias ao correto funcionamento do organismo, levando à problemas de toxicidade devido à atividade fora do alvo (120–122). Dito isto, por atenderem ao critério de seleção, os compostos que prosseguiram para avaliação da citotoxicidade em linhagens não-tumorais sistêmicas e dos respectivos tecidos locais foram: *cis-1d*, *trans-1d*, *cis-1e*, *cis-1f*, *cis-2c*, *cis-2d*, *cis-2e*, *meta-3a*, *para-3a*, *meta-3b*, *para-3b*, *meta-3c*, *para-3c*, *meta-3d*, *para-3d*, *meta-3e* e *para-3e*.

5.2 SELETIVIDADE

Após a triagem em células tumorais foram selecionados os compostos com valores de $\text{IC}_{50} \leq 10$ μM para a triagem em fibroblastos saudáveis—humanos (HFF-1, **Tabela 6**) e murinos (FC3H, **Tabela 6**)—com a finalidade de verificar a seletividade citotóxica dos compostos para células tumorais.

Os fibroblastos são um típico modelo de células utilizados em ensaios de citotoxicidade devido ao seu rápido e fácil crescimento. Nos mamíferos, os fibroblastos são altamente heterogêneos e os maiores constituintes do tecido conjuntivo; e, por conseguinte, grandes produtores de componentes da matriz extracelular tais como colágeno, elastina, glicosaminoglicanas e as glicoproteínas (123–125). A determinação da seletividade citotóxica frente FC3H justifica-se pela importância de testes em camundongos em fases iniciais de desenvolvimento de novos fármacos. Ensaios em humanos somente podem ser realizados quando há evidências sólidas de eficiência e segurança nestes animais. Desse modo, ao conduzir tais ensaios, foi possível avaliar a especificidade de ação dos compostos de maneira mais abrangente e coerente com as etapas experimentais *in vivo* subsequentes. Por fim, visando ampliar a análise da especificidade dos compostos pré-selecionados em relação ao local de manifestação primária dos cânceres avaliados, as linhagens MCF-10A (**Tabela 6**) e RWPE-1 (**Tabela 6**), provenientes de células não-tumorais dos epitélios da mama e da próstata humana, respectivamente, foram empregadas no ensaio de proliferação (126). A seletividade é um parâmetro importante a ser analisado nas etapas iniciais de descoberta de fármacos por ser a razão que mede a janela entre a toxicidade e a atividade de um determinado composto, entretanto, não há um valor consenso para corte. Quanto maior o índice de seletividade ($IS = CC_{50} \text{ não-tumoral} / IC_{50} \text{ tumoral}$), teoricamente, mais eficaz e seguro seria um medicamento durante o tratamento *in vivo*. Para fármacos voltados ao tratamento do câncer, por exemplo, devido à necessidade de uma ação sistêmica e rápida aprovação em função das altas taxas de morbidade e mortalidade da doença, valores mais baixos são costumeiramente observados mesmo em tratamentos de primeira-linha. Aqui foi considerado $IS \geq 10$ e a maior seletividade para critérios de desempate, sendo assim os compostos-líderes selecionados foram a indolizina lactona *cis-2e* e o híbrido quinazolina-chalcona *para-3d* (**Figura 9**).

Tabela 6 – Valores de IC_{50} e CC_{50} nos ensaios de proliferação celular.

COMPOSTOS	$IC_{50} \pm SD$ (μM)		$CC_{50} \pm SD$ (μM)			
	TUMORAIS		NÃO-TUMORAIS			
			SISTÊMICA		TECIDO LOCAL	
	MAMA	PRÓSTATA	FIBROBLASTOS		MAMA	PRÓSTATA
	MDA-MB-231	DU-145	HFF-1 (humano)	FC3H (murino)	MCF-10A	RWPE-1
<i>cis-1a</i>	67,86 ± 6,61	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>trans-1a</i>	> 100	> 100	ND	ND	ND	ND

(continua)

Tabela 6 – Valores de IC₅₀ e CC₅₀ nos ensaios de proliferação celular.
(continuação)

COMPOSTOS	IC ₅₀ ± SD (µM)		CC ₅₀ ± SD (µM)			
	TUMORAIS		NÃO-TUMORAIS			
	MAMA	PRÓSTATA	SISTÊMICA		TECIDO LOCAL	
			FIBROBLASTOS		MAMA	PRÓSTATA
MDA-MB-231	DU-145	HFF-1 (humano)	FC3H (murino)	MCF-10A	RWPE-1	
<i>cis-1b</i>	79,51 ± 21,84	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>trans-1b</i>	52,87 ± 0,84	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>cis-1c</i>	35,99 ± 0,69	54,71 ± 2,59	ND	ND	ND	ND
<i>trans-1c</i>	> 100	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>cis-1d</i>	16,72 ± 0,80	34,41 ± 2,68	0,92 ± 0,22	> 100	ND	ND
<i>trans-1d</i>	21,99 ± 3,44	46,65 ± 7,29	> 100	> 100	> 100	ND
<i>cis-1e</i>	21,05 ± 2,22	> 100	> 100	> 100	> 100	ND
<i>trans-1e</i>	53,03 ± 2,31	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>cis-1f</i>	20,47 ± 0,79	52,41 ± 0,45	> 100	> 100	> 100	ND
<i>trans-1f</i>	27,64 ± 0,99	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>cis-1g</i>	> 100	36,93 ± 2,58	ND	ND	ND	ND
<i>trans-1g</i>	> 100	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>cis-1h</i>	31,95 ± 2,72	52,28 ± 1,46	ND	ND	ND	ND
<i>trans-1h</i>	29,41 ± 5,46	35,67 ± 2,24	ND	ND	ND	ND
<i>cis-2a</i>	57,17 ± 3,99	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>trans-2a</i>	52,44 ± 0,81	> 100	ND	ND	ND	ND
<i>cis-2b</i>	35,59 ± 4,37	56,27 ± 6,82	ND	ND	ND	ND
<i>cis-2c</i>	1,51 ± 0,20	36,42 ± 1,27	> 100	> 100	72,41 ± 2,16	ND
<i>cis-2d</i>	4,19 ± 0,50	8,42 ± 0,64	> 100	> 100	> 100	13,80 ± 2,27

(continua)

Tabela 6 – Valores de IC₅₀ e CC₅₀ nos ensaios de proliferação celular. (conclusão)

COMPOSTOS	IC ₅₀ ± SD (µM)		CC ₅₀ ± SD (µM)			
	TUMORAIS		NÃO-TUMORAIS			
	MAMA	PRÓSTATA	SISTÊMICA		TECIDO LOCAL	
			FIBROBLASTOS		MAMA	PRÓSTATA
MDA-MB-231	DU-145	HFF-1 (humano)	FC3H (murino)	MCF-10A	RWPE-1	
<i>cis-2e</i>	1,01 ± 0,20	4,41 ± 0,93	> 100	> 100	> 100	2,70 ± 0,11
<i>meta-3a</i>	3,97 ± 0,39	7,91 ± 0,64	9,60 ± 1,75	> 100	ND	ND
<i>para-3a</i>	4,58 ± 0,90	5,27 ± 1,05	54,55 ± 4,48	> 100	9,94 ± 0,72	23,78 ± 1,14
<i>meta-3b</i>	3,69 ± 0,71	7,43 ± 0,12	9,28 ± 0,17	27,61 ± 1,90	ND	ND
<i>para-3b</i>	> 100	6,65 ± 0,36	> 100	> 100	ND	46,56 ± 2,93
<i>meta-3c</i>	1,95 ± 0,11	2,89 ± 0,15	3,71 ± 0,36	12,11 ± 1,09	ND	ND
<i>para-3c</i>	2,20 ± 0,27	4,05 ± 0,23	8,72 ± 0,69	> 100	ND	ND
<i>meta-3d</i>	4,33 ± 0,79	6,65 ± 0,23	7,72 ± 0,76	> 100	ND	ND
<i>para-3d</i>	> 100	5,85 ± 0,64	> 100	> 100	ND	> 100
<i>meta-3e</i>	2,13 ± 0,12	2,40 ± 0,09	3,71 ± 0,25	> 100	ND	ND
<i>para-3e</i>	9,02 ± 0,74	> 100	> 100	> 100	6,50 ± 0,14	ND
colchicina	0,009 ± 0,001	0,014 ± 0,002	0,024 ± 0,003	0,019 ± 0,001	0,012 ± 0,001	0,015 ± 0,001
doxorubicina	0,383 ± 0,024	0,095 ± 0,004	0,468 ± 0,009	0,445 ± 0,011	0,206 ± 0,003	0,111 ± 0,002

IC₅₀ = determinada concentração de um composto que inibe 50% da proliferação celular. CC₅₀ = quantidade média de um composto que causaria a morte em 50% das células.

SD = *standard deviation* (um desvio padrão, ou σ , é uma medida de quão dispersos os dados estão em relação à média). ND = não determinado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

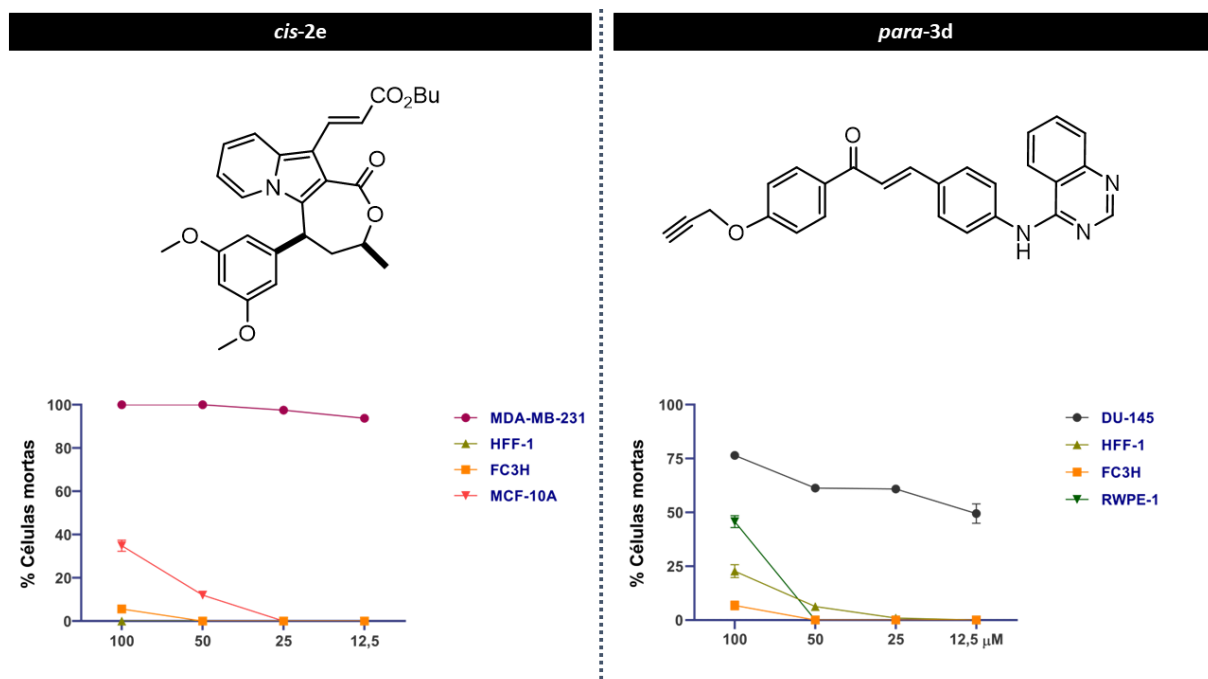


Figura 9 – Estrutura dos compostos-líderes e suas respectivas seletividades para os cânceres de mama e próstata. Fonte: Elaborada pelo autor.

Indolizinas fundidas com um anel lactônico de sete membros foram identificadas como uma estrutura promissora para a descoberta de novos agentes anticancerígenos. Uma biblioteca de indolizina lactonas *cis* e *trans* foi testada quanto à atividade antiproliferativa contra as linhagens celulares de CM e CaP usando uma sequência sintética modular. Um composto inicialmente ativo contra MDA-MB-231 foi um análogo metoxilado, e a funcionalização tardia do núcleo de indolizina resultou em análogos com potências até vinte vezes maiores do que o precursor. Este estudo nos permitiu enfatizar o papel da estereoquímica na atividade biológica das indolizinas lactonas *cis* e *trans* decoradas com variados substituintes. Os compostos *cis* apresentaram melhor desempenho do que os compostos *trans* em termos de citotoxicidade contra ambas as linhagens celulares MDA-MB-231 (CM) e DU-145 (CaP)—com maior afinidade pelas células cancerosas de mama.^{††††} Entre os diastereoisômeros, o *cis-1f* bis-metoxilado mostrou o melhor equilíbrio entre seletividade e citotoxicidade, com $IC_{50} = 20,47 \pm 0,79 \mu M$ contra a linhagem celular de CM. A funcionalização tardia do *cis-1f* aumentou sua atividade antiproliferativa, preservando a seletividade. A decoração dos análogos com grupamentos covalentes, tais como tiol (*cis-2c*) e acrilato de butila (*cis-2e*), resultou em um aumento de 20 vezes na citotoxicidade (IC_{50} *cis-2c* = $1,51 \pm 0,20$ e IC_{50} *cis-2e* = $1,01 \pm 0,20 \mu M$). Interessantemente, o análogo trifluorometil cetona (*cis-2d*) mostrou potencial como inibidor da proliferação celular, mas, com menor toxicidade devido à sua reatividade ($IC_{50} = 4,19 \pm 0,50 \mu M$) (93,127).

^{††††} *Cis-2d* e *cis-2e* avançaram nas etapas iniciais de triagem em DU-145, FC3H e HFF-1, entretanto, foram desclassificados pelo $IS \leq 10$ em RWPE-1 (seletividade local, tecido prostático saudável).

Híbridos de quinazolina e chalconas *orto* e *para* também foram testados quanto à atividade antiproliferativa contra as linhagens celulares de CM e CaP pautando-se na estratégia de hibridização molecular. Esta consiste na combinação de dois ou mais farmacóforos por meio de uma ligação covalente. Esses tipos são chamados de moléculas híbridas e também podem ser denominados de combinações multifuncionais, devido à capacidade que podem ter de atuar em diferentes fatores de uma mesma doença ou de doenças diferentes. A concepção de medicamentos para esses fins é especialmente importante quando se trata de doenças multifatoriais, como o câncer. Em geral, a hibridização é realizada para contrabalançar os efeitos colaterais da outra parte do híbrido e interagir com vários alvos para amplificar seus efeitos como uma entidade única. Dessa forma, as interações medicamentosas são minimizadas e a multifuncionalidade ou os efeitos sinérgicos podem ser alcançados. Este estudo nos permitiu enfatizar o papel do padrão de substituição *meta* e *para* na seletividade dos híbridos. Apesar de atividade antiproliferativa tanto em CM quanto em CaP para a maioria dos compostos ter sido na faixa micromolar baixa e não-tóxicos para FC3H, apenas os análogos fenol *para-3a* (CM e CaP), metilfenol *para-3b* (CaP), éter fenil-propargílico *para-3d* (CaP) e metóxi-acetofenona *para-3e* (CM) passaram pela triagem em fibroblastos humanos saudáveis HFF-1. Os análogos *para-3a* e *para-3e* não foram seletivos em MCF-10A e *para-3d* foi o único seletivo em RWPE-1.

5.3 ATIVIDADE ANTIMIGRATÓRIA

O ensaio celular *wound healing* permite a avaliação qualitativa 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 2 compostos foram avaliados a uma concentração de 10 μ M, o que permitiu a identificação deles como inibidores da migração celular (**Tabela 7**).

Tabela 7 – Resultados da triagem no ensaio *wound healing*.

COMPOSTOS	WOUND HEALING (% INIBIÇÃO \pm SD)	
	MDA-MB-231 (CM)	DU-145 (CaP)
<i>cis-2e</i>	77,83 \pm 1,74	ND
<i>para-3d</i>	ND	60,77 \pm 0,84
colchicina	88,69 \pm 0,91	90,56 \pm 0,79

ND = não determinada.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os compostos ativos selecionados (inibição \geq 50%) foram ainda avaliados a 5 e 1 μ M, o que permitiu a constatação de uma relação concentração vs efeito bem como e a escolha das concentrações a serem utilizadas nos ensaios quantitativos seguintes (**Figura 10**).

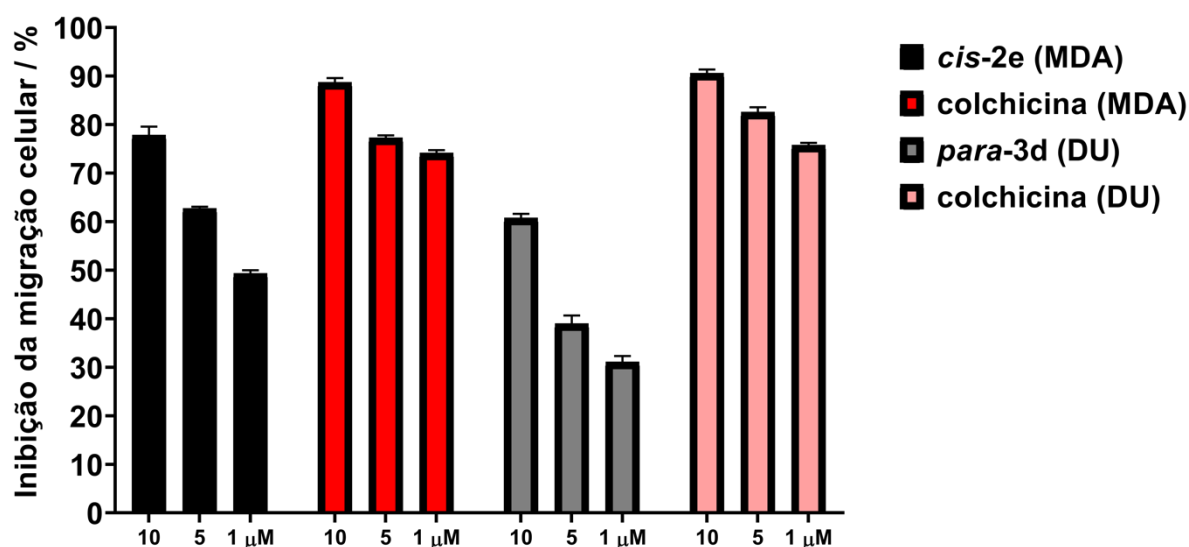


Figura 10 – Ensaio *wound healing* do tipo concentração vs efeito em linhagem de CM (MDA) e CaP (DU).
Fonte: Elaborada pelo autor.

A potência biológica de inibição da migração e invasão celular (**Tabela 8**) dos compostos foi determinada por meio de ensaios baseados em câmara de Boyden. Neste experimento, as células que migram através de uma membrana porosa em direção a um compartimento contendo um quimioatraente, na ausência ou presença de *coating* de colágeno, são desaderidas, lisadas e o conteúdo de DNA quantificado.

Tabela 8 – Valores de IC_{50} (μM) dos compostos nos ensaios de migração e invasão celular.

COMPOSTOS	LINHAGENS CELULARES			
	$IC_{50} \pm SD$ (μM)			
	MDA-MB-231 (CM)		DU-145 (CaP)	
	MIGRAÇÃO	INVASÃO	MIGRAÇÃO	INVASÃO
<i>cis-2e</i>	$1,26 \pm 0,10$	$1,29 \pm 0,19$	ND	ND
<i>para-3d</i>	ND	ND	$5,70 \pm 0,65$	$5,69 \pm 0,78$
colchicina	$0,40 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,03$

ND = não determinado.

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4 IDENTIFICAÇÃO DO ALVO

5.4.1 ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DA POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA PELOS COMPOSTOS ATRAVÉS DE UM SISTEMA TUBULÍNICO-MICROTUBULAR DIRECIONADO

Identificar o mecanismo pelo qual determinado composto atua é importante para compreender possíveis efeitos colaterais ou para ajudar na racionalização do processo de otimização através de modificações moleculares. Tendo em vista as funções celulares críticas dos MTs em todas as fases da divisão celular, o sistema tubulina-MT tem servido como um alvo atrativo para a concepção de

medicamentos anticâncer (128). Nesta parte do trabalho de investigação, concentramos principalmente em elucidar se os compostos atuam no sistema microtubular a fim de validar a atividade antiproliferativa. Em primeiro lugar, no ensaio de inibição da agregação de tubulina *in vitro* para a indolizina lactona e o híbrido quinazolina-chalcona (**Figura 11**), quando a proteína em questão foi incubada com o paclitaxel, a intensidade de fluorescência aumentou mais rapidamente do que o grupo tratado com o veículo (DMSO), o que demonstrou que o paclitaxel promoveu agregação excessiva de tubulina, e o que também vai de acordo com a sua classificação de estabilizador. Em contrapartida, a tendência crescente da intensidade de fluorescência abrandou com o uso da colchicina, podofilotoxina, vimblastina e dos compostos. Esta triagem em concentração única permitiu a caracterização dos compostos como inibidores de polimerização da tubulina que, em consonância com os resultados obtidos até o momento, corroboram a associação da modulação da proteína aos efeitos celulares observados. A determinação do IC_{50} encontra-se na **Tabela 9**.

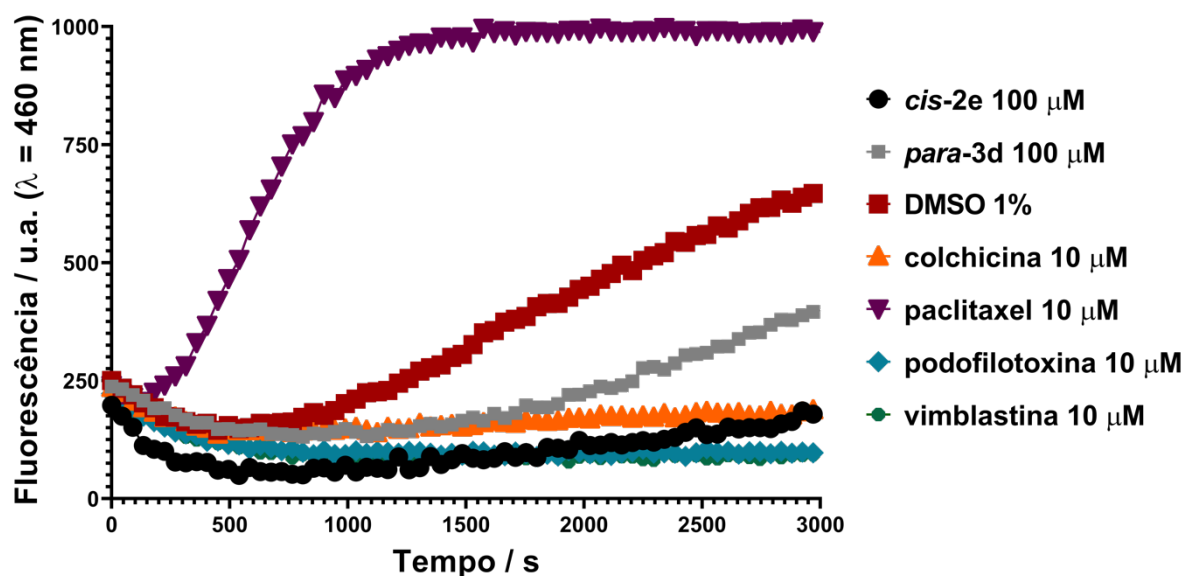


Figura 11 – Curvas de polimerização da tubulina na presença dos controles e compostos selecionados.
Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 9 – Potência dos compostos no ensaio de polimerização do alvo.

COMPOSTO	POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA, IC_{50} $EC_{50}^a \pm SD$ / μM
<i>cis-2e</i>	$0,92 \pm 0,09$
<i>para-3d</i>	$8,40 \pm 0,31$
colchicina	$0,99 \pm 0,03$
paclitaxel	$1,87 \pm 0,10^a$
podofilotoxina	$0,36 \pm 0,01$
vimblastina	$0,17 \pm 0,01$

^aPotência de promoção da polimerização.
Fonte: Elaborada pelo autor.

5.4.2 AMOSTRAS LIGAM-SE À TUBULINA NO SÍTIO DA COLCHICINA

Para confirmar o sítio de interação dos compostos, ensaios de competição pelo sítio da colchicina foram empregados por meio da medição da alteração da fluorescência intrínseca da colchicina quando ligada à tubulina. Como relatado, a competição entre o composto e a colchicina pelo sítio de ligação diminui a fluorescência intrínseca do complexo colchicina-tubulina, reduzindo a quantidade de colchicina ligada. Como controle positivo foi utilizada a podofilotoxina, a qual é conhecida por se ligar ao sítio da colchicina e, portanto, reduzir a fluorescência. O paclitaxel e a vimblastina não tiveram efeito na fluorescência, como era esperado para estes controles negativos. Como mostrado na **Figura 12**, os compostos reduzem a fluorescência intrínseca da colchicina de maneira dependente da concentração.

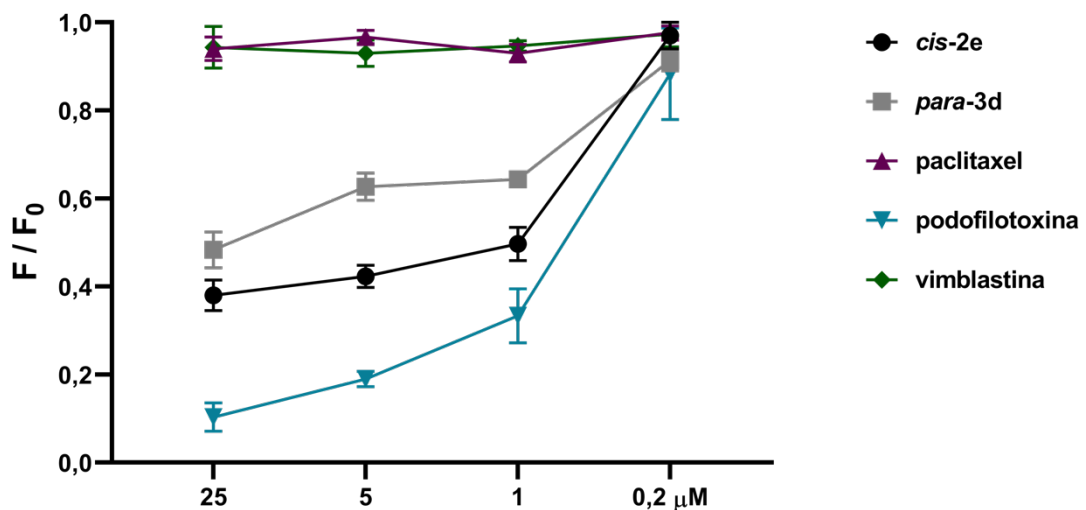


Figura 12 – Ensaio de competição pelo sítio da colchicina. Compostos e podofilotoxina diminuem a fluorescência intrínseca da colchicina, enquanto paclitaxel e vimblastina não.
Fonte: Elaborada pelo autor.

No entanto, verificou-se inibição incompleta em comparação com a podofilotoxina. Isto sugere que os compostos podem não deslocar diretamente a colchicina em seu sítio de interação, mas sim ligar-se alostericamente de forma vicinal à esta região, resultando na diminuição de afinidade de ligação de colchicina à tubulina ou até mesmo por impedimento estérico.

5.5 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Os compostos foram adicionalmente submetidos a um ensaio de marcação nuclear com o corante Hoechst 33342 para avaliar qualitativamente a estabilidade genômica das células tumorais em divisão. Marcadores que se ligam ao DNA podem ser usados para observar a condensação nuclear, possibilitando a distinção de células tumorais em crescimento daquelas em apoptose. No primeiro caso, o núcleo assume perfil esférico com distribuição e coloração uniformes do DNA, enquanto no segundo apresenta-

se usualmente fragmentado e corado mais intensamente. O conteúdo, morfologia e distribuição dos núcleos servem como indicadores da progressão do ciclo celular e podem auxiliar na identificação de fenótipos induzidos por agentes químicos. Quando a divisão celular não ocorre adequadamente, as células-filhas podem herdar complementos genéticos irregulares em estrutura e número, aumentando a taxa de anomalias mitóticas. Dada a interação dos compostos com a tubulina, o ensaio de fluorescência com Hoechst 33342 é capaz de evidenciar instabilidades nucleares, sobretudo fragmentações e demais alterações morfológicas decorrentes da interrupção do fuso mitótico pela modulação da dinâmica microtubular durante a replicação. Nesse contexto, as células de CM e CaP foram incubadas com os respectivos compostos e a colchicina a 10 μM , e dois controles negativos (sem DMSO, e com DMSO 1%). Os resultados do ensaio estão dispostos na **Figura 13**.

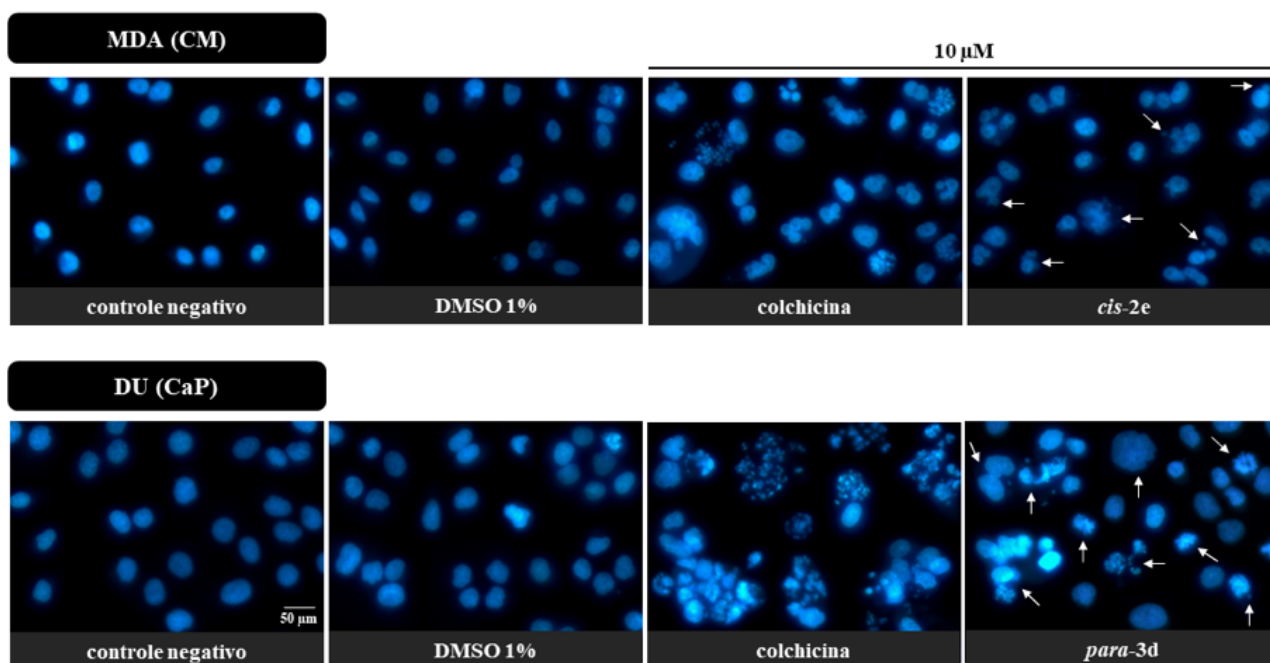


Figura 13 – Efeitos dos compostos na morfologia, conteúdo e distribuição nuclear. As setas indicam as irregularidades genéticas observadas. Núcleos corados com o marcador azul Hoechst 33342 e registrados em aumento de 20x. Barra de escala = 50 μm .

Fonte: Elaborada pelo autor.

É possível observar que as células do controle sem DMSO apresentam núcleos regulares e esféricos com distribuição e coloração uniformes. Comportamento muito similar é verificado no controle com DMSO 1%, ainda que sutis alterações morfológicas e de fluorescência sejam constatadas em decorrência do efeito deste agente.

As células tratadas com colchicina apresentaram notáveis modificações em sua morfologia, verificando-se núcleos fragmentados e fortemente corados, bem como a presença acentuada de células

polinucleadas e apoptóticas decorrentes da inibição das fibras do fuso. As células incubadas com os compostos exibiram características intermediárias entre os controles negativos e aquelas tratadas com colchicina. Nota-se que eles apresentam efeitos semelhantes com alterações morfológicas moderadas, produção de micronúcleos e evidente fragmentação nuclear com ocorrência de células polinucleadas e apoptóticas. Ademais, observa-se que os núcleos expressam heterogeneidade na emissão de fluorescência, ressaltando a instabilidade genômica deles. Tais erros mitóticos encontram-se destacados por setas e evidenciam que os compostos foram capazes de desestabilizar a divisão celular e promover a fragmentação nuclear de células tumorais por meio da capacidade de modulação *in situ* da tubulina.

5.6 ISOFORMAS DA TUBULINA E RELAÇÃO DE RESISTÊNCIA

Nos seres humanos, foram identificadas sete isoformas da α -tubulina e nove da β -tubulina, sendo observada a expressão específica de determinadas isoformas em diferentes tecidos (129). Estas variantes de α/β -tubulina exibem divergências na sequência de resíduos de aminoácidos, notadamente na extremidade C-terminal, composta por uma região altamente desordenada com aproximadamente 18 a 24 resíduos. Apesar dessa variação, as diversas isoformas mantêm sua homologia, apresentando uma identidade em torno de 95% (130). A cauda desempenha papel crucial na interação com outras proteínas, além de ser o sítio de modificações pós-traducionais, conferindo características singulares a cada isoforma. A polimerização de distintas isoformas de tubulina nos microtúbulos influencia sua instabilidade dinâmica, interação com proteínas motoras e com as MAPs^{§§§§§} (*microtubule-associated proteins*), assim como modifica sua afinidade de ligação para diferentes compostos. A isoforma β_I -tubulina é a mais prevalente, ao passo que a β_{III} -tubulina é especificamente encontrada em neurônios e testículos (131). A superexpressão da β_{III} -tubulina está associada a formas agressivas e resistentes à quimioterapia do câncer. A análise das sequências das isoformas da β -tubulina revela que a maior variabilidade se manifesta entre as seguintes isoformas: β_{III} , β_{IV} , β_V , β_{VI} e β_{VII} (59). A **Tabela 10** ilustra algumas discrepâncias entre as β -tubulinas humanas.

Tabela 10 – Distribuição da β -tubulina em células, tecidos e órgãos humanos.

ISOFORMA	CÉLULA/TECIDO/ÓRGÃO
β_I	expressão constitutiva
$\beta_{IIa/b}$	neurônios, pulmão, rim, baço, estômago, timo e adenocarcinoma de próstata
β_{III}	neurônios, células testiculares de Sertoli, tumores agressivos e invasivos

(continua)

^{§§§§§} Proteínas que se associam aos microtúbulos e aumentam a estabilidade destes.

Tabela 10 – Distribuição da β -tubulina em células, tecidos e órgãos humanos. (conclusão)

ISOFORMA	CÉLULA/TECIDO/ÓRGÃO
β_{IVa}	cérebro
β_{IVb}	expressão constitutiva
β_V	adenocarcinoma, útero e endométrio
β_{VI}	megacariócitos e plaquetas
β_{VII}	cérebro

Fonte: MASSAROTTI *et al.* (59)

A alteração na expressão das tubulinas β_I , β_{II} , β_{IVa} e β_V foi relacionada à resistência a compostos interagentes com a tubulina em diversos tipos de câncer. No entanto, a tubulina β_{III} é predominantemente associada à resistência aos alcaloides da vinca e taxanos em vários tipos de cânceres, tais como: estômago, **mama**, ovário, **próstata** e pulmão (132). No **Quadro 2**, Parker *et al.* (130) apresentam alguns dos tipos de câncer nos quais foram observadas modificações na expressão da tubulina e os efeitos decorrentes dessas alterações.

Quadro 2 – Estudos clínicos das alterações na expressão de isoformas da tubulina, tipos de tumor, e resposta à fármacos.

ISOFORMA ALTERADA DA TUBULINA	EFEITO	TIPO DE TUMOR
Aumento na expressão de β_I	baixa resposta ao tratamento com docetaxel	câncer de mama
Diminuição na expressão de β_{II}	relacionado à baixa resposta ao tratamento com taxanos	câncer de mama e ovário
	ou doença em estado avançado	
Aumento na expressão de β_{III}	baixa sobrevida, maus resultados cirúrgico	câncer pulmonar de células não pequenas
	ou de resposta ao tratamento com MTAs	
Aumento na expressão de β_{III}	relacionados com baixa sobrevivência,	câncer de ovário
	má resposta ao tratamento com platina e taxanos,	
	estágio avançado ou doença agressiva	
Aumento na expressão de β_{III}	resposta favorável ao tratamento com taxanos	ovário (adenocarcinoma de células claras)

(continua)

Quadro 2 – Estudos clínicos das alterações na expressão de isoformas da tubulina, tipos de tumor, e resposta à fármacos. (conclusão)

ISOFORMA ALTERADA DA TUBULINA	EFEITO	TIPO DE TUMOR
Aumento na expressão de β_{III}	baixa resposta ao tratamento com taxanos	câncer de mama
Aumento na expressão de β_{III}	baixa resposta ao tratamento com platina/taxanos	carcinoma seroso uterino
Aumento na expressão de β_{III}	baixa resposta ao tratamento com taxanos	câncer de estômago
Aumento na expressão de β_{III}	doença avançada e recaída precoce	câncer de próstata
Aumento na expressão de β_{IVa}	baixa resposta ao tratamento com taxol	câncer de ovário
Aumento na expressão de β_V	resposta favorável ao tratamento com taxanos	câncer pulmonar de células não pequenas

Fonte: PARKER *et al.* (130)

A comparação dos valores de CC_{50} nas células *wild type* (WT) parentais e β_{III} geneticamente manipulada permitiu o cálculo de um valor de resistência relativa, designado como relação de resistência (Rr). A Rr para os compostos *cis-2e* e *para-3d* foi ≤ 1 , indicando que eles são capazes de superar a conhecida resistência aos alcaloides da vinca e taxanos mediada pela isoforma β_{III} da tubulina, suportando a ideia de que eles sejam inibidores atuantes no sítio da colchicina (CBSIs), assim como a podofilotoxina (133). Os resultados estão sumarizados na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Atividade dos compostos em uma linhagem celular superexpressando tubulina β_{III} .

COMPOSTOS	$CC_{50} \pm SD$ (μM)		Rr ($CC_{50} \beta_{III} / CC_{50} WT$)
	HEK-293 WILD TYPE (WT)	HEK-293 T-REx TM TUBB3 (ISOFORMA β_{III})	
<i>cis-2e</i>	0,79 \pm 0,01	0,90 \pm 0,08	1,14
<i>para-3d</i>	6,10 \pm 1,15	5,87 \pm 0,36	0,96
colchicina	0,007 \pm 0,001	0,008 \pm 0,001	1,14
doxorubicina	0,012 \pm 0,003	0,013 \pm 0,002	1,08
paclitaxel	0,0020 \pm 0,0004	> 0,02	> 10
podofilotoxina	0,016 \pm 0,004	0,016 \pm 0,002	1
vimblastina	0,040 \pm 0,005	0,276 \pm 0,041	6,90

Fonte: Elaborada pelo autor.

5.7 DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS

5.7.1 COMPOSTOS MODULAM A DINÂMICA DOS MICROTÚBULOS EM CÉLULAS E EM RECONSTITUIÇÃO *IN VITRO*

Para confirmar se os compostos influenciam a interação entre uma proteína de ligação à extremidade (+) do MT (*end-binding protein*, EB)^{*****} e os MTs, examinamos a localização do EB3 após o tratamento com os compostos em células MDA-MB-231 fixadas, a fim de determinar a concentração do composto a ser utilizada nos ensaios de imagem em tempo real de células vivas e nas reconstituições *in vitro* dos MTs, ambos utilizando o EB3 marcado com GFP como marcador da extremidade (+) do MT (**Figura 14**).

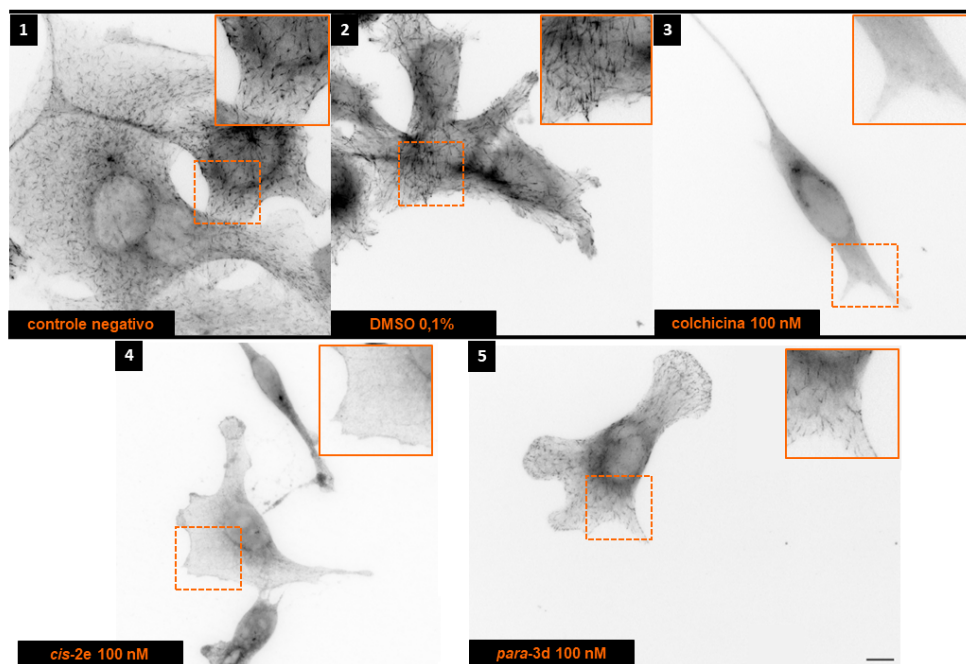


Figura 14 – Imagens de fluorescência de campo amplo de células MDA-MB-231 expressando de maneira estável o EB3-GFP. Tratamentos: **(1)** controle negativo. **(2)** veículo: DMSO 0,1%. **(3)** colchicina. **(4)** *cis*-2e e **(5)** *para*-3d. Todos os compostos a 100 nM. Barra de escala: 10 μm.

Fonte: Elaborada pelo autor.

^{*****} Nas células, a regulação da dinâmica dos MTs desempenha um papel fundamental na divisão celular, polarização e motilidade, envolvendo um grande número de proteínas. Notavelmente, entre essas proteínas, existe uma complexa rede de moléculas que regula a dinâmica dos extremos crescentes (+) dos microtúbulos. Essas proteínas são denominadas proteínas de rastreamento de extremidades positivas (+TIPs) e são evolutivamente conservadas. As proteínas da família de ligação à extremidade atuam como componentes centrais das redes de +TIPs, reconhecendo especificamente o extremo crescente dos MTs e recrutando outras proteínas [143].

Acredita-se que as proteínas de rastreamento da extremidade (+) dos MTs (+TIPs) se associam com os MTs em crescimento e desaparecem quando estes mudam para o encurtamento (45). Observamos que células fixadas (**Figura 14**) e células vivas (**Figura 15**) tratadas com colchicina e os compostos triados apresentaram localização anormal de cometas de EB3 que se reflete em parâmetros como taxa de crescimento e frequência de catástrofe.

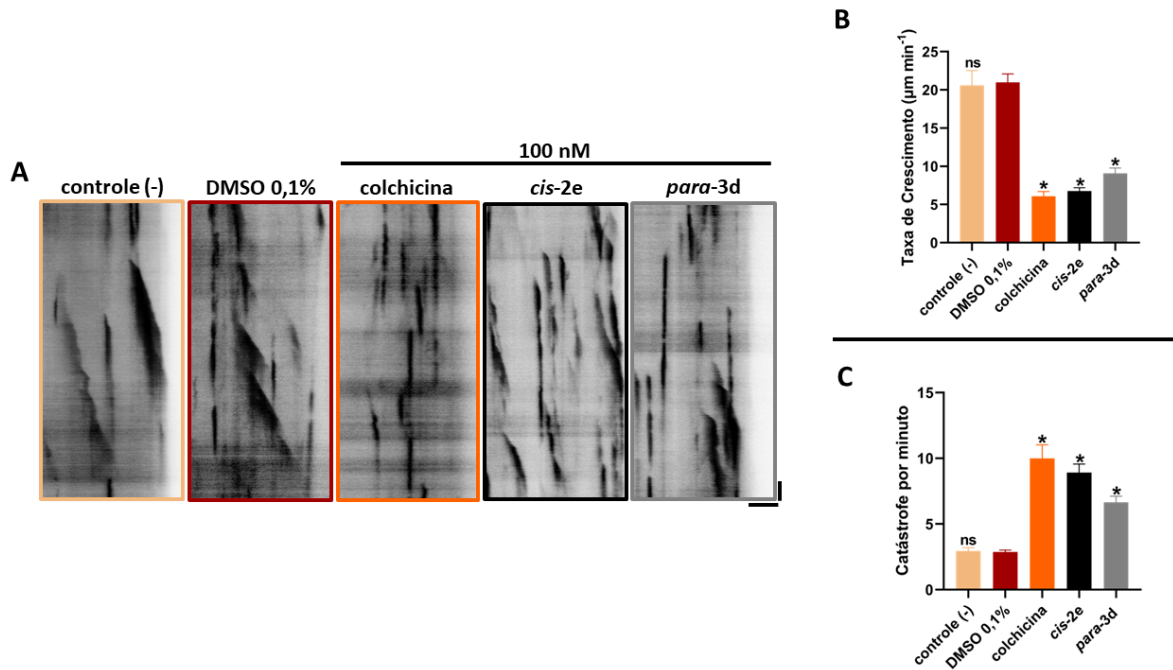


Figura 15 – **A:** A dinâmica dos microtúbulos foi monitorada em células MDA-MB-231 expressando de forma estável o EB3-GFP na extremidade (+) na presença de colchicina, *cis-2e* e *para-3d*, utilizando microscopia em células vivas e sendo ilustrada em quimografias. As barras de tempo (vertical, 2 s) e de distância (horizontal, 2 µm) aplicam-se a todas as imagens. **B:** Quantificação dos efeitos dos compostos nas taxas de crescimento dos microtúbulos celulares. **C:** Quantificação dos efeitos dos compostos nas frequências de catástrofes. Média ± desvio padrão, n = 300 eventos; para todos os gráficos, * $P < 0,0001$, e ns, sem diferença significativa em relação ao veículo DMSO, teste de Mann–Whitney U.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Cis-2e e *para-3d* atenuaram a taxa de crescimento dos MTs e aumentaram a frequência de catástrofes em células, conforme observado anteriormente, e também *in vitro* como apresentado na **Figura 16** a seguir. Nos ensaios de reconstituição dos MTs *in vitro*, entretanto, observamos forte indução de catástrofes por concentrações na faixa de nanomolar para ambos os compostos ao passo que a taxa de crescimento dos MTs foi apenas levemente reduzida. Isso indica que as observações em células vivas refletem um fenômeno fisiologicamente relevante (134). Como estes resultados coincidem com dados previamente obtidos para moduladores da tubulina, como a colchicina, concluímos que os compostos perturbam diretamente a dinâmica dos MTs e que a ligação à tubulina é a causa das ações antiproliferativas e antimigratórias destes compostos.

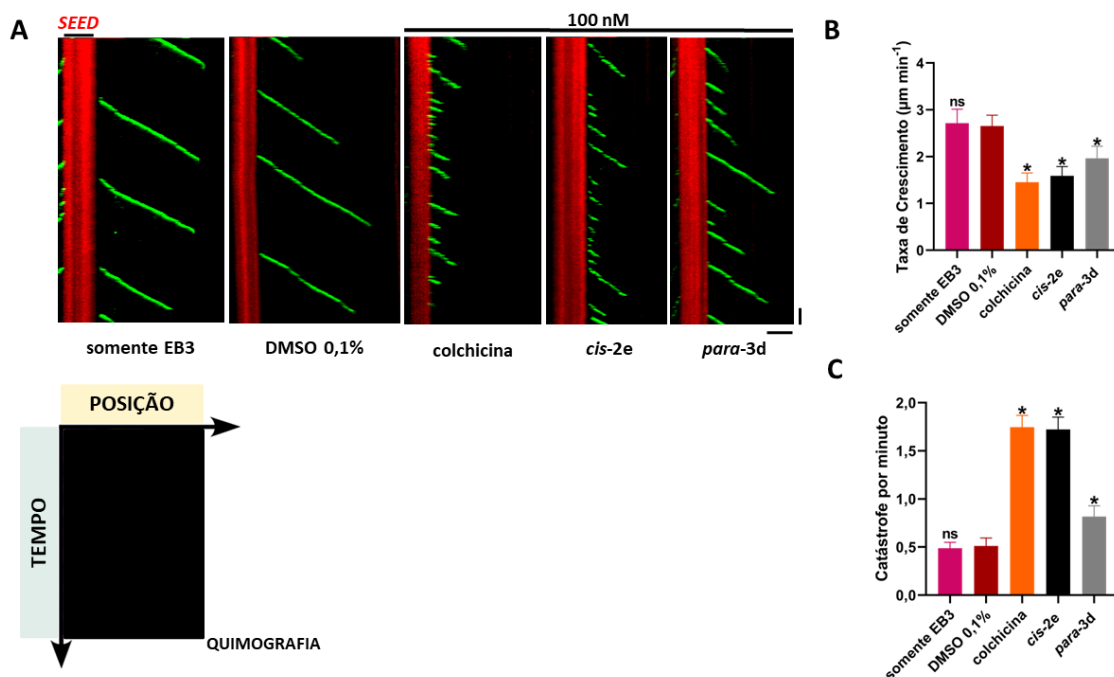


Figura 16 – A: Quimografias representativas ilustrando a dinâmica *in vitro* dos MTs na presença da proteína de rastreamento da extremidade (+) EB3-GFP e dos compostos indicados. Para economizar espaço, as quimografias foram truncadas horizontalmente para as trilhas mais longas de MTs. A barra de tempo (vertical, 60 s) e a barra de distância (horizontal, 2 µm) aplicam-se a todas as imagens. B: Quantificação das taxas de crescimento *in vitro* dos MTs. C: Quantificação das frequências de catástrofes derivadas de experimentos exemplificados em A, na ausência ou presença dos compostos indicados. Média ± desvio padrão, n = 300 eventos; para todos os gráficos, **P* < 0,05, e ns, sem diferença significativa em relação ao veículo DMSO, teste de Mann–Whitney U. Fonte: Elaborada pelo autor.

5.8 PERFIL FARMACOCINÉTICO

A farmacocinética é o estudo do movimento do fármaco no organismo. Um fármaco efetivo deve apresentar uma rota de administração adequada, atingir a concentração necessária para observação do efeito biológico no tecido alvo e 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 (135). Portanto, para compreender as vantagens e limitações das séries de compostos desenvolvidas durante esse trabalho de doutorado e priorizar compostos para futura avaliação *in vivo*, suas propriedades ADME foram avaliadas em colaboração com o Rafael Consolin Chelucci e a Simone Michelan Duarte, ambos pertencentes ao quadro de integrantes do LQMC.

O LogD é o logaritmo do coeficiente de distribuição de um composto entre uma fase orgânica (octanol) e uma fase aquosa (tampão) a um pH específico. Uma porção das moléculas do composto pode estar na forma iônica e uma porção pode estar na forma neutra. A lipofilicidade está relacionada com vários modelos da propriedade de fármacos que afetam ADME e toxicidade. Elas incluem a permeabilidade, absorção, distribuição, ligação às proteínas plasmáticas, metabolismo, eliminação e toxicidade. Por essa razão, o LogD é considerado um dos passos de rotina do processo de

desenvolvimento de medicamentos (136). Os compostos considerados ideais são aqueles com valor moderado de LogD (1–3), pois geralmente apresentam absorção intestinal adequada devido a um bom balanço de solubilidade e permeabilidade de difusão passiva. Entretanto, dependendo de outras características da molécula, compostos com valores de LogD até 5 ainda podem ser absorvidos após administração via oral. Os 2 compostos avaliados apresentaram valores de LogD entre 3 e 5 (**Quadro 3**). Com isto, os compostos apresentam boa permeabilidade, mas a absorção não é significativa, devido à baixa solubilidade. O metabolismo é mais expressivo nesta faixa, devido a maior ligação às enzimas metabólicas, conforme pode ser observado nos resultados em microsomas de camundongo e humano. Os impactos disto *in vivo* são biodisponibilidade e absorção oral respectivamente moderada e variável.

O ensaio PAMPA é uma técnica para triagem de compostos em larga escala, desenvolvida para avaliar sua permeabilidade nos estágios iniciais da P&D de fármacos, considerada uma ferramenta útil para prever a permeabilidade através de membranas biológicas (137). Corroborando os dados anteriores, os compostos apresentaram alta permeabilidade através deste ensaio ($P_e > 1,5$) e foi possível observar a relação inversa com o LogD. O metabolismo é a principal rota de *clearance* de 75% dos fármacos, sendo o fígado o órgão predominante neste processo. Ensaio de estabilidade metabólica de alto rendimento têm sido amplamente implementados e aplicados na descoberta de medicamentos para priorizar séries químicas, orientar modificações estruturais, prever depuração, estabelecer correlações *in vitro* e *in vivo*, e estimar doses. As vantagens de se utilizar microsomas hepáticos são a riqueza de enzimas metabolizadoras—especialmente as do CYP P450, facilidade de obtenção e armazenamento, empregabilidade em triagem de alto desempenho (*high throughput screening*) e o custo relativamente baixo, as quais superam as limitações relacionadas às vias metabólicas incompletas (138).

De uma perspectiva do desenvolvimento de medicamentos, a meia-vida ($T_{1/2}$) é definida como o tempo necessário para a concentração de um composto reduzir à metade de seu valor inicial quando as suas concentrações estão em declínio exponencial simples. É considerado que a $T_{1/2}$ ideal de um composto seja de 12 a 48h, onde a dosagem poderia ser administrada uma vez ao dia por via oral. Se a $T_{1/2}$ for muito curta, pode-se exigir uma dosagem mais frequente para manter as exposições desejadas e evitar picos de concentrações desnecessariamente altos. O *clearance* ou depuração, por sua vez, reflete a capacidade do corpo de eliminar o composto e pode ser quantificada de várias maneiras. Uma delas é a quantificação do *clearance* hepático intrínseco (CL_{int}). A importância da avaliação do CL_{int} está relacionada à eliminação de um composto ou seus metabólitos do corpo, que ocorre por vias de metabolismo e excreção. A $T_{1/2}$ e o CL_{int} têm relação inversamente proporcional, pois quanto mais tempo o composto permanece no organismo, menor será a capacidade de eliminá-lo pelo fígado e vice-versa (139).

Neste ensaio foram obtidos os valores de $T_{1/2}$ dos compostos através da avaliação em microsossomos de fígado de camundongo (MFC) e humano (MFH). Os compostos *cis-2e* e *para-3d* apresentaram melhores $T_{1/2}$ (≥ 34 min) quando incubados com MFH, com valores em torno de 3 e 1h, respectivamente (**Quadro 3**). De acordo com o esperado, os valores de *clearance* obtidos no sistema de camundongo são mais altos devido ao metabolismo mais acelerado dos roedores quando comparado com o humano. Compostos com alta taxa de eliminação não são considerados bons candidatos no desenvolvimento de medicamentos, uma vez que sendo eliminados rapidamente há também a redução do tempo de permanência e, portanto, de atuação no organismo. São considerados bons candidatos os compostos que apresentam eliminação baixa e moderada.

Quadro 3 – Resumo dos dados de ADME *in vitro* para os compostos selecionados.

Composto	ADME <i>in vitro</i>									
	eLogD (pH 7,4)	PAMPA Média Pe (10^{-6} cm/s)	$T_{1/2}$ (min.)				CL_{int} (mic) ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)			
			MFC (camundongo)	Classificação do $T_{1/2}$	MFH (humano)	Classificação do $T_{1/2}$	MFC (camundongo)	Classificação do <i>clearance</i>	MFH (humano)	Classificação do <i>clearance</i>
<i>cis-2e</i>	3,72	34,00	48,81	alto	182,41	alto	56,80	moderado	15,20	baixo
<i>para-3d</i>	4,36	26,18	18,43	moderado	72,96	alto	150,40	alto	38,00	moderado
cloranfenicol	1,56	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
imipramina	ND	ND	15,65	moderado	81,55	alto	177,20	alto	34,00	moderado
loratadina	4,43	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
metoprolol	ND	2,97	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
nadolol	ND	0,10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
varfarina	ND	ND	301,37	alto	346,57	alto	9,20	baixo	8,00	baixo
verapamil	ND	ND	14,32	moderado	21,07	moderado	193,60	alto	131,60	alto

ND: não determinado. Critérios de classificação (PAMPA): $Pe < 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s \rightarrow baixa permeabilidade; $Pe > 1,5 \times 10^{-6}$ cm/s \rightarrow alta permeabilidade. $T_{1/2}$: meia-vida. CL_{int} : *clearance* intrínseco. Critérios de classificação: $T_{1/2} \geq 34$ min \rightarrow eliminação baixa (estabilidade alta); $34 \text{ min} > T_{1/2} \geq 8,5$ min \rightarrow eliminação moderada (estabilidade moderada); $T_{1/2} < 8,5$ min \rightarrow eliminação alta (estabilidade baixa). $CL_{int} < 25$ $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ \rightarrow eliminação baixa (estabilidade alta); $25 \leq CL_{int} < 100$ $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ \rightarrow eliminação moderada (estabilidade moderada); $CL_{int} \geq 100$ $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ \rightarrow eliminação alta (estabilidade baixa).

Fonte: Elaborado pelo autor.

6 VISUALIZAÇÃO DA EVOLUÇÃO DOS COMPOSTOS NO PIPELINE UTILIZADO PARA A OTIMIZAÇÃO *HIT-TO-LEAD*

Quadro 4 – Visualização da evolução dos compostos nas etapas de otimização *hit-to-lead*.

COMPOSTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>cis-1a</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1a</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-1b</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1b</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-1c</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1c</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-1d</i>	Yellow	Grey	Red	Grey	Red	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1d</i>	Yellow	Green	Red	Grey	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-1e</i>	Yellow	Green	Red	Grey	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1e</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-1f</i>	Yellow	Green	Red	Grey	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1f</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-1g</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1g</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-1h</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-1h</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-2a</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>trans-2a</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-2b</i>	Red	Grey	Red	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-2c</i>	Green	Green	Red	Grey	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey
<i>cis-2d</i>	Green	Green	Green	Red	Green	Green	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey	Grey

(continua)

Quadro 4 – Visualização da evolução dos compostos nas etapas de otimização *hit-to-lead*.
(conclusão)

COMPOSTOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
<i>cis-2e</i>	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL
<i>meta-3a</i>	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>para-3a</i>	FAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>meta-3b</i>	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	DESAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>para-3b</i>	DESAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>meta-3c</i>	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	DESAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>para-3c</i>	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>meta-3d</i>	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>para-3d</i>	DESAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	MEDIANO	FAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL
<i>meta-3e</i>	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	DESAVORÁVEL	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO
<i>para-3e</i>	FAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	DESAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	FAVORÁVEL	FAVORÁVEL	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO	NÃO DETERMINADO

LEGENDA DAS CORES:

■	NÃO DETERMINADO
■	FAVORÁVEL
■	MEDIANO
■	DESAVORÁVEL

LEGENDA DOS NÚMEROS:

1/3 – (IC ₅₀) MDA-MB-231 / DU-145
2/4 – (CC ₅₀) MCF-10A / RWPE-1
5/6 – (CC ₅₀) HFF-1 / FC3H
7/8 – <i>Wound healing & Boyden</i> MDA-MB-231 / DU-145
9/10 – Polimerização da tubulina e competição pelo sítio da colchicina
11/12 – Imunofluorescência (Hoechst) MDA-MB-231 / DU-145
13 – Resistência β _{III}
14/15/16 – Dinâmica de microtúbulos (célula fixa / <i>live-cell</i> / reconstituição <i>in vitro</i>)
17/18/19/20/21/22 – eLogD / PAMPA / T _{1/2} camundongo / T _{1/2} humano / Cl _{int} camundongo / Cl _{int} humano

Fonte: Elaborado pelo autor.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dois compostos com atividades antimigratória e anti-invasiva ($IC_{50} \leq 10 \mu M$), seletivamente citotóxicos ($IS \geq 10$) para células triplo-negativas de câncer de mama e hormônio-refratárias de câncer de próstata foram identificadas em duas séries inéditas de indolizinas lactonas e híbridos de quinazolina-chalconas avaliadas dentro do projeto de doutorado financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos 2018/25.289-7 e 2022/00219-1). Os dois compostos (*cis-2e* e *para-3d*) modularam a tubulina *in vitro* sendo responsáveis pela inibição da sua polimerização em microtúbulos. Estudos complementares de mecanismo de ação sugeriram que tal inibição possivelmente tem relação com a interação dos compostos no sítio de ligação da colchicina. Por fim, eles ainda foram capazes de modular a tubulina *in situ* e de evitar, *in vitro*, um dos principais mecanismos de resistência associado a fármacos desta classe: elevada expressão da isoforma β_{III} da tubulina em linhagem recombinante mimetizando o perfil encontrado em tumores agressivos. Ademais, os compostos triados oferecem um conjunto de alternativas estruturais que podem ser exploradas para a otimização múltipla de parâmetros e das características desejáveis a fármacos. De posse dos resultados obtidos foi ainda possível expandir o estudo acessando os efeitos dos compostos na dinâmica dos MTs, os quais foram: atenuação na taxa de crescimento e aumento na frequência de catástrofe, características recorrentes em moléculas que atuam no sítio da colchicina, na proteína tubulina. O perfil farmacocinético delineado permitiu o ajuste fino que embasará a seleção dos compostos-líderes para possíveis ensaios *in vivo*, onde serão levados em consideração seus elevados valores de permeabilidade e estabilidade ($T_{1/2}$ e *clearance*), mesmo que absorção não seja significativa, devido a questões de solubilidade apontadas pelos valores um pouco elevados de LogD. Em relação à formação acadêmica, esta esteve vinculada a um estágio de pesquisa no exterior, na *Universiteit Utrecht* (Utrecht, Países Baixos) e a publicação de um artigo em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Fernando Coelho da UNICAMP (ANEXO).

REFERÊNCIAS

- 1 MARTINS, L. A-C. P.; SILVA, P. J. C.; MUTARELLI, S. R. K. A teoria dos temperamentos: do corpus hippocraticum ao século XIX. *Memorandum: memória e história em psicologia*, v. 14, p. 9-24, 2008.
- 2 KONSTANTINIDOU, M. K. *et al.* Are the origins of precision medicine found in the corpus hippocraticum? *Molecular Diagnosis & Therapy*, v. 21, p. 601–606, 2027. DOI: 10.1007/s40291-017-0291-y.
- 3 CAMPBELL, P. J. *et al.* Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature*, v. 578, p. 82–93, 2020. DOI: 10.1038/s41586-020-1969-6.
- 4 RICH, J. N. Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine (Baltimore)*, v. 95, p. S2–S7, 2016. DOI: 10.1097/MD.0000000000004764.
- 5 BIORENDER. *Stochastic vs cancer stem cell models*. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates>. Acesso em: 10 jan. 2024.
- 6 DILLEKÅS, H.; ROGERS, M. S.; STRAUME, O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Medicine*, v. 8, p. 5574–5576, 2019. DOI: 10.1002/cam4.2474.
- 7 NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER Training Modules. *Prostate cancer*. Disponível em: <https://training.seer.cancer.gov/prostate/>. Acesso em: 24 jan. 2023.
- 8 FERLAY, J. *et al.* *Global cancer observatory: cancer tomorrow*. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>. Acesso em: 09 jan. 2023.
- 9 SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, v. 71, p. 209–249, 2012. DOI: 10.3322/caac.21660.
- 10 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. *Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- 11 SANTOS, M.O. *et al.* Estimativa de incidência de câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v. 69, n. 1, p. 213700–213711, 2023.
- 12 LIST, M.; ALCARAZ, N.; BATRA, R. De novo pathway-based classification of breast cancer subtypes. In: CANZAR, S.; RINGELING, F.R. (ed.). *Protein-protein interaction networks: methods and protocols*. New York: Springer; 2020. p. 201–213. DOI: 10.1007/978-1-4939-9873-9_15.
- 13 SINGH, J. *et al.* Aggressive subsets of metastatic triple negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, v. 20, p. e20–e26, 2020. DOI: 10.1016/j.clbc.2019.06.012.
- 14 BIORENDER. *Intrinsic and molecular subtypes of breast cancer*. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates>. Acesso em: 12 jan. 2024.
- 15 SPORIKOVA, Z.; KOUDELAKOVA, V.; TROJANEC, R.; HAJDUCH, M. Genetic markers in triple-negative breast cancer. *Clinical Breast Cancer*, v. 18, p. e841–e850, 2018. DOI: 10.1016/j.clbc.2018.07.023.

16 WANG, Z.; JIANG, Q.; DONG, C. Metabolic reprogramming in triple-negative breast cancer. *Cancer Biology & Medicine*, v. 17, p. 44–59, 2020. DOI: 10.20892/j.issn.2095-3941.2019.0210.

17 BIORENDER. *Stages of breast cancer*. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates>. Acesso em: 19 jan. 2024.

18 ROSENBERG, J.; BUTOW, P.N.; SHAW, J. M. The untold story of late effects: a qualitative analysis of breast cancer survivors' emotional responses to late effects. *Support Care Cancer*, v. 30, p.177–185, 2022. DOI: 10.1007/s00520-021-06402-7.

19 MANDAPATI, A.; LUKONG, K. E. Triple negative breast cancer: approved treatment options and their mechanisms of action. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, v. 149, p. 3701–19, 2023. DOI: 10.1007/s00432-022-04189-6.

20 QIU, D. *et al.* Prospects of immunotherapy for triple-negative breast cancer. *Frontiers in Oncology*, v.11, p. 797092, 2022. DOI: 10.3389/fonc.2022.919072.

21 SYRIAC, A. K.; NANDU, N. S.; LEONE, J. P. Central nervous system metastases from triple-negative breast cancer: current treatments and future prospective. *Breast Cancer: targets and therapy*, v. 14, p. 1-14, 2022. DOI: 10.2147/BCTT.S274514.

22 OELKE, M. Physiology and pharmacology of the prostate. In: CHAPPLE, C.; STEERS, W.; EVANS, C. (ed.) *Urologic principles and practice*. Cham: Springer, 2020. p. 127–150. (Springer specialist surgery series). DOI: 10.1007/978-3-030-28599-9_8.

23 WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer. *The Global cancer observatory: Globocan*. 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/en>. Acesso em: 29 jan. 2024.

24 VIANA, N. I. *Correlação entre polimorfismos genéticos relacionados à hereditariedade, fatores hormonais e o câncer de próstata*. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

25 NATIONAL COUNCIL FOR AGING CARE. *Prostate cancer: a guide for aging men*. 2020. Disponível em: <https://www.aging.com/prostate-cancer-a-guide-for-aging-men/>. Acesso em: 09 jan. 2024.

26 ARORA, K.; BARBIERI, C. E. Molecular subtypes of prostate cancer. *Current Oncology Reports*, v. 20, 2018. DOI: 10.1007/s11912-018-0707-9.

27 KIRBY, M.; HIRST, C.; CRAWFORD, E. D. Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *International Journal of Clinical Practice*, v. 65, p. 1180–1192, 2011. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2011.02799.x.

28 JAIN, M. A.; SAPRA, A. Prostate cancer screening. 2021 Oct 9. In: *StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing*, 2022.

29 DHANYAKRISHNAN, R. *et al.* Morphological and molecular effects of phenolic extract from coconut kernel on human prostate cancer cell growth in vitro. *Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism*, v. 11, p. 21–36, 2018. DOI: 10.3233/MNM-17174.

- 30 DONG, L. Metastatic prostate cancer remains incurable, why? *Asian Journal of Urology*, v. 6, p. 26–41, 2019. DOI: 10.1016/j.ajur.2018.11.005.
- 31 NAEEM, A. A. *et al.* Prostate cell lines. *Journal of Oncology Medicine*, v. 5, p. 534–538, 2022.
- 32 STONE, K. R. *et al.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*, v. 21, p. 274–81, 1978. DOI: 10.1002/ijc.2910210305.
- 33 BIORENDER. *Natural history of prostate cancer*. Disponível em: <https://app.biorender.com/biorender-templates>. Acesso em: 21 jan. 2024.
- 34 NOORDSTRA, I. *Microtubules in cell migration, morphogenesis and metabolism: making the connections*. 2017. Ph. D. Thesis (Doctor) - Utrecht University, Utrecht, 2017.
- 35 DESAI, A.; MITCHISON, T. J. Microtubule polymerization dynamics. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 13, p. 83–117, 1997. DOI: 10.1146/annurev.cellbio.13.1.83.
- 36 NATIONAL CANCER INSTITUTE. SEER Training Modules. *Breast cancer*. Disponível em: <https://training.seer.cancer.gov/breast/>. Acesso em 02 jan. 2024.
- 37 KHWAJA, S. *et al.* An improved synthesis of indanocine and antiproliferative activity of 2-benzylindanocine via microtubule destabilization. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 98, p. 127–143, 2021. DOI: 10.1111/cbdd.13857.
- 38 KOMAROVA, Y. *et al.* Mammalian end binding proteins control persistent microtubule growth. *Journal of Cell Biology*, v. 184, p. 691–706, 2009. DOI: 10.1083/jcb.200807179.
- 39 AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Microtubule minus-end regulation at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 132, p. 1–7, 2019. DOI: 10.1242/JCS.227850.
- 40 RAI, A. *et al.* Lattice defects induced by microtubule-stabilizing agents exert a long-range effect on microtubule growth by promoting catastrophes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 118, p. e2112261118, 2021. DOI: 10.1073/PNAS.2112261118.
- 41 MÜHLETHALER, T. *et al.* Comprehensive analysis of binding sites in tubulin. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 133, p. 13443–13454, 2021. DOI: 10.1002/anie.202100273.
- 42 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell*, v. 100, p. 57–70, 2000. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- 43 HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, p. 646–674, 2011. DOI: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 44 HANAHAN, D. Hallmarks of cancer: new dimensions. *Cancer Discovery*, v. 12, p. 31–46, 2022. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-21-1059.
- 45 STEINMETZ, M. O.; PROTA, A. E. Microtubule-targeting agents: strategies to hijack the cytoskeleton. *Trends in Cell Biology*, v. 28, p. 776–792, 2018. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.05.001.

- 46 LAMBERT, J. M.; CHARI, R. V. J. Ado-trastuzumab emtansine (T-DM1): an antibody–drug conjugate (ADC) for HER2-positive breast cancer. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, p. 6949–6964, 2014. DOI: 10.1021/jm500766w.
- 47 MATTHEW, S. *et al.* Gatorbulin-1, a distinct cyclodepsipeptide chemotype, targets a seventh tubulin pharmacological site. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, p. 1–11, 2021. DOI: 10.1073/pnas.2021847118.
- 48 ISLAM, F. *et al.* Design, synthesis, and biological evaluation of 5, 6, 7, 8-tetrahydrobenzo [4, 5] thieno [2, 3-d] pyrimidines as microtubule targeting agents. *Molecules*, v. 27, p. 321, 2022. DOI: 10.3390/molecules27010321.
- 49 PÉREZ-PEÑA, H. *et al.* Computational approaches to the rational design of tubulin-targeting agents. *Biomolecules*, v. 13, p. 1–35, 2023. DOI: 10.3390/biom13020285.
- 50 Mühlethaler, T. *et al.* Rational design of a novel tubulin inhibitor with a unique mechanism of action. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 61, p. e202204052, 2022. DOI: 10.1002/anie.202204052.
- 51 CALLIGARIS, D. *et al.* Microtubule targeting agents: from biophysics to proteomics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 67, p. 1089–1104, 2010. DOI: 10.1007/s00018-009-0245-6
- 52 SHUAI, W. *et al.* Recent progress on tubulin inhibitors with dual targeting capabilities for cancer therapy. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 64, p. 7963–7990, 2021. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.1c00100.
- 53 AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Control of microtubule organization and dynamics: two ends in the limelight. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 16, p. 711–726, 2015. DOI: 10.1038/nrm4084.
- 54 RAVELLI, R. B. G. *et al.* Insight into tubulin regulation from a complex with colchicine and a stathmin-like domain. *Nature*, v. 428, p. 198–202, 2004. DOI: 10.1038/nature02393.
- 55 OLIVA, M. A. *et al.* Structural basis of noscapine activation for tubulin binding. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 63, p. 8495–8501, 2020. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00855.
- 56 WANG, Y. *et al.* Structures of a diverse set of colchicine binding site inhibitors in complex with tubulin provide a rationale for drug discovery. *FEBS Journal*, v. 283:102–111, 2016. DOI: 10.1111/febs.13555.
- 57 DORLÉANS, A. *et al.* Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, p. 13775–13779, 2009. DOI: 10.1073/pnas.0904223106.
- 58 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, p. 1848–1860, 2014. DOI: 10.1016/j.jmb.2014.02.005.
- 59 MASSAROTTI, A. *et al.* The tubulin colchicine domain: a molecular modeling perspective. *ChemMedChem*, v. 7, p. 33–42, 2012. DOI: 10.1002/cmdc.201100361.

- 60 LAISNE, M.C.; MICHALLET, S.; LAFANECHÈRE, L. Characterization of microtubule destabilizing drugs: a quantitative cell-based assay that bridges the gap between tubulin based- and cytotoxicity assays. *Cancers*, v. 13, n. 20, 2021. DOI: 10.3390/cancers13205226.
- 61 CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nature Reviews Cancer*, v. 2, p. 563–572, 2002. DOI: 10.1038/nrc865.
- 62 JOST, M. *et al.* Pharmaceutical-grade rigosertib is a microtubule-destabilizing agent. *Molecular Cell*, v. 79, p. 191-198.e3, 2020. DOI: 10.1016/j.molcel.2020.06.008.
- 63 SELIGMANN, J.; TWELVES, C. Tubulin: an example of targeted chemotherapy. *Future Medicinal Chemistry*, v. 5, p. 339–352, 2013. DOI: 10.4155/fmc.12.217.
- 64 PERONNE, L. *et al.* Two antagonistic microtubule targeting drugs act synergistically to kill cancer cells. *Cancers*, v. 12, p. 2196–2216, 2020. DOI: 10.3390/cancers12082196.
- 65 SAITO R. F.; LANA, M. V. G.; MEDRANO, R. F. V.; CHAMMAS, R. *Fundamentos de oncologia molecular*. São Paulo: Atheneu; 2015.
- 66 KAPOOR, S.; SRIVASTAVA, S.; PANDA, D. Indibulin dampens microtubule dynamics and produces synergistic antiproliferative effect with vinblastine in MCF-7 cells: implications in cancer chemotherapy. *Science Reports*, v. 8, p. 2–13, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-30376-y.
- 67 VARUGHESE, G. I.; VARGHESE, A. I. Colchicine in acute gouty arthritis: the optimum dose? *Arthritis Research & Therapy*, v. 8, p. 405, 2006. DOI: 10.1186/ar2039.
- 68 DALBETH, N.; LAUTERIO, T. J.; WOLFE, H. R. Mechanism of action of colchicine in the treatment of gout. *Clinical Therapeutics*, v. 36, p. 1465–1479, 2014. DOI: 10.1016/j.clinthera.2014.07.017.
- 69 NIDORF, S. M.; THOMPSON, P. L. Why colchicine should be considered for secondary prevention of atherosclerosis: an overview. *Clinical Therapeutics*, v. 41, p. 41–48, 2019. DOI: 10.1016/j.clinthera.2018.11.016.
- 70 MCLOUGHLIN, E. C.; O'BOYLE, N. M. Colchicine-binding site inhibitors from chemistry to clinic: a review. *Pharmaceuticals*, v. 13, p. 1–43, 2020. DOI: 10.3390/ph13040072.
- 71 NGUYEN, T. L. *et al.* A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 48, p. 7917–7917, 2005. DOI: 10.1021/jm058275i.
- 72 LU, Y. *et al.* An overview of tubulin inhibitors that interact with the colchicine binding site. *Pharmaceutical Research*, v. 29, p. 2943–2971, 2012. DOI: 10.1007/s11095-012-0828-z.
- 73 KIM, Y.; SENGUPTA, S.; SIM, T. Natural and synthetic lactones possessing antitumor activities. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, p. 1–69, 2021. DOI: 10.3390/ijms22031052.
- 74 Han, Y. *et al.* Identification of a unique resorcylic acid lactone derivative that targets both

lymphangiogenesis and angiogenesis. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 62, p. 9141–9160, 2019. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b01025.

75 SRIVASTAVA, S. K. *et al.* Synthesis of 13-amino costunolide derivatives as anticancer agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 4195–4199, 2006. DOI: 10.1016/j.bmcl.2006.05.083.

76 FORESTIER-ROMÁN, I. S. *et al.* Andrographolide induces DNA damage in prostate cancer cells. *Oncotarget*, v. 10, n. 10, p. 1085–1101, 2019.

77 MONGER, A. *et al.* Inhibition of topoisomerase II α and induction of apoptosis in gastric cancer cells by 19-triisopropyl andrographolide. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 18, n. 10, p. 2845, 2017.

78 LIU, Y. *et al.* Alantolactone, a sesquiterpene lactone, inhibits breast cancer growth by antiangiogenic activity via blocking VEGFR2 signaling. *Phytotherapy Research*, v. 32, n. 4, p. 643–650, 2018.

79 Wong, H. C. *et al.* SRJ23, a new semisynthetic andrographolide derivative: in vitro growth inhibition and mechanisms of cell cycle arrest and apoptosis in prostate cancer cells. *Cell Biology and Toxicology*, v. 30, n. 5, p. 269–288, 2014.

80 YUAN, H.; SUN, B.; GAO, F.; LAN, M. Synergistic anticancer effects of andrographolide and paclitaxel against A549 NSCLC cells. *Pharmaceutical Biology*, v. 54, n. 11, p. 2629–2635, 2016.

81 YEH, C-T. *et al.* A sesquiterpene lactone antrocin from *Antrodia camphorata* negatively modulates JAK2/STAT3 signaling via microRNA let-7c and induces apoptosis in lung cancer cells. *Carcinogenesis*, v. 34, n. 12, p. 2918–2928, 2013.

82 CHEN, J-H. *et al.* Antrocin, a bioactive component from *Antrodia cinnamomea*, suppresses breast carcinogenesis and stemness via downregulation of β -catenin/Notch1/Akt signaling. *Phytomedicine*, v. 52, p. 70–78, 2019. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.09.213.

83 CHEN, X. *et al.* Brevilin A, a novel natural product, inhibits janus kinase activity and blocks STAT3 signaling in cancer cells. *PLoS One*, v. 8, n. 5, p. e63697, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0063697.

84 KABEER, F. A.; RAJALEKSHMI, D. S.; NAIR, M. S.; PRATHAPAN, R. Molecular mechanisms of anticancer activity of deoxyelephantopin in cancer cells. *Integrative Medicine Research*, v. 6, n. 2, p. 190–206, 2017.

85 FENG, J-H.; NAKAGAWA-GOTO, K.; LEE, K-H.; SHYUR, L-F. A novel plant sesquiterpene lactone derivative, DETD-35, suppresses BRAFV600E mutant melanoma growth and overcomes acquired vemurafenib resistance in mice. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 15, n. 6, p. 1163–1176, 2016.

86 NAKAGAWA-GOTO, K. *et al.* Novel sesquiterpene lactone analogues as potent anti-breast cancer agents. *Molecular Oncology*, v. 10, n. 6, p. 921–937, 2016.

87 GHANTOUS, A.; SINJAB, A.; HERCEG, Z.; DARWICHE, N. Parthenolide: from plant shoots to cancer roots. *Drug Discovery Today*, v. 18, n. 17–18, p. 894–905, 2013.

- 88 SHAO, F-Y. *et al.* EM23, a natural sesquiterpene lactone, targets thioredoxin reductase to activate JNK and cell death pathways in human cervical cancer cells. *Oncotarget*, v. 7, n. 6, p. 6790, 2016.
- 89 ZHANG, L. L. *et al.* Downregulation of Cyclin B1 mediates nagilactone E-induced G2 phase cell cycle arrest in non-small cell lung cancer cells. *European Journal of Pharmacology*, v. 830, p. 17–25, 2018. DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.04.020
- 90 ZHANG, L. *et al.* Identification of nagilactone E as a protein synthesis inhibitor with anticancer activity. *Acta Pharmacologica Sinica*, v. 41, n. 5, p.698–705, 2020.
- 91 SWEENEY, C. J. *et al.* The sesquiterpene lactone parthenolide in combination with docetaxel reduces metastasis and improves survival in a xenograft model of breast cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, v. 4, n. 6, p. 1004–1012, 2005.
- 92 CURRY, E. A. *et al.* Phase I dose escalation trial of feverfew with standardized doses of parthenolide in patients with cancer. *Investigational New Drugs*, v. 22, n. 3, p. 299–305, 2004.
- 93 SILVA, T. S.; SOUZA, M. S.; ANDRICOPULO, A. D.; COELHO, F. Discovery of indolizine lactones as anticancer agents and their optimization through late-stage functionalization. *RSC Advances*, v. 13, p. 20264–20270, 2023. DOI: 10.1039/d3ra03395c.
- 94 Mass, E. B.; Duarte, G. V.; Russowsky, D. The Quinazoline-chalcone and quinazolinone-chalcone hybrids: a promising combination for biological activity. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 186–203, 2021. DOI: 10.2174/1389557520666200730160325.
- 95 BANSAL, R.; MALHOTRA, A. Therapeutic progression of quinazolines as targeted chemotherapeutic agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 211, p. 113016, 2021. DOI: 10.1016/j.ejmech.2020.113016.
- 96 DAS, R.; MEHTA, D. K.; DHANAWAT, M. Bestowal of quinazoline scaffold in anticancer drug discovery. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 1350–1368, 2020. DOI: 10.2174/1871520620666200627205321.
- 97 LI, W. *et al.* Discovery of novel quinazolines as potential anti-tubulin agents occupying three zones of colchicine domain. *Bioorganic Chemistry*, v. 83, p. 380–390, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2018.10.027.
- 98 ALAGARSAMY, V. *et al.* An overview of quinazolines: pharmacological significance and recent developments. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 151, p. 628–685, 2018. DOI: 10.1016/j.ejmech.2018.03.076.
- 99 OUYANG, Y. *et al.* Chalcone derivatives: role in anticancer therapy. *Biomolecules*, v. 11, p. 894, 2021. DOI: 10.3390/biom11060894.
- 100 DUCKI, S. *et al.* Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule polymerization. part 1: synthesis and biological evaluation of antivascular activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 7698–7710, 2009. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.09.039.
- 101 DUCKI, S. *et al.* Combretastatin-like chalcones as inhibitors of microtubule

polymerisation. part 2: structure-based discovery of alpha-aryl chalcones. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 17, p. 7711–7722, 2009. DOI: 10.1016/j.bmc.2009.09.044.

102 KAMAL, A. *et al.* Synthesis of phenstatin/isocombretastatin-chalcone conjugates as potent tubulin polymerization inhibitors and mitochondrial apoptotic inducers. *Organic and Biomolecular Chemistry*, v. 13, p. 3963–3981, 2015. DOI: 10.1039/c4ob02606c.

103 KODE, J. *et al.* Synthesis, biological evaluation, and molecular docking analysis of phenstatin based indole linked chalcones as anticancer agents and tubulin polymerization inhibitors. *Bioorganic Chemistry*, v. 105, p. 104447, 2020. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.104447.

104 LI, X.; LIANG, R. An orally antitumor chalcone hybrid inhibited HepG2 cells growth and migration as the tubulin binding agent. *Investigational New Drugs*, v. 39, p. 537, 2021. DOI: 10.1007/s10637-020-01026-w.

105 ALSWAH, M. *et al.* Design, synthesis and cytotoxic evaluation of novel chalcone derivatives bearing triazolo[4,3-a]quinoxaline moieties as potent anticancer agents with dual EGFR kinase and tubulin polymerization inhibitory effects. *Molecules*, v. 23, 2018. DOI: 10.3390/molecules23010048.

106 MPAHLELE, M. J.; MALULEKA, M. M.; PARBHOO, N.; MALINDISA, S. T. Synthesis, evaluation for cytotoxicity and molecular docking studies of benzo [c] furan-chalcones for potential to inhibit tubulin polymerization and/or EGFR-tyrosine kinase phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 9, p. 2552, 2018.

107 SAITO, Y. *et al.* α -Trifluoromethyl chalcones as potent anticancer agents for androgen receptor-independent prostate cancer. *Molecules*, v. 26, n. 9, p. 2812, 2021.

108 LIU, Z. *et al.* 4'-O-Methylbrousochalcone B as a novel tubulin polymerization inhibitor suppressed the proliferation and migration of acute myeloid leukaemia cells. *BMC Cancer*, v. 21, p. 1–13, 2021. DOI: 10.1186/s12885-020-07759-4.

109 SAITO, Y. *et al.* Bicyclic chalcones as mitotic inhibitors for overcoming androgen receptor-independent and multidrug-resistant prostate cancer. *ACS Omega* 2021;6:4842–9.

110 WANG, Y.; YANG, P.; ZHANG, Y.; SUN, J. Synthesis and clinical application of new drugs approved by FDA in 2023. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 265, p. 116124–116147, 2024. DOI: 10.1016/j.ejmech.2024.116124.

111 MOHAN, R. *et al.* End-binding proteins sensitize microtubules to the action of microtubule-targeting agents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 110, p. 8900–8905, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1300395110.

112 Aher, A. *et al.* CLASP mediates microtubule repair by restricting lattice damage and regulating tubulin incorporation. *Current Biology*, v. 30, p. 2175-2183.e6, 2020. DOI: 10.1016/j.cub.2020.03.070.

113 ALELYUNAS, Y. W. *et al.* A high throughput dried DMSO Log D lipophilicity measurement based on 96-well shake-flask and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, p. 1950–1955, 2010. DOI: 10.1016/j.chroma.2010.01.071.

- 114 LOMBARDO, F.; OBACH R. S.; SHALAEVA, M. Y.; GAO, F. Prediction of volume of distribution values in humans for neutral and basic drugs using physicochemical measurements and plasma protein binding data. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 45, p. 2867–2876, 2002. DOI: 10.1021/jm0200409.
- 115 AVDEEF, A. *et al.* PAMPA - critical factors for better predictions of absorption. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 96, p. 2893–2909, 2007. DOI: 10.1002/jps.21068.
- 116 KERNS, E. H. *et al.* Application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco-2 permeability. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 93, p. 1440–1453, 2004. DOI: 10.1002/jps.20075.
- 117 CHIBA, M.; ISHII, Y.; SAGIYAMA, Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. *AAPS Journal*, v. 11, p. 262–276, 2009. DOI: 10.1208/s12248-009-9103-6.
- 118 OBACH, R. S. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: an examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 27, n. 11, p. 1350–1359, 1999.
- 119 NARITOMI, Y. *et al.* Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 29, n. 10, p. 1316–1324, 2001.
- 120 WHITE, R. E.; MANITPISITKUL, P. Pharmacokinetic theory of cassette dosing in drug discovery screening. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 29, n. 7, p. 957–966, 2001.
- 121 WILLIAMS, J. A. *et al.* Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 32, n. 11, p. 1201–1208, 2004.
- 122 HUGHES, J.; REES, S, KALINDJIAN, S.; PHILPOTT, K. Principles of early drug. *British Journal of Pharmacology*, v. 162, p. 1239–1249, 2011.
- 123 SILVA, E. J. N. L. *et al.* Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *International Endodontic Journal*, v. 45, p. 49–56, 2012. DOI: 10.1111/j.1365-2591.2011.01946.x.
- 124 HIRSCHMAN, W. R. *et al.* Cytotoxicity comparison of three current direct pulp-capping agents with a new bioceramic root repair putty. *Journal of Endodontics*, v. 38, p. 385–388, 2012. DOI: 10.1016/j.joen.2011.11.012.
- 125 FERNANDES, I.R. *et al.* Fibroblast sources: where can we get them? *Cytotechnology*, v. 68, p. 223–228, 2016. DOI: 10.1007/S10616-014-9771-7.
- 126 GERAN, R. I. *et al.* Protocols for screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports*, v. 3, p. 17–19, 1972.
- 127 MUSHTAQ, A.; WU, P.; NASEER, M. M. Recent drug design strategies and identification of key heterocyclic scaffolds for promising anticancer targets. *Pharmacology &*

Therapeutics, v. 254, p.108579, 2023. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2023.108579.

128 YAN, J. *et al.* Structure modification and biological evaluation of indole-chalcone derivatives as anti-tumor agents through dual targeting tubulin and TrxR. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 227, p. 113897, 2022. DOI: 10.1016/j.ejmech.2021.113897.

129 KUMBHAR, B. V.; BOROGAON, A.; PANDA, D.; KUNWAR, A. Exploring the origin of differential binding affinities of human tubulin isotypes $\alpha\beta$ II, $\alpha\beta$ III and $\alpha\beta$ IV for DAMA-colchicine using homology modelling, molecular docking and molecular dynamics simulations. *PLoS ONE*, v. 11, p. 1–22, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0156048.

130 PARKER, A. L.; TEO, W. S.; MCCARROLL, J. A.; KAVALLARIS, M. An emerging role for tubulin isotypes in modulating cancer biology and chemotherapy resistance. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 18, p. 1434–1457, 2017. DOI: 10.3390/ijms18071434.

131 KUMBHAR, B. V.; BHANDARE, V. V. Exploring the interaction of Peloruside-A with drug resistant $\alpha\beta$ II and $\alpha\beta$ III tubulin isotypes in human ovarian carcinoma using a molecular modeling approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 39, p. 1990–2002, 2021. DOI: 10.1080/07391102.2020.1745689.

132 KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. *Nature Reviews Cancer*, v. 10, p. 194–204, 2010. <https://doi.org/10.1038/nrc2803>.

133 ISLAM, F. *et al.* Novel pyrazolo[4,3-d]pyrimidine microtubule targeting agents (MTAs): synthesis, structure–activity relationship, in vitro and in vivo evaluation as antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 41, p. 127923, 2021. DOI: 10.1016/j.bmcl.2021.127923.

134 BOHNACKER, T. *et al.* Deconvolution of Buparlisib's mechanism of action defines specific PI3K and tubulin inhibitors for therapeutic intervention. *Nature Communications*, v. 8, p. 1–13, 2017. DOI:10.1038/ncomms14683.

135 LUCAS, A. J.; SPROSTON, J. L.; BARTON, P.; RILEY, R. J. Estimating human ADME properties, pharmacokinetic parameters and likely clinical dose in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 14, p. 1313–1327, 2019. DOI: 10.1080/17460441.2019.1660642.

136 BHARATE, S. S.; KUMAR, V.; VISHWAKARMA, R. A. Determining partition coefficient (Log P), distribution coefficient (Log D) and Ionization constant (pKa) in early drug discovery. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, v. 19, p. 461–469, 2016. DOI: 10.2174/1386207319666160502123917.

137 BERBEN, P. *et al.* Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: overview and applications. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 119, p. 219–233, 2018. DOI: 10.1016/j.ejps.2018.04.016.

138 Di, L. *et al.* Mechanistic insights from comparing intrinsic clearance values between human liver microsomes and hepatocytes to guide drug design. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, p. 441–448, 2012. DOI: 10.1016/j.ejmech.2012.06.043.

139 BROCCATELLI, F.; CORNELIS, E. C. A.; HOP, C.; WRIGHT, M. Strategies to

optimize drug half-life in lead candidate identification. *Expert Opinion on Drug Discovery*, v. 14, p. 221–230, 2019. DOI: 10.1080/17460441.2019.1569625.

140 MATTHEWS, H. K.; BERTOLI, C.; BRUIN, R. A. M. Cell cycle control in cancer. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 23, p. 74–88, 2022. DOI: 10.1038/s41580-021-00404-3.

141 NANO, M.; MONTELL, D. J. Apoptotic signaling: beyond cell death. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 156, p. 22–34, 2024. DOI: 10.1016/j.semcd.2023.11.002.

142 LAWRENCE, E. J.; CHATTERJEE, S.; ZANIC, M. More is different: reconstituting complexity in microtubule regulation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 299, p. 105398–105407, 2023. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.105398.

143 AKHMANOVA, A.; STEINMETZ, M. O. Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 9, p. 309–322, 2008. DOI: 10.1038/nrm2369.

APÊNDICES

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024

NOME		TIPO DE CÂNCER		TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL						
Abemaciclibe	Verzenio®	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	CDK4/6	oral
Acetato de abiraterona	Zytiga®	CaP	-	pequena molécula	terapia-alvo	CYP17A1	oral
Acetato de buserelina	Sincroforte®	CaP	-	pequena molécula	endócrino	GnRHR	subcutânea
Acetato de ciproterona	Androcur®	CaP	-	pequena molécula	endócrino	GnRHR	oral
Acetato de goserrelina	Zoladex®	CaP	CM	pequena molécula	endócrino	GnRHR	subcutânea
Acetato de histrelina	Vantas®	CaP	-	pequena molécula	endócrino	GnRHR	subcutânea
Acetato de leuprolida	Eligard®	CaP	-	pequena molécula	endócrino	GnRHR	subcutânea
Acetato de leuprorrelina	LUPRON DEPOT®	CaP	CM	pequena molécula	endócrino	GnRHR	intravenosa
Acetato de medroxiprogesterona	Depo-Provera®	-	-	-	-	-	-
Acetato de megestrol	Megace®	-	CM	pequena molécula	endócrino	PR	oral
Ado-trastuzumabe emtansina	Kadcyla®	-	CM	conjugado anticorpo-fármaco	terapia-alvo	HER2	intravenosa
Aldesleucina	Proleukin®	-	-	-	-	-	-
Alectinibe	Alecensa®	-	-	-	-	-	-
Alpelisibe	Piqray®	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	PI3K	oral
Amivantamabe-vmjw	Rybrevant™	-	-	-	-	-	-
Anastrozol	Arimidex®	-	CM	pequena molécula	endócrino	aromatase	oral
Apalutamida	Erleada®	CaP	-	pequena molécula	endócrino	AR	oral
Atezolizumabe	Tecentriq®	-	CM	anticorpo monoclonal	imunoterapia	PD-L1	intravenosa
Avelumabe	Bavencio®	-	-	-	-	-	-
Axitinibe	Inlyta®	-	-	-	-	-	-
Bevacizumabe	Avastin™	-	-	-	-	-	-
Bicalutamida	Casodex®	CaP	-	pequena molécula	endócrino	AR	oral

(continua)

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024
(continuação)

NOME		TIPO DE CÂNCER	TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL					
Binimetinibe	Mektovi [®]	-	-	-	-	-
Brigatinibe	Alunbrig [®]	-	-	-	-	-
Cabazitaxel	Jevtana [®]	CaP	-	pequena molécula	citotóxico	tubulina intravenosa
Cabozantinibe	Cometriq [™]	-	-	-	-	-
Camsilato de rucaparibe	Rubraca [®]	CaP	-	pequena molécula	terapia-alvo	PARP oral
Capecitabina	Xeloda [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	TS oral
Carboplatina	Evocarb [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	DNA intravenosa
Cemiplimabe	Libtayo [®]	-	-	-	-	-
Ceritinibe	Zykadia [®]	-	-	-	-	-
Cetuximabe	Erbitux [®]	-	-	-	-	-
Ciclofosfamida	Cytoxan [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	DNA intravenosa; oral
Cisplatina	Platinol [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	DNA intravenosa
Citarabina	Cytosar-U [®]	-	-	-	-	-
Citrato de tamoxifeno	Soltamox [®]	-	CM	pequena molécula	endócrino	ER oral
Cloreto de estrôncio (89Sr)	Metastron [™]	-	-	-	-	-
Cloridrato de doxorubicina	Adriamycin [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	TOP2 intravenosa
Cloridrato de doxorubicina lipossomal peguilado	Caelyx [®]	-	-	-	-	-
Cloridrato de epirrubicina	Ellence [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	TOP2 intravenosa
Cloridrato de gencitabina	Gemzar [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	TS intravenosa
Cloridrato de irinotecano	Camptosar [®]	-	-	-	-	-
Cloridrato de mitoxantrona	Novantrone [®]	CaP	-	pequena molécula	citotóxico/terapia-alvo	DNA/ TOP2 intravenosa
Cloridrato de procarbazina	Natulan [®]	-	-	-	-	-
Cloridrato de tipiracila + trifluridina	Lonsurf [®]	-	-	-	-	-

(continua)

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024
(continuação)

NOME		TIPO DE CÂNCER		TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL						
Cobimetinibe	Cotellic [®]	-	-	-	-	-	-
Crizotinibe	Xalkori [®]	-	-	-	-	-	-
Dabrafenibe	Tafinlar [®]	-	-	-	-	-	-
Dacarbazina	DTIC-Dome [®]	-	-	-	-	-	-
Dacomitinibe	Vizimpro [®]	-	-	-	-	-	-
Dactinomicina	Cosmegen [®]	-	-	-	-	-	-
Darolutamida	Nubeqa [®]	CaP	-	pequena molécula	endócrino	AR	oral
Degarelix	Firmagon [®]	CaP	-	pequena molécula	endócrino	GnRHR	subcutânea
Dicloreto de rádio (223Ra)	Xofigo [®]	CaP	-	pequena molécula	citotóxico	DNA	intravenosa
Dicloridrato de elacestrante	ORSERDU [™]	-	CM	pequena molécula	endócrino	ER	oral
Dimaleato de afatinibe	Gilotrif [™]	-	-	-	-	-	-
Dimetilsulfóxido de trametinibe	Mekinist [®]	-	-	-	-	-	-
Dinutuximabe	Unituxin [®]	-	-	-	-	-	-
Ditosilato de lapatinibe	Tykerb [™]	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	EGFR	oral
Docetaxel	Taxotere [®]	CaP	CM	pequena molécula	citotóxico	tubulina	intravenosa
Dostarlimabe-gxly	Jemperli [®]	-	-	-	-	-	-
Durvalumabe	Imfinzi [™]	-	-	-	-	-	-
Encorafenibe	Braftovi [®]	-	-	-	-	-	-
Enzalutamida	Xtandi [®]	CaP	-	pequena molécula	endócrino	AR	oral
Erlotinibe	Tarceva [®]	-	-	-	-	-	-
Estramustina	Emcyt [®]	CaP	-	pequena molécula	citotóxico	DNA	oral
Estreptozocina	Zanosar [®]	-	-	-	-	-	-
Etoposídeo	Etopophos [®]	-	-	-	-	-	-
Everolimo	Afinitor [™]	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	mTOR	oral

(continua)

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024
(continuação)

NOME		TIPO DE CÂNCER		TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL						
Exemestano	Aromasin [®]	-	CM	pequena molécula	endócrino	aromatase	oral
Fam-trastuzumabe deruxtecano-nxki	Enhertu [®]	-	CM	anticorpo monoclonal	terapia-alvo	HER2	Intravenosa
Fenoxibenzamina	Dibenzylina [®]	-	-	-	-	-	-
Fluorouracila, 5-FU	Adrucil [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	TS	intravenosa
Flutamida	Eulexin [®]	CaP	-	pequena molécula	endócrino	AR	oral
Fulvestrant	Faslodex [®]	-	CM	pequena molécula	endócrino	ER	intramuscular
Gefitinibe	Iressa [®]	-	-	-	-	-	-
Hidroxiureia	Hydrea [®]	-	-	-	-	-	-
Ifosfamida	Holoxane [®]	-	-	-	-	-	-
Imiquimode	Aldara [™]	-	-	-	-	-	-
Iobenguano (131I)	Azedra [®]	-	-	-	-	-	-
Ipilimumabe	Yervoy [™]	-	-	-	-	-	-
Ivosidenibe	Tibsovo [®]	-	-	-	-	-	-
Ixabepilona	Ixempra [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	tubulina	intravenosa
Lanreotida	Somatuline [®]	-	-	-	-	-	-
Larotrectinibe	Vitrakvi [™]	-	-	-	-	-	-
Letrozol	Femara [®]	-	CM	pequena molécula	endócrino	aromatase	oral
Leucovorina	Fusilev [®]	-	-	-	-	-	-
Lorlatinibe	Lorbrena [®]	-	-	-	-	-	-
Lurbinectedina	Zepzelca [™]	-	-	-	-	-	-
Lutécio (177Lu) dotatate	Lutathera [®]	-	-	-	-	-	-
Malato de sunitinibe	Sutent [®]	-	-	-	-	-	-
Maleato de neratinibe	Nerlynx [®]	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	HER2	oral
Margetuximabe-cmkb	Margenza [™]	-	CM	anticorpo monoclonal	terapia-alvo	HER2	intravenosa

(continua)

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024
(continuação)

NOME		TIPO DE CÂNCER		TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL						
Melfalano	Evomela [®]	-	-	-	-	-	-
Mesilato de dabrafenibe	Tafinlar [®]	-	-	-	-	-	-
Mesilato de eribulina	Halaven [™]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	tubulina	intravenosa
Mesilato de imatinibe	Gleevec [®]	-	-	-	-	-	-
Mesilato de lenvatinibe	Lenvima [®]	-	-	-	-	-	-
Metotrexato	Trexall [™]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	DHFR	intravenosa; oral
Mitomicina	Jelmyto [®]	-	-	-	-	-	-
Mitotano	Lysodren [®]	-	-	-	-	-	-
Mobocertinibe	Exkivity [®]	-	-	-	-	-	-
Mogamulizumabe	Poteligeo [®]	-	-	-	-	-	-
Naxitamabe	Danyelza [®]	-	-	-	-	-	-
Necitumumabe	Portrazza [®]	-	-	-	-	-	-
Nilutamida	Nilandron [®]	CaP	-	pequena molécula	endócrino	AR	oral
Niraparibe	Zejula [™]	-	-	-	-	-	-
Nivolumabe	Opdivo [®]	-	-	-	-	-	-
Olaparibe	Lynparza [™]	CaP	CM	pequena molécula	terapia-alvo	PARP	oral
Olaratumabe	Lartruvo [™]	-	-	-	-	-	-
Osimertinibe	Tagrisso [®]	-	-	-	-	-	-
Oxaliplatina	Eloxatin [™]	-	-	-	-	-	-
Paclitaxel	Taxol [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	tubulina	intravenosa
Paclitaxel [ligado à albumina]	Abraxane [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	tubulina	intravenosa
Palbociclibe	Ibrance [®]	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	CDK4/6	oral
Pamidronato dissódico	Aredia [®]	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	FPPS	intravenosa
Pamoato de triptorelina	Trelstar [®]	CaP	-	pequena molécula	endócrino	GnRHR	intramuscular; subcutânea

(continua)

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024
(continuação)

NOME		TIPO DE CÂNCER	TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL					
Panitumumabe	Vectibix [®]	- -	-	-	-	-
Pazopanibe	Votrient [®]	- -	-	-	-	-
Pembrolizumabe	Keytruda [®]	- CM	anticorpo monoclonal	imunoterapia	PD-1	intravenosa
Pemetrexede	Alimta [®]	- -	-	-	-	-
Pemigatinibe	Pemazyre [®]	- -	-	-	-	-
Pertuzumabe	Perjeta [™]	- CM	anticorpo monoclonal	terapia-alvo	HER2	intravenosa
Porfímero de sódio	Photofrin [®]	- -	-	-	-	-
Pralsetinibe	Gavreto [™]	- -	-	-	-	-
Prednisolona	Deltasone [®]	- -	-	-	-	-
Ramucirumabe	Cyramza [®]	- -	-	-	-	-
Regorafenibe	Stivarga [®]	- -	-	-	-	-
Relugolix	Orgovyx [™]	CaP -	pequena molécula	endócrino	GnRHR	oral
Ribociclibe	Kisqali [®]	- CM	pequena molécula	terapia-alvo	CDK4/6	oral
Ripretinibe	Qinlock [™]	- -	-	-	-	-
Sacituzumabe govitecano-hziy	Trodelvy [®]	- CM	anticorpo monoclonal	terapia-alvo	TROP-2	intravenosa
Selpercatinibe	Retevmo [®]	- -	-	-	-	-
Selumetinibe	Koselugo [®]	- -	-	-	-	-
Sipuleucel-T	Provenge [®]	CaP -	imunoterapia	terapia-alvo	PSA	intravenosa
Sonidegibe	Odomzo [®]	- -	-	-	-	-
Sorafenibe	Nexavar [®]	- -	-	-	-	-
Sotorasibe	Lumakras [™]	- -	-	-	-	-
Tosilato de talazoparibe	Talzenna [™]	- CM	pequena molécula	terapia-alvo	PARP	oral
Talimogene laherparepvec (T-VEC)	Imlygic [®]	- -	-	-	-	-
Tazemetostat	Tazverik [®]	- -	-	-	-	-

(continua)

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024
(continuação)

NOME		TIPO DE CÂNCER	TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*	
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL						
Temozolomida	Astromide®	-	-	-	-	-	
Tensirolimo	Torisel®	-	-	-	-	-	
Tepotinibe	Tepmetko®	-	-	-	-	-	
Tiotepa	Tepadina®	-	CM	pequena molécula	citotóxico	DNA	intravenosa
Tirotropina alfa	Thyrogen®	-	-	-	-	-	-
Tisotumabe vedotina-tftv	Tivdak®	-	-	-	-	-	-
Tivozanibe	Fotivda®	-	-	-	-	-	-
Topotecano	Hycamtin®	-	-	-	-	-	-
Toremifeno	Fareston®	-	CM	pequena molécula	endócrino	ER	oral
Trabectedina	Yondelis®	-	-	-	-	-	-
Trastuzumabe	Herceptin®	-	CM	anticorpo monoclonal	terapia-alvo	HER2	intravenosa
Trastuzumabe + hialuronidase-oysk	Herceptin Hylecta™	-	CM	anticorpo monoclonal	terapia-alvo	HER2	subcutânea
Trilaciclibe	Cosela™	-	-	-	-	-	-
Tucatinibe	Tukysa®	-	CM	pequena molécula	terapia-alvo	HER2	oral
Valerato de estradiol	Delestrogen®	CaP	-	pequena molécula	endócrino	ER	intramuscular; oral
Valrubicina	Valstar®	-	-	-	-	-	-
Vandetanibe	Caprelsa®	-	-	-	-	-	-
Vemurafenibe	Zelboraf®	-	-	-	-	-	-
Sulfato de vimblastina	Velban®	-	CM	pequena molécula	citotóxico	tubulina	intravenosa
Vincristina (lipossomas)	Marqibo®	-	-	-	-	-	-

(continua)

APÊNDICE A – MEDICAMENTOS PARA ONCOLOGIA APROVADOS PELO FDA ENTRE 1949 E 2024
(conclusão)

NOME		TIPO DE CÂNCER		TIPO DE PRINCÍPIO ATIVO	MECANISMO	ALVO	ROTA*
PRINCÍPIO ATIVO	COMERCIAL						
Ditartarato de vinorelbina	Norelbin [®]	-	CM	pequena molécula	citotóxico	tubulina	Intravenosa
Vismodegibe	Erivedge [®]	-	-	-	-	-	-
Ziv-aflibercept	Zaltrap [®]	-	-	-	-	-	-
177Lu-PSMA-617	Pluvicto [™]	CaP	-	pequena molécula	terapia-alvo	PSMA	intravenosa

Fármacos aprovados pela FDA para cânceres sólidos com presença de tumores malignos. Não inclui cânceres hematológicos tais como leucemia, linfoma e mieloma.

Os usos aprovados pela FDA para cânceres de mama e de próstata são indicados.

CM = câncer de mama. **CaP** = câncer de próstata. **CDK4/6** = quinases dependentes de ciclinas. **CYP17A1** = citocromo P450, família 17, subfamília A, polipeptídeo 1. **GnRHR** = hormônio liberador de gonadotrofina. **PR** = receptor de progesterona. **HER2** = receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano. **PI3K** = fosfatidilinositol-3-quinase. **AR** = receptor de andrógeno. **PD-L1** = ligante-1 do receptor de morte celular programada. **PARP** = poli (ADP-ribose) polimerase-1. **TS** = timidilato sintetase. **DNA** = ácido desoxirribonucleico. **ER** = receptor de estrogênio. **TOP2** = topoisomerase II. **EGFR** = receptor do fator de crescimento epidérmico. **mTOR** = alvo da rapamicina em mamíferos. **DHFR** = diidrofolato redutase. **FPPS** = farnesil pirofosfato sintase. **PD-1** = proteína da morte celular programada 1. **TROP-2** = transdutor de sinal de cálcio associada a tumor 2. **PSA** = antígeno prostático específico. **PSMA** = antígeno de membrana específico da próstata.

*Rota de administração.

Última atualização realizada em janeiro/2024.

Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE B – QUIMIOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO

Insumos farmacêuticos ativos		
Câncer de mama metastático		
HER2+ e ER+ e PR+ (triplo-positivo)		
HER2- e ER+ e PR+ (receptor de hormônio positivo)		
HER2+ e ER- e PR- (receptor de hormônio negativo)		
Mutações (BRCA1/2 ou PIK3CA, por exemplo)		
Ausente	Presente	HER2- e ER- e PR- (triplo-negativo)
Acetato de Gosserrelina (Zoladex [®] , AstraZeneca)	Abemaciclibe (Verzenio [®] , Lilly)	Atezolizumabe (Tecentriq [®] , Roche)
Acetato de Megestrol (Megace [®] , Bristol-Myers Squibb)	Ado-Trastuzumabe Emtansina (Kadcyla [®] , Genentech)	Docetaxel (Taxotere [®] , Sanofi)
Anastrozol (Arimidex [®] , AstraZeneca)	Alpelisibe (Piqray [®] , Novartis)	Cloridrato de doxorubicina (Adriamycin [®] , APP)
Capecitabina (Xeloda [®] , Roche)	Carboplatina (Evocarb [®] , Pfizer)	Cloridrato de epirrubicina (Ellence [®] , Pfizer)
Ciclofosfamida (Cytosan [®] , Bristol-Myers Squibb)	Cisplatina (Platinol [®] , Pfizer)	Olaparibe (Lynparza [®] , AstraZeneca)
Citrato de Tamoxifeno (Soltamox [®] , Mayne Pharma)	Dicloridrato de elacestrante (ORSERDU [™] , Stemline)	Paclitaxel (Taxol [®] , Bristol-Myers Squibb)
Cloridrato de Doxorubicina (Adriamycin [®] , Rubex)	Fam-Trastuzumabe Deruxtecana (Enhertu [®] , AstraZeneca)	Pembrolizumabe (Keytruda [®] , Merck Sharp)
Cloridrato de Epirrubicina (Ellence [®] , Pfizer)	Fulvestrant (Faslodex [®] , AstraZeneca)	Sacituzumabe Govitecano-hziy (Trodelvy [®] , Gilead)
Cloridrato de Gencitabina (Gemzar [®] , Lilly)	Olaparibe (Lynparza [®] , Kudos Pharm)	
Ditartarato de Vinorelbina (Norelbin [®] , Eurofarma)	Tosilato de Talazoparibe (Talzenna [™] , Pfizer)	
Ditosilato de Lapatinibe (Tykerb [®] , GlaxoSmithKline plc.)		
Docetaxel (Taxotere [®] , Sanofi-Aventis)		
Everolimo (Afinitor [™] , Novartis)		
Exemestano (Aromasin [®] , Pfizer)		
Fluorouracila, 5-FU (Adrucil [®] , Teva Pharmaceuticals)		
Ixabepilona (Ixempra [®] , Bristol-Myers Squibb)		

(continua)

APÊNDICE B – QUIMIOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO (conclusão)

Insumos farmacêuticos ativos	
Câncer de mama metastático	
HER2+ (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano) e ER+ e PR+ (triplo-positivo)	
HER2- e ER+ (receptor de estrogênio) e PR+ (receptor de hormônio positivo)	
HER2+ e ER- e PR- (receptor de progesterona) (receptor de hormônio negativo)	HER2- e ER- e PR- (triplo-negativo)
Mutações (BRCA1/2 ou PIK3CA, por exemplo)	
Ausente	Presente
Letrozol (Femara [®] , Novartis)	
Maleato de Neratinibe (Nerlynx [®] , Laboratoires Pierre Fabre)	
Margetuximabe-cmkb (Margenza [™] , MacroGenics)	
Mesilato de Eribulina (Halaven [®] , Eisai Co., Ltd.)	
Metotrexato (Trexall [™] , Teva Pharmaceuticals)	
Paclitaxel (Taxol [®] , Bristol-Myers Squibb)	
Paclitaxel [ligado à albumina] (Abraxane [®] , Celgene Corporation)	
Palbociclibe (Ibrance [®] , Pfizer)	
Pertuzumabe (Perjeta [®] , Roche)	
Ribociclibe (Kisqali [®] , Novartis)	
Sulfato de Vimblastina (Velban [®] , ABL Pharma)	
Tiotepa (Tepadina [®] , ADIENNE Pharma & Biotech)	
Toremifeno (Fareston [®] , Novadoz Pharmaceuticals)	
Trastuzumabe (Herceptin [®] , Roche)	
Trastuzumabe + Hialuronidase-oysk (Herceptin Hylecta [®] , Genentech, Inc.)	
Tucatinibe (Tukysa [®] , Seattle Genetics, Inc.)	

BRCA = gene *breast cancer*. **PIK3CA** = gene *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*. Última atualização realizada em janeiro/2024.
Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE C – QUIMIOTERAPIA PARA O TRATAMENTO DO CÂNCER DE PRÓSTATA METASTÁTICO

INSUMOS FARMACÊUTICOS ATIVOS

CÂNCER DE PRÓSTATA METASTÁTICO

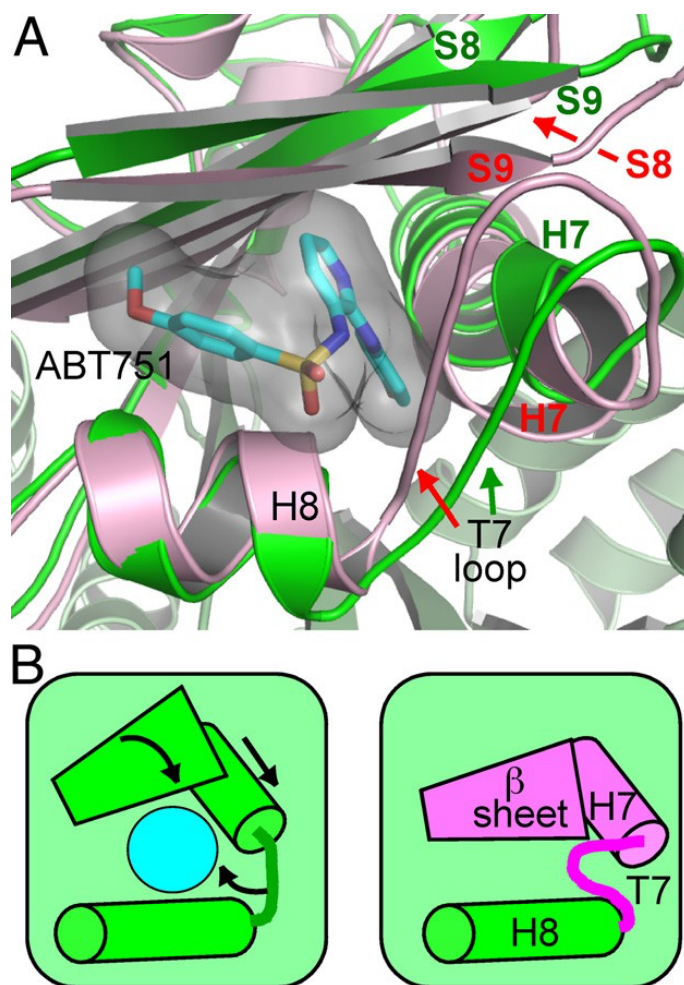
LINHAGENS

SELVAGENS / RESPONSIVAS (<i>WILD-TYPE</i> AR)	HORMÔNIO-REFRATÁRIAS / RESISTENTES (<i>MUTANT</i> AR)
1ª GERAÇÃO DE ANDRÓGENOS	2ª GERAÇÃO DE ANDRÓGENOS
Acetato de Gosserrelina (Zoladex [®] , AstraZeneca)	Acetato de Abiraterona (Zytiga [®] , Janssen)
Acetato de Leuprorrelina (Eligard [®] , Tolmar)	Cabazitaxel (Jevtana [®] , Sanofi)
Apalutamida (Erleada [®] , Janssen)	Camsilato de Rucaparibe (Rubraca [®] , Clovis Oncology)
Bicalutamida (Casodex [®] , AstraZeneca)	Cloridrato de Mitoxantrona (Novantrone [®] , Pfizer)
Degarelix (Firmagon [®] , Ferring)	Darolutamida (Nubeqa [®] , Bayer)
Flutamida (Eulexin [®] , Schering-Plough)	Dicloreto de Rádio, 223Ra (Xofigo [®] , Bayer)
Histrelina Acetato (Vantas [®] , Endo)	Docetaxel (Taxotere [®] , Sanofi)
Nilutamida (Nilandron [®] , Sanofi)	Enzalutamida (Xtandi [®] , Astellas)
Pamoato de Triptorrelina (Trelstar [®] , Allergan)	Estramustina (Emcyt [®] , Pfizer)
Relugolix (Orgovyx [™] , Sumitovant Biopharma)	Olaparibe (Lynparza [®] , AstraZeneca)
Valerato de Estradiol (Delestrogen [®] , Perrigo Company)	Sipuleucel-T (Provenge [®] , Dendreon)
	Tosilato de talazoparibe (Talzenna [®])
	177Lu-PSMA-617 (Pluvicto [™] , Novartis)

AR = receptor de andrógeno. Última atualização realizada em janeiro/2024.

Fonte: Elaborada pelo autor.

APÊNDICE D – ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS NO DOMÍNIO DA COLCHICINA DURANTE A CONVERSÃO DA TUBULINA DE CURVA PARA RETA



(A) Uma das subunidades β da tubulina em T2R-ABT751 é mostrada em tons de verde claro (domínio N-terminal e hélices C-terminais) e verde mais escuro (domínio intermediário, de H6 a S10). ABT751 está em ciano. O domínio intermediário da β -tubulina em sua conformação reta (ID do PDB: 1JFF) é representado (cor-de-rosa) após a sobreposição do domínio N-terminal com o da β -tubulina em T2R. Na estrutura reta, a folha β do domínio intermediário, especialmente as fitas S8 e S9, se aproximam da hélice H8. Juntamente com a translação de H7, isso resulta na redução do domínio da colchicina. Quando um ligante está ligado a ele, a conformação reta não pode ser alcançada devido a colisões estéricas com os elementos de estrutura secundária circundantes (S8, S9, H7 e H8).

(B) Visão esquemática da conversão de tubulina curva (esquerda) para reta (direita). Os movimentos dos elementos de estrutura secundária do domínio intermediário da tubulina são indicados por setas. Esses movimentos são impedidos por ligantes no domínio da colchicina (representados aqui como um disco azul).

Fonte: Retirado de *Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin*, de Dorléans et al., 2009 [57].

APÊNDICE E – PUBLICAÇÕES RELACIONADAS COM CBSIS NAS ÚLTIMAS DÉCADAS REGISTRADAS NO PUBMED

período	palavras-chave	
	<i>colchicine binding site inhibitors</i>	
	número de artigos	porcentagem
<i>1971-1980</i>	25	3
<i>1981-1990</i>	59	7
<i>1991-2000</i>	97	12
<i>2001-2010</i>	111	14
<i>2011-2024</i>	517	64

Última atualização realizada em janeiro/2024.

Fonte: Elaborada pelo autor.

ANEXO


 Cite this: *RSC Adv.*, 2023, **13**, 20264

Discovery of indolizine lactones as anticancer agents and their optimization through late-stage functionalization†

 Thiago Sabino da Silva,^a Matheus da Silva Souza,^b Adriano Defini Andricopulo^b and Fernando Coelho^{a*}

 Received 21st May 2023
 Accepted 26th June 2023

DOI: 10.1039/d3ra03395c

rsc.li/rsc-advances

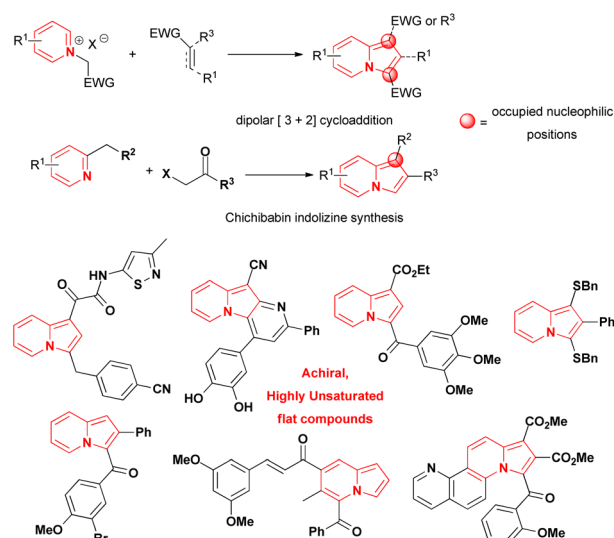
Indolizines fused with a seven-member lactone ring were identified as a promising scaffold in the search for new anticancer agents. Through a modular synthetic sequence, a library of *cis* and *trans* indolizines lactones had their antiproliferative activity evaluated against hormone-refractory prostate DU-145 and triple-negative breast MDA-MB-231 cancer cell lines. A methoxylated analogue was identified as an initial hit against MDA-MB-231 and late-stage functionalization of the indolizine core led to analogues within potencies up to twenty times higher than the parent precursor.

Introduction

Indolizines, which are indole isomers and bioisosters,¹ are present in numerous compounds that exhibit biological activity.^{2,3} They are considered privileged scaffolds for drug development,⁴ but no indolizine-based drugs have been marketed so far.¹ The best studied indolizines in terms of biological activity were primarily assessed through dipolar cycloadditions involving pyridinium ylides and electron deficient alkenes/alkynes or *via* the wide-spread Chichibabin reaction from 2-methylpyridinium salts (Scheme 1).^{1-3,5-15} The mild conditions, the ready access to starting materials and the modular synthetic approach that characterised those methods were some of the reasons leading to their extensive use in the search for indolizines with biological activities. Consequently, indolizines obtained by those methods were typically characterised by a high degree of planarity and by the absence of stereogenic centers, leading to an overall low level of molecular complexity, a property associated with improvements in the physicochemical properties, selectivity and safety of compounds during the drug discovery process.¹⁶⁻¹⁹ The multi-substituted character of these indolizines, especially at the nucleophilic positions 1 and 3 of the heterocyclic core or/and the presence of electron-withdrawing groups directly attached to them, potentially precluded the evaluation of late-stage functionalization (LSF)

strategies as suitable option to increase the drug profile of these molecules. This is another point that should be addressed during the design of new indolizines for biological activity evaluation.

The development of synthetic methods that would lead to more complex indolizines is therefore of great significance, and the introduction of chiral centers, fused rings or increases in the fraction of sp³ carbons (Fsp³ – the number of sp³ hybridised carbons/total carbon count) could be used to assess compounds with different topologies and increased molecular complexity.¹⁶ The functionalization of indolizines, rather than their *de novo* synthesis, appears to represent a suitable way to achieve this



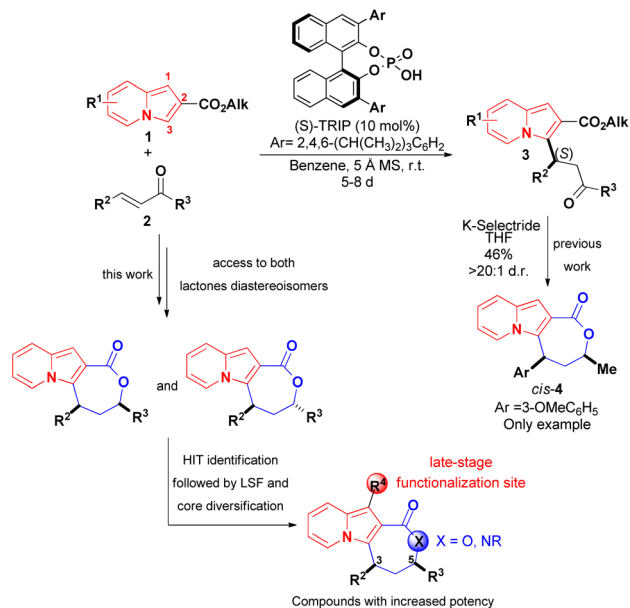
Scheme 1 Examples of indolizine motifs founded in compounds with anticancer activity and common strategies for their synthesis.^{1,10-15}

^aLaboratory of Synthesis of Natural Products and Drugs, Institute of Chemistry, University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, S/N, 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil. E-mail: facoelho@unicamp.br

^bLaboratory of Medicinal and Computational Chemistry, Institute of Physics of Sao Carlos, University of Sao Paulo – Avenida Joao Dagnone, 1100-13563-120 – Sao Carlos, SP, Brazil

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: <https://doi.org/10.1039/d3ra03395c>





Scheme 2 Reported asymmetric synthesis of an indolizine lactone (Coelho and List, 2017)²⁰ and the molecular sites available for further modifications during the investigation of biological activities of **4**.

goal. Along these lines, we recently described an organocatalytic asymmetric and diastereoselective synthesis of an indolizine fused to a lactone ring bearing two stereocenters, starting from the pre-formed 2-carboxyindolizine core **1** (Scheme 2).²⁰ The synthetic sequence of regioselective conjugate addition of **1** to enone **2**, followed by carbonyl reduction/ring closure, offers a modular approach for synthesis of indolizine lactone **4** with different structural patterns, allowing a rapid evaluation of the structure–activity relationship (SAR) towards a biological target. Additionally, the nucleophilic C1 position of the indolizine remains available on **4** and could represent a site for late-stage functionalization after the identification of promising compounds.

The exquisite indolizine lactone **4** has a seven-membered ring that resembles the one encountered in colchicine, a potent cytotoxic natural product extensively investigated

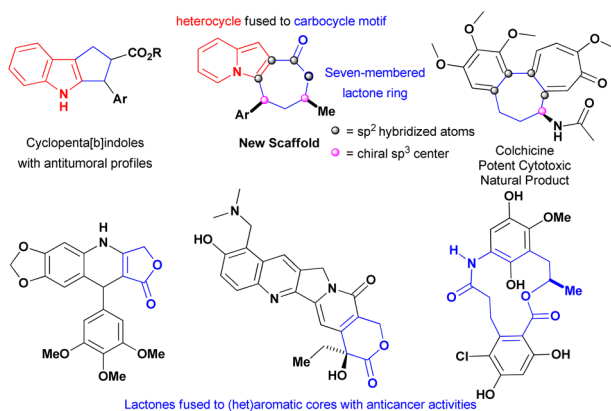


Fig. 1 Structural features of indolizines lactones founded in compounds with anticancer properties.

against different types of cancer,²¹ and its fused heterocyclic-carbocycle motif could be viewed as an ring-expanded version of cyclopenta[*b*]indoles that display excellent cytotoxicity against multiple cancer cell lines (Fig. 1).²² These factors, associated with the findings that indolizines^{1,10–15} and lactones^{23–25} were encountered in compounds with antitumoural properties, prompted our evaluation of this new core against triple-negative breast (MDA-MB-231) and hormone-refractory prostate metastatic (DU-145) cancer cells—both of which are metastatic.

We anticipated that the flexible approach used to construct more complex indolizine lactone derivatives, together with the late-stage functionalization strategy, would be fundamental to finding compounds with increased antiproliferative activity.

Results and discussion

Chemistry

Despite the existence of an enantio- and diastereoselective route for the synthesis of *cis*-indolizine lactones **4**, the evaluation of racemates and *trans* isomers potentially expands the possibilities of finding a hit compound on a first biological screening. Targeted *cis* and *trans* (*rac*)-lactones were obtained using the following 3-step sequence (Scheme 3): (1) diphenyl phosphate (DPP) catalysed conjugate addition between 2-carboxymethyl indolizine (**1**) and methyl cinnamyl ketones **2**; (2) reduction of conjugate adducts **3** using NaBH₄ (no lactonization was observed in this step), followed by chromatography separation of the *syn* and *anti*-hydroxy esters **5**; (3) lactonization of alcohols **5** catalysed by *para*-toluenesulfonic acid (*p*-TsOH).

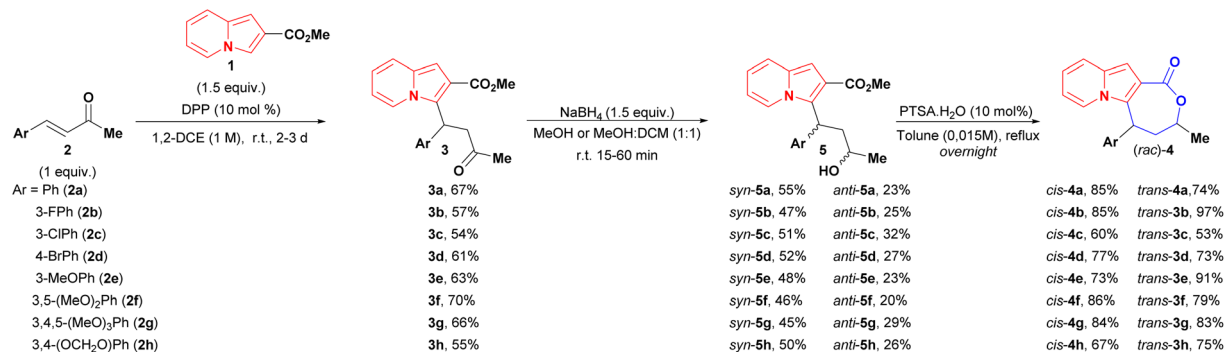
As general remarks, the reduction of conjugate adducts **3** using the non-hindered reducing agent NaBH₄ favoured the *syn* isomer, as observed in our previous work.²⁰ It showed moderated stereoselectivity, which allowed the isolation of *anti* alcohols **5**, as well as access to *trans* lactones **4**. Alternatively, the key hydroxy esters could be obtained in a one-pot two-step conjugate addition/reduction way, thereby obviating the need for the one chromatography step, as exemplified in the synthesis of *syn* and *anti* **5f** analogues in a slightly better global yield of 55% yield (Scheme 4).

Indolizine lactone *cis*-**4f** was identified as an initial hit on the first biological screening (see Table 1) and was selected for further synthetic manipulations. Modifications to the backbone of the seven-membered ring and to the indolizine motif were realised first. Lactam analogues of **4f** were synthesised *via* reductive amination of conjugate adduct **3** to afford a separable mixture of *syn* and *anti* aminoesters **6**, which cyclized into the corresponding *cis* and *trans* lactams (Scheme 5). Intriguingly, the majority product after the reduction step was the *anti* diastereoisomer **6** rather than the *syn* diastereoisomer observed after reduction of **3** with NaBH₄ or K-Selectride.²⁰

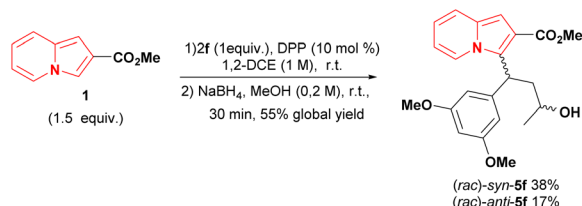
Another straightforward modification of the scaffold of *cis*-**4f** was achieved through the partial hydrogenation of its indolizine core using platinum oxide (PtO₂) as the catalyst. This led to the 5,6,7,8-tetrahydro-indolizine lactone *cis*-**8** in 65% yield (Scheme 6).²⁶

In addition to changes to the backbone of *cis*-**4f**, late-stage functionalization of the available indolizine C1 position opened up a new chemical space for further investigations. The





Scheme 3 Synthetic sequence to both diastereoisomers of indolizine lactones. ^aThe relative configurations of 5 were determined after the lactonization step.



Scheme 4 One-pot synthesis of 5f hydroxy esters.

C1 reactivity of indolizines has scarcely been explored since it is less reactive than C3 and few methods are available for the synthesis of C1-free, C3-substituted indolizines.²⁷ Here, we investigated the reactivity of *cis*-4f in reactions of thiolation,^{15,28} trifluoroacetylation and oxidative coupling,²⁹ to further evaluate the impact of these peripheral modifications on the anti-proliferative activity (Scheme 7).

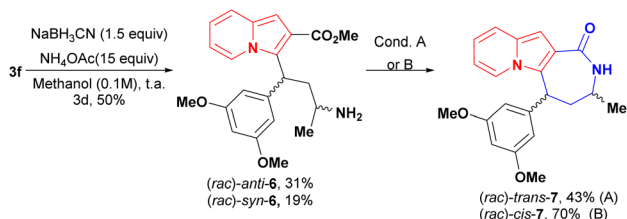
Thiolation of *cis*-4f in the presence of thiophenol, *tert*-butyl hydroperoxide (TBHP), and catalytic potassium iodide (KI) afforded *cis*-9 in 57% yield (Scheme 7). Previously,²⁸ only

Table 1 IC₅₀ and CC₅₀ values in μM for *cis* and *trans* lactones 4^a

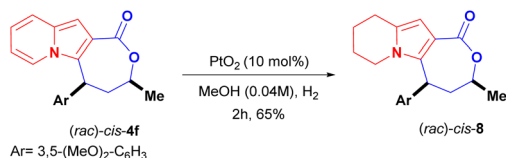
Entry	Ar	IC ₅₀		CC ₅₀ ^f	
		Cancer cell lines		Non-tumor cell lines (systemic)	
		DU-145 ^b	MDA-MB-231 ^c	FC3H ^d	HFF-1 ^e
1	Ph (<i>cis</i> -4a)	>100	67.86 ± 6.61	ND	ND
2	Ph (<i>trans</i> -4a)	>100	>100	ND	ND
3	3-FPh (<i>cis</i> -4b)	>100	79.51 ± 21.84	ND	ND
4	3-FPh (<i>trans</i> -4b)	>100	52.87 ± 0.84	ND	ND
5	3-ClPh (<i>cis</i> -4c)	54.71 ± 2.59	35.99 ± 0.69	ND	ND
6	3-ClPh (<i>trans</i> -4c)	>100	>100	ND	ND
7	4-BrPh (<i>cis</i> -4d)	34.41 ± 2.68 (0.03) ^g	16.72 ± 0.80 (0.06) ^g	>100	0.92 ± 0.22
8	4-BrPh (<i>trans</i> -4d)	46.65 ± 7.29 (>2) ^g	21.99 ± 3.44 (>5) ^g	>100	>100
9	3-MeOPh (<i>cis</i> -4e)	>100	21.05 ± 2.22 (>5) ^g	>100	>100
10	3-MeOPh (<i>trans</i> -4e)	>100	53.03 ± 2.31	ND	ND
11	3,5-MeOPh (<i>cis</i> -4f)	52.41 ± 0.45 (>2) ^g	20.47 ± 0.79 (>5) ^g	>100	>100
12	3,5-MeOPh (<i>trans</i> -4f)	>100	27.64 ± 0.99	ND	ND
13	3,4,5-MeOPh (<i>cis</i> -4g)	36.93 ± 2.58	>100	ND	ND
14	3,4,5-MeOPh (<i>trans</i> -4g)	>100	>100	ND	ND
15	Piperonyl (<i>cis</i> -4h)	52.28 ± 1.46	31.95 ± 2.72	ND	ND
16	Piperonyl (<i>trans</i> -4h)	35.67 ± 2.24	29.41 ± 5.46	ND	ND

^a Mean values ± standard error were expressed as the result of three independent experiments. DMSO was used as a negative control and doxorubicin and colchicine were used as positive controls (see ESI for further details). ^b Human prostate epithelial tumour cells. ^c Human breast epithelial tumour cells. ^d Mouse liver fibroblast cells. ^e Human skin fibroblast cells. ^f Only molecules with IC₅₀ ≤ 20 μM in cancer cell lines were tested against the nontumour ones. ^g Values in parentheses are the selectivity indexes (SI = CC₅₀/IC₅₀) towards the HFF-1 cell lines. ND: not determined.





Scheme 5 Synthesis of lactams **7** and partial hydrogenation of *cis*-**4f**. Condition A: NEt_3 (0.022 M) reflux, overnight; Condition B: toluene (0.025 M), NEt_3 (12 equiv.) reflux, overnight.

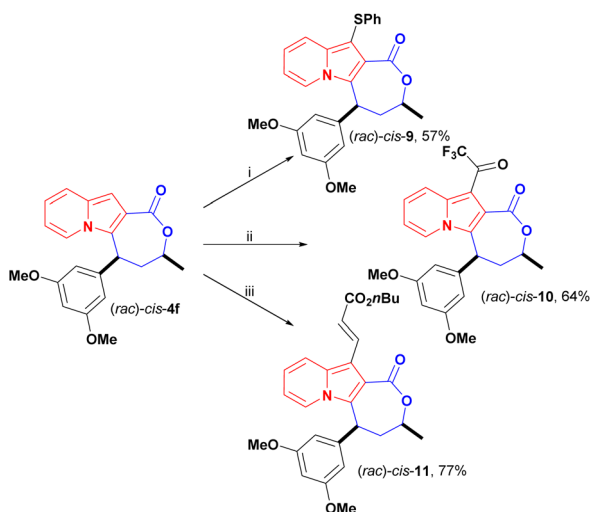


Scheme 6 Synthesis of lactams **7** and partial hydrogenation of *cis*-**4f**.

unsubstituted 2-aryl indolizines were reported as substrates for this transformation, but indolizine lactone *cis*-**4f** proved to be a suitable substrate for this transformation.

Trifluoroacetylation was achieved under mild conditions using trifluoroacetic anhydride (TFFA) and triethylamine. The trifluoromethyl ketone (TFMK) derivative *cis*-**10** was obtained in 64% yield (Scheme 7).

Olefination of *cis*-**4f** with *n*-butyl acrylate was carried out under Rh(II) catalysis using the lactone motif as a directing group for C–H activation at the C1 position, and *cis*-**11** was obtained in good yield, at 77%, in these conditions (Scheme 7). Notably, C–H activation of the C8 and C2 positions of indolizines was previously achieved employing amides, esters,



Scheme 7 Late-stage functionalization of *cis*-**4f**: (i) PhSH (2 equiv.), KI (10%), TBHP (2 equiv.), DMSO (0.1 M), 60 °C, 22 h. (ii) TFFA (1.25 equiv.), NEt_3 (1.5 equiv.), DCM (0.02 M), 0 °C, 1 h. (iii) *n*-butyl acrylate (4 equiv.), $[\text{Cp}^*\text{RhCl}_2]_2$ (4 mol%), AgSbF_6 (0.16 equiv.), $\text{Cu}(\text{OAc})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (2.1 equiv.), DCE (0.1 M), 100 °C.

ketones and aldehydes as directing groups.^{29,30} Here, we successfully expanded this strategy to activate the C-1 position within the carboxyl lactone motif.

Biological activity

The antiproliferative activities of lactones **4** were tested *in vitro* against two human cancer cell lines (DU-145, ATCC: HTB-81, hormone-refractory prostate cancer; and MDA-MB-231, ATCC: HTB-26, triple-negative breast cancer) purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, Virginia, EUA) or Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ, Rio de Janeiro, Brazil), using resazurin assays. DMSO was used as a negative control, and colchicine and doxorubicin were employed as positive controls (Table 1).

Except for the *trans* lactones **4a**, **4c**, and **4g**, all compounds exhibited antiproliferative activity against at least one of the human cancer cell lines tested. As a general trend, indolizines **4** showed more cytotoxicity towards breast cancer cells than towards the prostate cancer cells. The exception was *cis*-**4g** (Table 1, entry 13), which seemed to be promisingly selective for the DU-145 cell lines ($\text{IC}_{50} = 36.93 \pm 2.58 \mu\text{M}$). Fortunately, the diastereoisomer *cis* was more active than the *trans* isomers, and could be synthesised diastereoselectively using a hindered reducing agent.²⁰ This difference in activity highlights the important role of chirality in determining biological effectiveness.

The cytotoxic activities of *cis* halogenated indolizines (Table 1, entries 3, 5 and 7) against MDA-MB-231 cell lines were inversely proportional to the electronegativity of the substituents, suggesting a possible ‘halogen bonding effect’.^{31,32} The presence of a fluorine atom on *cis*-**4b** [IC_{50} (MDA-MB-231) = $79.51 \pm 21.84 \mu\text{M}$] had a negative impact on its antiproliferative capacity when compared with unsubstituted phenyl analogue *cis*-**4a** [IC_{50} (MDA-MB-231) = $67.86 \pm 6.61 \mu\text{M}$]. Conversely, the presence of a bromine atom appeared to increase the antiproliferative activities of both the *cis* and *trans* lactones **4d** (entries 6 and 7).

Lactone *cis*-**4d** (entry 7) exhibited the highest cytotoxicity against both cancer lines [IC_{50} (DU-145) = $34.41 \pm 2.68 \mu\text{M}$ and IC_{50} (MDA-MB-231) = $16.72 \pm 0.80 \mu\text{M}$] in this first evaluation and was almost inactive against non-tumoural mouse liver fibroblast cell lines [CC_{50} (FC3H, BCRJ: 0082) > $100 \mu\text{M}$] (Table 1, entry 7). Unfortunately, *cis*-**4d** was more cytotoxic against healthy human skin fibroblast cell lines [CC_{50} (HFF-1, ATCC: SCRC-1041) = $0.92 \pm 0.22 \mu\text{M}$] than it was against cancer lines, thereby ruling out further investigations and structural modifications of this compound. The *trans* isomer of lactone **4d** (entry 8) was slightly less potent against cancer cells [IC_{50} (DU-145) = $46.65 \pm 7.29 \mu\text{M}$ and IC_{50} (MDA-MB-231) = $21.99 \pm 3.44 \mu\text{M}$] than *cis*-**4d**; nevertheless, it displayed good selectivity index (SI) values [SI (HFF-1/DU-145) ≥ 2.14 and SI (HFF-1/MDA-MB-231) ≥ 4.55] when compared with the observed cytotoxicity against both systemic cell types evaluated ($\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ for both cell lines).

Among the alkoxyated analogues (Table 1, entries 9–16), mono-methoxylated *cis*-**4e** and bis-methoxylated *cis*-**4f** (entries 9 and 11) displayed lower IC_{50} values against breast cancer cell



lines ($21.05 \pm 2.22 \mu\text{M}$ and $20.47 \pm 0.79 \mu\text{M}$, respectively) and good SI values (both compounds showed CC_{50} values higher than $100 \mu\text{M}$ for FC3H and HFF-1 cells). Increasing the number of methoxy groups (entries 13 and 14) or using piperonyl derivatives (entries 15 and 16) affected the antiproliferative activity of the lactones.

Indolizine lactone *cis*-**4f** showed the best balance between cytotoxicity and selectivity and was therefore selected for further synthetic manipulations that might improve these attributes (Fig. 2). The presence of alkoxyated motifs in a series of natural and synthetic compounds with observed antitumoral activities^{21,33–36} and in other studies with indolizine derivatives as well,^{10,11,37,38} reinforced the choice of *cis*-**4f** as our first hit.

Changes to the backbone of **4f**, such as the substitution of the seven-member lactone ring for a lactam ring, could give important insights into the molecular proprieties associated with biological activity. The N–H motif acts as a hydrogen-bond donor and could therefore positively impact the molecular recognition of a compound by a biological target, while also improving its water solubility. In addition, lactams are less susceptible to hydrolysis and might improve compound bioavailability compared with lactones derivatives.^{39,40} However, the lactam analogues of **4f**, *cis*-**7** [IC_{50} (DU-145) $\geq 100 \mu\text{M}$ and IC_{50} (MDA-MB-231) = $57.17 \pm 3.99 \mu\text{M}$] and *trans*-**7** [IC_{50} (DU-145) $\geq 100 \mu\text{M}$ and IC_{50} (MDA-MB-231) = $52.44 \pm 0.81 \mu\text{M}$] were considerably less cytotoxic than the parent compound to cancer cell lines (Fig. 2), proving that the presence of oxygen on the seven-membered ring was essential to biological activity.

The role of the fully aromatised indolizine core on the biological outcome was evaluated by synthesising a 5,6,7,8-tetrahydro-indolizine *cis*-**8** (Scheme 6). This new compound possesses a higher fraction of sp^3 carbon atoms (where Fsp^3 = the number of sp^3 hybridised carbons/total carbon count), at

$\text{Fsp}^3 = 0.476$ versus $\text{Fsp}^3 = 0.285$ for the parent compound *cis*-**4f**, a property that is used to measure molecular complexity.^{16,17} Derivative *cis*-**8** was, nevertheless, less active [IC_{50} (DU-145) $\geq 56.27 \pm 6.82 \mu\text{M}$ and IC_{50} (MDA-MB-231) = $35.59 \pm 4.37 \mu\text{M}$] than *cis*-**4f**, demonstrating the important role of the indolizine aromatised core (Fig. 2).

Peripheral modifications of *cis*-**4f** were then performed through late-stage functionalization of the indolizine C1 position (see Scheme 7). Fortuitously, the thiolated, trifluoroacetylated and olefinated analogues were more cytotoxic than their precursor against both cancer cell lines without being harmful to the systemic non-tumour FC3H and HFF-1 cells ($\text{CC}_{50} > 100 \mu\text{M}$ for both lines) (Fig. 2). Remarkably, all the new analogues were more active against breast cancer cells.

Thiolated *cis*-**9** displayed an impressive 13.5-fold cytotoxicity increase against the breast cancer cells ($\text{IC}_{50} = 1.51 \pm 0.20 \mu\text{M}$) and a modest 1.4-fold against the prostate cancer cells ($\text{IC}_{50} = 36.42 \pm 1.27 \mu\text{M}$) when compared with the activity of the parent compound *cis*-**4f**. Decoration of *cis*-**4f** with the covalent warheads trifluoromethyl ketone and acrylate resulted in compounds with increased antiproliferative activity (Fig. 2). TFMK *cis*-**10** [IC_{50} (DU-145) = $13.42 \pm 0.64 \mu\text{M}$ and IC_{50} (MDA-MB-231) = $4.19 \pm 0.50 \mu\text{M}$] showed a 4.9-fold increased cytotoxicity against the breast cancer cells and a 3.9-fold increase against the prostate cancer cells. Olefinated analogue *cis*-**11** displayed the highest antiproliferative values against both cancer lines among all compounds tested, with an impressive 12-fold increase against prostate cancer cells ($\text{IC}_{50} = 4.41 \pm 0.93 \mu\text{M}$) and a 20-fold cytotoxicity increase against breast cancer cells ($1.01 \pm 0.20 \mu\text{M}$).

Finally, with the aim of broadening the analysis of the specificity of the selected compounds regarding the site of the primary manifestation of prostate and breast cancer, *cis*-**9** to **11**, which displayed IC_{50} values lower than $20 \mu\text{M}$ and systemic selectivity indexes higher than 5, had their cytotoxicity evaluated against local tissue non-tumoural RWPE-1 (BCRJ: 0389) and MCF-10A (ATCC: CRL-10317) cells (Fig. 2). Indolizine lactone *cis*-**9**, which showed markedly better cytotoxicity against MDA-MB-231 cell lines than against DU-145 lines, displayed a promising local SI value for breast tissues (SI = 47.95). Low or no local selectivity was observed for prostate cells when *cis*-**10** and **11** were evaluated (SI = 1.03 and 0.61 respectively); nevertheless, they showed good to excellent local SI values towards breast cell lines (SI ≥ 24 and ≥ 99 respectively).

Conclusions

The modular ring synthesis of *cis* and *trans* decorated lactones **4** emphasised the role of stereochemistry in biological activity, as the *cis* compounds were systematically more cytotoxic than the *trans* compounds for both tested cancer cell lines DU-145 (prostate) and MDA-MB-231 (breast) and were selectively more potent towards breast cancer cells. By screening both diastereoisomers, we doubled the number of identities tested and found bis-methoxylated *cis*-**4f** as an initial hit. Late-stage functionalization of *cis*-**4f** proved to be a suitable strategy for increasing the antiproliferative activity of the core while still

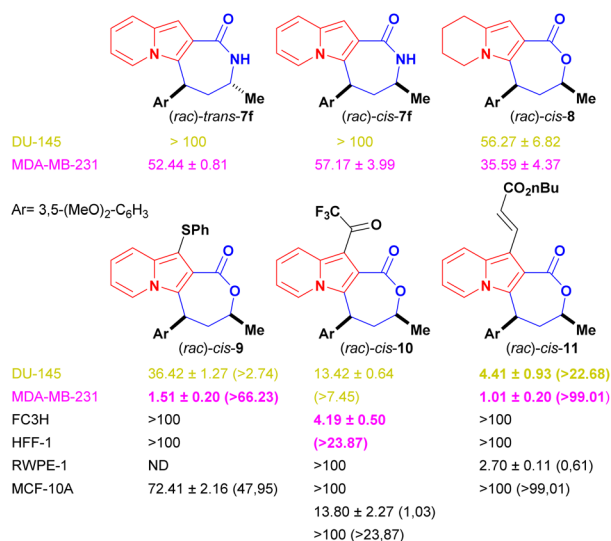


Fig. 2 IC_{50} values (μM) of *cis*-**4f** analogues. Selectivity index values (SI = $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$) between cancer cell lines (DU-145 and MDA-MB-231) and systemic (FC3H and HFF-1) and local non-tumour cells [RWPE-1 (prostate) and MCF-10A (breast)] are listed in parentheses. ND: not determined.



maintaining good selectivity index values. Decoration of the *cis*-4f motif with covalent warheads, such as trifluoromethyl ketone and acrylate, resulted in up to a 20-fold cytotoxicity increment.

Although the introduction of covalent warheads would be expected to lead to an increase in cytotoxicity, we found that the thiolated analogue *cis*-9 potentially avoided the toxicity issues associated with irreversible covalent inhibitors due their promiscuous reactivity.

Considering the availability of an organocatalytic, asymmetric and diastereoselective synthesis of *cis*-indolizine lactones **4**, we can expect that the evaluation of enantiopure compounds will lead to IC₅₀ values even lower than the ones observed here. The modular synthetic approach towards these cores also offers other sites for further modifications, such as the indolizine pyridine moiety or the thioether substitution pattern of *cis*-9 derivatives.

Conflicts of interest

There are no conflicts to declare.

Acknowledgements

This study was financed, in part, by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior–Brasil (CAPES)–Finance Code 001. F. C. thanks also the Brazilian National Council for Science and Development (CNPq) for the research fellowship (process no. 307840/2014-0 and 301330/2018-2) and FAPESP (process no. 2013/07600-3 and 2018/02611-0). T. S. S. thanks CAPES for the fellowship. M. S. S. acknowledge the Brazilian funding agency CNPq (process no. 141245/2019-0) and FAPESP (process no. 2018/25289-7 and 2022/00219-1) for the financial support. The authors would also like to thank the Center for Innovation in Biodiversity and Drug Discovery (CIBFar-CEPID, process no. 2013/07600-3).

Notes and references

- D. A. James, K. Koya, H. Li, G. Liang, Z. Xia, W. Ying, Y. Wu and L. Sun, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, **18**, 1784.
- K. M. Dawood and A. A. Abbas, *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2020, **30**, 695.
- G. S. Singh and E. E. Mmatli, *Eur. J. Med. Chem.*, 2011, **46**, 5237.
- M. E. Welsch, S. A. Snyder and B. R. Stockwell, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, **14**, 347.
- V. Sharma and V. Kumar, *Med. Chem. Res.*, 2014, **23**, 3593.
- C. R. de Souza, A. C. Gonçalves, M. F. Z. J. Amaral, A. A. Dos Santos and G. C. Clososki, *Targets Heterocycl. Syst.*, 2016, **20**, 365.
- B. Sadowski, J. Klajn and D. T. Gryko, *Org. Biomol. Chem.*, 2016, **14**, 7804.
- S. Dong, X. Fu and X. Xu, *Asian J. Org. Chem.*, 2020, **9**, 1133.
- J. Hui, Y. Ma, J. Zhao and H. Cao, *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**, 10245.
- A. Boot, A. Brito, T. van Wezel, H. Morreau, M. Costa and F. Proença, *Anticancer Res.*, 2014, **34**, 1673.
- A. Ghinet, C. M. Abuhaie, P. Gautret, B. Rigo, J. Dubois, A. Farce, D. Belei and E. Bîcu, *Eur. J. Med. Chem.*, 2015, **89**, 115.
- R. Danac, C. M. Al Matarneh, S. Shova, T. Daniloia, M. Balan and I. I. Mangalagiu, *Bioorg. Med. Chem.*, 2015, **23**, 2318.
- S. Park, E. H. Kim, J. Kim, S. H. Kim and I. Kim, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **144**, 435.
- A. V. Aksenov, N. A. Arutiunov, N. K. Kirilov, D. A. Aksenov, I. Y. Grishin, N. A. Aksenov, H. Wang, L. Du, T. Betancourt, S. C. Pelly, A. Kornienko and M. Rubin, *Org. Biomol. Chem.*, 2021, **19**, 7234.
- G. Li, X. Wu, P. Sun, Z. Zhang, E. Shao, J. Mao, H. Cao and H. Huang, *Biomed. Pharmacother.*, 2021, **133**, 110961.
- F. Lovering, J. Bikker and C. Humblet, *J. Med. Chem.*, 2009, **52**, 6752.
- F. Lovering, *Medchemcomm*, 2013, **4**, 515.
- O. Méndez-Lucio and J. L. Medina-Franco, *Drug Discovery Today*, 2017, **22**, 120.
- S. L. Schreiber, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, **108**, 6699.
- J. T. M. Correia, B. List and F. Coelho, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2017, **56**, 7967.
- Y. Lu, J. Chen, M. Xiao, W. Li and D. D. Miller, *Pharm. Res.*, 2012, **29**, 2943.
- M. S. Santos, D. C. Fernandes, M. T. Rodrigues, T. Regiani, A. D. Andricopulo, A. L. T. G. Ruiz, D. B. Vendramini-Costa, J. E. de Carvalho, M. N. Eberlin and F. Coelho, *J. Org. Chem.*, 2016, **81**, 6626.
- Y. Hitotsuyanagi, M. Fukuyo, K. Tsuda, M. Kobayashi, A. Ozeki, H. Itokawa and K. Takeya, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2000, **10**, 315.
- Y. Pommier, *Nat. Rev. Cancer*, 2006, **6**, 789.
- M. Wang, G. Shen and B. S. J. Blagg, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2006, **16**, 2459.
- B. V. M. Teodoro, J. T. M. Correia and F. Coelho, *J. Org. Chem.*, 2015, **80**, 2529.
- L. A. Zeoly, L. V. Acconcia, M. T. Rodrigues, H. Santos, R. A. Cormanich, J. C. Paniagua, A. Moyano and F. Coelho, *Org. Biomol. Chem.*, 2023, **21**, 3567.
- B. Li, Z. Chen, H. Cao and H. Zhao, *Org. Lett.*, 2018, **20**, 3291.
- X. Feng, J. Tian, Y. Sun, H. Hu, M. Lu, Y. Kan, D. Fang and C. Wang, *Chin. Chem. Lett.*, 2021, **32**, 470.
- P. P. Jadhav, N. M. Kahar and S. G. Dawande, *Eur. J. Org. Chem.*, 2019, **2019**, 7831.
- L. A. Hardegger, B. Kuhn, B. Spinnler, L. Anselm, R. Ecabert, M. Stihle, B. Gsell, R. Thoma, J. Diez, J. Benz, J. M. Plancher, G. Hartmann, D. W. Banner, W. Haap and F. Diederich, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2011, **50**, 314.
- Y. Lu, Y. Liu, Z. Xu, H. Li, H. Liu and W. Zhu, *Expert Opin. Drug Discovery*, 2012, **7**, 375.
- J. M. Andreu, B. Perez-Ramirez, M. J. Gorbunoff, D. Ayala and S. N. Timasheff, *Biochemistry*, 1998, **37**, 8356.
- M. Niu, J. Qin, C. Tian, X. Yan, F. Dong, Z. Cheng, G. Fida, M. Yang, H. Chen and Y. Gu, *Acta Pharmacol. Sin.*, 2014, **35**, 967.
- L. Li, S. Jiang, X. Li, Y. Liu, J. Su and J. Chen, *Eur. J. Med. Chem.*, 2018, **151**, 482.



- 36 W. Shuai, G. Wang, Y. Zhang, F. Bu, S. Zhang, D. D. Miller, W. Li, L. Ouyang and Y. Wang, *J. Med. Chem.*, 2021, **64**, 7963.
- 37 L. Lucescu, A. Ghinet, D. Belei, B. Rigo, J. Dubois and E. Bicu, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2015, **25**, 3975.
- 38 M.-C. Sardaru, A. M. Craciun, C.-M. Al Matarneh, I. A. Sandu, R. M. Amarandi, L. Popovici, C. I. Ciobanu, D. Peptanariu, M. Pinteala, I. I. Mangalagiu and R. Danac, *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, 2020, **35**, 1581.
- 39 I. Chourpa, J. M. Millot, G. D. Sockalingum, J. F. Riou and M. Manfait, *Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.*, 1998, **1379**, 353.
- 40 K. C. Nicolaou, D. Vourloumis, N. Winssinger and P. S. Baran, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, **39**, 44.

