

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

FELIPE RIBALDO FERREIRA DA COSTA

**INVESTIGAÇÃO DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS PARA O TRATAMENTO  
ANTICÂNCER**

SÃO CARLOS

2022

FELIPE RIBALDO FERREIRA DA COSTA

**INVESTIGAÇÃO DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS PARA O TRATAMENTO  
ANTICÂNCER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de São Carlos como  
requisito para obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo (IFSC/USP)

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cristina da Silva Pranchevicius (DGE/UFSCar)

SÃO CARLOS

2022

FELIPE RIBALDO FERREIRA DA COSTA

**INVESTIGAÇÃO DE MOLÉCULAS HÍBRIDAS PARA O TRATAMENTO  
ANTICÂNCER**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Universidade Federal de São Carlos como  
requisito para obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

**Membros Efetivos:**

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo

Dra. Marília Valli

**Local:** Sala 10 do Departamento de Genética e  
Evolução da Universidade Federal de São Carlos  
(DGE/UFSCar)

**Data:** 06 de julho de 2022

**Horário:** 14h00

SÃO CARLOS

2022

Aos meus pais, Ederson e Karina, por terem  
construído um universo de oportunidades.

Aos meus irmãos, Matheus e Guilherme, por  
serem meu refúgio e minha esperança.

Às minhas avós, Lia e Julinha, por acreditarem  
nesta jornada.

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de São Carlos, por todo o conhecimento adquirido e vivências que guiaram minha formação acadêmica.

À Universidade de São Paulo, Instituto de Física de São Carlos e Laboratório de Química Medicinal, por permitirem que o projeto fosse desenvolvido com todo o amparo necessário.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo, por ter visto em mim potencial de contribuir com o grupo de pesquisa, por todo o incentivo, confiança e às diversas oportunidades que me foram oferecidas.

Ao Prof. Dr. Dennis Russowsky e sua equipe, pela síntese dos híbridos de quinazolina-chalcona e imensurável colaboração sem a qual este trabalho não seria possível.

A todos os professores que me fizeram um estudante crítico e com sede de conhecimento.

Ao meu colega de laboratório, Me. Matheus da Silva Souza, essencial para minha formação como pesquisador. Agradeço pelos ensinamentos, suporte, paciência e pela amizade construída ao longo destes anos.

Às técnicas e aos demais membros do LQMC, pela ajuda constante, aprendizado e discussões científicas. Agradeço pelos cafés e conversas descompromissadas do dia a dia.

Ao apoio das agências de fomento para realização do presente trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) – Processo 138308/2020-9; e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processo 2021/06317-2 (2013/07600-3 – CEPID-CIBFar).

Aos meus amigos, Amanda Tejada, Isabela Dolci, Jaiane Santana, Maria Júlia Mattos, Matheus Pintor, Renan Omete e Vinicius Cauan, por serem minha inspiração e exemplos de dedicação, companheirismo e diversão. Obrigado pelo apoio, carinho e eternas memórias.

Aos meus pais e irmãos por serem responsáveis por quem sou hoje, por acreditarem e estarem sempre presentes por mim. Também agradeço ao meu tio pela solidariedade e às minhas avós, por transmitirem um legado de luta, admiração à vida e amor.

## RESUMO

Câncer é a atribuição dada ao crescimento e à proliferação descontrolados de células anormais capazes de invadir e destruir o tecido adjacente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o crescimento global de casos de câncer atingirá a marca de 60% até 2040, totalizando em torno de 37 milhões de casos. No Brasil, estimativas divulgadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) projetam que aproximadamente 66 mil novos indivíduos sejam acometidos por câncer de próstata (CaP) em 2022. No caso do tipo metastático e hormônio-refratário (mHRPC, *metastatic and hormone-refractory prostate cancer*), as células não se mostram responsivas ao tratamento convencional. De forma a contornar esta situação, o uso de terapias citotóxicas tendo como alvo os microtúbulos (MTs) consiste em uma opção consagrada na prática clínica. Os MTs são elementos estruturais constituídos pela proteína dimérica tubulina, a qual desempenha funções celulares por meio de sua capacidade intrínseca de instabilidade dinâmica: polimerização e despolimerização. Alterações nesta dinâmica levam ao bloqueio da mitose e da migração celular, direcionando a célula para apoptose. Este comportamento pode ser induzido pelo uso de agentes moduladores em sítios conhecidos da mesma, configurando uma conduta promissora quando se trata do desenvolvimento de antitumorais. Neste contexto, a união de grupos farmacofóricos para gerar moléculas híbridas emerge como alternativa inovadora. Assim, o presente trabalho traz resultados a respeito da triagem *in vitro* de ligantes bioativos para o tratamento do mHRPC. Uma linhagem de CaP (DU-145) e três não-tumorais [fibroblastos humanos (HFF-1) e murinos (FC3H), e células epiteliais de próstata humana (RWPE-1)] foram submetidas a ensaios de viabilidade celular para avaliação da potência de 10 híbridos de quinazolina-chalcona (AQCs) a partir de seus valores de  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$ . Para as amostras selecionadas, tais valores foram utilizados na determinação do índice de seletividade (SI, *selectivity index*). Três híbridos (AQC-02, AQC-04 e AQC-08) foram ativos na linhagem de CaP ( $IC_{50} \leq 20 \mu M$ ) e seletivos frente às não-tumorais ( $SI \geq 5$ ) e por isso encaminhados para ensaios celulares envolvendo análise de características observadas na cascata metastática. Os 3 híbridos inibiram a migração em ensaios qualitativos *wound healing* em concentração única ( $\geq 50\%$ ) e concentração x efeito. Além disso, por meio de um estudo *transwell* baseado em câmara de Boyden, foi possível quantificar e confirmar o efeito inibitório dos híbridos na migração e invasão de células tumorais (ambas com  $IC_{50} \leq 10 \mu M$ ). Ensaios cinéticos direcionados ao alvo molecular corroboraram para a classificação dos híbridos como inibidores de polimerização da tubulina, bem como viabilizaram a determinação de seus valores de  $IC_{50}$  ( $5,71 \pm 0,09$ ;  $9,04 \pm 0,40$  e  $8,40 \pm 0,31 \mu M$ , respectivamente). Ensaios de competição sugeriram que os híbridos possivelmente interagem com a tubulina nas proximidades do sítio da colchicina ou nele próprio. Adicionalmente, ensaios de fluorescência reforçaram a ação dos compostos em desestabilizar a divisão celular e promover a fragmentação nuclear de DU-145. Este trabalho, portanto, evidencia resultados promissores que, em consonância, suportam a identificação de compostos líderes elegíveis para ensaios *in vitro* e *in vivo* de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) objetivando a seleção de candidatos a novos fármacos para a quimioterapia do mHRPC.

**Palavras-chave:** Câncer de Próstata. Química Medicinal. Descoberta e Desenvolvimento de Fármacos. Tubulina. Agentes Direcionados aos Microtúbulos. Moléculas Híbridas. Quinazolina. Chalcona.

## ABSTRACT

Cancer is the attribution given to the uncontrolled growth and proliferation of abnormal cells capable of invading and destroying the adjacent tissue. According to the World Health Organization (WHO), the global growth in cancer cases will reach the 60% mark by 2040, totaling around 37 million cases. In Brazil, estimates released by the National Cancer Institute (INCA) project that approximately 66 thousand new individuals will be affected by prostate cancer (PC) in 2022. In the case of the metastatic and hormone-refractory type (mHRPC), the cells are not responsive to conventional treatment. In order to circumvent this situation, the use of cytotoxic therapies targeting microtubules (MTs) is a well-established option in clinical practice. MTs are structural elements constituted by the dimeric protein tubulin, which performs cellular functions through its intrinsic capacity for dynamic instability: polymerization and depolymerization. Changes in this dynamic lead to blockage of mitosis and cell migration, directing the cell to apoptosis. This behavior can be induced by the use of modulating agents in known sites of tubulin, configuring a promising conduct when it comes to the development of antitumor drugs. In this context, the union of pharmacophoric groups to generate hybrid molecules emerges as an innovative alternative. Thus, the present work brings results regarding the *in vitro* screening of bioactive ligands for the treatment of mHRPC. A cell line of PC (DU-145) and three non-tumor ones [human (HFF-1) and murine (FC3H) fibroblasts, and human prostate epithelial cells (RWPE-1)] were submitted to cell viability assays to evaluate the potency of 10 quinazoline-chalcone hybrids (AQC) from their  $IC_{50}$  and  $CC_{50}$  values. For the selected samples, these values were used to determine the selectivity index (SI). Three hybrids (**AQC-02**, **AQC-04** and **AQC-08**) were active in the PC cell line ( $IC_{50} \leq 20 \mu M$ ) and selective against non-tumor ones ( $SI \geq 5$ ), and therefore referred to cellular assays involving analysis of characteristics observed in the metastatic cascade. The 3 hybrids inhibited migration in qualitative wound healing assays at single concentration ( $\geq 50\%$ ) and concentration x effect. Furthermore, through a transwell study based on Boyden's chamber, it was possible to quantify and confirm the inhibitory effect of hybrids on tumor cell migration and invasion (both with  $IC_{50} \leq 10 \mu M$ ). Kinetic assays directed to the molecular target corroborated the classification of the hybrids as tubulin polymerization inhibitors, as well as made it possible to determine their  $IC_{50}$  values ( $5.71 \pm 0.09$ ;  $9.04 \pm 0.40$  and  $8.40 \pm 0.31 \mu M$ , respectively). Competition assays suggested that the hybrids possibly interact with tubulin near or at the colchicine site itself. Additionally, fluorescence assays reinforced the action of the compounds in destabilizing cell division and promoting the nuclear fragmentation of DU-145. This work, therefore, shows promising results that, in consonance, support the identification of lead compounds eligible for *in vitro* and *in vivo* ADME (Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion) assays, aiming at the selection of candidates for new drugs for the mHRPC chemotherapy.

**Keywords:** Prostate Cancer. Medicinal Chemistry. Drug Discovery and Development. Tubulin. Microtubule-targeting Agents. Hybrid Molecules. Quinazoline. Chalcone.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – A)</b> Principais modificações relacionadas à malignidade do câncer. <b>B)</b> Mutações no material genético são responsáveis pela natureza descontrolada de crescimento e proliferação verificada em células tumorais .....	11
<b>Figura 2 –</b> Etapas centrais compreendidas no processo de metástase.....	14
<b>Figura 3 –</b> Dímeros livres de tubulina associados formam protofilamentos que interagem lateralmente para organização da estrutura dinâmica dos MTs. Moléculas de GTP presentes na superfície da $\beta$ -tubulina promovem uma maior taxa de adição de novos dímeros na extremidade (+). O equilíbrio entre polimerização e despolimerização controla diversas funções celulares .....	16
<b>Figura 4 – A)</b> Heterodímero $\alpha$ e $\beta$ de tubulina com seus sete sítios de ligação: maitansina; taxanos; laulimalida; colchicina; gatorbulina; pironetina e vinca. <b>B)</b> Estrutura da colchicina: agente desestabilizador de MTs.....	18
<b>Figura 5 –</b> Perfis dos híbridos avaliados com os núcleos estruturais das classes químicas chalcona (vermelho) e quinazolina (azul) ligados por uma amina (roxo), seguindo os padrões <b>I) meta</b> (1,3) e <b>II) para</b> (1,4) do anel B.....	27
<b>Figura 6 – A)</b> Redução do corante resazurina em resorufina. <b>B)</b> Resultado do ensaio de viabilidade celular após incubação da placa de 96 poços com resazurina: quanto mais intensa a coloração rosa de um poço, maior o número de células viáveis e, quanto mais azul, menor esse número .....	28
<b>Figura 7 –</b> Comparação das porcentagens de células viáveis obtidas nos ensaios de viabilidade celular para a linhagem DU-145 (preto) e as linhagens não-tumorais HFF-1, FC3H e RWPE-1 (cinza) para AQC-02 .....	36
<b>Figura 8 –</b> Comparação das porcentagens de células viáveis obtidas nos ensaios de viabilidade celular para a linhagem DU-145 (preto) e as linhagens não-tumorais HFF-1, FC3H e RWPE-1 (cinza) para AQC-04 .....	36
<b>Figura 9 –</b> Comparação das porcentagens de células viáveis obtidas nos ensaios de viabilidade celular para a linhagem DU-145 (preto) e as linhagens não-tumorais HFF-1, FC3H e RWPE-1 (cinza) para AQC-08 .....	37
<b>Figura 10 –</b> Imagens da inibição da migração de DU-145 pelo controle positivo padrão colchicina a 10 $\mu$ M. Meios com e sem DMSO foram empregados como controles negativos. Aumento de 40x .....	38
<b>Figura 11 –</b> Imagens da inibição da migração de DU-145 pelos híbridos AQC-02, AQC-04 e AQC-08 a 10 $\mu$ M. Aumento de 40x.....	38
<b>Figura 12 –</b> Resultado do ensaio <i>wound healing</i> em concentração variável (1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M e 10 $\mu$ M) para AQC-02, AQC-04, AQC-08 e colchicina na linhagem DU-145 .....	39
<b>Figura 13 –</b> Alterações dos substituintes <b>R<sub>2</sub></b> nos híbridos de quinazolina-chalcona selecionados .....	40
<b>Figura 14 –</b> Resultado da triagem dos híbridos no ensaio de polimerização da tubulina. Colchicina, paclitaxel, podofilotoxina e vimblastina foram empregados como controles.....	41
<b>Figura 15 –</b> Resultado do ensaio de competitividade dos híbridos pelo sítio da colchicina. Paclitaxel, podofilotoxina e vimblastina foram utilizados como controles .....	43
<b>Figura 16 –</b> Efeitos dos controles negativos, da colchicina e dos híbridos selecionados na morfologia nuclear de células da linhagem DU-145. As setas indicam as irregularidades genéticas observadas. Núcleos corados com o marcador azul Hoechst 33342 e registrados em aumento de 20x. Barra de escala = 50 $\mu$ m .....	45



## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Principais insumos farmacêuticos aprovados pelo FDA para o tratamento da forma refratária do CaP.....	12
<b>Quadro 2</b> – Sítios de modulação da proteína tubulina: exemplos e classificação de seus respectivos agentes .....	17
<b>Quadro 3</b> – Dissertações de Mestrado desenvolvidas por pesquisadores do LQMC, expandindo o estudo de moduladores da tubulina para o tratamento antitumoral.....	22
<b>Quadro 4</b> – Teses de Doutorado desenvolvidas por pesquisadores do LQMC, visando a investigação de moduladores da tubulina para o tratamento anticâncer.....	23
<b>Quadro 5</b> – Tese de Doutorado em andamento no LQMC, tendo em vista a avaliação de moduladores da tubulina como alternativas terapêuticas ao câncer.....	23
<b>Quadro 6</b> – Substituintes <b>R<sub>1</sub></b> e <b>R<sub>2</sub></b> ligados ao anel A da porção chalcona dos híbridos, bem como a denotação do perfil estrutural dos mesmos de acordo com os padrões de ligação do anel B .....	27

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores de IC <sub>50</sub> (μM) e CC <sub>50</sub> (μM) para híbridos e controle nos ensaios de viabilidade celular .....	34
<b>Tabela 2</b> – Índice de seletividade (SI, <i>selectivity index</i> ) dos híbridos avaliados em relação às linhagens HFF-1, FC3H e RWPE-1.....	35
<b>Tabela 3</b> – Resultados da triagem no ensaio qualitativo <i>wound healing</i> em DU-145.....	37
<b>Tabela 4</b> – Valores de IC <sub>50</sub> (μM) de migração e invasão celular em DU-145 para os compostos ativos e para o padrão colchicina .....	39
<b>Tabela 5</b> – Valores de IC <sub>50</sub> (μM) de polimerização da tubulina dos compostos-teste e dos inibidores utilizados como controles (colchicina, podofilotoxina e vimblastina), bem como o valor de EC <sub>50</sub> (μM) do estabilizador paclitaxel também empregado como controle .....	41
<b>Tabela 6</b> – Comparação dos valores de IC <sub>50</sub> (μM) obtidos nos ensaios de citotoxicidade, migração/invasão celular e polimerização da tubulina, visando estabelecer relações entre estrutura e atividade dos compostos triados .....	42

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
1.1 Câncer .....	10
1.2 Câncer de Próstata.....	11
1.3 Metástase .....	13
1.4 Ensaios Celulares .....	15
1.5 Alvo Terapêutico.....	16
1.6 Planejamento de Novos Fármacos .....	17
1.7 Química Medicinal.....	19
1.8 Híbridos de Quinazolina-Chalcona.....	19
1.9 Racional para Uso de Moduladores de Tubulina .....	21
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1 Geral.....	25
2.2 Específicos.....	25
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	26
3.1 Linhagens Celulares.....	26
3.2 Série de Compostos.....	26
3.3 Ensaios de Viabilidade Celular .....	28
3.4 Migração e Invasão Celular.....	29
3.4.1 Ensaio <i>Wound Healing</i> .....	29
3.4.2 Ensaios <i>Transwell</i> Baseados em Câmara de Boyden.....	30
3.5 Ensaios Bioquímicos de Modulação da Tubulina.....	31
3.5.1 Ensaio de Polimerização .....	31
3.5.2 Ensaio de Competitividade pelo Sítio da Colchicina .....	32
3.6 Marcação de DNA Nuclear com Hoechst 33342.....	32
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	34
4.1 Citotoxicidade e Seletividade.....	34
4.2 Ensaios de Migração e Invasão Celular.....	37
4.2.1 <i>Wound Healing</i> .....	37
4.2.2 <i>Transwell</i> Baseados em Câmara de Boyden .....	39
4.3 Modulação da Proteína Tubulina .....	40
4.3.1 Polimerização <i>in vitro</i> .....	40
4.3.2 Competição pelo Sítio da Colchicina .....	42
4.4 Marcação Nuclear .....	43
<b>5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48
<b>APÊNDICE A</b> – Publicações com as classes quinazolina e chalcona para tratamento do CaP.....	56
<b>APÊNDICE B</b> – Representações gráficas dos resultados dos ensaios de viabilidade celular.....	57
<b>ANEXO A</b> – Certificado do curso <i>Target to Candidate: An Introduction to Drug Discovery</i> .....	58

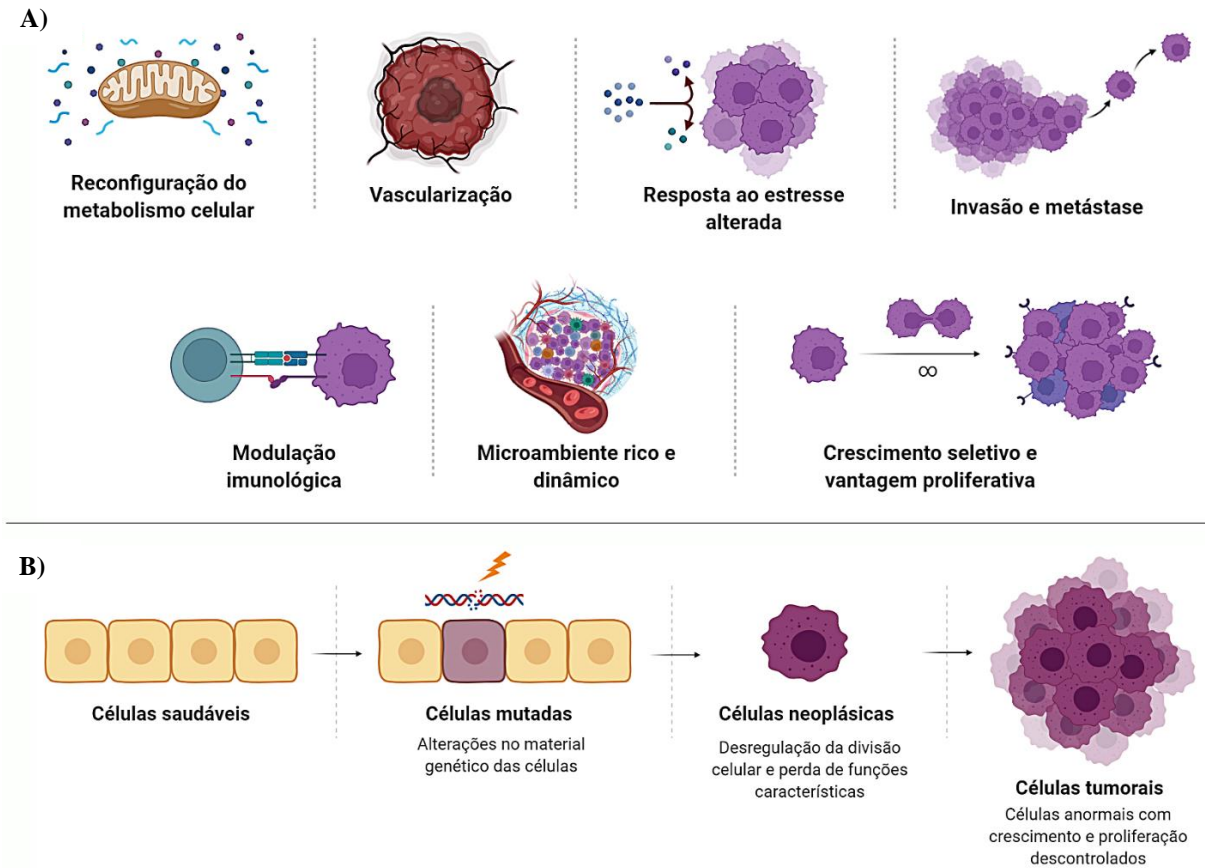
## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

Estimativas do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) apontam que o Brasil terá mais de 600 mil novos casos de câncer em 2022 (INCA, 2020). Trata-se de neoplasmas malignos resultantes do crescimento e proliferação descontrolados de células capazes de invadir e destruir o tecido circundante (NURMIK *et al.*, 2020). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que o mundo registrará um crescimento de 60% dos casos de câncer até o ano de 2040, ultrapassando a marca de 30 milhões de indivíduos acometidos, o que reforça a gravidade desta problemática de saúde pública (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2020).

O caráter maligno das células tumorais decorre de uma condição de desequilíbrio de todo o ambiente que o cerca, o qual desempenha notável participação no desenvolvimento tumoral, especialmente em relação à iniciação e metástase (NURMIK *et al.*, 2020). Crescimento seletivo, vantagem proliferativa, alteração da resposta ao estresse, vascularização sustentada pela angiogênese, invasão tecidual e metástase, modificações metabólicas e modulação imunológica são algumas das principais alterações responsáveis pela manifestação de tumores (FOUAD; AANEI, 2017). Tais marcadores tumorais encontram-se representados na **Figura 1A**. O potencial de replicação é mantido por mecanismos dinâmicos e eficientes de evasão da apoptose, autossuficiência em sinais de crescimento e insensibilidade a sinais inibitórios de proliferação, garantindo sua sobrevivência (HANAHAN, 2022).

Em células saudáveis, o ciclo celular é caracterizado por quatro fases: *gap 1* (G1), síntese (S), *gap 2* (G2) e mitose (M); as quais estão sujeitas a uma minuciosa regulação por proteínas e moléculas sinalizadoras (ZHENG *et al.*, 2019). Modificações genéticas são capazes de influenciar diretamente na progressão desordenada deste ciclo de crescimento e divisão. Caso sejam detectadas anomalias, mecanismos competentes são acionados para corrigi-las. Todavia, quando essa correção não é capaz de solucionar tais irregularidades, a célula é induzida a se autodestruir em um evento biológico denominado de apoptose (ALIMBETOV *et al.*, 2018). Em função de alterações genéticas, células tumorais tornam-se capazes de esquivar-se desse processo e de mecanismos de regulação e controle do ciclo celular, multiplicando-se irrestritamente (**Figura 1B**) (FOUAD; AANEI, 2017). Dessa forma, a progressão entre as fases destas células atípicas constitui um campo importante de interferência por agentes antitumorais, visto que podem resultar no bloqueio da proliferação descontrolada (LIU *et al.*, 2019).



**Figura 1** – **A)** Principais modificações relacionadas à malignidade do câncer. **B)** Mutações no material genético são responsáveis pela natureza descontrolada de crescimento e proliferação verificada em células tumorais.

**Fonte:** Elaborada pelo autor. Criada com BioRender e baseada em Fouad e Aanei (2017).

## 1.2 Câncer de Próstata

O câncer de próstata (CaP) consiste no segundo diagnóstico de câncer mais frequente entre os homens e a quinta principal causa de morte por esta doença no mundo (INCA, 2020; IARC, 2020; SUNG *et al.*, 2021). Anualmente, mais de 1,5 milhão de indivíduos são diagnosticados e cerca de 366 mil morrem a nível mundial em decorrência de suas complicações, sobretudo relacionadas ao comportamento metastático (PERNAR *et al.*, 2018). De acordo com dados apresentados pelo INCA, estima-se que mais de 65 mil novos indivíduos foram afetados com este tipo de câncer no Brasil em 2021. Segundo estimativas recentes da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), o mundo registrará um aumento de 71,6% dos casos de CaP nas próximas duas décadas, enquanto o Brasil excederá essa marca com um crescimento de 83,2%, alcançando mais de 178 mil casos em 2040 (IARC, 2020). Esta alta incidência evidencia a necessidade de se buscar alternativas terapêuticas que reduzam seu impacto na saúde pública no futuro (RAWLA, 2019).

A depender da linhagem e do estágio patológico, as alternativas indicadas de tratamento do CaP incluem **(I)** radioterapia, castração por **(II)** métodos cirúrgicos de remoção completa da próstata ou testículos, ou por **(III)** vias medicamentosas que inibem a síntese de testosterona

(bloqueio hormonal). Entretanto, além de serem intervenções invasivas, os resultados observados na prática clínica são pouco favoráveis e repletos de efeitos adversos – que muitas vezes levam à descontinuação por parte do paciente (FU *et al.*, 2012). A manifestação inicial do CaP ocorre na forma dependente de andrógeno, sendo passível de ser tratada com sucesso por meio de terapia de privação hormonal. Todavia, um comportamento mais agressivo e letal, com resistência à castração e com maior propensão à ocorrência de metástase, pode ser eventualmente desenvolvido após alguns anos do tratamento bem-sucedido (AYTES *et al.*, 2018).

Com o aumento da expectativa de vida da população e a negligência em relação à realização de exames periódicos, mais homens idosos eventualmente padecerão pelos efeitos da incidência tumoral (CHANG *et al.*, 2017). As taxas de mortalidade mantêm-se elevadas mesmo após tratamento com as estratégias tradicionais mencionadas. Para os casos de CaP metastático, tais taxas são ainda mais expressivas e as opções terapêuticas são restritas às quimioterapias que asseguram sobrevida média pouco superior a um ano. Dessa forma, novas e promissoras terapias são requeridas para o tratamento de formas malignas recorrentes que se revelam após emprego de procedimentos convencionais, como é o caso do câncer de próstata metastático e hormônio-refratário (mHRPC, *metastatic and hormone-refractory prostate cancer*). Entre os principais insumos farmacêuticos ativos reconhecidos pelo FDA (U.S. *Food and Drug Administration*) para o tratamento do CaP, treze agem na forma refratária da doença (**Quadro 1**) e são conhecidos como de segunda geração (65%), sendo apenas o cabazitaxel e o docetaxel (15%) moduladores clássicos da proteína tubulina (FU *et al.*, 2012; LEUNG *et al.*, 2021; NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2021).

Insumo Farmacêutico Ativo	Nome Comercial	Fabricante
Acetato de Abiraterona	Zytiga®	Janssen
Apalutamida	Erleada®	Janssen
Cabazitaxel	Jevtana®	Sanofi
Camsilato de Rucaparibe	Rubraca®	Clovis Oncology
Cloridrato de Mitoxantrona	Novantrone®	Pfizer
Darolutamida	Nubeqa®	Bayer
Dicloreto de Rádio, <sup>223</sup> Ra	Xofigo®	Bayer
Docetaxel	Taxotere®	Sanofi
Enzalutamida	Xtandi®	Astellas
Estramustina	Emcyt®	Pfizer
Olaparibe	Lynparza®	AstraZeneca
<sup>177</sup> Lu-PSMA-617	Pluvicto™	Novartis
Sipuleucel-T	Provenge®	Dendreon

**Quadro 1** – Principais insumos farmacêuticos aprovados pelo FDA para o tratamento da forma refratária do CaP. Resultados referentes à busca realizada até 19 de abril de 2022.

**Fonte:** Elaborado pelo autor com base em Leung *et al.* (2021), National Cancer Institute (2021) e FDA (2022).

Sabe-se que os andrógenos exercem papel crucial no crescimento, desenvolvimento e manutenção da próstata. Como tratado anteriormente, constata-se que as formas de CaP primárias dependem amplamente dos andrógenos para crescerem e sobreviverem, tal qual se verifica no desenvolvimento natural da próstata. Os efeitos deste hormônio se dão por meio do receptor de andrógeno intracelular (AR, *androgen receptor*), um ativador transcricional dependente de ligante. Por conseguinte, a primeira classe de alvos terapêuticos utilizada para o tratamento do CaP foi constituída por andrógenos e AR, e os fármacos aprovados conhecidos como de primeira geração (FU *et al.*, 2012).

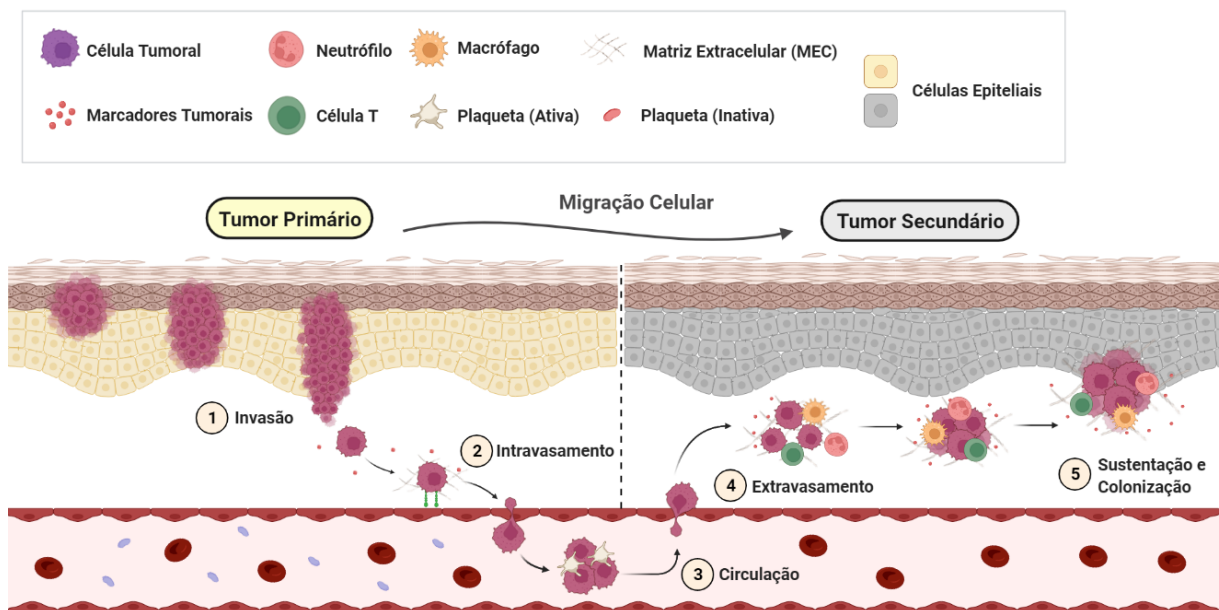
Apesar dos avanços alcançados com a aprovação de terapias voltadas ao AR, os casos de resistência farmacológica persistem como um empecilho a ser superado para o desenvolvimento de um tratamento eficiente e seguro. Neste contexto, a linhagem DU-145 destaca-se como modelo ideal para avaliar os efeitos e mecanismos de novos agentes anticâncer para o mHRPC, pois corresponde às células de CaP isoladas de metástase cerebral e resistentes aos fármacos tradicionais por serem independentes de andrógeno humano. Trata-se de uma linhagem com uma das maiores manifestações de agressividade do CaP, sendo reconhecida por sua contundente capacidade de migração e invasão tecidual (STONE *et al.*, 1978; SANLI *et al.*, 2009; KAUR *et al.*, 2021). Além disso, é caracterizada por não manifestar antígeno prostático específico (PSA, *prostate specific antigen*), uma glicoproteína usualmente expressa pelo tecido da próstata e cujos níveis plasmáticos são utilizados, em consonância com o exame de toque retal, para o diagnóstico do CaP (DHANYAKRISHNAN *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018; RAWLA, 2019). Desse modo, considera-se a linhagem DU-145 como uma das referências mais estudadas na busca de alternativas terapêuticas para o mHRPC.

### **1.3 Metástase**

O processo denominado de metástase configura no comportamento mais complexo e agressivo na tumorigênese, na qual a migração celular desempenha papel crucial. Praticamente todos os óbitos por CaP são acarretados por metástases manifestadas em estágios avançados e que usualmente são resistentes aos tratamentos habituais (AYTES *et al.*, 2018). Trata-se da capacidade de células atípicas de se desassociarem do local de origem do tumor e migrarem por diferentes regiões, invadindo-as e provocando a ocorrência de tumores secundários. Nos novos locais, as células tumorais provenientes do tumor primário usufruem de distintos mecanismos para se manterem viáveis, reconfigurando suas demandas metabólicas em detrimento das fontes disponíveis. O crescimento metastático está sujeito a vários fatores que favorecem mudanças

adaptativas essenciais ao novo microambiente, como ação de macrófagos, autofagia desequilibrada e eventos inflamatórios secundários (MAJIDPOOR; MORTEZAEI, 2021).

A metástase é considerada uma condição sistêmica, distinguindo-se de um tumor primário local passível de ser tratado por quimioterapia, cirurgia ou radioterapia, sendo responsável por 90% dos casos que levam os pacientes à óbito (LI; KING, 2012; FARES *et al.*, 2020). As etapas da disseminação metastática incluem (**Figura 2**): **(I)** escape celular do tumor primário pela invasão de tecidos adjacentes com a degradação da matriz extracelular (MEC) e subsequente migração em direção aos vasos sanguíneos; **(II)** infiltração das células em tais vasos (intravasamento); **(III)** movimentação das células na corrente sanguínea; **(IV)** adesão das células cancerosas às endoteliais, extravasando da corrente sanguínea e adentrando tecidos ou órgãos afastados do local de origem (extravasamento); **(V)** sustentação da sobrevivência, adaptação e colonização do microambiente, propiciando a manifestação de um novo tumor (KLEIN, 2008; CHAFFER; WEINBERG, 2011; MAJIDPOOR; MORTEZAEI, 2021).



**Figura 2** – Etapas centrais compreendidas no processo de metástase.

**Fonte:** Elaborada pelo autor. Criada com BioRender e baseada em Fares *et al.* (2020).

A invasão ocorre na interface entre o tumor e a frente invasiva por meio da migração de uma única célula ou por invasão coletiva. No primeiro caso, as células atípicas alteram sua forma e padrões de fixação para adquirirem um fenótipo invasivo, enquanto no segundo, o processo se dá pela coesão de um cordão multicelular que mantém as células aderidas (MAJIDPOOR; MORTEZAEI, 2021). O mecanismo por invasão coletiva se mostra menos frequente, mas destaca-se por exibir maior eficiência quando comparado com a migração de



uma única célula, visto ser capaz de adotar uma rota metastática mais competente (STRILIC; OFFERMANN, 2017).

No caso do CaP metastático, verifica-se que as células tumorais se organizam em torno da prática migratória coletiva (KIM *et al.*, 2017; LO *et al.*, 2020), apresentando propriedades semelhantes às verificadas em células epiteliais, como a capacidade de adesão entre si. Essa característica viabiliza com que elas migrem conjuntamente e alcancem a circulação sanguínea como aglomerados celulares (MAJIDPOOR; MORTEZAEE, 2021). Os ossos e linfonodos constituem os locais mais frequentes de metástase do CaP, ainda que pulmão e fígado estejam se tornando variantes severas atreladas ao aumento da letalidade e prognóstico desfavorável (HALABI *et al.*, 2016).

A metástase pode ser comprometida por falhas em alguma de suas complexas etapas. Cada uma exibe diversos alvos passíveis de serem explorados nos quais diferentes moduladores podem atuar com o objetivo de interferir neste processo. Como destacado, a migração celular configura um destes importantes alvos, assumindo notável relevância na disseminação cancerígena. Por essa razão, propriedades antimigratórias têm demonstrado grande importância no desenvolvimento de candidatos à antitumorais, visto serem capazes de influenciarem tal fenótipo (SMALL *et al.*, 2002; YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005). A compreensão de todo o evento de metástase e de suas causas é fundamental para identificação de seus principais alvos. Estratégias que busquem suprimir sua ocorrência ou reduzir sua extensão estão entre os grandes desafios atuais no desenvolvimento de tratamentos eficientes e seguros de tumores metastáticos (ESPOSITO; GANESAN; KANG, 2021).

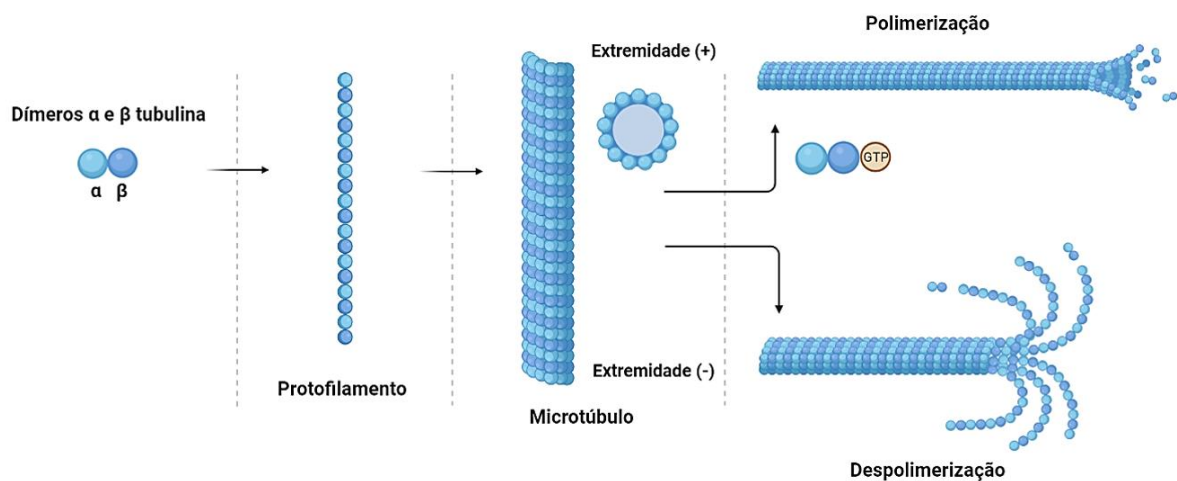
#### **1.4 Ensaios Celulares**

Os ensaios com culturas de células são comumente utilizados em função de sua alta reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade, sendo primordiais no processo de triagem de compostos candidatos a novos fármacos, pois geram variadas interpretações concomitantes, tais como viabilidade celular e seletividade. As linhagens empregadas nestes ensaios permitem a identificação de propriedades específicas de células tumorais ao interagirem com moléculas de interesse farmacológico. A permeabilidade da membrana plasmática configura um desses fatores a serem considerados no desenvolvimento de novos medicamentos, visto que muitos atuam em alvos terapêuticos intracelulares (YANG; HINNERD, 2014; ALLAVALLE *et al.*, 2020). Nesse contexto, a maquinaria celular é imprescindível nas análises relacionadas com o planejamento de fármacos, pois considera adversidades que devem ser superadas por um ligante bioativo e que não podem ser avaliadas em ensaios contra um alvo molecular isolado, como a

própria membrana plasmática e mecanismos de efluxo celular, promovendo apenas a seleção de moléculas que sejam aptas a ultrapassar tais resistências (HAIDER *et al.*, 2020).

### 1.5 Alvo Terapêutico

Uma série de funções celulares está relacionada com elementos estruturais dinâmicos do citoesqueleto denominados de microtúbulos (MTs), tais como formação do fuso mitótico, deslocamento de componentes intracelulares e migração. Essas estruturas são compostas por heterodímeros  $\alpha$  e  $\beta$  da proteína tubulina, um dos principais alvos moleculares validados e investigados para o desenvolvimento de terapias antitumorais (TANGUTUR *et al.*, 2017). A polimerização e despolimerização desta proteína asseguram um complexo dinâmico do aparato mitótico, de ancoragem de organelas, diferenciação celular e do movimento intracelular. A instabilidade desse sistema, representado na **Figura 3**, é requerida para que a proteína exerça suas funções devidamente (BROUHARD; RICE, 2018).



**Figura 3** – Dímeros livres de tubulina associados formam protofilamentos que interagem lateralmente para organização da estrutura dinâmica dos MTs. Moléculas de GTP presentes na superfície da  $\beta$ -tubulina promovem uma maior taxa de adição de novos dímeros na extremidade (+). O equilíbrio entre polimerização e despolimerização controla diversas funções celulares.

**Fonte:** Elaborada pelo autor. Criada com BioRender e baseada em Brouhard e Rice (2018).

Perturbações na dinâmica de funcionamento dos MTs podem reduzir o alcance de sua atividade e promover bloqueio da mitose, da migração celular e da angiogênese, levando a célula à morte (ČERMÁK, 2020; GUDIMCHUK; MCINTOSH, 2021). Agentes capazes de interferir no desempenho dos polímeros pela modulação da proteína tubulina podem afetar processos vitais à tumorigênese. Múltiplas características das células cancerígenas associam-se ao perfil de polimerização da tubulina, as quais podem ser potencialmente investigadas por novas terapias anticâncer que tenham tal proteína como alvo (LI *et al.*, 2018).

Nesse contexto, compostos capazes de modularem os MTs consistem em uma alternativa evidente para o desenvolvimento de fármacos com propriedades antitumorais

(GIANNAKAKOU; GALLETTI, 2017). A tubulina apresenta sete sítios de ligação para tais moléculas, sendo eles: colchicina; gatorbulina; laulimalida/pelorusida; maitansina; pironetina; taxanos e vinca (MATTHEW *et al.*, 2021; SHUAI *et al.*, 2021). Os moduladores que se ligam em tais regiões podem ser categorizados em duas classes: desestabilizadores ou estabilizadores (TANGUTUR *et al.*, 2017; MATTHEW *et al.*, 2021). O equilíbrio entre os MTs é modificado pela interação destes ligantes com a tubulina, resultando na interrupção do fuso mitótico e na transição crítica do ciclo celular, o que provoca apoptose (SHUAI *et al.*, 2021). O **Quadro 2** reúne os agentes que mais se destacam e suas respectivas classificações de acordo com a natureza da modulação de cada sítio.

Sítios da Tubulina	Agentes Moduladores de MTs	Classificação
Colchicina	Colchicina, Combretastatina A4 e Plinabulina	Desestabilizador
Gatorbulina	Gatorbulina-1	Desestabilizador
Maitansina	Maitansina	Desestabilizador
Pironetina	Pironetina	Desestabilizador
Vinca	Vimblastina, Vincristina, Eribulina e Dolastatina 10	Desestabilizador
Laulimalida/Pelorusida	Laulimalida e Pelorusida	Estabilizador
Taxanos	Paclitaxel, Docetaxel e Epotilona B	Estabilizador

**Quadro 2** – Sítios de modulação da proteína tubulina: exemplos e classificação de seus respectivos agentes.

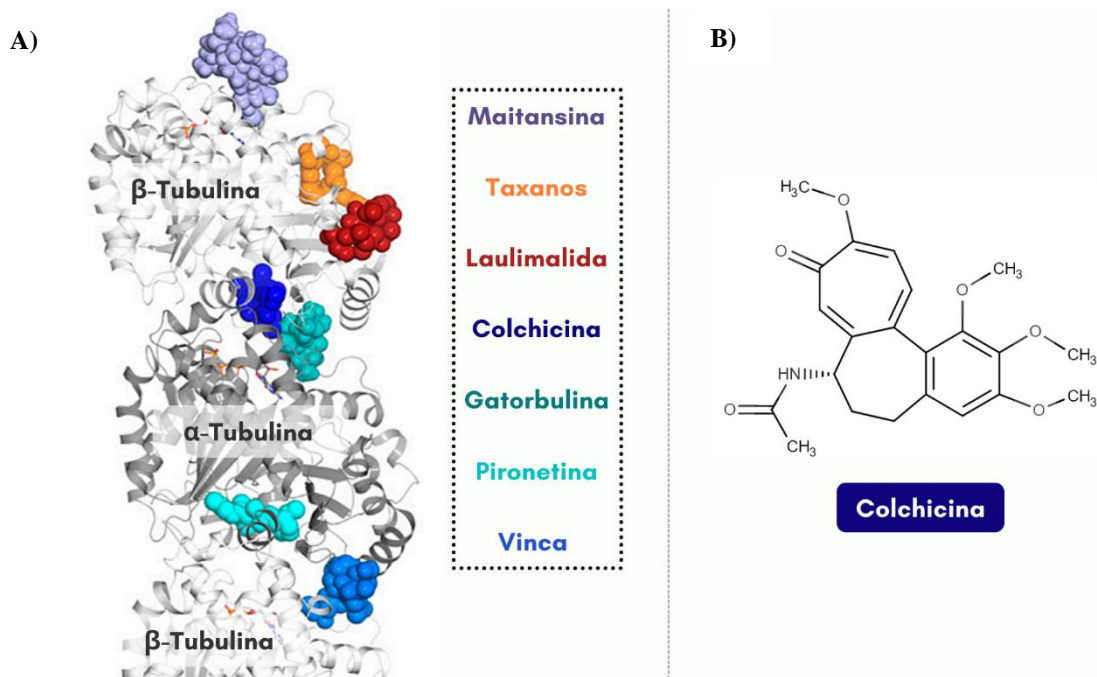
**Fonte:** Elaborado pelo autor com base em Matthew *et al.* (2021) e Shuai *et al.* (2021).

No caso do mHRPC, os tumores não respondem ao tratamento convencional de supressão hormonal, mantendo a proliferação celular. Assim, a terapia citotóxica com alvos compartilhados entre células saudáveis e tumorais destaca-se como uma alternativa, ainda que a seletividade represente uma adversidade fundamental a ser considerada. Embora poucos fármacos moduladores de tubulina tenham sido aprovados para o mHRPC, estes continuam sendo considerados como terapias de primeira escolha na prática clínica (OLZIERSKY; LABIDI-GALY, 2017). Desse modo, a busca por moléculas aptas a modularem a tubulina com eficiência e seletividade superiores às demais disponíveis clinicamente desponta como uma estratégia terapêutica excepcionalmente promissora (SHELLEY *et al.*, 2006; CHANG; KIBEL, 2009).

## 1.6 Planejamento de Novos Fármacos

Ainda que estejam listados como medicamentos essenciais ao tratamento, a baixa seletividade dos moduladores de tubulina configura a principal causa de efeitos adversos relacionados à quimioterapia (LANORE; DELPRAT, 2004). Ademais, os fármacos no mercado contam com o desenvolvimento de resistência, em decorrência da superexpressão de distintas isoformas das  $\alpha$  e  $\beta$  tubulinas e de bombas de efluxo das membranas celulares (DUMONTET; JORDAN, 2010; GALMARINI *et al.*, 2018; NING *et al.*, 2018; HEMMAT; CASTLE; ODDE,

2018). Até o momento, os medicamentos moduladores de tubulina aprovados para tratamento anticâncer interagem nos sítios dos taxanos e da vinca – descritos anteriormente no **Quadro 2** e representados na **Figura 4A** (SHUAI *et al.*, 2021). Entretanto, a classe de ligantes do sítio da colchicina tem sido alvo de acentuado estudo nos últimos anos, pois exibe vantagens em relação aos demais, como menor propensão aos mecanismos de resistência, além de baixa complexidade estrutural e menor peso molecular de seus moduladores, contribuindo com a otimização de parâmetros farmacocinéticos (LI *et al.*, 2018; FEDERICO *et al.*, 2020). A estrutura da colchicina, potente agente desestabilizador de MTs, encontra-se disposta na **Figura 4B**. Dessa forma, o planejamento de inibidores para este sítio configura uma abordagem interessante no tratamento do mHRPC dada sua não-responsividade à intervenção tradicional baseada em hormonioterapia (STENGEL *et al.*, 2009).



**Figura 4** – A) Heterodímero  $\alpha$  e  $\beta$  de tubulina com seus sete sítios de ligação: maitansina; taxanos; laulimalida; colchicina; gatorbulina; pironetina e vinca. B) Estrutura da colchicina: agente desestabilizador de MTs.  
**Fonte:** Adaptada de Matthew *et al.* (2021).

O planejamento de insumos farmacêuticos ativos baseia-se em um vasto estudo da fisiopatologia e das vias metabólicas das doenças, bem como na seleção e validação de alvos terapêuticos. Com base nestes conhecimentos, a biotecnologia e a física biomolecular visam a integração de metodologias experimentais com eventos bioquímicos e celulares patológicos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). Tais informações e estratégias associadas, juntamente aos avanços notáveis das ciências ômicas, geram informações relevantes à identificação funcional e/ou estrutural de moléculas candidatas à novos medicamentos. Essa estratégia integrada favorece reduções de tempo e custos das fases de desenvolvimento às quais

se destinam, e direciona a seleção dos melhores compostos a serem avaliados (ANDRICOPULO; MONTANARI, 2005; GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

### **1.7 Química Medicinal**

Nos últimos anos, a Química Medicinal tornou-se um dos campos mais empenhados na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. O planejamento e a síntese de novas moléculas capazes de interagir com alvos moleculares pré-definidos ocupam a centralidade na pesquisa de potenciais tratamentos. Embora existam avanços promissores, os ligantes bioativos precisam ser constantemente otimizados de acordo com parâmetros toxicológicos, farmacocinéticos e de seletividade, impactando consideravelmente patologias humanas de maior complexidade, como o câncer (PLOWRIGHT *et al.*, 2017).

Ainda que muitos fármacos com atividade anticâncer tenham sido desenvolvidos, muitos ainda se encontram em fases clínicas e exibem as limitações descritas anteriormente, como resistência e efeitos adversos severos (LIANG *et al.*, 2021). Neste contexto, a técnica de hibridização molecular surgiu como uma estratégia notável em pesquisas recentes para descoberta de novos fármacos. Trata-se da união covalente de grupos farmacofóricos de ação independente para obtenção de moléculas com afinidade e atividade aprimoradas. Agentes híbridos anticâncer contam com grande interesse terapêutico, uma vez que podem potencialmente superar a maioria das desvantagens farmacocinéticas de outras convencionais e contornar restrições de cada classe química original (KERRU *et al.*, 2017).

As principais vantagens de sintetizar estas estruturas consistem no aprimoramento da especificidade, atenuação da quimiorresistência e dos efeitos adversos, atingindo diretamente e eficientemente células tumorais. Desse modo, a integração bem-sucedida de princípios biológicos, farmacêuticos e médicos da Química Medicinal pode contribuir significativamente com o avanço de estudos que relacionam estrutura e atividade a fim de aperfeiçoar o planejamento de novas moléculas (KERRU *et al.*, 2017).

### **1.8 Híbridos de Quinazolina-Chalcona**

A presença de dois ou mais farmacóforos biologicamente ativos em uma única molécula pode favorecer a sinergia da atividade biológica, ampliando sua capacidade de interagir com alvos moleculares e sua ação farmacológica. A quinazolina consiste em um heterociclo de nitrogênio de grande importância medicinal por exibir propriedades diversificadas, como efeitos antimicrobiano, antiviral, antimalárico, anticonvulsivante, anti-inflamatório, antioxidante, anti-hipertensivo e principalmente anticâncer (AUTI; GEORGE; PAUL, 2020).

Fármacos com potência elevada e resistência restringida podem ser obtidos por meio de análogos híbridos constituídos de quinazolina e outros grupos farmacofóricos ativados, apresentando relevância para terapias antitumorais. Apesar de demonstrarem aprimoramentos de eficácia ao serem comparados com o núcleo estrutural original, nenhum análogo híbrido desta natureza química atingiu fases de testes clínicos para o CaP, reforçando a importância de se buscar novas combinações de ligantes (SHAGUFTA; AHMAD, 2017; AUTI; GEORGE; PAUL, 2020).

Nos últimos 20 anos, alguns derivados de quinazolina foram aprovados como fármacos anticâncer pelo FDA, destacando-se os seguintes: **(I)** afatinibe (Gilotrif<sup>®</sup>); **(II)** erlotinibe (Tarceva<sup>®</sup>); **(III)** gefitinibe (Iressa<sup>®</sup>); **(IV)** lapatinibe (Tykerb<sup>®</sup>); **(V)** vandetanibe (Caprelsa<sup>®</sup>) (MASS; DUARTE; RUSSOWSKY, 2021). O número de híbridos de quinazolina descritos ainda é pequeno e suas propriedades farmacocinéticas, bem como seletividade frente aos seus alvos, carecem de caracterização. Além disso, maiores refinamentos de sua diversidade estrutural são necessários para que potenciais agentes farmacológicos possam ser devidamente selecionados. Desse modo, estudos contínuos proporcionarão conhecimentos adicionais e essenciais para o desenvolvimento de insumos ativos com estruturas híbridas de quinazolina com índices de seletividade superiores, resistência farmacológica superada e mecanismos de ação diversos (AUTI; GEORGE; PAUL, 2020).

Análogos da colchicina, como tratado previamente, revelam atuação promissora como potenciais agentes anticâncer capazes de interagir com a proteína-alvo tubulina, inibindo sua polimerização em MTs. Entretanto, o uso clínico destes compostos para o tratamento antitumoral se mostra comprometido devido aos seus expressivos níveis de toxicidade (NAAZ *et al.*, 2019). Diversas pequenas moléculas derivadas de quinazolina foram descobertas com a capacidade de atuar no sítio da colchicina, promovendo a inibição de distintas linhagens tumorais (LI *et al.*, 2019). A descoberta de novos inibidores seletivos da polimerização da tubulina foi impulsionada pela triagem de moléculas com núcleo quinazolínico. Estudos mecanísticos sugeriram que tais derivados podem exibir capacidade de manter a maioria das células cancerígenas na fase G2/M do ciclo celular, paralisando os MTs por meio da competição em sítios de ligação da tubulina. Dessa forma, o desenvolvimento de híbridos sintéticos de quinazolina pode auxiliar na investigação de novas séries químicas com propriedades anticâncer (SHAGUFTA; AHMAD, 2017).

Nesse contexto, outra classe de interesse farmacoterapêutico é aquela composta pelas chalconas, uma vez que, assim como as quinazolininas, também possuem a capacidade de se ligar

à proteína tubulina e impedir sua polimerização. Ao interromper abruptamente a montagem do fuso mitótico, verifica-se um comprometimento funcional do citoesqueleto, promovendo o bloqueio da mitose (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015). Por essa razão, derivados sintéticos de chalconas podem apresentar propriedade antiproliferativa contra linhagens tumorais pela inibição da polimerização da tubulina, mantendo as células em fase G2/M do ciclo celular, incluindo aquelas resistentes à múltiplos fármacos. Ademais, moléculas desta classe já demonstraram potencial de inibição da migração celular de tumores metastáticos (LIU *et al.*, 2022). Análises de docagem molecular constataram derivados com capacidade de interagir no sítio de ligação da colchicina na tubulina, manifestando atividade citotóxica potente (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015).

Ao realizar uma busca de publicações que relacionam as classes quinazolina e chalcona ao tratamento do CaP na base de dados PubMed® (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) até julho de 2022, foram encontrados os resultados apresentados no **Apêndice A**. Os achados revelam um crescente interesse no estudo de híbridos como antitumorais, bem como de tais classes químicas independentes para este fim. Entretanto, foi verificada a ausência de publicações com o modelo híbrido de quinazolina-chalcona, refletindo o ineditismo de tais combinações estruturais na produção de conhecimento científico.

Diante do que fora destacado, é plausível identificar diversos benefícios em se avaliar possíveis propriedades antitumorais de híbridos de quinazolina-chalcona. A combinação destas classes pode promover a otimização da modulação de processos de divisão e migração de células tumorais pela inibição da polimerização da proteína tubulina, contendo a proliferação descontrolada e a ocorrência de metástase. Além disso, o estudo de tais atividades antiproliferativa e antimigratória de híbridos inéditos consiste em uma profunda contribuição para a Química Medicinal, podendo evidenciar, cientificamente, candidatos favoráveis ao tratamento do mHRPC.

### **1.9 Racional para Uso de Moduladores de Tubulina**

O presente trabalho de pesquisa é resultado de um abrangente estudo realizado por pesquisadores do Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo (LQMC-IFSC/USP) em colaboração com diversos parceiros científicos do Centro de Pesquisa e Inovação em Biodiversidade e Fármacos (CIBFar – CEPID/FAPESP). Inúmeros avanços foram alcançados por meio da bioprospecção de novas moléculas originárias da valiosa biodiversidade brasileira, incluindo a identificação de produtos naturais com extenso espectro de propriedades biológicas, bem como a seleção de ligantes

bioativos promissores para síntese orgânica e pesquisas voltadas para a relação entre estrutura e atividade. Tal perspectiva moderna de exploração racional da biodiversidade viabiliza com que estudos pré-clínicos de eficácia e toxicologia *in vitro* sejam executados para avaliação e otimização de parâmetros desejáveis a novos fármacos no país.

Nos últimos 15 anos, projetos inovadores de identificação, planejamento e caracterização de novas entidades químicas com propriedades antitumorais foram desenvolvidos por pesquisadores do LQMC a partir da integração de ensaios celulares e bioquímicos com metodologias de modelagem molecular na área da Química Medicinal. A proteína tubulina destaca-se como um dos principais objetos de estudo do grupo de pesquisa por se tratar de um alvo molecular validado para o desenvolvimento de tratamentos anticâncer, como apresentado anteriormente. Por essa razão, uma vasta triagem de compostos naturais e sintéticos de distintas classes químicas foi realizada durante anos visando a obtenção daqueles capazes de modular a polimerização dessa proteína ao interagirem com seus sítios de ligação. Os trabalhos concluídos, bem como em andamento, estão sumarizados com suas respectivas classes químicas investigadas nos **Quadros 3, 4 e 5**.

**Lívia de Barros Salum (2007)**

- Projeto: Estudos *in silico* no Planejamento de Candidatos a Novos Fármacos na Terapia do Câncer de Mama e de Reposição Hormonal (CNPq).
- Compostos Químicos:
  - Diidrobenzoxatiinas;
  - Flavonoides;
  - Diidrobenzoditiinas;
  - Fenilnaftalenos;
  - Fenilquinolinas.

**Luma Godoy Magalhães (2014)**

- Projeto: Identificação e Caracterização de Novos Agentes com Propriedades Anticâncer (CNPq).
- Compostos Químicos:
  - Acridinonas sintéticas baseadas na podofilotoxina.

**Quadro 3** – Dissertações de Mestrado desenvolvidas por pesquisadores do LQMC, expandindo o estudo de moduladores da tubulina para o tratamento antitumoral.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

**Lívia de Barros Salum (2011)**

- Projeto: Planejamento Racional de Novos Ligantes da Beta-Tubulina Candidatos a Fármacos com Propriedades Antitumorais (FAPESP - Processo 2007/07294-9).
- Compostos Químicos:
  - Análogos sintéticos do discodermolídeo;
  - Intermediários sintéticos da dictiostatina;
  - Diterpenos clerodanos (destaque para caseobliquinas);
  - Derivados sintéticos de indóis (fenilindóis, aroilindóis, ariltiondóis e seus análogos);
  - Benzotiofenos e benzofuranos;
  - Chalconas sintéticas;
  - Derivados de *N*-acil-hidrazonas e tiosemicarbazonas.



<p><b>Wanessa Fernanda Altei (2013)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Projeto: Triagem Biológica, Identificação e Planejamento de Novos Candidatos a Agentes Anticâncer a Partir de Produtos Naturais e Compostos Sintéticos (FAPESP - Processo 2009/15320-5).</li> <li>• Compostos Químicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ácidos gálico e protocatecuico, e seus derivados ésteres;</li> <li>○ Derivados guanidínicos (alcaloides) sintéticos;</li> <li>○ Derivados indólicos e de espirocicloexadienonas;</li> <li>○ Chalconas e hidrazidas;</li> <li>○ Enidrina (lactona sesquiterpênica) e piplartina.</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Ricardo Nascimento dos Santos (2015)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Projetos: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Estudos Estruturais da Polimerização de Microtúbulos e sua Modulação pela Ação de Fármacos Anticâncer (FAPESP – Processo 2013/11950-0).</li> <li>○ Planejamento Baseado na Estrutura do Receptor e do Ligante de Novos Agentes Quimioterápicos para o Tratamento do Câncer (FAPESP - Processo 2010/06741-4).</li> </ul> </li> <li>• Compostos Químicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Derivados indólicos (destaque para ciclopenta-<math>\beta</math>-indóis);</li> <li>○ <math>\beta</math>-Cetoesteres;</li> <li>○ Espirocicloexadienonas;</li> <li>○ Pirrolizidinonas e pirrolizidinas substituídas;</li> <li>○ 1,8-Naftiridinas substituídas;</li> <li>○ Adutos de Morita-Baylis-Hillman;</li> <li>○ Aciloínas;</li> <li>○ Ftalídeos;</li> <li>○ 1,2-aminoalcoóis.</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>Luma Godoy Magalhães (2019)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Projeto: Planejamento e Caracterização de Moduladores da Proteína Tubulina Candidatos a Fármacos para o Tratamento do Câncer (CAPES).</li> <li>• Compostos Químicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Acridinonas sintéticas baseadas na podofilotoxina.</li> </ul> </li> </ul>
<p><b>David Leandro Palomino Salcedo (2021)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Projeto: Estudos de Modelagem Molecular de Moduladores de Microtúbulos Bioativos (CAPES).</li> </ul>

**Quadro 4** – Teses de Doutorado desenvolvidas por pesquisadores do LQMC, visando a investigação de moduladores da tubulina para o tratamento anticâncer.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

<p><b>Matheus da Silva Souza (em andamento)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Projeto: Descoberta de Novos Ligantes Bioativos com Propriedades Anticâncer (FAPESP - Processo 2018/25289-7).</li> <li>• Compostos Químicos: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Ciclopenta[<i>b</i>]indóis;</li> <li>○ Indolizinas;</li> <li>○ Oxadiazolas;</li> <li>○ Lactonas.</li> </ul> </li> </ul>
--

**Quadro 5** – Tese de Doutorado em andamento no LQMC, tendo em vista a avaliação de moduladores da tubulina como alternativas terapêuticas ao câncer.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados obtidos das triagens finalizadas, a proposição de derivados quinazolínicos como moduladores da tubulina consiste em uma abordagem inédita, visto ser uma classe ainda não explorada pelo grupo de pesquisa e pouco caracterizada em termos de suas propriedades antitumorais, sobretudo frente ao mHRPC. Ademais, a exploração de

moléculas híbridas também se revela original e favorável para o desenvolvimento de ligantes com capacidade de associar benefícios terapêuticos de classes químicas diferentes.

Nesse contexto, em consonância com evidências da literatura científica, verifica-se que a combinação dos núcleos de quinazolina e chalcona em uma única estrutura química exerce papel notável na validação de novos fármacos. Os compostos planejados apresentam expressiva variabilidade estrutural, contribuindo com a geração de diversos compostos com funções biológicas. Muitos híbridos de quinazolina-chalcona despontaram como moléculas fortemente ativas *in vitro* frente várias linhagens cancerígenas. Portanto, a utilização destes é potencialmente capaz de reduzir interações medicamentosas, atingindo estados de multifuncionalidade e efeitos sinérgicos (MASS; DUARTE; RUSSOWSKY, 2021).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Geral

- Realização de triagens para identificação e caracterização de moléculas híbridas bioativas candidatas a novas terapias para o tratamento do mHRPC.

### 2.2 Específicos

- Avaliação de híbridos das classes quinazolina-chalcona por meio de ensaios celulares de citotoxicidade utilizando uma linhagem tumoral de mHRPC (DU-145);
- Determinação da seletividade dos compostos-teste frente DU-145 a partir de ensaios de citotoxicidade em linhagens de fibroblastos humanos e murinos não-tumorais (HFF-1 e FC3H, respectivamente) e em células epiteliais não-tumorais derivadas da próstata humana (RWPE-1);
- Investigação da atividade antimigratória das moléculas em DU-145 com base em ensaios qualitativos e semiquantitativos *wound healing*;
- Determinação de parâmetros quantitativos de inibição da migração e invasão celular por meio de ensaios do tipo *transwell* baseados em câmara de Boyden;
- Verificação da atividade dos melhores candidatos selecionados frente à proteína-alvo tubulina, empreendendo experimentos bioquímicos *in vitro* relacionados com o processo de polimerização e ensaios de competitividade pelo sítio da colchicina;
- Avaliação da interferência dos híbridos na morfologia dos núcleos de células tumorais a partir da marcação fluorescente do material genético.

### 3. METODOLOGIA

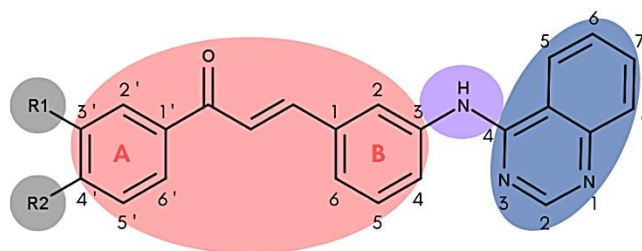
#### 3.1 Linhagens Celulares

Para realização dos ensaios fenotípicos *in vitro*, foram empregadas quatro linhagens: **(I)** DU-145, células tumorais epiteliais de próstata humana; **(II)** HFF-1, fibroblastos não-tumorais de pele humana; **(III)** FC3H, fibroblastos não-tumorais de fígado de camundongo; **(IV)** RWPE-1, células não-tumorais epiteliais de próstata humana. As linhagens **(I)** e **(III)** foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (*RoswellPark Memorial Institute* – Cultilab<sup>®</sup>). A linhagem **(II)** foi mantida em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* – Cultilab<sup>®</sup>). Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino (SFB, *Gibco*<sup>™</sup>). A linhagem **(IV)** permaneceu em meio de queratinócito na ausência de soro (*Keratinocyte Serum-Free Medium*, K-SFM, *Gibco*<sup>™</sup>) inteirado com fator de crescimento epidérmico recombinante humano (5 ng/mL) e extrato de pituitária humana (0,05 mg/mL). Para todos os cultivos, incorporou-se estreptomicina (100 µg/mL), L-glutamina (2 mM) e penicilina (200 U/mL) (*Sigma-Aldrich*<sup>®</sup>). As células em cultura foram mantidas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>.

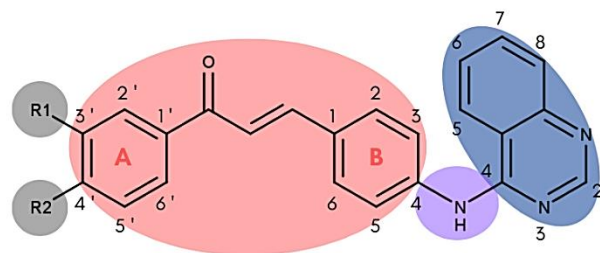
#### 3.2 Série de Compostos

Os dez compostos analisados são representados por híbridos das classes quinazolina (SELVAM; KUMAR, 2011) e chalcona (SZLISZKA *et al.*, 2010). Uma amina é responsável por unir os núcleos principais de ambas as classes, ligando-se ao carbono 4 da quinazolina e ao carbono 3 **(I)** ou 4 **(II)** do anel B da chalcona. As moléculas AQC-01, AQC-03, AQC-05, AQC-07 e AQC-09 seguem o perfil estrutural **I**, adotando um padrão *meta* do anel B (posição 1,3). Por sua vez, os híbridos AQC-02, AQC-04, AQC-06, AQC-08 e AQC-10 assumem o perfil **II**, aderindo ao padrão *para* do anel B (posição 1,4). As duplas AQC-01/02, AQC-03/04, AQC-05/06, AQC-07/AQC-08 e AQC-09/10 possuem os mesmos substituintes **R**<sub>1</sub> e **R**<sub>2</sub> ligados, respectivamente, nas posições 3' e 4' do anel A da chalcona. Entretanto, diferem entre si quanto à caracterização das posições das ligações do anel B, conforme explicação prévia. A estrutura molecular dos compostos triados nos ensaios encontra-se descrita na **Figura 5** em consonância com o **Quadro 6**.

## I) Perfil estrutural 1

Anel B: Padrão *meta* (posição 1,3)

## II) Perfil estrutural 2

Anel B: Padrão *para* (posição 1,4)

**Figura 5** – Perfis dos híbridos avaliados com os núcleos estruturais das classes químicas chalcona (vermelho) e quinazolina (azul) ligados por uma amina (roxo), seguindo os padrões **I** *meta* (1,3) e **II** *para* (1,4) do anel B.

**Fonte:** Elaborada pelo autor com base em Kraege *et al.* (2016) e Mass, Duarte e Russowsky (2021).

As amostras foram sintetizadas pelo Laboratório de Sínteses Orgânicas (LSO) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), sob supervisão do Prof. Dr. Dennis Russowsky, um parceiro científico do grupo de pesquisa. As soluções-estoque dos compostos foram preparadas na concentração de 20 mM em 100% de DMSO. As amostras utilizadas foram elaboradas a partir das soluções-estoque em meio de cultura, a fim de se atingir a concentração desejada para os ensaios e uma concentração final máxima de 1% de DMSO para que não houvesse interferência nos resultados.

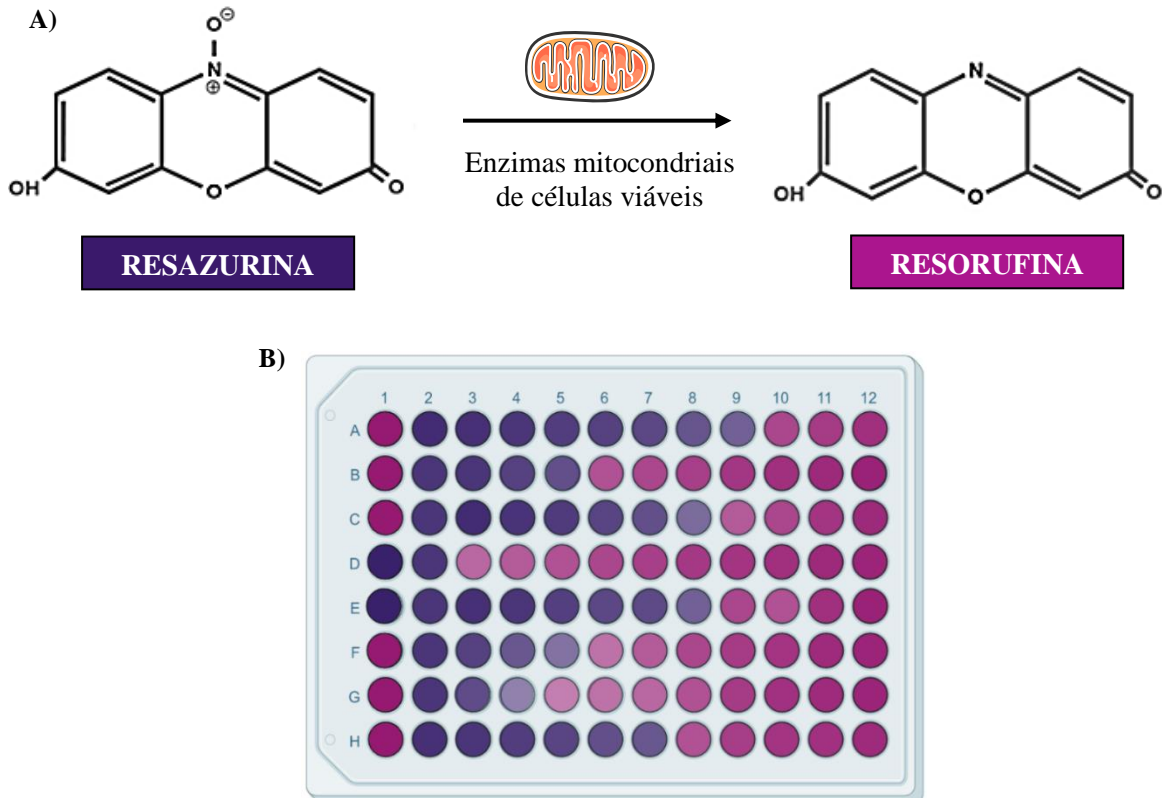
COMPOSTOS	SUBSTITUÍNTES	PERFIL ESTRUTURAL
AQC-01	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = H	I
AQC-02	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = H	II
AQC-03	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>	I
AQC-04	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>	II
AQC-05	R <sub>1</sub> = O-CH <sub>2</sub> -C≡CH, R <sub>2</sub> = H	I
AQC-06	R <sub>1</sub> = O-CH <sub>2</sub> -C≡CH, R <sub>2</sub> = H	II
AQC-07	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = O-CH <sub>2</sub> -C≡CH	I
AQC-08	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = O-CH <sub>2</sub> -C≡CH	II
AQC-09	R <sub>1</sub> = O-CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = O-CH <sub>2</sub> -C≡CH	I
AQC-10	R <sub>1</sub> = O-CH <sub>3</sub> , R <sub>2</sub> = O-CH <sub>2</sub> -C≡CH	II

**Quadro 6** – Substituintes R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> ligados ao anel A da porção chalcona dos híbridos, bem como a denotação do perfil estrutural dos mesmos de acordo com os padrões de ligação do anel B.

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 3.3 Ensaio de Viabilidade Celular

A análise da citotoxicidade das moléculas planejadas frente às linhagens celulares baseou-se em um teste colorimétrico sensível que permite avaliar a viabilidade celular por meio da reação de redução do composto resazurina – indicador de coloração azul (*blue dye fluorescent*) – em resorufina – produto de coloração rosa (*pink colored and highly fluorescent*) – por desidrogenases mitocondriais competentes em células viáveis (**Figura 6A**).



**Figura 6** – A) Redução do corante resazurina em resorufina. B) Resultado do ensaio de viabilidade celular após incubação da placa de 96 poços com resazurina: quanto mais intensa a coloração rosa de um poço, maior o número de células viáveis e, quanto mais azul, menor esse número.

**Fonte:** Elaborada pelo autor. Criada com BioRender.

Neste ensaio, foram adicionadas  $4 \times 10^3$  células por poço em placas de 96 poços das linhagens DU-145, HFF-1, FC3H e RWPE-1, respectivamente. Cada poço comportava 100  $\mu\text{L}$  de seus respectivos meios de cultura. Posteriormente, as placas foram incubadas durante 24 h em estufa a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$ . Transcorrido este período, com o auxílio de uma pipeta multicanal, adicionou-se 11 concentrações (100–0,097  $\mu\text{M}$ ) dos compostos selecionados e do controle colchicina (2–0,0019  $\mu\text{M}$ ) em diluição seriada. Em seguida, após outro período de incubação (72 h), adicionou-se 20  $\mu\text{L}$  de resazurina por poço e foi realizada a análise das placas em fluorímetro SpectraMax Gemini EM (*Molecular Devices*, Estados Unidos) após cerca de 4 h de incubação. O monitoramento da conversão se deu pela leitura da fluorescência em 588 nm (**Figura 6B**).

O parâmetro  $IC_{50}$  é utilizado para indicar a concentração dos compostos-teste necessária para diminuir uma resposta biológica ou bioquímica em 50%, fornecendo uma medida de potência (quantitativa e comparativa) para os híbridos. Neste caso, refere-se à concentração capaz de inibir em 50% a viabilidade celular de DU-145. Por sua vez, o parâmetro  $CC_{50}$  corresponde à concentração apta a reduzir a viabilidade em 50% das três linhagens não-tumorais. Os valores de  $IC_{50}$  e  $CC_{50}$  foram determinados pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste, dispondo dos valores das porcentagens de inibição com o *software* GraphPad Prism 8.2.1 (*GraphPad Software Inc.*, Estados Unidos).

### 3.4 Migração e Invasão Celular

#### 3.4.1 Ensaio *Wound Healing*

Após uma primeira seleção de compostos com atividade citotóxica e seletiva, a capacidade de inibição da migração celular destes foi investigada por meio do ensaio qualitativo e semiquantitativo *wound healing* com a linhagem DU-145 (YUE *et al.*, 2010). Este baseou-se na introdução de uma fenda na monocamada celular a qual se fecha em razão da migração das células após determinado período de incubação. Para isso, as células foram plaqueadas a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços (BD Falcon<sup>TM</sup>, Trasadingen, Suíça) e mantidas sob cultivo durante 48 h (*overnight* sem SFB em etapas preliminares). Uma vez alcançada a confluência da cultura, lesionou-se a camada de células com o auxílio de uma ponteira p100 estéril. Os poços foram suavemente lavados com PBS 1x para remoção dos resíduos celulares. Os híbridos testados foram diluídos em 1 mL de meio suplementado para alcançarem a concentração de 10  $\mu$ M.

As soluções foram adicionadas nos poços da placa de cultura em duplicata, empregando-se conjuntamente um controle positivo (colchicina a 10  $\mu$ M) e dois controles negativos (sem DMSO e com DMSO 1%). Em seguida, as placas foram incubadas durante 24 h em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>. Para registro das fendas, utilizou-se um microscópio óptico invertido na objetiva de 4x (*Optiphas*). O campo de visão fotografado foi padronizado de modo que se mantivesse o mesmo nos dois tempos avaliados. Para tal, uma placa autoclavável foi acoplada abaixo da placa de 24 poços. A incidência constante da luz do microscópio no mesmo ponto foi garantida pelo alinhamento entre este acessório com orifícios e a região central do poço. As imagens foram coletadas no início ( $t_1 = 0$  h) e ao final do ensaio ( $t_2 = 24$  h) com subsequente determinação da área das fendas em ambos os tempos com a assistência do *software* ImageJ. Estes valores foram utilizados no cálculo da porcentagem de inibição da migração celular de acordo com a **Equação 1**.

$$\text{Porcentagem de Inibição (\%)} = 100 - \left[ \left( \frac{\text{Área}_{0h} - \text{Área}_{24h}}{\text{Área}_{0h}} \right) \times 100 \right] \quad (1)$$

Dois experimentos independentes foram realizados em duplicata. Em um primeiro momento, o ensaio foi conduzido qualitativamente em concentração única. Somente as amostras com inibição do fechamento da fenda superior à 50% foram selecionadas para ensaios quantitativos *transwell* fundamentados em câmara de Boyden para determinação do IC<sub>50</sub> – concentração necessária para inibir em 50% o processo de migração celular. Entretanto, visando a caracterização da faixa de concentração empregada na câmara, o perfil concentração x efeito das moléculas foi preliminarmente analisado sob a regeneração da fenda por meio de um ensaio semiquantitativo *wound healing* nas concentrações 1 e 5 µM.

#### 3.4.2 Ensaio *Transwell* Baseados em Câmara de Boyden

A quantificação das propriedades antimigratórias dos compostos selecionados no ensaio *wound healing* e dos efeitos na invasão celular foi realizada de acordo com os princípios da câmara de Boyden (ALBINI *et al.*, 1987) utilizando os kits QCM™ 8 µm 96-well *Chemotaxis Cell Migration Assay* e QCM™ 8 µm 96-well *Collagen Cell Invasion Assay* – ECM510 e ECM556, respectivamente – (Merck Millipore®, Alemanha). Durante os 10 minutos iniciais, as placas de 96 poços foram mantidas à temperatura ambiente. Em seguida, preparou-se suspensões de 1 x 10<sup>5</sup> células por poço em 100 µL de meio sem SFB e sem fenol, e com os híbridos ativos. Antes de iniciar o ensaio, células da linhagem DU-145 foram cultivadas sem SFB durante um período intitulado *overnight starvation*.

Sob condições estéreis, as placas-suporte foram separadas em relação às câmaras e tampas contendo as membranas. Adicionou-se 150 µL de meio sem fenol e suplementado com 10% de SFB nas placas inferiores (*feeder tray*). Posteriormente, as câmaras foram novamente acopladas, garantindo que bolhas não fossem compreendidas sob as membranas. Foram transferidos 100 µL da suspensão de células nas porções superiores das câmaras na presença ou ausência de revestimento de colágeno. Por fim, a placa foi fechada e colocada em estufa a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por um período de 24 h. Pouco antes do término da incubação, adicionou-se 150 µL de solução de descolamento celular (*cell detachment solution*) aquecida primeiramente a 37 °C nos poços da bandeja de colheita de células (*cell harvesting tray*). Concluída esta etapa, removeu-se cuidadosamente a placa de 96 poços com a câmara de migração ou invasão da estufa, separando-a do meio suplementado com SFB no interior do fluxo.



As células presentes na porção superior da membrana foram removidas por aspiração do meio de cultura e a placa foi acoplada a fim de mantê-la em contato com a solução de descolamento previamente pipetada, incubando-a durante 30 minutos em condições análogas às anteriores. Transcorrida a incubação, inclinou-se cuidadosamente a câmara repetidas vezes no líquido para desalojar as células. Em seguida, foi realizada uma diluição do corante (1:75) no tampão para que uma solução *4x Lysis Buffer / CyQuant® GR dye* fosse preparada. Uma vez finalizada, acrescentou-se 50 µL de tal mistura em cada poço já comportando 150 µL da solução de descolamento celular, incubando o sistema à temperatura ambiente por 20 minutos. Dessa forma, foi feita a leitura da fluorescência a 520 nm após a transferência de 150 µL da mistura resultante para uma placa preta de 96 poços.

### 3.5 Ensaios Bioquímicos de Modulação da Tubulina

#### 3.5.1 Ensaio de Polimerização

Os híbridos com pronunciada potência contra DU-145, elevada seletividade frente as linhagens não-tumorais de fibroblastos e de células epiteliais da próstata humana e que se mostraram capazes de inibir a migração celular nos ensaios *wound healing* e *transwell* baseado em câmara de Boyden prosseguiram para ensaios de fluorescência para investigação da modulação da proteína tubulina *in vitro*. Para as análises bioquímicas de tais compostos, utilizou-se *kits* de polimerização da proteína-alvo (*Cytoskeleton Inc.*, Estados Unidos). Em um primeiro momento, os compostos foram avaliados em concentração única (100 µM). Em seguida, para determinação do IC<sub>50</sub> – concentração capaz de inibir a polimerização da tubulina pela metade –, 7 concentrações foram utilizadas. Empregou-se colchicina, paclitaxel, podofilotoxina e vimblastina como controles do ensaio.

Os seguintes elementos integravam o *kit* manipulado nos ensaios de modulação: 10 mg de tubulina liofilizada purificada – pureza superior à 99% – de tecido cerebral suíno, GTP (trifosfato de guanosina), DMSO, paclitaxel, além de tampões específicos de reconstituição (solução tamponante 1) e polimerização (glicerol). O tampão glicerol é composto por: 0,5 mM de ácido etilenoglicol tetra-acético (EGTA); 2 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>); 80 mM de piperazina-1,4-bis (ácido 2-etanosulfônico) (PIPES) e 60% de glicerol v/v; em pH 6,9. A composição do tampão 1 [*general tubulin (PEM) buffer*] é dada pelos seguintes constituintes: 0,5 mM de EGTA; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 80 mM de PIPES e 10 µM do marcador fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol); em pH 6,9.

Cada poço de microplacas pretas de meia área com 96 poços, integradas ao *kit*, foi preenchido com 5  $\mu\text{L}$  do composto-teste solubilizado em 10% de DMSO e 45  $\mu\text{L}$  de mistura reacional (2 mg/mL de tubulina; 1 mM de GTP; 2 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 80 mM de PIPES; 0,5 mM de EGTA; 10  $\mu\text{M}$  de DAPI e 15% de glicerol; em pH 6,9) – adicionada às placas com uma pipeta multicanal. Para que a solubilização dos compostos no meio reacional não influenciasse a cinética de reação, a concentração final de DMSO foi mantida em 1%. Com o auxílio do fluorímetro SpectraMax Gemini EM (*Molecular Devices*, Estados Unidos), as placas foram analisadas à temperatura de 37 °C e nos comprimentos de onda de excitação (340 nm) e emissão (460 nm). Este ensaio se baseou na ocorrência de 70 ciclos de leitura com intervalos de 45 segundos entre duas leituras de um mesmo poço. Os procedimentos acima foram executados em ensaios independentes em duplicata.

### 3.5.2 Ensaio de Competitividade pelo Sítio da Colchicina

Com o intuito de verificar a hipótese de modulação do sítio da colchicina pelos compostos selecionados, ensaios de competitividade para este sítio foram realizados (ZHENG *et al.*, 2016; BAI *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2021; SUN *et al.*, 2022). Para isso, foi feita uma mistura tubulina:colchicina a 4  $\mu\text{M}$  em PEM *buffer* utilizando a proteína presente no *kit* do ensaio de polimerização (**Seção 3.5.1**). Em seguida, quatro concentrações (25, 5, 1 e 0,2  $\mu\text{M}$ ) dos híbridos ou dos controles positivo (podofilotoxina) e negativo (paclitaxel ou vimblastina) foram adicionadas em placas pretas de 96 poços as quais foram incubadas a 37 °C durante 1 h.

Os registros de leitura de fluorescência foram empreendidos em  $\lambda_{\text{emissão}} = 435 \text{ nm}$  com o auxílio do fluorímetro SpectraMax Gemini EM (*Molecular Devices*, Estados Unidos). Posteriormente, normalizou-se os valores obtidos em relação ao tampão e à fluorescência da própria amostra. Desse modo, foi possível calcular a razão  $F/F_0$  em que F corresponde à fluorescência do complexo colchicina-tubulina para determinada concentração de composto em competição pelo sítio; enquanto  $F_0$  refere-se à fluorescência intrínseca do complexo.

### 3.6 Marcação de DNA Nuclear com Hoechst 33342

Com o intuito de verificar alterações no material genético de células de CaP causadas pela ação dos compostos-teste, realizou-se um ensaio de coloração fluorescente de DNA com o corante azul núcleo-específico Hoechst 33342 (*Invitrogen, Thermo Fisher Cientific Inc.*, Estados Unidos). Para isso,  $1 \times 10^5$  células da linhagem DU-145 foram cultivadas em placas de Petri (*SPL Life Sciences Inc.*, Coreia do Sul) durante 24 h em estufa a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ . Uma vez aderidas, as células foram lavadas com PBS 1x e incubadas com os compostos-teste a 10  $\mu\text{M}$ , controle positivo (colchicina a 10  $\mu\text{M}$ ) e dois controles negativos (sem DMSO e com

DMSO 1%) por 48 h nas mesmas condições anteriores. Finalizado o período de incubação, as células foram novamente lavadas com PBS 1x e fixadas com uma solução de *p*-formaldeído a 4% em PBS 1x e 0,05% de Triton X-100 durante 10 minutos. Em seguida, após outra etapa de lavagem, as células foram tratadas e incubadas com uma solução do marcador Hoechst 33342 (5 µg/mL) em PBS 1x por 30 minutos no escuro.

Ao término do tempo destinado à marcação com Hoechst, as células foram lavadas com PBS 1x para retirar o excesso do corante e as placas levadas ao microscópio. As imagens foram capturadas por microscopia confocal de fluorescência com o auxílio de um microscópio invertido Axio Vert.A1 (*ZEISS*, Estados Unidos) na objetiva 20x. O filtro DAPI foi escolhido em função das semelhanças existentes entre ambos os marcadores em relação aos seus comprimentos de excitação e emissão. Por essa razão, o corante foi excitado em comprimento de 358 nm e a emissão da fluorescência coletada em 461 nm. O software ZEN 2.3 (*ZEISS*, Estados Unidos) foi empregado para registro e manuseio das imagens, possibilitando a avaliação qualitativa da morfologia dos núcleos devidamente corados.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Citotoxicidade e Seletividade

Para avaliar a citotoxicidade dos dez compostos-teste frente DU-145, os valores de  $IC_{50}$  dos mesmos foram obtidos em ensaios de viabilidade celular (**Tabela 1**). As moléculas consideradas ativas e com potência citotóxica em células tumorais foram aquelas que apresentaram  $IC_{50} \leq 20 \mu M$ . Colchicina foi utilizada como controle. Os dados supracitados encontram-se representados graficamente no **Apêndice B**.

As amostras AQC-01 a AQC-09 atenderam ao critério de seleção e prosseguiram para ensaios de viabilidade celular em linhagens não-tumorais HFF-1, FC3H e RWPE-1 de verificação da seletividade citotóxica *in vitro*. Para tal, os valores de  $CC_{50}$  foram determinados (sumarizados na **Tabela 1**) e seus índices de seletividade (SI, *selectivity index*) calculados. Híbridos com  $SI \geq 5$  para as três linhagens não-tumorais foram selecionados para as etapas subsequentes da triagem.

COMPOSTOS	$IC_{50} \pm SD^*$ ( $\mu M$ )			
	DU-145	HFF-1	FC3H	RWPE-1
AQC-01	7,91 $\pm$ 0,64	9,60 $\pm$ 1,75	> 100	ND
AQC-02	5,27 $\pm$ 1,05	47,55 $\pm$ 4,48	> 100	23,78 $\pm$ 1,14
AQC-03	7,43 $\pm$ 0,12	9,28 $\pm$ 0,17	27,61 $\pm$ 1,90	ND
AQC-04	6,65 $\pm$ 0,36	> 100	> 100	46,56 $\pm$ 2,93
AQC-05	2,89 $\pm$ 0,15	3,71 $\pm$ 0,36	12,11 $\pm$ 1,09	ND
AQC-06	4,05 $\pm$ 0,23	8,72 $\pm$ 0,69	> 100	ND
AQC-07	6,65 $\pm$ 0,23	7,72 $\pm$ 0,76	> 100	ND
AQC-08	5,85 $\pm$ 0,64	> 100	> 100	> 100
AQC-09	2,40 $\pm$ 0,09	3,71 $\pm$ 0,25	> 100	ND
AQC-10	> 100	ND	ND	ND
COLCHICINA	0,014 $\pm$ 0,002 <sup>a</sup>	0,024 $\pm$ 0,003	0,019 $\pm$ 0,001	0,015 $\pm$ 0,001

**Tabela 1** – Valores de  $IC_{50}$  ( $\mu M$ ) e  $CC_{50}$  ( $\mu M$ ) para híbridos e controle nos ensaios de viabilidade celular.

\*Média  $\pm$  desvio-padrão (SD, *standard deviation*) de três ensaios independentes. ND = valor não determinado.

<sup>a</sup>Valores de referência: MAGALHÃES *et al.*, 2016; WANG *et al.*, 2018; GHAWANMEH *et al.*, 2020.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Após a identificação de 9 moléculas com atividade em DU-145, a seletividade das mesmas foi avaliada concomitantemente em fibroblastos não-tumorais humanos e murinos das linhagens HFF-1 e FC3H, respectivamente. A determinação da seletividade citotóxica frente FC3H justifica-se pela importância de testes em camundongos em fases iniciais de desenvolvimento de novos fármacos. Ensaios em humanos somente podem ser realizados quando há evidências sólidas de eficiência e segurança nestes animais. Desse modo, ao conduzir tais ensaios, foi possível avaliar a especificidade de ação dos híbridos de modo mais abrangente

e coerente com as etapas experimentais *in vivo* subsequentes (VAN MEER; GRAHAM, SCHUURMAN, 2015).

Os resultados demonstraram que os híbridos AQC-02, AQC-04 e AQC-08 se mostraram seletivos para DU-145 frente HFF-1 e FC3H (**Tabela 2**) com  $SI \geq 5$ , enquanto os demais não atingiram tal determinação para ambas as linhagens. Os valores de  $CC_{50}$  encontram-se representados graficamente no **Apêndice B**.

Por fim, visando ampliar a análise da especificidade dos três compostos pré-selecionados em relação ao local de manifestação primária do CaP, a linhagem RWPE-1 de células não-tumorais do epitélio da próstata humana foi empregada para definição dos parâmetros de interesse. A representação gráfica dos valores de  $CC_{50}$  pode ser visualizada no **Apêndice B**. Os resultados também corroboraram que tais híbridos são seletivos frente RWPE-1, apresentando  $SI \geq 5$  (**Tabela 2**).

COMPOSTOS	Selectivity Index (SI)*		
	HFF-1 / DU-145	FC3H / DU-145	RWPE-1 / DU-145
AQC-01	1	> 13	ND
AQC-02	9	> 19	5
AQC-03	1	4	ND
AQC-04	> 15	> 15	7
AQC-05	1	4	ND
AQC-06	2	> 25	ND
AQC-07	1	> 15	ND
AQC-08	> 17	> 17	> 17
AQC-09	2	> 42	ND

**Tabela 2** – Índice de seletividade (SI, *selectivity index*) dos híbridos avaliados em relação às linhagens HFF-1, FC3H e RWPE-1.

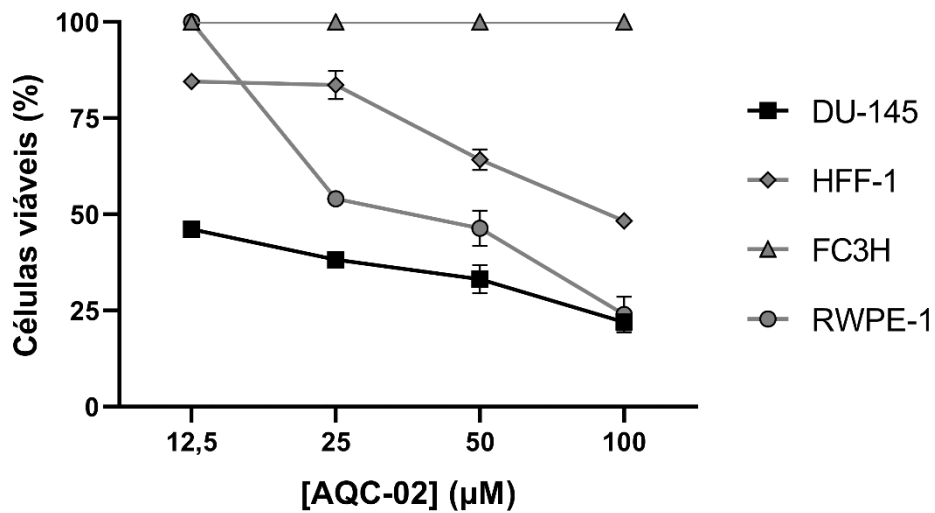
\* $SI = CC_{50}^{\text{não-tumoral}}/IC_{50}^{\text{tumoral}}$ . ND = valor não determinado.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

De acordo com as **Figuras 7-9**, evidencia-se que, para as concentrações entre 12,5 e 100  $\mu\text{M}$ , a porcentagem de células cancerígenas viáveis atingiu valores inferiores a 50% para as três moléculas selecionadas. Para o composto AQC-02 (**Figura 7**), tal porcentagem assumiu o valor de 100% para FC3H entre 12,5 e 100  $\mu\text{M}$  e para RWPE-1 na primeira concentração, além de uma taxa de viabilidade superior à 75% entre as concentrações 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  para HFF-1. A amostra AQC-04 (**Figura 8**) não inviabilizou células das linhagens HFF-1 e FC3H na faixa entre 12,5 e 50  $\mu\text{M}$ , bem como a porcentagem de células viáveis manteve-se próxima à 100% nas concentrações 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  para RWPE-1. Por fim, no caso do híbrido AQC-08 (**Figura 9**), verifica-se que as porcentagens de viabilidade também alcançaram o valor de 100% para

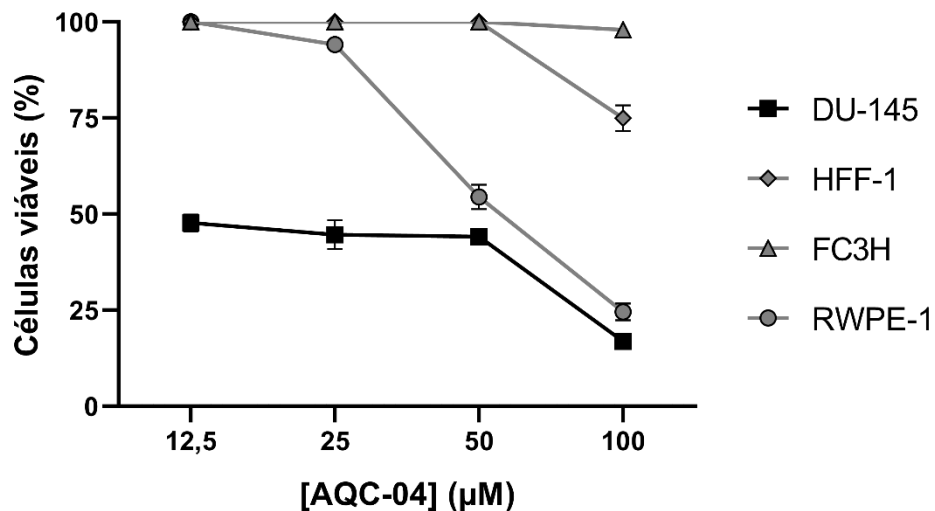
concentrações entre 12,5 e 50  $\mu\text{M}$  nas linhagens FC3H e RWPE-1, e entre 12,5 e 25  $\mu\text{M}$  para HFF-1.

Os achados experimentais mostram que os híbridos AQC-02, AQC-04 e AQC-08 possuem notável seletividade citotóxica para DU-145 frente as três linhagens não-tumorais, sobretudo AQC-08, constatado por seus valores superiores à 17 de SI e pela maior distância gráfica que separa as curvas de porcentagem de células tumorais viáveis em relação aos demais.



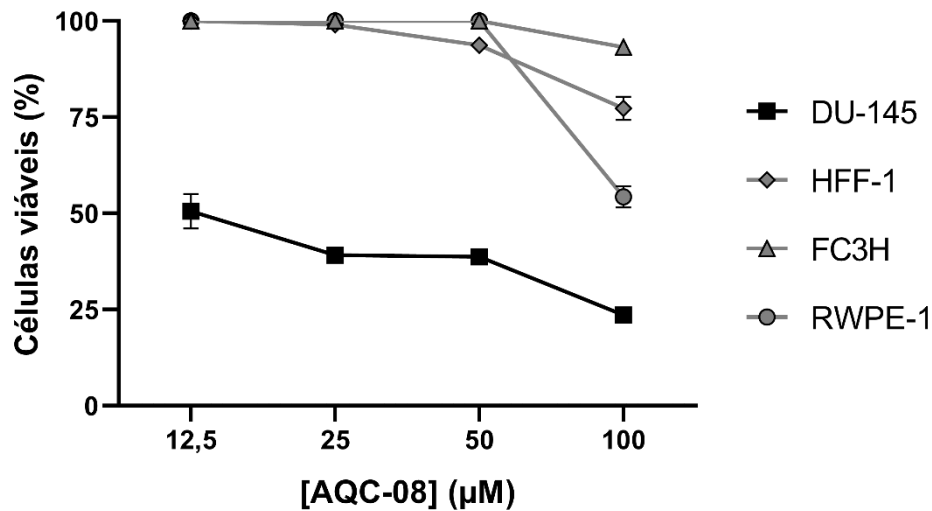
**Figura 7** – Comparação das porcentagens de células viáveis obtidas nos ensaios de viabilidade celular para a linhagem DU-145 (preto) e as linhagens não-tumorais HFF-1, FC3H e RWPE-1 (cinza) para AQC-02.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (GraphPad Prism 8.2.1).



**Figura 8** – Comparação das porcentagens de células viáveis obtidas nos ensaios de viabilidade celular para a linhagem DU-145 (preto) e as linhagens não-tumorais HFF-1, FC3H e RWPE-1 (cinza) para AQC-04.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (GraphPad Prism 8.2.1).



**Figura 9** – Comparação das porcentagens de células viáveis obtidas nos ensaios de viabilidade celular para a linhagem DU-145 (preto) e as linhagens não-tumorais HFF-1, FC3H e RWPE-1 (cinza) para AQC-08.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (GraphPad Prism 8.2.1).

## 4.2 Ensaios de Migração e Invasão Celular

### 4.2.1 Wound Healing

Dando continuidade à triagem dos híbridos de quinazolina-chalcona, a capacidade de inibição da migração de células tumorais de próstata promovida por AQC-02, AQC-04 e AQC-08 foi avaliada qualitativamente em ensaios *wound healing* a partir de uma fenda na monocamada celular. O fechamento desta ocorre em decorrência da migração celular durante o período em que as células permanecem incubadas. As três moléculas foram analisadas a uma concentração de 10 µM para um *screening* de atividade antimigratória. Estes compostos se mostraram ativos em DU-145, inibindo em 50% a migração celular (**Tabela 3**). Colchicina foi utilizada como controle positivo e meios -DMSO e +DMSO 1% empregados como controles negativos (**Figura 10**).

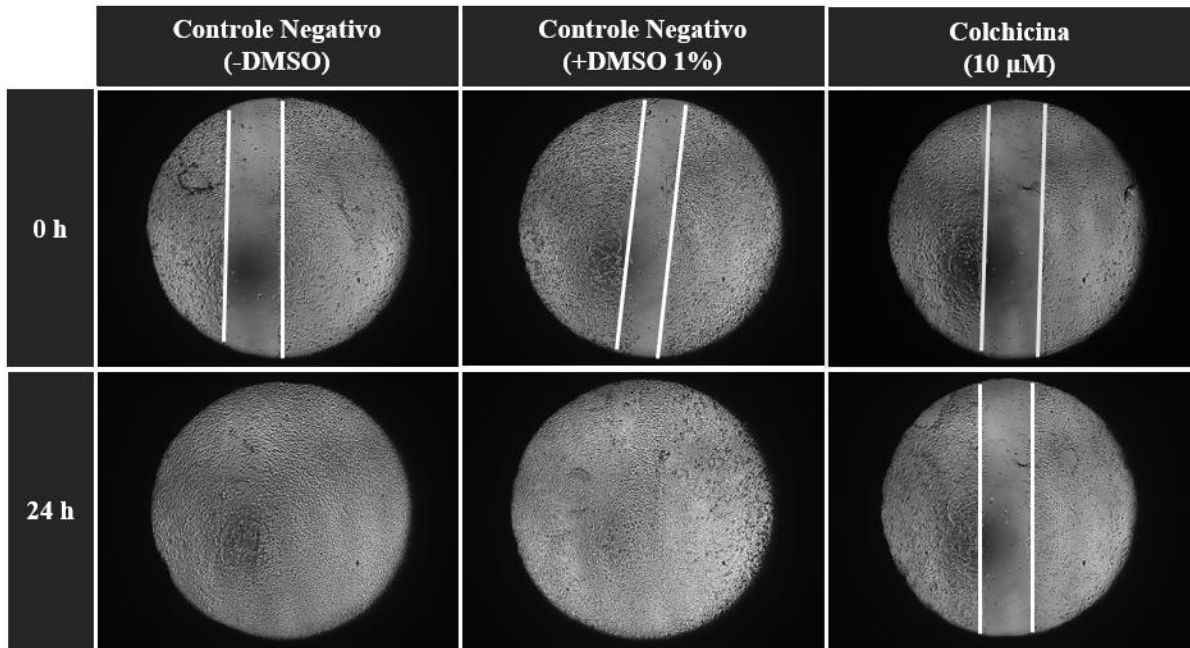
COMPOSTOS	INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO CELULAR (%)*	
	DU-145	
AQC-02	65 ± 1	
AQC-04	56 ± 1	
AQC-08	61 ± 1	
COLCHICINA	91 ± 1	

**Tabela 3** – Resultados da triagem no ensaio qualitativo *wound healing* em DU-145.

Os compostos-teste e o controle foram avaliados a 10 µM.

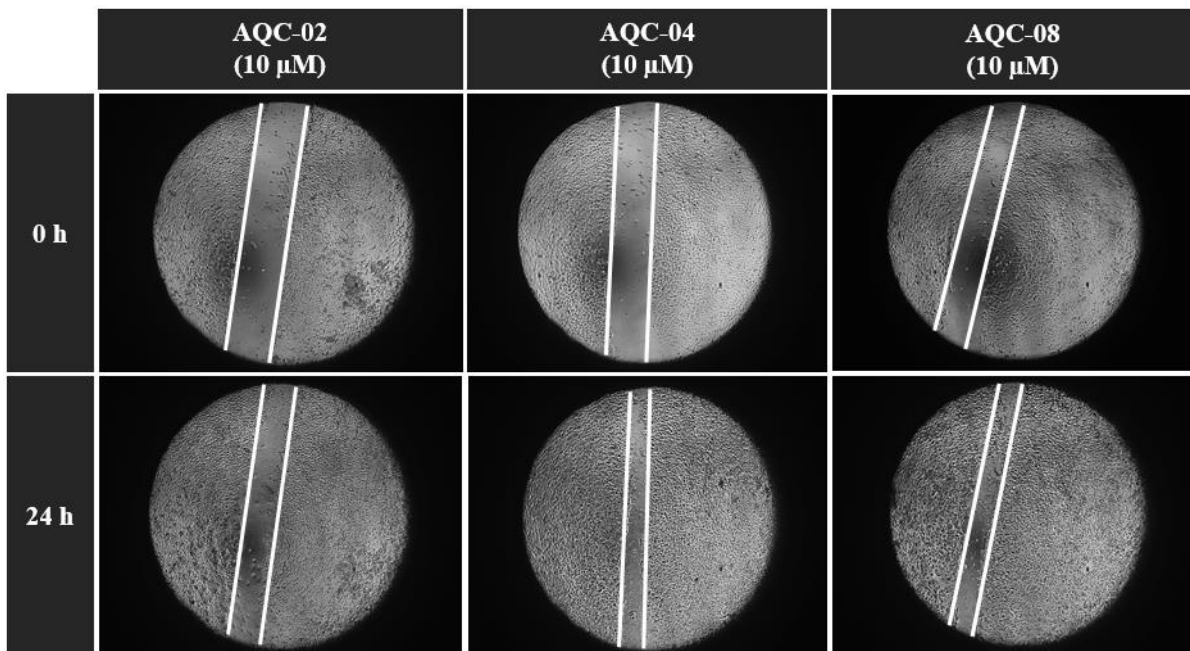
\*Média ± desvio-padrão de dois ensaios independentes em duplicata.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.



**Figura 10** – Imagens da inibição da migração de DU-145 pelo controle positivo padrão colchicina a 10  $\mu$ M. Meios com e sem DMSO foram empregados como controles negativos. Aumento de 40x.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

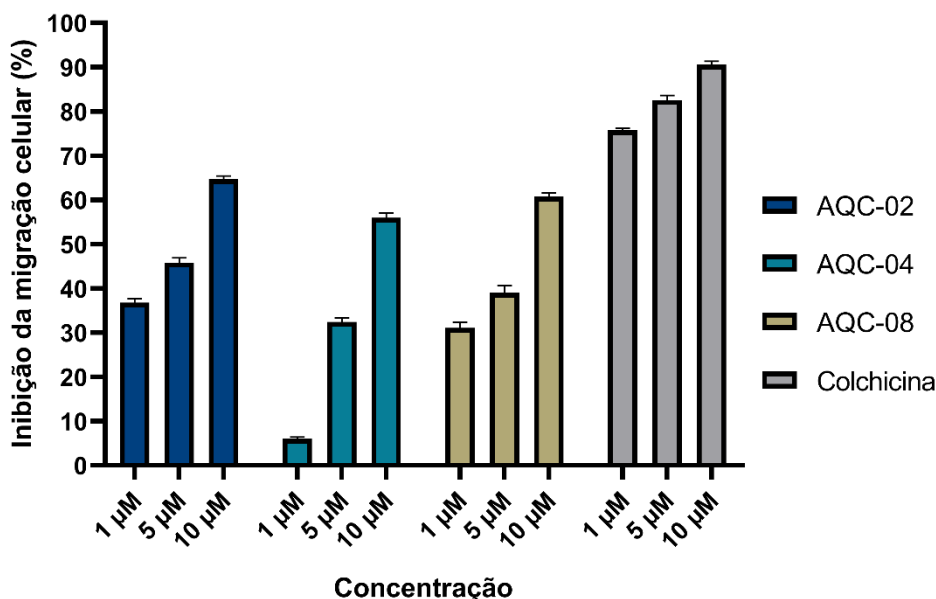


**Figura 11** – Imagens da inibição da migração de DU-145 pelos híbridos AQC-02, AQC-04 e AQC-08 a 10  $\mu$ M. Aumento de 40x.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Como a migração celular é crucial para a ocorrência de metástase, sua inibição consiste em uma propriedade almejada em novos antitumorais. Os compostos selecionados visivelmente exibiram atividade antimigratória *in vitro* (**Figura 11**), sobretudo AQC-02 e AQC-08 que inibiram em > 60% a migração das células tumorais. Além disso, um perfil concentração x efeito também foi identificado ao avaliar os três ligantes a 1 e 5  $\mu$ M (**Figura 12**).





**Figura 12** – Resultado do ensaio *wound healing* em concentração variável (1 µM, 5 µM e 10 µM) para AQC-02, AQC-04, AQC-08 e colchicina na linhagem DU-145.

As porcentagens de inibição resultaram da média de dois ensaios independentes.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (GraphPad Prism 8.2.1).

#### 4.2.2 *Transwell* Baseados em Câmara de Boyden

Após a realização do ensaio *wound healing*, as atividades inibitórias da migração e invasão celular foram avaliadas em termos quantitativos por ensaios *transwell* baseados em câmara de Boyden. Para isso, um quimioatratante presente no interior de um compartimento foi utilizado para promover a migração das células em sua direção através de uma membrana porosa na presença ou ausência de colágeno. Essas são desaderidas e lisadas, permitindo a quantificação de seu conteúdo de DNA.

COMPOSTOS	TRANSWELL / IC <sub>50</sub> ± SD (µM)*	
	Migração	Invasão
AQC-02	5,22 ± 0,50	5,41 ± 0,55
AQC-04	6,76 ± 0,78	6,88 ± 0,15
AQC-08	5,70 ± 0,65	5,69 ± 0,78
COLCHICINA	0,11 ± 0,02	0,16 ± 0,03

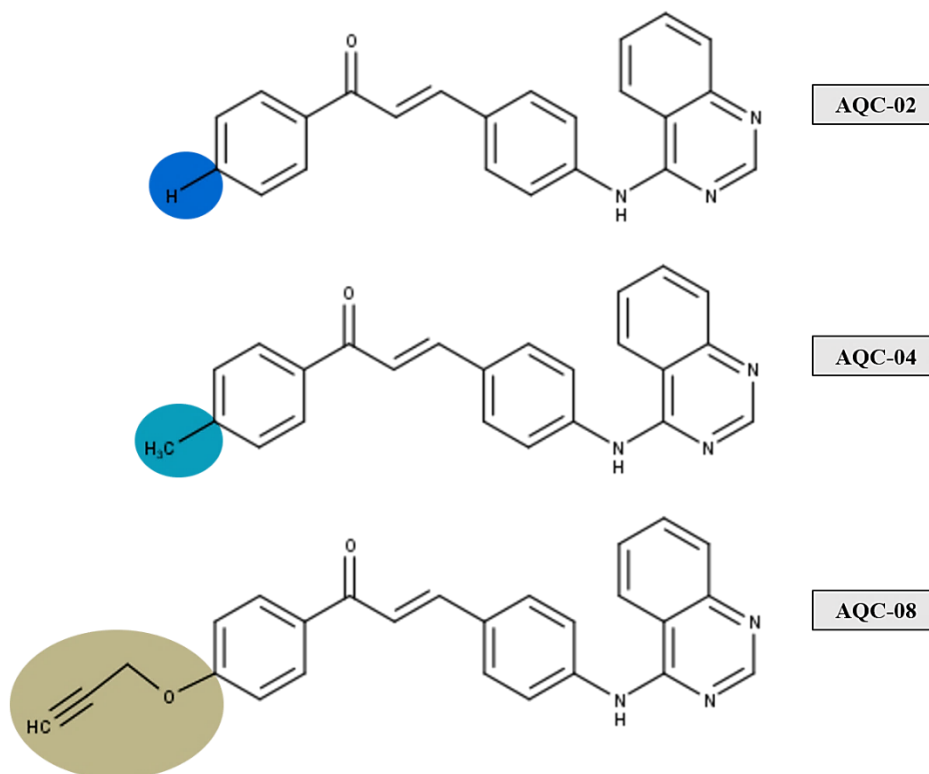
**Tabela 4** – Valores de IC<sub>50</sub> (µM) de migração e invasão celular em DU-145 para os compostos ativos e para o padrão colchicina.

\*Média ± desvio-padrão (SD, *standard deviation*) de dois ensaios independentes.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Com a determinação dos valores de IC<sub>50</sub> para migração e invasão celular (**Tabela 4**), foi possível verificar que a ordem de potência biológica em que os três híbridos avaliados em DU-145 se encontram é a mesma. As substituições propostas em **R**<sub>2</sub> de um hidrogênio (AQC-02) por uma metila (AQC-04) e por um grupo -O-CH<sub>2</sub>-C≡CH (AQC-08), como apresentado na **Figura 13**, foram tolerantes à migração destes híbridos de quinazolina-chalcona. Os resultados

indicam que tais moléculas, além de serem capazes de inviabilizar de forma seletiva a linhagem de mHRPC, também contam com propriedades inibitórias da migração celular em termos qualitativos e quantitativos. Dessa forma, os compostos-teste avançaram para a etapa subsequente do *screening* com a realização de ensaios bioquímicos *in vitro* de modulação da proteína tubulina.



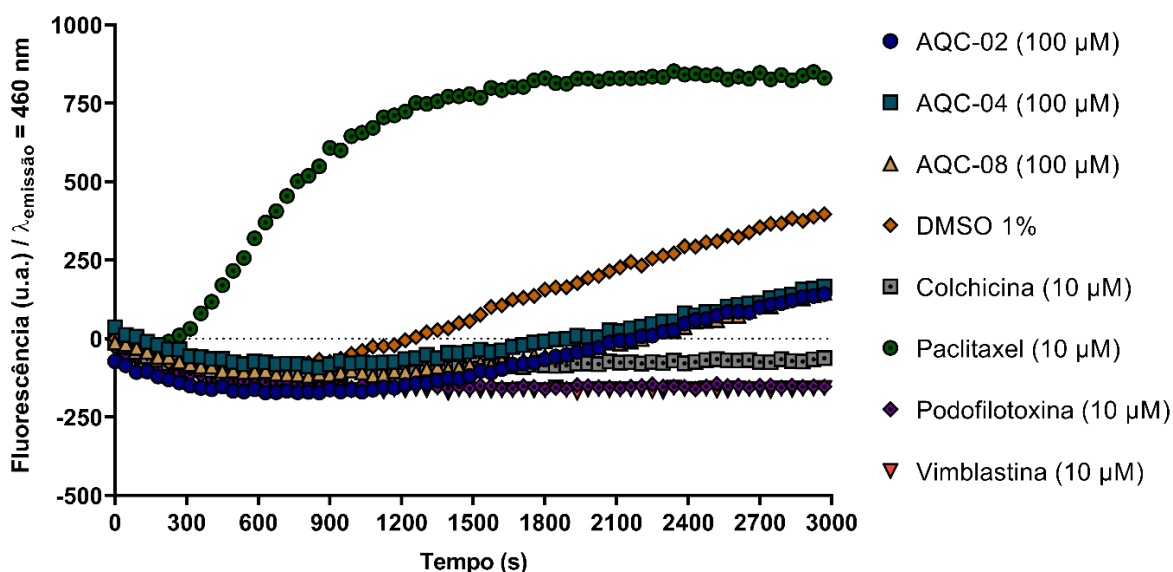
**Figura 13** – Alterações dos substituintes **R<sub>2</sub>** nos híbridos de quinazolina-chalcona selecionados.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 4.3 Modulação da Proteína Tubulina

#### 4.3.1 Polimerização *in vitro*

Para entender eventuais efeitos adversos ou auxiliar na racionalização de estratégias de otimização dos compostos por meio de alterações moleculares, torna-se essencial identificar o mecanismo de ação utilizado por eles. Os híbridos AQC-02, AQC-04 e AQC-08 foram avaliados em relação à capacidade de modular a tubulina em um ensaio de polimerização *in vitro*. Este baseia-se na propriedade do marcador DAPI, de natureza fluorescente, estabelecer ligações com os MTs com uma afinidade superior aos dímeros livres da proteína. Desse modo, à medida que a polimerização ocorre, o sinal de fluorescência é aumentado quando a amostra é excitada a 340 nm, emitindo a 460 nm. Estas determinações viabilizam a identificação de perfis particulares relacionados à atividade de desestabilizadores e estabilizadores de MTs, além da quantificação da interferência destes ligantes neste processo bioquímico.



**Figura 14** – Resultado da triagem dos híbridos no ensaio de polimerização da tubulina. Colchicina, paclitaxel, podofilotoxina e vimblastina foram empregados como controles.

As barras de erros foram omitidas para melhor visualização.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (GraphPad Prism 8.2.1).

O *screening* em concentração única (100  $\mu\text{M}$ ) permitiu a caracterização dos híbridos selecionados como inibidores de polimerização da tubulina (**Figura 14**) que, em consonância com os resultados obtidos, corroboram a associação da modulação da proteína aos efeitos celulares observados. A determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$  para os compostos-teste (**Tabela 5**) revelou que as trocas em  $\text{R}_2$  de um hidrogênio em AQC-02 por um  $-\text{CH}_3$  em AQC-04 e pelo grupamento  $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}\equiv\text{CH}$  em AQC-08 reduziu a potência de inibição de polimerização. Entretanto, ainda que diferenças expressivas nos ensaios celulares e direcionados ao alvo não tenham sido observadas (**Tabela 6**), tais alterações contribuíram com a otimização estrutural dos híbridos de quinazolina-chalcona, visto que a potência dos compostos selecionados se encontra na ordem de micromolar para todos os valores determinados.

COMPOSTOS	POLIMERIZAÇÃO DA TUBULINA / $\text{IC}_{50}$   $\text{EC}_{50}^{\text{a}}$ $\pm$ SD ( $\mu\text{M}$ )*
AQC-02	5,71 $\pm$ 0,09
AQC-04	9,04 $\pm$ 0,40
AQC-08	8,40 $\pm$ 0,31
COLCHICINA	0,99 $\pm$ 0,03
PACLITAXEL	1,87 $\pm$ 0,10 <sup>a</sup>
PODOFILOTOXINA	0,36 $\pm$ 0,01
VIMBLASTINA	0,17 $\pm$ 0,01

**Tabela 5** – Valores de  $\text{IC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) de polimerização da tubulina dos compostos-teste e dos inibidores utilizados como controles (colchicina, podofilotoxina e vimblastina), bem como o valor de  $\text{EC}_{50}$  ( $\mu\text{M}$ ) do estabilizador paclitaxel também empregado como controle.

\*Média  $\pm$  desvio-padrão (SD, *standard deviation*) de ensaios independentes em duplicata.

<sup>a</sup>Potência de promoção da polimerização.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

COMPOSTOS	IC <sub>50</sub> ± SD (µM)*			
	Citotoxicidade	Migração	Invasão	Tubulina
AQC-02	5,27 ± 1,05	5,22 ± 0,50	5,41 ± 0,55	5,71 ± 0,09
AQC-04	6,65 ± 0,36	6,76 ± 0,78	6,88 ± 0,15	9,04 ± 0,40
AQC-08	5,85 ± 0,64	5,70 ± 0,65	5,69 ± 0,78	8,40 ± 0,31

**Tabela 6** – Comparação dos valores de IC<sub>50</sub> (µM) obtidos nos ensaios de citotoxicidade, migração/invasão celular e polimerização da tubulina, visando estabelecer relações entre estrutura e atividade dos compostos triados.

\*Média ± desvio-padrão (SD, *standard deviation*).

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

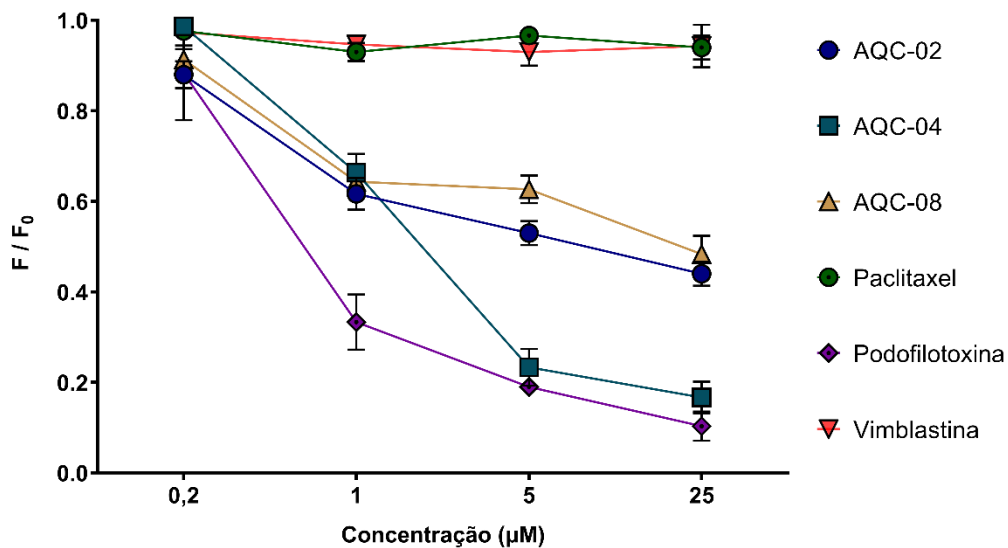
Como mencionado, a diminuição da potência contra a tubulina não resultou em diferenças consideráveis nas atividades citotóxicas e de inibição da migração celular e invasão celular para os híbridos, podendo estar relacionada com a lipofilia das moléculas. Esta característica pode ser comparada por meio de uma propriedade físico-química denominada logP, crucial na concepção de novos insumos farmacêuticos ativos. A permeabilidade de agentes terapêuticos através da membrana celular é uma das principais características suscetíveis à ação direta desta propriedade. Um composto permeia de maneira passiva pela membrana quando logP assume valor moderado (na faixa entre 1,5 e 3,5): não muito alto, a ponto de adentrar a membrana e não se afastar, e nem muito baixo a ponto de não realizar interações com a mesma (GAO; GESENERG; ZHENG, 2017).

A ferramenta computacional SwissADME foi utilizada para estimar o logP dos três compostos por meio de modelos preditivos de parâmetros farmacocinéticos (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Nota-se que os valores preditos para os híbridos AQC-02 (4,49), AQC-04 (4,83) e AQC-08 (4,62) sustentam o perfil observado nos ensaios celulares (IC<sub>50</sub> e logP: AQC-02 < AQC-08 < AQC-04), os quais são também corroborados pelos valores de polimerização determinados com o alvo isolado. Assim, as pequenas variações de potência observadas nos ensaios com células podem estar associadas às sutis diferenças em seus valores de logP. Desse modo, estudos futuros baseados no modelo PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) poderão ser realizados para avaliar tal hipótese a partir da determinação experimental da permeabilidade.

#### 4.3.2 Competição pelo Sítio da Colchicina

Uma vez caracterizados como inibidores de polimerização da tubulina, os três híbridos foram avaliados em um ensaio de competição para elucidar se o mecanismo de modulação desta proteína poderia estar baseado na interação com o sítio da colchicina. Como verificado na **Figura 15**, a podofilotoxina utilizada como controle positivo, conhecida por interagir com o sítio em questão, reduziu a fluorescência intrínseca do complexo colchicina-tubulina ao

restringir a quantidade de colchicina ligada. Por sua vez, os controles negativos paclitaxel e vimblastina, moduladores dos sítios dos taxanos e dos alcaloides da vinca, respectivamente, não apresentaram efeitos expressivos na fluorescência. A competição entre os compostos-teste e a colchicina pela ligação ao sítio reduziu a fluorescência do complexo colchicina-tubulina, exibindo efeitos dependentes da concentração. Juntos, tais resultados fornecem evidências de que os híbridos AQC-02, AQC-04 e AQC-08 possivelmente desestabilizam a polimerização da tubulina ao se ligarem alostericamente nas proximidades ou no próprio sítio da colchicina.



**Figura 15** – Resultado do ensaio de competitividade dos híbridos pelo sítio da colchicina. Paclitaxel, podofilotoxina e vimblastina foram utilizados como controles.

**Fonte:** Elaborada pelo autor (GraphPad Prism 8.2.1).

#### 4.4 Marcação Nuclear

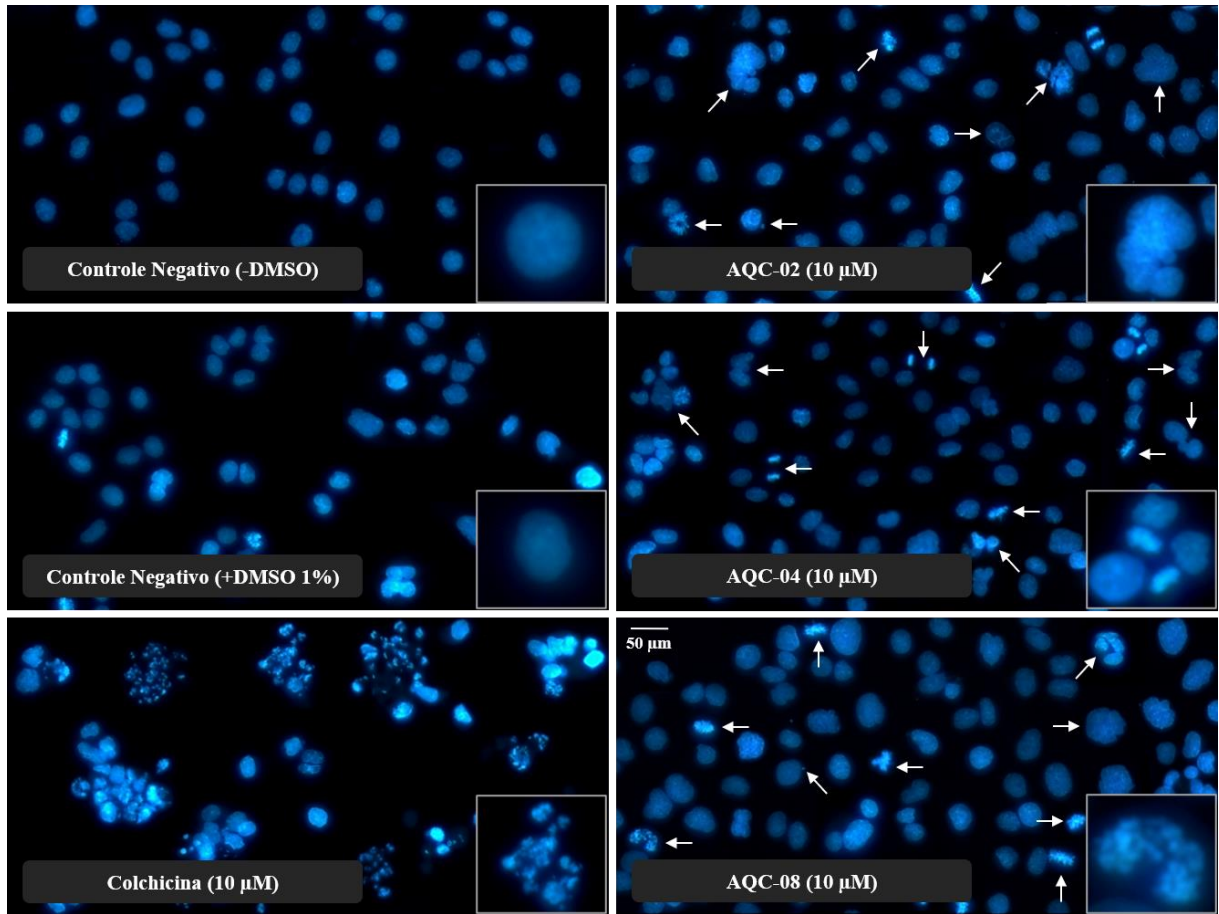
Os híbridos foram adicionalmente submetidos a um ensaio de marcação nuclear com o corante Hoechst 33342 para avaliar qualitativamente a estabilidade genômica das células tumorais em divisão. Marcadores que se ligam ao DNA podem ser usados para observar a condensação nuclear, possibilitando a distinção de células tumorais em crescimento daquelas em apoptose. No primeiro caso, o núcleo assume perfil esférico com coloração uniforme do DNA, enquanto no segundo apresenta-se usualmente fragmentado e corado mais intensamente (CROWLEY; MARFELL; WATERHOUSE, 2016).

O conteúdo e morfologia dos núcleos servem como indicadores da progressão do ciclo celular e podem auxiliar na identificação de fenótipos induzidos por agentes químicos (BUCEVIČIUS; LUKINAVIČIUS; GERASIMAITĖ, 2018). Quando a divisão celular não ocorre adequadamente, as células-filhas podem herdar complementos genéticos irregulares em estrutura e número, aumentando a taxa de anomalias mitóticas (GOMES *et al.*, 2018). Dada a

interação dos compostos-teste com a tubulina, o ensaio de fluorescência com Hoechst 33342 é capaz de evidenciar instabilidades nucleares, sobretudo fragmentações e demais alterações morfológicas decorrentes da interrupção do fuso mitótico pela modulação da dinâmica microtubular durante a replicação.

Nesse contexto, células DU-145 foram incubadas com as três moléculas e colchicina a 10  $\mu$ M, e dois controles negativos (sem DMSO e com DMSO 1%). Os resultados do ensaio estão dispostos na **Figura 16**. É possível observar que as células do controle sem DMSO apresentam núcleos regulares e esféricos com coloração uniforme. Comportamento muito similar é verificado no controle com DMSO 1%, ainda que pequenas e sutis alterações morfológicas e de fluorescência sejam constatadas em decorrência do efeito deste agente. As células tratadas com colchicina apresentaram notáveis modificações em sua morfologia, verificando-se núcleos fragmentados e fortemente corados, bem como a presença acentuada de células polinucleadas e apoptóticas decorrentes da inibição das fibras do fuso.

As células incubadas com os compostos AQC-02, AQC-04 e AQC-08 exibiram características intermediárias entre os controles negativos e aquelas tratadas com colchicina. Nota-se que os três compostos apresentam efeitos semelhantes com alterações morfológicas moderadas, produção de micronúcleos e evidente fragmentação nuclear com ocorrência de células polinucleadas e apoptóticas. Ademais, observa-se que os núcleos expressam heterogeneidade na emissão de fluorescência, ressaltando a instabilidade genômica dos mesmos. Tais erros mitóticos encontram-se destacados por setas na **Figura 16** e evidenciam que os híbridos são capazes de desestabilizar a divisão celular e promover a fragmentação nuclear de células tumorais.



**Figura 16** – Efeitos dos controles negativos, da colchicina e dos híbridos selecionados na morfologia nuclear de células da linhagem DU-145. As setas indicam as irregularidades genéticas observadas. Núcleos corados com o marcador azul Hoechst 33342 e registrados em aumento de 20x. Barra de escala = 50 µm.

Os núcleos em destaque foram selecionados e ampliados para melhor visualização dos resultados.

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Em linhas gerais, este Trabalho de Conclusão de Curso avançou com os estudos de novas terapias citotóxicas para o tratamento do mHRPC, o qual exhibe um dos maiores níveis de agressividade e letalidade entre homens no Brasil e no mundo. Além disso, também contou com conhecimentos imprescindíveis adquiridos com a participação do acadêmico no curso *Target to Candidate: An Introduction to Drug Discovery* (**Anexo A**) oferecido pela *Drug Discovery Unit* (DDU) da Universidade de Dundee (Escócia, Reino Unido). Nesse contexto, a série sintética de híbridos de quinazolina-chalcona avaliada consiste em uma inovação em termos estruturais e de propriedades anticâncer. Considerando-se as limitações de tratamentos tradicionais, o planejamento de novos ligantes bioativos situa-se em um campo terapêutico extenso e aplicável, sobretudo com a integração de métodos pautados na Química Medicinal.

Três compostos – **AQC-02**, **AQC-04** e **AQC-08** – se mostraram ativos e seletivos para CaP frente fibroblastos humanos e murinos não-tumorais, e células epiteliais saudáveis de próstata humana *in vitro* ( $SI \geq 5$ ). Ademais, também inibiram a migração celular tumoral em ensaios *wound healing* em concentração única ( $\geq 50\%$  a  $10 \mu\text{M}$ ) e concentração x efeito ( $1, 5$  e  $10 \mu\text{M}$ ). A potência das moléculas selecionadas encontra-se na ordem de micromolar contra a linhagem tumoral. Os ensaios *transwell* baseados em câmara de Boyden revelaram que os três híbridos contam com bom perfil de atividade antimigratória e de bloqueio da invasão celular (ambas com  $IC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$ ). Além de serem inibidoras da migração celular e seletivamente citotóxicas contra células tumorais do mHRPC, as moléculas demonstraram serem capazes de modular a tubulina *in vitro*, inibindo sua polimerização em MTs. Estudos complementares de modulação da proteína-alvo sugerem que tal inibição esteja possivelmente relacionada à ligação dos híbridos de forma alostérica nas proximidades ou no próprio sítio da colchicina. Por fim, os ensaios de marcação nuclear das células tumorais corroboraram o efeito dos compostos a partir da visualização da interrupção da divisão celular e ocorrência de fragmentação do núcleo das mesmas.

As modificações moleculares exibiram tolerância nos representantes dos modelos e, ainda que aprimoramentos significativos não tenham sido verificados nas atividades biológicas, nenhuma se mostrou deletéria. Interessante notar que os três compostos selecionados compartilham o perfil estrutural baseado no padrão *para* do anel B da porção chalcona, enquanto todos com padrão *meta* foram eliminados na triagem. O conhecimento adquirido será útil para o planejamento de novos análogos sintéticos aprimorados e no entendimento de seu mecanismo de ação molecular. Assim, considera-se que os representantes estudados oferecem



um conjunto de alternativas estruturais que podem ser exploradas para a otimização múltipla de parâmetros e características desejáveis a novos fármacos.

De posse dos achados experimentais, será possível expandir o estudo de tais compostos com análises farmacocinéticas para delinear o perfil ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) *in vitro*, promovendo um ajuste fino. Caso se mostrem promissoras, as moléculas serão posteriormente direcionadas para estudos *in vivo*, podendo despontar como fortes candidatas para ensaios com modelos apropriados para prova de conceito. A avaliação destes híbridos de quinazolina-chalcona conferiu informações significativas em relação à inibição de comportamentos essenciais atrelados à disseminação do CaP. Os dados coletados contribuem de forma coerente com o avanço nos estudos de quimioterápicos inéditos, colaborando para o processo de descoberta de fármacos. Dessa forma, conclui-se que o presente trabalho possibilitou a identificação e caracterização de moléculas híbridas promissoras ao tratamento do câncer de próstata metastático e hormônio-refratário.

## REFERÊNCIAS

ALBINI, A. *et al.* A Rapid *in vitro* Assay for Quantitating the Invasive Potential of Tumor Cells, **Cancer Research**, v. 47, p. 3239-3245, 1987.

ALIMBETOV, Dauren *et al.* Pharmacological Targeting of Cell Cycle, Apoptotic and Cell Adhesion Signaling Pathways Implicated in Chemoresistance of Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1690, 2018.

ALTEI, Wanessa Fernanda. **Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos**. 2014. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

ANDRICOPULO, Adriano; MONTANARI, Carlos. Structure-Activity Relationships for the Design of Small-Molecule Inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 585-593, 2005.

AUTI, Prashant S.; GEORGE, Ginson; PAUL, Atish T. Recent advances in the pharmacological diversification of quinazoline/quinazolinone hybrids. **RSC Advances**, v. 10, n. 68, p. 41353-41392, 2020.

AYTES, Alvaro *et al.* NSD2 is a conserved driver of metastatic prostate cancer progression. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1-14, 2018.

BAI, Zhaoshi *et al.* BZML, a novel colchicine binding site inhibitor, overcomes multidrug resistance in A549/Taxol cells by inhibiting P-gp function and inducing mitotic catastrophe. **Cancer Letters**, v. 402, p. 81-92, 2017.

BROUHARD, Gary J.; RICE, Luke M. Microtubule dynamics: an interplay of biochemistry and mechanics. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 7, p. 451-463, 2018.

BUCEVIČIUS, Jonas; LUKINAVIČIUS, Gražvydas; GERASIMAITĖ, Rūta. The Use of Hoechst Dyes for DNA Staining and beyond. **Chemosensors**, v. 6, n. 2, p. 18, 2018.

ČERMÁK, Vladimír *et al.* Microtubule-targeting agents and their impact on cancer treatment. **European Journal of Cell Biology**, v. 99, n. 4, p. 151075, 2020.

CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559-1564, 2011.

CHANG, Sam S.; KIBEL, Adam S. The role of systemic cytotoxic therapy for prostate cancer. **BJU International**, v. 103, n. 1, p. 8-17, 2009.

CHANG, Yi-Ting *et al.* REST is a crucial regulator for acquiring EMT-like and stemness phenotypes in hormone-refractory prostate cancer. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2017.

CROWLEY, Lisa C.; MARFELL, Brooke J.; WATERHOUSE, Nigel J. Analyzing Cell Death by Nuclear Staining with Hoechst 33342. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 9, p. 778-781, 2016.

DAINA, Antoine; MICHELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-13, 2017.

DALLAVALLE, Sabrina *et al.* Improvement of conventional anti-cancer drugs as new tools against multidrug resistant tumors. **Drug Resistance Updates**, v. 50, p. 100682, 2020.

DHANYAKRISHNAN, Radhakrishnan *et al.* Morphological and molecular effects of phenolic extract from coconut kernel on human prostate cancer cell growth *in vitro*. **Mediterranean Journal of Nutrition and Metabolism**, v. 11, n. 1, p. 21-36, 2018.

DUMONTET, Charles; JORDAN, Mary Ann. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 790-803, 2010.

ESPOSITO, Mark; GANESAN, Shridar; KANG, Yibin. Emerging strategies for treating metastasis. **Nature Cancer**, v. 2, n. 3, p. 258-270, 2021.

FARES, Jawad *et al.* Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2020.

FEDERICO, Leonardo Bruno *et al.* Identification of novel  $\alpha\beta$ -tubulin modulators with antiproliferative activity directed to cancer therapy using ligand and structure-based virtual screening. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 3040-3050, 2020.

FOUAD, Yousef Ahmed; AANEI, Carmen. Revisiting the hallmarks of cancer. **American Journal of Cancer Research**, p. 1016-1036, 2017.

FU, Weihua *et al.* Progress of molecular targeted therapies for prostate cancers. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1825, n. 2, p. 140-152, 2012.

GALMARINI, Carlos M. *et al.* Plocabulin, a novel tubulin-binding agent, inhibits angiogenesis by modulation of microtubule dynamics in endothelial cells. **BMC Cancer**, v. 18, n. 1, p. 18-20, 2018.

GAO, Yi; GESENERG, Christoph; ZHENG, Weijia. Oral Formulations for Preclinical Studies: principle, design, and development considerations. In: QIU, Yihong *et al.* **Developing Solid Oral Dosage Forms: pharmaceutical theory and practice**. 2. ed.: Academic Press, 2017. Cap. 17. p. 455-495.

GHAWANMEH, Abdullah A. *et al.* Recent developments on (–)-colchicine derivatives: synthesis and structure-activity relationship. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 185, p. 111788, 2020.

GIANNAKAKOU, Paraskevi; GALLETTI, Giuseppe. Microtubules in Prostate Cancer. **Molecular Pathology Library**, p. 439-453, 2017.

GOMES, Cecil J. *et al.* Measuring DNA content in live cells by fluorescence microscopy. **Cell Division**, v. 13, n. 1, p. 1-10, 2018.

GUDIMCHUK, Nikita B.; MCINTOSH, J. Richard. Regulation of microtubule dynamics, mechanics and function through the growing tip. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 22, n. 12, p. 777-795, 2021.

GUIDO, Rafael V. C.; ANDRICOPULO, Adriano D.; OLIVA, Glaucius. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81-98, 2010.

HAIDER, Tanweer *et al.* Drug resistance in cancer: mechanisms and tackling strategies. **Pharmacological Reports**, v. 72, n. 5, p. 1125-1151, 2020.

HALABI, Susan *et al.* Meta-Analysis Evaluating the Impact of Site of Metastasis on Overall Survival in Men With Castration-Resistant Prostate Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 34, n. 14, p. 1652-1659, 2016.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: new dimensions. **Cancer Discovery**, v. 12, n. 1, p. 31-46, 2022.

HEMMAT, Mahya; CASTLE, Brian T; ODDE, David J. Microtubule dynamics: moving toward a multi-scale approach. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 50, p. 8-13, 2018.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Estimativa 2020 – Incidência de câncer no Brasil**. 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/noticias/brasil-tera-625-mil-novos-casos-de-cancer-cada-ano-do-trienio-2020-2022>. Acesso em: 18 jan. 2022.

International Agency for Research on Cancer (IARC). **Globocan 2020: Global Cancer Observatory**. 2020. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/>. Acesso em: 18 jan. 2022.

KAUR, Sukhneeraj P. *et al.* Inhibition of glypican-1 expression induces an activated fibroblast phenotype in a human bone marrow-derived stromal cell-line. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2021.

KERRU, Nagaraju *et al.* Recent advances (2015–2016) in anticancer hybrids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 142, p. 179-212, 2017.

KLEIN, Christoph A. The Metastasis Cascade. **Science**, v. 321, n. 5897, p. 1785-1787, 2008.

KRAEGE, Stefanie *et al.* The combination of quinazoline and chalcone moieties leads to novel potent heterodimeric modulators of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.117, p. 212-229, 2016.

LANORE, Didier; DELPRAT, Christel. **Quimioterapia Anticancerígena**, São Paulo: Roca, p. 53-78, 2004.

LEUNG, David Ka-Wai *et al.* Novel Strategies for Treating Castration-Resistant Prostate Cancer. **Biomedicines**, v. 9, n. 4, p. 339, 2021.

LI, Jiahe; KING, Michael R. Adhesion receptors as therapeutic targets for circulating tumor cells. **Frontiers in Oncology**, v. 2, p. 1-9, 2012.

LI, L. *et al.* Recent advances in trimethoxyphenyl (TMP) based tubulin inhibitors targeting the colchicine binding site. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 151, p. 482-494, 2018.

LI, Wenlong *et al.* Discovery of novel quinazolines as potential anti-tubulin agents occupying three zones of colchicine domain. **Bioorganic Chemistry**, v. 83, p. 380-390, 2019.

LIANG, Xiaoxia *et al.* An update of new small-molecule anticancer drugs approved from 2015 to 2020. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 220, p. 113473, 2021.

LIU, Runlai *et al.* Design, synthesis and bioevaluation of 2,7-diaryl-pyrazolo[1,5- $\alpha$ ]pyrimidines as tubulin polymerization inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 115, p. 105220, 2021.

LIU, Wenjing *et al.* A review on synthetic chalcone derivatives as tubulin polymerisation inhibitors. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 9-38, 2022.

LIU, Xinran *et al.* Targeting mitosis exit: a brake for cancer cell proliferation. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1871, n. 1, p. 179-191, 2019.

MAGALHAES, Luma G. *et al.* Discovery of a Series of Acridinones as Mechanism-Based Tubulin Assembly Inhibitors with Anticancer Activity. **Plos One**, v. 11, n. 8, 2016.

MAGALHÃES, Luma Godoy. **Identificação e caracterização de novos agentes com propriedades anticâncer**. 2014. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

MAGALHÃES, Luma Godoy. **Planejamento e caracterização de moduladores da proteína tubulina candidatos a fármacos para o tratamento do câncer**. 2019. Universidade de São Paulo, 2019.

MAHAPATRA, Debarshi Kar; BHARTI, Sanjay Kumar; ASATI, Vivek. Anti-cancer chalcones: structural and molecular target perspectives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 98, p. 69-114, 2015.

MAJIDPOOR, Jamal; MORTEZAEE, Keywan. Steps in metastasis: an updated review. **Medical Oncology**, v. 38, n. 1, p. 1-17, 2021.

MASS, Eduardo Bustos; DUARTE, Gilmar Vieira; RUSSOWSKY, Dennis. The Quinazoline-Chalcone and Quinazolinone-Chalcone Hybrids: a promising combination for biological activity. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 186-203, 2021.

MATTHEW, Susan *et al.* Gatorbulin-1, a distinct cyclodepsipeptide chemotype, targets a seventh tubulin pharmacological site. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 9, p. 1-11, 2021.

NAAZ, Fatima *et al.* Anti-tubulin agents of natural origin: targeting taxol, vinca, and colchicine binding domains. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 171, p. 310-331, 2019.

NATIONAL CANCER INSTITUTE. **Drugs Approved for Prostate Cancer**. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/prostate>. Acesso em: 18 jan. 2022.

NING, Nannan *et al.* A Novel Microtubule Inhibitor Overcomes Multidrug Resistance in Tumors. **Cancer Research**, p. 5949-5958, 2018.

NURMIK, Martin *et al.* In search of definitions: cancer-associated fibroblasts and their markers. **International Journal of Cancer**, v. 146, n. 4, p. 895-905, 2020.

OLZIERSKY, Anna-Maria; LABIDI-GALY, S. Intidhar. Clinical Development of Anti-mitotic Drugs in Cancer. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, p. 125-152, 2017.

PERNAR, Claire H. *et al.* The Epidemiology of Prostate Cancer. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 8, n. 12, p. a030361, 2018.

PLOWRIGHT, Alleyn T. *et al.* Joining Forces: the chemical biologymedicinal chemistry continuum. **Cell Chemical Biology**, v. 24, n. 9, p. 1058-1065, 2017.

RAWLA, Prashanth. Epidemiology of Prostate Cancer. **World Journal of Oncology**, v. 10, n. 2, p. 63-89, 2019.

SALUM, Livia de Barros. **Estudos *in silico* no planejamento de candidatos a novos fármacos na terapia do câncer de mama e de reposição hormonal**. 2007. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SALUM, Livia de Barros. **Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais**. 2011. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.

SANLI, U.A. *et al.* Targeting apoptosis in the hormone- and drug-resistant prostate cancer cell line, DU-145, by gossypol/zoledronic acid combination. **Cell Biology International**, v. 33, n. 11, p. 1165-1172, 2009.

SANTOS, Ricardo Nascimento dos. **Planejamento de moduladores de polimerização de microtúbulos com propriedades anticâncer, análise estrutural de macromoléculas e geração de uma base virtual de produtos naturais**. 2015. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

SELVAM, Theivendren Panneer; KUMAR, Palanirajan Vijayaraj. Quinazoline Marketed drugs: A Review. **Research in Pharmacy**, p. 1-21, 2011.

SHAGUFTA; AHMAD, Irshad. An insight into the therapeutic potential of quinazoline derivatives as anticancer agents. **MedChemComm**, v. 8, n. 5, p. 871-885, 2017.

SHELLEY, Mike *et al.* Chemotherapy for hormone-refractory prostate cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, 2006.

SHUAI, Wen *et al.* Recent Progress on Tubulin Inhibitors with Dual Targeting Capabilities for Cancer Therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, n. 12, p. 7963-7990, 2021.

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

STENGEL, C *et al.* Class III  $\beta$ -tubulin expression and in vitro resistance to microtubule targeting agents. **British Journal of Cancer**, v. 102, n. 2, p. 316-324, 2009.

STONE, Kenneth R. *et al.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). **International Journal of Cancer**, v. 21, n. 3, p. 274-281, 1978.

STRILIC, Boris; OFFERMANN, Stefan. Intravascular Survival and Extravasation of Tumor Cells. **Cancer Cell**, v. 32, n. 3, p. 282-293, 2017.

SUN, Ya-Xin *et al.* Design, synthesis and evaluation of novel bis-substituted aromatic amide dithiocarbamate derivatives as colchicine site tubulin polymerization inhibitors with potent anticancer activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 229, p. 114069, 2022.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.



SZLISZKA, Ewelina *et al.* Chalcones Enhance TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 1-13, 2010.

TANGUTUR, Anjana Devi *et al.* Microtubule Targeting Agents as Cancer Chemotherapeutics: an overview of molecular hybrids as stabilizing and destabilizing agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 22, p. 2523-2537, 2017.

VAN MEER, Peter J.K.; GRAHAM, Melanie L.; SCHUURMAN, Henk-Jan. The safety, efficacy and regulatory triangle in drug development: Impact for animal models and the use of animals. **European Journal of Pharmacology**, v. 759, p. 3-13, 2015.

WANG, Guangcheng *et al.* Synthesis, biological evaluation and molecular docking studies of aminochalcone derivatives as potential anticancer agents by targeting tubulin colchicine binding site. **Bioorganic Chemistry**, v. 78, p. 332-340, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO): INTERNATIONAL ASSOCIATION OF CANCER REGISTRIES (IACR). **Cancer Tomorrow: A tool that predicts the future cancer incidence and mortality burden worldwide from the current estimates in 2018 up until 2040. 2020.** Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>. Acesso em: 18 jan. 2022.

WU, Zong-Ze *et al.* Anticancer Activity of *Anthopleura anjuna* Oligopeptides in Prostate Cancer DU-145 Cells. **Marine Drugs**, v. 16, n. 4, p. 125, 2018.

YAMAGUCHI, Hideki; WYCKOFF, Jeffrey; CONDEELIS, John. Cell migration in tumors. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 5, p. 559-564, 2005.

YANG, Nicole J.; HINNER, Marlon J. Getting Across the Cell Membrane: an overview for small molecules, peptides, and proteins. **Site-Specific Protein Labeling**, p. 29-53, 2014.

YUE, Patrick Y. K. *et al.* A Simplified Method for Quantifying Cell Migration/Wound Healing in 96-Well Plates. **Society for Biomolecular Sciences**, v. 15, p. 427-433, 2010.

ZHENG, Kai *et al.* Selective Autophagy Regulates Cell Cycle in Cancer Therapy. **Theranostics**, v. 9, n. 1, p. 104-125, 2019.

ZHENG, Yan-Bo *et al.* A Novel Nitrobenzoate Microtubule Inhibitor that Overcomes Multidrug Resistance Exhibits Antitumor Activity. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016.

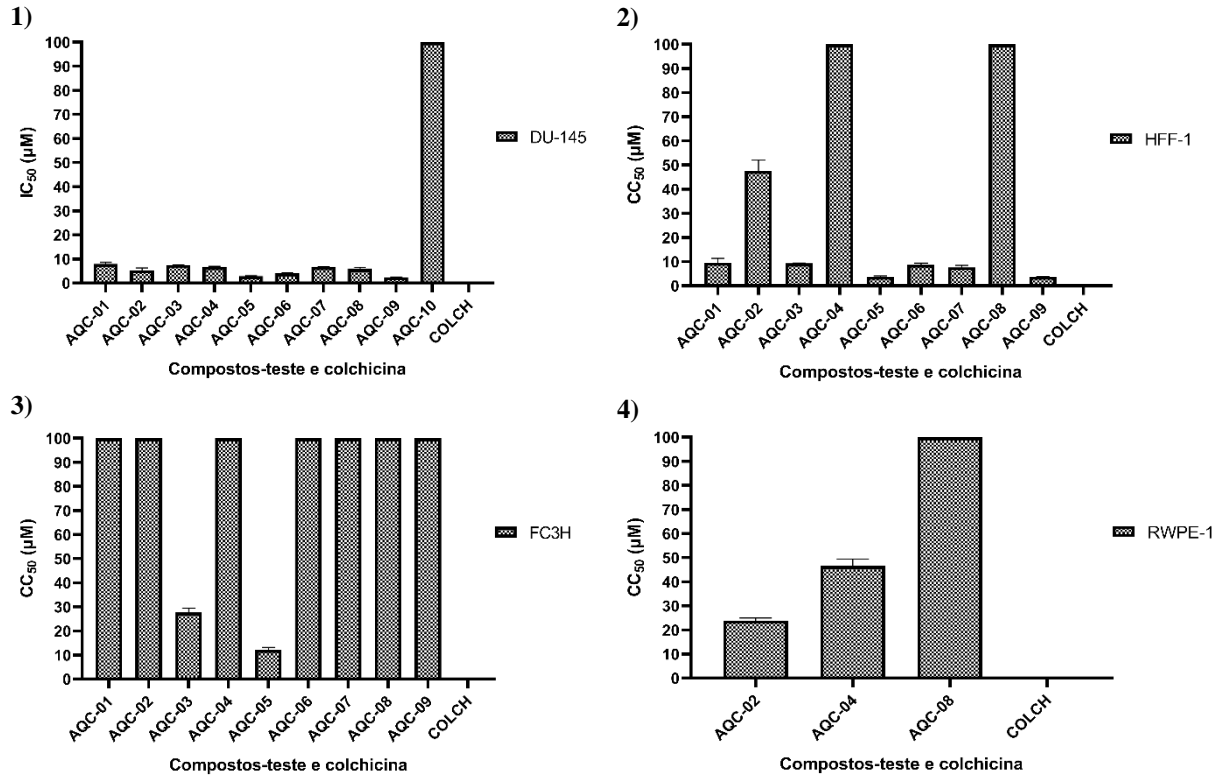
**APÊNDICE A** – Publicações com as classes quinazolina e chalcona para tratamento do CaP

Classe de compostos	Palavras-chave	
	<i>prostate cancer treatment</i>	
	Total	2017-2022*
<i>quinazoline</i>	365	47
<i>chalcone</i>	87	39
<i>hybrids</i>	1745	430
<i>quinazoline chalcone</i>	0	0

\*Resultados referentes à busca realizada até 18 de julho de 2022.

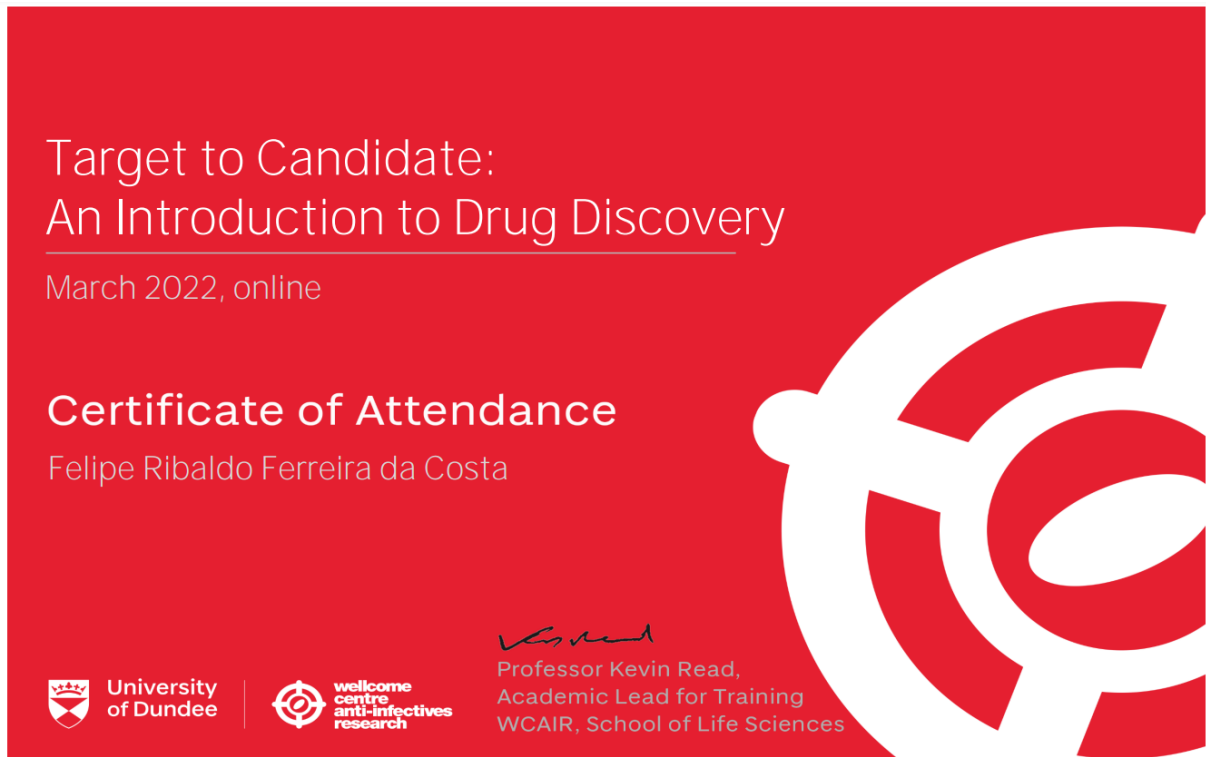
**Fonte:** Elaborado pelo autor (PubMed® – NCBI).

## APÊNDICE B – Representações gráficas dos resultados dos ensaios de viabilidade celular



1) Valores IC<sub>50</sub> (µM) dos 10 híbridos frente linhagem tumoral de próstata humana (DU-145). Valores de CC<sub>50</sub> (µM) das moléculas ativas selecionadas nas linhagens não-tumorais de fibroblastos 2) humanos (HFF-1) e 3) murinos (FC3H), e em 4) células de próstata humana (RWPE-1). Colchicina utilizada como controle em todos os ensaios.

**Fonte:** Elaborado pelo autor (GraphPad Prism 8.2.1).



**ANEXO A** – Certificado do curso *Target to Candidate: An Introduction to Drug Discovery*


Target to Candidate:  
An Introduction to Drug Discovery


---

March 2022, online

**Certificate of Attendance**  
Felipe Ribaldo Ferreira da Costa

 University of Dundee |  wellcome  
centre  
anti-infectives  
research

  
Professor Kevin Read,  
Academic Lead for Training  
WCAIR, School of Life Sciences



**Fonte:** Elaborado e fornecido pela *Drug Discovery Unit (DDU)* da *University of Dundee (UK)*.