

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da toxicidade e eficácia de híbridos triazóis

cumarínicos *in vitro*

BRUNA GAUER

Porto Alegre, Julho de 2014.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

Avaliação da toxicidade e eficácia de híbridos triazóis

cumarínicos in vitro

BRUNA GAUER

Professora Orientadora: Dr^a Solange Cristina Garcia

Porto Alegre, julho de 2014.

Dedico este trabalho aos meus pais, razões da minha vida, motivadores dos meus sonhos e meu porto seguro. Às minhas amigas Paula, Elisa, Laila, Vanessa, Camila, Fernanda, Deise, Bina, Priscila, companheiras e confidentes que estiveram do meu lado durante todo o decorrer deste curso que só me proporcionou alegrias. Ao meu namorado João por seu amor e compreensão que sempre me acolheu nos momentos difíceis e me apoiou a seguir em frente. Aos meus colegas do LATOX, por toda a parceria e amizade, vocês são minha segunda família. E por fim, e não menos especial, à minha orientadora, meu exemplo de profissional e pessoa a quem devo grande parte do meu aprendizado e quem me estendeu a mão para seguir me aperfeiçoando nessa área da toxicologia que gosto tanto.

Este trabalho foi elaborado segundo as normas da “Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences”, apresentadas em anexo.

Avaliação da toxicidade e eficácia de híbridos triazóis

cumarínicos *in vitro*

Bruna Gauer¹; Fernando Torres^{2,3}; Mariele Feiffer Charão^{1,3}; Angela Maria Moro^{1,3};

Bruna Dias¹; Andréia Buffon³; Daniel Fábio Kawano^{2,3}; Vera Lúcia Eifler-Lima^{2,3};

Solange Cristina Garcia^{1,3,*}

¹Laboratório de Toxicologia – Departamento de Análises da Faculdade de Farmácia –
Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – Brasil

²Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal – Departamento de Produção de Matéria-
Prima da Faculdade de Farmácia – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto
Alegre – Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) – Universidade
Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre – Brasil

* Solange Cristina Garcia, Av. Ipiranga, nº 2752, sala 605, bairro Santana, CEP 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, email: solange.garcia@ufrgs.br.

RESUMO

O câncer de pulmão é o mais prevalente no mundo e sua morbidade e mortalidade têm aumentado em países desenvolvidos. Sabe-se que quimioterápicos são, geralmente, muito tóxicos. Assim, estudos que avaliem eficácia e toxicidade nesta área são necessários. A enzima quinase fosfoinositídeo-dependente 1 (PDK-1) é um ativador importante de muitas proteínas quinases envolvidas na sobrevivência e proliferação de células cancerígenas e tem ganhado considerável atenção como alvo de fármacos antitumorais. Diante do exposto, o principal objetivo deste trabalho foi realizar um *screening* para avaliar o potencial efeito tóxico e antitumoral de híbridos triazóis cumarínicos análogos ao BX-517, um inibidor da PDK-1, em linhagem sadia de macrófagos (J774A1) e linhagem de adenocarcinoma pulmonar (A549). LaSOM 180, 185, 186 e 190 foram avaliados através dos ensaios de brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) e dosagem da enzima lactato desidrogenase (LDH), comparados ao LaSOM 77 (molécula precursora) e à cisplatina, um antitumoral reconhecido e amplamente utilizado. Todos híbridos revelaram menor citotoxicidade na linhagem J774A1 em relação a A549. LaSOM 185, 186 e 190 mostraram potencial efeito antitumoral, pois se mostraram mais efetivos que a cisplatina em muitas das concentrações testadas. Portanto, foi possível observar que as moléculas testadas demonstraram efeitos promissores, porém mais estudos são necessários para comprovar sua seletividade e especificidade à PDK-1.

UNITERMOS: antitumoral; toxicidade; LaSOM inibidores; PDK-1; câncer; pulmão

ABSTRACT

Lung cancer is the most prevalent cancer in the world and its morbidity and mortality has increased in developed countries. It is known that chemotherapy is generally very toxic. Thus, studies that include evaluation of efficacy and toxicity in this area are necessary. Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK-1) is an important activator of many protein kinases involved in the survival and proliferation of cancer cells and has gained considerable attention as a target for antitumor drugs. Given the above, the main objective was to conduct a screening to evaluate the potential antitumor and toxic effects of coumarin-triazole hybrids analogous to BX-517, a PDK-1 inhibitor, in cell lines of lung adenocarcinoma (A549) and healthy macrophage (J774A1). LaSOM 180, 185, 186 and 190 were evaluated in both cell lines through the MTT testing and dosing of the enzyme LDH, compared to LaSOM 77, which is a precursor molecule, and cisplatin, a recognized and widely used antitumor. All hybrids showed lower cytotoxicity in J774A1 line compared to A549. LaSOM 185, 186 and 190 showed potential antitumor effect, because they were more effective than cisplatin in many concentrations. Therefore, it was observed that the molecules tested showed promising effects, nevertheless, more studies are necessary to confirm its selectivity and specificity to the PDK-1.

KEYWORDS: antitumor; toxicity; LaSOM inhibitors; PDK-1; cancer; lung

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos 20 anos, o carcinoma de pulmão vem se destacando como o mais incidente em homens e mulheres, sendo o que apresenta maior mortalidade, principalmente entre os homens (Stewart; Kleihues; Cancer, 2003). Os quatro tipos mais comuns de câncer de pulmão são resultantes de células epiteliais e podem ser divididos em quatro classes histologicamente diferentes: carcinoma de células pequenas, carcinoma de células grandes, carcinoma epidermoide e adenocarcinoma (Tyczynski; Bray; Maxwell Parkin, 2003). Estudos realizados na Europa, Japão e América do Norte revelaram que 91% de todos os tipos de câncer em homens e 69% em mulheres são atribuídos ao hábito de fumar (Peto *et al.*, 2012; Sasco; Secretan; Straif, 2004), sendo o de pulmão o tipo câncer com risco de incidência mais fortemente correlacionado ao fumo (Hecht, 1999). Existe uma nítida dose-resposta que relaciona o risco de câncer pulmonar ao número de cigarros consumidos por dia, grau de inalação e a idade em que se iniciou a fumar (Tyczynski; Bray; Maxwell Parkin, 2003).

Adicionalmente, a exposição ambiental e ocupacional aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), exposição ocupacional a cristais de sílica, asbestos, metais (como níquel, cádmio, arsênio, entre outros), radônio e radiação ionizante são conhecidos carcinógenos pulmonares e podem apresentar sinergismo com o fumo no aumento do risco de câncer pulmonar (Boffetta; Jourenkova; Gustavsson, 1997; Tyczynski; Bray; Maxwell Parkin, 2003). Mesmo sendo o tipo mais incidente e letal, é possível observar que nas últimas décadas as taxas de mortalidade reduziram, e essa diminuição é reflexo da detecção e tratamento precoce, assim como a redução ou cessação do fumo reflete diretamente sobre a redução da mortalidade (Peto *et al.*, 2000; Siegel; Naishadham; Jemal, 2013).

A quimioterapia é um tratamento de escolha para muitos pacientes com carcinoma, entretanto o uso destes agentes contra o câncer pulmonar atingiu um platô terapêutico (Molina; Adjei; Jett, 2006). A baixa sobrevida dos pacientes com esse tipo de câncer revela a necessidade de identificação, programação e implementação de novas intervenções que possam reduzir a mortalidade.

Vias específicas que regulam a viabilidade e proliferação de células cancerígenas são ativadas por fatores de crescimento e hormônios, sendo assim um maior conhecimento das vias de sinalizações envolvidas nesses processos pode ser útil para o entendimento da agressividade de tumores através de seus fatores, além de auxiliar no desenvolvimento de novos fármacos antitumorais (Raimondi; Falasca, 2011).

A quinase fosfoinositídeo-dependente 1 (PDK-1) é uma enzima localizada na membrana plasmática que pertence à família das AGC quinases e é responsável pela fosforilação do segmento de ativação de aproximadamente 23 quinases, incluindo as isoformas da proteína quinase B (Akt), quinase S6 e PKC, que apresentam importante papel na progressão de tumores (Islam; Brown; *et al.*, 2007; Pearce; Komander; Alessi, 2010). Estudos mostram que certas mutações ativas aumentam a expressão da PDK-1 em alguns tipos de câncer e esta, por sua vez, provoca a ativação de vias inibitórias de genes supressores tumorais (Pearce; Komander; Alessi, 2010). O papel da PDK-1 em inúmeras vias de sinalização na progressão de câncer revela a necessidade investigar os inibidores dessa enzima como possíveis agentes antitumorais.

Em nosso estudo foi avaliada a toxicidade *in vitro* de moléculas análogas ao conhecido inibidor da PDK-1, o BX-517, em uma linhagem de macrófagos saudáveis (J774A1) com objetivo de verificar a citotoxicidade das moléculas nessa linhagem, e uma linhagem celular de adenocarcinoma pulmonar (A549) para averiguar eficácia antitumoral dessas moléculas, analisando a viabilidade e dano celular após os

tratamentos. Todas as moléculas testadas são inéditas e foram modeladas com base nos grupo farmacofóricos do BX-517.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.1 Preparação do ligante

A estrutura 3D do híbrido cumarina-triazol foi obtida utilizando a versão on-line do programa Corina (http://www.molecular-networks.com/online_demos/corina_demo), empregando como substituinte na posição quatro do triazol, uma metila. Corina atribui às estruturas 3D geradas comprimentos e ângulos de ligação pré-definidos, dependendo do tipo de ligação, do tipo de átomo e de seu estado de hibridação. O programa também definiu os ângulos torsionais mais prováveis, de acordo com a natureza da estrutura (acíclica, anéis pequenos/médios, macros ou policíclicos, etc), sendo capaz de reproduzir corretamente uma gama de estruturas cristalográficas (Gasteiger; Rudolph; Sadowski, 1990; Sadowski; Gasteiger; Klebe, 1994).

A geometria molecular foi então refinada utilizando-se o campo de força semi-empírico AM1 (Dewar *et al.*, 1985), tal como implementado no programa ArgusLab (Thompson, 2004). A estrutura foi considerada otimizada quando o gradiente de energia conformacional foi inferior a 0,5 kcal/mol.

2.1.2. Predição de alvo biológico

A identificação de potenciais alvos biológicos foi realizada através do servidor da web Pharmmapper (<http://59.78.96.61/pharmmapper/>), o qual utiliza uma abordagem de mapeamento "reverso" de farmacóforos para prever os potenciais alvos terapêuticos

sobre os quais uma dada molécula deve atuar. Phammapper possui um banco de dados com mais de 7.000 modelos farmacofóricos mapeados, os quais correspondem a mais de 1.500 alvos terapêuticos distintos. Uma vez carregada a estrutura tridimensional da molécula, o programa utiliza um método de triangulação (TriHash) para determinação do padrão farmacofórico da conformação original do ligante e de inúmeras outras conformações geradas por um algoritmo genético, as quais são então comparadas com cada um dos mais de 7.000 modelos farmacofóricos disponíveis de modo a ranquear os alvos terapêuticos que apresentam melhor complementaridade farmacofórica com o composto em questão (Liu *et al.*, 2010). Para a análise, foram empregadas as configurações padrões do Phammapper, ou seja, número máximo de confôrmeros gerados igual a 300 e busca em todos os modelos farmacofóricos disponíveis no banco (não apenas alvos humanos).

2.1.3. Sobreposição entre o híbrido e o ligante cristalográfico

A sobreposição entre o híbrido cumarina-triazol e o ligante da PDK-1, BX-517, foi realizada empregando o programa Open3DAlign (<http://open3dalign.sourceforge.net/>), o qual utiliza uma série de métodos para a geração de diferentes confôrmeros de ambos os compostos a serem comparados, seguido de alinhamento rígido aos pares baseado em farmacóforos utilizando o programa Pharao (Tosco; Balle; Shiri, 2011). A partir da análise, foram geradas duas hipóteses de alinhamento mais prováveis sendo selecionada para a análise o alinhamento de maior score (O3A_Score = 279,28).

2.1.4. Simulações de Docking Molecular

As simulações de docking molecular foram realizadas empregando-se o programa ArgusLab (<http://www.arguslab.com/>), utilizando como alvo macromolecular a estrutura cristalográfica da PDK-1 em complexo com o inibidor BX-517 (código PDB = 2PE1). Após redocking do ligante cristalográfico (RMSD = 1,63 Å), o algoritmo genético GADock em suas configurações padrões foi selecionado como algoritmo de amostragem para o docking do híbrido cumarina-triazol no sítio ativo da PDK-1. A visualização da melhor pose do híbrido locado no sítio ativo da enzima em relação ao ligante cristalográfico BX-517 foi feita empregando-se o programa Discovery Studio Visualizer 4.0 (<http://accelrys.com/>).

GADock é um algoritmo de amostragem genético lamarckiano (Thompson, 2004), sendo portanto uma variação do algoritmo genético original darwiniano com um método de busca local adaptativa que permite atualizar o genótipo (Morris *et al.*, 1998). Os algoritmos de amostragem genética tradicionais são inspirados na teoria da evolução de Darwin, em que os graus de liberdade do ligante são codificados como strings binários chamados genes que compõem um "cromossomo", o qual na verdade representa a pose do ligante (Meng *et al.*, 2011). Portanto, algoritmos genéticos demandam que os "indivíduos" mais aptos (poses) sejam transportados para a próxima geração e mutações aleatórias ou direcionadas podem ser feitas para aumentar a diversidade genética (conformacional) (Brooijmans; Kuntz, 2003).

2.2. Materiais e Reagentes para os ensaios *in vitro*

Híbridos triazóis cumarínicos, que são análogos inibidores da PDK-1, foram sintetizados no Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal da Universidade Federal do

Rio Grande do Sul através do projeto de pesquisa já qualificado e intitulado: Isolamento de cumarinas de espécies de *Pterocaulo* (Asteraceae) e síntese de 4-metilcumarinas. Concentrações de 0,01 a 5 μM de cada molécula sintetizada (LaSOM 77, LaSOM 180, LaSOM 185, LaSOM 186 e LaSOM 190) foram utilizadas para os experimentos.

As linhagens celulares J774A1 (macrófagos saudáveis) e A549 (adenocarcinoma pulmonar) foram obtidas da American Type Culture Collection (Rockville, MD, Estados Unidos).

Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), meios de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium-low glucose (DMEM) e Nutrient Mixture F-12 Ham (F-12), Estreptomicina/Penicilina e Anfotericina B, foram adquiridos da Sigma Aldrich (Estados Unidos). Soro fetal bovino e de bezerro foram obtidos da Gibco (Estados Unidos). Cisplatina (cis-diaminadichloroplatina(II)) 1 mg/mL (Platistine® CS, Pfizer). Os reagentes dimetilsulfóxido (DMSO) (Nuclear) e Triton X-100 (Vetec) também foram utilizados durante os experimentos. Kit comercial para dosagem da enzima Lactato Desidrogenase (LDH) foi obtido da Doles (Goiânia, GO, Brasil).

2.3. Cultivo e Tratamento Celular

A linhagem celular de macrófagos J774A1 foi mantida em meio DMEM suplementado com 10% de soro de bezerro. Essa linhagem celular saudável foi utilizada para verificar a citotoxicidade das moléculas em estudo. A linhagem de células de adenocarcinoma pulmonar A549 foi cultivada em meio F-12 suplementado com 10% de soro fetal bovino, sendo utilizada para avaliação do potencial efeito antitumoral dos híbridos em estudo. Os meios receberam estreptomicina/penicilina e anfotericina B em concentrações finais de 1 e 0,4%, respectivamente. As células foram cultivadas em estufa incubadora umidificada a 37°C sob uma atmosfera a 5% de CO₂.

Através de testes preliminares pelo ensaio MTT, foi calculado o valor de IC₁₀ (concentração capaz de reduzir em torno de 10% a viabilidade) das moléculas em estudo nos macrófagos saudáveis. A partir desse cálculo, concentrações na faixa do valor de IC₁₀ de cada molécula foram testadas na linhagem cancerígena pulmonar, a fim de verificar a eficácia dessas como antitumorais em concentrações pouco citotóxicas à linhagem saudável.

Para os experimentos, as células foram dispostas em placas de 96 poços (7x10³ células/poço para J774A1 e A549) e deixadas overnight para aderirem à placa. As moléculas LaSOM 77, LaSOM 180, LaSOM 185, LaSOM 186 e LaSOM 190 foram testadas nas concentrações 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 e 5 µM para verificar a toxicidade nos macrófagos saudáveis e a eficácia sobre a linhagem cancerígena A549. Todas as moléculas foram solubilizadas em DMSO. A concentração de DMSO no meio de cultura durante todos os tratamentos foi de 0,25%, a qual não afetou a viabilidade das células. Como controle positivo de eficácia nas células cancerígenas, foi utilizado o antitumoral cisplatina, testado nas seguintes concentrações: 0,5, 1 e 5 µM, as quais foram comparadas às mesmas concentrações dos LaSOM. Além disso, foi averiguado se as moléculas LaSOM seriam mais eficazes que esse conhecido antitumoral. O tempo de exposição das células para todas as moléculas foi de 24 horas. Após esse período foram realizados ensaios de viabilidade e dano celular, a fim de avaliar a citotoxicidade na linhagem saudável e a eficácia antitumoral na linhagem tumoral.

2.4. Citotoxicidade e eficácia

2.4.1. Ensaio MTT

O ensaio de citotoxicidade é baseado na capacidade de células viáveis reduzirem o brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a cristais de formazano através de desidrogenases mitocondriais ativas.

Para as duas linhagens, 7×10^3 células/poço foram dispostas em placas de 96 poços e incubadas overnight para que as células aderissem ao fundo da placa de cultivo. Em um primeiro momento, a linhagem sadia J774A1 foi tratada com as moléculas LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190, previamente diluídas em DMSO, nas concentrações finais de 0,01 μM a 2000 μM , por um período de 24 horas. Foram verificadas as concentrações das moléculas que não diminuíram mais que 10% da viabilidade nas células sadias. Após esta verificação, as moléculas que obtiveram esses resultados foram testadas concentrações na faixa de 0,01 a 5 μM na linhagem A549. Para todas as etapas de tratamento das linhagens, foi utilizado o respectivo meio de cultura sem adição de vermelho-fenol, para que este não interferisse na posterior determinação da desidrogenase láctica (LDH).

Após 24 horas do tratamento das linhagens celulares com as moléculas, os sobrenadantes dos poços foram removidos e separados para uso no ensaio da LDH. O reagente MTT foi preparado em uma concentração final de 0,5 mg/mL nos respectivos meios de cada linhagem e 100 μL foram adicionados nos poços da placa de tratamento. Após incubação por 2 horas a 37°C, a solução de MTT foi removida e às placas foram adicionadas 100 μL de DMSO para dissolver os cristais de formazano, sob agitação, durante 15 minutos, à temperatura ambiente e em local protegido da luz. A viabilidade celular foi estimada por leitura da absorção a 585 nm com o leitor de microplacas

(Spectramax Me2 Molecular Devices). As células viáveis produzem um produto formazano de coloração roxo escuro, enquanto essa coloração não é formada em células mortas. Resultados foram analisados com o software Soft Max Pro (version 2.2.1).

A viabilidade celular foi definida como a razão (expressa em porcentagem) de absorbância das células tratadas em relação às células não tratadas. O controle negativo (100% viável) continha somente meio de cultivo. Todas as determinações foram realizadas em triplicata e repetidas 3 vezes.

2.4.2. Ensaio de dosagem da enzima LDH

Esse ensaio foi realizado utilizando kit comercial da Doles®, ensaio colorimétrico de ponto final, em placas de 96 poços. O ensaio permite avaliar danos à membrana celular, comprovado pela quantificação da enzima intracelular extravasada para o meio circundante.

Após o tratamento das células com as moléculas, o sobrenadante foi removido da placa de cultura celular e transferido para um eppendorf, centrifugado a 5000 rpm por 1 minuto para a remoção de resíduos celulares.

Para a quantificação de LDH, foi utilizado uma placa de 96 poços e em todos os poços foram pipetados 5 μL de alúmen férrico seguidos de 25 μL do sobrenadante do tratamento celular (em duplicata). Após, 100 μL de substrato foram adicionados, a placa foi incubada por 3 minutos a 37°C, e, posteriormente, 5 μL de NAD foram acrescentados. A placa foi novamente incubada a 37°C durante 5 minutos e, por fim, 100 μL de solução estabilizadora foram pipetados aos poços. Para cada amostra foi realizado um branco, cujo preparo foi o mesmo descrito acima, exceto quanto aos 25 μL de amostra que foram adicionados no final da reação, após a solução estabilizadora.

A leitura foi realizada a 492 nm no leitor de microplacas (Spectramax Me2 Molecular Devices).

A porcentagem de dano à membrana foi calculada pela razão de absorbância das células tratadas com as moléculas em relação às células tratadas com um lisante celular (Triton 0,1%). O poço usado como controle positivo (100% de lise) continha 0,1% de Triton. Os resultados foram analisados com o software Soft Max Pro (version 2.2.1).

Todas as determinações foram realizadas em duplicata e repetidas três vezes.

2.5. Análises Estatísticas

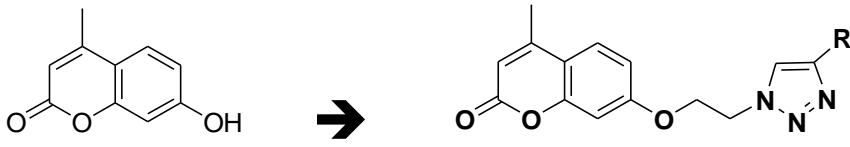
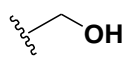
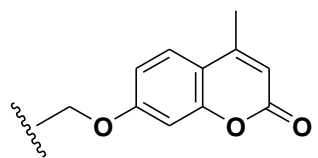
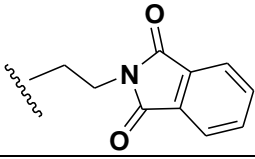
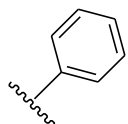
As análises estatísticas foram realizadas através do Software Statistic. A comparação entre as variáveis foi realizada com o teste ANOVA de uma via, seguida por Tukey. Comparação entre dois grupos foi realizada pelo teste t de Student. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Modelagem molecular

As estruturas dos compostos sintetizados a partir da modelagem *in silico* usando como modelo o BX-517 (inibidor da PDK-1) são mostrados na tabela I:

TABELA I – Estruturas das moléculas sintetizadas com base no BX-517, sendo o LaSOM 77 a molécula precursora dos demais LaSOM (180, 185, 186 e 190).

		
<p>LaSOM 77 LaSOM 180, 185, 186 e 190</p>		
Composto	R	Peso molecular (g)
LaSOM 180		176,17
LaSOM 185		301,30
LaSOM 186		459,45
LaSOM 190		347,37

A busca por possíveis alvos terapêuticos para os compostos sintetizados foi realizada empregando-se o servidor da web Pharmed, sendo que os cinco principais alvos terapêuticos de maior escore são mostrados na Tabela II:

TABELA II – Predição de alvos terapêuticos para o híbrido cumarina-triazol pelo webservidor Phrammapper

Alvo terapêutico	Código PDB	Número de grupos farmacofóricos	Fit Score
Acetilcolinesterase	1HBJ	9	4,755
Proteína Quinase Dependente de Fosfoinosítídeo 1 (PDK-1)	2PE1	7	4,542
Trans-sialidase de <i>Trypanosoma cruzi</i>	1SOJ	12	4,519
Aldose redutase	2FZ8	6	4,458
Aldose redutase	2HVO	6	4,434

Considerando o objetivo deste trabalho em explorar o potencial antitumoral dos híbridos cumarina-triazol planejados, a PDK-1 foi selecionada como alvo terapêutico principal e a sobreposição das estruturas do híbrido em questão e do inibidor da PDK-1, o BX-517 ($IC_{50} = 6$ nM) (Islam; Bryant; *et al.*, 2007) foi realizada através do programa Open3DAlign (Figura 1). Pela sobreposição das estruturas adotada, o programa sugere as seguintes sobreposições de grupos farmacofóricos:

- 1) oxigênio da carbonila do híbrido com o nitrogênio terminal da ureia do BX-517;
- 2) oxigênio do éter da lactona do híbrido com o segundo nitrogênio da ureia do BX-517;
- 3) anel benzênico da cumarina do híbrido com o anel benzênico do BX-517;
- 4) Nitrogênio 1 do triazol do híbrido com nitrogênio do pirrol do BX-517.



FIGURA 1 – Sobreposição realizada no programa Open3DAlign entre a estrutura do inibidor da PDK-1 BX-517 (cinza claro) e o híbrido cumarina-triazol contendo uma metila como substituinte na posição quatro do triazol (cinza escuro).

Neste caso, haveria em comum entre as duas estruturas a presença de três grupos aceptores de ligação de hidrogênio e um grupo aromático. Ao considerarmos os resultados dos estudos de docking molecular, embora a orientação entre os dois ligantes seja a mesma sugerida pela sobreposição de grupos farmacofóricos no Open3DAlign, o oxigênio da carbonila do híbrido se alinharia não com o nitrogênio terminal da ureia do BX-517 e sim com o segundo nitrogênio da ureia, fazendo com que a sobreposição entre os dois grupos aromáticos fosse perdida. Ainda de acordo esta análise, a melhor sobreposição entre nitrogênio do pirrol do BX-517 ocorreria não com o nitrogênio 1 do triazol do híbrido e sim com o nitrogênio 2 do mesmo anel (Figura 2). De qualquer modo, os três métodos distintos empregados nas análises *in silico* mostram-se coerentes ao sugerir a PDK-1 com um possível alvo terapêutico para a atividade antitumoral dos compostos planejados neste trabalho.

As proteínas quinases são reguladores críticos de processos celulares em tecidos saudáveis e cancerígenos. A PDK-1 é uma quinase molecular localizada na membrana plasmática celular que pertence à via de sinalização da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K), sendo fosforilada e ativada pela PI3K (Fyffe; Falasca, 2013). O produto da PI3K (PtdIns(3,4,5)P₃) tem sítios de ligação aos domínios PH das enzimas PDK-1 e Akt. Através da interação entre PtdIns(3,4,5)P₃ e a Akt, a enzima PDK-1 é recrutada para a membrana plasmática onde primeiramente se autofosforila e subsequentemente fosforila e ativa a Akt (Erlanson *et al.*, 2011; Falasca *et al.*, 2010). Por sua vez, a Akt é capaz de ativar o complexo multi-protéico sensível à rapamicina em mamíferos (mTORC1), ao qual pertence a mTOR, enzima que regula diversas funções intracelulares como crescimento, ciclo de proliferação e autofagia (Wullschleger; Loewith; Hall, 2006). Diversos estudos mostraram que as enzimas PI3K e Akt, que são intimamente ligadas a PDK-1, encontram-se altamente ativas em vários tipos comuns de câncer como mamário, ovariano, pulmonar, gástrico, prostático e ainda melanoma e leucemia (Islam;

Bryant; *et al.*, 2007; Osaki; Oshimura; Ito, 2004; Vara *et al.*, 2004; Vivanco; Sawyers, 2002). Enquanto muitos estudos vinham focando em atenuar o sinal da PI3K, através da inibição de suas subunidades catalíticas, outros estudos mostram que a PDK-1 pode ser um alvo efetivo na quimioterapia (Fyffe; Falasca, 2013). Além disso, a PDK-1 participa da ativação de outras quinases na superfamília das AGC quinases que também são importantes iniciadores e promotores de progressão tumoral (Islam; Bryant; *et al.*, 2007; Raimondi; Falasca, 2011).

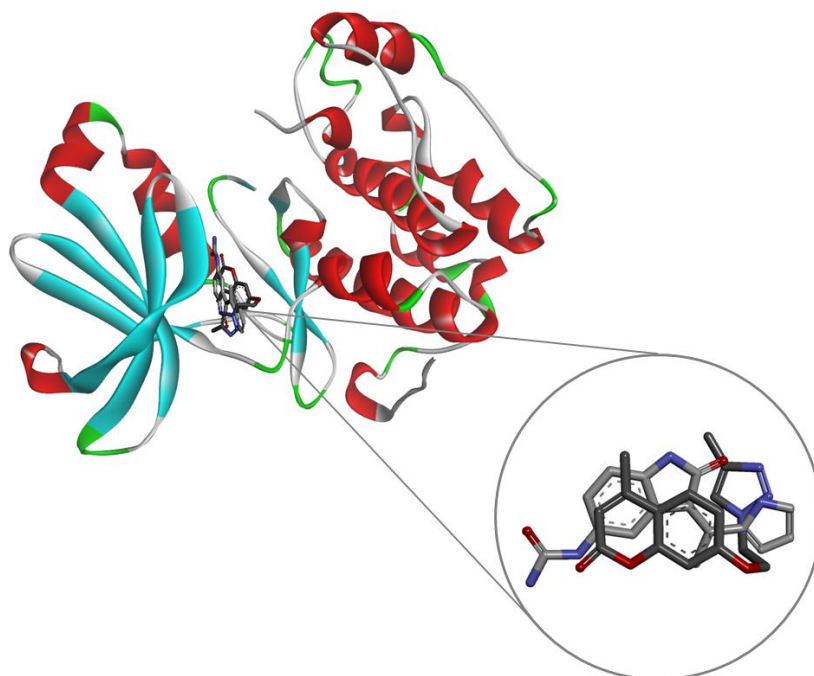


FIGURA 2 – Representação da melhor pose do híbrido cumarina-triazol contendo uma metila como substituinte na posição quatro do triazol (cinza escuro) no sítio ativo da PDK-1 em comparação com o ligante cristalográfico BX-517 (cinza claro).

O motivo para se utilizar um grupo metil na posição 4 do triazol foi para comparar o LaSOM 77 (precursor), com todos os 4 híbridos cumarina-triazol testados que contém um carbono ligado ao nitrogênio 4 do triazol, carbono este não presente no precursor. No caso dos LaSOM 180, 185 e 186 este carbono é um CH₂ e para o LaSOM 190 é um CH pertencente a um anel aromático. Portanto, ao buscar os potenciais alvos

terapêuticos por complementaridade farmacofórica com o composto com uma metila na posição 4 (CH₃), foi averiguado, na verdade, o alvo através dos quais todos estes 4 LaSOM tem potencial de interagir.

O BX-517 é um conhecido inibidor da PDK-1 e, apesar de potente, apresenta algumas desvantagens como baixa solubilidade e características farmacocinéticas desfavoráveis, como reduzido tempo de meia vida, baixa depuração plasmática, pequeno volume de distribuição e pouca estabilidade frente ao sistema de enzimas microsossomais hepáticas (Islam; Brown; *et al.*, 2007). Desse modo, após estudos de modelagem molecular, foi realizada a síntese de moléculas inéditas, análogas ao BX-517. Para encontrar concentrações não tóxicas dessas foi realizado um *screening in vitro* em uma linhagem celular sadia de macrófagos e, após, foi avaliado se essas concentrações não tóxicas para células sadias se mostrariam efetivamente tóxicas sobre linhagem de adenocarcinoma de pulmão.

A cisplatina é amplamente usada como antitumoral, pois possui ação sobre um amplo espectro de tumores malignos. Sua atividade é resultado de inter e intra-ligações cruzadas entre fitas duplas de DNA, levando a formação de adutos de DNA que inibem a replicação e induzem a apoptose celular (Qin; Ng, 2002). Entretanto, muitos tipos de câncer são resistentes a estímulos apoptóticos de diversos quimioterápicos e se tornam progressivamente incuráveis (Andriani *et al.*, 2006), fazendo necessário o uso de quimioterapias combinadas. Sendo assim, quimioterápicos com mecanismos de ação alternativos à indução de apoptose celular poderiam apresentar melhores resultados, tanto por agirem por vias possivelmente mais efetivas, como por reduzirem os efeitos deletérios às células sadias também expostas à grande carga quimioterápica ou até mesmo os efeitos colaterais oriundos dessa combinação de antitumorais.

O câncer de pulmão é o câncer mais prevalente no mundo e sua morbidade e mortalidade têm aumentado em países desenvolvidos (Zhang *et al.*, 2013). No Brasil,

ele é a principal causa de morte por câncer em homens e a segunda principal em mulheres (Duarte; Paschoal, 2006). A interrupção do hábito de fumar e a utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs) são as formas mais efetivas de se reduzir os riscos de carcinoma pulmonar pela exposição ambiental e ocupacional (Brown *et al.*, 2009)

Diversos estudos sugerem a quimioprevenção como uma alternativa para diminuição desse risco, mas nem todos mostram uma forte correlação entre a ingestão de micronutrientes antioxidantes (β -caroteno, vitamina C, retinoides) ou fitoquímicos (flavonoides, fitoestrógenos, glicosanoides), que poderiam minimizar danos oxidativos ao DNA, e a prevenção do câncer (Alberg; Brock; Samet, 2005; Knekt *et al.*, 1997; Speizer *et al.*, 1999; Ziegler; Mayne; Swanson, 1996). Embora a modificação da dieta não possa ser considerada um substituto para a interrupção do fumo, o seu papel como uma estratégia adicional na prevenção do câncer de pulmão merece atenção (Bandera *et al.*, 1997).

O prognóstico para o câncer de pulmão é deficiente, pois engloba testes complexos e dispendiosos, apresenta baixa sobrevida e quase nenhum progresso para seu tratamento ao longo das últimas duas décadas tem sido observado (Duarte; Paschoal, 2006; Zhang *et al.*, 2013). Por essa razão, diversos fármacos vêm sendo testados para tentar reduzir a gravidade em pacientes com alto risco. A complexidade do prognóstico e a baixa sobrevida desse câncer evidenciam a necessidade de novos fármacos com mecanismos alternativos à indução de apoptose celular e que apresentem elevada potência antitumoral e baixa toxicidade nas células sadias do organismo.

3.2. Ensaios de viabilidade e dano celular

Os ensaios *in vitro* utilizando linhagem celulares são muitas vezes utilizados com objetivo de rastrear (*screening*) compostos e avaliar se possuem potenciais efeitos sobre a proliferação celular ou efeitos citotóxicos diretos que, eventualmente, podem levar à morte celular (Riss *et al.*, 2004).

Os ensaios de MTT e dosagem de LDH nos permitiram avaliar a viabilidade e dano celular após a exposição das linhagens a tratamentos de 24 horas com diferentes concentrações das moléculas sintetizadas através da modelagem *in silico*. Os resultados foram comparados tanto entre as linhagens sadias e cancerígenas, como das moléculas LaSOMs comparadas com o seu precursor (LaSOM 77), bem como com um antitumoral reconhecido (cisplatina).

3.2.1. Ensaio de viabilidade celular (MTT)

As células viáveis com metabolismo ativo convertem o MTT em um produto de formazano com cor púrpura e, quando ocorre morte celular, elas perdem a capacidade de converter o MTT em formazano, assim, a formação de cor serve como um marcador útil e conveniente de apenas células viáveis (Abe; Matsuki, 2000; Riss *et al.*, 2004). Em testes de citotoxicidade de antitumorais, o ensaio do MTT pode ser usado para avaliar a sensibilidade de linhagens cancerígenas a esses fármacos (Ulukaya *et al.*, 2008).

O mecanismo exato da redução celular do MTT em formazano não é bem compreendido, mas envolve reação com NADH ou algum semelhante, reduzindo moléculas que transferem elétrons para MTT e, provavelmente, envolve enzimas mitocondriais como a succinato desidrogenase (Lobner, 2000; Riss *et al.*, 2004). A intensidade da coloração formada é dependente de vários parâmetros que incluem: a

concentração de MTT, o tempo de incubação, o número de células viáveis e sua atividade metabólica, e todos estes devem ser considerados na otimização das condições de ensaio para gerar uma quantidade suficiente de produto que possa ser detectado (Riss *et al.*, 2004). Estudos com biomateriais particulados, onde concentrações elevadas fazem com que as partículas se acumulem na parte inferior do poço, podem interferir com a medição da densidade óptica (Allen *et al.*, 1994). A redução do MTT a formazano, por estar relacionada às enzimas mitocondriais, pode ser afetada quando a função mitocondrial se encontra alterada (Lobner, 2000). Os principais fatores críticos para a reprodutibilidade e sucesso incluem: a utilização uma fonte controlada e consistente de células, a realização de uma caracterização adequada da concentração do reagente, e a padronização do tempo de incubação para cada sistema de modelo experimental (Riss *et al.*, 2004). O ensaio de adenosina trifosfato (ATP) por luminescência é um método mais preciso que o ensaio MTT, porém mais caro e menos e frequentemente usado, ao passo que os dois ensaios apresentam boa correlação em estudos de citotoxicidade (Ulukaya *et al.*, 2008).

Com o intuito de minimizar erros metodológicos, nossos experimentos foram padronizados (concentração dos reagentes, tempos de incubação, número de células), assim como controles positivo e negativo sempre foram aplicados concomitantemente aos tratamentos realizados nas placas de cultura. As concentrações testadas dos LaSOM eram baixas, então provavelmente não houve interferência na densidade óptica.

A linhagem sadia J774A1 foi tratada com LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190, previamente diluídos em DMSO, nas concentrações finais de 0,01 μM a 2000 μM , por um período de 24 horas. Os resultados encontrados em relação a viabilidade celular podem ser observados na figura 3:

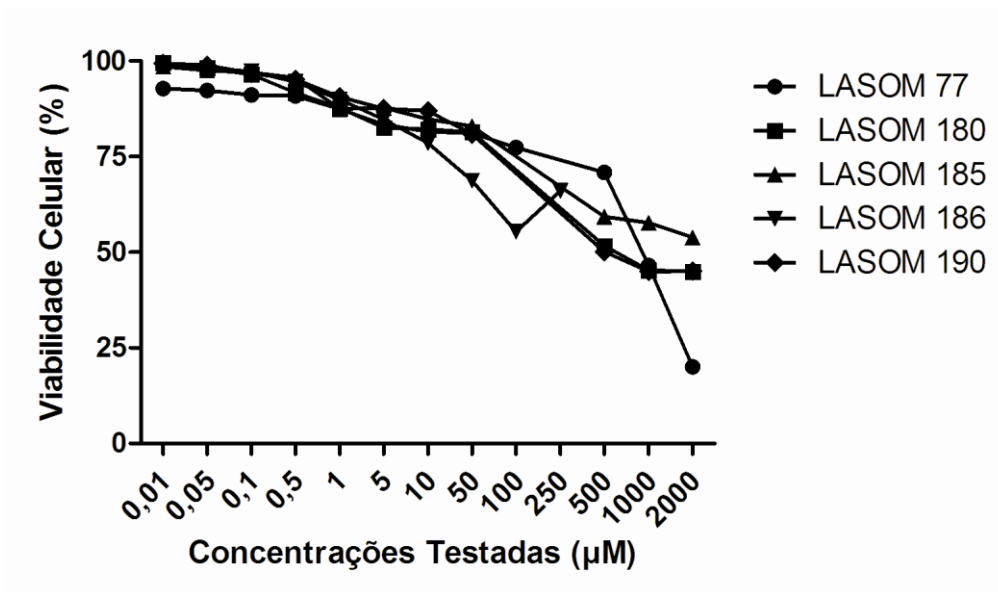


FIGURA 3 – Avaliação da Citotoxicidade na linhagem sadia de macrófagos (J774A1) dos LaSOM 77, 180, 185, 186 e 190 em estudos em concentrações de 0,01 a 2000 µM. Viabilidade celular foi definida como a razão (expressa em porcentagem) de absorbância das células tratadas em relação às células não tratadas. O controle negativo (100% viável) continha somente meio de cultivo.

As concentrações das moléculas que não diminuíram mais que 10% a viabilidade das células sadias foram utilizadas para o estudo na linhagem de adenocarcinoma pulmonar.

As concentrações mais baixas de todas as moléculas (0,01 e 0,05 µM), geralmente, apresentaram menor citotoxicidade frente à linhagem sadia de macrófagos. Em relação aos LaSOM 180 e 190, as menores concentrações testadas (0,01 e 0,05 µM), assim como a concentração de 0,05 µM do LaSOM 186, apresentaram viabilidade celular significativamente menor na linhagem cancerígena, revelando que essas moléculas têm potencial antitumoral bem como afetam menos as células sadias.

Os LaSOM 77 e 185 foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade da linhagem cancerígena em relação a sadia na concentração de 1 µM ($p < 0,05$).

Nenhum LaSOM provocou alteração significativamente diferente na viabilidade celular em relação à mesma concentração testada de LaSOM 77 na linhagem sadia ($p>0,05$).

Na linhagem A549, os LaSOM 186 e 190 na concentração de 0,1 μM foram capazes promover uma sensibilização significativamente maior que a mesma concentração do LaSOM 77 testado nessa linhagem cancerígena ($p<0,05$) (Tabela III).

TABELA III - Teste viabilidade celular (MTT) realizado em duas linhagens celulares J774A1 (macrófagos sadios) e A549 (adenocarcinoma pulmonar).

LaSOM		0,01	0,05	0,1	0,5	1	5
77	J774A1	92,75±6,76	92,30±6,42	91,14±7,06	90,87±7,59	87,49±2,14	83,39±5,02
	A549	72,41±12,32	86,37±1,64	86,19±3,15	73,88±4,66	63,47±3,97*	64,33±19,26
180	J774A1	99,52±0,65	98,21±0,56	96,47±3,53	91,67±1,29	87,74±7,36	82,55±3,32
	A549	72,11±4,73*	72,97±9,12*	81,25±3,46*	87,41±0,49	72,68±2,15*#	67,83±2,61*
185	J774A1	98,56±1,07	87,54±0,16	96,94±2,08	95,63±3,04	87,43±0,81	87,75±5,15
	A549	94,24±3,73	85,40±7,06	86,98±1,04	75,88±1,88	65,43±4,14*	—
186	J774A1	98,52±0,57	97,94±1,40	97,30±1,69	94,57±2,57	89,95±4,99	84,69±0,97
	A549	71,10±10,64	70,35±11,22*	75,82±2,47#	86,69±2,01	80,52±0,58#	—
190	J774A1	99,37±2,73	98,89±1,41	96,83±0,68	95,21±0,53	90,64±3,63	87,56±4,65
	A549	67,21±9,25*	71,45±13,18*	77,22±0,76*#	70,92±11,71	—	—

Resultados expressos em porcentagem (média \pm DP). A unidade das concentrações testadas é μM .

* Diferença significativa em relação à linhagem J774A1 ($p<0,05$).

Diferença significativa em relação ao LaSOM 77 testado na mesma concentração para a linhagem A549 ($p<0,05$).

— Concentrações não testadas neste ensaio.

Os resultados obtidos pelo ensaio MTT mostram que os LaSOM 180, 185, 186 e 190 são mais efivos, isto é, diminuem significativamente mais a viabilidade celular na linhagem de adenocarcinoma pulmonar em concentrações iguais ou até mesmo menores que o conhecido fármaco antitumoral cisplatina ($p<0,05$) (Figura 4).

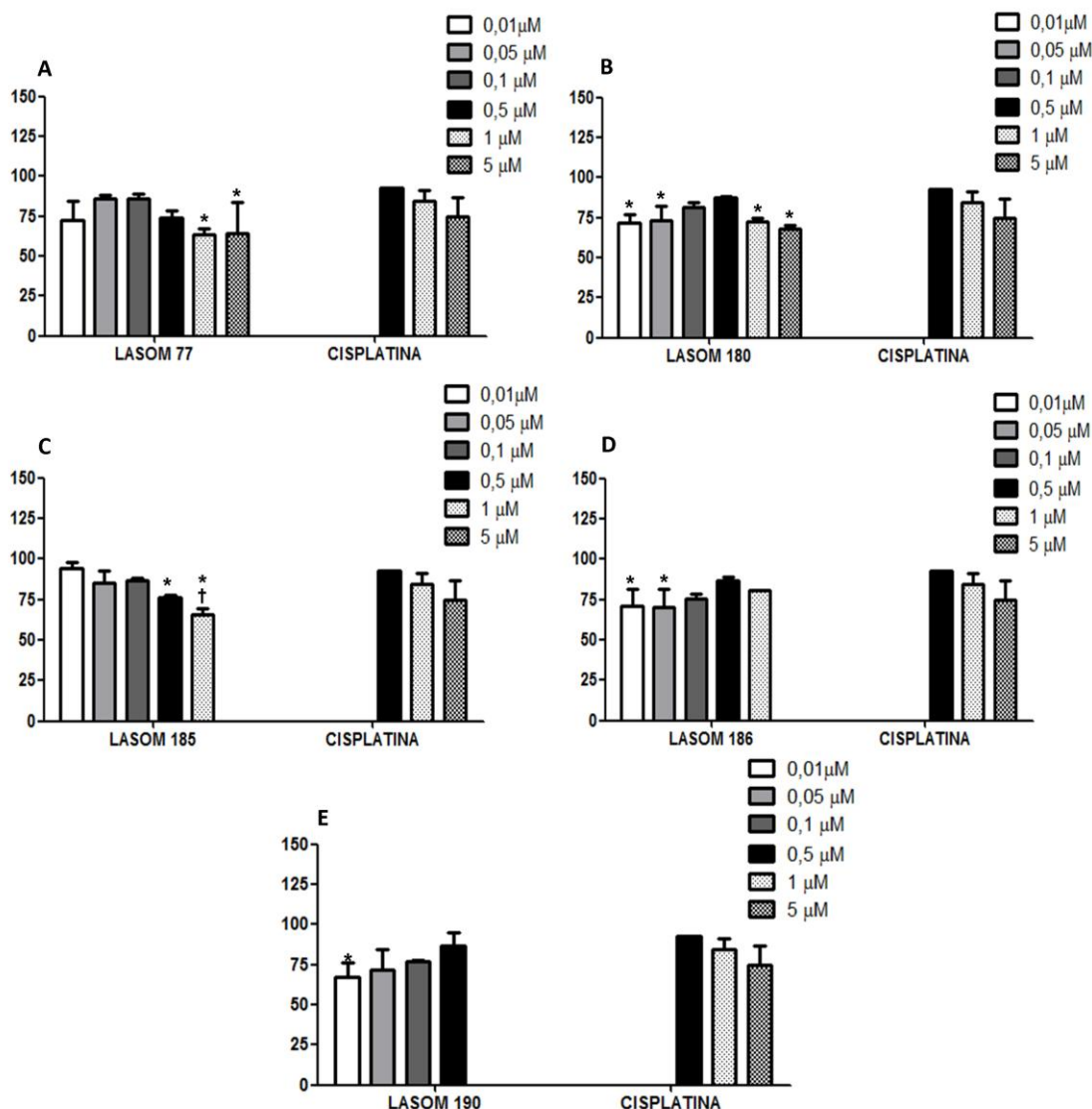


FIGURA 4 - Comparação de viabilidade celular através do ensaio de MTT na linhagem A549 entre diferentes concentrações das moléculas testadas em relação as da Cisplatina. (A) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 77 e de Cisplatina; (B) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 180 e de Cisplatina; (C) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 185 e de Cisplatina; (D) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 186 e de Cisplatina (E) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 190 e de Cisplatina. * Diferença significativa em relação à concentração 0,5 μM de Cisplatina ($p < 0,05$); † Diferença significativa em relação à concentração 1 μM de Cisplatina ($p < 0,05$).

3.2.2. Ensaio de dano celular (dosagem de LDH)

Os ensaios mais comuns para a estimativa da viabilidade e dano celular são baseados na integridade da membrana plasmática (Jurišić; Bumbaširević, 2008). A enzima LDH é um parâmetro largamente usado na toxicologia para diagnosticar dano celular e tecidual (Diamantino *et al.*, 2001), e diversos estudos mostram a confiabilidade do

ensaio para avaliação de citotoxicidade *in vitro* (Allen *et al.*, 1994; Evans; Clarke-Smith, 1991; Thomson *et al.*, 1991). A LDH está presente no citoplasma de todas as células de mamíferos e normalmente a membrana celular é impermeável à ela (Allen *et al.*, 1994), sendo liberada pela perda da integridade da membrana celular consequente ao processo de morte celular (Abe; Matsuki, 2000; Lobner, 2000).

O teste de avaliação de LDH é rápido, confiável e simples (Fotakis; Timbrell, 2006). O extravasamento de LDH a partir de células cultivadas depende do tipo de célula (tumoral ou normal), do número de células e do processo de separação utilizado. Além disso, a LDH extravasa consideravelmente mais em relação a outras enzimas intracelulares, e é útil, uma vez que representa o tipo de metabolismo anaeróbico celular de tumores (Jurišić; Bumbaširević, 2008).

O kit utilizado para dosagem de LDH (Doles, 2011) tem o princípio da metodologia de (Whitaker, 1969) com algumas modificações. Essa metodologia se mostra simples e prática, assim como alia as vantagens de um método espectrofotométrico com as facilidades instrumentais de um método fotolorimétrico. As concentrações de substrato e coenzima apresentavam-se otimizadas e os reagentes instáveis encontravam-se liofilizados para serem preparados no momento do uso. O kit apresenta dados de repetibilidade, reprodutibilidade, especificidade e sensibilidade com bons resultados. A técnica de Whitaker é específica para determinação da LDH, contudo, os fatores tempo e temperatura são decisivos para uma boa reprodutibilidade da metodologia. A queda de 1°C na temperatura de incubação condiciona uma diminuição de 7% na atividade da LDH. Um erro de 30 segundos leva a uma alteração de 10% na dosagem. Portanto, os tempos de incubação e pipetagem foram padronizados e o controle positivo (100% de lise) usado nos cálculos de dano celular foi analisado juntamente com as amostras para evitar erros metodológicos.

O ensaio para avaliação de dano celular através da quantificação da enzima LDH, após os tratamentos de 24h das diferentes concentrações das moléculas estudadas, revelou que o LaSOM 77, molécula precursora dos demais LaSOM, acarreta dano celular significativamente maior à linhagem sadia ($p < 0,05$). Em contraste aos resultados obtidos pelo ensaio do MTT, as menores concentrações de LaSOM 180 (0,01 e 0,05 μM) apresentaram uma tendência a produzir mais dano à linhagem sadia em relação à cancerígena, porém essa diferença não foi significativa ($p > 0,05$).

Os LaSOM 185, 186 e 190 revelaram dano significativamente maior à linhagem cancerígena em concentrações intermediárias do intervalo de valores testado ($p < 0,05$).

Na linhagem J774A1, todos os LaSOM acarretaram dano significativamente menor nas concentrações 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM e 5 μM em comparação com as mesmas concentrações de LaSOM 77 testadas nessa linhagem sadia ($p < 0,05$). Enquanto na linhagem A549, apenas os LaSOM 185 e 186 nas concentrações 0,1 μM , 0,5 μM e 1 μM e o LaSOM 190 nas concentrações 0,1 μM e 0,5 μM foram capazes de produzir um dano significativamente maior que as mesmas concentrações testadas da molécula precursora nessa linhagem cancerígena ($p < 0,05$) (Tabela IV).

TABELA IV – Teste de dano celular realizado em duas linhagens celulares J774A1 (macrófagos saudáveis) e A549 (adenocarcinoma pulmonar) e avaliado através da quantificação da enzima Lactato desidrogenase (LDH).

LaSOM		0,01	0,05	0,1	0,5	1	5
77	J774A1	102,26±29,29	94,93±25,72	87,64±27,89	86,44±20,67	110,49±25,45	99,15±5,13
	A549	55,60±0,57 [*]	53,43±4,72 [*]	42,18±4,70 [*]	42,02±0,96 [*]	43,39±0,39 [*]	49,02±0,54 [*]
180	J774A1	89,82±21,89	82,86±24,39	26,20±5,79†	36,56±4,94†	33,63±10,27†	41,72±7,67†
	A549	56,66±6,90	40,47±6,37	40,35±1,05	46,52±0,43	49,18±2,13	53,35±2,92
185	J774A1	72,20±15,87	86,96±14,14	37,54±3,73†	26,46±0,57†	38,92±6,37†	52,66±10,78†
	A549	—	—	58,21±1,11 ^{*#}	59,64±2,72 ^{*#}	60,78±6,45 ^{*#}	—
186	J774A1	70,41±15,94	66,54±0,86	41,45±0,86†	29,66±5,55†	28,75±7,07†	21,48±3,94†
	A549	50,32±2,60	57,46±1,52	82,55±1,66 ^{*#}	58,22±5,07 [#]	65,59±1,12 ^{*#}	—
190	J774A1	90,40±6,88	70,15±11,35	51,70±3,09†	40,38±1,17†	47,34±8,30†	53,11±5,08†
	A549	83,42±0,46 [#]	56,57±11,52	56,07±2,66 [#]	65,92±3,58 ^{*#}	—	—

Resultados expressos em porcentagem (média ±DP). A unidade das concentrações testadas é µM.

* Diferença significativa em relação à linhagem J774A1 (p<0,05).

† Diferença significativa em relação ao LaSOM 77 testado na mesma concentração para a linhagem J774A1 (p<0,05).

Diferença significativa em relação ao LaSOM 77 testado na mesma concentração para a linhagem A549 (p<0,05).

— Concentrações não testadas neste ensaio.

Na Figura 5, pode ser observado que os LaSOM 77 e 180 não apresentaram resultados relevantes na linhagem cancerígena frente ao antitumoral cisplatina (p>0,05). Por outro lado, corroborando com os ensaios de viabilidade pelo ensaio MTT, o ensaio de dano celular revelou que os LaSOM 185, 186 e 190 são capazes de promover dano significativamente maior na linhagem A549 em concentrações iguais ou menores que este antitumoral já bem descrito e amplamente utilizado na quimioterapia (p<0,05).

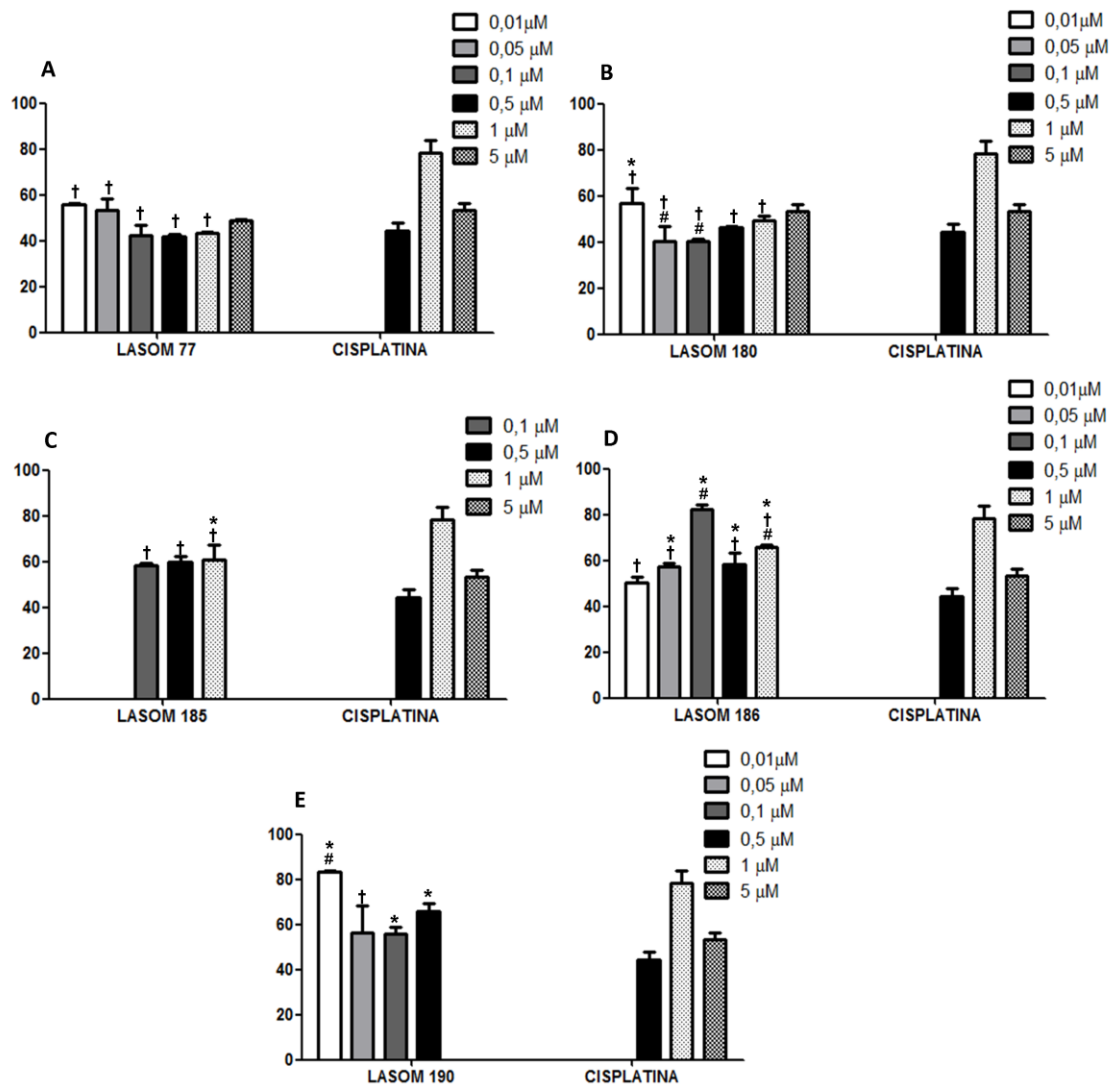


FIGURA 5 - Comparação do dano celular através da quantificação de LDH na linhagem A549 entre diferentes concentrações das moléculas testadas em relação às da Cisplatina. (A) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 77 e de Cisplatina; (B) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 180 e de Cisplatina; (C) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 185 e de Cisplatina; (D) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 186 e de Cisplatina (E) Comparação de todas as concentrações da LaSOM 190 e de Cisplatina. * Diferença significativa em relação à concentração 0,5 μM de Cisplatina ($p < 0,05$); † Diferença significativa em relação à concentração 1 μM de Cisplatina ($p < 0,05$); # Diferença significativa em relação à concentração 5 μM de Cisplatina ($p < 0,05$).

Ensaio de redução de tetrazólio (MTT) e ensaio para quantificação de lactato desidrogenase (LDH) extravasada são os métodos mais frequentemente utilizados para avaliar a viabilidade celular (Abe; Matsuki, 2000). Os dois ensaios podem ser realizados em conjunto, uma vez que mais de um ensaio deve ser usado para determinar a viabilidade celular em estudos *in vitro* para que aumente a confiabilidade dos resultados

obtidos (Fotakis; Timbrell, 2006). O ensaio do MTT se apresenta mais robusto e confiável, uma vez que os resultados da LDH obtidos pela metodologia aplicada sofrem consideráveis alterações com variações pequenas de temperatura e tempo de incubação.

LaSOM 77 é o precursor de todos os demais LaSOM e, quando este foi comparado aos LaSOM 180, 185, 186 e 190 nos ensaios realizados apresentou uma menor capacidade de reduzir a viabilidade da linhagem A549, bem como produziu dano celular significativamente maior na linhagem sadia em relação à cancerígena. O LaSOM 77 mostrou, inclusive, promover um dano celular significativamente maior em todas suas concentrações testadas na linhagem sadia, ao passo que os LaSOM 185, 186 e 190, em pelo menos duas de suas concentrações, acarretaram dano celular significativamente maior na linhagem cancerígena.

Esses resultados encontrados para o precursor LaSOM 77 em relação aos 4 híbridos significa que o triazol realmente agrega em relação à interação com o alvo biológico, provavelmente através da realização de ligações de hidrogênio com os aminoácidos do sítio de ligação da proteína.

As diferenças estruturais e comparação das atividades entre os quatro híbridos podem ser feitas da seguinte forma: o LaSOM 180 pode receber ou doar próton em ligações de hidrogênio com os aminoácidos do sítio de ligação da proteína; LaSOM 185 trata-se de um dímero de cumarina e, sua maior atividade se explicaria, por exemplo, através da interação deste segundo núcleo de cumarina com os aminoácidos do sítio de ligação da proteína; o LaSOM 186 possui uma isoindolina-1,3-diona e, portanto, pode realizar interação aromática ou receber prótons em ligações de hidrogênio com os aminoácidos do sítio de ligação da proteína; e, por fim, o LaSOM 190 pode realizar interação aromática com os aminoácidos do sítio de ligação da proteína.

Mais estudos *in vitro* envolvendo mecanismo de morte celular, especificidade e seletividade à PDK-1 das moléculas LaSOM 185, 186 e 190 são necessários, uma vez que, de acordo com este *screening* realizado, estas moléculas se mostraram ser as mais promissoras na linhagem de adenocarcinoma pulmonar. Assim, compostos que apresentem grupos farmacofóricos semelhantes a elas podem ser modelados e sintetizados, visando uma maior potência que a cisplatina.

4. CONCLUSÕES

A linhagem A549 apresentou significativa sensibilidade a todas as moléculas em diferentes concentrações testadas, revelando viabilidade significativamente menor nesta linhagem, na qual a viabilidade celular da linhagem J774A1, praticamente, não foi afetada.

O LaSOM 180 apresentou diferentes resultados nos dois ensaios realizados entre as duas linhagens, uma vez que foi capaz de reduzir significativamente mais a viabilidade da linhagem cancerígena nas suas concentrações mais baixas testadas, porém estas mesmas concentrações apresentaram uma tendência (não significativa) a produzir maior dano na linhagem sadia. O LaSOM 180 também não se mostrou promissor quando comparado ao precursor LaSOM 77 e ao antitumoral cisplatina.

Em decorrência da sua maior eficácia na linhagem cancerígena e menor toxicidade na linhagem sadia testada, mais estudos são necessários para avaliar, por exemplo, a especificidade e seletividade das LaSOM 185, 186 e 190 em relação a PDK-1, assim como o mecanismo de morte envolvido sobre estas linhagens. O nanoencapsulamento dessas moléculas também é uma alternativa válida como tentativa para aumentar a potência antitumoral e reduzir a toxicidade às células sadias que também ficam expostas aos quimioterápicos.

5. AGRADECIMENTOS

Suporte Financeiro: INCT, Pronex, Pronem, CNPQ e FAPERGS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe, K.; Matsuki, N. "Measurement of cellular 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT." **Neuroscience research**, v. 38, n. 4, p. 325-329, 2000.
- Alberg, A. J.; Brock, M. V.; Samet, J. M. "Epidemiology of lung cancer: looking to the future." **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 14, p. 3175-3185, 2005.
- Allen, M.; Millett, P.; Dawes, E.; Rushton, N. "Lactate dehydrogenase activity as a rapid and sensitive test for the quantification of cell numbers *in vitro*." **Clinical materials**, v. 16, n. 4, p. 189-194, 1994.
- Andriani, F.; Perego, P.; Carenini, N.; Sozzi, G.; Roz, L. "Increased sensitivity to cisplatin in non-small cell lung cancer cell lines after FHIT gene transfer." **Neoplasia**, v. 8, n. 1, p. 9-17, 2006.
- Bandera, E. V.; Freudenheim, J. L.; Marshall, J. R.; Zielezny, M.; Priore, R. L.; Brasure, J.; Baptiste, M.; Graham, S. "Diet and alcohol consumption and lung cancer risk in the New York State Cohort (United States)." **Cancer causes & control**, v. 8, n. 6, p. 828-840, 1997.
- Boffetta, P.; Jourenkova, N.; Gustavsson, P. "Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons." **Cancer causes & control**, v. 8, n. 3, p. 444-472, 1997.
- Brooijmans, N.; Kuntz, I. D. "Molecular recognition and docking algorithms." **Annual review of biophysics and biomolecular structure**, v. 32, n. 1, p. 335-373, 2003.
- Brown, C. H.; Baidas, S. M.; Hajdenberg, J. J.; Kayaleh, O. R.; Pennock, G. K.; Shah, N. C.; Tseng, J. E. "Lifestyle interventions in the prevention and treatment of cancer." **American Journal of Lifestyle Medicine**, 2009.
- Dewar, M. J.; Zoebisch, E. G.; Healy, E. F.; Stewart, J. J. "Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model." **Journal of the American Chemical Society**, v. 107, n. 13, p. 3902-3909, 1985.

- Diamantino, T. C.; Almeida, E.; Soares, A. M.; Guilhermino, L. "Lactate dehydrogenase activity as an effect criterion in toxicity tests with *Daphnia magna* straus." **Chemosphere**, v. 45, n. 4, p. 553-560, 2001.
- Doles, R. E. P. L. Desidrogenase Láctica (DHL). Goiânia - GO – Brasil, p. Instruções de Uso do Kit, 2011. Disponível em: <http://www.doles.com.br/produtos/instrucoes/DHL.pdf>. Acesso em: 20 de junho.
- Duarte, R. L. D. M.; Paschoal, M. E. M. "Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking." **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, n. 1, p. 56-65, 2006.
- Erlanson, D. A.; Arndt, J. W.; Cancilla, M. T.; Cao, K.; Elling, R. A.; English, N.; Friedman, J.; Hansen, S. K.; Hession, C.; Joseph, I. "Discovery of a potent and highly selective PDK1 inhibitor via fragment-based drug discovery." **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 21, n. 10, p. 3078-3083, 2011.
- Evans, E.; Clarke-Smith, E. "Studies on the mechanism of cell damage by finely ground hydroxyapatite particles *in vitro*." **Clinical materials**, v. 7, n. 3, p. 241-245, 1991.
- Falasca, M.; Chiozzotto, D.; Godage, H.; Mazzeletti, M.; Riley, A.; Previdi, S.; Potter, B.; Broggin, M.; Maffucci, T. "A novel inhibitor of the PI3K/Akt pathway based on the structure of inositol 1, 3, 4, 5, 6-pentakisphosphate." **British journal of cancer**, v. 102, n. 1, p. 104-114, 2010.
- Fotakis, G.; Timbrell, J. A. "In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride." **Toxicology letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.
- Fyffe, C.; Falasca, M. "3-Phosphoinositide-dependent protein kinase-1 as an emerging target in the management of breast cancer." **Cancer management and research**, v. 5, p. 271, 2013.
- Gasteiger, J.; Rudolph, C.; Sadowski, J. "Automatic generation of 3D-atomic coordinates for organic molecules." **Tetrahedron Computer Methodology**, v. 3, n. 6, p. 537-547, 1990.
- Hecht, S. S. "Tobacco smoke carcinogens and lung cancer." **Journal of the National Cancer Institute**, v. 91, n. 14, p. 1194-1210, 1999.
- Islam, I.; Brown, G.; Bryant, J.; Hrvatin, P.; Kochanny, M. J.; Phillips, G. B.; Yuan, S.; Adler, M.; Whitlow, M.; Lentz, D. "Indolinone based phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors. Part 2: Optimization of BX-517." **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 14, p. 3819-3825, 2007.
- Islam, I.; Bryant, J.; Chou, Y.-L.; Kochanny, M. J.; Lee, W.; Phillips, G. B.; Yu, H.; Adler, M.; Whitlow, M.; Ho, E. "Indolinone based phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) inhibitors. Part 1: Design, synthesis and biological activity." **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 17, n. 14, p. 3814-3818, 2007.

- Jurišić, V.; Bumbaširević, V. "In vitro assays for cell death determination." **Archive of Oncology**, v. 16, 2008.
- Knekt, P.; Järvinen, R.; Seppänen, R.; Heliövaara, M.; Teppo, L.; Pukkala, E.; Aromaa, A. "Dietary flavonoids and the risk of lung cancer and other malignant neoplasms." **American Journal of Epidemiology**, v. 146, n. 3, p. 223-230, 1997.
- Liu, X.; Ouyang, S.; Yu, B.; Liu, Y.; Huang, K.; Gong, J.; Zheng, S.; Li, Z.; Li, H.; Jiang, H. "PharmMapper server: a web server for potential drug target identification using pharmacophore mapping approach." **Nucleic acids research**, v. 38, n. suppl 2, p. W609-W614, 2010.
- Lobner, D. "Comparison of the LDH and MTT assays for quantifying cell death: validity for neuronal apoptosis?" **Journal of neuroscience methods**, v. 96, n. 2, p. 147-152, 2000.
- Meng, X.-Y.; Zhang, H.-X.; Mezei, M.; Cui, M. "Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery." **Current computer-aided drug design**, v. 7, n. 2, p. 146, 2011.
- Molina, J. R.; Adjei, A. A.; Jett, J. R. "Advances in chemotherapy of non-small cell lung cancer." **Chest Journal**, v. 130, n. 4, p. 1211-1219, 2006.
- Morris, G. M.; Goodsell, D. S.; Halliday, R. S.; Huey, R.; Hart, W. E.; Belew, R. K.; Olson, A. J. "Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function." **Journal of computational chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639-1662, 1998.
- Osaki, M.; Oshimura, M. A.; Ito, H. "PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer." **Apoptosis**, v. 9, n. 6, p. 667-676, 2004.
- Pearce, L. R.; Komander, D.; Alessi, D. R. "The nuts and bolts of AGC protein kinases." **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2010.
- Peto, R.; Darby, S.; Deo, H.; Silcocks, P.; Whitley, E.; Doll, R. "Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies." **BMJ**, v. 321, n. 7257, p. 323-329, 2000.
- Peto, R.; Lopez, A. D.; Boreham, J.; Thun, M. "Mortality from smoking in developed countries 1950– 2005 (or later)." **Population**, v. 251351, n. 103074, p. 112996, 2012.
- Qin, L. F.; Ng, I. O. "Induction of apoptosis by cisplatin and its effect on cell cycle-related proteins and cell cycle changes in hepatoma cells." **Cancer letters**, v. 175, n. 1, p. 27-38, 2002.
- Raimondi, C.; Falasca, M. "Targeting PDK1 in cancer." **Current medicinal chemistry**, v. 18, n. 18, p. 2763-2769, 2011.

- Riss, T.; Moravec, R.; Niles, A.; Benink, H.; Worzella, T.; Minor, L. "Cell Viability Assays." 2004.
- Sadowski, J.; Gasteiger, J.; Klebe, G. "Comparison of automatic three-dimensional model builders using 639 X-ray structures." **Journal of chemical information and computer sciences**, v. 34, n. 4, p. 1000-1008, 1994.
- Sasco, A.; Secretan, M.; Straif, K. "Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence." **Lung cancer**, v. 45, p. S3-S9, 2004.
- Siegel, R.; Naishadham, D.; Jemal, A. "Cancer statistics, 2013." **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.
- Speizer, F.; Colditz, G.; Hunter, D.; Rosner, B.; Hennekens, C. "Prospective study of smoking, antioxidant intake, and lung cancer in middle-aged women (USA)." **Cancer causes & control**, v. 10, n. 5, p. 475-482, 1999.
- Stewart, B. W.; Kleihues, P.; "Cancer, I. a. F. R. O." **World cancer report**. IARC press Lyon, 2003.
- Thompson, M. "Molecular docking using ArgusLab, an efficient shape-based search algorithm and the AScore scoring function." ACS meeting, Philadelphia, 2004. p.42.
- Thomson, L.; Law, F.; James, K.; Rushton, N. "Biocompatibility of particles of GORE-TEX® cruciate ligament prosthesis: an investigation both, *in vitro* and *in vivo*." **Biomaterials**, v. 12, n. 8, p. 781-785, 1991.
- Tosco, P.; Balle, T.; Shiri, F. "Open3DALIGN: an open-source software aimed at unsupervised ligand alignment." **Journal of computer-aided molecular design**, v. 25, n. 8, p. 777-783, 2011.
- Tyczynski, J. E.; Bray, F.; Maxwell Parkin, D. "Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection." **The lancet oncology**, v. 4, n. 1, p. 45-55, 2003.
- Ulukaya, E.; Ozdikicioglu, F.; Oral, A. Y.; Demirci, M. "The MTT assay yields a relatively lower result of growth inhibition than the ATP assay depending on the chemotherapeutic drugs tested." **Toxicology in vitro**, v. 22, n. 1, p. 232-239, 2008.
- Vara, J. Á. F.; Casado, E.; De Castro, J.; Cejas, P.; Belda-Iniesta, C.; González-Barón, M. "PI3K/Akt signalling pathway and cancer." **Cancer treatment reviews**, v. 30, n. 2, p. 193-204, 2004.
- Vivanco, I.; Sawyers, C. L. "The phosphatidylinositol 3-kinase–AKT pathway in human cancer." **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 7, p. 489-501, 2002.
- Whitaker, J. "A general colorimetric procedure for the estimation of enzymes which are linked to the NADH/NAD⁺ system." **Clinica Chimica Acta**, v. 24, n. 1, p. 23-37, 1969.

Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M. N. "TOR signaling in growth and metabolism." **Cell**, v. 124, n. 3, p. 471-484, 2006.

Zhang, J.; Chiu, J.; Zhang, H.; Qi, T.; Tang, Q.; Ma, K.; Lu, H.; Li, G. "Autophagic cell death induced by resveratrol depends on the Ca^{2+} /AMPK/mTOR pathway in A549 cells." **Biochemical pharmacology**, v. 86, n. 2, p. 317-328, 2013.

Ziegler, R. G.; Mayne, S. T.; Swanson, C. A. "Nutrition and lung cancer." **Cancer causes & control**, v. 7, n. 1, p. 157-177, 1996.

**Anexo – Normas para formatação e preparação de manuscritos segundo a Revista
Brasileira de Ciências Farmacêuticas**

Instruções para apresentação dos trabalhos

1. Estrutura dos originais

1.1. Cabeçalho: constituído por:

- Título do trabalho: deve ser breve e indicativo da exata finalidade do trabalho.
- Autor(es) por extenso, indicando a(s) instituição(ões) a(s) qual(is) pertence(m) mediante números. O autor para correspondência deve ser identificado com asterisco, fornecendo o endereço completo, incluindo o eletrônico. Estas informações devem constar em notas de rodapé.

1.2 Resumo (em português): deve apresentar a condensação do conteúdo, expondo metodologia, resultados e conclusões, não excedendo 200 palavras. Os membros da Comissão poderão auxiliar autores que não são fluentes em português.

1.3 Unitermos: devem representar o conteúdo do artigo, evitando-se os de natureza genérica e observando o limite máximo de 6(seis) unitermos.

1.4 Introdução: deve estabelecer com clareza o objetivo do trabalho e sua relação com outros trabalhos no mesmo campo. Extensas revisões de literatura devem ser substituídas por referências aos trabalhos bibliográficos mais recentes, onde tais revisões tenham sido apresentadas.

1.5 Material e Métodos: a descrição dos métodos usados deve ser breve, porém suficientemente clara para possibilitar a perfeita compreensão e repetição do trabalho. Processos e Técnicas já publicados, a menos que tenham sido extensamente modificados, devem ser apenas referidos por citação. Estudos em humanos devem fazer referência à aprovação do Comitê de Ética correspondente.

1.6 Resultados e Discussão: deverão ser acompanhados de tabelas e material ilustrativo adequado, devendo se restringir ao significado dos dados obtidos e resultados alcançados. É facultativa a apresentação desses itens em separado.

1.7 Conclusões: Quando pertinentes, devem ser fundamentadas no texto.

1.8 Resumo em inglês (ABSTRACT): deve acompanhar o conteúdo do resumo em português.

1.9 Unitermos em inglês: devem acompanhar os unitermos em português.

1.10 Agradecimentos: devem constar de parágrafos, à parte, antecedendo as referências bibliográficas.

1.11 Referências: devem ser organizadas de acordo com as normas da ABNT NBR-6023, ordenadas alfabeticamente no fim do artigo incluindo os nomes de todos os autores.

A exatidão das referências é de responsabilidade dos autores.

2. Apresentação dos originais

Os trabalhos devem ser apresentados em lauda padrão (de 30 a 36 linhas com espaço duplo). Utilizar Programa Word for Windows. Os autores devem encaminhar o trabalho acompanhado de carta assinada pelo autor de correspondência, que se responsabilizará pela transferência dos direitos à RBCF.

3. Informações adicionais

3.1 Citação bibliográfica: As citações bibliográficas devem ser apresentadas no texto pelo(s) nome(s) do(s) autor(es), com apenas a inicial em maiúsculo e seguida do ano de publicação. No caso de haver mais de três autores, citar o primeiro e acrescentar a expressão et al. (*em itálico*)

3.2 Ilustrações: As ilustrações (gráficos, tabelas, fórmulas químicas, equações, mapas, figuras, fotografias, etc) devem ser incluídas no texto, o mais próximo possível das respectivas citações. Mapas, figuras e fotografias devem ser, também, apresentados em arquivos separados e reproduzidas em alta resolução(800 dpi/bitmap para traços) com extensão tif. e/ou bmp. No caso de não ser possível a entrega do arquivo eletrônico das figuras, os originais devem ser enviados em papel vegetal ou impressora a laser.

Ilustrações coloridas somente serão publicadas mediante pagamento pelos autores.

As tabelas devem ser numeradas consecutivamente em algarismos romanos e as figuras em algarismos arábicos, seguidos do título. As palavras TABELA e FIGURA devem aparecer em maiúsculas na apresentação no texto e na citação com apenas a inicial em maiúsculo.

3.3 Nomenclatura: pesos, medidas, nomes de plantas, animais e substâncias químicas devem estar de acordo com as regras internacionais de nomenclatura. A grafia dos nomes de fármacos deve seguir, no caso de artigos nacionais, as Denominações Comuns Brasileiras (DCB) em vigor, podendo ser mencionados uma vez (entre parênteses, com inicial maiúscula) os registrados.