

GABRIELA CRISTINA SEGAT

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA E
ANTITUMORAL DE ACETOHIIDROXAMATOS SINTÉTICOS
EM MODELOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

Dissertação submetida ao Programa de Pós
Graduação em Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para obtenção do grau
de mestre em Farmacologia. Orientador: Prof. Dr.
João Batista Calixto.

FLORIANÓPOLIS
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de
Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Segat, Gabriela Cristina

Avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de
acetohidroxamatos sintéticos em modelos in vitro e in vivo
/ Gabriela Cristina Segat ; orientador, João Batista
Calixto - Florianópolis, SC, 2017.

117 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Oncologia. 3. Ensaio não-clínicos.
4. Acetohidroxamatos. I. Calixto, João Batista. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Aos meus pais, Roseli e Altamir, pelo apoio incondicional durante minha constante busca por conhecimento.

AGRADECIMENTOS

À minha querida família, especialmente aos meus pais Roseli e Altamir, que sempre me apoiaram e incentivaram a atingir com êxito meus objetivos.

Ao meu orientador, João Batista Calixto, por acreditar no meu potencial desde minha iniciação científica e abrir as portas do CIEnP para a realização deste trabalho, e por sempre se preocupar com a minha formação científica. Obrigada por toda a confiança e ensinamentos valiosos durante todos estes anos.

À Evelyn, Camila e Rodrigo, pela contribuição essencial durante o desenvolvimento de todo este trabalho, e também pela amizade e apoio. Obrigada pela colaboração e por tornarem os dias de laboratório muito mais alegres.

À Melina, por toda a dedicação durante o desenvolvimento do método analítico, e pela paciência ao esclarecer todas as minhas intermináveis dúvidas. Sua contribuição foi imprescindível para a realização deste trabalho.

À Raquel e ao Edir, por toda a colaboração e paciência durante os ensaios de farmacocinética, e também pela ajuda e companheirismo em diversos momentos.

Aos demais amigos, colegas e funcionários do CIEnP, pela ajuda e por todos os momentos e conhecimentos compartilhados.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia da UFSC, por todos os ensinamentos e pela contribuição para a minha formação acadêmica e científica.

A todos os demais amigos e colegas do Departamento de Farmacologia, por tornarem os dias na UFSC mais alegres.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC, pelo apoio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho não seria possível.

A todos os que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

E, finalmente, ao meu namorado Daniel, por todo o amor e companheirismo durante estes anos, e por sempre me apoiar e incentivar em todos os momentos. Sem você tudo teria sido mais difícil.

“(...) um cientista deve, acima de tudo, ser como uma criança. Se ele vê algo, deve dizer o que está vendo, independentemente daquilo ser o que ele imaginava ver ou não. Ver primeiro, testar depois. Mas sempre ver primeiro. Senão, você só vai ver o que você esperava ver. A maioria dos cientistas se esquece disso.”

(Douglas Adams)

RESUMO

O tratamento do câncer ainda se apresenta como um grande desafio, principalmente devido à resistência das células tumorais aos quimioterápicos e à alta toxicidade dos tratamentos convencionais. Estes fatores têm impulsionado a pesquisa de novas estratégias terapêuticas na área da oncologia, focando principalmente em novas classes de medicamentos anticâncer. Alguns compostos que têm despertado interesse na área oncológica são os derivados de ácidos hidroxâmicos, uma vez que estes compostos têm apresentado efeito citotóxico e antitumoral, principalmente por meio de inibição de histona deacetilases. Neste trabalho foi investigado o efeito citotóxico *in vitro* de onze acetohidroxamatos, além do perfil farmacocinético e atividade antitumoral *in vivo* dos compostos mais promissores. Todos os compostos apresentaram atividade citotóxica frente às linhagens tumorais de melanoma (A375) e glioblastoma humano (U-87 MG) no ensaio de MTT, sendo que os compostos AKS 7, AKS 26 e AKS 61 destacaram-se pela alta potência e/ou pelas características físico-químicas promissoras, prosseguindo por esta razão para as próximas etapas. Destes, o composto AKS 61 foi o que apresentou capacidade antiproliferativa em concentrações mais baixas nos ensaios de Sulforrodamina B e de Clonogenicidade, além de apresentar menor citotoxicidade frente à linhagem não-tumoral de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (CMC_{IPS}), tendo sido, portanto, selecionado para realizar alguns estudos mecanísticos *in vitro*. O AKS 61 bloqueou o ciclo celular de células da linhagem A375 de maneira bifásica (inicialmente em G2/M e posteriormente em G1), além de reduzir o potencial de membrana mitocondrial e induzir apoptose das células tratadas. Esse composto foi também eficaz em induzir autofagia após 24 horas de tratamento. A fim de avaliar o potencial antitumoral do AKS 61 *in vivo*, camundongos *nude* foram submetidos ao modelo de tumor xenográfico subcutâneo a partir da inoculação de células A375 e, em seguida, foram tratados com o composto AKS 61 pela via intravenosa (i.v.). O tratamento com AKS 61 (2 mg/kg, i.v.) não foi capaz de inibir o crescimento tumoral, provavelmente devido ao seu perfil farmacocinético desfavorável. Este composto apresentou tempo de meia vida plasmática inferior a quarenta minutos, acompanhada de uma alta taxa de eliminação total. Juntamente com a análise farmacocinética do AKS 61, foram também analisados os perfis dos compostos AKS 26 e AKS 7, sendo que este último apresentou o perfil mais favorável, inclusive apresentando

biodisponibilidade pela via oral. Os resultados obtidos neste trabalho evidenciam o potencial desta série de compostos derivados do ácido hidroxâmico e guiarão a otimização dessas moléculas, com o objetivo de obter um composto eficaz *in vivo* que apresente características farmacocinéticas mais favoráveis para a continuidade do desenvolvimento não-clínico.

Palavras-Chave: Câncer, desenvolvimento não-clínico, ácidos hidroxâmicos, atividade antitumoral, apoptose, autofagia.

ABSTRACT

Cancer treatment is still challenging, mainly due to tumor resistance to chemotherapy and high toxicity of conventional therapy. These factors have driven the search of new therapy strategies and the discovery of better anticancer drugs. Some compounds that have aroused attention in oncology include the hydroxamic acid derivatives, once they have demonstrated cytotoxic and antitumor effect, mostly because of their histone deacetylases inhibition property. In the present study we have investigated the *in vitro* cytotoxic effect of eleven synthetic acetohydroxamates, as well as the *in vivo* pharmacokinetic profile and antitumor activity of most promising compounds. All compounds presented cytotoxic activity against A375 (human melanoma) and U-87 MG (human glioblastoma) cell lines in the MTT assay, and the compounds AKS 7, AKS 26 and AKS 61 stood out for their promising potency and/or physicochemical characteristics, therefore proceeding to the next steps. Of these, the compound AKS 61 was the one that presented the most favorable antiproliferative capacity in the Sulforhodamine B and Clonogenic assays, also presenting smaller cytotoxicity against the non-tumoral lineage CMC_{iPS} (cardiomyocytes derived from human induced pluripotent stem cells), being therefore chosen to perform some mechanistic studies. AKS 61 was able to arrest the cell cycle of A375 cells biphasically (initially in G2/M and later in G1), in addition to inducing a decrease in the mitochondrial membrane potential and increasing apoptosis in treated cells. The compound was also capable of inducing autophagy after 24 hours of treatment. In order to assess the *in vivo* antitumor effect of AKS 61, nude mice were submitted to the xenographic tumor model (by A375 cells inoculation) and treated with the compound intravenously. AKS 61 treatment (2 mg/kg, i.v.) failed to inhibit tumor growth, probably because of its unfavorable pharmacokinetic profile. This compound presented a half-life time of less than 40 minutes, accompanied by a high clearance rate. Together with the pharmacokinetic analysis of AKS 61, the profiles of the compounds AKS 26 and AKS 7 were also analyzed, the latter having the most favorable profile and presenting oral bioavailability. These data show the potential anticancer effect of these hydroxamic acid derivatives and will guide the optimization of these molecules in order to obtain a more potent and effective *in vivo* compound associated with favorable pharmacokinetic characteristics to continue the nonclinical development.

Keywords: Cancer, nonclinical development, hydroxamic acids, antitumor activity, apoptosis, autophagy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Habilidades adquiridas pelas células neoplásicas durante a tumorigênese e exemplos de tratamentos direcionados para cada uma destas características.....	34
Figura 2. Vias extrínseca e intrínseca de ativação da apoptose.....	39
Figura 3. Etapas da Autofagia.....	40
Figura 4. Estratégia de <i>gating</i> utilizada para quantificação das células em cada fase do ciclo celular.....	53
Figura 5. Gráfico de pontos obtido após indução de apoptose e marcação de células com Anexina V PE e 7-AAD, contendo os quadrantes que definem marcação positiva ou negativa para cada um dos marcadores.....	55
Figura 6. Curvas dose-resposta de viabilidade e proliferação celular obtidas a partir do ensaio de SrB para as linhagens U-87 MG e A375.....	72
Figura 7. Viabilidade celular de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas após tratamento com acetohidroxamatos.....	75
Figura 8. Efeito dos acetohidroxamatos sobre a capacidade clonogênica de células A375.....	77
Figura 9. Avaliação dos estágios do ciclo celular por meio de marcação com 7-AAD.....	79
Figura 10. Avaliação do efeito do AKS 61 sobre o potencial de membrana mitocondrial por meio de coloração com JC-1.....	80
Figura 11. Avaliação de morte celular por apoptose por meio de marcação com Anexina V (PE) e 7-AAD.....	82
Figura 12. Análise qualitativa das características morfológicas e indução de autofagia em células tratadas com AKS 61.....	84

Figura 13. Efeito do tratamento com AKS 61 sobre o crescimento tumoral em modelo de tumor xenográfico.....	86
Figura 14. Curvas de concentração plasmática obtidas após tratamento intravenoso com 2 mg/kg de AKS 61, AKS 26 ou AKS7.....	88
Figura 15. Curvas de concentração plasmática obtidas após tratamento oral com AKS 7.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura, Código, logP, Fórmula e peso molecular dos acetohidroxamatos.....	46
Tabela 2. Veículos escolhidos para solubilização dos acetohidroxamatos utilizados nos ensaios <i>in vivo</i>	48
Tabela 3. Esquemas de tratamento utilizados para cada grupo experimental durante os ensaios xenográficos.....	66
Tabela 4. Valores de CI_{50} e de inibição máxima dos compostos na linhagem U-87 MG obtidos pelo ensaio de MTT.....	69
Tabela 5. Valores de CI_{50} e de inibição máxima dos compostos na linhagem A375 obtidos pelo ensaio de MTT.....	70
Tabela 6. Valores de CI_{50} , GI_{50} e TGI e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para os compostos na linhagem U-87 MG, após ensaio de SrB.....	71
Tabela 7. Valores de CI_{50} , GI_{50} e TGI e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para os compostos na linhagem A375, após ensaio de SrB.....	73
Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração intravenosa de AKS 7, AKS 26 e AKS 61.....	87
Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos esperados (em camundongo) para compostos em desenvolvimento, e parâmetros obtidos para o composto AKS 7.....	89
Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração intravenosa e oral de AKS 7.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARRIVE	Animal Research: Reporting of <i>In Vivo</i> Experiments
ATCC	American Type Culture Collection
Atg	Autophagy-related
Cdk	Quinase dependente de ciclina
CI ₅₀	Concentração Inibitória 50%
CIEnP	Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos
CIS	Cisplatina
CMC _{iPS}	Cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas
CQ	Controle de Qualidade
CQA	Controle de Qualidade Alto
CQB	Controle de Qualidade Baixo
CQM	Controle de Qualidade Médio
CV%	Coefficiente de Variação Percentual
DISC	Complexo de Sinalização Indutor de Morte
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DO	Densidade Óptica
FDA	U.S. Food and Drug Administration
EMAR	Espectrometria de Massas de Alta Resolução
GI ₅₀	Concentração Inibitória da proliferação 50%
HDAC	Histona Deacetilases
HTS	High-Throughput Screening
IAPs	Proteínas Inibidoras da Apoptose
IC 95%	Intervalo de confiança de 95%
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
I _{max}	Inibição Máxima
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Via intravenosa
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3"
MDR	Multi-drug resistance
MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-

	tetrazólio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDX	Patient-derived Xenograft
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
PTX	Paclitaxel
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
Rpm	Rotações por minuto
s.c.	Via subcutânea
SFB	Soro Fetal Bovino
SPF	Specific-Pathogen-Free
SrB	Sulforrodamina B
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Total Growth Inhibition
TMZ	Temozolamida
TNF	Fator de Necrose Tumoral
VM	Valinomicina
VN	Vermelho Neutro
v.o.	Via oral

LISTA DE SÍMBOLOS

AUC_{∞}	Área sob a curva do zero ao infinito
C_0	Concentração Inicial
CL	Clearance total
C_{max}	Concentração Máxima
F	Biodisponibilidade Absoluta
K_e	Constante de eliminação
mL	Mililitro
mM	Milimolar
m/z	Razão massa/carga
®	Marca Registrada
$t_{1/2}$	Tempo de Meia-Vida
TM	Trademark
T_{max}	Tempo necessário para atingir a concentração máxima
μL	Microlitro
μM	Micromolar
Vd	Volume de Distribuição

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
1.1	Aspectos Gerais sobre o Desenvolvimento de Medicamentos	27
1.2	Desenvolvimento Não-Clínico de Fármacos Antineoplásicos	28
1.2.1	Ensaio de eficácia.....	29
1.2.2	Ensaio de farmacocinética.....	30
1.3	Câncer.....	31
1.3.1	Melanomas.....	34
1.3.2	Gliomas e Glioblastomas.....	35
1.4	Ciclo Celular.....	36
1.5	Apoptose.....	37
1.6	Autofagia.....	39
1.6.1	Morte celular autofágica.....	40
1.7	Ácidos hidroxâmicos.....	41
2.	OBJETIVOS.....	43
2.1	Objetivo Geral.....	43
2.2	Objetivos Específicos.....	43
3.	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Obtenção dos acetohidroxamatos sintéticos.....	45
3.2	Preparo de soluções dos acetohidroxamatos sintéticos.....	45
3.3	Ensaio <i>in vitro</i>	48
3.3.1	Cultura de células.....	48
3.3.2	Determinação da atividade citotóxica dos acetohidroxamatos em células tumorais humanas.....	49
3.3.3	Determinação da atividade citotóxica dos acetohidroxamatos em células não tumorais humanas.....	50
3.3.4	Avaliação da atividade antiproliferativa dos	

acetohidroxamatos em células tumorais humanas	51
3.3.5 Avaliação do efeito dos acetohidroxamatos sobre a capacidade clonogênica de células tumorais humanas	52
3.3.6 Avaliação da interferência do composto AKS 61 no ciclo celular de células tumorais humanas.....	52
3.3.7 Avaliação do efeito do composto AKS 61 sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais humanas	53
3.3.8 Avaliação da morte celular por apoptose induzida pelo composto AKS 61 em células tumorais humanas	54
3.3.9 Avaliação da indução de autofagia promovida pelo composto AKS 61 em células tumorais.....	56
3.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para análise dos compostos em plasma de camundongos.....	56
3.4.1 Caracterização e ionização dos compostos em UPLC-MS/MS	57
3.4.2 Condições cromatográficas.....	58
3.4.3 Obtenção do plasma e extração dos compostos do plasma...	58
3.4.4 Validação do método analítico.....	59
3.4.4.1 Limite de detecção e quantificação.....	59
3.4.4.2 Linearidade	59
3.4.4.3 Seletividade.....	60
3.4.4.4 Recuperação.....	60
3.4.4.5 Precisão.....	60
3.4.4.6 Exatidão	61
3.4.4.7 Estabilidade.....	61
3.4.5 Identificação do possível metabólito glicuronídeo	62
3.5 Ensaios <i>in vivo</i>	62
3.5.1 Animais.....	63
3.5.2 Determinação do perfil farmacocinético dos acetohidroxamatos em camundongos	64
3.5.3 Avaliação da atividade antitumoral do composto AKS 61 em	

modelo de tumor xenográfico subcutâneo.....	65
3.6 FÁRMACOS e reagentes	66
3.7 Análise Estatística	67
4. RESULTADOS.....	69
4.1 Atividade citotóxica dos acetohidroamatos em linhagens tumorais humanas.....	69
4.2 Efeito citotóxico e antiproliferativo dos acetohidroamatos em linhagens tumorais humanas	70
4.3 Efeito citotóxico dos acetohidroamatos em cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas	74
4.4 Efeito dos acetohidroamatos sobre a capacidade clonogênica de células tumorais humanas.....	76
4.5 Efeito do composto AKS 61 sobre as fases do ciclo celular em células tumorais humanas.....	78
4.6 Efeito do composto AKS 61 sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais humanas.....	80
4.8 Avaliação da indução de autofagia após tratamento com o composto AKS 61 em células tumorais humanas	83
4.9 Avaliação da atividade antitumoral do composto AKS 61 em modelo de tumor xenográfico	84
4.10 Perfil farmacocinético dos compostos AKS 61, AKS 7 e AKS 26.....	87
5. DISCUSSÃO	91
6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES	101
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	103
REFERÊNCIAS	105
APÊNDICE A - Resultados da validação do método analítico desenvolvido para quantificação dos compostos em plasma de camundongo.	115
APÊNDICE B - Cromatogramas obtidos durante a análise de plasma de camundongos tratados com AKS 7 por via oral.	117

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Gerais sobre o Desenvolvimento de Medicamentos

Durante o desenvolvimento de um medicamento, as moléculas candidatas precisam passar por diversas etapas, visando não só confirmar sua eficácia clínica mas sobretudo a sua segurança (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008). Estas etapas iniciam com a pesquisa básica sobre as doenças e possíveis alvos terapêuticos, seguindo para a descoberta e otimização de novas moléculas, que serão testadas em sistemas celulares, em animais e finalmente em humanos (PHRMA, 2015). Devido às exigências atuais das agências regulatórias, como o FDA (*U.S. Food and Drug Administration*), a aprovação de um novo medicamento só é alcançada após muito trabalho, tempo e investimento financeiro. Atualmente, são necessários cerca de dez anos e mais de 2,6 bilhões de dólares para desenvolvimento de um novo medicamento. Este valor reúne o custo de milhares de moléculas que falham durante o processo de desenvolvimento, sendo que a grande maioria dos candidatos é descartada ainda durante a fase não-clínica de desenvolvimento. Mesmo para os candidatos que avançam para os ensaios clínicos, a probabilidade de conseguir a aprovação pelo FDA é baixa: menor que 12% (PHRMA, 2015), o que evidencia o grande risco enfrentado pelas empresas farmacêuticas durante o desenvolvimento de medicamentos.

As indústrias farmacêuticas têm enfrentado dificuldades devido ao surgimento de novas exigências regulatórias e do crescente aumento da taxa de insucesso de candidatos a fármacos nos últimos anos. Estes fatores resultam em custos insustentavelmente elevados para cada medicamento aprovado, fato que está levando muitas indústrias a repensar os modelos atualmente utilizados de pesquisa e desenvolvimento (MOORS; COHEN; SCHELLEKENS, 2014; YILDIRIM et al., 2016). Neste sentido, algumas mudanças que estão sendo propostas são: aumento das parceiras público-privadas; implementação de desenhos adaptativos nos ensaios clínicos; e o uso dos chamados “*Big Data*”, grandes e complexos conjuntos de dados, como dados de ensaios clínicos prévios ou de grandes triagens de moléculas candidatas (YILDIRIM et al., 2016).

Em 2016, vinte e dois medicamentos inovadores foram aprovados

pelo FDA, sendo seis deles aprovados para tratamento ou diagnóstico de diferentes tipos de câncer (FDA, 2016). Apesar de todas as dificuldades encontradas durante as fases de desenvolvimento, a área de oncologia possui 154 medicamentos aprovados pelo FDA e atualmente é líder em inovação, sendo responsável por grande parte dos medicamentos aprovados entre 2011 e 2015 (SANTOS et al., 2017). Estes 154 medicamentos podem ser divididos em três categorias: 26 são fármacos citotóxicos que agem no DNA e/ou RNA, 38 são fármacos citotóxicos que agem pelo menos parcialmente em proteínas e 85 agem em proteínas específicas (terapia direcionada) (SANTOS et al., 2017).

1.2 Desenvolvimento Não-Clínico de Fármacos Antineoplásicos

O desenvolvimento de fármacos antineoplásicos geralmente segue um dos dois modelos classicamente utilizados para a descoberta de moléculas líder: o modelo fenotípico ou o modelo focado em um alvo terapêutico específico. No modelo fenotípico, as substâncias de interesse são investigadas quanto ao seu efeito biológico em modelos relevantes e validados (cultura de células tumorais, por exemplo), enquanto que no modelo focado em um alvo terapêutico é investigada a capacidade da substância de interagir com o alvo escolhido. O papel do alvo escolhido na doença a ser investigada precisa ser conhecido e validado (ANDRADE et al., 2016a).

Ambos os modelos possuem suas vantagens e desvantagens. Porém, em doenças complexas e multifatoriais (como o câncer), a validação de um alvo farmacológico torna-se mais desafiadora, e muitas vezes é necessário que a molécula candidata ligue-se a mais de um alvo para produzir a resposta fisiológica desejada. Por este motivo, muitas indústrias estão revisitando o modelo fenotípico como principal ferramenta de triagem de novos fármacos para o tratamento destas doenças (ANDRADE et al., 2016a; PRIEST; ERDEMLI, 2014).

Devido à alta malignidade do câncer de maneira geral e da baixa eficácia da maioria dos tratamentos atualmente disponíveis, os guias de desenvolvimento não-clínico de fármacos antineoplásicos visam facilitar e agilizar o processo de desenvolvimento destes fármacos. Assim, o número de ensaios não-clínicos exigidos geralmente é inferior ao número exigido para outras classes de fármacos (ICH, 2009).

Segundo o guia S9 do ICH (*International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use*), as avaliações não-clínicas de fármacos antineoplásicos são

conduzidas para:

- Identificar as propriedades farmacológicas de um composto (através de prova de conceito, mecanismo de ação, seleção de biomarcadores);
- Estabelecer uma dose inicial segura para a primeira exposição em humanos (através de ensaios de farmacocinética e farmacodinâmica);
- Compreender o perfil toxicológico da substância (através da identificação de órgãos-alvo, relação exposição-resposta e reversibilidade).

O guia discorre ainda sobre os ensaios mínimos necessários para atingir esses objetivos e possibilitar o início dos estudos em pacientes com câncer refratários aos tratamentos disponíveis. À medida que o composto antineoplásico avança nos ensaios clínicos e passa a ser testado em pacientes com quadro clínico menos grave, mais estudos (principalmente de toxicologia) tornam-se necessários para garantir a segurança do uso do fármaco durante períodos maiores de exposição (ICH, 2009).

1.2.1 Ensaios de eficácia

A avaliação da atividade não-clínica de uma molécula candidata (prova de princípio) é uma das etapas essenciais durante o desenvolvimento de medicamentos. Esta inclui ensaios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, que podem ser conduzidos durante todas as fases de desenvolvimento.

Uma das ferramentas mais utilizadas nas etapas iniciais de desenvolvimento na indústria farmacêutica é a triagem de alta produtividade (HTS, do inglês “*High-Throughput Screening*”). Este ensaio permite a rápida identificação de novas substâncias ativas contra um alvo específico ou um sistema celular. Embora este sistema possua limitações óbvias, muitos benefícios surgiram com a implementação desta tecnologia, e seu uso associado a outras técnicas pode ampliar sua aplicação e resultar em grandes sucessos durante o desenvolvimento de novos fármacos (ANDRADE et al., 2016a; LIU; LI; HU, 2004).

Outras ferramentas *in vitro* comumente utilizadas são ensaios de citotoxicidade, proliferação e invasão celular, utilizando culturas 2D e 3D de diferentes células tumorais. Embora estes ensaios sejam largamente empregados para avaliação de eficácia nos estágios iniciais do desenvolvimento, ainda são altas as taxas de falha na transposição de

eficácia *in vitro* – *in vivo*. Por este motivo, grandes esforços têm sido feitos para refinar as técnicas *in vitro* atualmente utilizadas, bem como buscar novas técnicas com maior valor preditivo (ANDRADE et al., 2016a; WONG; CHENG; RIGAS, 2012).

Devido às limitações dos ensaios de eficácia *in vitro*, a realização de ensaios de eficácia em animais torna-se imprescindível no desenvolvimento de fármacos antineoplásicos. Os modelos animais mais utilizados atualmente são os seguintes (MORO et al., 2012):

- Camundongos geneticamente modificados, que desenvolvem neoplasias espontaneamente;
- Modelo de tumor xenográfico/ortotópico, onde linhagens tumorais humanas são inoculadas em animais imunossuprimidos;
- Modelo PDX (do inglês *Patient-derived xenograft*), onde tumores derivados de pacientes são implantados em animais imunossuprimidos.

Embora resultados positivos nestes modelos não garantam a eficácia em ensaios clínicos, a grande maioria dos fármacos antineoplásicos já aprovados possui atividade frente a estes ensaios, consolidando-os como ferramentas valiosas durante o desenvolvimento de fármacos anticâncer (JOHNSON et al., 2001).

1.2.2 Ensaios de farmacocinética

As propriedades farmacocinéticas de um composto são determinantes para o seu sucesso em ensaios clínicos. Por este motivo, muitas indústrias farmacêuticas realizam estudos de farmacocinética já nas primeiras etapas do desenvolvimento de novos fármacos (ANDRADE et al., 2016b).

A determinação de, pelo menos, alguns parâmetros farmacocinéticos (como concentração máxima, área sob a curva e tempo de meia-vida) é essencial para o desenvolvimento não-clínico de fármacos antineoplásicos, uma vez que estes dados auxiliam na escolha das doses iniciais e regimes de tratamento a serem utilizados nos primeiros ensaios clínicos (ICH, 2009). Estes parâmetros podem ser determinados a partir da administração do composto de interesse por diferentes vias e posterior determinação da sua concentração plasmática em diferentes tempos. As concentrações podem, então, ser utilizadas para calcular os parâmetros farmacocinéticos desejados (RANG et al., 2012).

Investigações mais detalhadas sobre as propriedades ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) dos compostos de interesse também são necessárias, mas podem ser conduzidas em paralelo com os ensaios clínicos (ICH, 2009).

É também possível investigar a biodisponibilidade do composto de interesse frente a diferentes vias de administração, a fim de auxiliar na escolha da via e da frequência mais adequada a ser utilizada nos ensaios de eficácia em animais, por exemplo (ICH, 2009). Neste sentido, também é possível aplicar a Regra de Lipinski antes mesmo da realização dos ensaios, com o objetivo de prever a chance de um composto de ser farmacologicamente ativo após administração oral. Segundo esta regra, uma molécula bioativa pela via oral geralmente viola no máximo um dos seguintes critérios (LIPINSKI, 2004):

- Não ter mais do que 5 doadores de ligação de hidrogênio;
- Não ter mais do que 10 aceptores de ligação de hidrogênio;
- Massa molecular menor que 500 daltons;
- logP (coeficiente de partição octanol-água) menor ou igual a 5.

Candidatos a fármacos que se encaixam na regra de Lipinski possuem não só maior probabilidade de serem bioativos pela via oral como também menor probabilidade de falharem durante o desenvolvimento. Por este motivo, a maioria dos candidatos em desenvolvimento continua seguindo os critérios desta regra (LEESON; SPRINGTHORPE, 2007).

1.3 Câncer

Câncer é um termo genérico utilizado para designar um conjunto de doenças, as quais se caracterizam pela proliferação descontrolada de uma população de células do organismo. Estas células geralmente possuem capacidade de invadir tecidos adjacentes de maneira agressiva e sem controle (INCA, 2016; WHO, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), cerca de 8 milhões de pessoas morrem por ano devido ao câncer, fazendo com que este conjunto de doenças represente uma das principais causas de morte no mundo. Ainda, estima-se que os novos casos anuais de câncer aumentem de 14 milhões (em 2012) para mais de 22 milhões nas próximas duas décadas (IARC, 2014). Somente para o Brasil, foram estimados cerca de 600 mil novos casos de câncer para o biênio de 2016-2017 (INCA, 2015).

Os cânceres se originam a partir do acúmulo de inúmeras mutações em um tipo celular, que lhes conferem uma variedade de características

e passam a propiciar sua sobrevivência e divisão indefinida. Geralmente, as células tumorais contêm uma série de mutações em genes diretamente ligados à tumorigênese, responsáveis pela regulação da proliferação e diferenciação celular (*gatekeepers*) e/ou em genes indiretamente ligados à tumorigênese (como os genes *caretakers* e *landscapers*) (MICHOR; IWASA; NOWAK, 2004). Estas mutações podem ser desencadeadas em resposta a diversos fatores ambientais e/ou à presença de predisposição genética.

Segundo Hanahan e Weinberg (2011), durante a evolução progressiva de células normais a células neoplásicas, elas adquirem diversas habilidades que propiciam a tumorigênese:

- manutenção da sinalização proliferativa;
- insensibilidade à supressão do crescimento;
- resistência à morte celular;
- imortalidade replicativa;
- indução de angiogênese;
- capacidade de invasão e metástase;
- reprogramação do metabolismo energético;
- evasão do sistema imune.

Além destas, há dois outros fatores básicos que contribuem para a aquisição das habilidades já supracitadas: instabilidade genômica e inflamação associada ao tumor.

Devido a esta diversidade de características adquiridas e de vias de sinalização redundantes que as mantém, o tratamento do câncer ainda apresenta-se como um grande desafio, onde mesmo após intervenções aparentemente bem sucedidas é comum observar recidivas da doença, devido à sobrevivência de células malignas resistentes ao tratamento (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A resistência das células tumorais aos quimioterápicos e a alta toxicidade dos tratamentos convencionais têm impulsionado a pesquisa de novas estratégias terapêuticas na área de oncologia, o que resultou no surgimento de novas classes de medicamentos anticâncer. Atualmente, além das estratégias de tratamento convencionais, como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia clássica, estão disponíveis terapias hormonais, terapias direcionadas às células tumorais e imunoterapia (NCI, 2016).

Os quimioterápicos clássicos foram tradicionalmente descobertos a partir de triagem extensiva de produtos sintéticos e naturais em modelos de tumores murinos e agem principalmente inibindo a divisão celular de forma geral, sem apresentar seletividade às células tumorais. Exemplos de quimioterápicos clássicos são os agentes alquilantes de DNA (como a

Cisplatina e a Temozolamida), agentes antimetabólitos (como a Citarabina e a Gencitabina) e os produtos naturais (como os Taxanos e os Alcaloides da Vinca) (CHABNER et al., 2012).

As terapias hormonais baseiam-se na capacidade de alguns hormônios de contribuir para o crescimento tumoral, principalmente nos cânceres de mama e próstata. Deste modo, as terapias hormonais visam bloquear a síntese ou a ação destes hormônios em pacientes com estes tipos de câncer. São exemplos desta classe de fármacos o Tamoxifeno (modulador dos receptores de estrogênio), os inibidores da aromatase (como o Anastrozol) e os antiandrógenos (como a Bicalutamida) (CANCER RESEARCH UK, 2016).

As terapias direcionadas visam interferir nas habilidades das células tumorais já citadas, agindo em uma grande variedade de alvos especificamente envolvidos na proliferação, progressão e metástase de tumores (NCI, 2016). Exemplos destas e outras terapias podem ser visualizadas na figura 1. A imunoterapia age especificamente em uma destas habilidades das células tumorais: a capacidade de evasão do sistema imune. Esta nova modalidade de terapia objetiva modular o sistema imunológico, de modo que esse seja capaz de eliminar as células tumorais do próprio paciente (KHALIL et al., 2016).

É importante ressaltar que muitas destas terapias são empregadas de maneira combinada. A utilização concomitante de fármacos com mecanismos de ação distintos aumenta a eficácia do tratamento e reduz as chances do aparecimento de resistência e de efeitos tóxicos muito pronunciados (PRITCHARD; LAUFFENBURGER; HEMANN, 2012). Deste modo, novas opções de terapia, mesmo que com eficácia moderada individualmente, podem ser utilizadas para melhorar a resposta terapêutica de tratamentos já estabelecidos clinicamente.

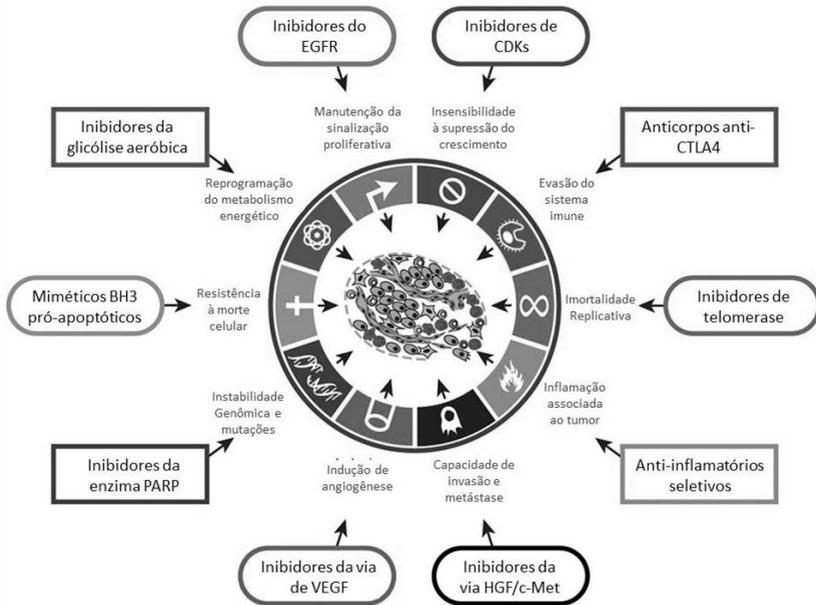


Figura 1. Habilidades adquiridas pelas células neoplásicas durante a tumorigênese e exemplos de tratamentos direcionados para cada uma destas características. Fonte: Adaptado de HANAHAN & WEINBERG (2011).

1.3.1 Melanomas

Os melanomas são neoplasias malignas originárias de melanócitos. Os melanócitos são células da epiderme responsáveis pela produção de melanina, substância que protege as camadas mais profundas da pele contra danos ao DNA promovidos por raios solares. Embora os melanócitos não estejam localizados somente na epiderme, este é o local onde estão presentes de maneira mais abundante e onde geralmente se originam as neoplasias melanocíticas, tanto malignas (melanoma cutâneo) quanto benignas (nevus melanocíticos) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016a; BASTIAN, 2014).

O melanoma cutâneo é o tipo de câncer de pele mais agressivo, sendo responsável por 80% das mortes relacionadas ao câncer de pele. Em casos com presença de metástases distantes, a taxa de sobrevivência em cinco anos de pacientes com melanoma é inferior a 20% (SPAGNOLO et al., 2015). Segundo a OMS, os melanomas podem ser classificados em quatro tipos principais, de acordo com aspectos morfológicos e a

localização do tumor primário: melanoma superficial disseminante (SSM), melanoma lentigo maligno (LMM), melanoma nodular (NM) e melanoma acrolentiginoso (ALM) (BASTIAN, 2014; LEBOIT et al., 2006). O estadiamento do melanoma é geralmente realizado segundo o sistema TNM, que se baseia em informações sobre o tumor primário (T), nódulos linfáticos acometidos (N) e existência de metástases (M) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016a).

O tratamento padrão do melanoma varia de acordo com a progressão da doença. Nos estágios iniciais, este geralmente consiste apenas da excisão do tumor primário, enquanto que em estágios mais avançados da doença é necessário também o tratamento com imunoterapia (como os anticorpos anti-PD-1), terapia direcionada (como os inibidores BRAF) e/ou quimioterapia clássica. Entre os quimioterápicos clássicos mais utilizados estão a Dacarbazina e a Temozolamida (DUMMER et al., 2015; GARBE et al., 2016). Embora novas opções terapêuticas tenham melhorado significativamente o prognóstico de pacientes com melanoma metastático, este tipo de câncer continua sendo de difícil manejo, principalmente devido à resistência intrínseca ou extrínseca ao tratamento (SPAGNOLO et al., 2015).

1.3.2 Gliomas e Glioblastomas

Os gliomas são neoplasias do sistema nervoso central que se originam de células gliais, como astrócitos e oligodendrócitos. Apesar dos gliomas serem responsáveis por menos de 2% dos casos de câncer do mundo, eles causam significativa mortalidade, apresentando um prognóstico muito desfavorável (IARC, 2014).

De acordo com o tipo celular de origem, a Organização Mundial de Saúde classifica os gliomas em astrocitomas (originários de astrócitos), oligodendrogliomas (derivados de oligodendrócitos) e oligoastrocitomas (tumores mistos, contendo características tanto de astrócitos quanto de oligodendrócitos). Estas neoplasias são também classificadas em subtipos, com diferentes graus de severidade (I a IV). O glioblastoma, um subtipo de astrocitoma de grau IV, é o tumor cerebral mais comum e mais maligno em adultos, apresentando sobrevida em cinco anos inferior a 10% (IARC, 2014; LOUIS et al., 2016).

O tratamento dos gliomas consiste inicialmente na excisão cirúrgica da massa tumoral. Por não possuírem bordas bem demarcadas, estes tumores muito dificilmente são removidos completamente, e o tratamento posterior com radioterapia e/ou quimioterapia é prejudicado

pela acentuada resistência destes tumores à radiação e aos agentes quimioterápicos (SATHORNSUMETEE; RICH; REARDON, 2007). Dentre os fármacos antineoplásicos disponíveis, a Temozolamida é atualmente o tratamento-padrão para glioblastomas, contribuindo significativamente para o aumento na sobrevida dos pacientes acometidos por esta neoplasia. Entretanto, apesar da eficácia deste quimioterápico, o prognóstico de pacientes com glioblastoma continua desfavorável, principalmente devido à resistência intrínseca ou adquirida das células tumorais à Temozolamida (MESSAOUDI; CLAVREUL; LAGARCE, 2015).

1.4 Ciclo Celular

Em condições fisiológicas, os processos de proliferação e divisão celular são altamente controlados por complexas vias de sinalização e só ocorrem em momentos de necessidade do organismo, como durante o desenvolvimento ou na cicatrização (DOWNWARD, 2003). Este controle rigoroso, antes e durante a divisão celular, visa garantir que todos os eventos envolvidos neste processo se desencadeiem de maneira correta, evitando assim a geração de células filhas defeituosas (BERTOLI; SKOTHEIM; DE BRUIN, 2013).

A divisão celular ocorre em ciclos com duração média de 24 horas para as células humanas, embora este período seja altamente variável de acordo com o tipo celular (ALBERTS et al., 2010). Além disso, uma célula normal geralmente é capaz de dividir-se cerca de 40 a 60 vezes antes de atingir a senescência, fenômeno conhecido como o limite de Hayflick, em homenagem ao seu descobridor (HAYFLICK; MOORHEAD, 1961).

O ciclo celular é dividido em quatro fases: G_1 , S, G_2 e M. A maioria das células de um organismo encontra-se normalmente fora do ciclo celular, em um estado quiescente (também chamado de G_0), e só inicia o ciclo celular se receber sinais estimuladores extracelulares por meio de mitógenos, como por exemplo fatores de crescimento. Ao iniciar o ciclo celular e entrar na fase G_1 , a célula realiza diversas checagens a fim de verificar se o ambiente é favorável para a divisão celular. O primeiro ponto de verificação (também chamado de ponto de restrição) do ciclo celular ocorre ao final da fase G_1 . Caso as condições sejam desfavoráveis à divisão celular, a célula permanece em G_1 ou entra em G_0 . Se as condições forem favoráveis, a célula se compromete com a divisão celular e entra em fase S, onde ocorre a duplicação do material

genético. Durante a fase G_2 ocorre a síntese de outros componentes celulares e o segundo ponto de verificação, em que a célula só prossegue para a fase M após duplicação completa e correta do DNA. Durante a fase M ocorre a condensação e organização dos cromossomos no fuso mitótico e a posterior divisão celular propriamente dita. O terceiro e último ponto de verificação acontece durante a fase M, antes do início da citocinese e divisão das cromátides irmãs (ALBERTS et al., 2010).

O sistema de controle do ciclo celular bloqueia a progressão do ciclo em cada um dos pontos de verificação, caso ocorram problemas no interior ou exterior da célula. Este sistema de controle é principalmente composto pelas chamadas cinases dependentes de ciclinas (Cdks, do inglês *Cyclin-dependent kinases*) e pelas ciclinas, que regulam a atividade das primeiras (ALBERTS et al., 2010).

Células tumorais frequentemente possuem mutações em diversos genes envolvidos na proliferação celular, o que gera falhas na regulação do ciclo celular e uma proliferação exacerbada, mesmo na ausência de mitógenos e ambiente favorável para a divisão celular (O'CONNOR; ADAMS, 2010).

1.5 Apoptose

A apoptose é o tipo mais comum de morte celular programada. Ela ocorre em diversos organismos e desempenha um papel importante na homeostasia dos tecidos, eliminando células desnecessárias ou defeituosas. A apoptose é principalmente executada por caspases, uma família de proteases que ativam-se em cascata durante o processo e clivam diversas proteínas-alvo na célula.

A apoptose pode ser desencadeada através da ativação de duas vias de sinalização: a via intrínseca e a via extrínseca (figura 2). Na via extrínseca, estímulos externos à célula ativam receptores de morte da família do TNF (fator de necrose tumoral). Estes receptores então recrutam proteínas adaptadoras e caspases iniciadoras, levando à formação do complexo de sinalização indutor de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*) e posterior ativação da cascata de caspases executoras, seguida pela morte celular. Já na via intrínseca, sinais de dano ou estresse celular (como quebra de DNA ou falta de nutrientes) desencadeiam modificações na permeabilidade da membrana mitocondrial, levando à liberação de citocromo *c* para o citosol, o que leva à formação do apoptossomo, uma estrutura capaz de recrutar e clivar caspases iniciadoras, desencadeando assim a cascata de caspases e

a morte celular (ALBERTS et al., 2010).

Diversas modificações morfológicas acompanham a apoptose. Durante este processo é possível observar arredondamento e encolhimento das células, condensação e fragmentação da cromatina e formação de bolhas no citoplasma. Além disso, diversas alterações bioquímicas na célula apoptótica ajudam a sinalizar a sua fagocitose, como, por exemplo, a exposição de resíduos de fosfatidilserina na membrana externa da célula, que são reconhecidos por células fagocíticas, como os macrófagos (ALBERTS et al., 2010; BROWN; ATTARDI, 2005). Estas modificações morfológicas também estão ilustradas na figura 2.

A ativação de ambas as vias de apoptose é altamente regulada para garantir que a morte celular só ocorra quando necessário. No caso da via intrínseca, a apoptose é regulada principalmente pela família de proteínas Bcl-2, composta tanto de proteínas anti-apoptóticas (como a própria Bcl-2) quanto pró-apoptóticas (como as proteínas BH3-*apenas*).

Em células cancerígenas, normalmente a expressão ou a atividade de pelo menos uma das proteínas envolvidas na apoptose está alterada, resultando em resistência à indução de morte celular por esta via. As alterações na via de apoptose mais comumente observadas são: redução da função ou expressão de receptores de morte, redução da expressão de caspase 8, expressão aberrante de Bcl-2 (muito comum em linfomas), inativação das proteínas pró-apoptóticas Bax ou BH3-*apenas* e expressão aberrante de proteínas inibidoras da apoptose (IAPs, comum em melanomas), entre outras (FULDA, 2009; SOENGAS; LOWE, 2003).

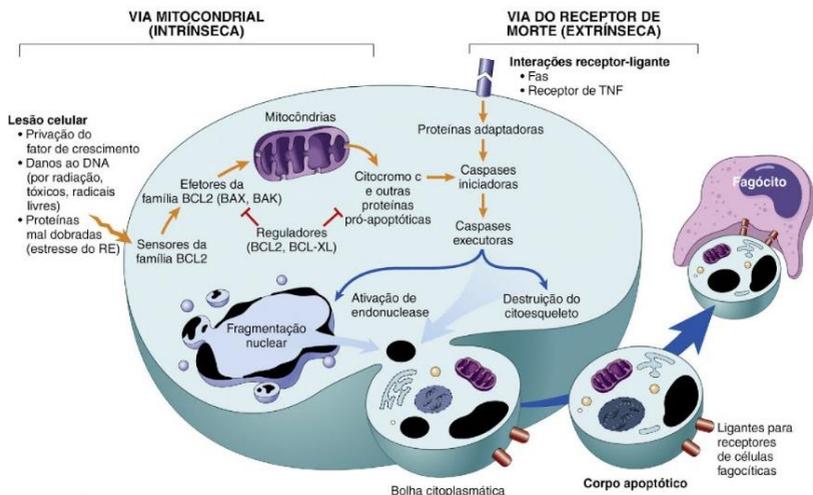


Figura 2. Vias extrínseca e intrínseca de ativação da apoptose. Na via intrínseca, lesão ou estresse celular desencadeiam a liberação de citocromo *c* mitocondrial no espaço intracelular, com posterior formação do apoptossomo e ativação da cascata de caspases. Na via extrínseca, sinais extracelulares ativam receptores de morte, que desencadeiam a formação do DISC e posterior ativação da cascata de caspases. Ambos os processos culminam na ativação de caspases executoras que clivam proteínas celulares, levando à fragmentação nuclear, destruição do citoesqueleto e formação de corpos apoptóticos, que serão posteriormente fagocitados. Fonte: KUMAR; ASTER; ABBAS, 2016.

1.6 Autofagia

A autofagia é um processo catabólico de digestão de componentes celulares, muito importante para o balanço energético celular durante períodos de desenvolvimento ou escassez de nutrientes. Este processo também realiza a remoção de proteínas defeituosas e organelas danificadas, bem como de patógenos intracelulares (GLICK; BARTH; MACLEOD, 2010).

A macroautofagia (comumente referida apenas como autofagia) é o tipo de autofagia mais estudada atualmente, e é orquestrada por proteínas Atg (do inglês *autophagy-related*) e pela PI3K (fosfatidilinositol-3-cinase) do tipo 3. O processo da autofagia se inicia com a formação de uma membrana de isolamento chamada de fagóforo, promovida pela PI3K. Em seguida, as vias Atg5–Atg12 e LC3 orquestram o alongamento e fechamento da membrana em torno de componentes celulares, e a proteína LC3 (do inglês *Microtubule-*

associated protein 1A/1B-light chain 3) passa a ser incorporada na membrana da vesícula. Após a maturação do então formado autofagossomo, este se funde com o lisossomo, dando origem ao autofagolisossomo (ou apenas autolisossomo), que promove a digestão enzimática dos componentes englobados, com liberação de energia (KUMAR; ASTER; ABBAS, 2016; SHIMIZU et al., 2014). Uma ilustração deste processo pode ser observada na figura 3.

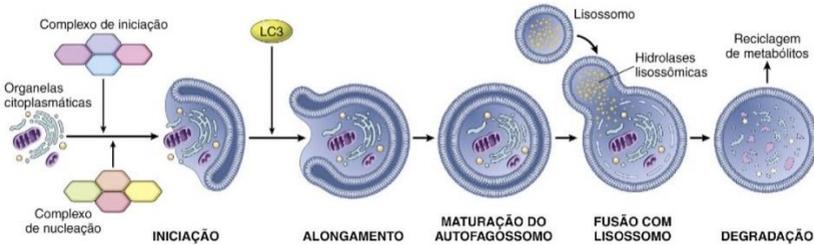


Figura 3. Etapas da Autofagia. Diversos estímulos (como a privação de energia ou estresse) desencadeiam o processo de autofagia, levando à formação de autofagossomos que englobam material celular a ser degradado. Após maturação do autofagossomo, este se funde ao lisossomo, culminando na degradação de conteúdo intracelular e reciclagem de metabólitos. Fonte: KUMAR; ASTER; ABBAS, 2016.

1.6.1 Morte celular autofágica

Embora seja normalmente um processo citoprotetor que possibilita a sobrevivência celular em situações de falta de nutrientes e estresse, a ativação da autofagia também pode levar à morte celular durante o desenvolvimento e em algumas doenças, como o câncer (KUMAR; ASTER; ABBAS, 2016; NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Os mecanismos envolvidos na morte celular autofágica ainda não foram completamente elucidados. Evidências atuais sugerem que a ativação da autofagia é necessária, mas não suficiente, para a indução de morte celular autofágica. Outros sinais de morte parecem ser requeridos para este processo, como a fosforilação de JNK (do inglês, *c-Jun N-terminal kinase*) (SHIMIZU et al., 2014). Este tipo de morte celular parece ser particularmente importante em células resistentes à apoptose. Células deficientes em Bax/Bak, por exemplo, não sofrem apoptose após estímulos pró-apoptóticos, mas morrem expressando diversas estruturas autofágicas e alta fosforilação de JNK, fenômeno que

é inibido pelo silenciamento de Atg5 (SHIMIZU et al., 2004, 2014).

A interação entre a autofagia e a apoptose tem sido amplamente estudada, e evidências sugerem que ambos os processos podem agir de maneira sinérgica ou contrária, dependendo da situação (EISENBERG-LERNER et al., 2009; NIKOLETOPOULOU et al., 2013). Este papel dual da autofagia, ora promovendo a sobrevivência e ora promovendo a morte celular, também tem sido descrito para o câncer. Há evidências de que a atividade autofágica reduzida está relacionada à tumorigênese, e diversos tumores apresentam baixos níveis das proteínas Atg. Porém, a autofagia também pode promover o crescimento tumoral sob situações de hipóxia, a partir da reciclagem de nutrientes (para revisão ver: SHIMIZU et al., 2014).

Os resultados atuais neste campo de estudo sugerem que o papel da autofagia pode ser modulado de acordo com as características ambientais e celulares, sendo que a função deste processo deve ser desvendada caso a caso.

1.7 Ácidos hidroxâmicos

Os ácidos hidroxâmicos (ou hidroxamatos, na forma ionizada), são compostos orgânicos com estrutura geral R-CO-NH-OH. O grupamento ácido hidroxâmico (CO-NH-OH) possui forte atividade quelante, podendo se ligar de maneira monodentada ou bidentada a íons metálicos, a partir de seus átomos de oxigênio e nitrogênio. Além disso, os ácidos hidroxâmicos também possuem habilidade de formar até cinco ligações de hidrogênio, dependendo do número de sítios disponíveis, o que fortalece a ligação entre estas moléculas e seus alvos farmacológicos (GUPTA; SHARMA, 2013).

Devido a estas propriedades, moléculas contendo este grupo funcional possuem diversas aplicações biomédicas, desempenhadas principalmente através da inibição de sítios ativos de enzimas contendo metais, como zinco e manganês (GUPTA; SHARMA, 2013; HUGUET et al., 2012). Exemplos destas enzimas, alvos dos ácidos hidroxâmicos, são as histona deacetilases (HDAC), metaloproteinases de matriz, anidrase carbônica, enzima conversora de angiotensina e lipoxigenases (DAY; COHEN, 2013; GUPTA; SHARMA, 2013).

Um grande número de compostos derivados de ácidos hidroxâmicos foram ou estão sendo investigados na terapia de diversas condições, com destaque para o tratamento do câncer e dos vírus da Hepatite C e HIV (KOZLOV et al., 2015; MANAL et al., 2016; STRANIX et al., 2016).

Entretanto, alguns candidatos (como o Batimastat e o Marimastat) foram descontinuados durante os ensaios clínicos, principalmente devido à instabilidade metabólica e estreita janela terapêutica (CATHCART; PULKOSKI-GROSS; CAO, 2015). Entre os ácidos hidroxâmicos que ainda encontram-se em fases iniciais de desenvolvimento estão os 2-aril-2-(3-indolil)acetohidroxamatos, uma série de compostos sintéticos que apresentou atividades promissoras contra células tumorais resistentes à quimioterapia (AKSENOV et al., 2015).

O Vorinostat, primeiro ácido hidroxâmico aprovado para o tratamento de câncer, foi descoberto por meio da investigação do potencial antiproliferativo de pequenos solventes polares. A análise da relação estrutura-atividade destas pequenas moléculas levou ao desenvolvimento e otimização de moléculas derivadas de ácidos hidroxâmicos (MARKS; BRESLOW, 2007). Estes estudos resultaram na aprovação do Vorinostat, um ácido hidroxâmico que desempenha sua atividade anticâncer através da inibição das HDAC (RICHON, 2006; RICHON et al., 1998).

Após a aprovação do Vorinostat (em 2006), tem sido dado grande destaque para a capacidade dos ácidos hidroxâmicos de inibirem a família das HDAC, que são um grupo de enzimas que realizam a deacetilação de resíduos de lisina presentes nas caudas das histonas. A deacetilação aumenta a carga positiva destas caudas, reforçando a ligação entre as histonas e o DNA, o que geralmente resulta em condensação da estrutura e prevenção da transcrição gênica (CECCACCI; MINUCCI, 2016; PARBIN et al., 2014). A atividade desregulada desta classe de enzimas tem sido observada durante a tumorigênese, e a expressão de HDACs parece ser necessária para o crescimento e sobrevivência de células tumorais, uma vez que o silenciamento da expressão destas enzimas pode induzir parada do ciclo celular, inibição da proliferação, indução de apoptose e senescência (para revisão ver CECCACCI; MINUCCI, 2016; FALKENBERG; JOHNSTONE, 2014).

A importância da regulação destas enzimas na progressão tumoral vem sendo confirmada através da aprovação e utilização de quatro inibidores de HDAC (Vorinostat, Romidepsin, Belinostat e Panobinostat) para o tratamento de diversos tipos de câncer (CECCACCI; MINUCCI, 2016). Três deles (Vorinostat, Belinostat e Panobinostat) pertencem à classe dos ácidos hidroxâmicos, e pelo menos mais cinco compostos desta classe estão atualmente em estudos clínicos (MOTTAMAL et al., 2015), evidenciando seu potencial no tratamento anticâncer.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a potencial atividade citotóxica *in vitro* de acetohidroxamatos sintéticos em linhagens de células humanas tumorais e não tumoral e sua atividade antitumoral em modelo de tumor xenográfico subcutâneo, além do perfil farmacocinético *in vivo* dos mesmos.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a solubilidade dos acetohidroxamatos sintéticos;
- b) Avaliar a atividade citotóxica dos compostos nas linhagens tumorais humanas de melanoma (A375) e glioblastoma (U-87 MG) e de cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas, por meio dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro;
- c) Avaliar a atividade antiproliferativa e anticlonogênica de diferentes concentrações dos compostos nas linhagens tumorais humanas de melanoma (A375) e glioblastoma (U-87 MG), por meio dos ensaios de Sulforrodamina B e clonogenicidade;
- d) Investigar alguns dos possíveis mecanismos de morte celular desencadeados pelo(s) composto(s) mais ativo(s), por meio de técnicas de citometria de fluxo e imunofluorescência;
- e) Avaliar a atividade antitumoral e toxicidade *in vivo* do(s) composto(s) mais ativo(s) através de modelo de tumor xenográfico, utilizando camundongos nude atímicos;
- f) Avaliar o perfil farmacocinético e biodisponibilidade oral do(s) composto(s) mais ativo(s) *in vitro*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos acetohidroxamatos sintéticos

A série de 2-aril-2-(3-indolil)acetohidroxamatos utilizados neste trabalho foi sintetizada pelos professores Alexander Kornienko, Alexander V. Aksenov e colaboradores na North Caucasus Federal University (Stavropol, Russia), a partir da reação de derivados indólicos com β -nitroestirenos em solução de ácido polifosfórico 80% a 70 °C por 1-2 horas. Todos os compostos sintetizados foram caracterizados por ressonância magnética nuclear (RMN) de H (hidrogênio) e C (carbono) e espectrometria de massas de alta resolução (EMAR). A pureza obtida para cada composto foi de pelo menos 95%. Informações mais detalhadas sobre a síntese e análise dos compostos podem ser obtidas em Aksenov et al. (2015).

A estrutura química, logP, fórmula molecular e massa molecular dos compostos utilizados neste trabalho estão apresentados na Tabela 1. O logP foi calculado de maneira teórica, e está representado como a média do valor obtido nos seguintes programas: ChemAxon's Marvin sketch, Molinspiration e ALOGPS (por VCCLAB).

3.2 Preparo de soluções dos acetohidroxamatos sintéticos

A solubilidade dos compostos foi testada a partir da diluição dos mesmos em diferentes concentrações do veículo escolhido. Para os ensaios *in vitro*, o veículo utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO) + meio de cultura em diferentes proporções. Partiu-se de uma solução-mãe de cada composto a 10 mM diluída em 100% de DMSO, e todas as demais concentrações foram obtidas diluindo-se esta solução-mãe em meio de cultura apropriado para a célula utilizada. Para os ensaios com os cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas foi utilizada uma solução-mãe 20 mM diluída em 100% de DMSO, a fim de reduzir a quantidade final de DMSO. Todos os veículos com mais de 0,1% de DMSO foram testados e não apresentaram interferência sobre a viabilidade ou proliferação celular (dados não mostrados).

Para os ensaios *in vivo*, o veículo escolhido foi DMSO + Tween 80 em salina, testado em diferentes proporções. O veículo final escolhido para execução dos ensaios foi o que continha as menores

quantidades de DMSO e/ou Tween 80 necessárias para solubilizar completamente os compostos na concentração desejada. Os veículos finais utilizados para os ensaios *in vivo* estão mostrados na tabela 2.

Tabela 1. Estrutura, Código*, logP, Fórmula e peso molecular dos acetohidroxamatos

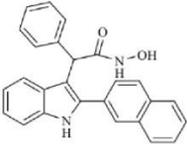
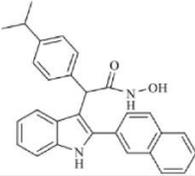
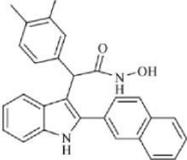
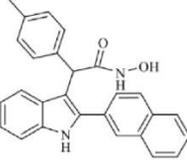
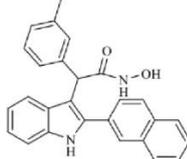
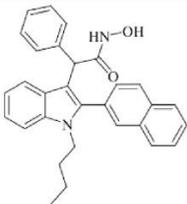
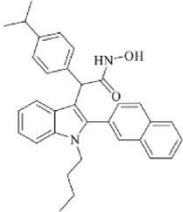
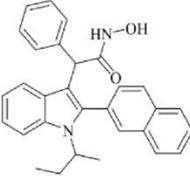
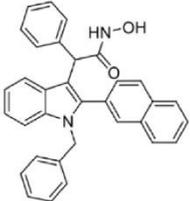
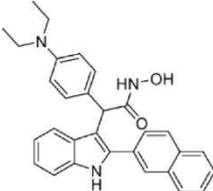
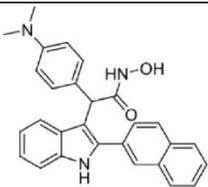
Nome	Estrutura	Código	logP	Fórmula molecular e peso molecular
AKS 7		3aafa	4,1	C ₂₆ H ₂₀ N ₂ O ₂ 392,4
AKS 26		3aafe	6,7	C ₂₉ H ₂₆ N ₂ O ₂ 434,5
AKS 43		3aafk	6,1	C ₂₈ H ₂₄ N ₂ O ₂ 420,5
AKS 51		3aafm	5,7	C ₂₇ H ₂₂ N ₂ O ₂ 406,5
AKS 52		3aafn	5,7	C ₂₇ H ₂₂ N ₂ O ₂ 406,5
AKS 56		3cafa	6,8	C ₃₀ H ₂₈ N ₂ O ₂ 448,6

Tabela 1. Estrutura, Código*, logP, Fórmula e peso molecular dos acetohidroxamatos (Continuação)

Nome	Estrutura	Código	logP	Fórmula molecular e peso molecular
AKS 57		3cafe	8,4	$C_{29}H_{27}N_2O_2$ 435,5
AKS 58		3dafa	6,7	$C_{33}H_{34}N_2O_2$ 490,6
AKS 59		3eafa	7,0	$C_{33}H_{26}N_2O_2$ 482,6
AKS 60		3aafp	6,0	$C_{30}H_{29}N_3O_2$ 463,6
AKS 61		3aafp	5,3	$C_{28}H_{25}N_3O_2$ 435,5

*Código utilizado para designar as moléculas aqui descritas em AKSENOV et al. (2015).

Tabela 2. Veículos escolhidos para solubilização dos acetohidroxamatos utilizados nos ensaio *in vivo*.

Composto e dose	Volume de adm.	Via de adm.	Concentração da solução	Veículo utilizado
AKS 7 2 mg/kg	5 mL/kg	i.v.	0,4 mg/mL	2,5% DMSO + 1% Tween 80
AKS 7 50 mg/kg	10 mL/kg	v.o.	5 mg/mL	10% DMSO + 5% Tween 80
AKS 7 100 mg/kg	10 mL/kg	v.o.	10 mg/mL	20% DMSO + 10% Tween 80
AKS 26 2 mg/kg	5 mL/kg	i.v.	0,4 mg/mL	2,5% DMSO + 1% Tween 80
AKS 61 2 mg/kg	5 mL/kg	i.v.	0,4 mg/mL	2,5% DMSO + 1% Tween 80

Adm. = Administração; i.v.= via intravenosa; v.o. = via oral.

3.3 Ensaios *in vitro*

3.3.1 Cultura de células

As linhagens A375 (melanoma humano, ATCC[®] CRL-1619TM) e U-87 MG (glioblastoma humano, ATCC[®] HTB-14TM) foram obtidas da ATCC (American Type Culture Collection, USA). O banco de células foi criado seguindo-se as recomendações do fornecedor e protocolo interno do laboratório de cultura de células do CIEnP. Após criação do banco de células, os lotes de trabalho foram mantidos em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, com alta glicose, glutamina, bicarbonato de sódio e piruvato de sódio) suplementado com soro fetal bovino (SFB, 10%) e Penicilina/Estreptomicina (1%). As células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ em garrafas de cultura até o momento da utilização para os ensaios. O subcultivo foi realizado conforme recomendações do fornecedor. Os cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas (CMC_{iPS}) foram produzidos e fornecidos pela empresa PluriCell Biotech e mantidos em cultura conforme especificações da empresa. Todas as linhagens do banco de células do CIEnP passam por checagem microbiológica periodicamente e encontravam-se livres de contaminação bacteriana (inclusive por *Mycoplasma*, verificado através de teste rápido e de coloração por Hoechst[®] 33258) durante os

experimentos reportados neste trabalho.

3.3.2 Determinação da atividade citotóxica dos acetohidroxamatos em células tumorais humanas

A avaliação da citotoxicidade dos acetohidroxamatos em células tumorais humanas foi realizada pelo ensaio colorimétrico de redução do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), no qual as mitocôndrias de células viáveis reduzem o sal do MTT a formazan, composto insolúvel em água de coloração roxa.

Para realização do ensaio de viabilidade, as células A375 e U-87 MG foram tripsinizadas, contadas e semeadas em placas de 96 poços ($1,4 \times 10^4$ células por poço, em 200 μL de meio). Após 24 horas, o meio de cultura foi substituído por meio contendo os veículos ou diferentes concentrações dos onze acetohidroxamatos (descritos na tabela 1) e as células foram incubadas por mais 48 horas. Os fármacos Paclitaxel (PTX) e Temozolamida (TMZ) foram utilizados como controle positivo (dados não mostrados). O tempo de incubação de 48 horas foi escolhido de acordo com resultados obtidos em ensaios piloto (dados não mostrados).

Após o término da incubação com os tratamentos, estes foram retirados e as células foram incubadas com 200 μL de meio de cultura contendo MTT (0,5 mg/mL) durante 4 horas. Após a incubação, a solução de MTT foi retirada e 100 μL de DMSO foram adicionados por poço para solubilização dos cristais de formazan formados. Após solubilização, a absorbância dos poços foi lida a 570 nm em leitor de microplacas SpectraMax i3x[®] (Molecular Devices).

Todos os ensaios foram realizados com, pelo menos, três réplicas, em três experimentos independentes. Para análise dos resultados, a proporção de células viáveis foi calculada em relação ao controle negativo (meio de cultura sem tratamento), utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Células Viáveis (\%)} = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do controle negativo}} \times 100$$

Após cálculo da porcentagem de células viáveis, os dados obtidos foram utilizados para cálculo da CI_{50} (concentração necessária para atingir 50% do efeito inibitório máximo do composto) a partir de regressão não-linear.

3.3.3 Determinação da atividade citotóxica dos acetohidroxamatos em células não tumorais humanas

A fim de avaliar a atividade citotóxica dos compostos em cardiomiócitos derivados de células-tronco induzidas (CMC_{IPS}), foram utilizadas os métodos colorimétricos de redução do MTT e de incorporação do corante vermelho neutro (VN) por células viáveis. Em condições fisiológicas de pH intracelular, o corante VN se difunde pelas membranas e se concentra nos lisossomos, onde fica retido devido a uma mudança de carga da molécula causada pelo pH mais baixo da organela. Quando a célula morre ou perde o gradiente de pH, o corante não fica mais retido, fazendo com que a quantidade de vermelho neutro retido seja proporcional à quantidade de células viáveis (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

Para realização dos ensaios, as células da linhagem CMC_{IPS} foram contadas e semeadas em placas de 96 poços (densidade média de 2×10^4 células por poço). Cinco dias após o plaqueamento, as células foram tratadas com duas concentrações dos compostos de interesse, sendo a primeira concentração correspondente ao valor de CI₅₀ obtido em linhagens tumorais e a outra 10 vezes superior à CI₅₀ correspondente. O quimioterápico Doxorrubicina foi utilizado como controle positivo. Após 48 horas de tratamento, as células foram submetidas aos protocolos de MTT (conforme descrito no item 3.3.2) ou Vermelho Neutro. Para realização do ensaio de Vermelho Neutro, o meio de manutenção das células foi substituído por meio contendo o corante em uma concentração de 80 µg/mL e incubado por 3 a 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, as células foram lavadas com solução contendo cloreto de cálcio (1 %) e formaldeído (0,5 %) em tampão fosfato salino (PBS), e, logo em seguida, o corante foi solubilizado em 100 µL da solução de eluição, contendo ácido acético (1 %) e etanol (50 %) em PBS. A quantificação do vermelho neutro foi realizada por meio da leitura das absorbâncias em 540 nm, utilizando o equipamento SpectraMax i3x® (Molecular Devices).

Todos os ensaios foram realizados com, pelo menos, três réplicas, em pelo menos dois experimentos independentes. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo tratado com veículo, como descrito no item 3.3.2.

3.3.4 Avaliação da atividade antiproliferativa dos acetohidroxamatos em células tumorais humanas

Para avaliação da atividade proliferativa dos compostos, foi utilizado o ensaio da Sulforrodamina B (SrB), o qual se baseia na capacidade deste corante em se ligar às proteínas celulares. Em ambiente levemente acidificado, a SrB se liga a proteínas de maneira linear (a quantidade de corante é diretamente proporcional à massa celular), sendo facilmente desligada e solubilizada em pH levemente alcalino.

O ensaio de SrB foi realizado conforme descrito por Vichai e Kirtikara (2006), com algumas modificações. Para o ensaio de proliferação celular, as células A375 e U-87 foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células por poço, em 100 μL de meio). Após 24 horas, o conteúdo de alguns poços foi fixado com 100 μL de ácido tricloroacético (TCA) 20% a 4 °C por 30 minutos, para realização do controle de não crescimento (T0). Os demais poços foram imediatamente incubados com 200 μL dos tratamentos de interesse em diferentes concentrações durante 48 horas, e posteriormente fixados com TCA 20% conforme descrito acima. O quimioterápico Temozolamida foi utilizado como controle positivo. Após fixação, as células foram lavadas com água e deixadas para secar a temperatura ambiente. Após secagem, 50 μL de SrB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) foram adicionados em cada poço, mantidos 30 minutos em contato com as células e posteriormente retirados, seguidos de quatro lavagens com ácido acético 1% e nova secagem. Por fim, 100 μL de Tris base 10 mM foram adicionados para solubilização da Sulforrodamina B incorporada. Após completa solubilização, a absorbância dos poços foi lida a 540 nm em leitor de microplacas SpectraMax i3x[®] (Molecular Devices).

Todos os ensaios foram realizados com, pelo menos, três réplicas, em três experimentos independentes. A análise dos resultados foi realizada conforme sugerido por Vichai & Kirtikara (2006), utilizando-se a fórmula abaixo, sendo DO a densidade óptica ou absorbância da amostra:

$$\% \text{ de crescimento em relação ao controle} = \frac{\text{DO}_{\text{amostra}} - \text{DO}_{\text{T0}}}{\text{DO}_{\text{controle negativo}} - \text{DO}_{\text{T0}}} \times 100$$

Após cálculo da porcentagem de crescimento para cada concentração, os dados obtidos foram utilizados para cálculo da GI₅₀ (do inglês, *growth inhibition 50%*, concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%) e TGI (do inglês, *total growth inhibition*,

concentração necessária para inibir 100% da proliferação celular). Foram também calculados os valores de CI_{50} , do mesmo modo descrito para o ensaio de MTT.

3.3.5 Avaliação do efeito dos acetohidroamatos sobre a capacidade clonogênica de células tumorais humanas

Para avaliar o potencial dos compostos de interferir na capacidade clonogênica das células tumorais sobreviventes ao tratamento, foi realizado o ensaio de clonogenicidade. Para isso, células da linhagem A375 foram plaqueadas em garrafas de 25 cm² ($2,9 \times 10^6$ células por garrafa). Após adesão das células, os tratamentos de interesse foram adicionados na própria garrafa e incubados durante 48 horas. O quimioterápico Cisplatina foi utilizado como controle positivo. Ao final do tempo de incubação os tratamentos foram retirados e as células foram lavadas com PBS, tripsinizadas e contadas. Após contagem, 1000 células viáveis de cada tratamento foram replaqueadas em placas de 6 poços e incubadas durante 10 dias, para permitir a formação de colônias. O meio de cultura foi renovado a cada 2-3 dias, e ao fim do experimento as células foram fixadas com metanol e coradas com cristal violeta 0,2% (em solução de metanol e água, 1:1).

A análise do ensaio foi feita através da contagem do número de colônias (contendo pelo menos 50 células) formadas após cada tratamento, e o resultado final foi expresso em relação ao veículo. Imagens representativas foram feitas com auxílio de câmera fotográfica. O ensaio foi realizado com duas réplicas, em dois experimentos independentes.

3.3.6 Avaliação da interferência do composto AKS 61 no ciclo celular de células tumorais humanas

A fim de avaliar a interferência do composto AKS 61 nas fases do ciclo celular, células da linhagem A375 foram semeadas em placas de 6 poços (3×10^5 células/poço) em meio com 0,5% de SFB, para sincronização das células em G0 (intérfase). Após 24 horas, o meio de plaqueamento foi substituído por meio suplementado com 10% de SFB contendo AKS 61, veículo ou Cisplatina (controle positivo). Após 24 e 48 horas de incubação com os tratamentos, as células (no sobrenadante e aderidas) foram coletadas, fixadas e permeabilizadas com solução BD

Cytofix/Cytoperm™ e finalmente marcadas com o intercalante de DNA 7-AAD, durante 15 minutos ao abrigo da luz, a fim de determinar o estágio do ciclo celular através do conteúdo de DNA de cada célula.

As células marcadas foram analisadas em citômetro de fluxo FACS Canto™ II. A Figura 4 exemplifica a estratégia de *gating* utilizada para quantificação das células em cada fase do ciclo celular. Foram adquiridos cerca de 10.000 eventos por amostra (correspondente a aproximadamente 10.000 células). Os ensaios foram realizados com, pelo menos, duas réplicas, em três experimentos independentes.

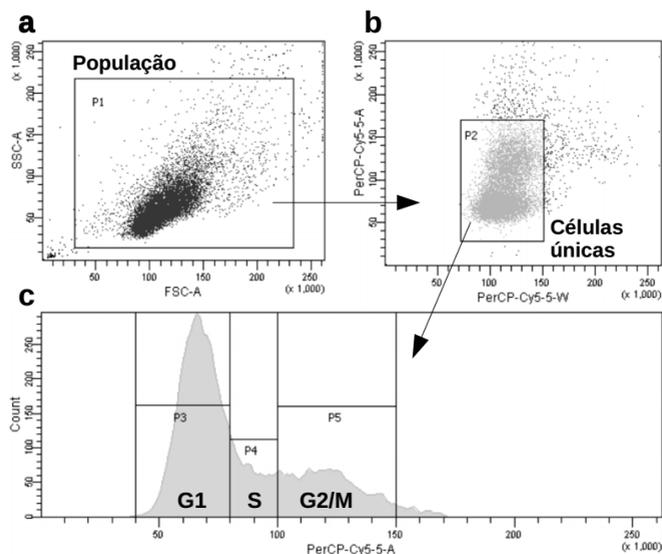


Figura 4. Estratégia de *gating* utilizada para a quantificação das células em cada fase do ciclo celular. (a) Seleção da população de eventos de interesse. (b) Seleção de células únicas, ou *singlets*, e exclusão de *doublets* celulares que foram analisados como um único evento. (c) Determinação da fase do ciclo celular de acordo com o conteúdo celular. A fase G1 foi definida de acordo com o valor do primeiro pico em células controle, enquanto a fase G2/M foi definida aproximadamente a partir do valor de $\text{Pico}_{G1} \times 2$. A fase S foi definida como o intervalo entre G1 e G2/M.

3.3.7 Avaliação do efeito do composto AKS 61 sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais humanas

O potencial de membrana mitocondrial é considerado um bom marcador para ativação da via intrínseca de apoptose. Com o objetivo de

detectar possíveis alterações no potencial de membrana mitocondrial (PMM) decorrentes do tratamento com o composto AKS 61, foi utilizado o ensaio de JC-1. Este corante acumula em mitocôndrias com alto potencial de membrana, formando agregados que emitem fluorescência vermelha. Já em mitocôndrias com baixo potencial de membrana, o mesmo corante fica distribuído predominantemente em monômeros devido à baixa concentração, os quais produzem uma fluorescência verde. Deste modo, uma redução da fluorescência vermelha em razão da fluorescência verde é indicativo de despolarização da membrana mitocondrial.

Para realização do ensaio, células da linhagem A375 foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células por poço. Após 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas com AKS 61, veículo ou Valinomicina (controle positivo) por 24 e 48 horas e posteriormente submetidas ao protocolo de coloração com JC-1. Para isso, os poços foram lavados com PBS e incubados com 100 μ L de JC-1 2,5 μ g/mL durante 20 minutos a 37 °C e 5% de CO₂. Decorrido o tempo de incubação, os poços foram lavados duas vezes com PBS e imediatamente analisados em leitor de microplacas SpectraMax® i3, utilizando os seguintes parâmetros:

- Fluorescência vermelha = excitação a 525 nm e emissão a 590 nm;
- Fluorescência verde = excitação a 490 nm e emissão a 530 nm.

Para análise dos resultados, foi calculada a razão entre a fluorescência vermelha e a fluorescência verde, e os resultados foram expressos em relação ao veículo correspondente. Os ensaios foram realizados com, pelo menos, três réplicas, em três experimentos independentes.

3.3.8 Avaliação da morte celular por apoptose induzida pelo composto AKS 61 em células tumorais humanas

Para avaliar a indução de morte celular por apoptose promovida por AKS 61, as células da linhagem A375 foram cultivadas conforme recomendado pelo fornecedor e semeadas em placas de 6 poços (3×10^5 células/poço). Após 24 horas do plaqueamento, as células foram incubadas com AKS 61, veículo ou Cisplatina (Controle positivo) por 24 ou 48 horas, coletadas (sobrenadante e células aderidas) e imediatamente marcadas com Anexina V e 7-AAD durante 15 minutos ao abrigo da luz. A Anexina V possui a habilidade de se ligar a moléculas de fosfatidilserina que foram translocadas para a porção

externa da membrana celular, fenômeno que ocorre em estágios iniciais de apoptose. Uma vez que o intercalante de DNA 7-AAD é expulso das células viáveis ou em apoptose inicial que ainda apresentam integridade de membrana, a avaliação com ambos os marcadores possibilita a diferenciação entre células viáveis, em apoptose inicial ou em estados tardios de apoptose.

Após a marcação, as células foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACS Canto™ II, conforme recomendado pelo fabricante do kit utilizado (Annexin V PE Apoptosis Detection Kit I – BD). Foram adquiridos cerca de 10.000 eventos (correspondente a 10.000 células), e a análise dos mesmos foi feita utilizando-se os filtros “PE” para detecção da Anexina V PE e “APC” para detecção do 7-AAD. O gráfico de pontos gerado foi dividido em quadrantes, e as células foram classificadas de acordo com o quadrante: Q1 = células mortas/restos celulares (PE -/7-AAD +); Q2 = células em apoptose tardia ou outros tipos de morte celular (PE +/7-AAD +); Q3 = Células viáveis (PE -/7-AAD -); Q4 = Células em apoptose inicial (PE +/7-AAD -), conforme ilustrado na figura 5. Os ensaios foram realizados pelo menos em duplicata e repetidos em três experimentos independentes.

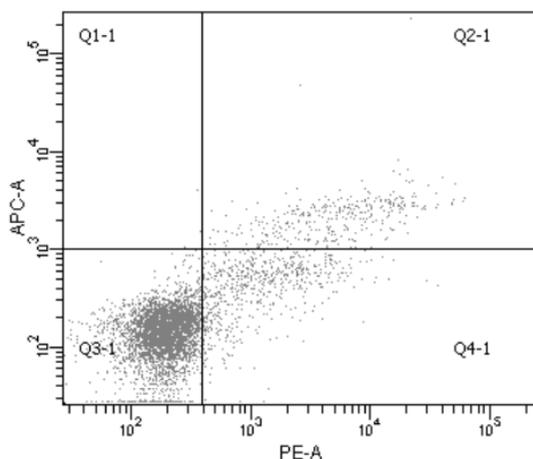


Figura 5. Exemplo de gráfico de pontos obtido após marcação de células com Anexina V PE e 7-AAD. Os quadrantes definem marcação positiva ou negativa para cada um dos marcadores, sendo que as células em Q1 são positivas somente para o marcador no eixo Y (APC), em Q4 são positivas somente para PE (eixo X), em Q2 são positivas para ambos e em Q3 negativas para ambos.

3.3.9 Avaliação da indução de autofagia promovida pelo composto AKS 61 em células tumorais

As células da linhagem A375 foram mantidas conforme recomendado pelo fornecedor e semeadas em lâminulas previamente tratadas com poli-L-lisina contidas dentro de placas de 12 poços, na densidade de 6×10^4 células. 24 horas após o plaqueamento, o meio foi substituído pelos tratamentos de interesse. O fármaco Cloroquina foi utilizado como controle positivo. Os poços tratados com Veículo e AKS 61 foram incubados durante 24 horas, enquanto os poços tratados com Cloroquina foram incubados por 16 horas. Após os períodos de incubação, as lamínulas contendo as células tratadas foram rapidamente transferidas para poços contendo metanol gelado e fixadas durante 15 minutos a -20 °C. Decorrido o tempo de fixação, as lamínulas foram lavadas com PBS e incubadas durante 60 minutos com tampão de bloqueio (5% de *normal goat serum* + 0,3% de Triton X-100 em PBS), a fim de reduzir marcações inespecíficas. Após o bloqueio, procedeu-se a incubação com o anticorpo primário *rabbit* anti-LC3B (1:200, Cat. #3868, Cell Signaling, Danvers, MA, EUA), durante cerca de 16 horas a 4-8 °C. Ao fim da incubação as lamínulas foram novamente lavadas em PBS e incubadas com anticorpo secundário fluorescente *Goat anti-Rabbit* Alexa® 594 (1:2.000, Cat. A11012, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), durante cerca de 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, as lamínulas foram lavadas com PBS e montadas em lâminas para microscopia com meio de montagem contendo DAPI (Cat. P36966, Molecular Probes®, Eugene, Oregon, EUA). As lâminas foram analisadas com auxílio do Digitalizador de lâminas Axio Scan 2.1, localizado no LAMEB II, CCB, UFSC. A análise qualitativa da presença de autofagolisossomos foi feita através da observação de pelo menos 10 campos por lâmina, em aumento de 400x.

3.4 Desenvolvimento e validação do método analítico para análise dos compostos em plasma de camundongos

Para possibilitar a quantificação dos compostos AKS 7, AKS 26 e AKS 61 em plasma de camundongo e a avaliação do perfil farmacocinético dos mesmos, um método analítico foi desenvolvido e validado.

A validação do método analítico foi conduzida conforme os guias das agências reguladoras ICH, FDA e ANVISA (Agência Nacional de

Vigilância Sanitária). O desenvolvimento e a validação da metodologia foram realizados por meio da obtenção e análise de curvas de calibração/linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, seletividade, recuperação e estabilidade. Uma vez validado, o método analítico foi utilizado para a quantificação dos acetohidroxiácidos nas amostras de plasma de camundongos, a fim de determinar o perfil farmacocinético dos compostos investigados. Informações mais detalhadas sobre a preparação das amostras e resultados das análises podem ser obtidas no relatório interno 013-DVM-019-16 do CIEnP e no Apêndice A.

3.4.1 Caracterização e ionização dos compostos em UPLC-MS/MS

O método analítico foi desenvolvido utilizando equipamento do tipo UPLC-MSMS, cujo sistema é composto por um espectrômetro de massas Xevo TQS com analisador de massas tipo triploquadrupolo, da marca Waters (Reino Unido). Este espectrômetro de massas permite monitorar o íon precursor e os íons produto de um determinado composto através de diferentes modos de varredura de massas. Neste trabalho, foi utilizado o modo MRM (Monitoramento de Reações Múltiplas), em que o terceiro quadrupolo trabalha com o monitoramento de um ou mais íons produto de m/z (razão massa/carga) específica provenientes da fragmentação de um íon precursor de interesse, o que possibilita o desenvolvimento de métodos mais seletivos e específicos. O espectrômetro de massas foi acoplado a um cromatógrafo a líquido de alta eficiência (Acquity H-Class) equipado com degaseificador, sistema de bombas quaternário, forno para coluna cromatográfica, amostrador com controle de temperatura e injetor automático, também da marca Waters. A aquisição e o tratamento dos dados foram realizados com o software MassLynx, versão 4.1.

O espectrômetro de massas foi calibrado nos modos de íons positivos e negativos com uma solução padrão de calibração de ácido fosfórico. Nitrogênio foi utilizado como gás nebulizante (150 L/hora) e gás secante (1100 L/hora). Outros parâmetros do MS: fonte de ionização, *electrospray*; tensão do capilar, 3000 V; temperatura da fonte, 550 °C; voltagem do cone, 30 V. Os parâmetros da cela de colisão foram: vazão do gás de colisão (argônio), 0,15 mL/min; energia de colisão, 30 eV (AKS 61), 20 eV (AKS 7) ou 16 eV (AKS 26).

Após a caracterização dos compostos através dos

escaneamentos de massa MS1Scan e *Daughter Scan*, as transições de massa 437,15 → 362,1 (AKS 61), 393,13 → 332,1 (AKS 7) e 435,14 → 374,1 *m/z* (AKS 26) foram escolhidas para o monitoramento dos compostos pelo modo MRM.

3.4.2 Condições cromatográficas

Para a separação cromatográfica do composto AKS 61 foi escolhida uma coluna cromatográfica de fase reversa C18 (Acquity UPLC® BEH C18 5,0 cm x 2,1 mm, 1,7 µm, marca Waters). Já para os compostos AKS 26 e AKS 7, a coluna utilizada foi uma coluna cromatográfica de fase reversa Kinetex Biphenyl (5,0 cm x 2,1 mm, 2,6 µm, marca Phenomenex).

Os solventes constituintes da fase móvel de ambas as colunas foram: ácido fórmico 0,1% em água desionizada (solvente A) e acetonitrila também contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente B). O modo de eluição por gradiente linear foi o que proporcionou a melhor separação do analito de outros interferentes da matriz, sendo que o gradiente de acetonitrila utilizado para o AKS 61 foi o seguinte: 0-2 minutos: 5%, 2-2:06 min: 5%-95%, 2:06-3:30 min: 95%, 3:30-4 min: 95%-5%, 4-6 min: 95%. Para o AKS 7 e AKS 26 foram utilizados os mesmos tempos de gradiente, porém iniciou-se a eluição com acetonitrila 50%, subindo para 95% e depois retornando para 50%. A taxa de fluxo da fase móvel foi fixada em 300 µL/min para o AKS 61 e 400 µL/min para o AKS 7 e AKS 26. Em todas as corridas, o volume injetado foi de 1,00 µL e o tempo de corrida foi de 6 minutos.

A temperatura do forno foi ajustada a 30°C para todas as corridas analíticas, já a temperatura do amostrador foi mantida a 10°C sempre que amostras, controles de qualidade ou calibradores permaneceram no equipamento.

3.4.3 Obtenção do plasma e extração dos compostos do plasma

Para o desenvolvimento e validação do método analítico foi gerado um banco de plasma de camundongos da linhagem CD1 não tratados. O volume de aproximadamente 1,5 mL de sangue circulante de cada animal foi coletado por punção cardíaca terminal e centrifugado, separadamente, a 4°C, 4.000 rpm por 15 minutos. O plasma resultante foi misturado para obtenção de um pool de plasma homogêneo, que foi

utilizado para confecção dos calibradores e controles de qualidade (CQs) necessários para validação do método analítico.

Tanto para os calibradores e CQs utilizados na validação no método quanto para as amostras de plasma de animais tratados provenientes dos ensaios de farmacocinética, a extração dos acetohidroxamatos do plasma foi realizada por precipitação de proteínas com acetonitrila. Para isso, acetonitrila foi adicionada a cada amostra de plasma, na proporção de 1 parte de plasma para cada 3 de acetonitrila (1:3). Posteriormente, as amostras foram agitadas em vórtex durante 10 segundos e centrifugadas por 5 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante de cada amostra foi então transferido para um vial de injeção e injetado em UPLC-MS/MS.

3.4.4 Validação do método analítico

3.4.4.1 Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção representa a menor concentração da substância de interesse que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, enquanto que o limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser medida com precisão e exatidão aceitáveis, utilizando um determinado método analítico (FARIA; DE SOUZA; DE OLIVEIRA, 2008). O limite de detecção pode ser calculado de três maneiras diferentes: método visual, método da relação sinal-ruído, e método baseado em parâmetros da curva analítica, sendo que neste trabalho optou-se por utilizar o primeiro método. O menor ponto da curva de calibração foi considerado como parâmetro validado para o limite de quantificação.

3.4.4.2 Linearidade

Para a avaliação da linearidade do método, foram construídas duas curvas de calibração distintas em plasma, em dois dias diferentes, na faixa de aplicação de 5,0 a 500,0 ng/mL (para AKS 61) ou de 20,0 a 300 ng/mL (para AKS 7 e AKS 26). Os calibradores foram preparados da seguinte maneira: primeiramente a curva de calibração (contendo seis pontos) foi construída em metanol em uma faixa de concentração de 0,2 a 20,0 µg/mL (para AKS 61) ou de 0,8 a 12,0 µg/mL (para AKS 7 e AKS 26) a partir de solução-mãe dos acetohidroxamatos

correspondentes na concentração de 40,0 µg/mL. Em seguida, cada ponto da curva em solvente foi diluído em plasma branco, acrescido de padrão interno e acetonitrila, resultando nas concentrações finais já descritas anteriormente.

As curvas de calibração foram injetadas sempre no mesmo dia do preparo, e a construção da curva de regressão linear foi obtida por meio do método dos mínimos quadrados. A linearidade foi avaliada considerando o coeficiente de correlação r e aplicando-se o teste de hipótese de linearidade *a priori*.

3.4.4.3 Seletividade

Para determinação da seletividade, o método analítico foi primeiramente desenvolvido em solvente. A seguir, os compostos foram adicionados na concentração correspondente ao limite de detecção de cada composto a doze amostras distintas de plasma branco, sendo que seis eram de camundongos fêmea e outras seis de camundongos macho. Em seguida, foram preparadas outras doze amostras de plasma branco, (seis de machos e seis de fêmeas), sem adição do composto para poder verificar se, no tempo de retenção dos analitos, ocorreria a eluição de algum interferente. Todas as amostras foram analisadas de acordo com as condições cromatográficas propostas.

3.4.4.4 Recuperação

Para a avaliação da eficiência da extração dos acetohidroxamatos da matriz biológica foram utilizados controles de qualidade (CQs) preparadas tanto em solvente (metanol) quanto em plasma, em três níveis de concentração: baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA). De acordo com recomendações da ANVISA, as concentrações dos CQs utilizadas foram as seguintes: CQB = limite de quantificação x 3; CQM = ponto médio da curva de calibração; CQA = entre 75 e 85% do maior ponto da curva de calibração. Os CQs em solvente foram preparados em triplicata e os CQs em plasma em quintuplicata.

3.4.4.5 Precisão

No presente trabalho foram avaliadas a precisão instrumental e a

precisão intraensaio. A precisão instrumental foi determinada pela injeção dez vezes consecutivas de um CQ em solvente na mesma concentração que o limite de quantificação (para o AKS 61) ou que o CQB (para AKS 7 e AKS 26). A resposta avaliada foi a razão de área entre o pico da Substância Teste e do padrão interno. Já para a avaliação da precisão intraensaio, foram preparadas cinco replicatas dos controles de qualidade CQB, CQM e CQA em plasma. A resposta avaliada para ambos ensaios foi a razão de área entre o pico da Substância Teste e do padrão interno e os resultados foram expressos como coeficiente de variação percentual (CV%).

3.4.4.6 Exatidão

Neste trabalho, a exatidão do método analítico foi calculada a partir de dados das curvas de calibração e também de dados dos CQs utilizados na determinação da precisão intraensaio. Os valores de exatidão foram calculados utilizando-se a fórmula abaixo, e expressos como o desvio em porcentagem *bias* do valor de referência.

$$\text{Exatidão (\%bias)} = \left(\frac{x_i - x}{x} \right) \times 100$$

Onde x_i é o valor de concentração experimental e x é o valor de concentração nominal da determinação.

3.4.4.7 Estabilidade

Os testes de estabilidade foram realizados apenas para os compostos AKS 7 e AKS 26, uma vez que o composto AKS 61 já havia sido abandonado nesta etapa do estudo. Para o ensaio de estabilidade em solução (metanol), foram preparados dois CQs em solvente nas concentrações de 60,0 e 270,0 ng/mL. Estes controles foram preparados em triplicata e analisados no dia do preparo das soluções (08 de agosto de 2016). Posteriormente, no dia 29/08/16 os compostos foram novamente pesados e outras soluções foram preparadas e analisadas. A estabilidade foi determinada através do coeficiente de variação percentual (CV%) entre a média das áreas dos picos cromatográficos dos CQs preparados no dia 08 de agosto com os preparados no dia 29 de agosto.

Para os testes de estabilidade em matriz biológica, amostras de AKS 7 ou AKS 26 em triplicata foram preparadas em plasma nas mesmas

concentrações utilizadas para o ensaio em solvente. Estas amostras foram analisadas no dia do preparo e posteriormente submetidas a um ciclo curto de congelamento/descongelamento (17 horas) ou a congelamento por longo período (30 dias). Após os períodos de congelamento, as amostras foram descongeladas a temperatura ambiente e reanalisadas. A estabilidade em matriz biológica foi determinada pelo coeficiente de variação percentual (CV%) entre a área do pico cromatográfico dos CQs antes e após os períodos de congelamento/descongelamento.

3.4.5 Identificação do possível metabólito glicuronídeo

Durante as análises de plasma provenientes dos ensaios de farmacocinética do AKS 7 administrado por via oral, foi detectada também uma substância cujo pico cromatográfico apresentou tempo de retenção (0,60 minutos) diferente do AKS 7 (1,17 minutos) (Apêndice B). Para detecção do AKS 7, foi utilizado o modo de escaneamento MRM, com monitoramento da transição $393 \rightarrow 332.1$ m/z (conforme descrito no item 3.4.1). Como o modo MRM só monitora transições pré-definidas, a substância só foi detectada porque coincidentemente possui o mesmo perfil de fragmentação do AKS 7. É importante frisar que este pico não foi observado em amostras de plasma branco fortalecido com AKS 7 nem em amostras provenientes de animais tratados com AKS 7 pela via intravenosa.

Para tentar identificar a substância que gerou o pico cromatográfico, foi confeccionado um pool de amostras provenientes de animais tratados com AKS 7 pela via oral, para aumentar a quantidade do composto desconhecido. Este pool de amostras foi submetido a outro modo de escaneamento (*Parent Scan*), com o objetivo de identificar e/ou confirmar os íons precursores do fragmento em comum. Analisando o fragmento 332.1 m/z , o equipamento identificou dois precursores: o primeiro com $[M+H]^+ = 393$ em 1,17 minutos (correspondente ao AKS 7) e o segundo com $[M+H]^+ = 569$ em 0,60 minutos (correspondente à substância desconhecida).

3.5 Ensaios *in vivo*

3.5.1 Animais

Para os ensaios de farmacocinética, foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem CD-1 (peso entre 25 e 40 gramas), enquanto que para os ensaios de tumor xenográfico foram utilizados camundongos da linhagem Crl:NU(NCr)-Foxn1tm (nude atômico, peso entre 20 e 35 gramas), sendo ambos provenientes do biotério de criação do Centro de Inovação e Ensaios Pré-Clínicos (CIEnP).

Tanto no biotério de criação quanto no biotério de manutenção, os animais foram mantidos em gaiolas conectadas a racks microisoladoras, medindo 23x42,2x17 cm (LxCxA, máximo de 5 animais por caixa). Todas as gaiolas continham forração tipo maravalha (ASPEN – Souralit®), material para nidificação e pequenos blocos de madeira Aspen como enriquecimento ambiental. As gaiolas dos camundongos nude atômicos também continham papel toalha autoclavado para nidificação e aquecimento. A maravalha utilizada para a cama foi previamente autoclavada e renovada periodicamente para manter o ambiente seco e limpo. A temperatura das salas foi ajustada para 21 ± 2 °C com faixa de umidade de 45-70%. Os animais foram mantidos em ciclo claro/escuro de 12h, com livre acesso a água e ração (exceto durante os ensaios de farmacocinética oral), sendo a ração da marca Nuvital CR1® (Quimtia, Colombo, Paraná, Brasil) autoclavada e a água, filtrada, clorada e embalada na máquina Hydropac (Lab Products, Belcamp, Maryland, EUA). O CIEnP realiza mensalmente a avaliação de potabilidade da água fornecida aos animais.

Todos os experimentos *in vivo* foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do CIEnP (protocolos 217/00, 222/00 e 239/00 CEUA-CIEnP) e foram conduzidos e reportados seguindo orientações das diretrizes ARRIVE (do inglês “*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*”) (KILKENNY et al., 2010). A única exceção foi em relação ao tamanho da amostra nos experimentos de tumor xenográfico, onde o número de animais por grupo (N=5) ficou abaixo do ideal devido a pouca quantidade de composto disponível para o tratamento prolongado dos animais. Contudo, tendo em vista a pequena variação dos resultados e a ausência de efeito antitumoral *in vivo*, esse fator não causou interferência na tomada de decisão do estudo.

Os seguintes procedimentos foram rigorosamente aplicados desde o planejamento experimental até a realização dos experimentos deste estudo: 1) Nenhum dado foi excluído ou incluído nos resultados; 2) Os animais foram distribuídos aleatoriamente nos diferentes grupos

experimentais; 3) Os experimentos foram realizados de forma cega, ou seja, o experimentador que avaliou o tamanho tumoral nos ensaios de tumor xenográfico subcutâneo não tinha conhecimento a respeito dos tratamentos dos animais e 4) Todos os parâmetros e testes estatísticos foram determinados antes do início da realização dos experimentos. A duração dos ensaios e o número de animais utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar efeitos consistentes.

3.5.2 Determinação do perfil farmacocinético dos acetohidroxamatos em camundongos

O perfil farmacocinético após tratamento intravenoso (i.v.) foi determinado para os compostos AKS 7, AKS 26 e AKS 61. O perfil farmacocinético após tratamento pela via oral (v.o.) e biodisponibilidade foi determinado apenas para o composto AKS 7. Os compostos foram diluídos conforme item 3.2, sem ultrapassar as concentrações e volume máximos recomendados de veículo para cada via utilizada.

Para determinação do perfil farmacocinético após tratamento i.v., camundongos da linhagem CD-1 foram anestesiados com isoflurano e tratados com 2 mg/kg (5 mL/kg) de AKS 7, AKS 26 ou AKS 61 pela veia caudal. As coletas de sangue foram realizadas 3, 5, 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos após os tratamentos. Já para a determinação do perfil farmacocinético após tratamento v.o., os animais foram mantidos em jejum por pelo menos três horas e posteriormente tratados por gavagem com 50 mg/kg ou 100 mg/kg de AKS 7 (10 mL/kg). Amostras de sangue foram coletadas 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 720 e 1440 minutos após a administração.

Para realização da coleta de sangue, os animais foram anestesiados com isoflurano. As amostras foram coletadas a partir de punção da veia facial ou punção cardíaca (coleta terminal) e armazenadas em tubos contendo anticoagulante (heparina sódica). Foram coletados no máximo 100 µL de sangue por ponto de coleta (exceto coleta terminal). Logo após a coleta, as amostras foram centrifugadas (4.000 rpm, 4-8 °C, por 15 minutos) e o plasma obtido foi separado e armazenado a -80 °C até o momento de análise. Foram realizadas no máximo três coletas por animal, sendo a última sempre terminal. N = 3 a 5 animais por ponto de coleta.

A análise do plasma e quantificação dos compostos foram realizadas por método padronizado conforme o item 3.4. Após análise, o perfil farmacocinético das substâncias e os seguintes parâmetros

farmacocinéticos foram determinados: Concentração inicial (C_0), Volume de distribuição (Vd), Concentração Máxima (C_{max}), tempo necessário para atingir a concentração máxima (T_{max}), tempo de meia-vida ($t_{1/2}$), Constante de eliminação (K_e), Área sob a curva do zero ao infinito (AUC_{∞}) e Clearance total (CL). Além disso, também foi calculada a biodisponibilidade absoluta (F) do composto AKS 7.

3.5.3 Avaliação da atividade antitumoral do composto AKS 61 em modelo de tumor xenográfico subcutâneo

Para indução de modelo de tumor xenográfico (melanoma humano), células da linhagem A375 foram cultivadas conforme orientações do fornecedor. No dia da inoculação, as células foram tripsinizadas, contadas e ressuspensas em meio de cultura, na concentração de 2×10^6 células/100 μ L. A suspensão de células foi imediatamente inoculada no dorso de camundongos nude atímicos (2×10^6 células por animal, via subcutânea, s.c.). O crescimento do tumor foi acompanhado periodicamente através da aferição do comprimento e largura do tumor com auxílio de paquímetro eletrônico. O volume tumoral foi calculado a partir da fórmula a seguir:

$$\text{Volume tumoral}(\text{mm}^3) = \frac{\text{comprimento}(\text{mm}) \times \text{largura}(\text{mm})^2}{2}$$

Após os tumores atingirem cerca de 100-200 mm^3 , os animais foram randomizados de maneira sistemática (ou em blocos), a fim de obter grupos com médias de volume tumoral semelhantes entre si. Os tratamentos foram iniciados no dia da randomização e persistiram até o fim do experimento, conforme esquemas de tratamento descritos na tabela 3. A concentração de AKS 61 utilizada foi escolhida por ser correspondente a aproximadamente cem vezes o valor da CI_{50} deste composto em células A375 (após administração intravenosa e difusão no sangue). O volume tumoral, peso e sobrevivência dos animais foram monitorados durante todo o período.

Com o objetivo de evitar o sofrimento animal, os experimentos foram finalizados logo após a média de volume tumoral do grupo Veículo atingir 2.000 mm^3 . Os animais foram eutanaziados em câmara de CO_2 e submetidos à necrópsia para coleta de sangue, retirada do tumor primário e investigação geral.

Tabela 3. Esquemas de tratamento utilizados para cada grupo experimental durante os ensaios de tumor xenográfico.

Grupo Experimental	Dose	Via	Veículo	Frequência de tratamento
Veículo AKS 61	-	i.v.	2,5% DMSO + 1% Tween 80 em salina	1x/dia
AKS 61	2 mg/kg	i.v.	2,5% DMSO + 1% Tween 80 em salina	1x/dia
Cisplatina	2 mg/kg	i.p.	salina	3x/semana

i.v. = intravenosa; i.p.= intraperitoneal

3.6 Fármacos e reagentes

Os acetohidroxamatos foram sintetizados pelos professores Alexander Kornienko, Alexander V. Aksenov e colaboradores na North Caucasus Federal University, conforme descrito no item 3.1.

As linhagens de células tumorais A375 e U-87 MG foram adquiridas da ATCC (Manassas, VA, USA). A linhagem CMC_{iPS} e seus meios de cultivo específicos foram fornecidos pela empresa PluriCell Biotech (São Paulo, SP, Brasil). O meio de cultura DMEM (Cat. D6429, Sigma), Soro Fetal Bovino, Tripsina com EDTA e solução de Penicilina/Estreptomina foram adquiridos das empresas Gibco (Grand Island, NY, USA) e Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Os corantes MTT, Vermelho Neutro e Sulforrodamina B foram também obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), bem como os fármacos Paclitaxel, Cisplatina, Temozolamida, Cloroquina e Valinomicina.

O kit “Annexin V PE Apoptosis Detection Kit I – BD”, o corante JC-1 e a solução BD Cytotfix/CytopermTM foram adquiridos da empresa Becton Dickinson (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA).

Os reagentes Metanol, DMSO, Etanol, Formaldeído, Ácido tricloroacético e Cristal Violeta foram obtidos da empresa LabSynth (Diadema, SP, Brasil). Os reagentes de grau analítico Metanol e Acetonitrila foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

A Doxorubicina foi gentilmente doada pelo Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON, Florianópolis, SC, Brasil).

3.7 Análise Estatística

Para os ensaios de viabilidade e de proliferação celular (MTT e SrB), os resultados estão apresentados como a $CI_{50} \pm 95\%$ de intervalo de confiança de três experimentos independentes. A CI_{50} foi calculada através de regressão não linear (dose resposta – inibição) do gráfico concentração/resposta de cada composto. Foi utilizada a CI_{50} relativa, calculada com base na inibição máxima da substância. Os valores de GI_{50} e TGI foram obtidos a partir de regressão não linear e posterior interpolação dos valores desejados na curva ($Y=50$ para GI_{50} e $Y=0$ para TGI). Para os demais ensaios *in vitro*, os resultados estão apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM) de pelo menos dois experimentos independentes.

Para os ensaios de farmacocinética, os resultados foram representados como média \pm desvio padrão para os gráficos de perfil farmacocinético ($n=3$ a 5/ponto de coleta). Os parâmetros farmacocinéticos foram determinados utilizando os modelos monocompartimental e bicompartimental, e cinética de primeira ordem, com auxílio do programa WinNonlin® (Princeton, NJ, USA). Nos ensaios xenográficos os dados são apresentados como média \pm EPM ($n=5-10$ /grupo).

As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais com valores dentro da distribuição normal foram detectadas com análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo Teste de Dunnet ou Newman-Keuls (para experimentos com apenas uma variável independente) ou ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni (para experimentos com mais de uma variável independente). Valores de p menores que 0,05 ($* = p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância. Os cálculos e análises estatísticas (exceto cálculo de parâmetros farmacocinéticos) foram realizados com auxílio do programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

4.1 Atividade citotóxica dos acetohidroxiatos em linhagens tumorais humanas

O ensaio de MTT é amplamente utilizado para avaliação de citotoxicidade (RISS; NILES; MINOR, 2004). A fim de avaliar o potencial citotóxico dos acetohidroxiatos, células das linhagens tumorais U-87 MG e A375 foram expostas durante 48 horas a concentrações entre 0,03 e 100 μM de cada um dos compostos, e posteriormente avaliadas quanto à sua viabilidade através do ensaio de MTT. Utilizando as curvas de concentração-resposta obtidos com o ensaio, foram calculados os valores de CI_{50} e I_{max} para cada tipo celular. Os resultados observados em células U-87 MG e A375 estão representados nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4. Valores de CI_{50} e de inibição máxima dos compostos na linhagem U-87 MG obtidos pelo ensaio de MTT.

Composto	CI_{50} e $\text{IC}_{95\%}$ (μM)	I_{max} (%)
AKS 7	19,21 (10,60 – 34,78)	88,0
AKS 26	8,70 (4,94 – 15,32)	87,9
AKS 43	13,62 (7,22 – 25,69)	87,1
AKS 51	10,05 (5,83 – 17,30)	85,5
AKS 52	11,42 (5,98 – 21,79)	84,9
AKS 56	15,95 (8,67 – 29,39)	84,7
AKS 57	13,95 (7,45 – 26,12)	77,1
AKS 58	8,49 (4,89 – 14,74)	80,3
AKS 59	13,02 (7,18 – 23,62)	85,5
AKS 60	12,76 (5,95 – 27,35)	80,0
AKS 61	12,66 (6,36 – 25,23)	84,1

CI_{50} = Concentração necessária para atingir 50% da citotoxicidade máxima; I_{max} = Inibição máxima da viabilidade celular. Os valores foram calculados através de regressão não linear e representam a média e intervalo de confiança de 95% ($\text{IC}_{95\%}$, entre parênteses) obtidos a partir de três experimentos independentes.

Tabela 5. Valores de CI_{50} e de inibição máxima dos compostos na linhagem A375 obtidos pelo ensaio de MTT.

Composto	CI_{50} e $IC95\%$ (μM)	I_{max} (%)
AKS 7	4,20 (2,48 – 7,12)	88,3
AKS 26	3,94 (2,31 – 6,73)	89,3
AKS 43	3,98 (2,34 – 6,74)	89,0
AKS 51	4,36 (2,67 – 7,13)	88,4
AKS 52	4,39 (2,64 – 7,30)	85,9
AKS 56	6,20 (3,41 – 11,25)	86,2
AKS 57	6,76 (3,78 – 12,10)	86,5
AKS 58	4,51 (2,80 – 7,26)	87,5
AKS 59	5,34 (3,13 – 9,10)	88,1
AKS 60	3,64 (2,27 – 5,85)	85,7
AKS 61	0,58 (0,41 – 0,82)	86,2

CI_{50} = Concentração necessária para atingir 50% da citotoxicidade máxima; I_{max} = Inibição máxima da viabilidade celular. Os valores foram calculados através de regressão não linear e representam a média e intervalo de confiança de 95% ($IC95\%$, entre parênteses) obtidos a partir de três experimentos independentes.

Com os resultados obtidos neste ensaio, foi possível verificar que todos os compostos avaliados possuem atividade citotóxica frente às linhagens testadas, com CI_{50} entre 0,58 e 19,21 μM e inibição máxima da viabilidade celular em torno de 85%. Ainda, foi possível observar que a linhagem A375 apresentou maior sensibilidade ao tratamento com os acetohidroxamatos.

Levando-se em conta os valores de CI_{50} e I_{max} obtidos no ensaio de MTT, bem como os valores de $\log P$ teóricos das substâncias investigadas (Tabela 1), os compostos AKS 7, AKS 26 e AKS 61 foram escolhidos para prosseguir com os próximos experimentos deste trabalho.

4.2 Efeito citotóxico e antiproliferativo dos acetohidroxamatos em linhagens tumorais humanas

Para avaliar o potencial citotóxico dos acetohidroxamatos escolhidos por um método com fundamento diferente do MTT, foi escolhido o ensaio de Sulforrodamina B (SrB). Além de possuir

sensibilidade e reprodutibilidade comparáveis ao MTT em ensaios de citotoxicidade, este ensaio é também amplamente utilizado para a avaliação de proliferação celular, possibilitando a distinção entre substâncias citostáticas e substâncias citotóxicas (SHOEMAKER, 2006; VICHAI; KIRTIKARA, 2006).

As células das linhagens tumorais U-87 MG e A375 foram expostas durante 48 horas a concentrações entre 0,1 e 30 μM de AKS 7, AKS 26 ou AKS 61, além de concentrações entre 30 e 1000 μM de Temozolamida (TMZ), utilizada como controle positivo. Para possibilitar o cálculo da inibição de proliferação, foi também realizado um controle de não crescimento (T_0), conforme descrito anteriormente na sessão 3.3.4.

Os gráficos de viabilidade e de proliferação obtidos podem ser observados na figura 6. Os valores calculados para CI_{50} , GI_{50} e TGI e seus respectivos intervalos de confiança estão descritos nas tabelas 6 e 7, para as linhagens celulares U-87 MG e A375, respectivamente.

Tabela 6. Valores de CI_{50} , I_{max} , GI_{50} e TGI e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para os compostos na linhagem U-87 MG, após ensaio de SrB.

Composto	CI_{50} (μM)	I_{max} (%)	GI_{50} (μM)	TGI (μM)
AKS 7	7,80 (5,70 – 10,67)	86,0	4,12 (2,54 – 6,08)	10,67 (7,78 – 15,40)
AKS 26	3,81 (2,97 – 4,88)	88,8	1,95 (1,37 – 2,62)	5,19 (4,03 – 7,01)
AKS 61	3,59 (2,53 – 5,09)	86,4	1,66 (0,97 – 2,56)	5,69 (3,82 – 9,25)
TMZ	324,9 (275,4 – 383,3)	78,1	272,6 (203,5 – 329,0)	449,7 (355,6 – 691,3)

CI_{50} = Concentração necessária para atingir 50% da citotoxicidade máxima; I_{max} = Inibição máxima da viabilidade celular; GI_{50} = Concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%; TGI= Concentração necessária para inibir 100% da proliferação celular. Os valores foram calculados através de regressão não linear e interpolação (para GI_{50} e TGI), e representam a média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses) obtidos a partir de três experimentos independentes.

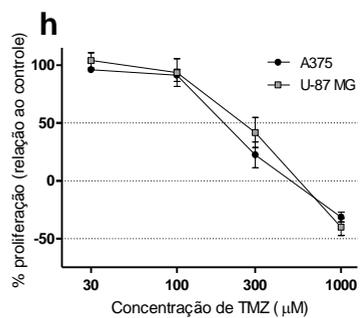
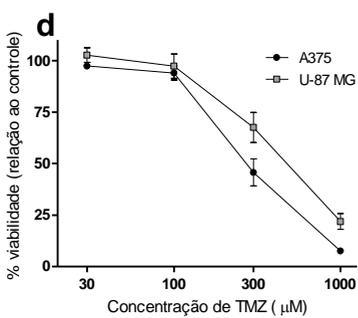
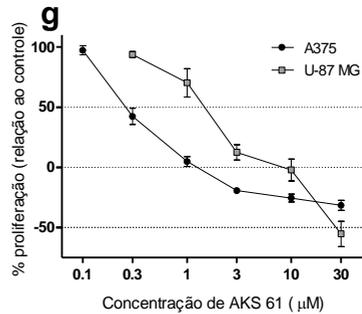
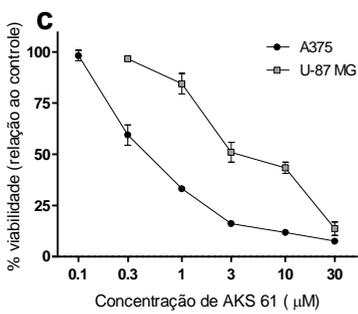
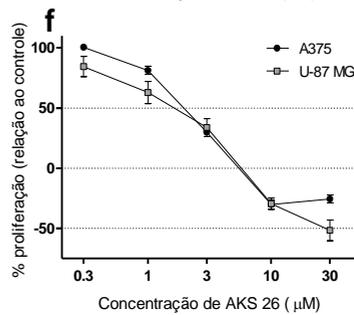
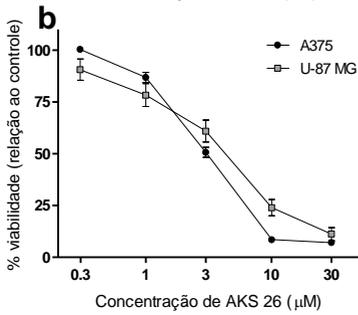
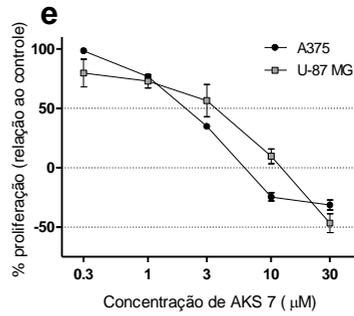
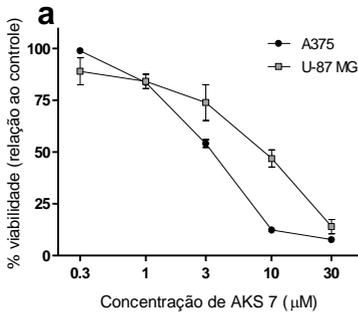


Figura 6. Curvas concentração-resposta de viabilidade e proliferação celular obtidas a partir do ensaio de SrB para as linhagens U-87 MG e A375. As linhagens tumorais foram semeadas em placas de 96 poços (2×10^4 células/poço), expostas a diferentes concentrações dos compostos durante 48 horas e submetidas ao ensaio de SrB. Os gráficos representam a média \pm EPM da porcentagem de células em relação ao controle obtida em três experimentos independentes (a-d) Curvas concentração-resposta obtidas para os diferentes compostos no ensaio de viabilidade celular por SrB (calculado sem levar em consideração o controle de não crescimento (T0)). (e-h) Curvas concentração-resposta obtidas para os diferentes compostos no ensaio de proliferação celular por SrB. Nestes gráficos, é possível calcular a GI_{50} e a TGI através da interpolação dos pontos da curva em $Y=50$ e $Y=0$, respectivamente.

Tabela 7. Valores de CI_{50} , I_{max} , GI_{50} e TGI e seus respectivos intervalos de confiança obtidos para os compostos na linhagem A375, após ensaio de SrB.

Composto	CI_{50} (μ M)	I_{max} (%)	GI_{50} (μ M)	TGI (μ M)
AKS 7	2,79 (1,99 – 3,90)	92,3	2,16 (1,88 – 2,44)	5,34 (4,54 – 6,46)
AKS 26	2,45 (1,74 – 3,43)	93,0	2,06 (1,82 – 2,30)	4,81 (4,11 -5,73)
AKS 61	0,47 (0,36 – 0,61)	92,5	0,31 (0,25 – 0,38)	1,04 (0,81 – 1,38)
TMZ	271,7 (132,7 – 556,3)	92,4	231,2 (153,8 – 272,3)	379,3 (318,4 – 548,3)

CI_{50} = Concentração necessária para atingir 50% da citotoxicidade máxima; I_{max} = Inibição máxima da viabilidade celular; GI_{50} = Concentração necessária para inibir a proliferação celular em 50%; TGI= Concentração necessária para inibir 100% da proliferação celular. Os valores foram calculados através de regressão não linear e interpolação (para GI_{50} e TGI), e representam a média e intervalo de confiança de 95% (entre parênteses) obtidos a partir de três experimentos independentes.

Os acetohidroxamatos testados apresentaram ação citostática em concentrações menores do que as necessárias para reduzir a viabilidade celular. Já em concentrações mais elevadas, estes compostos apresentam também ação citotóxica, sendo capazes de reduzir a quantidade celular a valores abaixo dos observados no controle de não crescimento (tempo 0).

Corroborando os resultados obtidos no ensaio de MTT, as células da linhagem A375 novamente mostraram-se mais sensíveis ao

tratamento com os acetohidroxiatos. Por estes motivo, esta linhagem foi escolhida para a realização dos experimentos posteriores.

4.3 Efeito citotóxico dos acetohidroxiatos em cardiomiócitos derivados de células-tronco pluripotentes induzidas

A toxicidade a diversos órgãos e tecidos associada ao uso de quimioterápicos ainda é um dos principais fatores limitantes do tratamento antineoplásico. Neste cenário, a toxicidade cardiovascular é um dos efeitos adversos mais frequentes, o qual pode aumentar as chances de morte prematura em pacientes que sobreviveram ao câncer (CROSS et al., 2015; ZAMORANO et al., 2016).

Com o objetivo de avaliar o potencial citotóxico dos acetohidroxiatos sobre células não tumorais, as células CMC_{iPS} foram expostas aos compostos AKS 7, AKS 26 e AKS 61 durante 48 horas. Foram testadas duas concentrações de cada composto: uma concentração próxima à média das CI₅₀ obtidas para células U-87 MG e A375, e outra 10 vezes superior à primeira. O quimioterápico doxorubicina foi utilizado como controle positivo. A viabilidade celular pós-tratamento foi avaliada através dos ensaios de MTT e Vermelho Neutro (VN). Os resultados obtidos podem ser observados na figura 7.

Os resultados apresentados mostram que os três compostos testados possuem citotoxicidade significativa frente a células CMC_{iPS}, nas concentrações 10 vezes acima da CI₅₀ média (exceto o composto AKS 61 no ensaio de Vermelho Neutro). Entretanto, nas concentrações mais baixas, o composto AKS 61 não apresentou atividade citotóxica em nenhum dos ensaios e o composto AKS 7 apresentou citotoxicidade apenas no ensaio de vermelho neutro. Ainda, conforme esperado, o controle positivo Doxorubicina apresentou efeito citotóxico significativo em ambas as concentrações testadas.

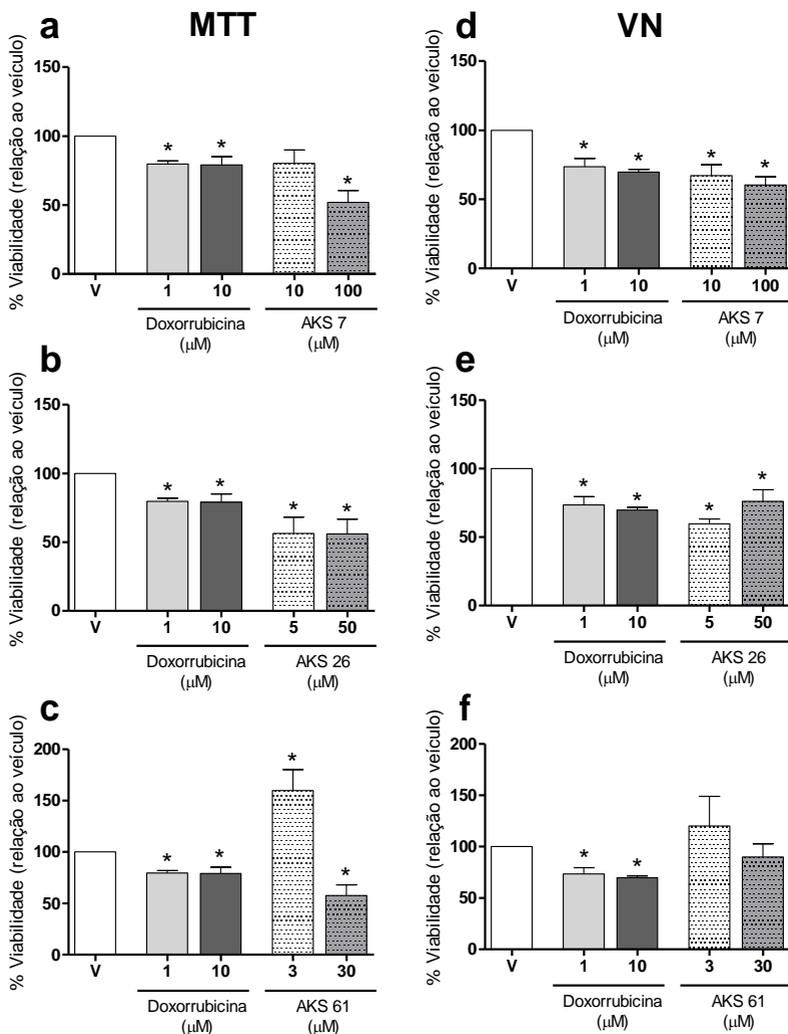


Figura 7. Viabilidade celular da linhagem CMC_{iPS} após tratamento com acetohidroxiatos. CMC_{iPS} foram expostos a Doxorubicina (controle positivo) ou aos acetohidroxiatos durante 48 horas. A viabilidade celular ao fim do experimento foi avaliada através dos ensaios de MTT (a-c) e Vermelho Neutro (d-f). Os resultados foram expressos como média ± EPM de dois (VN) ou três (MTT) experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (DMSO 0,5%). ANOVA de uma via seguida de teste de Newman-Keuls. V= Veículo.

4.4 Efeito dos acetohidroxamatos sobre a capacidade clonogênica de células tumorais humanas

O ensaio de clonogenicidade permite avaliar os efeitos citotástico de um composto a longo prazo, uma vez que este modelo investiga a capacidade de células previamente submetidas ao tratamento de gerar novos clones e formar colônias celulares (SUMANTRAN, 2011).

Para avaliar o efeito dos acetohidroxamatos sobre esta capacidade das células tumorais, células da linhagem A375 foram tratadas durante 48 horas com 3 μM de AKS 7, AKS 26, AKS 61 ou Cisplatina (CIS, 1 e 10 μM , utilizada como controle positivo). Ao fim do tratamento, as células viáveis foram replaqueadas, com o objetivo de avaliar a capacidade clonogênica de cada célula sobrevivente. Dez dias após, a quantidade de colônias formadas foi verificada. Conforme mostrado na Figura 8, o composto AKS 61 inibiu quase que completamente a capacidade clonogênica das células testadas (apenas uma colônia formada em um dos dois experimentos), com efeito comparável ao do quimioterápico Cisplatina, que inibiu completamente a formação de colônias na concentração de 10 μM . Já os compostos AKS 7 e AKS 26 não foram capazes de reduzir a capacidade clonogênica das células nas condições avaliadas.

Com base no conjunto de resultados obtidos até este momento, o acetohidroxamato AKS 61 foi escolhido para proceder com os demais estudos *in vitro* e *in vivo*.

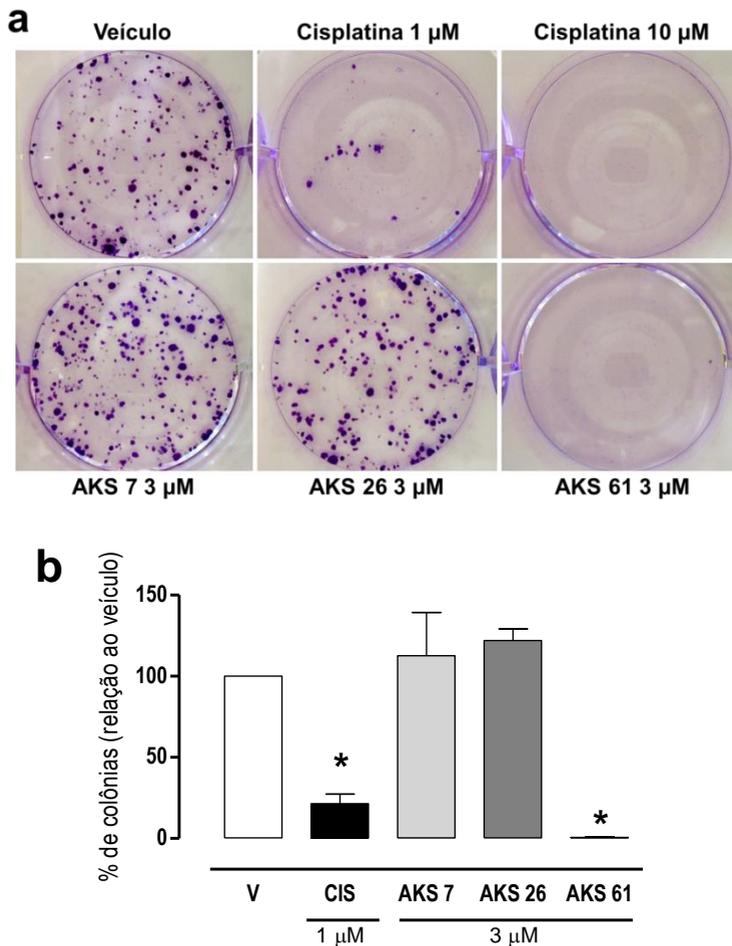


Figura 8. Efeito dos acetohidroxamatos sobre a capacidade clonogênica de células A375. Células A375 sobreviventes aos tratamentos (48 horas) foram replaqueadas em placas de seis poços em baixa densidade (1000 células por poço) e incubadas durante dez dias. As colônias formadas foram coradas com cristal violeta e contadas. **(a)** Imagens representativas das colônias coradas com cristal violeta. **(b)** Média \pm EPM da quantidade de colônias (porcentagem em relação ao veículo) observadas em dois experimentos independentes. O grupo Cisplatina 10 μ M não foi representado no gráfico, por não apresentar crescimento de colônias em nenhum dos experimentos realizados. * $p < 0,05$ em relação ao veículo (ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett).

4.5 Efeito do composto AKS 61 sobre as fases do ciclo celular em células tumorais humanas

A capacidade de manter a sinalização de proliferação, mesmo sob condições supressoras, é uma das características essenciais das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Uma das formas de avaliar esta capacidade de manter-se em divisão celular é através da realização do ensaio de ciclo celular.

Os resultados dos ensaios de SrB e clonogenicidade apresentados anteriormente sugerem que os acetohidroxamatos aqui testados possuem tanto atividade citotóxica quanto citostática, numa relação concentração-dependente. Com o objetivo de avaliar de uma maneira mais específica se o composto AKS 61 seria capaz de causar parada do ciclo celular em algum estágio específico, foi realizado o ensaio de ciclo celular. Para isso, células da linhagem A375 foram incubadas durante 24 ou 48 horas com veículo, AKS 61 ou Cisplatina (controle positivo). Após este período, as células foram permeabilizadas e marcadas com o intercalante de DNA, 7-AAD, para possibilitar a avaliação do conteúdo de DNA presente em cada célula. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo, e os resultados obtidos podem ser observados na figura 9.

Embora não tenha sido observada diferença estatística, os resultados obtidos mostram que o tratamento com 1 μ M de AKS 61 parece causar modulação bifásica do ciclo celular, com pequeno acúmulo de células em fase G2/M nas primeiras 24 horas e posterior redução de células em G2/M associado com aumento de células em fase G1 48 horas após o tratamento. O tratamento com Cisplatina causou acúmulo significativo de células em fase S e G2/M, conforme já esperado para este quimioterápico (SORENSEN; EASTMAN, 1988).

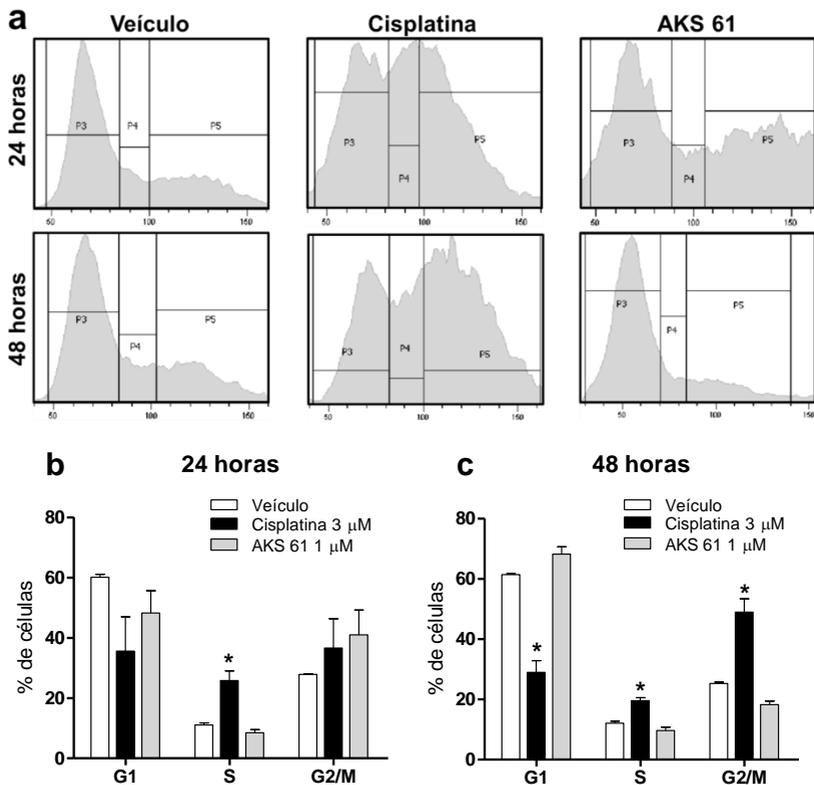


Figura 9. Avaliação dos estágios do ciclo celular por meio de marcação com 7-AAD. Células da linhagem A375 foram sincronizadas em G0 e posteriormente incubadas com Veículo (DMSO 0,01%), Cisplatina (3 μ M) ou AKS 61 (1 μ M) durante 24 (b) ou 48 horas (c). Após o tempo de incubação, as células foram coletadas, fixadas e permeabilizadas. O conteúdo de DNA celular foi avaliado em citômetro de fluxo através da marcação com 7-AAD. Os dados obtidos foram utilizados para calcular a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. (a) Imagens representativas dos histogramas obtidos após análise em citômetro de fluxo. (b,c) Média \pm EPM de três experimentos independentes realizados 24 (b) ou 48 horas (c) após os tratamentos. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett).

4.6 Efeito do composto AKS 61 sobre o potencial de membrana mitocondrial de células tumorais humanas

O potencial de membrana mitocondrial (PMM) é considerado um importante parâmetro de função mitocondrial, sendo que alterações neste potencial podem desencadear morte celular por apoptose (GOTTLIEB et al., 2003; TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007).

A fim de avaliar o efeito do tratamento com AKS 61 sobre o PMM, utilizou-se a coloração por JC-1. Neste ensaio, à medida que o potencial de membrana diminui, a razão entre a fluorescência vermelha e a fluorescência verde do corante também diminui. Para a realização do ensaio, células da linhagem A375 foram tratadas com AKS 61 nas concentrações de 0,3 ou 3 μM , seus respectivos veículos ou com Valinomicina 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle positivo), durante 24 e 48 horas. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 10.

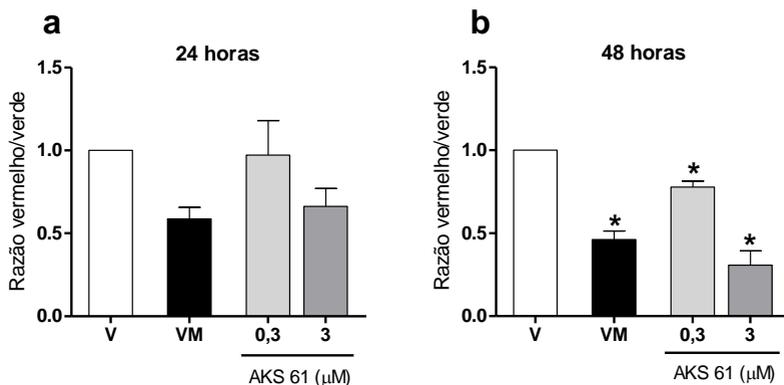


Figura 10. Avaliação do efeito do AKS 61 sobre o potencial de membrana mitocondrial por meio de coloração com JC-1. Células da linhagem A375 foram tratadas com veículo (V, DMSO 0,003% para AKS 61 0,3 μM ou DMSO 0,03% para AKS 61 3 μM), AKS 61 (0,3 ou 3 μM) ou Valinomicina (VM, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), durante 24 horas (a) e 48 horas (b), e posteriormente submetidas ao protocolo de avaliação de PMM por JC-1. Os gráficos representam a média \pm EPM da razão vermelho/verde em relação ao veículo correspondente, obtidos a partir de três (b) ou 4 (a) experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett).

O tratamento com AKS 61 induziu queda significativa no potencial de membrana mitocondrial 48 horas após o tratamento (figura

10b), tanto na concentração de 3 μM quanto na de 0,3 μM . Conforme esperado, o controle positivo Valinomicina também induziu queda no potencial de membrana mitocondrial após 48 horas.

4.7 Avaliação da morte celular por apoptose induzida pelo composto AKS 61 em células tumorais humanas

Tendo em vista que o tratamento com AKS 61 mostrou-se eficaz em promover queda no potencial de membrana mitocondrial, e que alterações neste parâmetro são capazes de desencadear a via de apoptose intrínseca (FULDA; DEBATIN, 2006; GOTTLIEB et al., 2003), foi realizado o ensaio de apoptose por Anexina V e 7-AAD.

Para realização deste, células A375 foram tratadas durante 24 e 48 horas com AKS 61 (1 μM e 3 μM), veículo (DMSO 0,03%) ou com Cisplatina (3 μM) e posteriormente incubadas com Anexina V e 7-AAD e analisadas em citômetro de fluxo. Neste ensaio, é possível distinguir células em apoptose inicial (onde há apenas exposição de fosfatidilserina na membrana) e apoptose tardia/necrose (onde há também perda da integridade da membrana).

Na figura 11 observa-se que o tratamento com AKS 61 na concentração de 3 μM induziu aumento do número de células em apoptose inicial (Q4) após 24 horas (figura 11b). Após 48 horas, a maioria das células tratadas já se encontrava em estágios finais de apoptose ou outro tipo de morte celular (Q2) (figura 11c). Conforme esperado, a Cisplatina (controle positivo) também induziu apoptose, porém apenas no tempo 48 horas (figura 11c).

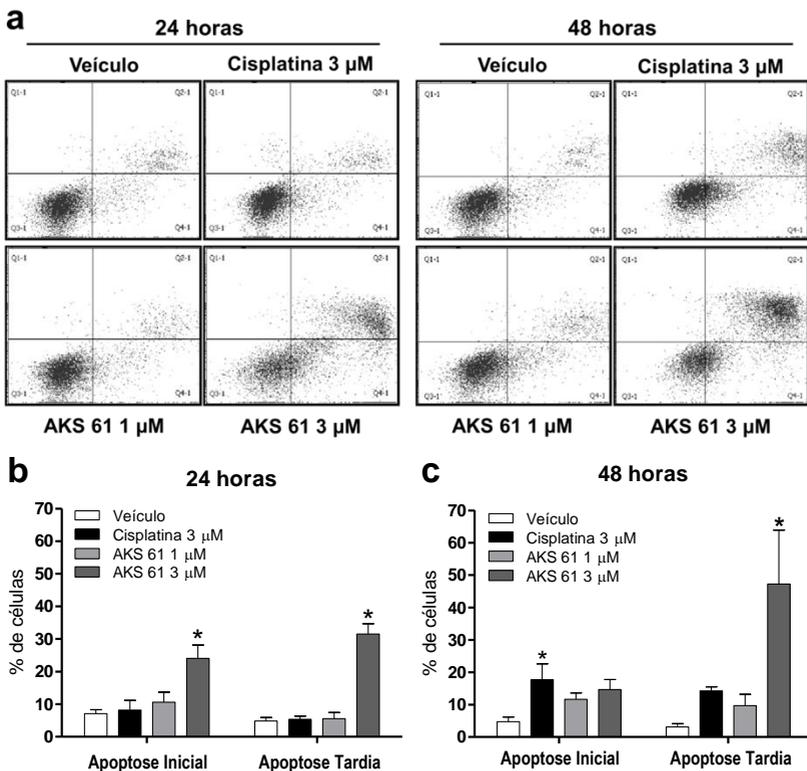


Figura 11. Avaliação de morte celular por apoptose por meio de marcação com Anexina V (PE) e 7-AAD. Células da linhagem A375 foram incubadas com Veículo (DMSO 0,03%), Cisplatina (3 μ M) ou AKS 61 (1 ou 3 μ M) durante 24 (b) e 48 horas (c). Após o tempo de incubação, as células foram coletadas, submetidas à marcação com Anexina V (PE) e 7-AAD e imediatamente analisadas em citômetro de fluxo. Q1 = células mortas/restos celulares (PE- /7-AAD +); Q2 = células em apoptose tardia ou outros tipos de morte celular (PE+/7-AAD+); Q3 = Células viáveis (PE- /7-AAD -); Q4 = Células em apoptose inicial (PE+/7-AAD-). (a) Imagens representativas dos gráficos de pontos obtidos após análise das células tratadas em citômetro de fluxo. (b,c) Média \pm erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo (ANOVA de uma via seguida de teste de Dunnett).

4.8 Avaliação da indução de autofagia após tratamento com o composto AKS 61 em células tumorais humanas

A ativação de vias apoptóticas é reconhecida como o principal mecanismo geral pelo qual os tratamentos anticâncer atuais induzem a morte de células tumorais (FULDA; DEBATIN, 2006). Porém, este não é o único tipo de morte celular induzido pelos quimioterápicos. Novos estudos têm evidenciado a importância de outros processos, como catástrofe mitótica e autofagia, na ação anticâncer de fármacos já utilizados na clínica (para revisão ver BROWN & ATTARDI, 2005).

Com o objetivo de avaliar qualitativamente a possível indução de autofagia após tratamento com AKS 61, realizou-se a marcação para a proteína LC3B através da técnica de imunofluorescência. Para realização do ensaio, células A375 foram plaqueadas em lamínulas, tratadas com veículo (DMSO 0,01%, 24 horas) AKS 61 (1 μ M, 24 horas) ou Cloroquina (controle positivo, 50 μ M, 16 horas) e posteriormente fixadas e marcadas com anticorpo anti-LC3B. Foi também utilizado o corante DAPI para marcação do núcleo.

Na figura 12 podem ser observados os padrões de marcação de LC3B após cada tratamento. No grupo veículo, a proteína LC3B encontra-se majoritariamente difusa no citoplasma, evidenciando a baixa ocorrência de autofagia em situações fisiológicas. As células tratadas com Cloroquina apresentam forte e condensada marcação na forma de pontos, resultado do acúmulo de vacúolos autofágicos devido à inibição dos estágios finais da autofagia. No último quadro, pode-se notar que o AKS 61 induziu o acúmulo da proteína LC3B em forma de pontos no citoplasma em grande parte das células tratadas, sugerindo que o tratamento com este composto é capaz de induzir autofagia.

Observando a morfologia das células expostas ao AKS 61, ainda foi possível identificar algumas células em apoptose, com núcleo condensado e/ou fragmentado e protusões citoplasmáticas, porém em quantidade menor do que as células em autofagia.

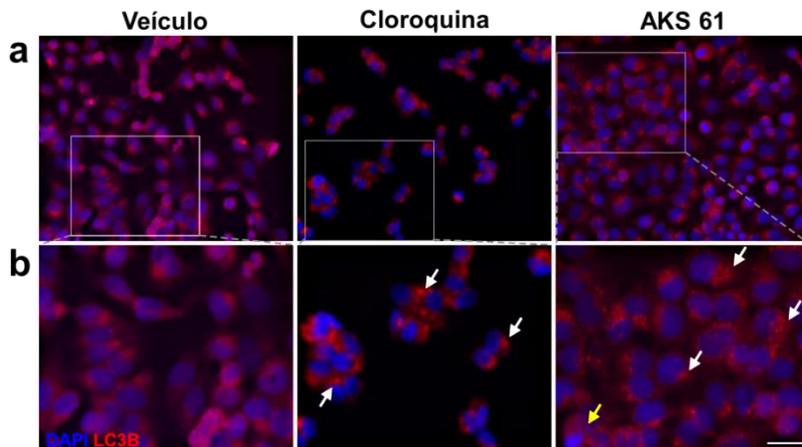


Figura 12. Análise qualitativa das características morfológicas e indução de autofagia em células tratadas com AKS 61. Células da linhagem A375 foram incubadas com Veículo (DMSO 0,01%, 24 horas), Cloroquina (50 μM , 16 horas) ou AKS 61 (1 μM , 24 horas). Após o tempo de incubação, as células foram fixadas com metanol e submetidas a protocolo de imunofluorescência e marcação com anticorpo anti-LC3B (em vermelho) e DAPI (em azul). As imagens foram obtidas com auxílio de digitalizador de lâminas. **(a-b)** Imagens representativas das principais características morfológicas observadas e da distribuição de LC3B após os tratamentos, em aumento de 200x **(a)** e 400x **(b)**. As setas brancas indicam a presença de pontos no citoplasma fortemente marcados com LC3B, evidenciando a presença de autofagossomos. A seta amarela indica a presença de células apoptóticas, com núcleo condensado e/ou fragmentado. Barra de escala = 20 μm .

4.9 Avaliação da atividade antitumoral do composto AKS 61 em modelo de tumor xenográfico

Após os resultados promissores obtidos nos diversos ensaios *in vitro* realizados, o composto AKS 61 foi escolhido como o primeiro candidato para a avaliação de eficácia *in vivo* (prova de princípio).

O modelo animal escolhido para avaliar a eficácia antitumoral do AKS 61 foi o de tumor xenográfico. Este modelo é muito utilizado para avaliação de eficácia *in vivo*, uma vez que permite fácil avaliação do tamanho tumoral e é altamente reprodutível e homogêneo (JUNG, 2014; MORTON; HOUGHTON, 2007).

Após cerca de 12 dias da indução do modelo, quando os tumores atingiram volume médio de cerca de 100 a 200 mm^3 , os animais foram

randomizados em três grupos experimentais e tratados com Veículo (DMSO 2,5% + Tween 80 1%, i.v., 1x/dia), AKS 61 (2 mg/kg, i.v., 1x/dia) ou Cisplatina (controle positivo, 2 mg/kg, i.p., 3x/semana) durante cerca de 20 dias. No decorrer do experimento, o volume tumoral, peso corporal e sinais clínicos gerais dos animais foram avaliados periodicamente. O ensaio foi encerrado no momento em que o volume tumoral dos animais do grupo veículo atingiu média de 2.000 mm³.

Conforme esperado, o tratamento com o controle positivo, Cisplatina, foi eficaz em reduzir de maneira significativa o crescimento do tumor no último dia de avaliação (Volume tumoral= 789±97 mm³ para grupo Cisplatina; 2060±588 mm³ para grupo Veículo; figura 10a).

Entretanto, o tratamento diário com 2 mg/kg (i.v.) de AKS 61 não foi capaz de impedir o crescimento tumoral (figura 13a) nem de reduzir o peso tumoral ao fim do experimento (figura 13c). Adicionalmente, não foram observadas perdas de peso significativas (figura 13b) nem outros sinais clínicos relevantes nos grupos tratados com ambos os compostos.

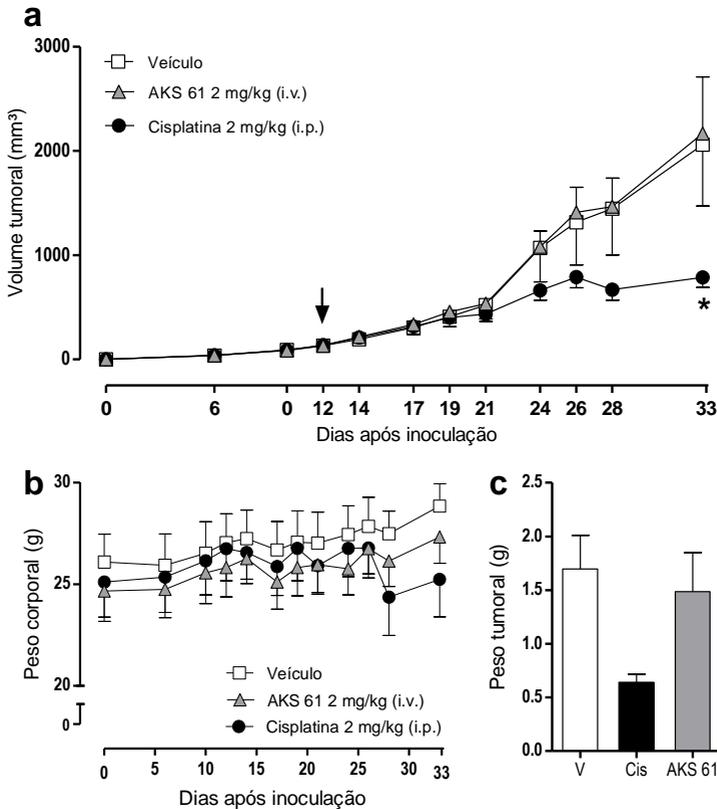


Figura 13. Efeito do tratamento com AKS 61 sobre o crescimento tumoral em modelo de tumor xenográfico. Camundongos nude foram inoculados com células da linhagem A375. Ao atingirem volume tumoral médio de 100 mm³, os animais foram randomizados nos diferentes grupos experimentais e os tratamentos foram iniciados. O experimento foi encerrado quando o volume tumoral dos animais do grupo veículo atingiu média de 2.000 mm³. **(a)** Média ± EPM do volume tumoral dos animais submetidos aos diferentes tratamentos ao longo do tempo. N=5 por grupo. A seta indica o momento da randomização e início dos tratamentos. * $p < 0,05$ versus grupo Veículo (ANOVA de duas vias seguida de teste de Bonferroni). **(b)** Média ± EPM do peso corporal dos animais submetidos aos diferentes tratamentos ao longo do tempo. **(c)** Média ± EPM do peso tumoral ao fim do experimento representado em (a).

4.10 Perfil farmacocinético dos compostos AKS 61, AKS 7 e AKS 26

Após os resultados de eficácia *in vivo* desfavoráveis obtidos para o tratamento com AKS 61, decidiu-se investigar as características farmacocinéticas deste composto, assim como dos acetohidroxamatos AKS 7 e AKS 26. A existência de um perfil farmacocinético favorável é reconhecidamente essencial para o desenvolvimento de um medicamento, e sua ausência é uma das principais causas de perda de eficácia durante a transposição de estudos *in vitro* para estudos *in vivo* (GALLO, 2010; LIPTON; NORDSTEDT, 2016).

Para investigar o perfil farmacocinético dos acetohidroxamatos, camundongos da linhagem CD1 receberam pela via intravenosa 2 mg/kg de AKS 61, AKS 26 ou AKS 7. Amostras de sangue foram coletadas 3, 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos após a administração dos compostos. A concentração plasmática em cada ponto de coleta foi determinada através de análise em UPLC-MS/MS.

As curvas de concentração-tempo obtidas para cada composto podem ser observadas na figura 14. As concentrações obtidas foram utilizadas para calcular os parâmetros farmacocinéticos de cada um dos acetohidroxamatos, com auxílio do programa WinNonlin®. Os parâmetros calculados são mostrados na tabela 8.

Tabela 8. Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração intravenosa de AKS 7, AKS 26 e AKS 61.

	$t_{1/2}$ (min)	C_{max} (ng/mL)	C_0 (ng/mL)	AUC_{∞} (min*ng/mL)	Vd (mL/kg)	CL (mL/min/kg)
AKS 61	38,1	554,3	1061,5	9723,8	11307,1	205,68
AKS 26	45,7	1509,3	2779,2	28499,7	4625,2	70,18
AKS 7	99,0	2348,6	3892,5	65233,1	4380,7	30,66

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida; C_{max} =concentração máxima observada; C_0 =concentração inicial (calculada); AUC_{∞} = Área sob a curva do zero ao infinito; Vd= Volume de distribuição; CL = Clearance total. Parâmetros calculados com auxílio do programa WinNonlin® 6.4, a partir das curvas de concentração-tempo obtidas após tratamento intravenoso com os compostos na dose de 2 mg/kg.

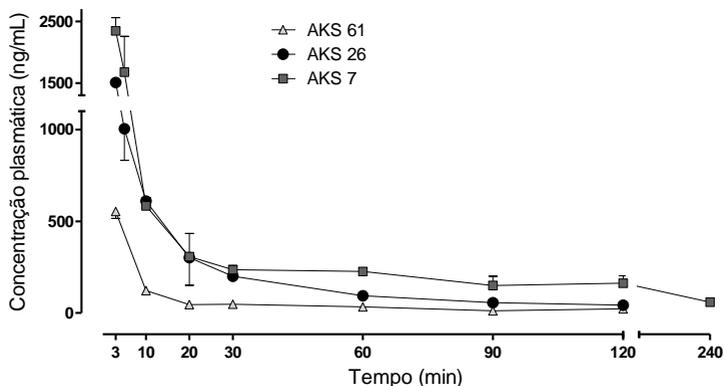


Figura 14. Curvas de concentração plasmática em função do tempo, obtidas após tratamento intravenoso com 2 mg/kg de AKS 61, AKS 26 ou AKS7. Animais CD1 receberam pela via intravenosa 2 mg/kg de AKS 61, AKS 26 ou AKS 7. Amostras de sangue foram coletadas 3, 10, 20, 30, 60, 90, 120 e 240 minutos após a administração, e a concentração plasmática dos compostos em cada amostra foi determinada. O gráfico representa a média \pm desvio-padrão das concentrações obtidas ($n=3-5$ para cada ponto de coleta de cada tratamento).

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que todos os compostos parecem seguir uma cinética de primeira ordem e modelo bi-compartimental, com rápida distribuição para os tecidos e tempo de meia-vida curto.

O composto AKS 61 possui perfil farmacocinético altamente desfavorável, com baixos valores de AUC_{∞} e tempo de meia-vida e alto clearance total. Os compostos AKS 26 e AK 7 possuem perfis semelhantes, com valores de concentração máxima, AUC_{∞} e tempo de meia-vida superiores aos valores obtidos para o AKS 61, bem como valores de Clearance total mais baixos. Os valores obtidos para o AKS 7 foram os mais favoráveis, sendo esse o único composto com tempo de meia-vida plasmática superior a 1 hora.

Considerando os valores desejáveis para os parâmetros farmacocinéticos em camundongos (tabela 9), apenas o composto AKS 7 possui valores intermediários nos três parâmetros referidos. Por possuir o perfil farmacocinético mais favorável, este composto foi escolhido para investigação de perfil farmacocinético oral e determinação de biodisponibilidade.

Tabela 9. Parâmetros farmacocinéticos esperados (em camundongo) para compostos em desenvolvimento, e parâmetros obtidos para o composto AKS 7.

Parâmetro	Alto	Baixo	AKS 7
Vd (L/kg)	> 5	< 0,6	4,38
CL (mL/min/kg)	> 68	< 9	30,66
t_{1/2} (h)	> 4	< 1	1,65

Vd= Volume de distribuição; CL = Clearance total, t_{1/2}= tempo de meia-vida.
Fonte: KERNS & DI, 2016.

Para isso, camundongos CD1 foram mantidos em jejum por pelo menos 3 horas e posteriormente tratados com 50 ou 100 mg/kg de AKS 7 pela via oral. Amostras de sangue foram coletadas 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 720 e 1440 minutos após a administração. As curvas de concentração plasmática podem ser observadas na figura 15. Os valores de concentração obtidos foram utilizados para calcular os parâmetros farmacocinéticos após o tratamento oral, incluindo a biodisponibilidade oral (F). Os parâmetros calculados estão descritos na tabela 10.

Quando administrado pela via oral, o composto AKS 7 apresentou tempo de meia-vida superior ao encontrado após a administração intravenosa, porém com baixa biodisponibilidade em ambas as doses testadas (14,6% para a dose de 50 mg/kg e 10,2% para a dose de 100 mg/kg, tabela 10). Ademais, observou-se uma redução na biodisponibilidade quando a dose oral foi aumentada de 50 para 100 mg/kg, o que sugere a existência de uma saturação na absorção oral deste composto.

Ainda, a análise das amostras por UPLC-MS/MS revelou a presença de outro pico cromatográfico com tempo de retenção diferente do composto AKS 7 no plasma dos animais tratados por via oral (tanto na dose de 50 mg/kg quanto na dose de 100 mg/kg), que não foi observado após tratamento intravenoso com o AKS7. Ao analisar a massa molecular do composto que originou o novo pico cromatográfico, obteve-se valor de $[M+H]^+=569$. Este valor é correspondente à massa do composto AKS 7 ligado a uma molécula de ácido glicurônico, o que sugere que a substância desconhecida seja um metabólito glicuronídeo do AKS 7. Entretanto, é necessária a síntese e análise do possível metabólito glicuronídeo para confirmar que o pico cromatográfico encontrado realmente pertence a este metabólito. O perfil

farmacocinético deste possível metabólito é mostrado na figura 15b. Um cromatograma representativo mostrando o pico deste composto pode ser observado no Apêndice B.

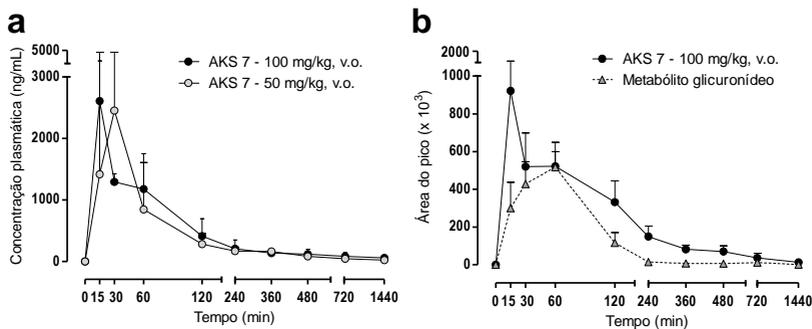


Figura 15. Curvas de concentração plasmática obtidas após tratamento oral com AKS 7. Camundongos CD1 foram tratados com 50 ou 100 mg/kg de AKS 7 pela via oral. Amostras de sangue foram coletadas 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 720 e 1440 minutos após a administração dos compostos e analisadas em UPLC-MS/MS. **(a)** Curvas de concentração-tempo obtida após administração oral de 50 ou 100 mg/kg de AKS 7. **(b)** Área dos picos de AKS7 e de seu possível metabólito glicuronídeo obtidos para cada tempo após tratamento oral com 100 mg/kg de AKS 7. Os gráficos representam a média \pm desvio-padrão das concentrações ou picos obtidos ($n=3-5$ para cada ponto de coleta).

Tabela 10. Parâmetros farmacocinéticos obtidos após administração intravenosa ou oral de AKS 7.

AKS 7	$t_{1/2}$ (min)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (min)	AUC_{∞} (min*ng/mL)	F (%)
2 mg/kg, i.v.	99,04	2348,6	---	65233,1	---
50 mg/kg, v.o.	375,68	2452,4	30	237247,1	14,55
100 mg/kg, v.o.	563,07	2608,3	15	331378	10,16

$t_{1/2}$ = tempo de meia-vida; C_{max} = concentração máxima observada; T_{max} = tempo necessário para atingir a concentração máxima; AUC_{∞} = Área sob a curva do zero ao infinito; F = biodisponibilidade. Parâmetros calculados com auxílio do programa WinNonlin® 6.4, a partir das curvas de concentração-tempo obtidas após tratamento intravenoso ou oral nas doses já descritas.

5. DISCUSSÃO

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde e da Sociedade Americana de Câncer, os avanços das pesquisas básicas e clínicas conduzidas na área oncológica durante as últimas décadas têm contribuído positivamente para o aumento da sobrevivência dos pacientes diagnosticados com câncer. Entretanto, o número de casos diagnosticados continua a aumentar, principalmente devido ao envelhecimento e à expansão populacional (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2016b; IARC, 2014).

O tratamento do câncer tem evoluído rapidamente nos últimos anos, principalmente com a pesquisa e desenvolvimento de novas modalidades terapêuticas, como a terapia direcionada (ou terapia-alvo) e a imunoterapia. Em janeiro de 2017, dos cerca de 230 mil estudos listados no site *ClinicalTrials.gov*, mais de 58 mil envolviam a área de oncologia. Este elevado número de estudos clínicos evidencia a grande necessidade de melhoria no tratamento de diversos tipos de câncer e os esforços recentes que têm sido feitos nesta área.

Neste trabalho, investigamos o potencial efeito citotóxico de onze 2-*aril-2-(3-indolil)acetohidroxamatos* sintéticos (tabela 1), bem como o efeito antitumoral e características farmacocinéticas dos compostos mais promissores. Estas moléculas foram inicialmente desenhadas visando à inibição de histona-deacetilases, uma vez que diversos hidroxamatos com ação anti-câncer têm sido descritos como inibidores desta classe de enzimas, como o Vorinostat e o Panobinostat (CURTIN; GLASER, 2003; KRENNHRUBEC et al., 2007; TESSIER et al., 2009; YANG et al., 2015).

Apesar das semelhanças entre estes grupos de moléculas, não foi possível detectar atividade inibidora de histona-deacetilases em estudos prévios com a série de acetohidroxamatos que foi aqui testada (AKSENOV et al., 2015). Entretanto, a investigação dos efeitos destes compostos sobre diversas linhagens tumorais evidenciou o potencial citotóxico das mesmas, inclusive em linhagens resistentes a múltiplos fármacos (MDR, do inglês *multi-drug resistance*). A resistência a múltiplos fármacos é o principal mecanismo pelo qual as células tumorais tornam-se resistentes ao tratamento quimioterápico, impedindo a eficácia das terapias em diversos tipos de câncer (KIBRIA; HATAKEYAMA; HARASHIMA, 2014). Além da MDR, outro fator que prejudica o tratamento quimioterápico é a existência de resistência intrínseca à morte celular por apoptose, principalmente em tumores de

origem epitelial (BROWN; ATTARDI, 2005; FULDA, 2009).

Assim, o desenvolvimento de novos fármacos com capacidade de superar tanto a resistência intrínseca (causando morte celular por outra via) quanto a resistência extrínseca de tumores torna-se altamente desejável. Por este motivo, neste trabalho foram utilizadas duas linhagens celulares intrinsecamente resistentes à apoptose para investigar os efeitos desta classe de moléculas.

Como primeiro passo deste trabalho, a atividade citotóxica dos compostos estudados (descritos em detalhes na tabela 1) foi avaliada. Com base nos primeiros resultados, foi possível observar que todos os compostos apresentaram atividade citotóxica em concentrações relativamente baixas nas linhagens tumorais humanas A375 (melanoma) e U-87 MG (glioblastoma), corroborando os dados previamente obtidos pelos nossos colaboradores em células da linhagem U-87 MG e em outras linhagens tumorais (AKSENOV et al., 2015). As CI_{50} observadas nestas linhagens (entre 0,58 e 19,21 μM para o ensaio de MTT) foram semelhantes ou até mesmo inferiores a muitos quimioterápicos utilizados na clínica para o tratamento de melanoma e de glioblastoma, como a Temozolamida (cerca de 300 μM) e a Cisplatina (cerca de 3 μM , dados não mostrados). Um destaque especial deve ser feito para o composto AKS 61, que apresentou potência cerca de 10 vezes maior que os demais compostos testados na linhagem A375 (0,58 μM , contra cerca de 4-5 μM para os demais compostos).

Um problema frequentemente observado em linhagens celulares intrinsecamente resistentes à apoptose são os baixos valores de inibição máxima encontrados após o tratamento com drogas citostáticas. Alguns agentes pró-apoptóticos são capazes de eliminar uma porção das células em baixas concentrações, porém uma porcentagem significativa destas pode resistir mesmo quando expostas a altíssimas concentrações de quimioterápico (AKSENOV et al., 2015; LEFRANC et al., 2013). De maneira interessante, os acetohidroxamatos aqui estudados foram capazes de causar expressiva inibição máxima de viabilidade (cerca de 85%) em ambas as linhagens testadas, o que pode representar uma vantagem destes compostos sobre certos quimioterápicos pró-apoptóticos.

Neste momento, decidiu-se escolher os acetohidroxamatos mais promissores para prosseguir com os próximos experimentos *in vitro*. Considerando que todos os compostos testados apresentaram atividade citotóxica no ensaio de MTT, utilizamos os seguintes parâmetros para auxiliar na escolha dos compostos que seguiriam para as próximas etapas de estudo: CI_{50} , inibição máxima de viabilidade atingida, logP e

resultados obtidos em estudos prévios (AKSENOV et al., 2015) . Após análise destas características, os seguintes compostos foram escolhidos para a próxima etapa:

- AKS 7, principalmente por apresentar $\log P = 4,1$; sendo o único acetohidroxamato da série a apresentar $\log P$ menor que 5. Este composto também mostrou resultados interessantes em estudos prévios, como boa seletividade a células tumorais e capacidade antiproliferativa (AKSENOV et al., 2015);
- AKS 26, por apresentar um dos valores de CI_{50} mais baixos em ambas as células e elevados percentuais de inibição máxima da viabilidade celular;
- AKS 61, por apresentar a menor CI_{50} em células A375 e valor de $\log P$ próximo a 5 ($\log P = 5,3$).

A próxima etapa do trabalho consistiu na avaliação da atividade antiproliferativa destes três compostos e de sua citotoxicidade frente a uma linhagem não tumoral. Através do ensaio de sulforrodamina B – que permite avaliar tanto o efeito citotóxico quanto citostático – corroboramos os resultados observados no ensaio de MTT, obtendo mais uma vez baixos valores de CI_{50} . Além disso, assim como no teste de MTT, a linhagem celular A375 (melanoma humano) foi mais sensível a todos os tratamentos, sendo por este motivo escolhida para realização dos estudos posteriores.

Outro aspecto que pode ser avaliado no ensaio de SrB é a capacidade citostática dos compostos testados. Realizando esta avaliação, foi possível observar que os acetohidroxamatos foram capazes de inibir a proliferação celular em concentrações menores do que as necessárias para reduzir a viabilidade celular. Além disso, em concentrações não muito superiores às CI_{50} , os três compostos foram capazes de inibir totalmente a proliferação celular, conforme demonstrado pelos valores de TGI, tanto na linhagem U-87 MG quanto na linhagem A375, inclusive apresentando potência superior à do quimioterápico Temozolamida, utilizado como controle positivo. Estes resultados vão ao encontro dos dados obtidos pelos nossos colaboradores, que observaram pronunciada capacidade antiproliferativa do composto AKS 7 nas linhagens U373 (glioblastoma humano) e SKMEL28 (melanoma humano) (AKSENOV et al., 2015).

A atividade terapêutica de muitos fármacos anticâncer ainda é altamente limitada pelos efeitos tóxicos a alguns órgãos vitais e células com alta taxa de proliferação, devido à baixa seletividade dos quimioterápicos às células tumorais (HAGLUND et al., 2012; VARGA et al., 2015). Com o objetivo de avaliar a seletividade dos

acetohidroxamatos e a possível existência de toxicidade a órgãos vitais, analisamos a citotoxicidade destes compostos frente a cardiomiócitos derivados de células pluripotentes induzidas. A toxicidade cardíaca é a principal causa de retirada de drogas do mercado e de falha nos ensaios clínicos, e é frequentemente observada em quimioterápicos, principalmente na classe das antraciclinas (VARGA et al., 2015). A Doxorrubicina, um dos fármacos mais eficazes e utilizados desta classe, tem sua utilização clínica limitada devido ao risco de cardiotoxicidade, que é dependente da dose empregada (DAMIANI et al., 2016; VARGA et al., 2015). Os resultados obtidos para os acetohidroxamatos testados sugerem que, em concentrações próximas às suas CI_{50} , os compostos AKS7 e AKS 61 não mostram atividade cardiotoxica. Ainda, em um dos ensaios realizados, o composto AKS 61 não apresentou potencial cardiotoxico nem mesmo em concentração 10 vezes superior à sua CI_{50} em células tumorais. O composto AKS 26 foi o que apresentou menor seletividade a células tumorais, induzindo queda na viabilidade dos cardiomiócitos já na concentração próxima à CI_{50} obtida em linhagens tumorais.

Estes dados corroboram resultados prévios obtidos por nossos colaboradores em linhagens de fibroblastos humanos (NHDF e NHLF), onde também os compostos AKS 7 e AKS 61 apresentaram seletividade maior às células tumorais do que o composto AKS 26 (AKSENOV et al., 2015). Os resultados em células não tumorais sugerem que a seletividade dos acetohidroxamatos parece estar associada às suas estrutura química, podendo assim ser melhorada através de modificações na estrutura das moléculas.

Ainda visando avaliar a capacidade antiproliferativa, desta vez a longo prazo, foi realizado também o ensaio de clonogenicidade. Uma vez que este ensaio avalia a capacidade de cada célula de produzir uma colônia (geralmente definida como um conjunto de pelo menos 50 células) ao longo de vários dias após o tratamento, o teste combina a avaliação de diversas formas de morte celular, assim como a capacidade proliferativa pós tratamento (BROWN; ATTARDI, 2005). O acetohidroxamato AKS 61 foi capaz de inibir completamente a formação de colônias, enquanto que os compostos AKS 7 e AKS 26 não apresentaram nenhum efeito nas concentrações testadas.

Diante destes novos resultados, o AKS 61 foi selecionado para dar prosseguimento aos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Os novos ensaios *in vitro* realizados nesta etapa tiveram como objetivo investigar o possível mecanismo de morte celular desencadeado pelo AKS 61 em células da linhagem A375. Como primeiro experimento desta etapa realizamos

análise do ciclo celular. Neste ensaio, observou-se que o tratamento com AKS 61 resultou em discreto aumento de células em fase G2/M após 24 horas, com posterior redução desta população e aumento de células em G1 após 48 horas de tratamento. Estes dados sugerem que o tratamento com AKS 61 interfere na regulação do ciclo celular, provavelmente resultando em parada e acúmulo de células em fase G0/G1 ao longo do tempo. Entretanto, a regulação do ciclo celular é um processo complexo, mediado por um grande número de estímulos e proteínas, fazendo com que sejam necessários mais estudos para concluir com clareza o papel deste composto na regulação do ciclo celular.

Além disso, é comum observarmos dados discrepantes na literatura, onde dois estudos utilizando a mesma molécula encontram perfis de modulação do ciclo celular diferentes. Este é o caso, por exemplo, do vorinostat (ou ácido hidroxâmico suberoilânilida, SAHA), um inibidor das histona deacetilases. Enquanto alguns estudos relatam acúmulo de células em G1 após o tratamento, outros relatam acúmulo em G2/M e subG0 (XU et al., 2011; YANG et al., 2015). No caso dos inibidores de histona deacetilases, isto parece acontecer devido à capacidade destes compostos de parar o ciclo celular tanto em G1 quanto em G2, dependendo do momento do ciclo celular em que as células se encontram ao iniciar o tratamento (YOSHIDA; BEPPU, 1988). Em outros casos, isto também pode ser explicado pela existência de um perfil bifásico de inibição do ciclo celular para alguns compostos anticâncer, onde diferentes concentrações e tempos de incubação são capazes de alterar o efeito final sobre o ciclo celular (BLAJESKI et al., 2002).

O efeito do tratamento com AKS 61 sobre o potencial de membrana mitocondrial também foi avaliado. Na presença de sinais pró-apoptóticos, a membrana externa da mitocôndria torna-se permeável, levando à perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de fatores que desencadeiam a via de apoptose intrínseca (TSUJIMOTO; SHIMIZU, 2007). Em nosso trabalho, verificamos que o tratamento com AKS 61 durante 48 horas foi capaz de desencadear a perda do potencial de membrana mitocondrial, o que possivelmente culminaria em morte celular por apoptose. Esta hipótese foi confirmada através do ensaio de apoptose por Anexina V e 7-AAD, onde foi detectada uma porção significativa de células tratadas com AKS 61 positiva apenas para Anexina V. A anexina V liga-se aos resíduos de fosfatidilserina externalizados em estágios iniciais da apoptose, sendo assim um marcador seletivo para este tipo de morte quando não há marcação concomitante com 7-AAD. A marcação positiva também para 7-AAD

só ocorre quando há perda da integridade de membrana, evento que sucede a externalização de fosfatidilserina na apoptose mas que também ocorre nos estágios finais de outros tipos de morte celular, não sendo portanto exclusivo da apoptose.

Apesar da confirmação da indução de morte celular por apoptose após tratamento com AKS 61, notou-se que a porcentagem de células em apoptose foi expressivamente inferior ao número de células não viáveis observadas nos ensaios de MTT e SrB, principalmente para o AKS 61 na concentração de 1 μ M. Este resultado sugere que a apoptose pode não ser o único mecanismo de morte celular desencadeado pelo tratamento com o AKS 61. Devido a este fato, somado à observação de algumas características morfológicas das células em cultura, decidimos investigar a capacidade do composto AKS 61 de induzir morte celular por autofagia.

Recentemente, diversas evidências têm demonstrado que a apoptose não é o único mecanismo pelo qual as células podem sofrer um processo de morte celular programada. A autofagia, processo pelo qual a célula consome componentes celulares dentro de autofagossomos, parece ser capaz de agir sinergicamente com a apoptose para levar à morte celular (EISENBERG-LERNER et al., 2009). Por este motivo, compostos capazes de desencadear este processo estão sendo cogitados para tratamento de tumores resistentes à apoptose, como o melanoma metastático (SOARES et al., 2014).

Através dos resultados obtidos por imunofluorescência para a proteína LC3B, foi possível observar a indução de autofagia após 24 horas de tratamento com AKS 61. Porém, até o momento não é possível determinar o exato papel da autofagia no efeito citotóxico do AKS 61, uma vez que a presença de autofagia acompanhada de apoptose não garante que ambos os processos estejam agindo de maneira sinérgica. A autofagia também pode representar um mecanismo de proteção da célula contra a morte celular por apoptose, sendo capaz de gerar resistência ao tratamento quimioterápico, por exemplo (DEL BELLO et al., 2013; LEE et al., 2015). Apesar de nossos resultados atuais sugerirem que a autofagia estaria agindo de forma a intensificar a morte celular desencadeada pelo AKS 61, são necessários mais experimentos para confirmar se a autofagia induzida após o tratamento realmente contribui para a morte celular ou a prejudica, tornando as células resistentes ao composto.

Finalmente, tem sido amplamente demonstrada na literatura a indução de autofagia por inibidores de histona-deacetilases, decorrente da inibição da via mTOR (YANG et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Este fato, juntamente com os resultados obtidos nos ensaios de ciclo celular, levaram-nos a cogitar novamente a possibilidade dos compostos investigados neste trabalho agirem através da inibição das histona-deacetilases. Novos resultados, ainda preliminares, sugerem que o tratamento com AKS 61 também é capaz de reduzir a fosforilação de mTOR (dados não mostrados). Estudos adicionais estão sendo conduzidos a fim de elucidar este possível mecanismo de ação dos acetohidroxamatos.

Após o conjunto de resultados *in vitro* promissores obtidos para o composto AKS 61, decidiu-se avaliar a atividade antitumoral deste composto em modelo de tumor xenográfico, com o objetivo de confirmar sua eficácia *in vivo* (prova de princípio). Apesar deste composto apresentar apenas uma violação da regra de Lipinski (possuir logP superior a 5), a via intravenosa foi escolhida para sua administração, visando excluir qualquer interferência de biodisponibilidade ou de metabolismo de primeira passagem nesta análise inicial. Após tratamento intravenoso diário com 2 mg/kg de AKS 61 durante cerca de 20 dias, nenhum efeito inibitório sobre o crescimento tumoral foi observado. Além disso, não foi observada perda de peso nos animais, nem tampouco sinais clínicos indicativos de outros efeitos adversos.

Diante dos resultados negativos obtidos no ensaio de prova de conceito, decidiu-se investigar o perfil farmacocinético do AKS 61, uma vez que o conhecimento deste perfil poderia ajudar a explicar, pelo menos em parte, a falha no experimento de eficácia e também guiar a escolha de dose e cronograma de tratamento para os estudos subsequentes. Após administração intravenosa do AKS 61 e análise da concentração plasmática ao longo do tempo, observou-se que este acetohidroxamato é distribuído para os tecidos e também rapidamente eliminado, uma vez que baixas quantidades do composto foram encontradas na corrente sanguínea já desde os primeiros tempos analisados.

Estas baixas concentrações plasmáticas poderiam também ser acarretados por problemas analíticos, como uma baixa taxa de recuperação do composto após extração do plasma sanguíneo. Para descartar esta possibilidade, foram realizados ensaios durante a validação do método analítico, onde foram observadas altas taxas de recuperação plasmática do composto (Anexo A), o que sugere que as baixas concentrações detectadas são de fato decorrentes da rápida distribuição e eliminação do composto. Os parâmetros farmacocinéticos calculados a partir da curva de concentração plasmática do AKS 61

corroboram esta hipótese, com obtenção de altos valores de volume de distribuição e clearance total, acompanhados de baixo tempo de meia-vida de eliminação. Estes resultados também sugerem rápida metabolização do AKS 61, e vão ao encontro com análises farmacocinéticas de outros acetohidroamatos, onde foram descritos baixos tempos de meia-vida e hidrólise dos compostos aos seus ácidos carboxílicos correspondentes (CURTIN; GLASER, 2003).

A instabilidade metabólica dos acetohidroamatos foi confirmada após análise dos perfis farmacocinéticos dos outros dois compostos da série, que também estavam sendo cogitados para estudos posteriores, AKS 7 e AKS 26. Após administração intravenosa destes acetohidroamatos, na mesma concentração utilizada para análise do AKS 61, também foram encontradas baixas concentrações plasmáticas dos compostos, acompanhadas de baixos tempos de meia-vida de eliminação. Entretanto, para estes dois compostos, os perfis farmacocinéticos não foram tão desfavoráveis quanto o perfil obtido para o AKS 61. Isso pode ter ocorrido devido à existência de uma amina terciária na molécula do composto AKS 61 que não está presente nos outros dois compostos. Esta amina terciária poderia sofrer diversas reações de biotransformação, como N-oxidação, N-metilação e/ou N-glicuronidação (SMITH, 2010), contribuindo para a rápida metabolização e eliminação do AKS 61.

O composto AKS 7 foi o que apresentou perfil farmacocinético mais favorável, com tempo de meia-vida de eliminação superior a uma hora. Além disso, este composto é o único da série a apresentar logP inferior a 5, sendo por este motivo também avaliado quanto à sua biodisponibilidade oral. Apesar de uma boa biodisponibilidade oral não ser imprescindível para o desenvolvimento de fármacos anticâncer, esta é uma característica que continua sendo altamente desejável, principalmente devido à sua conveniência e possibilidade de atingir maiores tempos de exposição com menos efeitos adversos (BHATTACHARYYA, 2010).

Para avaliar a biodisponibilidade oral do AKS 7, bem como a linearidade da mesma, foi analisado o seu perfil farmacocinético após administração oral nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg. A partir destas análises, foram obtidos baixos percentuais de biodisponibilidade (abaixo de 15%) para ambas as doses, com queda de biodisponibilidade após administração da dose mais alta (100 mg/kg), o que sugere a ocorrência de uma saturação na absorção deste composto. Esta saturação da absorção já foi descrita para quimioterápicos de uso oral, como por exemplo o Etoposídeo, onde a biodisponibilidade em humanos é não-

linear em doses superiores a 200 mg/m² (MCLEOD, 2005; SLEVIN et al., 1989). A partir destes resultados, faz-se necessária a avaliação da biodisponibilidade do AKS 7 após administração de outras doses orais, a fim de definir em que momento esta saturação da absorção começa a ocorrer. Caso a saturação já esteja presente na dose de 50 mg/kg, é possível que valores superiores de biodisponibilidade sejam obtidos com a administração de doses mais baixas de AKS 7.

Apesar da baixa biodisponibilidade, a administração oral de ambas as doses apresentou algumas vantagens farmacocinéticas, como o aumento no tempo de meia-vida de eliminação e do tempo de exposição ao composto. Além disso, nenhum dos animais tratados apresentou sinais visíveis de toxicidade, mesmo após administração da dose de 100 mg/kg. Estes resultados mostram que a administração oral de AKS 7 durante os ensaios de eficácia poderá ser vantajosa, mesmo com a baixa biodisponibilidade por esta via.

Ainda durante os estudos de farmacocinética, detectou-se o aparecimento de outro pico cromatográfico nas amostras de plasma dos animais que receberam AKS 7 pela via oral, quando analisadas por UPLC-MS/MS. Através da análise do peso molecular, da origem e do perfil de aparecimento deste pico, concluiu-se que este poderia se tratar de um metabólito glicuronídeo do AKS 7. Como já mencionado anteriormente, o grupamento ácido hidroxâmico é metabolicamente instável, podendo facilmente sofrer reações de biotransformação de fase I e/ou II. Além disso, a glicuronidação já foi descrita como sendo o principal resultado do metabolismo hepático de vários fármacos contendo o grupo ácido hidroxâmico, como o Vorinostat, o Panobinostat e o Belinostat (CALVO et al., 2016; CLIVE et al., 2012; SCHWAB; SCHAEFFELER; BRAUCH, 2012). Novos estudos deverão ser conduzidos com o objetivo de confirmar a formação deste e outros metabólitos, bem como quantificá-los.

No momento, novos ensaios de eficácia estão sendo conduzidos para investigar o potencial antitumoral do AKS 7. Caso resultados positivos sejam obtidos, a molécula deste candidato poderá ser otimizada com o objetivo de melhorar sua biodisponibilidade oral e tempo de meia-vida, tornando-a mais promissora para o desenvolvimento clínico.

6. SUMÁRIO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

- A série de acetohidroxamatos estudada apresentou atividade citotóxica e citostática promissora *in vitro*, o que impulsionou e justificou as investigações realizadas neste trabalho.
- Alguns acetohidroxamatos como o AKS 61 e AKS 7 demonstraram, já nos ensaios *in vitro*, características desejáveis aos compostos antitumorais em fase de desenvolvimento, como boa seletividade para células tumorais e boa potência citotóxica.
- Embora o mecanismo de ação desta série de compostos não tenha sido totalmente elucidada, o tratamento com AKS 61 resultou em parada do ciclo celular, queda do potencial de membrana mitocondrial, apoptose e autofagia das células tumorais, possivelmente devido à inibição de enzimas da classe das histona-deacetilases.
- O tratamento com AKS 61 não foi capaz de inibir o crescimento tumoral no modelo *in vivo* utilizado. Porém, esta falta de eficácia pode ser facilmente justificada pelo perfil farmacocinético desfavorável do composto.
- Embora o composto AKS 7 tenha apresentado um perfil farmacocinético mais favorável, esta série de acetohidroxamatos ainda precisa ser otimizada, a partir de modificações nas moléculas, a fim de possibilitar a continuidade dos estudos de eficácia *in vivo* com moléculas ainda mais promissoras.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Avaliados em conjunto, os resultados do presente estudo demonstram claramente a grande complexidade do desenvolvimento de novos medicamentos eficazes para o tratamento do câncer. A demonstração de resultados potencialmente promissores *in vitro*, mesmo que associados a novos mecanismos de ação, não garantem *per se* que estes compostos terão os mesmos efeitos quando avaliados *in vivo* (prova de princípio), principalmente devido à dificuldade de obtenção e manutenção das concentrações terapêuticas no tecido/órgão-alvo. Diante disso, estudos de farmacocinética realizados o quanto antes possível tornam-se imperativos para a tomada de decisão quanto ao prosseguimento ou não dos ensaios não-clínicos. Ademais, a interação paralela com profissionais da área de química medicinal, visando à obtenção e otimização de uma molécula candidata, é imprescindível para o sucesso de qualquer projeto que visa desenvolver novos medicamentos. O desenvolvimento de novos medicamentos é um processo lento, de alto risco e que normalmente encontra obstáculos a transpor para alcançar o sucesso. Aprender com os problemas encontrados é essencial para otimizar as etapas subsequentes e aumentar as taxas de sucesso durante o processo de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS

- AKSENOV, A. V. et al. Activity of 2-Aryl-2-(3-indolyl)acetohydroxamates against drug-resistant cancer cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2206–2220, 2015.
- ALBERTS, B. et al. **Biologia molecular da Célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Melanoma Skin Cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/skincancer-melanoma/detailedguide>>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **The History of Cancer**. Disponível em: <<http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002048-pdf.pdf>>. Acesso em: 12 dez. 2016b.
- ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies required for new drug development – Part I: early in silico and in vitro studies, new target discovery and validation, proof of principles and robustness of animal studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 11, p. 1–9, 2016a.
- ANDRADE, E. L. et al. Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 12, p. 1–19, 2016b.
- BASTIAN, B. C. The Molecular Pathology of Melanoma: an Integrated Taxonomy of Melanocytic Neoplasia. **Annu Rev Pathol**, v. 9, p. 239–271, 2014.
- BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 518–28, 2013.
- BHATTACHARYYA, G. S. Oral systemic therapy: Not all “win-win”. **Indian journal of medical and paediatric oncology**, v. 31, n. 1, p. 1–3, jan. 2010.
- BLAJESKI, A. L. et al. G1 and G2 cell-cycle arrest following microtubule depolymerization in human breast cancer cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, p. 91–99, jul. 2002.

BROWN, J. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 231–237, 2005.

CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA, J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98–106, 2008.

CALVO, E. et al. Pharmacokinetics, metabolism, and excretion of ¹⁴C-labeled belinostat in patients with recurrent or progressive malignancies. **Investigational New Drugs**, v. 34, n. 2, p. 193–201, 2016.

CANCER RESEARCH UK. **What hormone therapy is**. Disponível em: <<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancers-in-general/treatment/hormone/what-hormone-therapy-is>>. Acesso em: 23 dez. 2016.

CATHCART, J.; PULKOSKI-GROSS, A.; CAO, J. Targeting matrix metalloproteinases in cancer: Bringing new life to old ideas. **Genes and Diseases**, v. 2, n. 1, p. 26–34, 2015.

CECCACCI, E.; MINUCCI, S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia. **British Journal of Cancer**, v. 114, n. 6, p. 605–11, 2016.

CHABNER, B. A. et al. Agentes Citotóxicos. In: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**. 12. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012. p. 2079.

CLIVE, S. et al. Characterizing the disposition, metabolism, and excretion of an orally active pan-deacetylase inhibitor, panobinostat, via trace radiolabeled ¹⁴C material in advanced cancer patients. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 513–522, 2012.

CROSS, M. J. et al. Physiological, pharmacological and toxicological considerations of drug-induced structural cardiac injury. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, p. 957–974, 2015.

CURTIN, M.; GLASER, K. Histone deacetylase inhibitors: The Abbott Experience. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, p. 2373–2392, 2003.

DAMIANI, R. M. et al. Pathways of cardiac toxicity: comparison between chemotherapeutic drugs doxorubicin and mitoxantrone. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 9, p. 2063–2076, 25 set. 2016.

DAY, J. A.; COHEN, S. M. Investigating the selectivity of metalloenzyme inhibitors. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 20, p. 7997–8007, 24 out. 2013.

DEL BELLO, B. et al. Cisplatin-Induced Apoptosis Inhibits Autophagy, Which Acts as a Pro-Survival Mechanism in Human Melanoma Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, 2013.

DI, L.; KERNS, E. H. **Drug-like Properties: Concepts, Structure, Design and Methods - from ADME to Toxicity Optimization**. 2. ed. [s.l.] Elsevier, 2016.

DOWNWARD, J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 1, p. 11–22, jan. 2003.

DUMMER, R. et al. Cutaneous melanoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 26, n. July, p. v126–v132, 2015.

EISENBERG-LERNER, A. et al. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, p. 966–975, 2009.

FALKENBERG, K. J.; JOHNSTONE, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 9, p. 673–691, 2014.

FARIA, A. F.; DE SOUZA, M. V. N.; DE OLIVEIRA, M. A. L. Validation of a capillary zone electrophoresis method for the determination of ciprofloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin and ofloxacin in pharmaceutical formulations. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 389–396, 2008.

FDA. **Drug Innovation - Novel Drug Approvals for 2016**. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/DrugInnovation/ucm483775.htm>>. Acesso em: 9 jan. 2017.

FULDA, S. Tumor resistance to apoptosis. **International Journal of Cancer**, v. 124, n. 3, p. 511–515, 1 fev. 2009.

FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, p. 4798–4811, 2006.

GALLO, J. M. Pharmacokinetic/ pharmacodynamic-driven drug development. **The Mount Sinai Journal of Medicine, New York**, v. 77, n. 4, p. 381–388, 2010.

GARBE, C. et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline - Update 2016. **European Journal of Cancer**, v. 63, p. 201–217, 2016.

GLICK, D.; BARTH, S.; MACLEOD, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. **The Journal of Pathology**, v. 221, n. 1, p. 3–12, 2010.

GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 10, p. 709–717, 2003.

GUPTA, S. P.; SHARMA, A. The Chemistry of Hydroxamic Acids. In: GUPTA, S. P. (Ed.). . **Hydroxamic Acids: A Unique Family of Chemicals with Multiple Biological Activities**. Berlin: Springer, 2013. p. 311.

HAGLUND, C. et al. In vitro evaluation of clinical activity and toxicity of anticancer drugs using tumor cells from patients and cells representing normal tissues. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 697–707, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Experimental Cell Research**, v. 25, p. 585–621, dez. 1961.

HUGUET, F. et al. Hydroxamic Acids as Potent Inhibitors of Fe II and Mn II E. coli Methionine Aminopeptidase: Biological Activities and X-ray Structures of Oxazole Hydroxamate-EcMetAP-Mn Complexes. **ChemMedChem**, v. 7, n. 6, p. 1020–1030, 2012.

IARC. **World Cancer Report 2014**. Lyon: IARC Press, 2014.

ICH. **ICH Harmonised Tripartite Guideline - Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals - S9**, 2009.

INCA. **Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro:

INCA, 2015.

INCA. **INCA - O que é o câncer**. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>. Acesso em: 5 dez. 2016.

JOHNSON, J. et al. Relationships between drug activity in NCI preclinical in vitro and in vivo models and early clinical trials. **British journal of cancer**, v. 84, n. 10, p. 1442–1431, 2001.

JUNG, J. Human tumor xenograft models for preclinical assessment of anticancer drug development. **Toxicological research**, v. 30, n. 1, p. 1–5, mar. 2014.

KHALIL, D. N. et al. The future of cancer treatment: immunomodulation, CARs and combination immunotherapy. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 13, n. 5, p. 273–290, 2016.

KIBRIA, G.; HATAKEYAMA, H.; HARASHIMA, H. Cancer multidrug resistance: mechanisms involved and strategies for circumvention using a drug delivery system. **Archives of Pharmacal Research**, v. 37, n. 1, p. 4–15, 2014.

KILKENNY, C. et al. Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, 29 jun. 2010.

KOZLOV, M. V. et al. Pyridine hydroxamic acids are specific anti-HCV agents affecting HDAC6. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 11, p. 2382–2385, 2015.

KRENNHRUBEC, K. et al. Design and evaluation of “Linkerless” hydroxamic acids as selective HDAC8 inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 17, n. 10, p. 2874–2878, 2007.

KUMAR, V.; ASTER, J. C.; ABBAS, A. **Robbins & Cotran Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

LEBOIT, P. et al. (EDS.). **Pathology and Genetics of Skin Tumours**. Lyon: IARC Press, 2006.

LEE, J. G. et al. Autophagy contributes to the chemo-resistance of non-small cell lung cancer in hypoxic conditions. **Respiratory Research**, v. 16,

n. 1, p. 138, 2015.

LEESON, P. D.; SPRINGTHORPE, B. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 11, p. 881–890, nov. 2007.

LEFRANC, F. et al. In Vitro Pharmacological and Toxicological Effects of Norterpene Peroxides Isolated from the Red Sea Sponge *Diacarnus erythraeanus* on Normal and Cancer Cells. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 9, p. 1541–1547, 2013.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LIPTON, S. A.; NORDSTEDT, C. Partnering with Big Pharma — What Academics Need to Know. **Cell**, v. 165, n. 3, p. 512–515, 2016.

LIU, B.; LI, S.; HU, J. Technological advances in high-throughput screening. **American Journal of Pharmacogenomics**, v. 4, n. 4, p. 263–276, 2004.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica**, v. 131, n. 6, p. 803–820, 2016.

MANAL, M. et al. Inhibitors of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. **Bioorganic Chemistry**, v. 67, p. 18–42, 2016.

MARKS, P. A.; BRESLOW, R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 1, p. 84–90, 2007.

MCLEOD, H. L. Epipodophyllotoxins. In: SCHELLENS, J. H. M.; MCLEOD, H. L.; NEWELL, D. R. (Eds.). **Cancer Clinical Pharmacology**. New York: Oxford University Press, 2005. p. 267.

MESSAOUDI, K.; CLAVREUL, A.; LAGARCE, F. Toward an effective strategy in glioblastoma treatment. Part I: resistance mechanisms and strategies to overcome resistance of glioblastoma to temozolomide. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 899–905, 2015.

MICHOR, F.; IWASA, Y.; NOWAK, M. A. Dynamics of cancer

progression. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 3, p. 197–205, mar. 2004.

MOORS, E. H. M.; COHEN, A. F.; SCHELLEKENS, H. Towards a sustainable system of drug development. **Drug Discovery Today**, v. 19, n. 11, p. 1711–1720, 2014.

MORO, M. et al. Patient-Derived Xenografts of Non Small Cell Lung Cancer: Resurgence of an Old Model for Investigation of Modern Concepts of Tailored Therapy and Cancer Stem Cells. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

MORTON, C. L.; HOUGHTON, P. J. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 247–250, 2007.

MOTTAMAL, M. et al. Histone deacetylase inhibitors in clinical studies as templates for new anticancer agents. **Molecules**, v. 20, n. 3, p. 3898–3941, 2015.

NCI. **About Cancer - National Cancer Institute Website**. Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/>>. Acesso em: 12 dez. 2016.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3448–59, dez. 2013.

O'CONNOR, C. M.; ADAMS, J. U. **Essentials of Cell Biology**. Cambridge: NPG Education, 2010.

PARBIN, S. et al. Histone deacetylases: a saga of perturbed acetylation homeostasis in cancer. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 62, n. 1, p. 11–33, jan. 2014.

PHRMA. **Biopharmaceutical Research & Development : The Process Behind New Medicines**. [s.l.: s.n.].

PRIEST, B. T.; ERDEMLI, G. Phenotypic screening in the 21st century. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, n. 264, p. 1–2, 2014.

PRITCHARD, J. R.; LAUFFENBURGER, D. A.; HEMANN, M. T. Understanding resistance to combination chemotherapy. **Drug Resistance Updates**, v. 15, p. 249–257, out. 2012.

RANG, H. P. et al. **Rang & Dale - Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v. 3, n. 7, p. 1125–31, 2008.

RICHON, V. M. et al. A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3003–3007, 1998.

RICHON, V. M. Cancer biology: mechanism of antitumour action of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid), a novel histone deacetylase inhibitor. **British Journal of Cancer**, v. 95, p. S2–S6, 2006.

RISS, T. L.; NILES, A. L.; MINOR, L. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. **Assay Guidance Manual**, p. 1–23, 2004.

SANTOS, R. et al. A comprehensive map of molecular drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 1, p. 19–34, 2017.

SATHORNSUMETEE, S.; RICH, J. N.; REARDON, D. A. Diagnosis and Treatment of High-Grade Astrocytoma. **Neurologic Clinics**, v. 25, n. 4, p. 1111–1139, 2007.

SCHWAB, M.; SCHAEFFELER, E.; BRAUCH, H. Anticancer Drugs. In: ANZENBACHER, P.; ZANGER, U. M. (Eds.). **Metabolism of Drugs and Other Xenobiotics**. Weinheim: Wiley-VCH, 2012. p. 753.

SHIMIZU, S. et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. **Nature Cell Biology**, v. 6, n. 12, p. 1221–1228, 2004.

SHIMIZU, S. et al. Autophagic Cell Death and Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 3145–3153, 2014.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813–823, 2006.

SLEVIN, M. L. et al. The effect of dose on the bioavailability of oral etoposide: confirmation of a clinically relevant observation. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 24, n. 5, p. 329–331, 1989.

SMITH, D. A. (ED.). **Metabolism, Pharmacokinetics, and Toxicity of Functional Groups: Impact of Chemical Building Blocks on ADMET**. Cambridge: RSC Publishing, 2010.

SOARES, A. S. et al. Combination of CI-IB-MECA with paclitaxel is a highly effective cytotoxic therapy causing mTOR-dependent autophagy and mitotic catastrophe on human melanoma cells. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 140, n. 6, p. 921–935, 2014.

SOENGAS, M. S.; LOWE, S. W. Apoptosis and melanoma chemoresistance. **Oncogene**, v. 22, p. 3138–3151, 2003.

SORENSEN, C. M.; EASTMAN, A. Mechanism of Cis-Diamminedichloroplatinum(H)-Induced Cytotoxicity: Role of G2 Arrest and DNA Double-Strand Breaks. **Cancer Research**, v. 48, n. 16, p. 4484–4488, 1988.

SPAGNOLO, F. et al. BRAF-mutant melanoma: treatment approaches, resistance mechanisms, and diagnostic strategies. **Oncotargets and Therapy**, v. 8, p. 157–68, 2015.

STRANIX, B. R. et al. Pyridoxine hydroxamic acids as novel HIV-integrase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 4, p. 1233–1236, 2016.

SUMANTRAN, V. N. Cellular Chemosensitivity Assays: An Overview. **Methods in Molecular Biology**, v. 731, p. 219–236, 2011.

TESSIER, P. et al. Diphenylmethylene hydroxamic acids as selective class IIa histone deacetylase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, p. 5684–5688, 2009.

TSUJIMOTO, Y.; SHIMIZU, S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. **Apoptosis**, v. 12, p. 835–840, 2007.

VARGA, Z. V et al. Drug-induced mitochondrial dysfunction and cardiotoxicity. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 309, n. 9, p. 1453–1467, nov. 2015.

VICHAJ, V.; KIRTIKARA, K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1112–1116, 2006.

WHO. **WHO | Cancer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>.

Acesso em: 5 dez. 2016.

WONG, C. C.; CHENG, K.-W.; RIGAS, B. Preclinical predictors of anticancer drug efficacy: critical assessment with emphasis on whether nanomolar potency should be required of candidate agents. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 341, n. 3, p. 572–578, jun. 2012.

XU, J. et al. Vorinostat modulates cell cycle regulatory proteins in glioma cells and human glioma slice cultures. **Journal of Neurooncology**, v. 105, n. 2, p. 241–251, 2011.

YANG, B. et al. Antitumor activity of SAHA, a novel histone deacetylase inhibitor, against murine B cell lymphoma A20 cells in vitro and in vivo. **Tumor Biology**, v. 36, p. 5051–5061, 2015.

YILDIRIM, O. et al. Opportunities and Challenges for Drug Development: Public–Private Partnerships, Adaptive Designs and Big Data. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 12, p. 1–13, 2016.

YOSHIDA, M.; BEPPU, T. Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A. **Experimental Cell Research**, v. 177, p. 122–131, 1988.

ZAMORANO, J. L. et al. 2016 ESC Position Paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC Committee for Practice Guidelines. **European Heart Journal**, v. 37, p. 2768–2801, 2016.

ZHANG, J. et al. Histone deacetylase inhibitors induce autophagy through FOXO1-dependent pathways. **Autophagy**, v. 11, n. 4, p. 629–642, 2015.

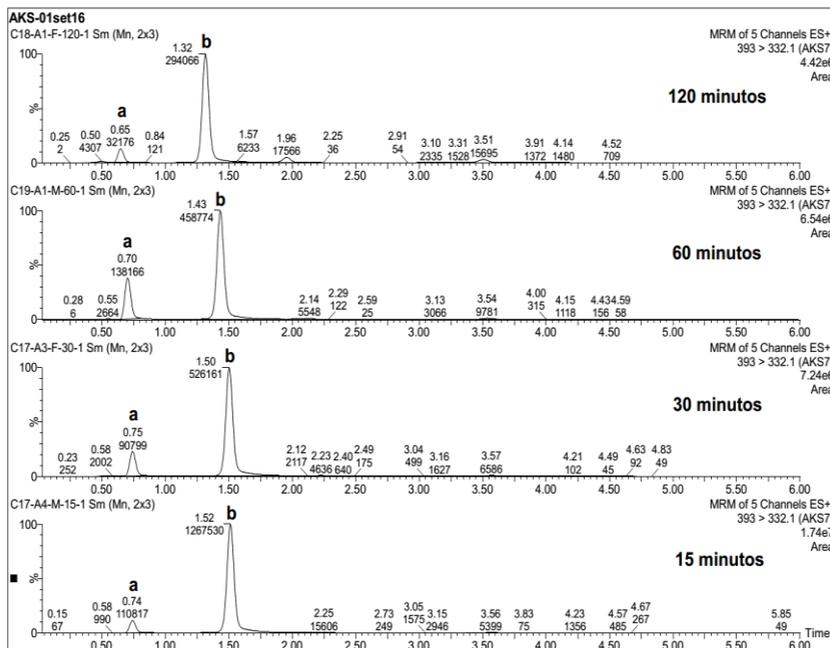
APÊNDICE A - Resultados da validação do método analítico desenvolvido para quantificação dos compostos em plasma de camundongo.

Limites de Detecção (LD) e Quantificação (LQ) (ng/mL)					
	AKS 61	AKS 7		AKS 26	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
LD	1	5		5	
LQ	5	20		20	
Recuperação (%)					
CQB	89,5	75,6	80,0	87,4	90,5
CQM	81,1	95,7	108,0	108,0	131,3
CQA	83,8	84,5	102,7	94,6	119,2
Linearidade					
<i>r</i>	0,9962	0,9973	0,9987	0,9959	0,9987
Precisão intrumental e intraensaio (IE) (CV%)					
Instrumental	4,77	2,70		5,89	
IE CQB	15,60	1,50	10,28	1,73	8,55
IE CQM	3,47	15,55	13,06	15,82	11,23
IE CQA	7,31	3,80	7,35	3,64	7,49
Exatidão (% BIAS)					
CQB	81,87	80,77	99,63	80,91	95,40
CQM	103,44	93,76	99,56	94,54	106,82
CQA	102,67	86,21	95,66	86,19	98,23
P1	92,60	81,24	110,88	76,15*	103,45
P2	106,70	105,95	96,73	108,68	102,54
P3	89,60	101,87	99,47	100,37	97,55
P4	103,23	102,75	103,14	104,33	101,37
P5	104,76	95,56	96,76	95,29	96,67
P6	96,90	100,79	101,28	100,35	102,02
Estabilidade em solução (CV%)					
CQB	-	15,28*		9,09	
CQA	-	3,99		7,86	
Estabilidade em matriz biológica (CV%)					
CCC CQB	-	12,10		3,83	
CCC CQA	-	2,44		9,12	
CCL CQB	-	9,90		43,71*	
CCL CQA	-	12,31		7,56	

CQB = Controle de Qualidade Baixo; CQM = Controle de Qualidade Médio;

CQA = Controle de Qualidade Alto; r = coeficiente de correlação; CV% = Coeficiente de Variação %; P1 a P6 = primeiro ao sexto ponto da curva de calibração; CCC = Ciclo de Congelamento Curto; CCL = Ciclo de Congelamento Longo. *Valores que se encontram fora dos limites preconizados pela ANVISA para cada ensaio. Os valores foram calculados conforme descrito na seção 3.4, e o método analítico foi considerado validado de acordo com os resultados obtidos.

APÊNDICE B - Cromatogramas obtidos durante a análise de plasma de camundongos tratados com AKS 7 por via oral.



Cromatogramas representativos das análises de amostras de plasma coletadas 15, 30, 60 e 120 minutos após o tratamento com AKS 7 (50 mg/kg, gavagem), onde observa-se a presença do pico cromatográfico possivelmente correspondente a um metabólito glicuronídeo do composto AKS 7, além do pico do próprio AKS 7. a = picos correspondentes ao possível metabólito glicuronídeo do AKS 7; b = picos correspondentes ao composto AKS 7. O método de análise está descrito na seção 3.4.