

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

**Avaliação Pré-clínica da Farmacocinética e da Toxicidade  
Aguda em Roedores do Candidato a Fármaco Antitumoral  
LaSOM 65**

BRUNA GAELZER SILVA TORRES

PORTO ALEGRE, 2012



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

**Avaliação Pré-clínica da Farmacocinética e da Toxicidade  
Aguda em Roedores do Candidato a Fármaco Antitumoral  
LaSOM 65**

Dissertação apresentada por **Bruna  
Gaelzer Silva Torres** para obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

Orientadora: Profa. Dra. Teresa Cristina Tavares Dalla Costa

PORTO ALEGRE, 2012

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado, da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.03.2012, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nadia Maria Volpato  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Leandro Tasso  
Universidade de Caxias do Sul

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Solange Cristiana Garcia  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Torres, Bruna Gaelzer Silva  
Avaliação Pré-clínica da Farmacocinética e da  
Toxicidade Aguda em Roedores do Candidato a Fármaco  
Antitumoral LaSOM 65 / Bruna Gaelzer Silva Torres.  
-- 2012.  
158 f.

Orientadora: Teresa Cristina Tavares Dalla Costa.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2012.

1. Antitumoral. 2. Método Analítico. 3. Pré-clínico  
. 4. Farmacocinética. 5. Toxicidade Aguda. I. Dalla  
Costa, Teresa Cristina Tavares, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Centro Bioanalítico de Medicamentos e no Laboratório 405 da Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com financiamento do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fármacos e Medicamentos (INCT-*if*). O autor recebeu bolsa de estudos do CNPq e da CAPES.



“O jeito é curtir nossas escolhas e abandoná-las quando for preciso, mexer e remexer na nossa trajetória, alegrar-se e sofrer, acreditar e descreer, que lá adiante tudo se justificará, tudo dará certo.”

**Martha Medeiros**





## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Bruno e Cláudia, por ser minha base, meu alicerce; pelo esforço e incentivo dado para que eu pudesse realizar meus sonhos, por acreditarem em mim, mesmo em face as minhas inseguranças.

A minha irmã Carina, pelo companheirismo com o qual sempre pude contar, por estar sempre ao meu lado e ser meu exemplo.

À professora e orientadora Dra. Teresa Dalla Costa, pela orientação e paciência no desenvolvimento deste trabalho, pelo exemplo profissional e oportunidades concedidas e pela amizade construída.

A Prof<sup>a</sup>. Dra. Vera Lima, pela colaboração e auxílio para a realização deste projeto.

Aos colegas e amigos do Laboratório 405 e Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM) pela colaboração, companheirismo, amizade e convívio.

Aos queridos amigos farmacocinéticos (conhecidamente os PKs): Maiara Pigatto, Francine Johansson, Sandra Haas, Cristiane de Andrade, Liberato Brum, Felipe Hurtado, Fernanda Galves, Ticiane Bessegato, Pedro Sansone, João Victor Laureano, Estevan Zimmerman, Jonas Malman e Bibiana Araújo, meu muito obrigada, por todos os momentos e emoções compartilhados, pelo aprendizado, companheirismo e principalmente pela amizade construída, pois tenho certeza que não somos apenas colegas de profissão e laboratório e sim amigos, irmãos.

À Dra. Flávia De Toni Uchôa pelo auxílio e dedicação com este trabalho e por incentivar-me com a pesquisa, fazendo-me apaixonar por ela.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os professores e funcionários da Faculdade de Farmácia.

A todos os meus grandes amigos que sempre me deram força e incentivo para a realização deste trabalho, acreditando e me fazendo acreditar que tudo daria certo.

A CAPES pelo financiamento da bolsa de estudos concedida durante todo o desenvolvimento do projeto.

## RESUMO

**Objetivo:** Contribuir para o desenvolvimento do candidato a antitumoral (LaSOM 65) através da avaliação farmacocinética pré-clínica em roedores de diferentes doses pelas vias i.v., p.o e i.p. e avaliação da toxicidade aguda do composto. **Metodologia:** LaSOM 65 foi administrado a ratos Wistar nas doses de 1 mg/kg i.v. *bolus* (n = 8), 10 e 30 mg/kg p.o. e 30 e 90 mg/kg i.p. (n = 6/grupo). As concentrações plasmáticas foram quantificadas por CL-UV em método desenvolvido e validado. A ligação às proteínas foi determinada por ultrafiltração e a distribuição tecidual foi avaliada por homogeneizado de tecido após administração i.v. de 1 mg/kg (n = 3 animais/ponto de coleta). Para o ensaio de toxicidade aguda, dose única de 1, 2,5 e 5 mg/kg i.v. e 50, 100 e 150 mg/kg p.o. de LaSOM 65 foi administrada aos animais. Ganho de peso, massa relativa dos tecidos, determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos e uma observação clínica detalhada foram realizados para a avaliação de possíveis efeitos tóxicos. **Resultados e Discussão:** LaSOM 65 apresentou farmacocinética linear na faixa de dose de 1 a 30 mg/kg (i.v., p.o. e i.p.). Após dose i.v. apresentou um  $CL = 0,85 \pm 0,18$  L/h/kg,  $t_{1/2} = 1,8 \pm 0,7$  h e  $Vd = 1,76 \pm 0,24$  L/kg. Para a dose de 90 mg/kg i.p. um aumento no  $Vd$  ( $3,2 \pm 0,8$  L/Kg) e  $t_{1/2}$  ( $2,9 \pm 0,9$  h) foi observado. O composto apresentou boa biodisponibilidade para as administrações extravasculares (58 e 50% p.o. e 73 e 61% i.p.). A ligação às proteínas foi de  $84,7 \pm 1,6\%$ . O composto distribuiu-se nos tecidos investigados tendo no pulmão a maior taxa de penetração ( $ASC_{\text{tecido/plasma}} = 2,7$ ) e o cérebro a menor ( $ASC_{\text{tecido/plasma}} = 0,4$ ). Piloereção, diarreia, letargia e dispneia foram os sinais clínicos observados imediatamente após administrações i.v., os quais regrediram após 3 h. Para a via oral nenhuma alteração foi observada. Nenhum outro parâmetro avaliado demonstrou efeitos toxicológicos para o LaSOM 65. **Conclusões:** LaSOM 65 demonstrou uma rápida distribuição tecidual e uma rápida eliminação após administração i.v. Sua boa biodisponibilidade e uma possível ausência de toxicidade apresentada por esta via permitem seu uso oral. A baixa penetração cerebral sugere que desenvolvimento no âmbito farmacotécnico será necessário visando seu uso para o tratamento de gliomas.

**Palavras-chave:** LaSOM 65, candidato antitumoral, farmacocinética, distribuição tecidual, ligação proteína, toxicidade aguda.



## ABSTRACT

### Pre-clinical Evaluation of the Pharmacokinetics and Acute Toxicity in Rodents of the Anticancer Candidate LaSOM 65

**Purpose:** To contribute with the development of a new anticancer candidate (LaSOM 65) by investigating its pre-clinical pharmacokinetics in rodents after administration of different doses by three routes (i.v., p.o. and i.p.) and acute toxicological evaluation of the compound. **Methodology:** LaSOM 65 was administrated to Wistar rats in the 1 mg/kg i.v. *bolus* (n = 8), 10 and 30 mg/kg p.o. and 30 and 90 mg/kg i.p. dose (n = 6/group). Plasma concentrations were determined by a development and validated LC-UV method. Protein binding was determined by ultrafiltration and tissue penetration was investigated in tissue homogenates after i.v. administration of 1 mg/kg (n = 3 animals/time point). For the acute toxicological assay, single administration of LaSOM 65 at the doses of 1, 2.5 and 5 mg/kg i.v. and 50, 100 and 150 mg/kg p.o. were given to the rats. Weight gain, organ relative mass, biochemical and hematological parameters and a detailed clinical observation were evaluated to determine LaSOM 65 toxicity. **Results and Discussion:** LaSOM 65 showed linear pharmacokinetic between 1 and 30 mg/kg (i.v., p.o and i.p.) with  $CL = 0.85 \pm 0.18$  L/h/kg,  $t_{1/2} = 1,8 \pm 0,7$  h and  $Vd = 1.76 \pm 0.24$  L/kg after i.v. dosing. After 90 mg/kg i.p. dosing an increase in  $Vd$  ( $3.2 \pm 0.8$  L/kg) and  $t_{1/2}$  ( $2.9 \pm 0.9$  h) were observed. The compound showed good bioavailability after p.o. (58 and 50%) and i.p. (73 and 61%) dosing. The protein binding was  $84.7 \pm 1.6\%$ . LaSOM 65 distributed into the tissues investigated with a higher penetration ratio into lung ( $AUC_{tissue/plasma} = 2.7$ ) than into brain ( $AUC_{tissue/plasma} = 0.4$ ). Piloerection, diarrhea, lethargy and dyspnea were the clinical signs observed immediately after the i.v. administrations and they regressed 3 h post-dosing. No alterations were observed after p.o. dosing. **Conclusions:** LaSOM 65 showed a rapid tissue distribution and elimination after i.v. administration. Its good bioavailability together with the probably absence of toxicity for the oral route allowed its use by this route. The low brain penetration suggests that a pharmaceutical development will be necessary if LaSOM 65 is intended for the treatment of glioma.

**Keywords:** LaSOM 65, antitumor candidate, pharmacokinetics, tissue distribution, protein binding, acute toxicity.



## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos dependendo da fase do ciclo celular.....	39
Figura 2. Equilíbrio dinâmico entre microtúbulos e os dímeros de tubulina.....	41
Figura 3. Estruturas químicas dos principais alcalóides da <i>Vinca</i> e seus análogos.....	43
Figura 4. Obtenção dos taxanos.....	45
Figura 5. A) Representação esquemática da cinesina Eg5 B) Esquema da função da cinesina Eg5 C) Representação esquemática de um fuso mitótico bipolar normal e um fuso monoastral causado pela inibição da Eg5.....	51
Figura 6. Estrutura química do A) Monastrol e B) LaSOM 65.....	54
Figura 7. Síntese das di-hidro-pirimidinonas.....	54
Figura 8. Efeito do monastrol, e análogos na proliferação celular (A e B) e na viabilidade celular (C e D) nas linhagens celulares de glioma.....	56

### CAPÍTULO 1

Figure. 1 Molecular structure of monastrol (A) and LaSOM 65 (B).....	67
Figure 2. Representative HPLC chromatograms of : (A) blank rat plasma, (B) rat plasma spiked with LaSOM 65 and IS (C) 1 h plasma sample from rat dosed with LaSOM 65 at 1 mg kg <sup>-1</sup> i.v. and IS.....	74
Figure 3. Mean plasma concentration-/time profile of LaSOM 65 after single i.v <i>bolus</i> dose of 1 mg kg <sup>-1</sup> to male Wistar rats.....	79

### CAPÍTULO 2

Figure 1. Molecular structure of monastrol (A) and LaSOM 65 (B).....	89
--	----

Figure 2. Mean plasma profile of LaSOM 65 after a single 1 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dose to Wistar rats.....	101
Figure 3. Mean plasma concentration–time profiles after administration of LaSOM 65: (A) 10 mg/kg and (B) 30 mg/kg oral doses; (C) 30 mg/kg and (D) 90 mg/kg intraperitoneal doses.....	103
Figure 4. Mean tissue concentration versus time profiles of LaSOM 65 after 1 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing: (A) tissues with higher concentrations; (B) tissues with lower concentrations.....	108
Figure 5. Mean body relative weight gain (day 0 = 100%) after: (A) oral administrations; (B) intravenous administration.....	110



## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DA LITERATURA

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma.....	35
Tabela 2. Relação entre ciclo celular e os principais classes de agentes quimioterápicos.....	39
Tabela 3. Famílias de cinesinas com seus respectivos membros e funções.....	49
Tabela 4. Di-hidro-pirimidinonas sintetizadas a partir do esquema representado na Figura 7.....	55
Tabela 5. Efeito do LaSOM 65 em camundongos com Sarcoma 180.....	58

### CAPÍTULO 1

Table 1. Standard curve parameters (linearity) and statistics for LaSOM 65 in rat plasma .....	75
Table 2. Intra and inter-day variation of LaSOM 65 in rat plasma.....	76
Table 3. Accuracy for the analysis of LaSOM 65 in rat plasma .....	77
Table 4. Stability results of LaSOM 65 in rat plasma.....	77
Table 5. Pharmacokinetic parameters of LaSOM 65 following i.v. administration of 1 mg/kg to Wistar rats estimated by non-compartmental approach .....	79

### CAPÍTULO 2

Table 1. Pharmacokinetic parameters of LaSOM 65 following intravenous dosing of 1 mg/kg to Wistar rats.....	102
Table 2. Pharmacokinetic parameters determined after single oral and intraperitoneal administration of LaSOM 65 to Wistar rats.....	104

Table 3. Pharmacokinetic parameters estimated for different tissues after LaSOM 65 1 mg/kg i.v. <i>bolus</i> dosing to Wistar rats.....	109
Table 4. DCO Scores after LaSOM 65 single administration to Wistar rats of different doses by oral and intravenous routes.....	111
Table 5. Serum biochemical indices of oral treatment with LaSOM 65 in male Wistar rats .....	112
Table 6. Serum biochemical indices of intravenous treatment with LaSOM 65 in male Wistar rats .....	113
Table 7. Effects of LaSOM 65 on hematological parameters after 14 days.....	115
Table 8. Effects of LaSOM 65 on relative organ weights.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS

$ASC_{0-\infty}$	Área sob a curva de 0 a infinito
$ASC_{ext}$	Área sob a curva extrapolada
ATP	Adenosina trifosfato
$AUC_{0-t}$	Área sob a curva de 0 a t
$AUMC_{0-\infty}$	Área sob a curva de primeiro momento de 0 a infinito
BBB	Barreira Hematoencefálica
CL	<i>Clearance</i> Total
$C_{máx}$	Concentração máxima
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
$F_{abs}$	Biodisponibilidade
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
i.v.	Administração intravenosa
i.p.	Administração intraperitoneal
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IS	<i>Internal standard</i>
$k_a$	Constante de velocidade de absorção
$k_e$	Constante de velocidade de eliminação
LaSOM 65	Ethyl 6-methyl-4-(3-nitrophenyl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidin-5-carboxylate
LC/UV	Cromatografia Líquida/Ultravioleta
MDR	Resistência a múltiplas drogas
MRT	<i>Mean residence time</i>
MSC	<i>Model selection criterion</i>
n	Tamanho amostral
NCE	<i>New chemical entity</i>
NEC	Nova entidade química
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.o.	Administração oral
P-gp	Glicoproteína-P
RNA	Ácido Ribonucléico

SD	<i>Standard deviation</i>
$t_{1/2}$	Tempo de meia-vida
$t_{lag}$	Tempo necessário para o início da absorção
$t_{máx}$	Tempo para atingir concentração máxima
Vd	Volume de distribuição
$Vd_{ss}$	Volume de distribuição no <i>steady state</i>
$\alpha$	Constante de velocidade da fase de distribuição
$\beta$	Constante de velocidade da fase de eliminação
$\lambda$	Constante de velocidade de eliminação

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	31
1. Câncer.....	33
2. Tratamento do câncer.....	35
3. Fármacos antitumorais.....	36
3.1 Inibidores da mitose.....	40
3.1.1 Alcalóides da Vinca.....	42
3.1.2 Colchicina.....	44
3.1.3 Taxanos.....	44
3.1.4 Efeitos adversos da terapia com inibidores da mitose.....	46
3.1.5 Resistência aos inibidores da mitose.....	47
3.2 Cinesinas.....	48
3.2.1 Família cinesina-5 e seus inibidores.....	50
3.2.2 LaSOM 65.....	54
4. Importância da avaliação farmacocinética e toxicológica pré-clínica no desenvolvimento de novos fármacos.....	58
 <b>CAPÍTULO 1. Bioanalytical Method for the Quantification of the Anticancer Monastrol Derivative Candidate LaSOM 65 in Pre-Clinical Pharmacokinetic Investigation</b> .....	 61
<i>Abstract</i> .....	65
<i>Introduction</i> .....	66
<i>Experimental</i> .....	68
Chemical.....	68
Apparatus and chromatographic conditions.....	69
Standard solutions, analytical curves and quality control samples.....	69
Sample preparation.....	70
Validation of the bioanalytical method.....	70
Preliminary pharmacokinetic study.....	72
<i>Results and Discussion</i> .....	73
Separation conditions.....	73
Extraction procedure.....	74
Method validation.....	74
Suitability of the method for pre-clinical pharmacokinetic studies..	78
<i>Conclusions</i> .....	80
<i>References</i> .....	81
 <b>CAPÍTULO 2: Pre-Clinical Pharmacokinetic and Acute Toxicological Evaluation In Roedents of Monastrol Derivative Anticancer Canditate LaSOM 65</b> .....	 83
<i>Abstract</i> .....	86

<i>Introduction</i> .....	87
<i>Experimental</i> .....	90
Chemicals and reagents.....	90
Animals.....	90
LaSOM 65 doses preparation.....	91
Pharmacokinetic study design .....	91
Bioanalytical Methodology.....	92
Pharmacokinetic Data Analysis.....	93
Determination of Plasma Protein Binding.....	95
Tissue Distribution.....	96
Statistical analysis.....	99
<i>Results</i> .....	100
Pharmacokinetics profiles of LaSOM 65 in Plasma.....	100
Plasma Protein Binding .....	106
LaSOM 65 Tissue distribution .....	107
Acute Toxicological Study.....	109
<i>Discussion</i> .....	117
<i>Conclusions</i> .....	122
<i>References</i> .....	123
<b>DISCUSSÃO GERAL</b> .....	127
<b>CONCLUSÕES</b> .....	133
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	137
<b>ANEXOS</b> .....	125

# INTRODUÇÃO

---





O câncer pode ser definido como uma doença crônica multicausal, caracterizado pelo aparecimento de células alteradas que se comportam de maneira anormal, perdendo o controle do seu crescimento, o que leva a uma proliferação desordenada (GARÓFOLO et al., 2004; ALMEIDA et al., 2005; NUSSBAUMER et al., 2011). Os fatores de risco do câncer podem ser ambientais ou genéticos. De todos os casos relatados, 80% a 90% dos cânceres estão associados a fatores ambientais. Mudanças ocorridas no meio ambiente, hábitos e estilos de vida adotados pelo homem fazem com que a prevalência de câncer no mundo tenha aumentado significativamente nos últimos anos (GARÓFOLO et al., 2004; INCA, 2011). No Brasil, estima-se para 2012 a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer e, segundo a Organização Mundial da Saúde, estima-se que 9 milhões de pessoas morrerão em 2015 vítimas de câncer (INCA, 2011; WHO, 2008).

O tratamento mais empregado visando a cura do câncer é a quimioterapia (ALMEIDA et al., 2005). Os quimioterápicos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação e fase do ciclo celular na qual atuam (BAGULEY e KERR, 2002). No segundo caso, podem ser subdivididos em ciclo celular específicos (CCS), atuando apenas nas células que se encontram no ciclo celular ou ciclo celular não-específicos (CCNS), atuando tanto em células que se encontram no ciclo celular, como em células em repouso (ALMEIDA et al., 2005)

O desenvolvimento de novos fármacos antitumorais é de extrema importância, visto que, apesar da sua grande utilização, um número limitado de fármacos para o tratamento de câncer está disponível no mercado (SONDHI et al., 2010). Ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de fármacos que interrompem o ciclo celular durante o estágio da mitose. Uma variedade de fármacos que se ligam à tubulina e inibem a formação do fuso mitótico são atualmente utilizados na terapia antitumoral, podendo-se citar como exemplos os alcalóides da *Vinca* (vincristina, vinblastina e vindesina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel) (SCHMIDT e BASTIANS, 2007). Embora muito efetivos esses fármacos estão associados a uma série de efeitos colaterais e ao desenvolvimento de resistência pelas células tumorais. Recentemente, a procura por fármacos que atuem inibindo as cinesinas, proteínas motoras

envolvidas na formação do fuso mitótico, tem ganhado atenção. Devido a sua função específica no estágio de mitose, a inibição destas proteínas leva ao desenvolvimento de fármacos antimitóticos mais seletivos, reduzindo problemas de efeitos colaterais e resistência observados nos fármacos usados na clínica (HUSZAR et al., 2009).

O monastrol foi a primeira molécula de baixo peso molecular caracterizada como inibidor da cinesina Eg5 (PETERS et al., 2005). Foi isolado através de um *screening* fenotípico delineado para identificar compostos antimitóticos que não interferissem diretamente com a tubulina e os microtúbulos (HUSZAR et al., 2009). Sendo o primeiro inibidor seletivo dessa proteína, o monastrol tornou-se uma molécula-plataforma (*lead*) para a síntese de novas moléculas e uma nova abordagem no tratamento do câncer. Recentemente, Müller e colaboradores (2007) demonstraram que análogos do monastrol são promissores no tratamento de tumores no sistema nervoso central (SNC), sendo efetivos contra a proliferação de glioblastomas humanos.

No Brasil, derivados do monastrol foram sintetizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (LaSOM). Entre os compostos da série sintetizada destaca-se o análogo LaSOM 65 (etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato), que demonstrou importante atividade no modelo de Sarcoma 180 *in vivo*, sendo capaz de reduzir em 70% o crescimento do tumor em camundongos após administrações intraperitoneais diárias de 90 mg/kg por um período de 7 dias (CANTO, 2009). Em ensaios *in vivo* o LaSOM 65 demonstrou atividade citotóxica frente a linhagens celulares cancerígenas de glioma murino C6 e humano U138-MG (CANTO et al., 2011). Esses resultados farmacológicos preliminares justificam e estimulam a avaliação farmacocinética e toxicológica aguda pré-clínica do LaSOM 65, uma vez que o composto apresenta boa atividade antitumoral e tais estudos fornecem informações necessárias para as etapas seguintes do desenvolvimento deste candidato a fármaco.

A avaliação farmacocinética permite a compreensão da cinética de absorção e do processo de disposição (distribuição e eliminação) do candidato

a fármaco, através da determinação numérica de parâmetros que descrevam estes processos.

Os testes toxicológicos agudos realizados durante o desenvolvimento de um fármaco permitem a seleção de dose para futuros estudos em animais, o embasamento científico para a realização dos primeiros testes clínicos em humanos e a previsão das consequências de uma overdose (CHAPMAN et al., 2010). Muito dos efeitos tóxicos de fármacos observados em animais podem ser transpostos à espécie humana, sendo o uso de testes toxicológicos pré-clínicos capaz de oferecer dados sobre a segurança do uso do candidato a fármaco.

O desenvolvimento de fármacos anticâncer é diferenciado em relação ao desenvolvimento de outros agentes terapêuticos, pois, por serem agentes extremamente tóxicos, as fases clínicas não são realizadas em voluntários saudáveis, sendo seu primeiro uso em humanos realizado em pacientes que não são responsivos a outros tratamentos com agentes antitumorais (TOMASZEWSKI et al., 2002). Dessa forma, o risco de óbito desses pacientes se torna muito alto, pois já estão debilitados pela doença e pelos tratamentos anteriormente testados (BAGULEY e KERR, 2002). Nesse contexto, os candidatos a agentes antitumorais devem ter dados pré-clínicos que predigam eficazmente os efeitos esperados em humanos. Na fase pré-clínica do desenvolvimento desses fármacos é considerada essencial a realização de estudos farmacodinâmicos, visando identificar o mecanismo de ação, estudos farmacocinéticos para avaliar a disposição corporal do candidato a fármaco e estudos toxicológicos, visando determinar a dose máxima tolerada, tanto em modelos animais com roedores como com não-roedores (NEWHOUSE et al., 2005). Nesse contexto se insere a proposta de avaliação da farmacocinética e toxicológica aguda pré-clínica em roedores do candidato a antitumoral LaSOM 65 apresentada neste trabalho.



## **OBJETIVOS**

---

---



## Objetivo Geral

O presente trabalho objetivou avaliar a farmacocinética pré-clínica e investigar a toxicologia aguda pré-clínica do candidato a fármaco antitumoral LaSOM 65 em ratos Wistar.

## Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método analítico sensível por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para quantificação do LaSOM 65 em plasma e tecidos de ratos;
- Estabelecer os parâmetros farmacocinéticos do LaSOM 65 após administrações i.v. *bolus*, oral e intraperitoneal, em diferentes doses, a ratos Wistar;
- Determinar a penetração tecidual (pulmão, rim, fígado, coração, cérebro, baço, tecido adiposo) do candidato a antitumoral LaSOM 65 após administração de dose única i.v. *bolus* de 1 mg/kg a ratos Wistar;
- Avaliar a ligação do LaSOM 65 a proteínas plasmáticas de ratos Wistar;
- Investigar a toxicologia pré-clínica em ratos do LaSOM 65, após administração única de diferentes doses i.v. e orais, em modelo agudo de avaliação toxicológica.





# REVISÃO DA LITERATURA

---

---



## 1. Câncer

O câncer é um distúrbio em nível celular onde ocorre a perda do controle da proliferação e da divisão celular, levando ao crescimento de uma massa sólida de células (tumor) ou um câncer líquido (p.ex. leucemia) (NUSSBAUER et al., 2011).

O câncer é considerado uma doença genética, uma vez que as alterações que levam à formação de neoplasias ocorrem em genes especiais, denominados oncogenes, responsáveis pela malignização das células normais (BELIZÁRIO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2005). Os oncogenes são genes normais que sofreram processos de mutação e, quando transcritos, levam à síntese de proteínas que mostram perda ou ganho de função biológica. Estudos demonstram que durante o processo de carcinogênese (formação do câncer) os genes mais suscetíveis a sofrer mutações são os genes que garantem a ordem dos eventos do ciclo de divisão celular, os genes que consertam erros na replicação do material genético e os que promovem e mantêm o estado de diferenciação celular (BELIZÁRIO et al., 2002). Células que possuem estes oncogenes passam então a se comportar de forma anormal, multiplicando-se de maneira descontrolada (ALMEIDA et al., 2005). Estas células também podem espalhar-se para outras partes do corpo em um processo conhecido como metástase.

O câncer é uma doença multicausal, podendo ter causas internas ou externas ao organismo, sendo o desenvolvimento das formas mais comuns o resultado de uma inter-relação entre elas (GARÓFOLO et al., 2004; INCA, 2011). As causas externas referem-se ao meio ambiente, estilos e hábitos de vida, enquanto as causas internas referem-se a fatores endógenos, geralmente geneticamente pré-determinados, sendo então, hereditários (ALMEIDA et al. 2005; INCA, 2011). A maioria dos casos (aproximadamente 80%) está relacionada a fatores ambientais (ALMEIDA et al., 2005), sendo fatores de risco a obesidade, o tabagismo, a dieta inadequada, a exposição a substâncias conhecidamente carcinogênicas e a exposição a vírus, bactérias e outros parasitas importantes (GARÓFOLO et al., 2004). São raros os casos de câncer que se devem apenas a fatores hereditários (INCA, 2011).

Segundo relatório publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que em 2008 houve mais de 12 milhões de novos casos de câncer diagnosticados, 25 milhões de pessoas vivas com câncer e 7 milhões de mortes por câncer. O contínuo crescimento e envelhecimento da população mundial tende a aumentar estes números, sendo previsto para 2030, 15,5 milhões de novos casos diagnosticados e 11,5 milhões de mortes devido ao câncer (WHO, 2008). Nos países desenvolvidos, o câncer é a segunda maior causa de morte, porém, estudos epidemiológicos apontam que esta é também uma tendência para os países em desenvolvimento, principalmente para os países “em transição” ou de renda média, como os países da Ásia e da América do Sul (WHO, 2007).

No Brasil, de acordo com o Instituto Nacional de Câncer, estima-se para 2012 aproximadamente 518.510 novos casos de câncer, sendo um total de 257.870 novos casos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. O tipo mais incidente será o câncer de pele não melanoma para ambos os sexos, seguido pelo câncer de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (Tabela 1).

A distribuição dos casos novos de câncer mostra-se heterogênea entre as cinco regiões do Brasil. As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário (INCA, 2011).

**Tabela 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto câncer de pele não melanoma.

Localização Primária	Homens		Localização Primária	Mulheres	
	Casos Novos	%		Casos Novos	%
Próstata	60.180	30,8	Mama Feminina	52.680	27,9
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8	Colo do Útero	17.540	9,3
Cólon e Reto	14.180	7,3	Cólon e Reto	15.960	8,4
Estômago	12.670	6,5	Glândula Tireóide	10.590	5,6
Cavidade Oral	9.990	5,1	Traquéia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3
Esôfago	7.770	4,0	Estômago	7.420	3,9
Bexiga	6.210	3,2	Ovário	6.190	3,3
Laringe	6.110	3,1	Corpo do Útero	4.520	2,4
Linfoma não-Hodgkin	5.190	2,7	Linfoma não-Hodgkin	4.450	2,4
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5	Sistema Nervoso Central	4.450	2,4

(Elaborada a partir de INCA, 2011)

## 2. Tratamento do Câncer

Dentre as estratégias utilizadas no tratamento do câncer, além da prevenção, estão: excisão cirúrgica, radioterapia e quimioterapia (NUSSBAUMER et al., 2011). Na maioria dos casos, torna-se necessário combinar mais de uma modalidade de tratamento (INCA, 2011).

A prevenção primária do câncer refere-se a ações voltadas para a redução da exposição da população aos fatores de risco, objetivando uma redução na incidência de novos casos (TONANI, 2007). Essas ações são dirigidas ao controle de fatores de risco evitáveis, como a dieta e o fumo (INCA, 2011). A prevenção secundária visa à redução da mortalidade por câncer e abrange um conjunto de ações que permitam o diagnóstico precoce da doença e seu tratamento imediato, aumentando a possibilidade de cura e sobrevida dos pacientes (TONANI, 2007).

A cirurgia é o procedimento mais adequado quando existe a necessidade de retirada do tumor. É extremamente eficaz quando utilizada para o tratamento de tumores sólidos quando esses não apresentarem metástases. Normalmente é utilizada em conjunto com a radioterapia visando um aumento na eficácia (ALMEIDA et al., 2005).

A radioterapia é um método capaz de destruir células tumorais através do emprego de feixes de radiações ionizantes. Ao interagir com os tecidos a radiação causa uma série de alterações bioquímicas nas células, como hidrólise da água e ruptura das cadeias de DNA, ocasionando a morte celular por variados mecanismos. As células tumorais, ao contrário das células normais, não dispõem dos mecanismos de reparo de dano, sendo mais sensíveis à radiação (INCA, 2011). A radioterapia é um método de tratamento local, podendo ser usada de forma exclusiva ou associada a outros métodos terapêuticos para reduzir tumores grandes e diminuir a recorrência e chance de metástase, sendo uma metodologia antitumoral bastante utilizada (ALMEIDA et al., 2005).

A quimioterapia começou nos anos 1940 com o uso da mostarda nitrogenada, que é um agente alquilante muito potente (NUSSBAUMER et al., 2011). A quimioterapia tem como principal objetivo destruir as células neoplásicas, preservando as normais. É utilizada quando se deseja um tratamento sistêmico, uma vez que os tratamentos citados anteriormente (cirurgia e radioterapia) são medidas locais, eficazes apenas para um terço dos pacientes. Resultados surpreendentes, com índices de cura de até 90% em diversos tipos de câncer, têm sido conseguidos com o uso de diferentes agentes antineoplásicos isolados ou em combinação (ALMEIDA et al., 2005). Por ser a quimioterapia o tratamento mais utilizado, cerca de 60 a 70% dos casos, existe grande interesse na pesquisa científica de novos fármacos antitumorais, com o objetivo de torná-los mais específicos, eficazes e seguros (MENDONÇA et al., 2008).

### **3. Fármacos Antitumorais**

A maioria dos fármacos antitumorais tem seu mecanismo de ação baseado em duas estratégias: a inibição de vias específicas de crescimento celular e a inibição do crescimento do câncer como um tecido. São classificados de acordo com seu mecanismo de ação e de acordo com o ponto do ciclo celular em que atuam (BAGULEY e KERR, 2002). Contudo, a variedade de compostos utilizados na quimioterapia oncológica é tão grande

que torna o processo de classificação complexo e controverso (ALMEIDA et al., 2005).

Uma classificação simples dos agentes quimioterápicos, baseada em seu mecanismo de ação é apresentada a seguir (ALMEIDA et al., 2005; INCA, 2011; NUSSBAUMER et al., 2011):

1. Agentes antimetabólitos: por possuírem estrutura similar a um metabólito fisiológico, afetam as células inibindo a biossíntese dos componentes essenciais do DNA e RNA. O antimetabólito compete com o metabólito impedindo a multiplicação e função normal da célula. Podem ser análogos da purina (como a 6-mercaptopurina e a 6-tioguanina) ou da pirimidina (5-fluorouracil, gencitabina), ou interferir em processos enzimáticos do metabolismo essencial, como os análogos do ácido fólico que atuam inibindo a formação do tetraidrofolato, essencial para a síntese de purina e pirimidina, pela inibição da dihidrofolato redutase (metotrexato, trimetoprim).

2. Agentes que interagem com o DNA: os fármacos dessa classe atuam através de diversos mecanismos.

- Agentes alquilantes: são compostos capazes de substituir um átomo de hidrogênio por um radical alquil em diversos grupos eletronegativos do DNA. Estes agentes antitumorais formam comprovadamente ligações cruzadas (*cross-link*) com as fitas ou filamentos do DNA, formando diferentes tipos de ligações cruzadas, o que impede a separação dos dois filamentos do DNA na dupla hélice espiralar, fenômeno este indispensável para a replicação. O primeiro fármaco desta classe a ser utilizado foi a cisplatina. Pertencem a esta classe a mostarda nitrogenada, a ciclofosfamida, as nitrosuréias, o bissulfam e a ifosfamida.

- Agentes intercalantes de DNA: atuam intercalando-se nos pares de base nitrogenada CG (citosina e guanina). A intercalação ocorre por ligações eletroestáticas (interações do tipo TT) e por complexos de transferência de elétrons formados entre os intercalantes e as bases CG. Devido a esta característica, os intercalantes são moléculas de alta densidade eletrônica, normalmente formados por

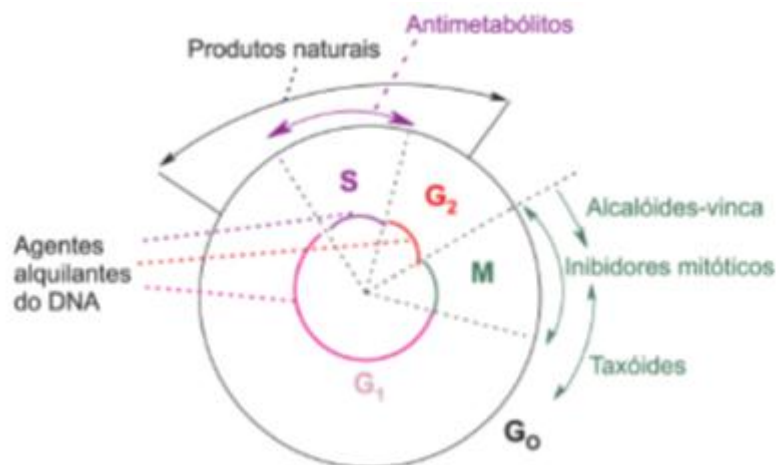
anéis aromáticos fundidos. A classe inclui os antibióticos antitumorais como as antraciclinas (doxorubicina e epirubicina).

- Inibidores da topoisomerase: incluem os fármacos irinotecana (tipo I) e etoposida (tipo II). Inibem as enzimas responsáveis pela clivagem, anelamento e estado topológico do DNA. Inibição das topoisomerasas Tipo I e Tipo II interferem tanto na transcrição quanto na replicação do DNA, controlando seu superenrolamento.
- Agentes clivadores de DNA: possui como representante a bleomicina que interage com o DNA causando uma cisão nas hélices devido à formação de radicais livres.

**3. Agentes inibidores da mitose:** os inibidores mitóticos podem paralisar a mitose na metáfase, devido à sua ação sobre a proteína tubulina, formadora dos microtúbulos que constituem o fuso espiralar, pelo qual migram os cromossomos. Deste modo, os cromossomos, durante a metáfase, ficam impedidos de migrar, ocorrendo a interrupção da divisão celular. Os principais membros dessa família são os taxanos e alcalóides da *Vinca*.

Outra classificação mais abrangente é a divisão em fármacos em ciclo-celular específicos (CCS) ou ciclo-celular não-específicos (CCNS). Os primeiros exercem sua ação apenas em células que se encontram em processo de divisão no ciclo celular enquanto os fármacos CCNS tem a capacidade de exterminar células tumorais independentes de estarem atravessando o ciclo ou estarem em repouso, na fase  $G_0$  (fase onde não há replicação celular ou fase de repouso) (ALMEIDA et al., 2005). Uma representação esquemática mostrando os fármacos e em que fase do ciclo celular atuam é demonstrada na Figura 1 e a classificação em CCS e CCNS dos principais fármacos usados na clínica é dada na Tabela 2.





**Figura 1.** Atividade dos agentes quimioterápicos antineoplásicos dependendo da fase do ciclo celular. G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, S e M são as fases do ciclo de replicação celular para células em mitose, onde G<sub>0</sub> é a fase de repouso (célula não está replicando), seguida pela fase G<sub>1</sub> onde há preparação da célula para replicação (produção de constituintes celulares essenciais), na fase S ocorre a síntese de DNA e na G<sub>2</sub> a síntese de componentes necessários para a mitose para finalmente ocorrer a formação do fuso mitótico na fase M. (Retirado de ALMEIDA et al., 2005).

**Tabela 2.** Relação entre ciclo celular e as principais classes de agentes quimioterápicos.

Agentes ciclo-celular específicos (CCS)	Agentes ciclo-celular não-específicos (CCNS)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Agentes Antimetabólitos</b> Análogo ácido fólico Antagonistas das pirimidinas Análogos das purinas e inibidores correlatos</li> <li>• <b>Agentes Hormonais</b> Adrenocorticosteróides Progestinas Estrógenos Androgênios Antiestrogênio Antiandrogênio Análogo do hormônio liberador de gonadotropina Inibidor da aromatase Inibidor do hormônio peptídico</li> <li>• <b>Produtos Naturais</b> Alcalóides vegetais Alcalóides da <i>Vinca</i> Paclitaxel (Taxol)</li> <li>• <b>Enzimas</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Produtos Naturais</b> Antibióticos naturais Alcalóides pirrolizidínicos</li> <li>• <b>Complexos de Coordenação de Platina</b> Cisplatina Carboplastina</li> <li>• <b>Agentes Alquilantes diversos</b> Mostardas Nitrogenadas Nitrossuréias Triazenos Alquil sulfonatos</li> </ul>

(Elaborado a partir de ALMEIDA et al., 2005).

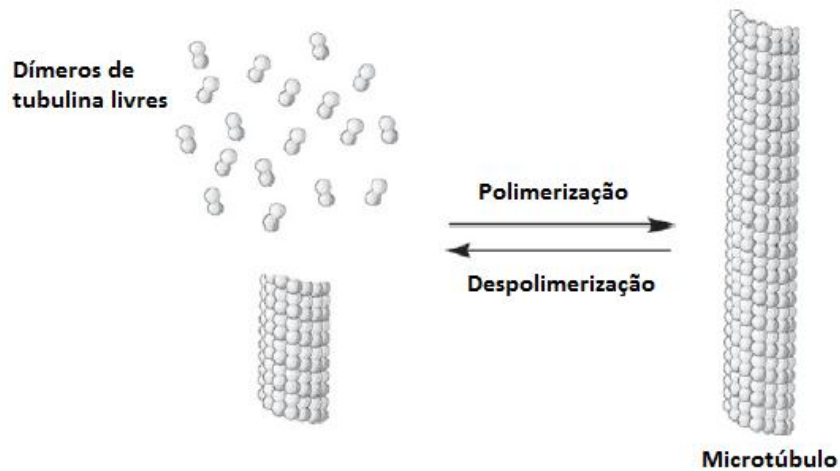
Além de um número limitado de fármacos para o tratamento de câncer estarem disponíveis no mercado (SONDHI et al., 2010), terapias eficazes para alguns tipos de tumores ainda são escassas (BURGER e FIEBIG, 2004). Em 1999, dos 92 fármacos disponíveis para o tratamento de câncer, apenas 17 eram considerados pelos oncologistas como clinicamente aplicáveis e apenas 12 dos agentes adicionais eram percebidos como tendo alguma vantagem em determinadas situações clínicas (BURGER e FIEBIG, 2004). Isso demonstra a necessidade urgente da pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos com atividade anticancerígena (SONDHI et al., 2010). Nesse contexto, ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de novos fármacos capazes de interromper o ciclo celular durante a mitose, os inibidores da mitose, por representarem uma das medicações mais efetivas contra o câncer (HAIT et al., 2007).

### **3.1 Fármacos inibidores da Mitose**

Os fármacos que interferem com a progressão normal da mitose representam os compostos de maior sucesso quimioterápico para o tratamento anticâncer atualmente utilizados (SCHMIDT e BASTIANS, 2007). Nessa família, tanto os fármacos de origem natural quanto os semi-sintéticos possuem um grande espectro de atividade anticancerígena, sendo utilizados para diversos tipos de tumores (HAIT et al., 2007). Esses fármacos, cujos principais representantes são os taxanos e os alcalóides da *Vinca*, inibem a função dos microtúbulos na formação do fuso mitótico, levando a parada do ciclo celular no estágio de mitose, induzindo a morte das células tumorais (SCHMIDT e BASTIANS, 2007).

Os microtúbulos são um dos principais componentes do citoesqueleto das células eucariontes (SCHMIDT e BASTIANS, 2007). Tem a função de manter a estrutura celular, realizam o transporte de organelas e vesículas intracelulares, participam da secreção extracelular, motilidade celular e neurotransmissão (HAIT et al., 2007; SCHMIDT e BASTIANS, 2007; AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Uma estrutura muito importante formada pelos microtúbulos é o fuso mitótico, usado pelas células eucariontes para segregarem seus cromossomos corretamente durante a divisão celular, permitindo

a transferência dos cromossomos da célula original para a célula-filha (AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Os microtúbulos são tubos longos, ocos, cilíndricos e rígidos, com um diâmetro em torno de 25nm, formados por 13 protofilamentos que crescem e encurtam pela adição reversível e não covalente de dímeros de tubulina no seu final (HAIT et al., 2007; SCHMIDT e BASTIANS, 2007; AVENDANO e MENENDEZ, 2008). A tubulina é uma proteína que possui duas subunidades chamadas de  $\alpha$  e  $\beta$  e seus dímeros livres estão em um equilíbrio dinâmico com os microtúbulos, através da polimerização e despolimerização desses, conforme demonstrado na Figura 2 (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).



**Figura 2.** Equilíbrio dinâmico entre microtúbulos e os dímeros de tubulina (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

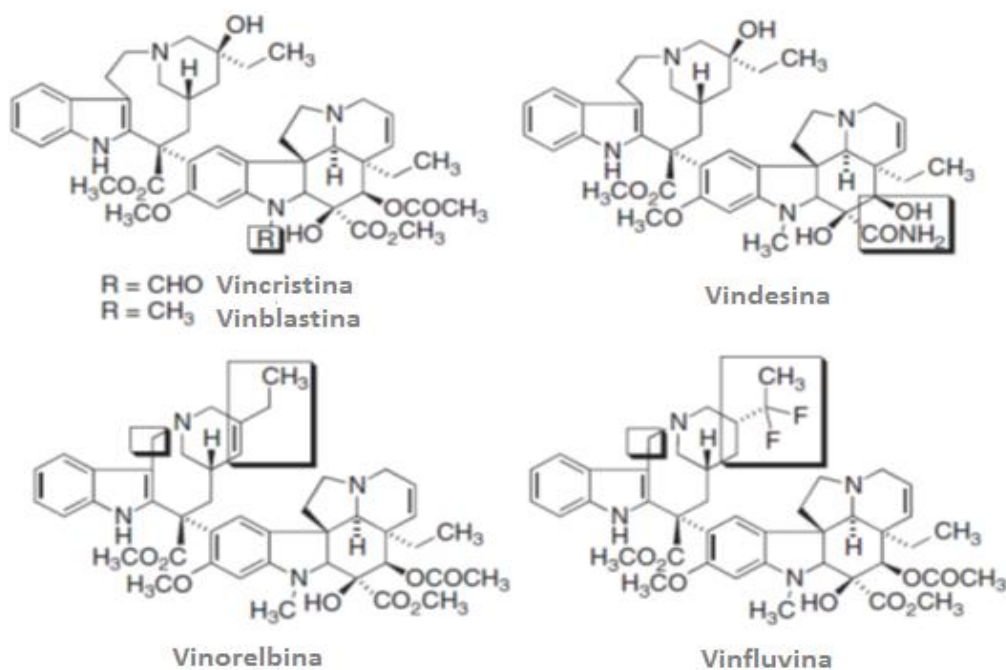
A polimerização dos microtúbulos necessita da adição das  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas a uma molécula de guanosina trifosfato (GTP). Uma vez ligadas a GTP, os dímeros de tubulina formam uma cápsula que alongam o final do microtúbulo. Esta ligação da GTP ao final do microtúbulo aumenta a afinidade para outras moléculas de tubulina. A despolimerização ocorre quando o GTP é hidrolisado mais rapidamente do que é adicionado (HAIT et al., 2007). Proteínas auxiliares regulam os processos de polimerização e despolimerização dos microtúbulos.

As proteínas associadas ao microtúbulo (PAM) são proteínas estruturais que regulam a estabilidade e o comportamento dinâmico dos microtúbulos. Outro grupo de PAM é representado pelas proteínas motoras, que podem ser divididas em cinesinas e dineínas. Essas se movem ao longo dos microtúbulos mediando transportes intracelulares, congregação e segregação cromossômica (CASSIMERIS e SPITTLE, 2001).

Fármacos que tem como alvo os microtúbulos se ligam em diferentes locais da tubulina e em diferentes porções dos microtúbulos, mas todos suprimem a dinâmica de polimerização-despolimerização dos microtúbulos. Tradicionalmente, fármacos anticancerígenos que agem nos microtúbulos podem ser classificados em dois grupos: a) fármacos que inibem a polimerização dos microtúbulos (agentes desestabilizantes dos microtúbulos), como os alcalóides da *Vinca* e a colchicina; e b) fármacos que estimulam a polimerização (agentes estabilizantes dos microtúbulos), como os taxanos. Atualmente sabe-se que essa classificação só é válida em altas concentrações, pois para baixas concentrações observa-se que ambos os grupos atuam estabilizando os microtúbulos (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

### **3.1.1 Alcalóides da *Vinca***

Os alcalóides da *Vinca* foram inicialmente isolados da *Catharantus roseus* (*Vinca rósea*), sendo que dos quatro alcalóides isolados, dois tornaram-se agentes terapêuticos, a vincristina e a vinblastina (HAIT et al., 2007). Seus potenciais citotóxicos foram descobertos em 1958, sendo inseridas na terapia anticancerígena no final dos anos de 1960, sendo amplamente utilizadas até os dias atuais (AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Em seguida, diversos análogos semi-sintéticos foram introduzidos na clínica sendo vindesina, vinorelbina e vinfluvina os mais notáveis (Figura 3) (SCHMIDT e BASTIANS, 2007).



**Figura 3.** Estruturas químicas dos principais alcalóides da *Vinca* e seus análogos.

Apesar da semelhança estrutural, a vincristina e a vinblastina possuem um espectro de atividade biológica bastante distinta (O'MARCAIGH e BETCHER, 1995). A vinblastina é normalmente utilizada para o tratamento da doença de Hodgkin e tumores testiculares, enquanto a vincristina é utilizada para o tratamento de linfomas e leucemia (O'MARCAIGH e BETCHER, 1995; HAIT et al., 2007; AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

Como dito anteriormente, o mecanismo de ação dos alcalóides da *Vinca* é concentração dependente (HAIT et al., 2007). Em altas concentrações os compostos se ligam especificamente à subunidade  $\beta$  dos dímeros de tubulina, em uma região conhecida como domínio *Vinca*, provocando um aumento da afinidade da tubulina por ela mesma, formando agregados paracristalinos (AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Isso resulta na supressão da dinâmica do microtúbulo (SCHMIDT e BASTIANS, 2007), pela diminuição do número de dímeros de tubulina livres, impedindo a polimerização desses. Em concentrações sub-estequiométricas estes fármacos ligam-se com elevada

afinidade na porção terminal do microtúbulo tornando-o estável (HAIT et al., 2007).

### **3.1.2 Colchicina**

Colchicina é um alcalóide isolado da *Colchicum autumnalee*, apesar de ser um dos primeiros ligantes dos microtúbulos identificados, seu uso clínico para o tratamento do câncer não é muito significativo. A colchicina é utilizada clinicamente para o tratamento da gota. Similarmente aos alcalóides da *Vinca*, a colchicina desestabiliza os microtúbulos em altas concentrações por se ligar ao domínio da colchicina na tubulina, formando precipitados dessas, diminuindo a quantidade de tubulina livre para se ligar aos microtúbulos. Outros compostos que se ligam ao domínio da colchicina como as combrestatinas (isoladas da árvore africana *Combretumcaffrum*), 2-metoxiestradiol e ABT-751 estão sendo investigados para o tratamento de câncer (SCHMIDT e BASTIANS, 2007; AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

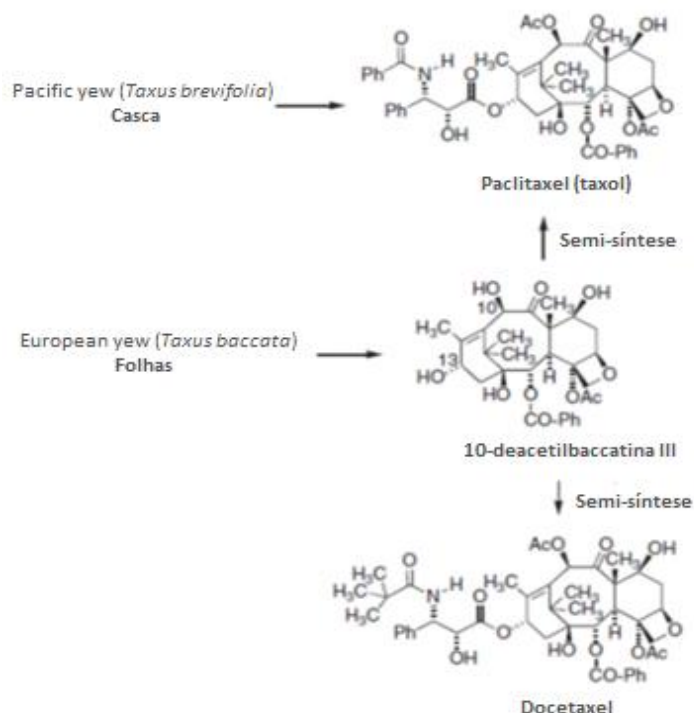
Pacientes que estão fazendo o uso da colchicina, principalmente para o tratamento da gota, não apresentam os sinais de neurotoxicidade apresentados pelos pacientes que fazem uso dos alcalóides da *Vinca*. Desse modo, a colchicina pode apresentar um benefício terapêutico na prevenção de alguns tipos de câncer em pacientes de alto risco (SCHMIDT e BASTIANS, 2007).

### **3.1.3 Taxanos**

O paclitaxel (Taxol®) é isolado do teixo do Pacífico *Taxus brevifolius*, sendo o produto de origem natural mais importante utilizado na quimioterapia (AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Porém, problemas para a extração do paclitaxel, como a necessidade de derrubar a árvore para extraí-lo, uma vez que se encontra na casca, a baixa concentração do farmacógeno (são necessárias 4000 árvores para obter-se 360g de paclitaxel), além do processo de extração complexo e de alto custo (AVENDANO e MENENDEZ, 2008), juntamente com sua baixa solubilidade em água, que gera problemas para sua formulação (HAIT et al., 2007), levaram a investigação de novos compostos e derivados semi-sintéticos que possam ser utilizados para substituí-lo. Nesse

contexto, foi descoberto o docetaxel, um derivado semi-sintético obtido a partir do precursor natural 10-deacetilbaccatina III, extraído das folhas, galhos e agulhas do *Taxus baccata*, onde se encontra em altas concentrações. Por via semi-sintética, a 10-deacetilbaccatina III pode ser transformada também em paclitaxel (Figura 4) (AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Docetaxel é um composto mais potente e mais solúvel que o paclitaxel, sendo um dos fármacos anticancerígenos mais ativo e amplamente utilizado da atualidade (HAIT et al., 2007).

O paclitaxel e o docetaxel são utilizados clinicamente para o tratamento de carcinomas de mama, pulmão, ovário e bexiga e possuem atividade contra malignidades linfóides e câncer de próstata (HAIT et al., 2007; AVENDANO e MENENDEZ, 2008). Ao contrário dos alcalóides da *Vinca*, seu mecanismo de ação consiste na inibição da despolimerização dos microtúbulos. Seus mecanismos de ação também são dose-dependente. Em altas concentrações, os taxanos são capazes de induzir a polimerização dos microtúbulos mesmo na ausência de GTP ou PAMs e são resistentes à despolimerização pelo cálcio ou baixas temperaturas (HAIT et al., 2007). São capazes de aumentar a massa de polímeros dos microtúbulos, em um fenômeno conhecido como “agregação dos microtúbulos”.



**Figura 4.** Obtenção dos taxanos (AVENDANO e MENENDEZ, 2008).

### 3.1.4 Efeitos adversos da terapia com inibidores da mitose

O alvo principal dos fármacos inibidores da mitose é o fuso mitótico, pois atuam interferindo na dinâmica dos microtúbulos. Entretanto, mesmo as células que não estão em estado proliferativo necessitam da dinâmica dos microtúbulos para a manutenção das funções do citoesqueleto e processos de transporte intracelular, em particular as células neurais onde o transporte axonal de vesículas contendo neurotransmissores é guiado pelos microtúbulos (TRUDEAU, 1996; ZHOU e GIANNAKAKOU, 2005). Assim, sendo os fármacos inibidores da mitose não seletivos para as células tumorais (HAIT et al., 2007), o principal efeito adverso observado na clínica é a neuropatia periférica, que limita a dose tolerada pelos pacientes (ALEY et al., 1996). Esta pode ser explicada por um rompimento dos microtúbulos responsáveis pelo fluxo axonal (SCHMIDT e BASTIANS, 2007) e seus sintomas incluem dormência e formigamento das extremidades, perda dos reflexos tendinosos profundos e fraqueza muscular distal. As alterações sensoriais são geralmente reversíveis com o tempo, sendo a perda da função motora o sintoma mais grave que leva a descontinuidade do tratamento. Juntamente com a neurotoxicidade, outro efeito adverso bastante observado e dose-limitante é a mielossupressão (HAIT et al., 2007). A supressão da função dos microtúbulos mitóticos inibe a proliferação de células precursoras hematopoéticas, o que explica a mielossupressão grave e neutropenia dos pacientes em tratamento (SCHMIDT e BASTIANS, 2007).

Outros efeitos adversos associados ao uso de fármacos inibidores da mitose são a alopecia (HAIT et al., 2007), toxicidade gastrintestinal (ATTARD et al., 2006), toxicidade epitelial e mucosite (KIRSCH-VOLDERS e PARRY, 1996). Para os alcalóides da *Vinca* observa-se dores no peito e problemas respiratórios e, para o docetaxel, observa-se um aumento da permeabilidade vascular periférica resultando em edema periférico, ascites e derrame pleural (HAIT et al., 2007).



### 3.1.5 Resistência aos inibidores da mitose

A aquisição de resistência a agentes quimioterápicos por parte das células tumorais é um fenômeno conhecido como resistência a múltiplas drogas (MDR) (ARORA e SHUKLA, 2003). A resistência a fármacos que tem como alvo a tubulina e os microtúbulos é mediada por diversos mecanismos: efluxo de fármaco, mudanças na distribuição e metabolismo, alterações na tubulina e perturbações no ciclo celular, entre outros (HAIT et al., 2007).

O efluxo de fármaco é manifestado por uma diminuição do acúmulo intracelular de fármaco e é mediado pela glicoproteína P (P-gp), que é um transportador de membrana ATP dependente de alto peso molecular (170 kDa) codificada pelo gene *mdr-1* (ARORA e SHUKLA, 2003). Células tumorais normalmente apresentam uma super-expressão de P-gp, o que permite que apresentem resistência a diversos agentes antitumorais (GANGJEE et al., 2011). Esta super-expressão do gene *mdr-1* pode ocorrer por vários estímulos, especialmente a presença dos próprios fármacos inibidores da mitose, que são capazes de induzir a transcrição do gene *mdr-1* (ARORA e SHUKLA, 2003). Além de aumentarem a expressão da P-gp, os alcalóides da *Vinca* e os taxanos são ativamente transportados pela P-gp (HAIT et al., 2007), fazendo do efluxo um dos principais mecanismos que confere resistência aos fármacos dessa classe.

Outro importante mecanismo que confere resistência aos fármacos inibidores da mitose é a mudança na proporção dos isotipos de tubulina e mutações na mesma (HAIT et al., 2007). Em trabalho publicado por Burkhart e colaboradores (2001) foi encontrado um grande aumento no isotipo da classe II da  $\beta$ -tubulina (M $\beta$ 2) em uma linhagem de células resistentes ao Taxol®, sugerindo que a expressão aumentada de M $\beta$ 2 poderia ser um fator que contribui para o alto nível de resistência ao Taxol® dessas células. Células tumorais resistentes também expressam formas mutantes de tubulina  $\alpha$  e  $\beta$  nas quais os domínios de ligação com os fármacos estão alterados (HAIT et al., 2007).

Apesar de muito efetivos, os fármacos até agora apresentados estão associados com uma variedade de efeitos colaterais e resistência por diversos

tumores. Recentemente, as cinesinas motoras tem ganhado grande atenção na busca de alternativas por fármacos inibidores da mitose (HUSZAR et al., 2009). Essas proteínas motoras interagem com os microtúbulos durante a mitose, não interagindo com os microtúbulos na interfase, sugerindo que estes novos inibidores seriam específicos para os tecidos em proliferação (AVENDANO e MENENDEZ, 2008), o que criaria a oportunidade para o desenvolvimento de fármacos mais seletivos, evitando os principais efeitos colaterais observados para os inibidores da mitose clássicos. Além disso, os inibidores da cinesina aparentam não possuir os problemas de resistência relatados para os inibidores de mitose, sendo assim mais efetivos (HUSZAR et al., 2009).

### **3.2 Cinesinas**

As cinesinas são proteínas motoras associadas aos microtúbulos as quais estão envolvidas em diversos processos celulares, incluindo o transporte de vesículas, organelas e cromossomos (HUSZAR et al., 2009), a regulação da dinâmica do microtúbulo (VALENTINE e GILBERT, 2007), sendo fundamentais para a morfologia celular (GOOD et al., 2011). As cinesinas também participam dos movimentos cromossomais e do fuso durante a meiose e mitose (MIKI et al., 2009), sendo que todas hidrolizam o ATP como fonte de energia para realizar suas funções motoras (MIKI et al., 2005).

Até o momento, as cinesinas formam uma superfamília de pelo menos 650 proteínas distintas, as quais são categorizadas em 14 diferentes famílias e são identificadas em diferentes espécies, sendo encontradas apenas em células eucariontes (GOOD et al., 2011). As diferentes famílias, suas funções e membros estão representados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Famílias de cinesinas com seus respectivos membros e funções.

<b>Nome Padronizado (Famílias)</b>	<b>Membros Representativos</b>	<b>Função/Estrutura</b>
<b>Cinesina-1</b>	KIF5B, KHC, NKin, DdK3, DdK5	Transporte vesicular/ convencional
<b>Cinesina-2</b>	KIF3A/3B, KIF17, Krp85/95, Osm3, Fla10	Transporte vesicular intraflagelarr/heterotrimérica
<b>Cinesina-3</b>	KIF1A, KIF1B, KIF3A, UNC104, DdUnc104	Transporte organelas/ monomérica
<b>Cinesina-4</b>	KIF4A, KIF21A/B, Cromocinesina	Transporte organelas, movimento cromossomos
<b>Cinesina-5</b>	KIF11, Eg5, Bim C, CIN8, KIP1, Cut7	Formação fuso/ homotetramérica bipolar
<b>Cinesina-6</b>	KIF20, KIF23, Rab6Cinesina, CHO1, MKLPP1	Citocinese, polaridade do fuso
<b>Cinesina-7</b>	KIF10, CENP-E, CMET, CANA, KIP2	Captura cinetocore do microtúbulo
<b>Cinesina-8</b>	KIF18B, KIF19A, KLP67A, KIP3	Migração nuclear, transporte mitocondrial
<b>Cinesina-9</b>	KIF6, KIF9, KRP3, CrKLP1	Desconhecida
<b>Cinesina-10</b>	KIF22, KID, Nod	Segregação cromossômica
<b>Cinesina-11</b>	KIF26A/B, VAB8, SMY1	Transdução de sinal/ cabeça catalítica divergente
<b>Cinesina-12</b>	KIF12, KIF15, HKLP2, KLP54D, Xkpl2, PAKRPd	Transporte organelas/ caudas homólogas
<b>Cinesina-13</b>	KIF2A, MCAK, XKCM1, PfKinI	Despolimerização microtúbulos
<b>Cinesina-14<sup>a</sup></b>	KIFC1, CHO2, Ncd, Kar3, KatA	Segregação cromossômica
<b>Cinesina-14B</b>	KIFC2/3, KatD, KCBP, KIF25	Transporte organelas
<b>Órfãos</b>	CeKLP10, CeKLP18, DdK9	Sem grupo

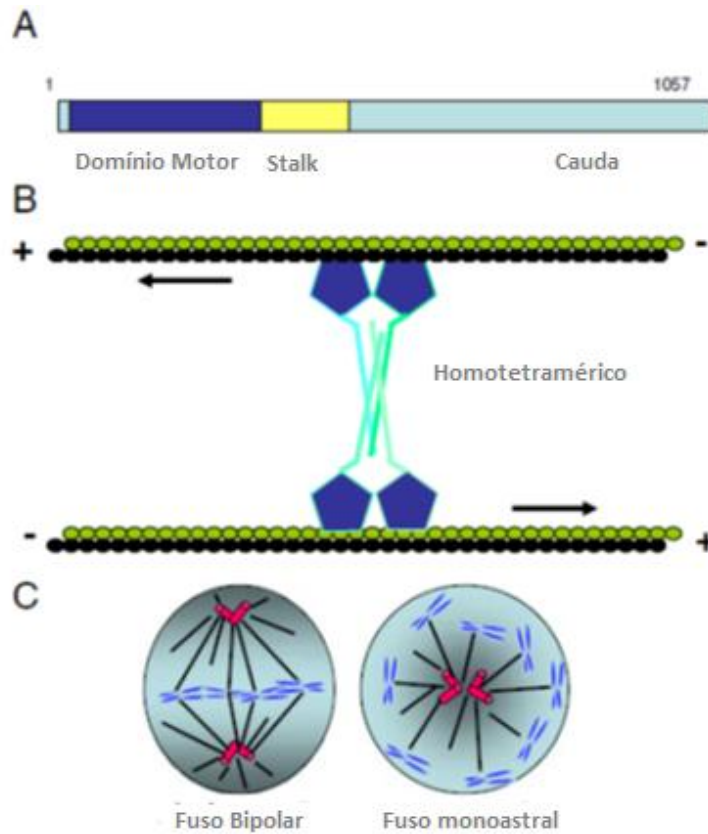
(Elaborado com base em MIKI et al., 2005)

Todas as cinesinas são caracterizadas por um domínio motor composto de aproximadamente 340 aminoácidos o qual contém um núcleo catalítico para a hidrólise de ATP e o local de ligação aos microtúbulos. Próximo a este domínio motor, também chamado de “cabeça”, as cinesinas possuem uma região chamada “*stalk*” seguido por um domínio denominado “cauda”, no lado

oposto da molécula. O domínio da cabeça é responsável pelo movimento, impulsionado pela hidrólise de ATP, enquanto a região “stalk” e o domínio “cauda” são importantes para a interação com as moléculas cargas, como proteínas, lipídios ou ácidos nucléicos (MIKI et al., 2005; HUSZAR et al., 2009). A pequena região entre a “cabeça” e o “stalk”, denominada “pescoço”, contém características família-específicas. Em várias famílias esta região tem se mostrado essencial para propriedades como direção da motilidade ou regulação da atividade. O domínio motor, juntamente com o pescoço, é responsável pela função mecânica, sendo bem conservado em cada família, enquanto a região “stalk” e a “cauda” são altamente divergentes, mesmo em membros da mesma família. Isso reflete as diversas funções celulares efetuadas pelas cinesinas, que vão desde o transporte de lipídios, vesículas sinápticas através dos axônios até o transporte cromossômico durante a mitose (MIKI et al., 2005).

### **3.2.1 Família cinesina-5 e seus inibidores**

Membros da família cinesina-5 são proteínas homotetraméricas que estão envolvidas na formação do fuso mitótico no início da mitose (GOOD et al., 2011). Devido a sua estrutura tetramérica essas cinesinas fazem uma ligação cruzada com dois microtúbulos antiparalelos, sendo dois domínios motores interagindo com cada um dos filamentos e deslizando-os em direção oposta. Durante a mitose, este deslizamento dos microtúbulos mediado pelas cinesinas-5 é essencial para o estabelecimento do fuso mitótico bipolar (Figura 5A e 5B) (HUSZAR et al., 2009).



**Figura 5. A)** Representação esquemática da cinesina Eg5 **B)** Esquema da função da cinesina Eg5 **C)** Representação esquemática de um fuso mitótico bipolar normal e um fuso monoastral causado pela inibição da Eg5 (Retirado de HUSZAR et al., 2009).

Os membros da família cinesina-5 foram inicialmente denominados membros da família BimC, devido a descoberta do membro BimC no *Aspergillus nidulan*, sendo também conhecidos como bloqueadores da mitose (GOOD et al., 2011). Atualmente, seu principal membro é a proteína Eg5 (também denominada KSP- “*kinesin spindle protein*”), cinesina encontrada em humanos (MIKI et al., 2009) e um alvo muito investigado para potenciais quimioterápicos (GOOD et al., 2011).

O papel funcional dessas cinesinas na formação do fuso mitótico bipolar reflete em seu perfil de expressão. Observa-se para a cinesina Eg5 uma grande expressão em tecidos durante o estágio de proliferação, enquanto que em tecidos não proliferativos pouca ou nenhuma Eg5 é observada. Adicionalmente, observa-se uma super-expressão de Eg5 em vários tumores

sólidos e leucemias, juntamente com o aumento de outros marcadores mitóticos, demonstrando que esses tecidos apresentam uma alta taxa proliferativa. A necessidade da cinesina Eg5 no início da mitose, juntamente com o fato de que encontra-se expressa principalmente nos tecidos em proliferação, tornam a cinesina Eg5 alvo para a inibição farmacológica, visando o desenvolvimento de novos antitumorais (HUSZAR et al., 2009).

O primeiro inibidor da cinesina Eg5 descoberto foi uma molécula de baixo peso molecular denominada monastrol, devido ao fenótipo monoastral monopolar dos microtúbulos cercados por um anel de cromossomos que foi observado no lugar do fuso mitótico bipolar normal (Figura 5C). O monastrol foi descoberto a partir de uma biblioteca de 16.320 compostos através de *screenings* desenhados para identificar compostos capazes de afetar a mitose. No mesmo estudo, conduzido por Mayer e colaboradores (1999), demonstrou-se que em células BS-C-1 (células epiteliais renais de macaco) tratadas com o monastrol depois de 4 horas de tratamento uma fração significativa das células estavam presas na mitose, sendo que 90% delas apresentavam o fenótipo monoastral. As células que se encontravam na interfase não foram afetadas. Os resultados permitiram demonstrar também que o monastrol não é um inibidor geral das proteínas motoras, sendo específico para a cinesina Eg5.

Em 2002, Maliga e colaboradores, investigando o mecanismo de ação pelo qual o monastrol inibe a Eg5, demonstraram que o fármaco inibe a atividade da ATPase tanto na presença quanto na ausência do microtúbulo, sendo que essa inibição não ocorre devido a uma competição com a ligação do ATP à Eg5, como ocorre com os outros inibidores da ATPase. O monastrol parece inibir a ATPase através da inibição da liberação do ADP da Eg5, não competindo com a ligação ao microtúbulo, sugerindo que o fármaco se liga a um sítio alostérico no domínio motor da cinesina. No mesmo trabalho, a partir de estudos realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo*, os autores demonstraram que o (S)-monastrol é um inibidor mais potente da cinesina Eg5 do que seu (R)-enântiômero.

Peters e colaboradores (2006) sugeriram com seus estudos que o monastrol possui características indutivas e inibitórias fracas sobre a P-gp, quando comparado com indutores e inibidores conhecidos dessa proteína.

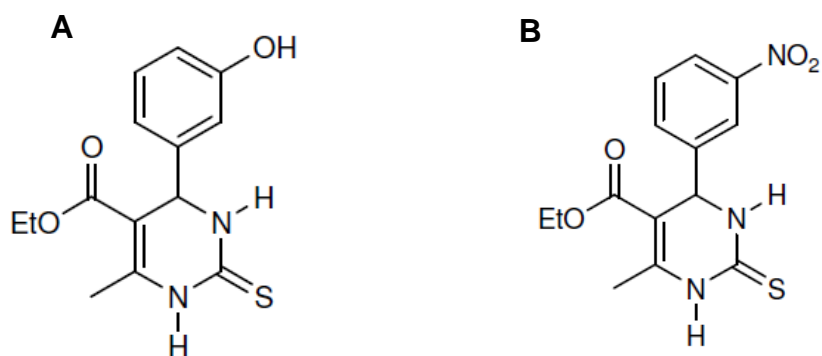
Aparentemente o monastrol não é substrato da P-gp, não sendo transportado por ela, uma vez que não houve diferença na potência inibitória de crescimento entre linhagens celulares nativas e linhagens que super-expressam P-gp.

A especificidade para tecidos em proliferação e a fraca interação com a P-gp observadas com o monastrol impulsionaram o desenvolvimento de novos inibidores da Eg5 mais potentes. Estes podem ser divididos em inibidores alóstericos da ATPase e inibidores competitivos da ATPase.

Assim como o monastrol, os inibidores alostéricos da ATPase não competem pelo sítio de ligação do ATP, sendo seletivos para Eg5, uma vez que seu sítio de ligação não parece estar presente em outras cinesinas (HUSZAR et al., 2009). Nesse grupo encontram-se os análogos ao monastrol, que são desenvolvidos com o objetivo de elevar a potência, uma vez que o monastrol é um inibidor fraco da cinesina Eg5. Estes incluem as ciano-pirimidonas, as ciano-tripirimidonas e as pirimidin-2-tionas bicíclicas, porém nenhum destes encontra-se em fase clínica (HUSZAR et al., 2009). Outra classe de inibidores alostéricos da ATPase incluem compostos como a ispinesib (SB-715992 - Cytokinetics/GSK) e seu análogo SB-743921, que são os primeiros inibidores da Eg5 em ensaios clínicos de Fase II (GOOD et al., 2011).

Em 2009 uma série de compostos inibidores competitivos da ATPase foram identificados. Esses se ligam a uma região distinta dos inibidores não competitivos e possuem a vantagem de superar a resistência observada nos inibidores alostéricos, uma vez que mutações no sítio de ligação destes já foram encontradas (HUSZAR et al., 2009). O uso de inibidores competitivos em combinação com inibidores alostéricos pode ser útil na clínica uma vez que o problema de resistência é superado e a eficácia do tratamento é aumentada.

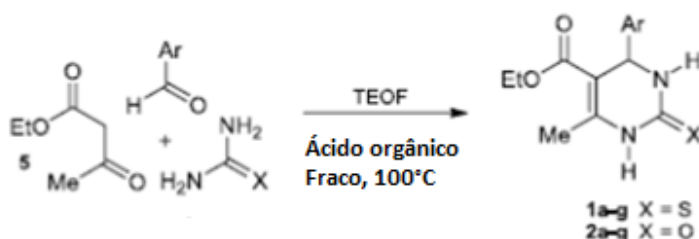
No Brasil, derivados do monastrol (Figura 6) vem sendo sintetizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (RUSSOWSKI *et al.*, 2006; CANTO et al., 2011). Dentre os 13 compostos sintetizados, o etil 6-metil-4-(3-nitrofenil)-2-tioxo-1,2,3,4-tetrahidropirimidina-5-carboxilato (LaSOM 65) tem demonstrado resultados promissores na investigação farmacológica pré-clínica.



**Figura 6.** Estrutura química do **A)** Monastrol e **B)** LaSOM 65.

### 3.2.2 LaSOM 65

Dois séries de 4-aryl-3,4-dihidropirimidin-2(1*H*)-(tio)onas, incluindo o monastrol, foram sintetizadas pelo Laboratório de Química Orgânica e Medicinal (UFRGS). O grupo desenvolveu e otimizou um novo protocolo de síntese destes compostos a partir da utilização do agente desidratante trietilortoformato (TEOF) juntamente com ácidos orgânicos fracos (ácido cítrico e oxálico) utilizando o aquecimento convencional. TEOF associado aos ácidos cítrico ou oxálico atua como um promotor eficaz da reação de Biginelli entre a uréia (ou tiouréia), acetato de etila e aldeídos aromáticos produzindo diversas di-hidro-pirimidinonas (DHPMs) (Figura 7). O sistema ácido cítrico/TEOF, a 100 °C, durante 1-2 h apresentou os melhores rendimentos de síntese, que variaram entre 71-96%. Além dos elevados rendimentos, o uso de ácidos orgânicos fracos juntamente com o TEOF no lugar de sais metálicos como catalisadores torna a metodologia econômica e ambientalmente correta. Os compostos sintetizados estão apresentados na Tabela 4 (CANTO et al., 2011).



**Figura 7.** Síntese das di-hidro-pirimidinonas (CANTO et al., 2011).



**Tabela 4.** Di-hidro-pirimidinonas sintetizadas a partir do esquema representado na Figura 7.

Produto	Nomenclatura	Ar	X
1a	Monastrol	3-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
1b	LaSOM 60	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	S
1c	LaSOM 64	3,4(-OCH <sub>2</sub> O)-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	S
1d	LaSOM 65	3-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
1e	LaSOM 75	4-NC- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
1f	LaSOM 63	4-(Me) <sub>2</sub> N- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
1g	LaSOM 62	2-F- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	S
2a	LaSOM 66	3-HO-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
2b	LaSOM 70	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub>	O
2c	LaSOM 68	3,4(-OCH <sub>2</sub> O)-C <sub>6</sub> H <sub>3</sub>	O
2d	LaSOM 67	3-O <sub>2</sub> N-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
2e	LaSOM 90	4-NC- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
2f	LaSOM 69	4-(Me) <sub>2</sub> N- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O
2g	LaSOM 71	2-F- C <sub>6</sub> H <sub>4</sub>	O

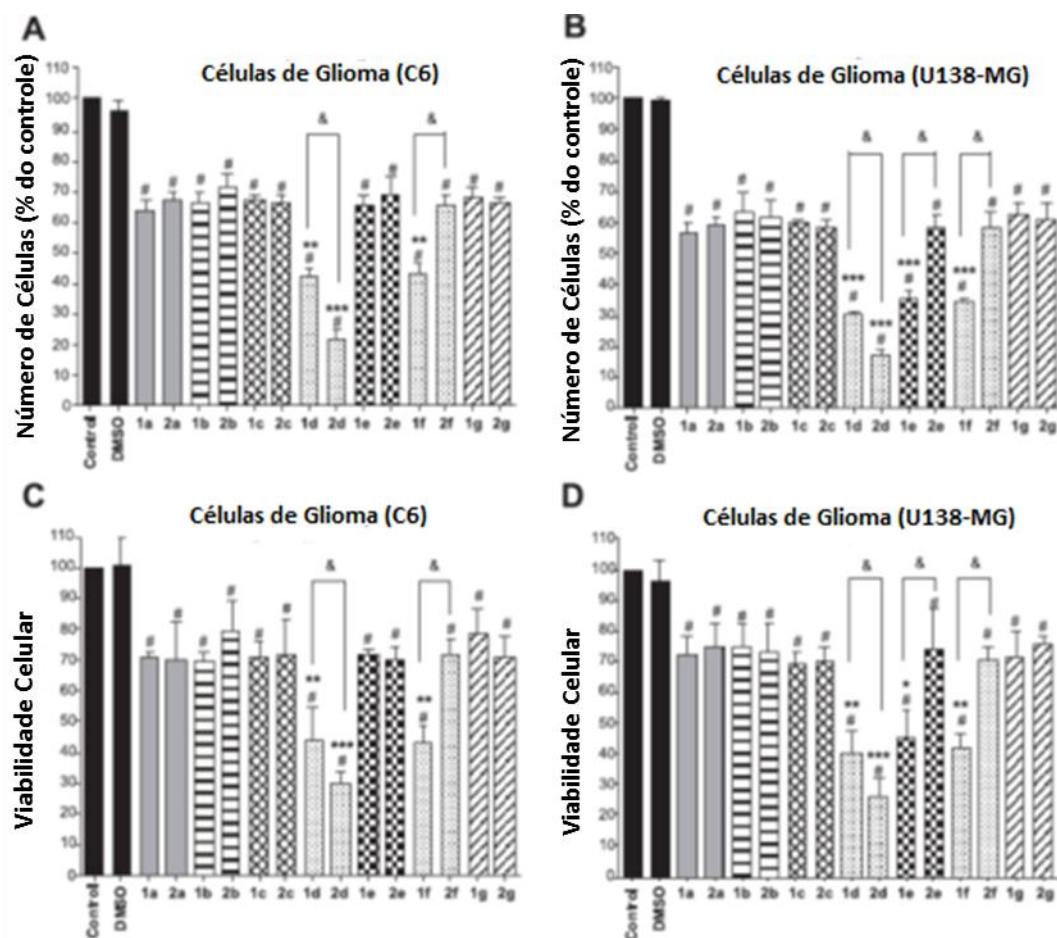
(Adaptado de CANTO et al., 2011).

As moléculas sintetizadas foram testadas para atividade anticancerígena através de ensaios farmacológicos: ensaios de citotoxicidade *in vitro* sobre linhagens tumorais de glioma murino C6 e humano U138-MG; e ensaio *in vivo* no modelo de Sarcoma 180 em camundongos.

Em 2007, Müller e colaboradores demonstraram que análogos do monastrol (enastron, dimetilenastron e vasastrol VS-83) são promissores no tratamento de tumores no sistema nervoso central (SNC), sendo efetivos contra a proliferação de glioblastomas humanos. Gliomas representam 80% dos tumores no SNC em humanos e, apesar dos avanços na medicina o prognóstico desses tumores continua insatisfatório. Gliomas possuem uma alta taxa de proliferação e um comportamento invasivo e infiltrante, o que leva a uma sobrevida dos pacientes de apenas 1 a 2 anos (SCHWARTZBAUM et al., 2006). Assim, a pesquisa e desenvolvimento de fármacos efetivos para o tratamento de gliomas, como tem se demonstrado os análogos do monastrol, são de prioridade iminente.

Para avaliação do potencial antiproliferativo dos compostos, células de glioma murino C6 e humano U138-MG foram tratadas com 150 µmol/L de cada composto por 48 h e seu efeito comparado com o monastrol (composto 1a). Após o tratamento as células foram contadas em hemocitômetro e realizou-se o ensaio de redução do sal tetrazólio (MTT) para verificar a viabilidade celular.

Através do ensaio MTT obtêm-se uma medida quantitativa do número de células com mitocôndrias metabolicamente ativas (CANTO et al., 2011). Os resultados do efeito inibitório dos compostos frente às linhagens celulares estão demonstrados na Figura 8.



**Figura 8.** Efeito do monastrol, e análogos na proliferação celular (A e B) e na viabilidade celular (C e D) nas linhagens celulares de glioma. O número celular e a viabilidade celular estão representados em relação aos respectivos controles. Valores representados como média  $\pm$  DP de três experimentos independentes feitos em duplicata. Dados foram analisados por ANOVA seguidos de uma comparação *post-hoc* (teste de Turkey). # Diferença significativa dos grupos controles e DMSO ( $p < 0,01$ ); \* Diferença significativa do monastrol (1a) ( $p < 0,05$ ); \*\* Diferença significativa do monastrol (1a) ( $p < 0,01$ ); \*\*\* Diferença significativa do monastrol (1a) ( $p < 0,001$ ); & Diferença significativa entre os dois grupos ( $p < 0,01$ ) (Retirado de CANTO et al., 2011).

Todos os compostos testados apresentaram atividade antiproliferativa significativa sobre as linhagens de glioma quando comparados aos grupos controle, incluindo o monastrol (1a), sendo os efeitos mais pronunciados na

linhagem U138-MG. Para as duas linhagens celulares o composto 1d (LaSOM 65) demonstrou ser bastante efetivo, perdendo apenas para seu análogo oxo, tendo uma atividade praticamente duas vezes maior que o monastrol (Figura 8A e 8B). O efeito citotóxico dos compostos foi confirmado pelo ensaio de MTT, o qual apresentou resultados concordantes ao ensaio da contagem celular (Figura 8C e 8D) (CANTO et al., 2011). Para o composto 1d (LaSOM 65), observou-se ao microscópio a formação do fenótipo monoastral monopolar dos microtúbulos cercados por um anel de cromossomos semelhante ao observado para o monastrol. O mesmo não foi observado para o análogo oxo (2d).

O Sarcoma 180 é um tumor sólido o qual histologicamente apresenta-se como massa sólida formada por células com pleomorfismo acentuado, estroma conjuntivo vascularizado circundando e permeando o tumor, sendo originário de camundongos (KURASHIGE e MITSUHASHI, 1982). É um modelo bastante empregado na pesquisa *in vivo* de novos agentes antitumorais, pois grande parte dos quimioterápicos disponíveis na clínica tem atividade limitada contra tumores sólidos devido à capacidade restrita dos fármacos em penetrar no tecido tumoral em concentrações letais (TRÉDAN et al., 2007; WONG et al., 2009). Logo, compostos que apresentem atividade inibitória frente ao modelo de Sarcoma 180 apresentam alto poder citotóxico e com grande poder de penetração em massas sólidas, fator determinante para um candidato a agente antitumoral.

Ensaio *in vivo* no modelo de Sarcoma 180 em camundongos foram realizados com o composto LaSOM 65. Células tumorais ascíticas de Sarcoma 180 com 10 dias ( $5 \cdot 10^6$  células/200  $\mu$ L) foram implantadas pela via subcutânea na região da axila direita dos camundongos experimentais. Um dia após a inoculação, foi iniciado tratamento com 90 mg/kg de LaSOM 65 em solução salina contendo 10% de etanol pela via intraperitoneal (i.p.) em dose única diária por 7 dias. Como controle positivo, foi utilizado o fármaco doxorrubicina (2 mg/kg) sendo este preparado e administrado da mesma forma que o LaSOM 65. Ao controle negativo foi administrado somente o veículo. No 8º dia, os camundongos foram sacrificados e os tumores foram excisados, pesados e fixados com formaldeído 10%. O LaSOM 65 apresentou atividade antitumoral na dose e condições testadas sendo capaz de inibir em mais de 70% o

crescimento do tumor, quando comparado com o controle não tratado (Tabela 4) (CANTO, 2009).

**Tabela 5.** Efeito do LaSOM 65 em camundongos com Sarcoma 180 (CANTO, 2009 modificado).

<b>Tratamento</b>	<b>Dose (mg/kg/dia, i.p.)</b>	<b>Peso do tumor (g)*</b>	<b>Inibição (%)</b>
<b>Controle negativo</b>	-	2,40 ± 0,31	-
<b>LaSOM 65</b>	90	0,58 ± 0,13	76,0
<b>Doxorrubicina</b>	2	0,71 ± 0,12	61,1

\*Média ± DP, n = 8 animais/grupo.

Os resultados dos ensaios farmacológicos *in vitro* e *in vivo* previamente realizado com o LaSOM 65 indicaram ser um compostos de elevado interesse. Desse modo, o avanço nas etapas de investigação pré-clínica desse composto é relevante em face da possibilidade de ser obter um novo protótipo para o tratamento de câncer sólido e câncer de SNC, especialmente glioma.

#### **4. Importância da avaliação farmacocinética e toxicológica pré-clínica no desenvolvimento de novos fármacos**

O desenvolvimento de fármacos para o tratamento de câncer é mais difícil que o desenvolvimento de fármacos para outras finalidades, uma vez que fármacos antitumorais são os agentes mais tóxicos intencionalmente administrados a humanos. O desenvolvimento torna-se ainda mais complexo, pois o primeiro uso desses compostos em humanos é realizado em pacientes não responsivos a outros tratamentos com antitumorais convencionais, os quais já estão bastante debilitados em função da doença e dos tratamentos prévios, diferentemente de outros agentes terapêuticos para os quais a Fase Clínica I é realizada em voluntários saudáveis. Logo, a dose inicial selecionada para o primeiro uso em humanos deve, além de ser segura, oferecer alta probabilidade de eficácia. Na fase pré-clínica do desenvolvimento desses

fármacos é, portanto, considerada essencial a realização de estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, objetivando obter o máximo de informações para posterior realização da Fase Clínica I (NEWHOUSE et al., 2005). Nesse contexto, candidatos a agentes antitumorais devem apresentar resultados consistentes e abrangentes nos estudos pré-clínicos, que permitam predizer com a máxima precisão os efeitos esperados em humanos, uma vez que o risco de óbito dos pacientes no qual é realizada a etapa clínica é muito alto (TOMASZEWSKI et al., 2002).

Problemas farmacocinéticos e toxicológicos eram a principal causa de falha no desenvolvimento de novos fármacos nos anos 1990. Como estas características eram pesquisadas apenas nas fases finais do desenvolvimento de fármacos, geravam altos custos e levavam a reiniciar a procura de um novo agente terapêutico. Neste contexto, evidenciou-se que é necessário que essas duas características sejam estudadas o mais cedo possível durante o processo de descobrimento de um novo fármaco (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003), visando minimizar custos e reduzir o tempo de investigação de novos agentes terapêuticos.

A avaliação farmacocinética pré-clínica permite o estudo do curso temporal do fármaco no organismo, compreendendo os processos de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME). Os parâmetros farmacocinéticos são derivados da medida temporal da concentração do fármaco no sangue ou plasma. O principal objetivo e importância da avaliação dos parâmetros farmacocinéticos é a determinação da posologia e tamanho de dose necessários para a eficácia do futuro tratamento (WATERBEEMD e GIFFORD, 2003).

Testes toxicológicos agudos pré-clínicos permitem o embasamento científico para prever os principais efeitos colaterais e as consequências de uma overdose para posterior escalonamento em humanos (CHAPMAN et al., 2010). O objetivo principal de estudos toxicológicos pré-clínicos é identificar uma dose inicial segura para estudos clínicos de Fase I, o potencial toxicológico do fármaco e a reversibilidade dos efeitos adversos (NEWELL et al., 2004). Em estudo realizado por Newell e colaboradores (2004) dados toxicológicos pré-clínicos em roedores e dados clínicos de Fase I foram

comparados para 14 antitumorais e, com apenas uma exceção, os dados obtidos de roedores foram capazes de prever uma dose inicial segura para os compostos, sendo eficazes em prever em particular os efeitos hematológicos.

Devido aos bons resultados obtidos nos estudos farmacodinâmicos *in vivo* e *in vitro*, e considerando a importância da realização de estudos pré-clínicos farmacocinéticos e toxicológicos para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, o presente trabalho consiste na avaliação pré-clínica do LaSOM 65 visando a investigação dos parâmetros farmacocinéticos do composto bem como sua toxicidade aguda em ratos Wistar.

# **CAPÍTULO 1**

Bioanalytical Method for the Quantification of the Anticancer  
Monastrol Derivative Candidate LaSOM 65 in Pre-Clinical  
Pharmacokinetic Investigation

---

---





**Bioanalytical Method for the Quantification of the Anticancer Monastrol  
Derivative Candidate LaSOM 65 in Pre-Clinical Pharmacokinetic  
Investigation**

Bruna G. S. Torres<sup>a</sup>, Flávia D. T. Uchôa<sup>b</sup>, Rômulo F.S. Canto<sup>a,c</sup>, Allan Crestani<sup>c</sup>,  
Vera Eifler-Lima<sup>a,c</sup> and Teresa D. Costa<sup>\*,a,b</sup>

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

\*Corresponding author current address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga, 2752 - 90610-000 - Porto Alegre, RS - Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5418

Email: teresadc@farmacia.ufrgs.br

Este capítulo aborda o desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE-UV para quantificação do LaSOM em amostras de plasma de ratos Wistar.

Um método simples e sensível por CLAE/UV foi desenvolvido e validado para a determinação do LaSOM 65. O método foi validado de acordo com os guias do *Food and Drug Administration* (FDA, 2001). Utilizou-se nifedipino como padrão interno (PI), coluna e pré-coluna de fase reversa C<sub>18</sub> e eluição isocrática de acetonitrila:água (45:55, v/v) com um fluxo de 0,8 mL/min e detecção em 303 nm. O processamento das amostras constituía-se de precipitação de proteínas com acetonitrila (recuperação superior a 95%) e alíquotas de 50µL do sobrenadante eram injetadas no sistema cromatográfico. As curvas padrão foram lineares ( $r^2 > 0,98$ ) na faixa de concentração de 0,05 a 2 µg/mL e a precisão intra e inter-dia foi superior a 86%. Outros parâmetros como exatidão, limite de quantificação, especificidade e seletividade também foram avaliados. Um estudo de estabilidade do LaSOM 65 em plasma também foi conduzido em diferentes condições temperaturas e formas de armazenamento.

O método foi empregado para a quantificação de LaSOM 65 após a administração i.v. de 1 mg/kg a ratos Wistar machos (n = 3) e mostrou-se adequadamente sensível para caracterizar a fase de eliminação da droga, com uma ASC extrapolada inferior a 20%, indicando adequabilidade para a correta determinação de parâmetros farmacocinéticos em estudos pré-clínicos em roedores.

## **CAPÍTULO 2**

Pre-Clinical Pharmacokinetics and Acute Toxicological  
Evaluation in Rodents of a Monastrol Derivative Anticancer

Candidate LaSOM 65

---



**Pre-Clinical Pharmacokinetics and Acute Toxicological Evaluation in Rodents of a Monastrol Derivative Anticancer Candidate LaSOM 65**

Bruna G. S. Torres<sup>1</sup>, Flávia De Toni Uchôa<sup>2</sup>, Maiara C. Pigatto<sup>1</sup>, Francine J. Azeredo<sup>1</sup>, Sandra E. Haas<sup>1</sup>, Eliane Dallegrove<sup>4</sup>, Rômulo F.S. Canto<sup>1,3</sup>, Vera Eifler-Lima<sup>1,3</sup> and Teresa Dalla Costa<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>2</sup>Centro Bioanalítico de Medicamentos (CBIM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Síntese Orgânica e Medicinal (LaSOM), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>4</sup>Centro de Informação Toxicológica do Rio Grande do Sul (CIT/RS), Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), Secretaria da Saúde, Porto Alegre, RS, Brazil

Corresponding author current address:

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Faculdade de Farmácia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Av. Ipiranga 2752, 90610-000 Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 5418 Fax +55 51 3308 5437

Email: [teresadc@farmacia.ufrgs.br](mailto:teresadc@farmacia.ufrgs.br)

Este capítulo aborda os estudos pré-clínicos de farmacocinética, distribuição tecidual e estudos de toxicidade aguda do LaSOM 65.

O delineamento experimental do estudo farmacocinético foi conduzido a partir de 5 grupos de animais, G1 recebeu 1 mg/kg da droga pela via intravenosa (n = 8), G2 e G3 receberam 10 e 30 mg/kg, respectivamente, pela via oral (n = 6/grupo) e G4 e G5 receberam 30 e 90 mg/kg, respectivamente, pela via intraperitoneal (n = 6/grupo). A distribuição tecidual foi avaliada após a administração de 1 mg/kg i.v. *bolus*. O estudo de toxicidade aguda foi avaliado após administrações intravenosas (1, 2,5 e 5 mg/kg) e orais (50, 100 and 150 mg/kg), tendo dois grupos controles, salina e veículo.

Após a administração intravenosa, LaSOM 65 apresentou uma meia-vida curta ( $1,75 \pm 0,71$  h), depuração elevada ( $0,85 \pm 0,18$  L/h/kg) e um volume de distribuição moderado ( $1,76 \pm 0,24$  L/kg). A biodisponibilidade absoluta do LaSOM 65 foi elevada, sendo maior para a via i.p. (73 e 61%) do que para a via p.o. (58 e 50%). O composto apresentou farmacocinética linear na faixa de doses de 1 a 30 mg/kg ( i.v., p.o. e i.p), apresentando desvio de linearidade apenas na maior dose administrada, 90 mg/kg i.p., onde observou-se um aumento do volume de distribuição e da meia-vida.

Devido ao seu caráter lipofílico, o fármaco tem elevada penetração nos pulmões e tecido adiposo com fatores de penetração tecidual de 2,7 e 1,4, respectivamente. Os outros tecidos investigados apresentam fatores de penetração tecidual menores e semelhantes entre si.

No estudo de toxicidade aguda, sintomas clínicos adversos como diarreia, piloereção, letargia e dispnéia foram observados apenas após as administrações intravenosas e regrediram 3 horas após a administração. Nenhuma diferença significativa dos controles foi encontrada para as análises bioquímicas e hematológicas (ALT, AST, uréia, creatinina, fosfatase alcalina, hemoglobina, leucócitos e plaquetas) massa corporal e peso relativos dos órgão, indicando provável ausência de efeitos tóxicos agudos.

LaSOM 65 apresentou boas características farmacocinéticas e ausência de efeitos toxicológicos agudos, indicando que é um candidato a antitumoral promissor.

## **DISCUSSÃO GERAL**

---





O desenvolvimento de novos fármacos antitumorais é diferenciado do desenvolvimento de novos fármacos de outras classes terapêuticas. Geralmente, fármacos utilizados no tratamento do câncer possuem elevada citotoxicidade uma vez que visam à morte das células cancerígenas. Desse modo, esses compostos estão associados a sérios efeitos colaterais, pois são, na sua maioria, inespecíficos, agindo em células saudáveis e cancerosas. Nesse contexto, o principal desafio da terapia antitumoral encontra-se na descoberta de fármacos que, além de possuírem elevada potência, possuam grande seletividade para as células cancerígenas, aumentando a segurança de seu uso.

O desenvolvimento desses agentes terapêuticos torna-se ainda mais complexo quando aliado ao fato que os estudos de Fase Clínica I são realizados em pacientes irresponsivos aos tratamentos convencionais. Logo, diferentemente de outras classes terapêuticas no qual o primeiro uso em humanos é realizado em voluntários sadios, anticancerígenos são primeiramente testados em pacientes, os quais se encontram debilitados.

Neste contexto, este trabalho objetivou realizar a avaliação pré-clínica da farmacocinética e da toxicologia aguda de um candidato a antitumoral, o LaSOM 65, visando contribuir para o desenvolvimento dessa nova entidade química (NEC). O LaSOM 65 mostrou-se uma molécula promissora após análise de uma biblioteca de 13 novos compostos análogos do monastrol. O composto apresentou elevada citotoxicidade *in vitro* contra linhagens celulares de glioma murino e humano além de excelente atividade anticancerígena em modelo *in vivo* de tumor sólido de roedores (CANTO, 2009; CANTO et al., 2011).

Visando atingir o objetivo geral do trabalho, primeiramente foi desenvolvida e validada metodologia analítica por CL-UV para a quantificação de LaSOM 65 em plasma de ratos para posterior utilização na avaliação farmacocinética da NEC. O método desenvolvido envolveu a precipitação de proteína com acetonitrila e quantificação do LaSOM 65 utilizando nifedipino como padrão interno. O mesmo demonstrou-se preciso, linear, específico e possuir sensibilidade adequada para a quantificação do composto, permitindo uma confiável determinação dos parâmetros farmacocinéticos.

De posse do método analítico foi possível iniciar a avaliação farmacocinética pré-clínica do composto. LaSOM 65 foi administrado na dose de 1 mg/kg i.v. *bolus*, 10 e 30 mg/kg p.o. e 30 e 90 mg/kg i.p. As doses e vias de administração foram escolhidas com base nos estudos de farmacodinâmica. A via i.v. é fundamental para avaliação da biodisponibilidade da NEC. Como não havia referência de dose para essa via, optou-se por trabalhar com uma dose segura, dez vezes menor que a menor dose utilizada na via oral.

O perfil farmacocinético do LaSOM 65 após administração i.v. foi adequadamente descrito pelo modelo de 2 compartimentos, possuindo uma rápida fase de distribuição ( $\alpha = 7,7 \pm 4,7 \text{ h}^{-1}$ ) seguida de uma eliminação mais lenta ( $\beta = 0,44 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$ ). Após dose i.v. o  $CL_{\text{tot}}$  foi de  $0,85 \pm 0,18 \text{ L/h/kg}$ , o  $V_d$  de  $1,76 \pm 0,24 \text{ L/kg}$  e o  $t_{1/2}$  de  $1,75 \pm 0,71 \text{ h}$ .

O modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem e fase-*lag* melhor descreveu os perfis plasmáticos do LaSOM 65 após a administração das duas doses orais. Para as administrações i.p. o modelo que melhor descreveu os dados foi o modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem. A escolha de diferentes doses e diferentes vias de administração possibilitou determinar que a farmacocinética do LaSOM 65 é linear para as doses de 1 a 30 mg/kg. Para estas doses e vias,  $k_e$ ,  $CL_{\text{tot}}$  e  $V_d$  foram semelhantes entre si e estatisticamente semelhantes aos parâmetros determinados pela via i.v. Para a maior dose administrada, 90 mg/kg i.p., observou-se um aumento significativo no  $t_{1/2}$  ( $2,94 \pm 0,85 \text{ h}$ ) em comparação com a dose i.v. devido a uma redução na  $k_e$  ( $0,25 \pm 0,07 \text{ h}^{-1}$ ) gerada pelo aumento significativo do  $V_d$  ( $3,19 \pm 0,81 \text{ L/kg}$ ). O  $CL_{\text{tot}}$  ( $0,77 \pm 0,17 \text{ L/h/Kg}$ ), entretanto, não foi alterado.

A biodisponibilidade absoluta do LaSOM 65 foi elevada, sendo maior para a via i.p. (73 e 61%) do que para a via p.o. (58 e 50%). As constantes de velocidade de absorção ( $k_a$ ) calculadas após as administrações orais foram estatisticamente similares ( $0,43 \pm 0,06 \text{ h}^{-1}$  e  $0,36 \pm 0,03 \text{ h}^{-1}$  para as doses de 10 mg/kg e 30 mg/kg, respectivamente). Porém, após as administrações intraperitoneais, observou-se uma diferença estatística no valor de  $k_a$  que foi maior para a dose de 30 mg/kg ( $0,69 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$ ) do que para a dose de 90 mg/kg ( $0,3 \pm 0,09 \text{ h}^{-1}$ ). Essa diminuição no  $k_a$  para a maior dose pode ser

devida à saturação do processo de absorção, o que contribuiu para a não-linearidade farmacocinética dessa dose em relação às menores doses investigadas. A maior biodisponibilidade e a maior constante de velocidade de absorção apresentada pela via i.p. reflete as características dessa via de administração, como menor efeito de primeira passagem.

A penetração tecidual do LaSOM 65 após administração i.v. de 1 mg/kg também foi avaliada em diferentes tecidos (baço, cérebro, coração, fígado, rins, pulmões e tecido adiposo), uma vez que elevada penetração tecidual é fundamental para a ação de antitumorais. O composto apresentou rápida e ampla distribuições para os tecidos, o que corrobora com a escolha de modelo de 2 compartimentos para descrever os dados da administração i.v. Os pulmões apresentaram a maior exposição ao LaSOM 65 ( $ASC_{0-t} = 6,37 \mu\text{g.h/g}$ ) seguido pelo tecido adiposo ( $ASC_{0-t} = 68,7 \mu\text{g.h/g}$ ) e pelos rins ( $ASC_{0-t} = 0,91 \mu\text{g.h/g}$ ). O LaSOM 65 é uma molécula com características lipofílicas ( $\text{Log } P = 2,93$ ) o que justificaria sua alta penetração pulmonar e no tecido adiposo.

O menor pico de concentração ( $C_{\text{max}} = 0,24 \mu\text{g/g}$ ) bem como a menor exposição foi observado para o cérebro ( $ASC_{0-t} = 0,35 \mu\text{g.h/g}$ ). A baixa penetração cerebral apresentada pelo composto pode ser explicada pela dificuldade que compostos xenobióticos tem em atravessar a barreira hematoencefálica. Por possuir elevada citotoxicidade frente a linhagens celulares de glioma, a baixa penetração cerebral do LaSOM 65 pode vir a representar um problema, caso o candidato a fármaco venha a ser desenvolvido para o tratamento de gliomas. Kaiser e colaboradores (2010) demonstraram um aumento na taxa de penetração cerebral de um candidato a anticonvulsivante (benzaldeído semicarbazona) quando complexado em  $\beta$ -ciclodextrinas. Um aumento na penetração cerebral também foi observado para o ácido valpróico, quando associado a nanocápsulas revestidas com quitosana (FREDDO, 2009). Desse modo, o desenvolvimento farmacotécnico como a inclusão em ciclodextrinas ou a utilização de nanocarreadores, podem ser alternativas para contornar o problema observado.

O ensaio de avaliação da toxicidade aguda (14 dias) do LaSOM 65 foi realizado após administrações únicas de 1, 2,5 e 5 mg/kg pela via i.v. e 50, 100 e 150 mg/kg pela via p.o. Através de uma observação clínica detalhada,

sintomas adversos como diarreia, piloereção, letargia e dispnéia foram constatados após administração i.v. do candidato a antitumoral. Os sintomas persistiram por 3 horas após a administração, regredindo e não sendo mais observados durante o restante do experimento. Para as administrações orais não foram observados sinais clínicos de toxicidade. Em função do resultado da boa biodisponibilidade do LaSOM 65 sugere-se que os efeitos adversos observados pela via i.v. e não observados para a via oral, são advindos do “efeito *bolus*”, uma vez que elevadas concentrações plasmáticas são atingidas em um curto espaço de tempo após a administração pela via i.v. O baixo  $t_{1/2}$  apresentado pelo LaSOM 65 após administração i.v. (1,75 h) justifica a regressão dos sintomas em apenas 3 horas. Alterações no peso corporal, ganho de peso, massa relativa dos tecidos e análises bioquímicas não apresentaram diferenças estatísticas quando comparadas aos grupos controle (veículo e salina). Porém, é necessário ampliar a investigação para a realização de análises histopatológicas, por exemplo, para confirmar a ausência de toxicidade aguda para tecidos como fígado e rins, uma vez que os biomarcadores como ALT e AST, uréia e creatinina, apresentaram diferenças estatísticas entre o mesmo grupo nos dias analisados.

O conjunto de resultados da investigação pré-clínica do LaSOM 65 demonstrou que o composto possui características farmacocinéticas e toxicológicas interessantes, devendo sua investigação ser continuada, principalmente visando seu uso pela via oral (boa biodisponibilidade e possível ausência de toxicidade). Além disso, testes em outras linhagens celulares cancerígenas, principalmente linhagens de tumor pulmonar, devem ser investigadas, devido à afinidade do composto por esse tecido.

**CONCLUSÕES**

---

---



- Método analítico para determinação de LaSOM 65 em amostras de plasma e tecido de ratos foi desenvolvido e validado. O mesmo mostrou-se linear, exato, preciso, específico e sensível, sendo adequado para determinação dos perfis plasmáticos e teciduais do composto após diferentes doses e vias de administração.
- O perfil farmacocinético plasmático do LaSOM 65 após administração i.v. *bolus* de 1 mg/kg foi adequadamente descrito pelo modelo aberto de 2 compartimentos. O modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem e fase-*lag* foi capaz de descrever as administrações orais (10 e 30 mg/kg) e o modelo de 1 compartimento com absorção de primeira ordem melhor descreveu as administrações intraperitoneais (30 e 90 mg/kg).
- LaSOM 65 apresentou farmacocinética linear na faixa de doses de 1 a 30 mg/kg ( i.v., p.o. e i.p).
- A dose de 90 mg/kg i.p. de LaSOM 65 apresentou desvio da linearidade farmacocinética, com elevação do volume de distribuição e da meia-vida.
- O composto apresentou elevada biodisponibilidade absoluta após as administrações orais (50 e 58%) e intraperitoneais (60 e 73%).
- A fração do LaSOM 65 ligada as proteínas plasmáticas é de  $84,7 \pm 1,6\%$ , sendo a ligação concentração independente na faixa investigada (0.4 – 8  $\mu\text{g/mL}$ ).
- Devido ao seu caráter lipofílico, o fármaco tem elevada penetração nos pulmões e tecido adiposo e sua distribuição tecidual ocorre de forma rápida e ampla.
- Após administração única intravenosa de 1, 2,5 e 5 mg/kg do LaSOM 65, sinais clínicos adversos (piloereção, diarreia, letargia e dispneia) foram observados até 3 h após a administração. Para as administrações orais

(50, 100 e 150 mg/kg), estes sintomas adversos não foram evidenciados.



## REFERÊNCIAS

---

---



ALEY, K.O.; REICHLING, D.B.; LEVINE, J.D. Vincristine hyperalgesia in the rat: a model of painful vincristine neuropathy in humans. *Neuroscience*, v. 73, n. 1, p. 259-265, 1996.

ALMEIDA, V.L. et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Química Nova*, v. 28, p. 118-129, 2005.

ARORA, A. and SHUKLA, Y. Modulation of vinca-alkaloid induced P-glycoprotein expression by indole-3-carbinol. *Cancer Letters*, v. 189, p. 167–173, 2003.

ATTARD, G. et al. Update on tubulin-binding agentes. *Pathologie Biologie*, v. 54, p.72–84, 2006.

AVENDANO, C. and MENENDEZ, C. Anticancer Drugs Targeting Tubulin and Microtubules. In: *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*. Elsevier Science, cap.8, p. 229-249, 2008.

BAGULEY, B. C. and KERR, D.J. Anticancer drug development. San Diego: Academic Press, 2002.

BELIZÁRIO, J. E. O próximo desafio: Reverter o Câncer. *Ciência Hoje*, v. 31, p. 50-57, 2002.

BURGER, A. M. and FIEBIG, H. H. Preclinical screening for new anticancer agents. In: FIGG, W. D. and MCLEOD, H. L., *Handbook of Anticancer Pharmacokinetics and Pharmacodynamic*. Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2004.

BURKHART, C.A.; KAVALLARIS, M.; HORWITZ, S.B. The role of  $\beta$ -tubulin isotypes in resistance to antimetabolic drugs. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1471, p. O1-O9, 2001.

CANTO, R.F.S. et al. Synthesis of dihydropyrimidin-2-one/thione library and cytotoxic activity against the human U138-MG and rat C glioma cell lines. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 1379-1388, 2011.

CANTO, R.F.S. Síntese de diidropirimidinonas análogas ao Monastrol e avaliação pré-clínica do LaSOM 65. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Farmácia/UFRGS. Porto Alegre, 2009.

CASSIMERIS, L., SPITTLE, C. Regulation of microtubule-associated proteins. *Internacional Review of Cytology*, v. 210, p. 163–226, 2001.

CHAPMAN, K. et al. The value of acute toxicity studies to support the clinical management of overdose and poisoning: A cross-discipline consensus. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 58, p. 354–359, 2010.

FREDDO, R.J. Estudos Para Obtenção E Caracterização De Sistemas Nanoparticulados Contendo Ácido Valpróico E Avaliação Da Penetração Deste Pela Barreira Hematoencefálica Por Microdiálise. (Tese de Doutorado), Faculdade de Farmácia/UFRGS. Porto Alegre, 2009.

GANGJEE, A. et al. 2-Amino-4-methyl-5-phenylethyl substituted-7-N-benzyl-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as novel antitumor antimitotic agents that also reverse tumor resistance. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, v.19, p. 4355-4365, 2011.

GARÓFOLO, A. et al. Diet and cancer: an epidemiological view. *Revista de Nutrição*, v. 17, n. 4, 2004.

GOOD, J. A. D.; SKOUFIAS, D. A.; KOZIELSKI, F. Elucidating the functionality of kinesins: An overview of small molecule inhibitors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 22, p. 935– 945, 2011.

GOODMAN AND GILMAN'S. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 10. Ed., McGraw-Hill, 2003.

HAIT, W. N. et al. Tubulin targeting agents. *Update on Cancer Therapeutics*, v. 2, p. 1–18, 2007.

HUSZAR, D. et al. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. *Cancer Metastasis Reviews*, v.28, p. 197–208, 2009.

INCA, Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2012: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro, 2011.

KIRSCH-VOLDERS, M. and PARRY, E.M. Genetic toxicology of mitotic spindle inhibitors used as anticancer drugs. *Mutation Research*, v. 355, p. 103-128, 1996.

KURASHIGE, S.; MITSUHASHI, S. Macrophage activities in sarcoma 180 bearing mice and EL4 bearing mice. *Gann Japanese Journal of Cancer Research*, v. 73, p.85-90, 1982.

MALIGA, Z.; KAPOOR, T. M.; MITCHISON, T. J. Evidence that Monastrol Is an Allosteric Inhibitor of the Mitotic Kinesin Eg5. *Chemistry & Biology*, v. 9, p. 989–996, 2002.

MAYER, T.U. et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*, v. 286, p.971-974, 1999.

MENDONÇA, L.M. Avaliação genotóxica e antigenotóxica da curcumina contra a toxicidade induzida pela cisplatina em culturas de células PC12. (Dissertação de Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Ribeirão Preto, 2008.

MIKI, H.; OKADA, Y.; HIROKAWA, N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. *Trends in Cell Biology*, v.15, n.9, 2005.

MÜLLER, C. et al. Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, v. 59, p.157-164, 2007.

NEWELL, D.R. et al. The Cancer Research UK experience of pre-clinical toxicology studies to support early clinical trials with novel cancer therapies. *European Journal of Cancer*, v.40, p. 899–906, 2004.

NEWHOUSE, J.P. et al. Federal agency roles in cancer drug development from preclinical research to new drug approval. Washington: National Academic Press, 2005.

NUSSBAUMER, S. et al. Analysis of anticancer drugs: A review. *Talanta*, v.85, p. 2265– 2289, 2011.

O'MARCAIGH, A.S. and BETCHER, D.L. The Vinca Alkaloids. *Journal of Pediatric Oncology Nursing*, v. 12, n. 3, p. 140-142, 1995.

PETERS, T. et al. Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 372, p. 291–299, 2006.

RUSSOWSKY, D. et al. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorganic Chemistry*, v.34, p. 173-182, 2006.

SCHMIDT, M. and BASTIANS, H. Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resistance Updates*, v.10, p. 162-181, 2007.

SCHWARTZBAUM, J. A. et al. Epidemiology and molecular pathology of glioma. *Nature Clinical Practice Neurology*, v. 2, p.494–503, 2006.

SONDHI, S.M. et al. Synthesis, anti-inflammatory and anticancer activity evaluation of some novel acridine derivatives. *European Journal Medicinal Chemistry*, v. 45 p. 555–556, 2010.

TOMASZEWSKI, J.E; et al. Relevance of preclinical pharmacology and toxicology to Phase I trial extrapolation techniques: Relevance of animal toxicology. In: BAGULEY, B. C.KERR, D.J. *Anticancer drug development*. San Diego: Academic Press, 2002.

TONANI, M. Risco de câncer e comportamentos preventivos: A persuasão como estratégia de intervenção. (Dissertação de Mestrado), Escola de Enfermagem de Riberão Preto/USP. Riberão Preto, 2007.

TRÉDAN, O. et al., Drug Resistance and the Solid Tumor Microenvironment. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, p. 1441–54, 2007.

TRUDEAU, M.E. Docetaxel: a review of its pharmacology and clinical activity. *Canadian Journal of Oncology*, v. 6, p. 443–457, 1996.

VALENTINE, M.T. and GILBERT, S.P. To step or not to step? How biochemistry and mechanics influence processivity in Kinesin and Eg5. *Current Opinion in Cell Biology*, v. 19, p. 75–81, 2007.

WANTERBEEMD, H. and GIFFORD, E. ADMET *in silico* modeling: towards prediction paradise?. *Nature publishing group*, v.2, 2003.

WHO, World Health Organization, Cancer Report, 2008.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. The World Health Organization's fight against cancer: Strategies that prevent, cure and care. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, Geneva, 2007.

WONG, H. L.; XIAO, Y. W; BENDAYAN, R. Multidrug Resistance in Solid Tumor and Its Reversal. In: LU, Y.; MAHATO, R.I. (eds.), *Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*, Springer New York, 2009.

ZHOU, J., GIANNAKAKOU, P. Targeting microtubules for cancer chemotherapy. *Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents*, v. 5, p. 65–71, 2005.





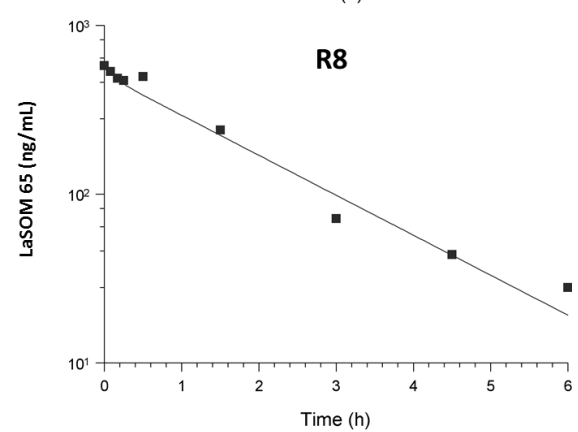
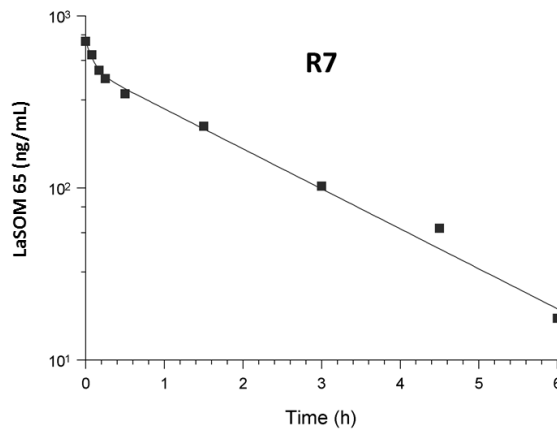
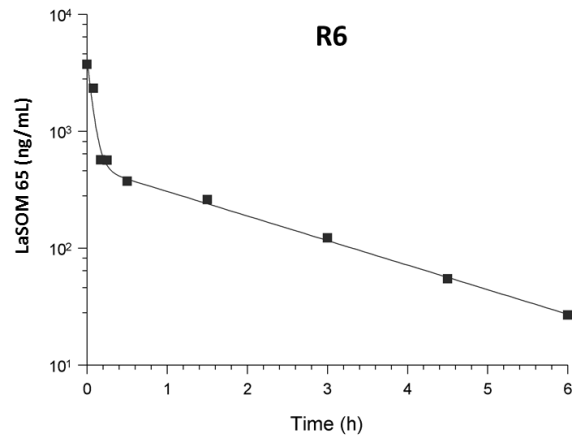
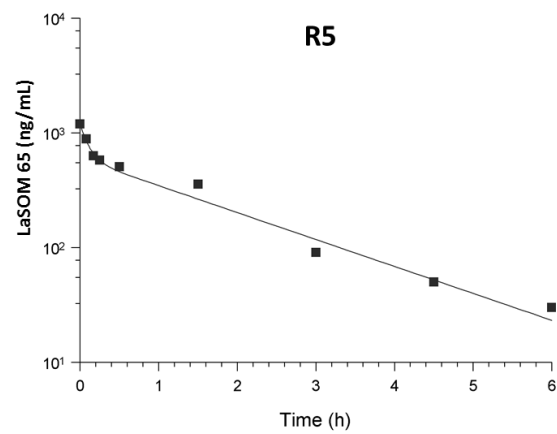
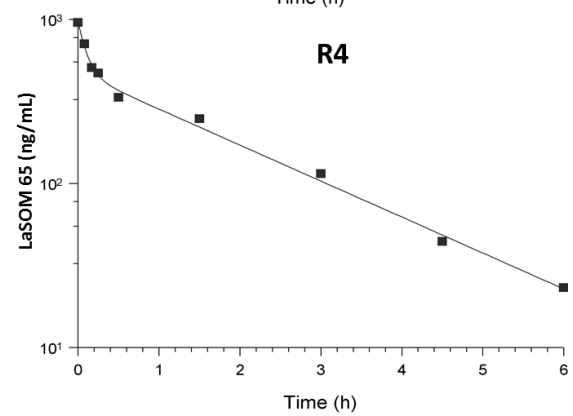
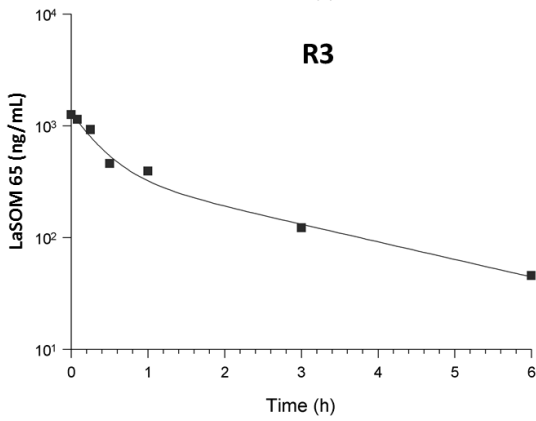
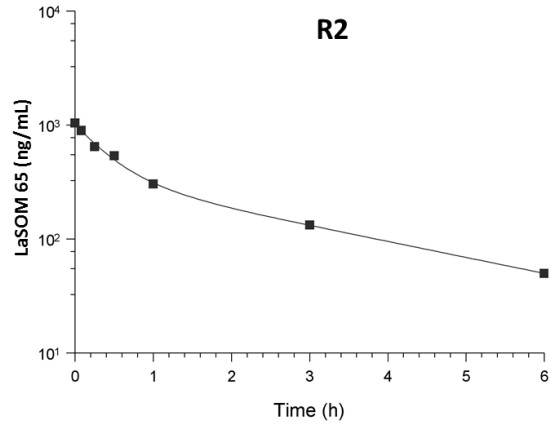
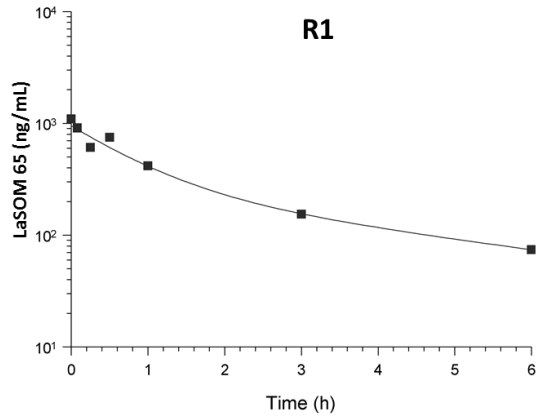
**ANEXOS**

---

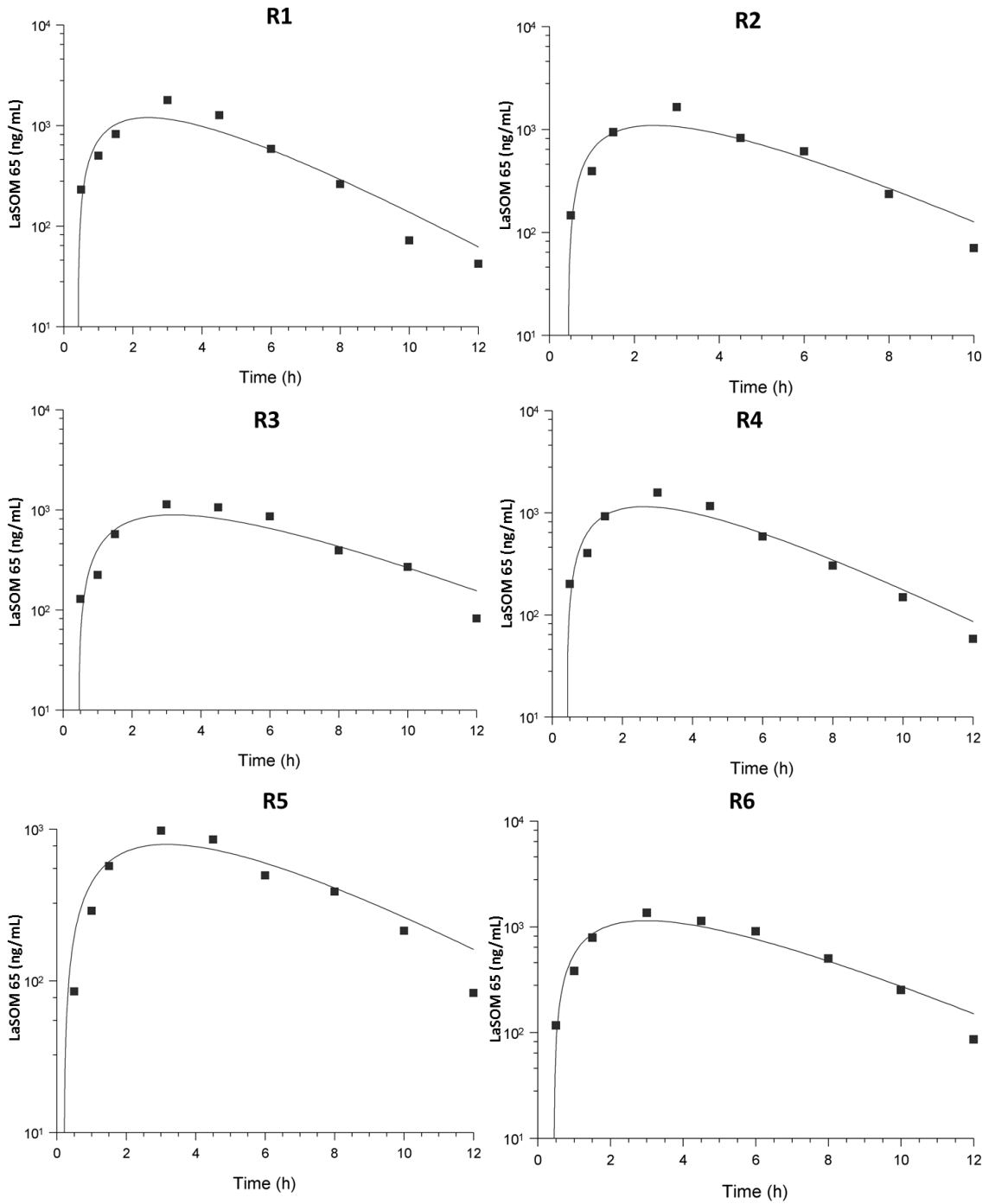
---



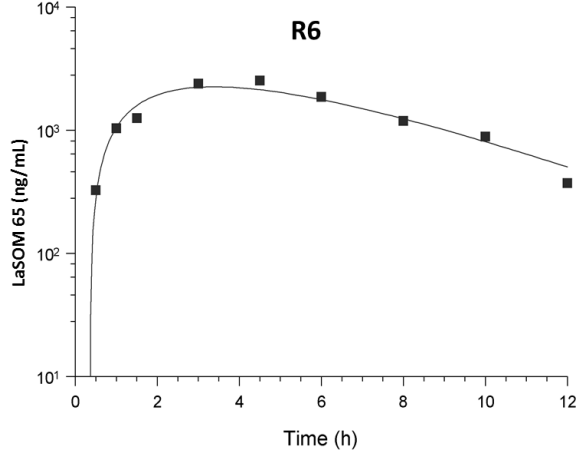
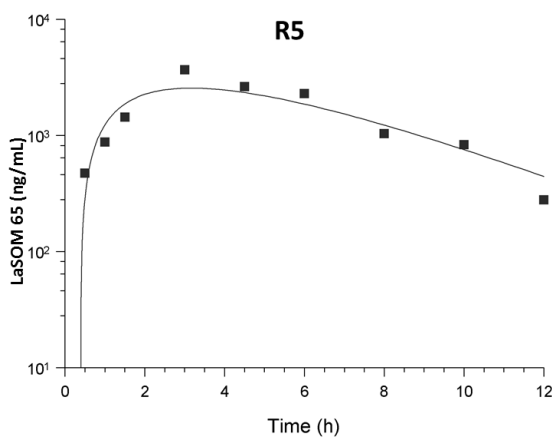
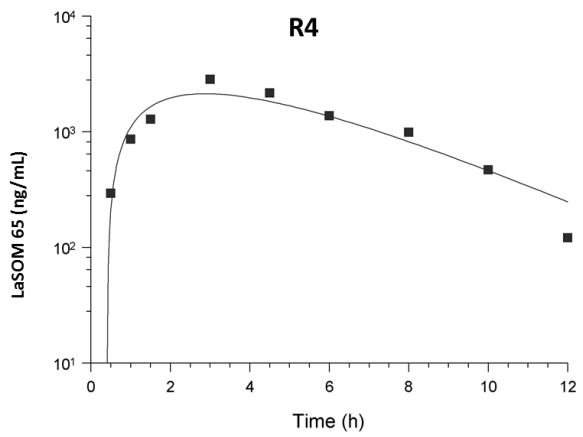
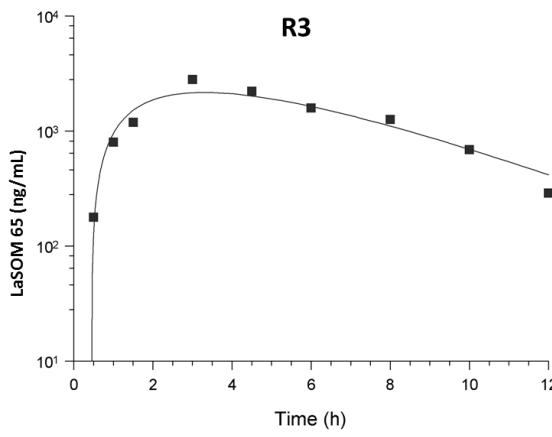
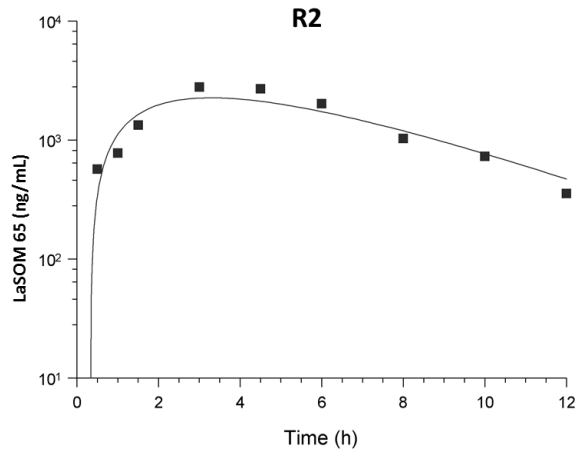
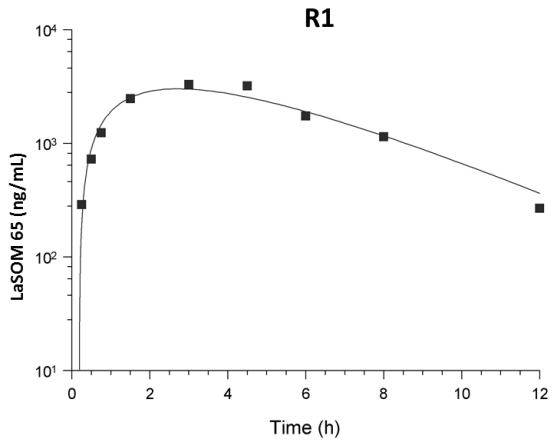
## ANEXO I – Perfis individuais após LaSOM 65 1 mg/kg i.v. *bolus*



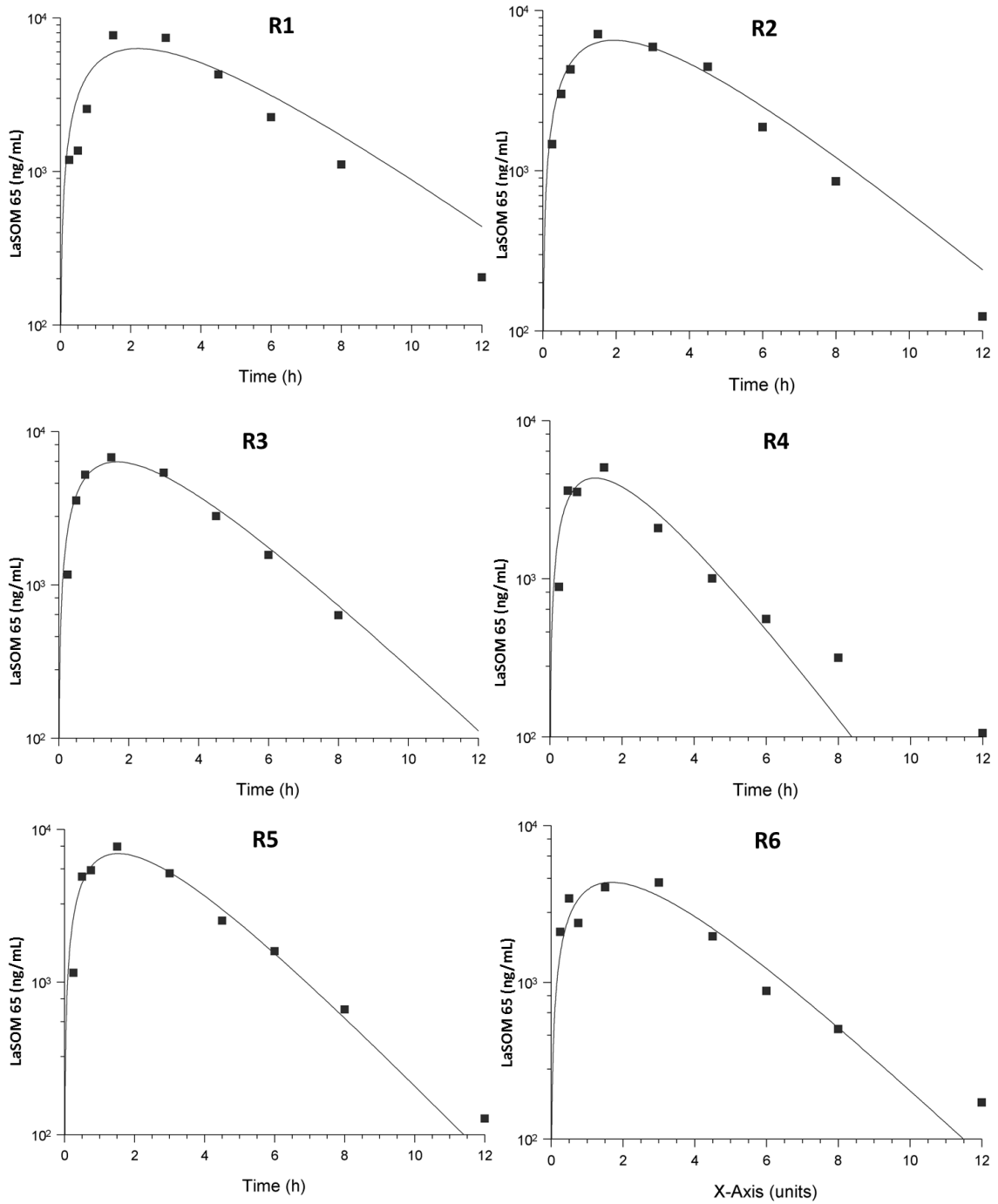
## ANEXO II - Perfis individuais após LaSOM 65 10mg/kg oral



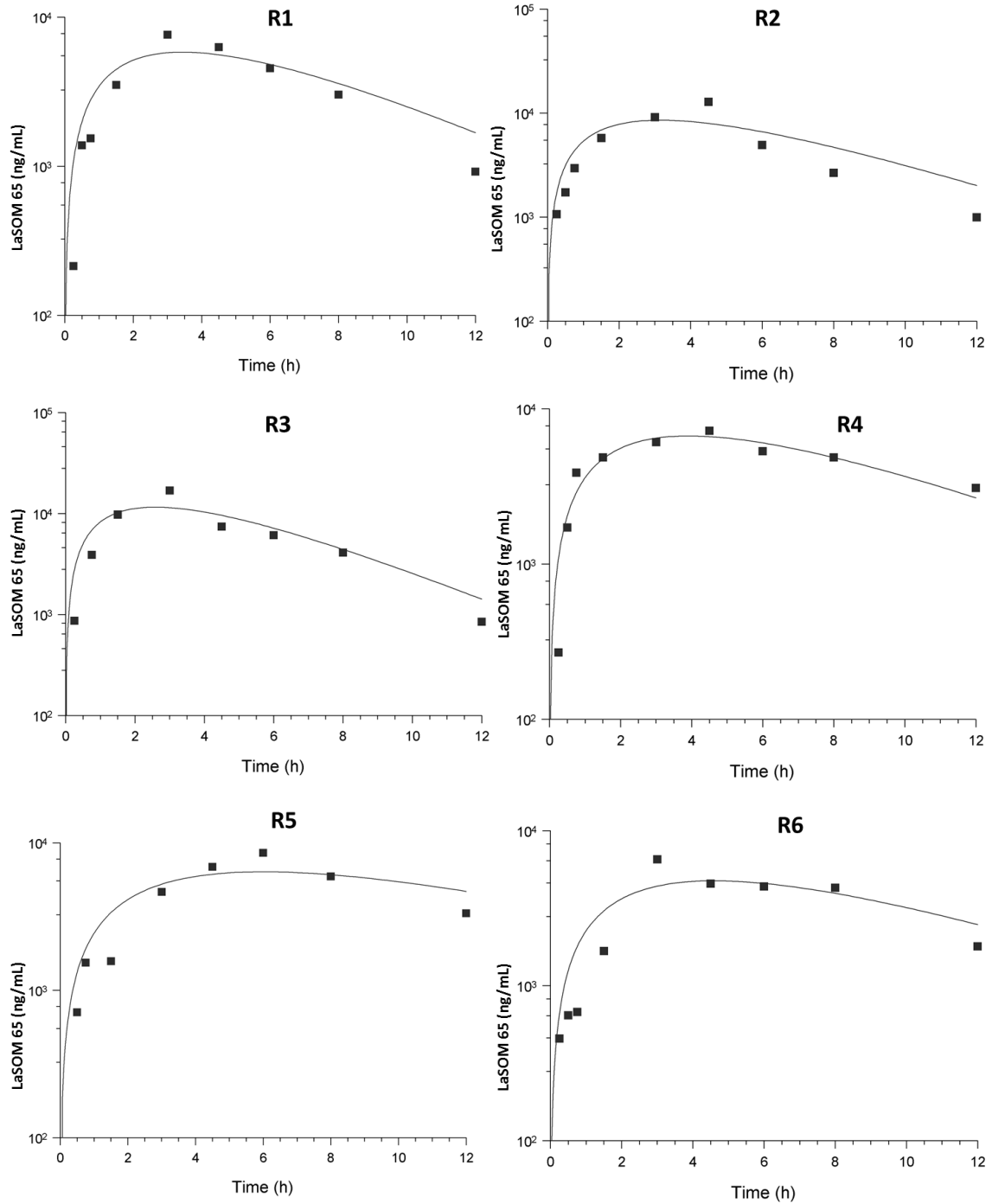
### ANEXO III - Perfis individuais após LaSOM 65 30mg/kg oral



## ANEXO IV - Perfis individuais após LaSOM 65 30mg/kg intraperitoneal



## ANEXO V - Perfis individuais após LaSOM 65 90mg/kg intraperitoneal



## ANEXO VI

Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
CARTA DE APROVAÇÃO

pro-pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

**Número :** 2008196

**Título :** Avaliação Farmacocinética Pré-clínica do Candidato a Fármaco Antitumoral LASOM 65

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA	PESQ RESPONSÁVEL	dalla.costa@ufrgs.br	33085218
FLAVIA DE TONI UCHÔA	PESQUISADOR	flaviadetoni@yahoo.com.br	
VERA LUCIA EIFLER LIMA	PESQUISADOR	eifler@farmacia.ufrgs.br	33085108

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 61 , ata nº 141 , de 3/12/2009 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, sexta-feira, 4 de dezembro de 2009

  
JOSE ARTUR BOGO CHIES  
Coordenador do CEP-UFRGS



## ANEXO VII

Autorização para uso de figuras de revista da Editora Springer

### SPRINGER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 16, 2012

---

---

This is a License Agreement between Bruna Torres ("You") and Springer ("Springer") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Springer, and the payment terms and conditions.

**All payments must be made in full to CCC. For payment instructions, please see information listed at the bottom of this form.**

License Number	2850871022852
License date	Feb 16, 2012
Licensed content publisher	Springer
Licensed content publication	Cancer and Metastasis Reviews
Licensed content title	Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy
Licensed content author	Dennis Huszar
Licensed content date	Jun 1, 2009
Volume number	28
Issue number	1
Type of Use	Thesis/Dissertation
Portion	Figures
Author of this Springer article	No
Order reference number	
Title of your thesis / dissertation	Avaliação Farmacocinética e Toxicológica Pré-clínica do Candidato a FÁRMACO Antitumoral LaSOM 65
Expected completion date	Mar 2012
Estimated size(pages)	90
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

**If you would like to pay for this license now, please remit this license along with your payment made payable to "COPYRIGHT CLEARANCE CENTER" otherwise you will be invoiced within 48 hours of the license date. Payment should be in the form of a check or money order referencing your account number and this invoice number RLNK500720974.**

**Once you receive your invoice for this order, you may pay your invoice by credit card. Please follow instructions provided at that time.**

**Make Payment To:  
Copyright Clearance Center  
Dept 001  
P.O. Box 843006  
Boston, MA 02284-3006**

**For suggestions or comments regarding this order, contact RightsLink Customer Support: [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-877-622-5543 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.**

**Gratis licenses (referencing \$0 in the Total field) are free. Please retain this printable license for your reference. No payment is required.**

## ANEXO VIII

Autorização para uso de figuras da revista Sociedade Brasileira de Química.



### AUTORIZAÇÃO

Por este instrumento de autorização para utilização de artigo, a **SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA – SBQ** dá permissão à **Bruna Torres**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), para a reprodução da figura a seguir, cujo *copyright* é detido pela Sociedade.

**Artigo:** Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução.

**Autores:** Vera Lúcia de Almeida, Andrei Leitão, Luisa del Carmen Barrett Reina, Carlos Alberto Montanari, Claudio Luis Donnici e Miriam Teresa Paz Lopes.

**Revista:** *Quim. Nova* **2005**, 28, 118.

**Figura:** 5b – página 121.

A autorização de reprodução da figura acima explicitada é dada pela SBQ à Bruna Torres, para reprodução na revisão bibliográfica da sua Dissertação de Mestrado.

A autora se compromete a colocar em destaque o crédito: Reproduzido de Química Nova, vol.28, n° 1, 118-129, **2005** sob permissão da <sup>®</sup>Sociedade Brasileira de Química.

São Paulo, 24 de fevereiro de 2012

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Dirce Maria F. Campos".

Dirce Maria F. Campos  
Sociedade Brasileira de Química

## ANEXO IX

Carta de aprovação do Adendo a Projeto de Pesquisa no  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS.



### PRÓ-REITORIA DE PESQUISA COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFRGS

#### PROJETO DE PESQUISA/ADENDO

**Título:** Avaliação Farmacocinética Pré-clínica do Candidato a Fármaco Antitumoral LASOM 65

Nº: 17453

**Pesquisador Responsável:** TERESA CRISTINA TAVARES DALLA COSTA

#### PARECER

É um adendo ao projeto intitulado "Avaliação Farmacocinética pré-clínica do candidato a fármaco antitumoral LASOM65". Pesquisador Responsável: Teresa Cristina Tavares Dalla Costa. Este projeto tem cadastro no CEP-UFRGS: 2008196 e obteve parecer de aprovação em 20.10.2009.

O projeto original tinha por objetivo realizar a avaliação farmacocinética pré-clínica em roedores (ratos Wistar) do candidato a fármaco antitumoral LASOM65. De acordo com os autores, esta avaliação foi realizada e indicou que o composto possui perfil farmacocinético adequado para prosseguir para estudos mais aprofundados de farmacodinâmica. Assim, o presente adendo prevê a avaliação toxicológica do LASOM65, para a determinação da toxicidade deste composto.

A introdução e o item de metodologia contemplam os diferentes assuntos necessários para a compreensão do projeto. O tamanho da amostra, estimado em 5 animais/grupo experimental totalizando 40 animais, está baseado nas guias de avaliação de produtos químicos propostos pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*). Os procedimentos de manipulação animal, eutanásia e descarte de material biológico, além de gerenciamento de resíduos químicos, estão descritos e adequados. O cronograma e orçamento estão adequados.

Desta forma, considera-se que o projeto encontra-se adequado em relação aos aspectos éticos e recomenda-se sua aprovação.

Porto Alegre, 20 de março de 2012