

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação *in vitro* de atividade antitumoral e toxicidade de híbridos cumarina-triazol

LUCAS VOLNEI AUGSTEN

PORTO ALEGRE, 2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação *in vitro* de atividade antitumoral e toxicidade de híbridos cumarina-triazol

Dissertação apresentada por **Lucas Volnei Augsten** para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Vera Lucia Eifler-Lima

CO-ORIENTADORA: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia

PORTO ALEGRE, 2022

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Raffin Pohlmann

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Gilsane Lino von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Marcelo Dutra Arbo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Rômulo Faria Santos Canto

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Volnei Augsten, Lucas  
Avaliação in vitro de atividade antitumoral e  
toxicidade de híbridos cumarina-triazol / Lucas Volnei  
Augsten. -- 2022.  
64 f.

Orientadora: Vera Lúcia Eifler-Lima.

Coorientadora: Solange Cristina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,  
BR-RS, 2022.

1. modelos alternativos ao uso de animais. 2.  
cumarinas. 3. antitumoral. 4. híbridos  
cumarina-triazol. 5. toxicidade. I. Eifler-Lima, Vera  
Lúcia, orient. II. Garcia, Solange Cristina,  
coorient. III. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente à minha namorada Victória por ter sido minha parceira durante toda essa jornada, da troca de apartamento para começar a passar do salário de farmacêutico para a bolsa de mestrado, a passarmos a pandemia juntos no apartamento minúsculo, assistindo junto a minhas aulas e me servindo almoço no computador quando estas caíam nesse horário. Te amo!

Aos meus pais Roselaina e Flademir pelo apoio e suporte durante toda minha vida e meus irmãos Anderson, Gabriela e Júlia pelo apoio e torcida em todos os momentos.

Aos meus amigos de Sapiranga Gabriel, Erick, Michael e Nicolás por manter a amizade por anos e ser fonte dos momentos de descontração todos os dias.

Aos meus amigos de Porto Alegre Mariana, Breno, Paula e Nunes pelas novas amizades nessa cidade.

Às minhas orientadoras Vera e Solange pela confiança e oportunidade e por me guiarem durante esse meu trabalho. Também aos professores Marcelo e Gabriela pelos ensinamentos e parceria.

Aos colegas do LaSOM Thiago, Gustavo, Pablo, Maristela e Viviana; e do LaTOX Shanda, Igrid Flesh, Ingrid Garcia, Carol, Larissa, Aline, Karol, Yasmin, João, Bruno, e Luiz pelo apoio, parceria e momentos de descontração durante o trabalho.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM) e no Laboratório de Toxicologia (LaTOX) da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com financiamento da CAPES. O autor recebeu bolsa de estudos da CAPES.



## RESUMO

Muitos métodos alternativos tem sido validados para detectar toxicidade o mais cedo possível e assim diminuir o desperdício de recursos e esforços na pesquisa da química medicinal, modelos alternativos *in vivo* são especialmente valiosos pela quantidade de informação que eles podem providenciar por um baixo custo e em pouco tempo. O nosso grupo de pesquisa escreveu uma revisão da literatura publicada esse ano sobre métodos alternativos *in vivo* para screening de toxicidade usados na química medicinal. Esses modelos *in vivo* incluem o zebrafish, *Artemia salina*, *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, planárias, e o *Caenorhabditis elegans*. Chamamos atenção para o *C. elegans* por causa de sua popularidade em ascensão, uma vasta gama de usos, e seus resultados rápidos e confiáveis. Com o passar do tempo, o *C. elegans* virou uma opção para *screening* de fármacos de alta eficiência (HTS). Este manuscrito também lista brevemente outros métodos de *screening* usados para análises toxicológicas iniciais e o papel de métodos alternativos *in vivo* nestes cenários, classificando-os em modelos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* que tem recebido um interesse crescente nos últimos anos. Paralelamente, quatro híbridos cumarina-triazol foram sintetizados usando himecromona como precursor e testadas para avaliarmos a atividade antitumoral em linhagens celulares A549 (câncer de pulmão), HepG2 (câncer de fígado), J774A1 (macrófago de sarcoma de camundongo), MCF7 (câncer de mama), OVACAR (cancer de ovário), RAW (macrófago de leucemia murina), Siha (carcinoma de útero) e 3T3 (fibroblastos saudáveis). Avaliamos a citotoxicidade através de ensaios como MTT e vermelho neutro (VN), além de efeitos antioxidantes e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através do ensaio diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (DCF-DA), dano na membrana mitocondrial pelo ensaio etil ester de tetrametilrodamina (TMRE), apoptose/necrose pelo ensaio Anexina V-FITC/PI e dano no DNA pelo ensaio cometa alcalino. Os híbridos demonstraram atividade potente dentre as linhagens celulares testadas com IC<sub>50</sub> abaixo de 100 µM, com seletividade melhor que o fármaco de referência cisplatina, todos tiveram boa predição farmacocinética pelo programa SwissADME e causaram morte por apoptose. Duas das moléculas avaliadas demonstraram atividade antioxidante e três interromperam o potencial de membrana mitocondrial, além disso, nenhuma causou dano genotóxico nas células 3T3. Todos os híbridos estudados possuem potencial para serem *leads*.

**Palavras-chave:** modelos alternativos ao uso de animais, cumarinas, antitumoral, híbridos cumarina-triazol, toxicidade.



## ABSTRACT

Many alternative methods have been validated to detect toxicity as early as possible to diminish the waste of resources and efforts in medicinal chemistry research, and *in vivo* alternative methods are especially valuable for the amount of information they can provide at little cost and in a short time. We present a review of the literature published between the years 2000 and 2021 on *in vivo* alternative methods of toxicity screening employed in medicinal chemistry. These *in vivo* models include zebrafish, *Artemia salina*, *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, planarians, and *Caenorhabditis elegans*. Special attention is given to *C. elegans* because of its rising popularity, a wide range of uses, and its fast and reliable results. Over time, *C. elegans* also became a viable high-throughput (HTS) automated drug screening option. Additionally, this manuscript lists briefly the other screening methods used for the initial toxicological analyses and the role of alternative *in vivo* methods in these scenarios, classifying them as *in silico*, *in vitro* and alternative *in vivo* models that have been receiving a growing increase in interest in recent years. Four coumarin-triazoles were synthesized using hymechromone as a precursor and tested for antitumor activity on A549 (lung cancer), HepG2 (liver cancer), J774A1 (mouse sarcoma macrophage), MCF7 (breast cancer), OVACAR (ovarian cancer), RAW (murine leukaemia macrophage), Siha (uterus carcinoma) and toxicity on 3T3 (healthy fibroblasts) cell lines via MTT and neutral red (NR) assays; besides effect on reactive oxygen species (ROS) production and antioxidant activity via 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) assay, mitochondrial membrane disruption activity via tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) assay, apoptosis/necrosis evaluation via annexin V-FITC/PI assay and DNA damage via alkaline comet assay. The hybrids showed potent antitumor activity with IC<sub>50</sub> below 100 µM across all the cell lines tested, with better selectivity index than the reference drug cisplatin, all of them had good pharmacokinetic predictions via the SwissADME program and caused death by apoptosis induction. Two showed antioxidant activity *in vitro* and three disrupted the mitochondria membrane, besides none causing genotoxic damage on healthy cells. All of the hybrids may become potential leads, and further studies of rearrangement, elucidation of mechanism of action and evaluation of *in vivo* activity and toxicity of these molecules can be carried out.

**Keywords:** alternative *in vivo* models, coumarins, antitumour, coumarin-triazole hybrids, toxicity



## LISTA DE ABREVIATURAS

3T3 – Linhagem celular de fibroblastos saudáveis

A549 - Linhagem celular de carcinoma de pulmão

AchE – Acetilcolinesterase

C6 - linhagem celular de glioma de rato

DCF-DA - dichlorodihydrofluorescein diacetate

DMSO- Dimetilsulfóxido

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

HepG2 - Linhagem de células hepáticas

LaSOM - Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal

J774A1 – Linhagem de macrófago de sarcoma de camundongo

MCF-7 - Linhagem celular de câncer de mama

MTT - 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NR – Neutral Red

OVACAR 0 Linhagem celular de câncer de ovário

RAW – linhagem celular de macrófago de leucemia murina

ROS – Reactive Oxygen Species

Siha – Linhagem celular de carcinoma de útero

TMRE - tetramethylrhodamine ethyl ester

T24 - linhagem celular de câncer de bexiga humano

U138-MG - linhagem celular de glioma humano

VN – Vermelho Neutro



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL .....	12
2. OBJETIVOS .....	19
3. CAPÍTULO 1: Manuscrito publicado na revista <i>Current Medicinal Chemistry</i> ...	21
4. CAPÍTULO 2: Manuscrito publicado na revista <i>MedChemComm</i> .....	41
5. DISCUSSÃO .....	53
6. CONCLUSÕES .....	57
7. REFERÊNCIAS .....	58



## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A química medicinal é uma disciplina que envolve química, biologia, ciências médicas e farmacêuticas. Se preocupa com a invenção, descoberta, *design*, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, o estudo de seu metabolismo, interpretação de seus mecanismos de ação no nível molecular e a construção de relação estrutura-atividade (BUCKLE et al., 2013).

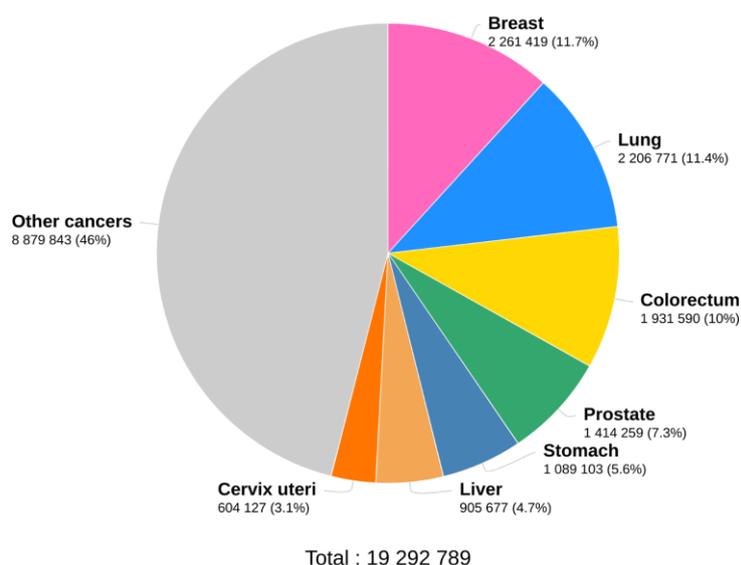
A descoberta de novos fármacos utiliza uma variedade de modelos para predição e testes de atividade e toxicidade, podendo ser modelos computacionais *in silico*, modelos *in vitro* usando linhagens celulares ou modelos *in vivo* utilizando organismos vivos. Esse processo necessita de anos de pesquisa e mais de um bilhão de dólares para que uma molécula consiga entrar no mercado, algo que ocorre em cerca de 1 em 10.000 compostos testados, com cerca de 40% falhando em ensaios pré-clínicos de toxicidade ou farmacocinética (MCKIM JR, 2010).

Ensaio *in vivo* normalmente são realizados usando animais como ratos e camundongos após etapas de ensaios *in silico* e *in vitro*, e demandam muito tempo e recursos além de questões éticas relacionadas ao seu uso. Em 1959 Russel e Burch desenvolveram o conceito dos 3 Rs (replacement, reduction and refinement/ substituição, redução e refinamento) por preocupação sobre os aspectos éticos do uso de animais em pesquisa. Esses princípios ainda guiam a comunidade acadêmica para minimizar o sofrimento animal em processos de experimentação. Modelos *in vivo* alternativos ao uso de animais e *in silico* estão ganhando destaque por possibilitar a aquisição de mais informações mais rapidamente e eliminando compostos problemáticos antes de chegar na etapa de uso de mamíferos (FREIRES et al., 2017; HUBRECHT; CARTER, 2019).

Alguns exemplos de modelos *in vivo* que usam animais não-mamíferos incluem *Dario rerio*, *Artemia salina*, *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, planárias e o nematódeo *Caenorhabditis elegans*. Com o uso destes, é possível fazer o *screening* de novas entidades químicas e *hits*, provendo informação toxicológica confiável e identificando moléculas de potencial danoso mais rapidamente (HUNT, 2017). Embora esses modelos alternativos proveem resposta sistêmica, eles não substituem completamente testes *in vivo* utilizando mamíferos. É importante entender que a maquinaria celular e a associação de estudos *in silico*, *in vitro* e *in vivo* é essencial para estudar os mecanismos de doenças, entendê-los e providenciar tratamentos (GOIS et al., 2020; TORRES; COCK; CELIS RAMÍREZ, 2020).

O câncer é uma das maiores causas de mortes globalmente, causando cerca de 10 milhões de mortes em 2020. Os tipos mais comuns são destacados na figura 1.1: câncer de mama (11,7% dos casos em 2020), pulmão (11,4%), colorretal (10%), próstata (7,3%), estômago (5,6%), fígado (4,7%), útero-cervical (3,1%) e de esôfago (3,1%). Os tipos mais letais são o de pulmão (18% de mortes por câncer em 2020), colorretal (9,4%), fígado (8,3%), estômago (7,7%), mama (6,9%), esôfago (5,5%), pâncreas (4,7%) e próstata (3,8%) (FERLAY J et al., 2020). Os tratamentos farmacológicos atualmente em uso para o câncer sofrem de severos problemas de toxicidade, e a químicos medicinais buscam por novos compostos com efetividade similar ou maior e com menos efeitos tóxicos, e compostos de origem natural são uma grande fonte de possíveis novos fármacos para

Estimated number of new cases in 2020, worldwide, both sexes, all ages



Source: Globocan 2020  
 Production: Global Cancer  
 Registry (<http://gco.iarc.fr>)

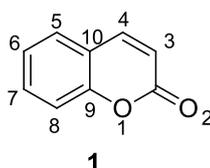
International Agency for Research on Cancer  
 World Health Organization

**Figura 1.1:** Prevalência dos tipos de câncer no mundo em 2020. Fonte: OMS

este uso.

As cumarinas **1** (Figura 1.2) pertencem à classe de compostos heterocíclicos da família das benzopironas, e são amplamente distribuídas na natureza principalmente como metabólitos secundários de plantas. São consideradas uma estrutura privilegiada na química medicinal, possuindo uma estrutura planar com um anel aromático, podendo realizar interações hidrofóbicas,  $\pi$ - $\pi$ , CH- $\pi$  e cátion- $\pi$ , e um anel lactona contendo dois átomos de oxigênio concedendo a capacidade de interagir através de ligações de hidrogênio com resíduos de aminoácidos. A dupla ligação no anel lactona também é essencial para a planaridade da estrutura, permitindo a relocação de carga entre o

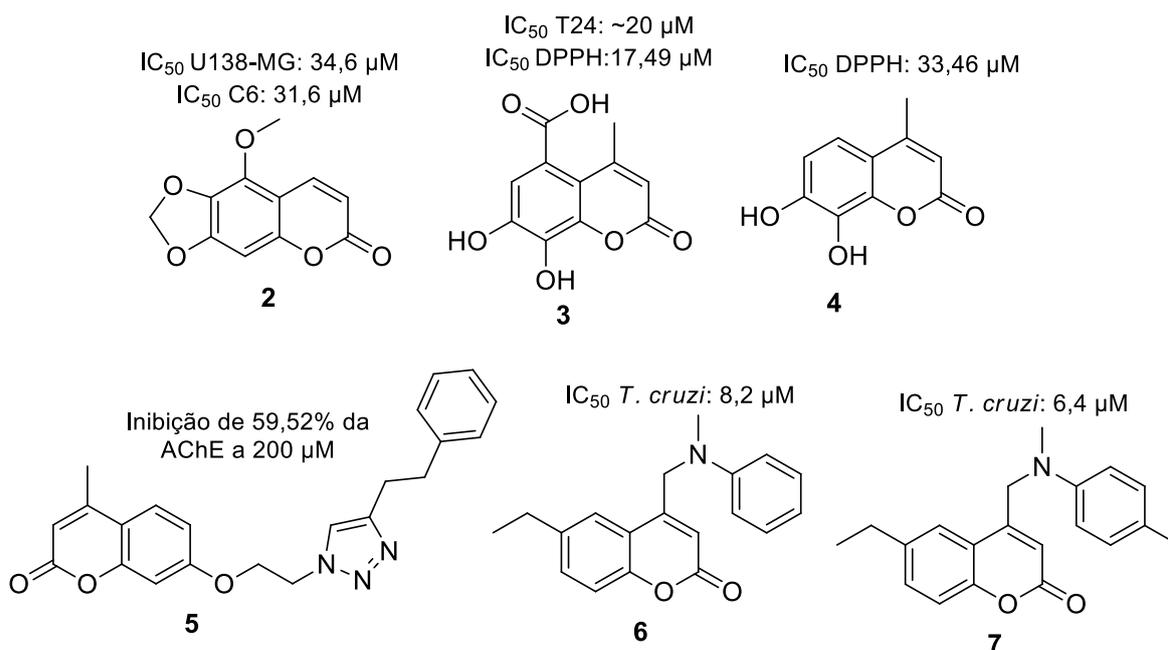
grupamento carbonila e o anel aromático. Estas propriedades as permitem interagir com uma grande variedade de receptores. Hoje em dia existe uma ampla gama de propriedades interessantes na visão da química medicinal já citada na literatura, como antioxidantes (AL-MAJEDY et al., 2016; BORGES BUBOLS et al., 2013), anti-inflamatória (FYLAKTAKIDOU et al., 2005; KIRSCH; ABDELWAHAB; CHAIMBAULT, 2016), antiviral (HASSAN et al., 2016), anti-bacteriana (SMYTH; RAMACHANDRAN; SMYTH, 2009),



**Figura 1.2:** estrutura geral das cumarinas **1**, também conhecida como 2H-chromen-2-ona.

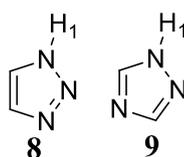
inibidoras da acetilcolinesterase (BOUHAOUI et al., 2021; TORRES et al., 2016), anti-Leishmania (GONÇALVES et al., 2020a) e doença de Chagas (GONÇALVES et al., 2020b). Cumarinas são pesquisadas para o tratamento para o câncer devido a sua baixa toxicidade geral e tem demonstrado capacidade antitumoral até contra câncer com resistência multidrogas(WANG et al., 2020).

Nosso grupo de pesquisa, LaSOM, tem trabalhado com o isolamento e síntese de 4-metilcumarinas que apresentaram alguns efeitos farmacológicos (Figura 1.3): antitumoral (**2** e LaSOM 79 **3**) (VIANNA et al., 2012a, 2015), antioxidante (LaSOM 79 **3** e 78 **4**) (BORGES BUBOLS et al., 2013; TORRES et al., 2014; VIANNA et al., 2012b), inibidoreas da acetilcolinesterase (AChE) (LaSOM 206 **5**) (TORRES et al., 2016) e anti-Chagas (LaSOM 231 **6** e 266 **7**) (GONÇALVES et al., 2020b; SOARES et al., 2019). Trabalhos em colaboração com o Grupo da Professora Dr.<sup>a</sup> Gilsane von Poser levaram ao isolamento, em espécie *Pterocaulon*, da 5-metoxi-6,7-metilenodioxicumarina **2** com atividade em linhagens celulares de glioma humano (U138-MG) e de rato (C6), demonstrando um IC<sub>50</sub> de 34,6 e 31,6 μM, respectivamente (VIANNA et al., 2012a); e à síntese do ácido LaSOM 79 **3** com atividade citotóxica em linhagem celular de câncer de bexiga humano T24, com IC<sub>50</sub> ~20 μM (VIANNA et al., 2015).



**Figura 1.3:** Cumarinas farmacologicamente ativas obtidas pelo LaSOM. 5-metoxi-6,7-metilenodioxycumarina **2** com atividade em linhagens celulares U138-MG e C6; LaSOM 79 **3** em linhagem T24 e antioxidante por DPPH, LaSOM 78 **4** antioxidante, LaSOM 206 **5** inibidor da AChE, e LaSOM 231 **6** e 266 **7** tripanossomicidas.

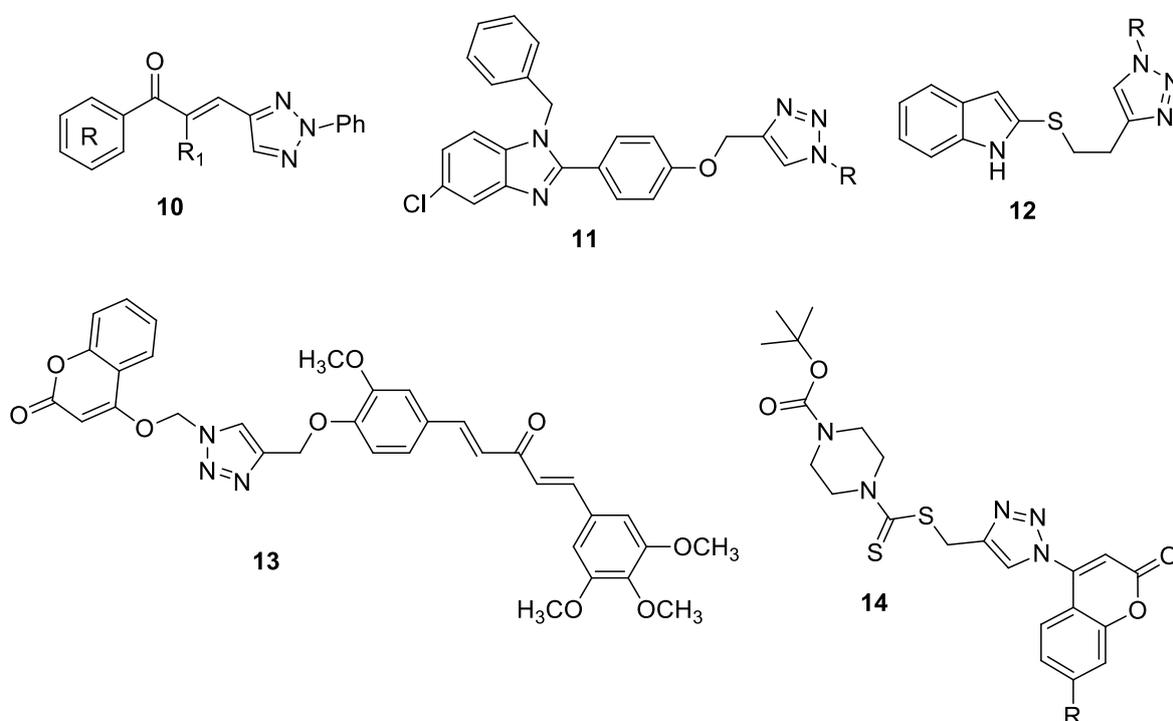
O triazol é um heterociclo aromático de 5 membros com a presença de três átomos de nitrogênio e dois carbonos, possuindo dois isômeros: 1,2,3-triazol **8** e 1,2,4-triazol **9** (Figura 1.4). Eles podem ser substituídos nas posições 1, 3, ou 5, mas o maior diferencial é exercido pelos grupamentos na posição 1 do anel (KHARB; SHARMA; YAR, 2011). O 1,2,3-triazol é um heterociclo rico em elétrons que interage facilmente com várias enzimas e receptores devido à capacidade de formar pontes de hidrogênio, que também aumentam sua solubilidade em água, sendo um importante heterociclo na química medicinal, sendo usado como ligante, como *linker*, em substâncias organometálicas ou por sua própria atividade intrínseca como antitumoral, antimicrobiana, antituberculose, antiparasitária, antiviral, dentre outras (SLAVOVA et al., 2020).



**Figura 1.4:** Anéis 1,2,3-triazol **8** e 1,2,4-triazol **9**

Híbridos com esse grupo (figura 1.5) tem sido extensivamente estudados por sua atividade antitumoral com resultados promissores, por exemplo triazol-chalcona **10** contra câncer de próstata (PINHEIRO et al., 2020), benzimidazol-triazóis **11** para câncer de

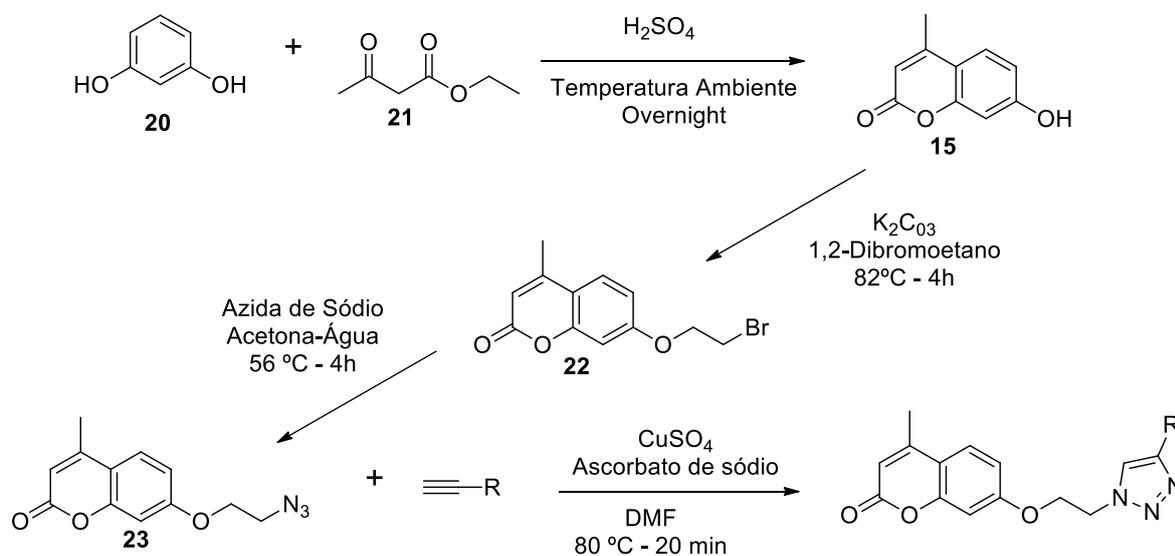
pulmão (SRIDHAR GOUD et al., 2020), conjugados indol-triazol **12** para câncer de mama (YELE et al., 2020) e híbridos cumarina-triazol **13-14** demonstrando atividade anti-proliferativa contra múltiplas linhagens deste tipo de câncer (BHATIA; RAWAL, 2019; SONG; HUO; GUO, 2021). Híbridos curcumina-triazol se mostraram tóxicos contra as linhagens cancerígenas de monócito leucêmico THP-1, e câncer de colo COLO-205 e HCT-116, e pelo ensaio de polimerização da tubulina do citoesqueleto mostraram efeito inibitório na polimerização da tubulina, com o composto mais potente **13** tendo um IC<sub>50</sub> de 1,55 µM (SINGH et al., 2016). Em outro estudo, híbridos cumarina-1,2,3-triazol-ditiocarbamato **14** inibiram a demetilase específica para lisina 1 (LSD1), um membro da família de enzimas monoaminas oxidases, com o composto mais potente tendo um IC<sub>50</sub> de 0,39 µM contra essa enzima (YE et al., 2014). Neste trabalho, as cumarinas LaSOM 77 **15**, LaSOM 180 **16**, LaSOM 185 **17**, LaSOM 186 **18**, e LaSOM 190 **19** (Figura 1.6) foram selecionadas para a avaliação do efeito da hibridização entre cumarinas e triazol sobre o efeito antitumoral usando substituintes simples como um hidroxila, um anel aromático e um dímero. Para o propósito de continuar esse trabalho avaliando o efeito antitumoral de cumarinas, primeiro realizamos o *screening* de híbridos cumarina/triazol



**Figura 1.5:** Híbridos com triazol com atividade antitumoral. triazol-chalcona **10**, indol-triazol **11**, benzimidazol-triazol **12**, curcumina-triazol **13** e cumarina-1,2,3-triazol-ditiocarbamato **14**.

LaSOM 180, LaSOM 185, LaSOM 186, LaSOM 190 e do precursor LaSOM 77, pertencentes à quimioteca do LaSOM.

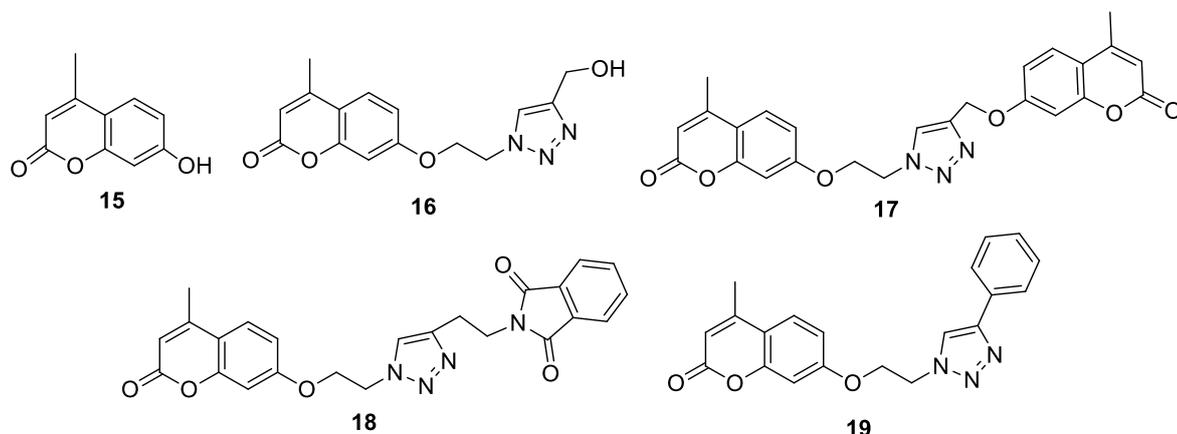
Para a obtenção dos compostos (Figura 1.7), o precursor LaSOM 77 foi sintetizado através da reação de Pechman realizando-se a condensação do Resorcinol **20** e acetoacetato de etila **21**. Em seguida os outros compostos foram obtidos através da *click-chemistry*, passando pelos intermediários LaSOM 182 **22** e LaSOM 183 **23**, terminando com a ciclização de Huisen, utilizando um alcino terminal e um azido orgânico **23** para promover uma cicloadição 1,3-dipolar, utilizando um catalisador de cobre que leva à seletividade do produto triazol 1,4-dissubstituído (TORRES et al., 2016).



**Figura 1.7:** Esquema da síntese dos compostos cumarina-triazol

O projeto dessa dissertação inicialmente visava a avaliação da toxicidade destas cumarinas selecionadas, incluindo estudos *in vivo* utilizando o modelo alternativo *Caenorhabditis elegans*. Quando as atividades laboratoriais presenciais foram suspensas devido à pandemia do covid-19, redirecionamos os planos e foi feita uma revisão sobre o uso de modelos *in vivo* alternativos durante o período de atividades remotas. Com a volta das atividades presenciais para estudos *in vitro* apenas em janeiro de 2022, com o auxílio da prof.<sup>a</sup> dr.<sup>a</sup> Solange Cristina Garcia e seu laboratório foram realizados os testes *in vitro* e, devido à falta de tempo, os testes *in vivo* foram cancelados. Assim, a dissertação se apresenta como um encarte de artigos com dois capítulos, o primeiro sendo uma revisão sobre o uso de modelos alternativos *in vivo* na química medicinal, com destaque para o *C. elegans*, e o segundo sobre os ensaios *in vitro* realizados. Cada um está com numerações próprias dos compostos, figuras, tabelas e referências, e

formatados nas normas da revista à qual cada um foi submetido. Após, encontram-se a discussão geral seguida das conclusões gerais e referências.



**Figura 1.6:** Híbridos cumarina-triazol avaliados neste trabalho LaSOM 180 **16**, LaSOM 185 **17**, LaSOM 186 **18** e LaSOM 190 **19**, e seu precursor LaSOM 77 **15**.

## 2. OBJETIVOS

- Realizar uma revisão bibliográfica sobre o uso de métodos alternativos ao uso de mamíferos em química medicinal, destacando os trabalhos com *Caenorhabditis elegans*;
- Avaliar a atividade antitumoral in vitro de quatro híbridos 4-metilcumarina/1,2,3-triazol em diferentes linhagens tumorais e em uma linhagem sadia e calcular o índice de seletividade dos compostos;
- A partir de testes in vitro, investigar o mecanismo de ação dos compostos: espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, potencial de membrana mitocondrial, dano ao DNA e apoptose/necrose.



### **3. CAPÍTULO 1**

**The role of alternative toxicological trials in drug discovery programs. The case of  
Caenorhabditis elegans and other methods.**

Manuscrito publicado na revista *Current Medicinal Chemistry*

*Doi: 10.2174/0929867329666220329190825*

---

O Capítulo 1 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 22 – 40.

Göethel G\*, Augsten LV\*, das Neves GM, Gonçalves IL, de Souza JPS, Garcia SC, Eifler-Lima VL. The Role of Alternative Toxicological Trials in Drug Discovery Programs. The Case of *Caenorhabditis elegans* and Other Methods. *Current Medicinal Chemistry* 2022, v. 29(32): 5270-5288. Doi: 10.2174/0929867329666220329190825.





































#### **4. CAPÍTULO 2**

### **Antiproliferative activity and toxicity evaluation of Hybrids 1,2,3-Triazole and 4-Methyl Coumarin in cancer cell lines**

Manuscrito publicado na revista *RSC Medicinal Chemistry*

*Doi: 10.1039/D3MD00031A*

---

O Capítulo 2 é constituído por artigo científico publicado, conforme referência abaixo, que no texto completo da tese defendida ocupa o intervalo compreendido entre as páginas 42 – 52.

Augsten LV\*, Göethel G\*, Gauer B, Charão MF, von Poser G, Canto RFS, Arbo MD, Eifler-Lima VL, Garcia SC. Antiproliferative activity and toxicity evaluation of 1,2,3-triazole and 4-methyl coumarin hybrids in the MCF7 breast cancer cell line. RSC Medicinal Chemistry 2023, v. 14: 869-879. Doi: 10.1039/D3MD00031A.





















## 5. DISCUSSÃO

Com a redação da revisão foi possível observar que existem modelos alternativos *in vivo* que têm sido usados na química medicinal para a obtenção de melhores informações nas etapas iniciais da descoberta de novos fármacos, como o *zebrafish*, a *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Artemia salina*, planárias e o *Caenorhabditis elegans*.

Foi possível observar também que todo modelo *in vivo* alternativo possui suas vantagens, como mencionamos na nossa revisão, nenhum consegue ser o melhor em tudo, cada grupo de pesquisa, deveria verificar qual é o mais adequado para seu trabalho e qual deles vai responder melhor ao objetivo desejado. Alguns modelos possuem implementações mais restritas, mas com vantagens consideráveis, como *G. mellonella* para testes de infecção, sobrevivendo em temperaturas de 37 °C permitindo a infecções se desenvolverem em um ambiente mais similar ao corpo humano; e planárias com sua capacidade regenerativa dando oportunidades únicas para estudos de desenvolvimento e comportamentais, ambos necessitando de investimento mínimo para implementar.

Há alguns modelos com uma variedade de testes disponíveis mais ampla, como o *zebrafish*, *C. elegans* e *D. melanogaster*, com o primeiro necessitando de mais investimento em infraestrutura e manutenção enquanto os dois últimos são mais fáceis de implementar; e alguns testes com as moscas necessitando de manipulação individual delas, demandando mais trabalho. Esses três modelos também são os com o maior número de publicações nos últimos anos, com o *zebrafish* e *C. elegans* tomando a liderança.

Apesar da heterogeneidade de estudos dificultar a comparação entre os modelos e seus usos, podemos notar que *D. melanogaster* é um modelo popular com muitos anos de uso, mas publicações implementando-a parecem ter chegado num platô, provavelmente pelo surgimento de outros modelos alternativos mais fáceis de manipular. *D. rerio* também está muito popular nos últimos anos, mas a necessidade de instalar e manter um aquário é uma limitação real para sua ampla implementação, já que nem todo laboratório terá a infraestrutura e/ou o pessoal para mantê-lo apropriadamente.

Com o objetivo de encontrar novos *hits* seletivos e seguros, nosso grupo de pesquisa tem usado o modelo *C. elegans* como *screening* toxicológico *in vivo*, juntamente com *screening in vitro*, para avaliar nossos compostos. A toxicidade de 4 dentre 42 4-metil-aminocumarinas com atividade *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* foi avaliada em *C.*

*elegans* (SOARES et al., 2019). Nesse estudo dois compostos (LaSOM 231 **6** e LaSOM 266 **7**) demonstraram potências próximas à do Nifurtimox, um fármaco de referência contra a doença de Chagas. Com valores de LD<sub>50</sub> de 61,7 mM e 73,4 mM, respectivamente, ambos os compostos mostraram menor toxicidade ao *C. elegans* que o nifurtimox (LD<sub>50</sub>= 19,5 mM), ambos em letalidade e desenvolvimento dos nematoides.

Nos testes *in vitro* foi demonstrada uma atividade antitumoral potente dos compostos testados dentre 6 das linhagens celulares testadas, especialmente contra a linhagem de câncer de mama MCF7, onde todos os híbridos possuíam IC<sub>50</sub> entre 2,66 e 10,08 µM, menores que o do fármaco de referência cisplatina (45,33 µM). O Lasom 180 e 185 foram os únicos testados na linhagem de macrófagos murina RAW, e possuíam atividade potente com IC<sub>50</sub> de 5,08 e 8,37 µM, respectivamente. LaSOM 186 teve IC<sub>50</sub> menor que 100 µM em 5 das 6 linhagens celulares cancerígenas em que foi testado. O LaSOM 185 também possuiu atividade potente na linhagem de câncer de fígado HepG2 (IC<sub>50</sub>= 88,29 µM), e o LaSOM 190 na linhagem de macrófago de sarcoma de camundongo J77A1 (33,04 µM). A seletividade para linhagem de câncer de mama MCF7 do LaSOM 180, 185, 186 e 190 foram maiores que a do precursor himecromona e do fármaco de referência cisplatina, demonstrando que o anel triazol aumentou a citotoxicidade nas células de câncer de mama mais do que nas células saudáveis, demonstrando que estas moléculas têm potencial como fármacos antitumorais. O LaSOM 185 não demonstrou diminuição significativa na mortalidade da linhagem celular de fibroblastos saudáveis 3T3 a 40 µM, a maior concentração testada.

Na predição farmacocinética através do programa SwissADME os compostos foram classificados de moderadamente a solúveis em água, não apresentaram nenhuma violação das regras de Lipinski, e teriam alta absorção gastrointestinal. Apenas a himecromona e o LaSOM 190 permeariam a barreira hemato-encefálica, demonstrando que os outros não teriam efeitos colaterais relacionados ao sistema nervoso central.

A himecromona, LaSOM 180 e 185 demonstraram atividade antioxidante nas células saudáveis 3T3, enquanto que LaSOM 186 e 190 não mostraram diferença significativa em comparação ao controle.

O LaSOM 185, 186 e 190 mostraram capacidade de diminuir o potencial da membrana mitocondrial, com o LaSOM 186 e 190 alcançando atividade similar ao controle positivo CCCP. Isso pode indicar que ter um anel conectado ao triazol aumenta a capacidade da molécula danificar a membrana mitocondrial, já que o LaSOM 180, o

único sem essa atividade, possui apenas uma hidroxila nessa posição. Este efeito e o IC<sub>50</sub> das moléculas nas linhagens celulares MCF7 e 3T3 parecem inversamente proporcionais à produção de EROs, então a citotoxicidade dessas moléculas pode ser parcialmente devido ao dano oxidante nas membranas mitocondriais, mesmo se elas em si não aumentaram os níveis das espécies reativas, e atividade antioxidante diminui a citotoxicidade. Apenas o LaSOM 185 demonstrou ambas atividades antioxidante e de interrupção de potencial de membrana mitocondrial.

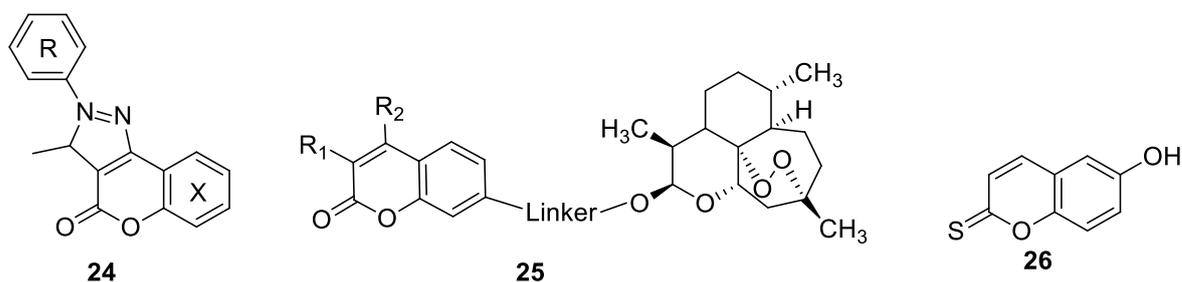
Nenhum dos tratamentos causou genotoxicidade significativa em linhagem celular de fibroblastos saudáveis 3T3 avaliados pelo ensaio cometa alcalino e pelo LMW. Isso exclui mecanismos que envolvem dano ao DNA, como antimetabólitos, intercalantes, ou inibidores de enzimas de reparo. Esse efeito citotóxico apesar da falta de dano ao DNA pode levar a efeitos sinérgicos entre estes compostos e outros fármacos que atuem por esse mecanismo, especialmente para os compostos LaSOM 185, 186 e 190 que tiveram a predição de inibição da enzima CYP3A4, que metaboliza fármacos antitumorais.

Essa atividade de cumarinas contra câncer de mama coincide com a literatura prévia (BHATIA; RAWAL, 2019; SONG; HUO; GUO, 2021; SONG et al., 2020). Mecanismos sugeridos para a atividade antitumoral de cumarinas incluem a inibição de anidrase carbônica IX, receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR), P-glicoproteína, e receptor de fator de crescimento endotelial vascular 2 (VEGFR-2).

A inibição de LSD1 é outro mecanismo proposto para a atividade antitumoral de híbridos cumarina-triazol. Essa enzima desmetila Lys4 e Lys8 mono- e dimetiladas da histona H3, e poderia desmetilar a DNA transferase 1 e fator de transcrição E2F 1, regulando suas funções. Um estudo encontrou a inibição de LSD1 de híbridos cumarina-triazol-ditiocarbamato **9** usando o método de indução de LSD1 recombinante em *E. coli*, um método baseado em fluorescência, e *western blotting* de linhagem celular de câncer gástrico histona MFC-803 (YE et al., 2014).

Um mecanismo importante de cumarinas para a indução de apoptose é através da inibição de anidrase carbônica IX (CAIX). Essa enzima possui pelo menos 16 subtipos presentes no citoplasma e como proteases transmembrana. Entre elas a CA IX e XII são superexpressas em células tumorais e regulam o pH intracelular. Cumarinas que demonstraram a inibição dessas enzimas incluem derivados substituídos 2-aril **24**, híbridos dihidroartemisina-cumarina **25**, e 2-tioxocumarinas **26** (WU et al., 2020). Temiz et al (TEMIZ et al., 2021) testaram o efeito da inibição de CAIX na linhagem celular de

câncer cervical HeLa utilizando uma sulfonamida com atividade de inibição conhecida desta enzima, e encontraram uma mudança na morfologia das células, aumento de apoptose, pH intracelular drasticamente alterado, níveis de EROs e potencial de membrana mitocondrial diminuído. Resultados similares foram encontrados neste trabalho, então é possível inferir que estes híbridos cumarina-triazol atuem através da inibição da CAIX. Embora não tenhamos avaliado na linhagem celular HeL, Mishra et al (MISHRA et al., 2021) observaram efeitos similares da inibição de CAIX *in vitro* em linhagem celular de câncer de mama e *in vivo* em camundongos usando o inibidor de CAIX BSM-0004.



**Figura 5.1:** Cumarinas inibidoras da CAIX: 2-arilcumarinas **24**, híbridos dihidroartemisina-cumarina **25**, e 2-tioxocumarinas **26**

## 6. CONCLUSÕES

- Foi possível fazer uma revisão sobre o uso nas duas últimas décadas do uso de modelos alternativos *in vivo* na química medicinal e observamos que tem havido um aumento no uso de modelos como *Danio rerio*, *Artemia salina*, *Galleria mellonella*, *Drosophila melanogaster*, planarians, *organ/body-on-a-chip*, e *Caenorhabditis elegans*. Destacamos o modelo *C. elegans* pelo fato de ter sua sequência genética totalmente elucidada e um banco de cepas disponível, além de outras vantagens, como a facilidade de manipulação e manutenção, baixo custo de implementação, e sua confiabilidade. Ele também tem a capacidade de medir alguns efeitos farmacológicos como atividade antioxidante, antimicrobiana ou mesmo antitumoral;
- Foi possível detectar quatro novos *hits*, híbridos cumarina-triazol, ativos em 6 linhagens celulares tumorais, A549 (câncer de pulmão), HepG2 (câncer de fígado), J774A1 (macrófago de sarcoma de camundongo), MCF7 (câncer de mama), OVACAR (câncer de ovário), RAW (macrófago de leucemia de rato);
- Estes compostos demonstraram melhor seletividade que o fármaco de referência cisplatina para a linhagem de câncer de mama MCF7;
- O composto mais ativo foi o LaSOM 186, com IC<sub>50</sub> abaixo de 100 µM em 5 das linhagens mencionadas (A549, HepG2, J774A1, MCF7 e OVACAR), mas também demonstrou um IC<sub>50</sub> de 0,62 µM na linhagem de fibroblastos saudáveis 3T3. O LaSOM 185 demonstrou atividade potente contra as linhagens HepG2, MCF7 e RAW, e baixíssima toxicidade na linhagem sadia. Estes dois compostos mostraram potencial para prosseguir para estudos posteriores como ensaios *in vivo*;
- LaSOM 180 e 185 diminuíram a produção de EROs e ERNs, mostrando atividade antioxidante potente na linhagem celular 3T3;
- LaSOM 185, 186 e 190 diminuíram o potencial de membrana mitocondrial, demonstrando um mecanismo através de dano mitocondrial;
- Nenhum tratamento demonstrou genotoxicidade em células saudáveis 3T3 no ensaio cometa alcalino;
- Todos os compostos demonstraram características farmacocinéticas favoráveis na predição *in silico* SwissADME.



## 7. . REFERÊNCIAS

AL-MAJEDY, Y. K. et al. Coumarins as potential antioxidant agents complemented with suggested mechanisms and approved by molecular modeling studies. **Molecules**, v. 21, n. 2, 2016.

BHATIA, R.; RAWAL, R. K. Coumarin Hybrids: Promising Scaffolds in the Treatment of Breast Cancer. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 17, 2019.

BORGES BUBOLS, G. et al. The Antioxidant Activity of Coumarins and Flavonoids. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 3, 2013.

BOUHAOUI, A. et al. Synthesis and Biological Properties of Coumarin Derivatives. A Review. **ChemistrySelect**, v. 6, n. 24, p. 5848–5870, 2021.

BUCKLE, D. R. et al. Glossary of terms used in medicinal chemistry Part II (IUPAC recommendations 2013). **Annual Reports in Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 8, p. 387–418, 2013.

FERLAY J et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. **International Agency for Research on Cancer**, v. 68, n. 6, 2020.

FREIRES, I. A. et al. Alternative Animal and Non-Animal Models for Drug Discovery and Development: Bonus or Burden? **Pharmaceutical Research**, v. 34, n. 4, p. 681–686, 2017.

FYLAKTAKIDOU, K. et al. Natural and Synthetic Coumarin Derivatives with Anti-Inflammatory / Antioxidant Activities. **Current Pharmaceutical Design**, v. 10, n. 30, p. 3813–3833, 18 mar. 2005.

GOIS, A. M. et al. in Vitro and in Vivo Models of Amyotrophic Lateral Sclerosis: an Updated Overview. **Brain Research Bulletin**, v. 159, n. April, p. 32–43, 2020.

GONÇALVES, G. A. et al. Natural and synthetic coumarins as antileishmanial agents: A

review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 203, 2020a.

GONÇALVES, G. A. et al. Chagas Disease and Coumarins: A Review of Natural and Synthetic Coumarins As Anti-Trypanosoma Cruzi Agents. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 13, 2020b.

HASSAN, M. Z. et al. Therapeutic potential of coumarins as antiviral agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, 2016.

HUBRECHT, R. C.; CARTER, E. The 3Rs and humane experimental technique: Implementing change. **Animals**, v. 9, n. 10, p. 754, 2019.

HUNT, P. R. The C. elegans model in toxicity testing. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, p. 50–59, 2017.

KHARB, R.; SHARMA, P. C.; YAR, M. S. Pharmacological significance of triazole scaffold. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 1–21, 2011.

KIRSCH, G.; ABDELWAHAB, A. B.; CHAIMBAULT, P. Natural and synthetic coumarins with effects on inflammation. **Molecules**, v. 21, n. 10, 2016.

MCKIM JR, J. M. Building a tiered approach to in vitro predictive toxicity screening: a focus on assays with in vivo relevance. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 13, p. 188–206, 2010.

MISHRA, C. B. et al. Anti-breast cancer action of carbonic anhydrase IX inhibitor 4- [4- (4- benzenesulfonamide ( BSM-0004 )): in vitro and in vivo studies. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 954–963, 2021.

PINHEIRO, S. et al. 2H-1,2,3-Triazole-chalcones as novel cytotoxic agents against prostate cancer. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 30, n. 19, 2020.

SINGH, H. et al. Triazole tethered C5-curcuminoid-coumarin based molecular hybrids as

novel antitubulin agents: Design, synthesis, biological investigation and docking studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 116, 2016.

SLAVOVA, K. I. et al. Developments in the Application of 1,2,3-Triazoles in Cancer Treatment. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 15, n. 2, 2020.

SMYTH, T.; RAMACHANDRAN, V. N.; SMYTH, W. F. A study of the antimicrobial activity of selected naturally occurring and synthetic coumarins. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 5, 2009.

SOARES, F. G. N. et al. Novel coumarins active against *Trypanosoma cruzi* and toxicity assessment using the animal model *Caenorhabditis elegans*. **BMC Pharmacology and Toxicology**, v. 20, p. 76, 2019.

SONG, F.; HUO, X.; GUO, Z. Anti-breast Cancer Potential of Natural and Synthetic Coumarin Derivatives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 18, 2021.

SONG, X. F. et al. Coumarin derivatives with anticancer activities: An update. **Archiv der Pharmazie**, v. 353, n. 8, p. 1–11, 2020.

SRIDHAR GOUD, N. et al. Novel benzimidazole-triazole hybrids as apoptosis inducing agents in lung cancer: Design, synthesis, <sup>18</sup>F-radiolabeling & galectin-1 inhibition studies. **Bioorganic Chemistry**, v. 102, 2020.

TEMIZ, E. et al. Inhibition of Carbonic Anhydrase IX Promotes Apoptosis through Intracellular pH Level Alterations in Cervical Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, p. 6098, 2021.

TORRES, F. et al. New Insights into the Chemistry and Antioxidant Activity of Coumarins. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 22, p. 2600–2623, 2014.

TORRES, F. C. et al. Combining the pharmacophore features of coumarins and 1,4-substituted 1,2,3-triazoles to design new acetylcholinesterase inhibitors: Fast and easy

generation of 4-methylcoumarins/1,2,3-triazoles conjugates via click chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 9, 2016.

TORRES, M.; COCK, H. DE; CELIS RAMÍREZ, A. M. In vitro or in vivo models, the next frontier for unraveling interactions between malassezia spp. And hosts. how much do we know? **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 1–16, 2020.

VIANNA, D. R. et al. Selective cytotoxicity and apoptosis induction in glioma cell lines by 5-oxygenated-6,7-methylenedioxy coumarins from Pterocaulon species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, p. 268–274, 2012a.

VIANNA, D. R. et al. Evaluation of the antioxidant capacity of synthesized coumarins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 7260–7270, 2012b.

VIANNA, D. R. et al. 4-Methylcoumarins with cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines. **Medicinal Chemistry Communication**, v. 6, n. 5, p. 905–911, 2015.

WANG, G. et al. Coumarins as Potential Anti-drug Resistant Cancer Agents: A Mini Review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 19, 2020.

WU, Y. et al. A Review on Anti-Tumor Mechanisms of Coumarins. **Frontiers in Oncology**, v. 10, n. December, 2020.

YE, X. W. et al. Synthesis and biological evaluation of coumarin-1,2,3-triazole-dithiocarbamate hybrids as potent LSD1 inhibitors. **Medicinal Chemistry Communication**, v. 5, n. 5, 2014.

YELE, V. et al. Synthesis and Preclinical Evaluation of Indole Triazole Conjugates as Microtubule Targeting Agents that are Effective against MCF-7 Breast Cancer Cell Lines. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 8, 2020.