



PLANEJAMENTO E AVALIAÇÃO FARMACODINÂMICA E FARMACOCINÉTICA *IN SILICO* DO ÁCIDO (E)-2-(1'-(BENZILIDENOAMINO)-4'-CIANO-5'-OXO-1',5'-DIHIDRO-10H-ESPIRO[ACRIDINA-9,2'-PIRROL]-10-IL)-ACÉTICO COM POTENCIAL AÇÃO PARA CÂNCER COLORRETAL

Design and in silico Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Evaluation Of (E)-2-(1'-(benzylideneamino)-4'-cyano-5'-oxo-1',5'-dihydro-10H-spiro[acridine-9,2'-pyrrol]-10-yl)-acetic acid with Potential Action for Colorectal Cancer

Misael de Azevedo Teotônio Cavalcanti¹, Analara Cordeiro de Macedo¹, Ricardo Olímpio de Moura¹

¹ Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande - PB, Brasil.

*Misael de Azevedo: misaelazevedo.2015@gmail.com

RESUMO

O câncer colorretal é um distúrbio do crescimento de células epiteliais do revestimento do cólon ou reto e, dentre os diversos tipos de câncer, ocupa terceira posição em incidência e segunda em mortalidade. A transformação de células epiteliais normais do cólon em pólipos adenomatosos sofre influência epigenética e é regulada por enzimas Histona Desacetilases (HDAC), bem como está relacionada à ativação do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR). Porém, existem poucas opções de tratamento e, por isso, a busca por novos fármacos é imprescindível. Nesse sentido, os derivados acridínicos constituem uma boa alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos. Assim, esse estudo teve como objetivo avaliar os perfis farmacodinâmico e farmacocinético de um novo derivado espiro-acridínico ácido, o AMTAC-01AC, planejado a partir do AMTAC-01, um derivado



acridínico que demonstrou atividade *in vitro* para câncer de cólon. Para isso, foram feitos estudos *in silico* com o AMTAC-01 e seu derivado ácido, utilizando ancoramento molecular e servidores web. Como resultado, o novo composto exibiu afinidade e potência superiores a fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), com os alvos HDAC8 e EGFR, bem como realizou mais interações de hidrogênio que as outras moléculas, com destaque para interações feitas pelo resíduo ácido, evidenciando que a modificação molecular foi favorável. Além disso, os derivados também exibiram farmacocinética adequada aos padrões de fármacos comerciais. Portanto, o AMTAC-01AC mostrou-se promissor para o tratamento de câncer colorretal, com alta afinidade e potência para dois alvos terapêuticos relevantes e ótimos parâmetros farmacocinéticos e de *drug-likeness*.

Palavras-chave: Derivados Espiro-Acridínicos; Câncer Colorretal; *In silico*; Simulação de Acoplamento Molecular; Farmacocinética.

ABSTRACT

Colorectal cancer is a disorder of the growth of epithelial cells in the lining of the colon or rectum and, among the different types of cancer, it ranks third in incidence and second in mortality. The transformation of normal colonic epithelial cells into adenomatous polyps is epigenetic influenced and regulated by Histone Deacetylases (HDAC) enzymes, as well as being related to the activation of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). However, there are few treatment options and, therefore, the search for new drugs is essential. In this regard, acridine derivatives are a good alternative for the development of new drugs. Thus, this study aimed to evaluate the pharmacodynamic and pharmacokinetic profiles of a new spiro-acridine acid derivative, AMTAC-01AC, based on AMTAC-01, an acridine derivative that has demonstrated *in vitro* activity against colon cancer. For this, *in silico* studies were carried out with AMTAC-01 and its acid derivative, using molecular docking and web services. As a result, the new compound exhibited superior affinity and potency to drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA), with the targets HDAC8 and EGFR, as well as performed more hydrogen interactions than the other molecules, with emphasis



on interactions made by the acid residue, showing that the molecular modification was favorable. Furthermore, the derivatives also exhibited pharmacokinetics adequate to commercial drug standards. Therefore, AMTAC-01AC has shown to be promising for the treatment of colorectal cancer, with high affinity and potency for two relevant therapeutic targets and excellent pharmacokinetic and drug-likeness parameters.

Keywords: Spiro-Acridinic Derivatives; Colorectal Cancer; *In silico*; Molecular Docking Simulation; Pharmacokinetics.

INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como um conjunto de mais de 100 doenças relacionadas ao crescimento desorganizado de células capazes de se disseminar entre tecidos e órgãos vizinhos ao local afetado inicialmente (BATISTA *et al.*, 2015). Dessa forma, o câncer está associado à excessiva sinalização proliferativa, evasão de inibidores do crescimento, imortalidade replicativa, resistência à morte celular, instabilidade e mutação do DNA, indução de angiogênese, metástase, entre outras características (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Conforme o *Global Cancer Observatory*, o câncer é a primeira ou a segunda causa de morte em indivíduos com menos de 70 anos, estando presente em 112 de 183 países. Além disso, estima-se que houve cerca de 19,3 milhões de novos casos e quase 10 milhões de mortes por câncer, mundialmente, no ano de 2020. Dentre os diversos tipos, o câncer colorretal ocupa a terceira posição em incidência e a segunda em mortalidade (Gráfico 1), apresentando mais de 1,9 milhão de novos casos e 935 mil mortes, em 2020, o que representa cerca de 1 a cada 10 casos e mortes por câncer (SUNG *et al.*, 2021). Ademais, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer, os indivíduos mais afetados pelo câncer colorretal são adultos acima de 60 anos de idade (INCA, 2019).

Gráfico 1: Incidência e Mortalidade para os Principais Tipos de Câncer em 2020



Fonte: Adaptado de SUNG *et al.* (2021)

O câncer colorretal é um distúrbio do crescimento de células epiteliais do revestimento do cólon ou reto, que pode progredir para os linfonodos e os músculos adjacentes (BHASKARAN & KUMAR, 2021). A transformação de células epiteliais normais do cólon em pólipos adenomatosos sofre bastante influência de alterações epigenéticas e é regulada por enzimas Histona Desacetilases (HDAC). Dentre as isoformas existentes, a HDAC8 é predominante no câncer de cólon, no qual se apresenta em níveis mais elevados do que em tecidos saudáveis, e estudos relataram que sua inativação inibiu a proliferação do câncer de cólon (BISWAS *et al.*, 2018). Além disso, a enzima HDAC8 foi associada à regulação da atividade do gene do Fator Modificador de Bcl-2, uma proteína que promove a apoptose de células. Portanto, inibidores dessa enzima podem ser uma boa alternativa para o tratamento do câncer de cólon e de reto (KANG *et al.*, 2014).

Ademais, fatores de crescimento também estão relacionados ao câncer e, dentre eles, o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) é um alvo amplamente presente no câncer de cólon. Este é um receptor transmembrana tirosina quinase e sua via de sinalização estimula a proliferação, o crescimento, a diferenciação, a angiogênese e a metástase de células epidérmicas, por meio da ativação das vias MAPK/ERK, JAK/STAT e PI3K/AKT. Nesse sentido, o EGFR promove a expressão de genes relacionados à mitose e sobrevivência celular no câncer colorretal (SHANMUGAPRIYA *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2018).

Para o tratamento de câncer de cólon, além de cirurgia e radioterapia, existem muitos quimioterápicos, porém, estes, geralmente, não aumentam as chances de sobrevivência dos pacientes. Isso se deve ao desenvolvimento de mecanismos de resistência dos tumores, como



a superexpressão de bombas de efluxo dependentes de ATP, que impedem a chegada do fármaco à biofase. Além disso, muitos quimioterápicos têm pouca especificidade, levando a graves efeitos adversos (BHASKARAN & KUMAR, 2021). Sendo assim, é essencial desenvolver novos candidatos a fármacos como terapia alternativa (BISWAS *et al.*, 2018).

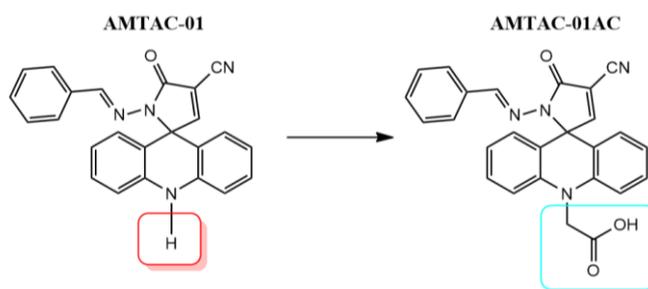
Nesse sentido, a indústria farmacêutica utiliza ferramentas potentes de química medicinal para estudar as relações estrutura-atividade (*Structure Activity Relationship – SAR*), bem como os perfis farmacodinâmico e farmacocinético. Com o advento da cristalografia de raios-X e da ressonância magnética nuclear, foi possível elucidar a estrutura de vários alvos e compreender o reconhecimento molecular, permitindo o surgimento do desenvolvimento de fármacos baseado na estrutura do alvo (*Structure Based Drug Design – SBDD*) (FERREIRA *et al.*, 2015).

O SBDD utiliza ferramentas computacionais, como ancoramento molecular, para analisar a energia de ligação, as interações envolvidas no reconhecimento de uma molécula por seu alvo e as mudanças conformacionais induzidas por ligante. O ancoramento prevê, com boa precisão, a conformação de micromoléculas dentro do sítio ativo de um alvo apropriado e classifica compostos conforme sua afinidade de ligação. Para isso, são exploradas várias conformações e potenciais modos de ligação, seguidas de predição da energia de interação, através de funções de pontuação específicas (FERREIRA *et al.*, 2015).

Já em relação a novos candidatos a fármacos, a acridina consiste em um núcleo heterocíclico presente em fármacos com várias atividades (KUMAR *et al.*, 2012), dentre os quais pode-se destacar a Amsacrina, agente anticâncer ativo contra leucemias e linfomas. Muitas estratégias de planejamento de novos derivados acridínicos já foram feitas, como, por exemplo, a síntese do protótipo AMTAC-01 ou (E)-1'-(benzilidenoamino)-5'-oxo-1',5'-dihidro-10H-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-4'-carbonitrila, com a introdução do grupo 2-ciano-N-acilidrazona entre a acridina e o anel benzilidênico, seguido de ciclização espontânea para formar o grupo espiro. Esse composto teve bons resultados de citotoxicidade contra a linhagem de câncer de cólon HT-29, demonstrando concentração de 6,72 μM para inibir 50% do crescimento celular (GI_{50}) (ALMEIDA *et al.*, 2016).

Além disso, estudos associaram a conjugação de aminoácidos a *scaffolds* biologicamente ativos com excelentes resultados, como baixa toxicidade, moderada potência e ótimas propriedades farmacocinéticas, incluindo compostos com atividade anticâncer (RAKESH *et al.*, 2019). Assim, tendo em vista que aminoácidos possuem o grupo ácido carboxílico, foi feito o planejamento de um derivado espiro-acridínico contendo um resíduo de ácido acético. Para isso, foi feita uma expansão molecular associada a um bioisosterismo não clássico, através da substituição do hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel acridínico por um resíduo de ácido acético, produzindo o Ácido (E)-2-(1'-(benzilidenoamino)-4'-ciano-5'-oxo-1',5'-dihidro-10h-espiro[acridina-9,2'-pirrol]-10-il)-acético (AMTAC-01AC) a partir do protótipo AMTAC-01 (Figura 1). Após isso, foi feita a avaliação farmacodinâmica e farmacocinética *in silico* do protótipo AMTAC-01 e seu derivado ácido AMTAC-01AC, por meio de ancoramento molecular e serviços web gratuitos, respectivamente.

Figura 1: Planejamento do AMTAC-01AC por Bioisosterismo Não Clássico



Fonte: Aatoria (2021)

METODOLOGIA

Análise *in silico* do perfil farmacodinâmico (ancoramento molecular)

Foi feito o ancoramento molecular com os compostos AMTAC-01 e AMTAC-01AC. O primeiro já havia sido sintetizado pelo nosso grupo de pesquisa e foi planejado com base na estrutura do fármaco Amsacrina, inserindo a 2-ciano-N-acilidrazona entre a acridina e o anel benzilidênico, com subsequente ciclização espontânea e formação do grupo espiro. Tendo em vista que essa molécula apresentou atividade citotóxica *in vitro* contra câncer de cólon (Almeida *et al.*, 2016), foi feito o planejamento de um novo derivado espiro-acridínico,



o AMTAC-01AC, através de expansão molecular e bioisosterismo não clássico, substituindo o hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel acridínico por um resíduo de ácido acético. Sendo assim, utilizando o software ChemDraw Ultra 12.0, foram desenhadas as estruturas das moléculas e, através do Chem3D, foi feita uma minimização de energia, pelo método de mecânica molecular mínima e utilizando o campo de força MM2 (ALLINGER, 1977).

As estruturas dos alvos HDAC8 (PDB ID: 1T69) e EGFR (PDB ID: 4HJO) foram obtidas do *Protein Data Bank* (PDB) e carregadas no *PyMol* 2.4.1, para remover moléculas de água e ligantes co-cristalizados. Em seguida, foram carregados os alvos no *AutoDock Tools* (MORRIS *et al.*, 2009), para a adição de hidrogênios e cargas de Gasteiger, além da mesclagem de hidrogênios não polares. As simulações de ancoramento foram feitas com a identificação do sítio ativo dos alvos, nas coordenadas de 30,300, -3,208 e -13,210 Å para a enzima HDAC8 e 24,407, 9,151 e -0,636 Å para o receptor EGFR. O espaçamento utilizado foi de 0,315 Å e os eixos X, Y e Z com dimensões 40 x 40 x 40 Å. Além disso, para HDAC8, foi adicionada a carga +2 do íon zinco, manualmente.

Após localizar o sítio ativo, o ancoramento foi desenvolvido com o *AutoDock* 4.2, com 100 operações de algoritmo genético Lamarckiano e nos parâmetros padrões do *AutoDock Tools*. Com isso, foram gerados valores de Energia Livre de Ligação (ΔG) e Constante Inibitória (K_i), sendo salvas as conformações com menor valor de ΔG . Por fim, no *Discovery Studio* (BIOVIA, 2021), os resultados foram analisados, determinando regiões de ligação dos alvos com as moléculas, tipos de interação e aminoácidos do sítio ativo que participam das ligações. Para a validação da metodologia, através de *reancoramento molecular*, foi selecionada a conformação do ligante com menor valor de Desvio Quadrático Médio (RMSD) das distâncias entre os átomos e abaixo de 2,0 Å (BELL & ZHANG, 2019).

Análise *in silico* do perfil farmacocinético

Para análise farmacocinética dos compostos, foram feitas predições de parâmetros importantes de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Eliminação, utilizando os serviços

web SwissADME (DAINA *et al.*, 2017), pkCSM (PIRES *et al.*, 2015) e ADMETlab 2.0 (XIONG *et al.*, 2021). Assim, foram preditas propriedades de Lipofilicidade, *Drug-likeness*, Absorção Intestinal, Resistência a Fármacos, Volume de Distribuição, Permeabilidade por Barreira Hematoencefálica, Metabolismo por CYP450 e *Clearance* Renal.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise *in silico* do perfil farmacodinâmico (ancoramento molecular)

Ambos os ligantes Vorinostat e Erlotinibe exibiram disposições espaciais semelhantes ao ligante co-cristalizado e suas melhores conformações preditas demonstraram valores de RMSD de 1,47 Å e 0,42 Å, respectivamente, ambos abaixo de 2,0 Å, validando a metodologia. Porém, apresentaram algumas diferenças, principalmente entre as ligações sigma, tendo em vista que estas são mais flexíveis que as ligações pi.

Após a validação da metodologia, foi feito o ancoramento do AMTAC-01 e do AMTAC-01AC com a enzima Histona Desacetilase 8, resultando nos seguintes valores de energia livre de ligação (ΔG) e constantes inibitórias estimadas (K_i), presentes na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados de ancoramento dos compostos com HDAC8 (PDB ID: 1T69)

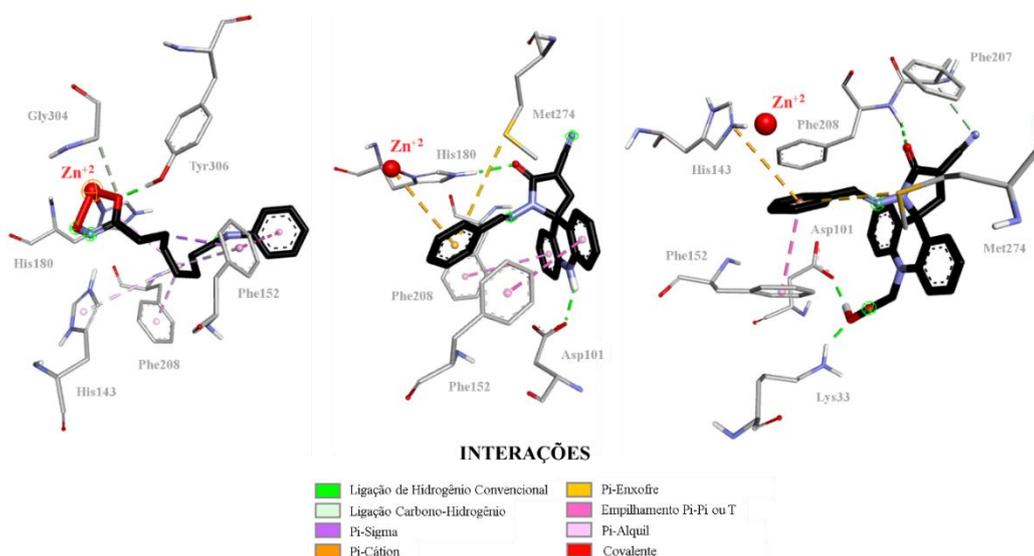
Moléculas	Energia Livre (ΔG)	Constante de Inibição (K_i)
AMTAC-01	-7,88 kcal/mol	1,68 μM
AMTAC-01AC	-8,08 kcal/mol	1,20 μM
Vorinostat	-6,69 kcal/mol	12,51 μM

Fonte: Aatoria (2021)

Ambas as moléculas demonstraram maior afinidade e potência pelo alvo HDAC8, em relação ao Vorinostat, fármaco aprovado pela FDA. Porém, o AMTAC-01AC exibiu menor valor de energia livre de ligação (ΔG) e de constante de inibição (K_i) em comparação com o AMTAC-01, demonstrando maior afinidade e potência que este, uma vez que valores negativos de ΔG determinam maior estabilidade para o complexo ligante-receptor. Já a constante K_i é inversamente proporcional à intensidade das ligações de uma molécula por seu alvo e, conseqüentemente, à sua potência (DU *et al.*, 2016; BURLINGHAM &

WIDLANSKI *et al.*, 2003). Ademais, foi possível também visualizar as interações nos complexos receptor-ligante, e as distâncias entre os aminoácidos e as moléculas (Figura 3).

Figura 3: Diagramas 3D das interações do Vorinostat (esquerda), do AMTAC-01 (centro) e do AMTAC-01AC (direita) com a enzima HDAC8 (PDB ID: 1T69)



Fonte: Adaptado de *Discovery Studio 2021 Client* (2021)

A partir da análise dos diagramas 3D mostrados acima, percebe-se que o protótipo AMTAC-01 realizou duas ligações de hidrogênio convencionais, interações hidrofóbicas de empilhamento T e uma ligação pi-cátion com o Zn^{+2} , diferentemente do Vorinostat, que forma um complexo de coordenação com este íon. Foram feitas, também, interações com alguns resíduos de aminoácidos que interagem também com o inibidor Vorinostat, como a Phe208, a Phe152 e a His180, indicando que a molécula interage com o sítio ativo da enzima.

Já o AMTAC-01AC demonstrou realizar três ligações de hidrogênio convencionais (Figura 3), além de interações hidrofóbicas do tipo empilhamento, de forma semelhante ao AMTAC-01 e ao Vorinostat. Além disso, o derivado ácido também exibiu interações com os resíduos de aminoácidos de Phe208, Phe152 e His 143, que interagem com o Vorinostat, fazendo parte do sítio ativo da enzima. Logo, o menor valor de energia e de constante inibitória do novo composto pode ser associada às interações promissoras com o alvo, com destaque para o resíduo ácido, que realiza uma ligação de hidrogênio extra em relação ao

grupo NH acridínico doador de ligação de hidrogênio, presente no protótipo AMTAC-01. No entanto, apesar de apresentar maior afinidade e potência, o AMTAC-01AC não demonstrou interagir com o íon zinco, como mostrado na Figura 3 (direita).

Em seguida, foi feito o ancoramento com o receptor EGFR, gerando valores de ΔG e K_i , dispostos na Tabela 2. Nesse caso, o novo composto apresentou maior afinidade e potência pelo alvo EGFR, em relação às outras moléculas.

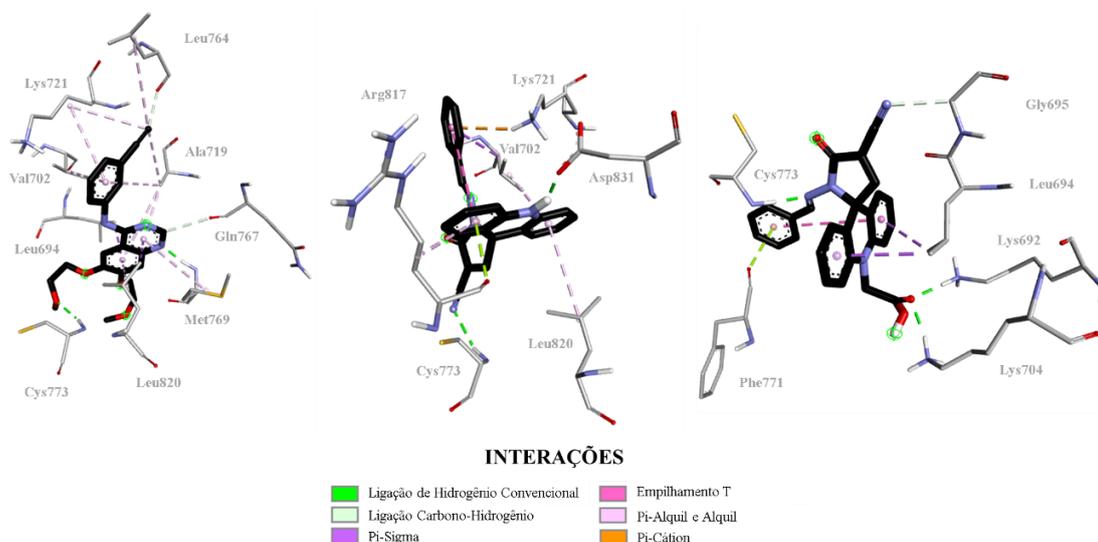
Tabela 2: Resultados de ancoramento dos compostos com EGFR (PDB ID: 4HJO)

Moléculas	Energia Livre (ΔG)	Constante de Inibição (K_i)
AMTAC-01	-7,82 kcal/mol	1,85 μ M
AMTAC-01AC	-10,45 kcal/mol	0,02192 μ M
Erlotinibe	-7,76 kcal/mol	2,05 μ M

Fonte: Aatoria (2021)

Para explicar essas diferenças de energia livre, pode-se visualizar a Figura 4, abaixo, mostrando as interações do Erlotinibe, do AMTAC-01 e do novo composto, AMTAC-01AC, com o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), dispostas em um diagrama 2D.

Figura 4: Diagramas 3D de interações de Erlotinibe (esquerda), do AMTAC-01 (centro) e do AMTAC-01AC (direita) com o receptor EGFR (PDB ID: 4HJO)



Fonte: Adaptado de *Discovery Studio 2021 Client* (2021)



Na Figura 4, é possível perceber que o AMTAC-01AC demonstrou realizar três ligações de hidrogênio convencionais, enquanto que o AMTAC-01 e o Erlotinibe, fármaco aprovado pela FDA como inibidor do receptor EGFR, exibiram apenas duas interações de hidrogênio. Isso pode justificar a maior afinidade apresentada pelo novo composto em relação às outras duas moléculas analisadas. Além disso, o AMTAC-01AC demonstrou, também, interagir com os aminoácidos Cys773 e Leu694, tal qual o Erlotinibe, indicando sua presença no sítio ativo do EGFR, no qual atua também o inibidor aprovado pela FDA. Portanto, o novo composto planejado mostrou-se muito mais promissor que o protótipo AMTAC-01, para esse alvo, com destaque para a modificação molecular feita, uma vez que o resíduo de ácido acético exibiu duas interações de hidrogênio, enquanto que o grupo NH acridínico do AMTAC-01 realizou apenas uma.

Análise *in silico* do perfil farmacocinético

Nos estágios iniciais do planejamento de fármacos, estudos *in silico* de propriedades como absorção, distribuição, metabolismo e eliminação, ajudam a prever características físico-químicas, farmacocinéticas e farmacodinâmicas de novas moléculas. Para o estudo dessas propriedades, alguns padrões foram estabelecidos para ajudar a prever características comuns de fármacos já comercializados, possibilitando a determinação das moléculas mais promissoras a serem aprovadas em testes *in vitro* e *in vivo*, e chegarem no mercado.

Um fármaco administrado por via oral, pode ter sua absorção prejudicada por várias razões, como baixa solubilidade e permeabilidade através da mucosa. As regras de Lipinski determinam padrões a serem obedecidos pela nova substância para garantir sua biodisponibilidade oral (B_o). As normas preveem que a má absorção é mais provável em fármacos com as seguintes características: 1) mais de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio, 2) mais de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio, 3) peso molecular maior que 500 g.mol^{-1} , 4) coeficiente de partição octanol/água (Log P) maior que 5 (CLogP)



ou 4,15 (MLogP) (LIPINSKI *et al.*, 1997). Moléculas que violam mais de um desses parâmetros têm alta probabilidade de não serem bem absorvidas por via oral.

Nesse sentido, o Log P determina o coeficiente de partição entre as concentrações da substância na fase orgânica (octanol) e na fase aquosa. Os fármacos que têm maior afinidade pela fase orgânica possuem maior Log P e tendem a apresentar maior taxa de permeabilidade nas membranas lipídicas, apresentando melhor perfil de biodisponibilidade. Por outro lado, a baixa solubilidade aquosa também pode interferir na absorção da molécula. Além disso, o peso molecular também pode ser determinante para a absorção do fármaco. A maior absorção de compostos com baixo P_M pode ser explicada com base nos princípios de difusão passiva. Porém, algumas classes de fármacos, como inibidores de renina e inibidores da protease, têm a maior parte de suas moléculas com $P_M \geq 500 \text{ g.mol}^{-1}$ e, ainda sim, apresentam biodisponibilidade adequada (NAVIA, 1996).

Ademais, Veber e colaboradores estabeleceram que a B_o do fármaco tem maior relação com o número de ligações rotacionais, a área de superfície polar e a contagem de ligações de hidrogênio, que tendem a aumentar com o peso molecular. De acordo com esses parâmetros, moléculas com alta probabilidade de possuir boa biodisponibilidade apresentam 10 ou menos ligações rotativas e área de superfície polar máxima de 140 \AA , ou, no máximo, 12 grupos doadores e aceptores ($D_{LH} + A_{LH}$) de ligação de hidrogênio (VEBER *et al.*, 2002).

Nesse contexto, a área de superfície polar (ou *Polar Surface Area* – PSA) pode ser definida como a soma dos grupos aceptores e doadores de elétrons e possui forte correlação com o transporte passivo de drogas através da membrana, permitindo a previsão do sucesso de transporte do fármaco (ERTL *et al.*, 2000). Ademais, fármacos que têm menos de sete ligações rotacionais, independentemente do P_M , possuem maior probabilidade de ter boa B_o (VEBER *et al.*, 2002).

Já a abordagem feita por Ghose e colaboradores (1999) inclui também os parâmetros de refratividade molar (> 40 e < 130), e o número total de átomos, com uma faixa de qualificação entre 20 e 70, para que o fármaco apresente uma biodisponibilidade adequada.

Diante dos dados apresentados, na Tabela 3, abaixo, e dos parâmetros estabelecidos, é notável que ambos os fármacos respeitam as regras de *drug-likeness* de Lipinski, Veber e Ghose, e têm características físico-químicas adequadas para uso oral com uma boa biodisponibilidade, possuindo também uma excelente previsão de porcentagem de absorção intestinal, de 93,67% para o AMTAC-01 e 80,78% para o AMTAC-01AC.

Tabela 3: Parâmetros de *drug-likeness* e farmacocinéticos dos compostos

Parâmetros	AMTAC-01	AMTAC-01AC
Peso Molecular	376,41 g.mol ⁻¹	434,45 g.mol ⁻¹
Aceptores de Ligação de H	4	5
Doadores de Ligação de H	1	1
MLogP	3,01	2,55
Ligações Rotacionais	2	4
Refratividade Molar	118,19	129,67
Nº Total de Átomos	45	51
Glicoproteína-P	Inibidor	Inibidor e Substrato
Inibição de CYP450	1A2, 2C19, 2C9 e 3A4	2C9
Substrato de CYP450	2C19, 2C9 e 3A4	2C19, 2C9 e 3A4

Fonte: Aatoria (2021)

Outro fator determinante para o sucesso dos fármacos, considerando que ambos visam o tratamento antineoplásico, é a resistência a múltiplas drogas (RMD) por células tumorais, relacionada ao aumento na expressão de proteínas como a glicoproteína-P (P-gp). Em células humanas, a expressão do gene *mdr1*, em mamíferos, está envolvida com a RMD, pois está diretamente relacionada à P-gp, que utiliza energia proveniente da hidrólise do ATP para promover o efluxo do quimioterápico (HUBER *et al.*, 2010). As drogas podem, então, se comportarem como substratos (S), ou seja, aquelas que são transportadas pela P-gp, ou como indutoras ou inibidoras (I_b) do seu transporte. A Tabela 3 apresenta as previsões para a interação das moléculas com a P-gp.



O estabelecimento do AMTAC-01AC como substrato e inibidor da P-gp indica a possibilidade de que esse composto seja um inibidor competitivo do efluxo de outras moléculas, ou seja, compete com outros substratos pela ligação a um mesmo local da P-gp (ARAÚJO, 2015). O AMTAC-01, por outro lado, foi determinado apenas como I_b , sendo um possível inibidor da hidrólise do ATP. A vantagem desse mecanismo de inibição, promovido pelo AMTAC-01, é que este pode ser utilizado em menores concentrações.

O estudo da farmacocinética de uma droga também inclui os dados sobre distribuição, metabolismo e excreção. O volume de distribuição (V_d) é um parâmetro importante para quantificar a distribuição do fármaco no corpo humano e fornece uma referência para a concentração plasmática esperada para uma determinada dose, mas não é capaz de determinar o padrão específico de distribuição. O V_d considerado adequado se encontra na faixa entre 0,04-20 L/kg. Drogas com alto V_d ligam-se fortemente ao tecido, com baixa concentração plasmática, maior tempo de meia-vida e risco aumentado de toxicidade (LE, 2020).

Os fármacos que permanecem na circulação e têm maior concentração plasmática tendem a ter um baixo volume de distribuição, exigindo maior dose para exercerem sua atividade no local escolhido. Ambas as moléculas exibiram volumes de distribuição adequados, apresentando valores de 0,482 L/kg para o AMTAC-01 bem como 0,191 L/kg para o AMTAC-01AC. Além disso, o derivado ácido demonstrou não atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), enquanto que o primeiro a atravessa em pequenas quantidades. Logo, o AMTAC-01AC tem menos efeitos colaterais no sistema nervoso central, uma vez que o objetivo terapêutico é o câncer colorretal.

Ademais, o metabolismo de um fármaco ocorre principalmente no fígado e pode ser dividido em duas fases, que têm como objetivo tornar a molécula mais hidrofílica para que esta possa ser eliminada. O principal sistema enzimático do metabolismo de fase I é o citocromo P-450 (CYP450), uma superfamília de isoenzimas que catalisa a oxidação de muitos medicamentos. As isoenzimas CYP1A2, CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 e CYP3A4, integrantes da CYP450, atuam no metabolismo da maioria dos medicamentos.



Assim, moléculas que exercem atividade sobre a mesma família de enzimas do CYP450, quando administrados concomitantemente, podem interagir entre si afetando o efeito terapêutico de ambos, ou causando toxicidade (BRAZ *et al.*, 2018).

Como citado anteriormente, pessoas com mais de 60 anos são as mais afetadas pelo câncer colorretal. Nesse grupo de indivíduos, a capacidade do fígado de metabolizar através do sistema enzimático CYP450 é significativamente reduzida devido à diminuição do volume hepático e do fluxo sanguíneo, levando a níveis mais elevados de concentração da droga no organismo e meia-vida prolongada (LE, 2020). Além disso, um estudo feito por Braz e colaboradores indicou que 90% dos idosos estudados utilizavam pelo menos um fármaco com atividade sobre a CYP450 (BRAZ *et al.*, 2018). Sendo assim, é importante notar que ambas as moléculas tem pelo menos algum tipo de ação sobre as isoenzimas CYP450 (Tabela 3), sendo, portanto, potenciais causadores de interação medicamentosa e correndo o risco de terem sua atividade reduzida, ou concentração elevada a níveis tóxicos.

Por fim, a principal via de excreção de medicamentos é pelos rins, sendo a droga, portanto, eliminada na urina. Por isso, há a necessidade do aumento da hidrofiliabilidade através da metabolização do fármaco. O *clearance* total de uma droga é um padrão para medição da excreção por via biliar, urinária, por suor e outras vias. O valor ótimo se encontra entre 5-15 mL/min/kg, conforme o software ADMETlab, e altos valores de depuração podem levar à eliminação renal elevada e concentrações subterapêuticas (UDY *et al.*, 2010). Embora apenas o AMTAC-01 tenha demonstrado *clearance* dentro da faixa apropriada (5,298 mL/min/kg), a depuração renal do derivado ácido apresentou-se pouco abaixo do limite adequado (4,524 mL/min/kg), com baixo risco de concentração plasmática subterapêutica por elevada eliminação renal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Portanto, o novo derivado espiro-acridínico ácido, AMTAC-01AC, demonstrou maior afinidade e potência pelos alvos, em relação ao protótipo AMTAC-01 e os inibidores



aprovados pela FDA, Vorinostat e Erlotinibe. Quanto às interações, o derivado ácido exibiu mais ligações de hidrogênio com ambos os alvos, em relação ao AMTAC-01, com destaque para as interações feitas pelo resíduo de ácido acético, evidenciando que a estratégia de modificação molecular por bioisosterismo não clássico associado à expansão molecular foi favorável. No entanto, é importante ressaltar que o novo composto planejado não interagiu com o íon zinco, presente na enzima HDAC8, enquanto que o AMTAC-01 promoveu uma ligação pi-cátion e o Vorinostat formou um complexo de coordenação. Além disso, tanto o AMTAC-01 como o derivado ácido apresentaram interessantes parâmetros farmacocinéticos e de *drug-likeness*. Logo, o novo composto, AMTAC-01AC, mostrou-se bastante promissor para o tratamento de câncer colorretal, com alta afinidade por alvos terapêuticos relevantes, elevada potência e ótimos parâmetros de *drug-likeness* e farmacocinética.

REFERÊNCIAS

ALLINGER, N. L. (1977). Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms. **Journal of the American Chemical Society**, 99(25), 8127–8134.

ALMEIDA, S. M. V. DE, LAFAYETTE, E. A., SILVA, W. L., LIMA SERAFIM, V. DE, MENEZES, T. M., NEVES, J. L., RUIZ, A. L. T. G., CARVALHO, J. E. DE, MOURA, R. O. DE, BELTRÃO, E. I. C., CARVALHO JÚNIOR, L. B. DE, & LIMA, M. DO C. A. DE. (2016). New spiro-acridines: DNA interaction, antiproliferative activity and inhibition of human DNA topoisomerases. **International Journal of Biological Macromolecules**, 92, 467–475.

ALMEIDA, L. C. DE, CALIL, F. A., MACHADO-NETO, J. A., & COSTA-LOTUFO, L. V. (2021). DNA damaging agents and DNA repair: From carcinogenesis to cancer therapy. In *Cancer Genetics* (Vols. 252–253, pp. 6–24). **Elsevier Inc.**

ARAÚJO, A. P. L. M. G. de (2015). **O papel da glicoproteína-P nas interações fármaco-fármaco**. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2015.

BATISTA, D. R. R., MATTOS, M. DE, & SILVA, S. F. DA. (2015). Convivendo com o câncer: do diagnóstico ao tratamento. **Revista de Enfermagem Da UFSM**, 5(3).



BELL, E. W., ZHANG, Y. (2019). DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. **Journal of Cheminformatics**, 11(1), 40.

BHASKARAN, N. A., & KUMAR, L. (2021). Treating colon cancers with a non-conventional yet strategic approach: An overview of various nanoparticulate systems. **Journal of Controlled Release**, 336, 16–39.

BIOVIA, Dassault Systèmes, Discovery Studio 2021 Client, San Diego: Dassault Systèmes, 2021.

BISWAS, S., REDDY, N. D., JAYASHREE, B. S., & RAO, C. M. (2018). Evaluation of Novel 3-Hydroxyflavone Analogues as HDAC Inhibitors against Colorectal Cancer. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2018, 4751806.

BRASIL. Instituto Nacional do Câncer (INCA). **Câncer colorretal** - Taxas de mortalidade pelas topografias selecionadas, brutas e ajustadas por idade, pela população mundial e brasileira de 2010, por 100.000 homens e mulheres, Brasil, entre 2010 e 2019 – Brasil: Banco de Dados. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em 11 de setembro 2021

BRAZ, C. L., FIGUEIREDO, T. P., BARROSO, S. C. C., REIS, A. M. M (2018). Medicamentos com atividade sobre o citocromo P450 utilizados por idosos em domicílio. **Revista Médica de Minas Gerais**, [s. l.], v. 28, 12 mar.

BURLINGHAM, B. T., & WIDLANSKI, T. S. (2003). An Intuitive Look at the Relationship of K_i and IC_{50} : A More General Use for the Dixon Plot. **Journal of Chemical Education**, 80(2), 214.

DAINA, A., MICHIELIN, O., ZOETE, V. (2017). SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific Reports**, 7(1), 42717.

DU, X., LI, Y., XIA, Y.-L., AI, S.-M., LIANG, J., SANG, P., JI, X.-L., & LIU, S.-Q. (2016). Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, Models, and Methods. **International Journal of Molecular Sciences**, 17(2), 144.

ERTL, P., ROHDE, B., & SELZER, P. (2000). Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. **Journal of Medicinal Chemistry**, 43(20), 3714–3717.

FERREIRA, L. G., DOS SANTOS, R. N., OLIVA, G., & ANDRICOPULO, A. D. (2015). Molecular Docking and Structure-Based Drug Design Strategies. **In Molecules** (Vol. 20,



Issue 7).

GHOSE, A. K., VISWANADHAN, V. N., & WENDOLOSKI, J. J. (1999). A Knowledge-Based Approach in Designing Combinatorial or Medicinal Chemistry Libraries for Drug Discovery. 1. A Qualitative and Quantitative Characterization of Known Drug Databases. **Journal of Combinatorial Chemistry**, 1(1), 55–68.

HUBER, PC, MARUIAMA, CH, & ALMEIDA, WP (2010). Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores. **Química Nova**, 33 (10), 2148–2154.

KANG, Y., NIAN, H., RAJENDRAN, P., KIM, E., DASHWOOD, W. M., PINTO, J. T., BOARDMAN, L. A., THIBODEAU, S. N., LIMBURG, P. J., LÖHR, C. V, BISSON, W. H., WILLIAMS, D. E., HO, E., & DASHWOOD, R. H. (2014). HDAC8 and STAT3 repress BMF gene activity in colon cancer cells. **Cell Death & Disease**, 5(10), e1476–e1476.

KUMAR, R., KAUR, M., & KUMARI, M. (2012). Acridine: a versatile heterocyclic nucleus. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, 69(1), 3–9.

LE, JENNIFER. Drug Distribution to Tissues. **Merck Sharp and Dohme Manual for the Professional**, [s. l.], 2020.

LE, JENNIFER. Drug Metabolism. **Merck Sharp and Dohme Manual Professional Version**, [s. l.], 2020.

LEE, D., LIM, J., WOO, K.-C., & KIM, K.-T. (2018). Piperonylic acid stimulates keratinocyte growth and survival by activating epidermal growth factor receptor (EGFR). **Scientific Reports**, 8(1), 162.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., & FEENEY, P. J. (1997). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 23(1-3), 3–25.

MORRIS, G. M., HUEY, R., LINDSTROM, W., SANNER, M. F., BELEW, R. K., GOODSSELL, D. S., OLSON, A. J. (2009). AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, 30(16), 2785–2791.

NAVIA, M., & CHATURVEDI, P. (1996). Design principles for orally bioavailable drugs. **Drug Discovery Today**, 1(5), 179–189.



PIRES, D. E. V, BLUNDELL, T. L., ASCHER, D. B. (2015). pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **Journal of Medicinal Chemistry**, 58(9), 4066–4072.

RAKESH, K. P., KUMARA, H. K., MANUKUMAR, H. M., & CHANNE GOWDA, D. (2019). Anticancer and DNA binding studies of potential amino acids based quinazolinone analogs: Synthesis, SAR and molecular docking. **Bioorganic Chemistry**, 87, 252–264.

SHANMUGAPRIYA, K., KIM, H., & KANG, H. W. (2020). Epidermal growth factor receptor conjugated fucoidan/alginate loaded hydrogel for activating EGFR/AKT signaling pathways in colon cancer cells during targeted photodynamic therapy. **International Journal of Biological Macromolecules**, 158, 1163–1174.

SUNG, H., FERLAY, J., SIEGEL, R. L., LAVERSANNE, M., SOERJOMATARAM, I., JEMAL, A., & BRAY, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, 71(3), 209–249.

UDY, AA, ROBERTS, JA, BOOTS, RJ et al. Depuração renal aumentada. **Clin Pharmacokinet** 49, 1-16 (2010).

VEBER, D. F., JOHNSON, S. R., CHENG, H.-Y., SMITH, B. R., WARD, K. W., & KOPPLE, K. D. (2002). Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, 45(12), 2615–2623.

XIONG, G., WU, Z., YI, J., FU, L., YANG, Z., HSIEH, C., YIN, M., ZENG, X., WU, C., LU, A., CHEN, X., HOU, T., CAO, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. **Nucleic Acids Research**, 49(W1), W5–W14.