



JOÃO EUSTÁQUIO ANTUNES

**Novas Quinazolininas 2,4,8-dissubstituídas com
Potencial Atividade de Inibição da Quinase de
Adesão Focal (FAK)**

CAMPINAS - SP

2013

i



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

JOÃO EUSTÁQUIO ANTUNES

**Novas Quinazolininas 2,4,8-dissubstituídas com
Potencial Atividade de Inibição da Quinase de
Adesão Focal (FAK)**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de
título de Doutor em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR JOÃO EUSTÁQUIO ANTUNES,
E ORIENTADO PELO PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

An89n Antunes, João Eustáquio, 1971-
Novas Quinazolinas 2,4,8-dissubstituídas com
Potencial Atividade de Inibição da Quinase de Adesão
Focal (FAK) / João Eustáquio Antunes. -- Campinas, SP :
[s.n.], 2013.

Orientador : Kleber Gomes Franchini.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Proteína-tirosina quinases de adesão focal. 2.
Quinazolinas. 3. Docking. 4. Cardiomegalia. 5.
Neoplasias. I. Franchini, Kleber Gomes, 1961-. II.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: New 2,4,8-disubstituted Quinazolines with Potential Inhibitory Activity of Focal Adhesion Kinase (FAK)

Palavras-chave em inglês:

Focal adhesion protein-tyrosine kinases

Quinazolines

Docking

Cardiomegaly

Neoplasms

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutor em Farmacologia

Banca examinadora:

Kleber Gomes Franchini [Orientador]

Gabriel Forato Anhô

Artur Torres Cordeiro

Luciana Venturini Rossoni

Eduardo Pagani

Data da defesa: 22-02-2013

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

JOÃO EUSTÁQUIO ANTUNES

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

MEMBROS:

1. PROF. DR. KLEBER GOMES FRANCHINI

Kleber Franchini

2. PROF. DR. GABRIEL FORATO ANHE

Gabriel Forato Anhe

3. PROF. DR. ARTUR TORRES CORDEIRO

Artur T. Cordeiro

4. PROFA. DRA. LUCIANA VENTURINI ROSSONI

Luciana Venturini Rossoni

5. PROF. DR. EDUARDO PAGANI

Eduardo Pagani

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 22 de fevereiro de 2013

DEDICATÓRIA

À minha família

AGRADECIMENTOS

Ao professor Kleber pela oportunidade, confiança e o compromisso para uma ciência de qualidade;

À grande amiga Dra. Silvana Aparecida Rocco, pela dedicação, paciência, incentivo e apoio na realização das sínteses.

Aos colegas que contribuíram diretamente para a elaboração deste trabalho, Michelle, Leandro, Gilberto (CIPOI), Renata, Ana Paula;

Aos grandes amigos do Laboratório de Fisiopatologia Cardiovascular e Laboratório Nacional de Biociências pela convivência sempre agradável, pela amizade e pelo aprendizado adquirido com cada um;

Ao Centro Integrado de Pesquisa Oncohematológica da Infância CIPOI;

Ao Departamento de Farmacologia pela oportunidade de fazer uma pós-graduação de qualidade;

À FAPESP pelo apoio financeiro;

À minha querida esposa e colega de doutorado Michelle Bueno, Antunes pelo apoio incondicional, paciência e amor. Aos meus pais, Júlio Bolívar Antunes (*in memoria*) e Maria Aparecida Salgado Antunes (*in memoria*) pela educação, ensinamentos e exemplo de vida.

Aos meus irmãos Vicente, Júlio e Márcia, por tornarem o caminho percorrido mais suave e alegre;

Principalmente ao bondoso Deus por sempre guiar minha vida.

"Para achar água é preciso descer terra adentro, encharcar-se no lodo.

Mas há os que preferem olhar os céus, e esperar pelas chuvas."

(Oduvaldo Vianna Filho)

	PÁG
RESUMO.....	xxiv
ABSTRACT.....	xxvi
1. INTRODUÇÃO.....	29
1.1. Introdução.....	31
1.2. Desenvolvimento de novos fármacos.....	33
1.3. Aspectos da Modelagem Molecular no Processo da Descoberta de Fármacos.	35
1.4. Propriedades Físico-químicas e Atividade Biológica.....	43
1.5. Validação do alvo - FAK e Hipertrofia Cardíaca.....	45
1.6. Validação do alvo - FAK e Câncer.....	53
1.7. Obtenção de um protótipo – Quinazolininas.....	54
1.8. Otimização do protótipo – Quinazolininas substituídas.....	56
1.9. Hipótese.....	56
1.10. Objetivo.....	57
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
2.1. Estudos Computacionais dos parâmetros ADME-TOX para os compostos candidatos a fármacos e para o inibidor seletivo da FAK.....	61
2.2. Modelos de predição.....	63
2.3. <i>Docking</i> Molecular.....	70

2.4. Síntese.....	72
2.4.1. <i>Protocolo de síntese</i>	75
2.5. Caracterização dos compostos quinazolínicos sintetizados.....	76
2.5.1. <i>Ressonância Magnética Nuclear ¹H e Ressonância Magnética Nuclear ¹³C</i>	76
2.5.2. <i>Espectrometria de Massas</i>	76
2.6. Avaliação da Pureza do composto 4-BZLO por HPLC.....	77
2.7. <i>Screening in vitro</i> para teste de inibição enzimática em células Flp-In que superexpressam a FAK.....	78
2.7.1. <i>Metodologia para testar os compostos inibidores da FAK</i>	80
2.7.2. <i>Western Blotting</i>	82
2.8. Ensaio de tirosina quinase <i>in vitro</i>	83
2.9. Metodologia de <i>screening in vitro</i> para teste de viabilidade celular em células cancerosas leucêmicas e tumores sólidos.....	83
2.10. Avaliação do efeito do composto 4-BZLO na atividade da FAK em células de glioblastoma (U87).....	85
2.11. Avaliação da absorção.....	86
2.12. Coarctação da Aorta.....	86
2.12.1. <i>Ecocardiografia, Histologia, Fibrose Miocárdica</i>	87
2.13. Tratamento preventivo e curativo.....	90
2.14. Avaliação da Inibição da FAK pelo composto 4-BZLO em camundongos transgênicos para a FAK.....	91
2.15. Análise estatística.....	91

3. RESULTADOS.....	93
3.1. Estudos computacionais para propor um composto protótipo com capacidade de inibir a FAK.....	95
3.1.1. Cálculo de Log P.....	95
3.1.2. Cálculo de docking entre a FAK e novas quinazolininas.....	96
3.1.3. Avaliação computacional dos parâmetros farmacocinéticos.....	98
3.2. Síntese dos compostos.....	99
3.2.1. Caracterização dos compostos sintetizados.....	100
3.3. O composto 4-BZLO é capaz de inibir a atividade da FAK <i>in vitro</i>	103
3.4. Avaliação <i>in vitro</i> do composto 4-BZLO em teste de viabilidade celular para células cancerosas leucêmicas e tumores sólidos.....	107
3.5. Absorção <i>in vivo</i> dos compostos sintetizados.....	112
3.6. Análise da medida da massa ventricular e ecocardiografia de coração hipertrófico de camundongos tratados com o composto 4-BZLO.....	113
3.7. Tratamento com 4-BZLO é capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca de animais transgênicos específicos para a FAK.....	119
4. DISCUSSÃO.....	123
4.1. Descoberta de novos fármacos, identificação e validação do alvo.....	125
4.2. Estudos computacionais de farmacocinética e <i>docking</i> molecular para escolha do protótipo.....	127
4.3. Síntese, caracterização e absorção das quinazolininas.....	129

4.4. Estudos de inibição da FAK <i>in vitro</i>	129
4.5. Estudos de inibição da FAK <i>in vivo</i> – Hipertrofia e Fibrose Cardíaca.....	133
4.6. Avaliação do 4-BZLO em modelo de animal transgêncio específico para FAK.....	136
5. SUMÁRIO.....	139
6. CONCLUSÃO.....	143
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	147
7. ANEXO.....	169

LISTA DE ABREVIATURAS

ADME	- Absorção, distribuição, metabolismo e excreção
ADME-Tox	- Absorção, distribuição, metabolismo e excreção e toxicidade
BPL	- Boas práticas de laboratório
ATP	- Adenosina Tri-Fosfato
4-BZLO	- <i>N</i> -[4-(benzyloxy)phenyl]-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amine
CT	- Controle
CSK	Citoesqueleto
DMEM	- Meio <i>Eagle</i> modificado por Dulbelcco
DMF	- Dimetilformamida
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido Desoxirribonucléico
DTT	- 1,4-Dithiothreitol
EDTA	- Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ERK	- <i>Extracellular Signal-regulated Kinase</i>
FAK	- <i>Focal Adhesion Kinase</i>
Fas	- Receptor de Morte Celular
FAT	- <i>Focal Adhesion Targeting</i>
FERM	- Four-point-one, Ezrina, Radixina e Moesina
FL-FAK	- <i>Full Length FAK</i>
HPLC	- Cromatografia Líquida de Alta Performance
FNRK	- <i>FAK-related Non-Kinase</i>
GAPDH	- <i>Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase</i>
Grb2	- <i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
JNK	- Jun N-Terminal Kinase
KDa	- KiloDalton
m/z	- Massa/carga
MOPS	- <i>N-Morpholino Propanesulfonic Acid</i>
mRNA	- RNA mensageiro

pb	- Pares de base
PBS	- Phosphate buffered saline - Tampão Salina Fosfato
PDB	- <i>Protein Data Bank</i>
PI3 quinase	- <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
PMSF	- <i>Phenylmethanesulphonyl Fluoride</i>
RMN	- Ressonância Magnética Nuclear
RMSD	- <i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	- Ácido Ribonucléico
Rpm	- Rotação por minuto
SFB	- Soro Fetal Bovino
SHP2	- <i>Src homology 2-containing Tyrosine Phosphatase</i>
siRNA	- <i>small Interference RNA</i>
Tyr	- Tirosina
U.A.	- Unidades Arbitrárias
VCR	-Vincristina

LISTA DE FIGURAS

	PÁG
Figura 01- Principais etapas envolvidas no desenvolvimento de um fármaco.....	36
Figura 02- Representação das diferentes estratégias racionais para o planejamento de novos candidatos a fármacos segundo a abordagem fisiológica.....	40
Figura 03- Ilustração esquemática da cardiomiopatia hipertrófica.....	46
Figura 04- Estrutura da FAK e suas funções.....	49
Figura 05- Estrutura auto-inibitória da FAK.....	50
Figura 06- As partes lipofílicas da molécula da aspirina em verde e grupos hidrofílicos em vermelho.....	66
Figura 07- As partes da estrutura com propriedade mutagênica.....	67
Figura 08- A estrutura do <i>Melphalan</i> , dada como exemplo, apresenta efeito tóxico no sangue com probabilidade de 100%.....	68
Figura 09- Processos evolutivos na coleta, análise e hierarquização e correlação para análise dos fragmentos de compostos submetidos aos cálculos.....	70
Figura 10- Procedimento de ciclização para derivados de 4-(3H)-quinazolinonas.....	73
Figura 11- Etapas para a formação de derivados de cloroquinazolinonas e anilinoquinazolinonas a).....	74
Etapas para a formação de derivados de cloroquinazolinonas e anilinoquinazolinonas b).....	75
Figura 12- Plasmídeo utilizado para a produção da linhagem HEK 293 com expressão induzível de FLAG-FAK.....	79
Figura 13- Ilustração do local onde foi realizado a coarctação da aorta.....	87
Figura 14- Estrutura do 4-BZLO dentro do sítio ativo da FAK.....	97

Figura 15-	Representação do esquema para selecionar as estruturas mais promissoras para a síntese de inibidores de FAK.....	99
Figura 16-	Espectro RMN de ¹ H do <i>N</i> -[4-(benzyloxy)phenyl]-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amine, denominado 4-BZLO.....	100
Figura 17-	Espectro RMN de ¹³ C do <i>N</i> -[4-(benzyloxy)phenyl]-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amine, denominado 4-BZLO.....	101
Figura 18-	Espectro de MS (EI), m/z 388,16 [MH] ⁺	102
Figura 19-	Cromatograma da análise do 4-BZLO em HPLC.....	103
Figura 20-	O composto 4-BZLO (D4) apresentou melhor capacidade de inibir a atividade da FAK em células HEK-FAK.....	104
Figura 21-	O composto 4-BZLO inibiu aproximadamente 50% da atividade da FAK (p397) com 10µM em células HEK-FAK.....	105
Figura 22-	O composto 4-BZLO foi capaz de inibir a atividade da FAK em 50% com aproximadamente 10nM.....	106
Figura 23-	Gráfico representativo do teste de triagem para 12 compostos em 10 diferentes linhagens de células leucêmicas.....	108
Figura 24-	Gráfico representativo do teste de triagem para 22 compostos em 12 diferentes linhagens de células de tumores sólidos.....	109
Figura 25-	As linhagens celulares marcadas com a seta azul foram aquelas que apresentaram maior inibição da viabilidade celular em presença do 4-BZLO e menor influência do DMSO.....	110
Figura 26-	O composto 4-BZLO na concentração de 1µM foi capaz de inibir em mais de 50% a atividade da FAK em células U87.....	111
Figura 27-	Perfil da concentração sérica em ng/mL do 4-BZLO em plasma de ratos <i>versus</i> o tempo (em horas).....	113
Figura 28-	Medida do peso médio do ventrículo esquerdo sobre peso corpóreo dos animais.....	114

Figura 29-	Medida do diâmetro dos miócitos em animais tratados com 4-BZLO e controle.....	116
Figura 30-	Medida da intensidade do interstício (grau de fibrose) em animais tratados com 4-BZLO e controle.....	117
Figura 31-	O composto 4-BZLO diminui a atividade e expressão da FAK em corações de ratos após a coarctação da aorta.....	118
Figura 32-	Composto 4-BZLO foi usado como inibidor farmacológico da FAK e regrediu a hipertrofia cardíaca em animais transgênicos específicos para a FAK.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Sequência de fases de descoberta e desenvolvimento de fármacos.....	35
Tabela 2-	Lista das quinazolinas em relação ao cálculo do Log P. Abaixo representação esquemática do anel quinazolínico com as posições R1, R2, R3, R4 que foram substituídas.....	171
Tabela 3-	Estruturas das quinazolinas e o resultado do cálculo de <i>Docking</i> molecular para a FAK. Abaixo representação esquemática do anel quinazolínico com as posições R1, R2, R3, R4 que foram substituídas.....	175
Tabela 4-	Avaliação <i>in silico</i> da farmacocinética dos 28 compostos selecionados.....	178
Tabela 5-	Quinazolinas selecionadas para síntese.....	186

A compreensão de como a quinase de adesão focal (FAK) contribui para os processos de hipertrofia, insuficiência cardíaca e câncer são de grande interesse científico. Um dos nossos objetivos específicos é desenvolver inibidores desta tirosina quinase com vistas à sua aplicação terapêutica no tratamento de insuficiência cardíaca e câncer. Portanto, foi realizado planejamento racional e a síntese de inibidores farmacológicos para a FAK. Estudos computacionais de *docking* e farmacocinéticos permitiram selecionar 28 estruturas de quinazolina mais promissoras em relação à capacidade de inibir a FAK. Desta forma, economiza-se tempo e dinheiro para obter-se a síntese apenas de 6 das estruturas pré-selecionadas. Uma quinazolina denominada **4-BZLO** foi sintetizada após o planejamento racional. Tal quinazolina foi capaz de inibir em 50% da atividade da FAK *in vitro* com aproximadamente 1nM. Os testes de pureza da síntese, absorção por via oral, melhor resultado em triagem em células que superexpressam a FAK e o melhor resultado para triagem em duas linhagens de célula leucêmicas e tumor sólido permitiram direcionar o **4-BZLO** para ser o composto líder deste estudo. O composto **4-BZLO** apresentou resultado promissor para experimentos com camundongos submetidos à coarctação da aorta, que induz hipertrofia cardíaca. Para avaliar se o tratamento preventivo seria eficiente para hipertrofia cardíaca, foi realizado experimento em animais tratados com 30mg/Kg/dia durante 30 dias. Após este período, foi realizada cirurgia de coarctação da aorta para induzir a hipertrofia cardíaca nos animais e os mesmos foram tratados por mais 30 dias. Parâmetros tais como: peso médio do ventrículo esquerdo sobre peso corpóreo de cada animal (LVW/BW), medida da espessura da parede do ventrículo esquerdo (LVWT) e parâmetros histológicos (diâmetro dos miócitos cardíacos) demonstraram que nos animais tratados houve regressão da hipertrofia comparada ao controle (animais sem tratamento). Outro estudo realizado no qual os animais foram tratados de maneira curativa, ou seja, o tratamento foi realizado somente após a coarctação da aorta demonstrou uma melhora no quadro de hipertrofia e função cardíaca. O modelo de fibrose cardíaca foi usado para avaliar se tratamento com **4-BZLO** é capaz de reduzir a fibrose cardíaca nos animais. Os resultados obtidos demonstraram que os animais tratados com **4-BZLO** por 30 dias apresentaram redução da acumulação de colágeno, que é um indicador de fibrose, em relação ao controle. Nosso laboratório desenvolveu camundongos transgênicos específicos para a FAK que desenvolve moderada hipertrofia cardíaca. Assim, tal modelo permitiu testar o tratamento com o **4-BZLO** para hipertrofia cardíaca induzida pela FAK. Os animais transgênicos específicos para a FAK foram tratados com o composto líder e houve melhora dos parâmetros cardíacos. Os resultados obtidos permitiram concluir que a quinazolina denominada **4-BZLO** é um bom candidato a fármaco como inibidor da FAK.

Palavras chave: Quinase de Adesão Focal, Quinazolinas, Estudo de *Docking*, Hipertrofia e Fibrose Cardíaca, Câncer.

Understanding how the focal adhesion kinase (FAK) contributes to the processes of hypertrophy, heart failure and cancer are of great scientific interest. One of our goals is to develop specific inhibitors of this tyrosine kinase with potential therapeutic application in the treatment of heart failure and cancer. In this view, we used rational design to select a group of possible FAK inhibitors. Computational studies such as docking and pharmacokinetic studies allowed us to select 28 structures most likely to inhibit FAK. In this way, we saved up time and money in devising the synthesis of 6 pre-selected structures. Accordingly, quinazoline **4-BZLO** was prepared and was able to inhibit the *in vitro* activity of FAK by 50% at a concentration of approximately 1nM. Several factors contributed to **4-BZLO** being chosen as the lead compound in this study: 1) the degree of purity achieved during synthesis; 2) good oral bioavailability; 3) the best inhibition values in cells overexpressing FAK in screening, 4) the best result against two leukemic cell lines and one solid tumor target. **4-BZLO** showed promising results in experiments with mice subjected to aortic coarctation, which develops cardiac hypertrophy. To assess whether **4-BZLO** would be effective for the preventive treatment of cardiac hypertrophy, an experiment was conducted in animals treated with 30 mg/kg/day for 30 days. After this period, an aortic coarctation was performed surgically in order to induce cardiac hypertrophy in animals, and these were further treated for 30 days. Parameters such as left ventricular weight per body weight ratio (LVW/BW), measurement of the left ventricle wall thickness (LVWT), and histological parameters, such as the diameter of cardiac myocytes in treated animals showed that there was a regression of hypertrophy, compared to untreated animals (control). A similar study, where treatment with **4-BZLO** was performed only after aortic coarctation showed an improvement regarding hypertrophy and cardiac function. A cardiac fibrosis model was used and the results obtained demonstrated that animals treated with **4-BZLO** for 30 days showed a reduction of collagen accumulation, which is an indicator of fibrosis, equal to the control group. Our laboratory has developed transgenic mice specific for FAK, which develop moderate cardiac hypertrophy. Consequently, this model allows us to test **4-BZLO** for the treatment of FAK induced cardiac hypertrophy. The transgenic animals were treated with **4-BZLO**, leading to an improvement of the cardiac parameters. These results showed that synthetic quinazoline **4-BZLO** is a good drug candidate for the inhibition of the FAK enzyme.

Keywords: Focal Adhesion Kinase, Quinazolines, Docking Study, Cardiac Hypertrophy and Fibrosis, Cancer.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O desenvolvimento de agentes farmacológicos com função específica tem papel importante em vários aspectos da pesquisa em biologia, bem como para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para as doenças. A disponibilidade de agentes inibidores específicos de moléculas de sinalização pode favorecer o desenvolvimento do conhecimento sobre a importância das mesmas nas funções celulares e seu envolvimento na patogenia de doenças.

Tirosinas quinases constituem a família mais numerosa de quinases em mamíferos (Hanks S. K. e Hunter T.; 1995) e contribuem na regulação e sinalização de processos celulares diversos como o controle do crescimento, diferenciação, mitose e apoptose. Alguns membros dessa família como a c-Src e o receptor de EGF, participam da gênese de diversos tipos de câncer, de forma que é promissora a modulação da atividade dessas enzimas por fármacos direcionados para o tratamento de vários tipos de câncer. Assim sendo, um número considerável de trabalhos relata a busca de compostos com atividade inibitória dessas tirosinas quinases. Algumas classes de substâncias estudadas são heterocíclicas como anilinoquinazolininas (**1**) (Vansteenkiste J. F.; 2004; Tiseo M.; 2004), quinolinas (**2**) (Wissner, A. *et al.*, 2000), piridopirimidinas (**3**) (Fry, D. W. *et al.*, 1998) e pirrolopirimidinas (**4**) (Mellinghoff I. K. *et al.*, 2002; Traxler, P. *et al.*, 2004). A questão da seletividade, no entanto, costuma ser problemática, uma vez que as tirosinas quinases possuem alto grau de homologia estrutural e sequencial. Apesar desse obstáculo, alguns grupos têm logrado sucesso e inibidores seletivos de determinadas tirosinas quinases já são comercializados ou se encontram em estudos clínicos avançados (Klutchko, S. R. *et al.*, 2006).

Os estudos de nosso laboratório têm como foco principal, o entendimento da participação da tirosina quinase FAK nos processos de sinalização celular em miócitos cardíacos e demais células miocárdicas durante estímulos mecânicos. As evidências disponíveis indicam que esta enzima tem papel crítico para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzida por sobrecarga mecânica (Franchini, K.G. *et al.*; 2000, Torsoni, A.S.; *et al.*, 2003; Marin, T.M. *et al.*, 2007; Clemente, C.F.M. *et al.*, 2007). Estudos realizados por Peng e colaboradores (Peng, X. *et al.*, 2006) indicaram que a deleção condicional da FAK em miócitos cardíacos impede o crescimento hipertrófico e predispõe o ventrículo esquerdo à dilatação ventricular e insuficiência cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica. Também dados obtidos em nosso laboratório indicam que o silenciamento gênico da FAK em camundongos impede o desenvolvimento de hipertrofia em resposta a sobrecarga pressórica (Clemente, C.F.M. *et al.*, 2007). Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos em camundongos com deleção condicional da FAK no miocárdio. Por outro lado, os resultados do silenciamento também sugerem que a ativação prolongada da FAK no miocárdio contribui para a deterioração estrutural e funcional do ventrículo esquerdo de camundongos com sobrecarga pressórica crônica, sugerindo que a inibição da atividade da FAK pode potencialmente se constituir em alternativa terapêutica para a hipertrofia e insuficiência cardíacas.

Neste contexto, é importante que sejam desenvolvidos inibidores seletivos para a FAK. Até recentemente, não havia relatos sobre a existência de compostos orgânicos com atividade inibitória específica para a FAK. No entanto, pesquisadores da empresa farmacêutica Novartis relatou o desenvolvimento de pirrolopirimidínicos 2,8-dissubstituídos como inibidores da FAK (Choi, H.S. *et al.*, 2006a; Choi, H.S. *et al.*, 2006b),

o que confirma a possibilidade de se produzirem compostos com seletividade para tirosina quinases.

Apesar da existência dos referidos compostos, é ainda plenamente justificável o desenvolvimento de novos compostos com capacidade inibitória da atividade da FAK. Dentre os argumentos citam-se: 1. compostos heterocíclicos de naturezas diversas podem fornecer possibilidades quantitativas e qualitativamente diferentes de interação com a enzima, permitindo a produção de compostos com potência e seletividades maiores; 2. nosso grupo tem experiência no manuseio e síntese de compostos quinazolínicos, que diferem estruturalmente das pirrolopirimidinas utilizadas na síntese dos referidos compostos do grupo da Novartis® e têm se mostrado, em alguns casos, mais adequadas à inibição de quinases específicas que os derivados de pirrolopirimidinas (vide caso de inibidores de adenosina quinase); 3. compostos com estruturas diferentes, podem, em testes toxicológicos, apresentar diferenças vantajosas que permitem o desenvolvimento de compostos viáveis para uso clínico; 4. compostos com estruturas diferentes têm o potencial de serem inéditos e permitirem o patenteamento.

1.2. Desenvolvimento de novos fármacos

O desenvolvimento de um novo fármaco é difícil e dispendioso. Pouquíssimas moléculas que chegam à fase de desenvolvimento são finalmente aprovadas como fármacos. De dez mil compostos considerados promissores nos resultados dos ensaios iniciais, menos de dez repetem a ação nos ensaios clínicos e apenas dois são, por fim, aprovados (Golan, D.E. 2009). Além disso, os custos associados à descoberta e ao desenvolvimento de um novo fármaco variam de 0,8 a 1,7 bilhões de dólares. Embora a

criação de novos fármacos seja um empreendimento arriscado, os fármacos bem-sucedidos podem ser muito lucrativos. Os fármacos de maior sucesso comercial, como a atorvastatina, têm vendas anuais acima de 12 bilhões de dólares (Golan, D.E. 2009). A descoberta de um novo fármaco vai desde a identificação e validação de um possível alvo terapêutico até a seleção de uma única molécula para testes em seres humanos. O desenvolvimento de um fármaco geralmente é definido como o período que vai dos estudos pré-clínicos que respaldam os ensaios clínicos iniciais até a aprovação do fármaco pelo órgão regulador. O processo de descoberta e desenvolvimento de um fármaco é complexo e requer a colaboração de muitas especialidades científicas diferentes (Golan, D.E. 2009).

O termo descoberta de um fármaco refere-se ao processo pelo qual laboratórios farmacêuticos, de biotecnologia, acadêmicos e governamentais identificam ou analisam substâncias para encontrar agentes terapêuticos potencialmente ativos. A triagem consiste em testar muitas substâncias em ensaios relevantes para a doença em questão. Um composto aprovado nessa triagem é chamado de composto ativo ou (*hit*). Se a substância ou seus derivados estruturais ainda se mostrarem promissores após a caracterização biológica e química adicional, passa a ser um protótipo (*lead*) (Golan, D.E. 2009).

De acordo com a Tabela 1, na fase da descoberta do fármaco estão os estudos baseado no alvo e no composto. Nessa fase também pode ser realizado estudos de identificação do alvo e desenvolvimento do ensaio e triagem como, por exemplo, ensaios de alto desempenho conhecidos como *High throughput screening (HTS)*. A otimização do protótipo e estudos de parâmetros farmacocinéticos ADME *in vitro* e *in vivo* fazem parte da metodologia de descoberta de fármacos denominada de estudos pré-clínico (Sawyer, T.K.; 2006).

Na fase de desenvolvimento do fármaco contempla as fases de estudos clínicos denominadas de Fase I, II, III. Na fase I, avalia-se a farmacocinética em humanos e a segurança à exposição do fármaco em desenvolvimento. Na fase II, além de estudos metabólitos e interações medicamentosas estuda-se a segurança e seleção da dose. A fase III é a fase de desenvolvimento do fármaco que estuda as interações medicamentosas e carcinogênese para a finalização dos estudos com ensaios de registro. Ao final dos estudos, o fármaco pode ser aprovado pelas agências regulatórias (Golan, D.E. 2009).

Tabela 1. Sequência de fases de descoberta e desenvolvimento de fármacos

	Descoberta do fármaco		Desenvolvimento do fármaco				
Fase	Baseada no alvo Baseada no composto		Otimização do protótipo	Desenvolvimento pré-clínico	Fase I	Fase II	Fase III
	Identificação do alvo	Desenvolvimento do ensaio e triagem	Modelos animais de doença				
ADME	Metabolismo <i>in vitro</i>		Farmacocinética (animal)		humano	Metabolismo Interações medicamentosas	
Toxicologia	Triagem		Pré-clínico	BPL Toxicologia			Desenvolvimento e reprodução Carcinogênese
Médica					Segurança Exposição	Eficácia Seleção da dose	Ensaio de registro

1.3. Aspectos da Modelagem Molecular no Processo de Descoberta de Fármacos

A descoberta de novos fármacos representa um desafio demorado, que necessita de contínuo e elevado investimento financeiro em pesquisa. Considerando este panorama, estratégias racionais de planejamento estruturais de novos fármacos vêm sendo amplamente empregadas em paralelo aos processos aleatórios suportados por tecnologias de alto desempenho como, por exemplo, a química combinatória e o *high-throughput screening* (HTS) (Botwen J.P. e Cory M. 2002).

As vantagens do planejamento racional de novos fármacos são inúmeras como: a) o planejamento de novas substâncias bioativas, envolvendo a síntese e modificação molecular de substâncias; b) a identificação ou elucidação da estrutura; c) a descrição das moléculas desde a sua constituição atômica até suas características estruturais quando da(s) interação(ões) com os diferentes sistemas biológicos; d) a compreensão em nível molecular de processos bioquímicos/farmacológicos, toxicológicos e farmacocinéticos; e) a proposição e validação de modelos matemáticos por meio de estudos das relações entre a estrutura química e a atividade farmacológica e/ou toxicológica, permitindo então a proposição de novas substâncias químicas (Do Amaral, A. T.; Montanari, C. A.; 2002). A Figura 1 ilustra as principais etapas relacionadas ao processo de desenvolvimento de um novo fármaco e as metodologias empregadas ao longo deste processo.

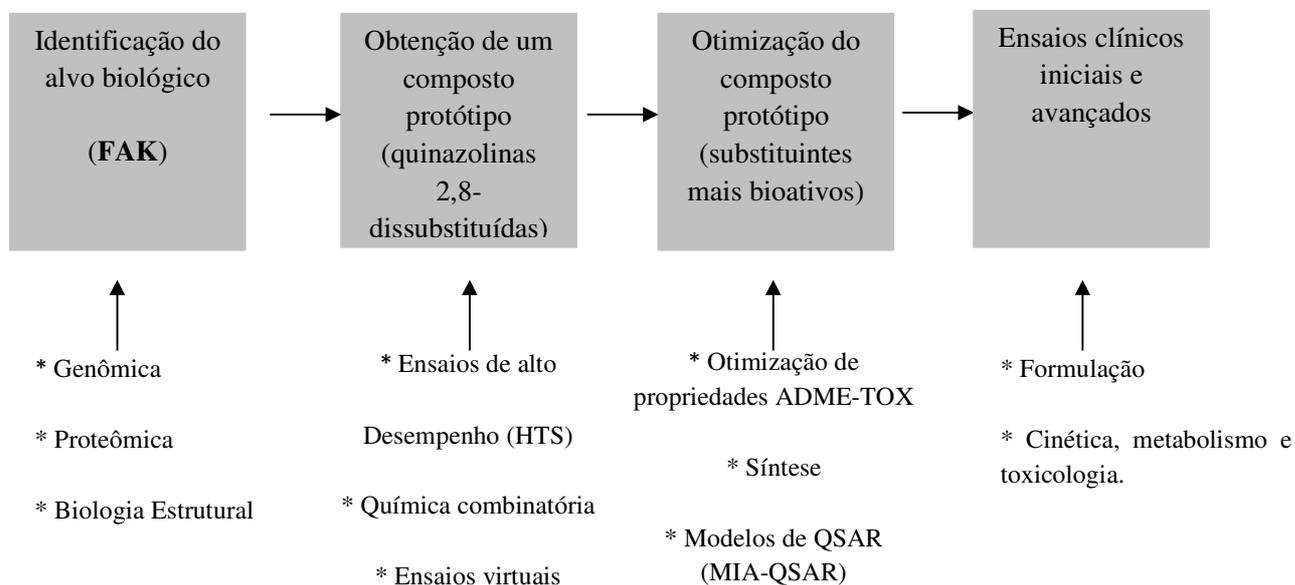


Figura 1. Principais etapas envolvidas no desenvolvimento de um fármaco.

Dentre as várias estratégias de planejamento, desenho e modificação molecular, aplicáveis na busca de novos ligantes, aquelas que envolvem o uso de técnicas computacionais vêm crescendo em importância devido ao gradativo aumento da capacidade de processamento dos computadores, o desenvolvimento das interfaces gráficas de visualização das estruturas geradas e à operacionalidade dos programas disponíveis. O uso adequado dos recursos *in silico*, associado a dados experimentais, pode permitir desde o aumento da eficácia de um candidato a fármaco até eventuais inferências de seu perfil de propriedades farmacocinéticas, por exemplo, ADMETox. Esta abordagem inicial previne a síntese e a avaliação farmacológica de extensivo número de compostos e/ou minimiza o risco de falha do protótipo por inadequação de suas propriedades farmacocinéticas (Engel T.; 2006).

O uso dos recursos computacionais na visualização da estrutura tridimensional (3D) de ligantes ou protótipos candidatos a fármacos acarretou profundas mudanças de paradigma nos processos de planejamento molecular. A elucidação da conformação bioativa facilitou a interpretação das similaridades/dissimilaridades estruturais entre substâncias bioativas distintas de uma mesma série congênere ou não, e as influências sobre o perfil de atividade farmacológica (Cohen N.C.; 1996).

Os estudos de modelagem molecular podem ser sistematizados considerando-se três parâmetros principais: acurácia, tempo e tamanho/complexidade do sistema em estudo (Head-Gordon M.; 1996). A acurácia dos modelos propostos é estritamente dependente do método de análise estrutural que pode simplesmente explorar os princípios da mecânica molecular. Neste caso, levam-se em consideração os campos de forças envolvidos na união dos átomos que compõem a molécula em estudo, em função de variações de comprimento e ângulos de ligação e outras interações não ligantes. Alternativamente, podem-se empregar

os princípios da mecânica quântica, que consideram toda estrutura e interações entre os elétrons da molécula e se baseiam na resolução da equação de Schrödinger (Head-Gordon M. 1996). Os métodos quânticos podem ser aplicados por meio de três diferentes abordagens: métodos *ab-initio*, que não usam aproximação na resolução da equação de Schrödinger, e são conseqüentemente dispendiosos, uma vez que é necessário o uso ilimitado de computadores com alta tecnologia; métodos semi-empíricos devem ser usados de acordo com a complexidade estrutural da molécula-alvo pois consideram apenas os elétrons da camada de valência; e métodos baseados na teoria do funcional de densidade (DFT), que se fundamentam em variações de densidade eletrônica (Head-Gordon M. 1996; Botwen J.P.; Cory M. 2002).

O objetivo primário destes estudos, aplicados ao desenho estrutural de fármacos, consiste na caracterização da(s) conformação(ões) bioativa(s) e a energia associada a este arranjo molecular, seguido de possíveis inferências de propriedades físico-químicas e estereo-eletrônicas, como momento dipolar, energias de orbitais de fronteiras HOMO e LUMO, densidade eletrônica, polarizabilidade e volume molecular, entre outros (Cohen N.C. 1996).

A primeira geração de estratégias de planejamento estrutural de fármacos auxiliados por computador foi implementada no início dos anos 1970, por meio dos estudos de relações quantitativas entre a estrutura química e a atividade biológica (QSAR), criada por Corwin Hansch (Hansch C. 1993; Head-Gordon M. 1996). Em um contexto temporal e que se admitia as moléculas como entidades de topologia bidimensional (2D), as propriedades biológicas eram dependentes, primariamente, de suas propriedades físico-químicas e expressas por equações matemáticas.

As limitações dos métodos de QSAR-2D na descoberta de novos bioligantes e protótipos candidatos a fármacos, corroborou a importância dos fatores estereoquímicos e a análise detalhada das propriedades moleculares associadas às geometrias 3D do processo de reconhecimento molecular de uma micromolécula pelo sítio receptor da biomacromolécula. Neste contexto, na metade da década de 1980, a modelagem molecular começou a ser empregada como ferramenta no planejamento racional de ligantes e protótipos de fármacos, permitindo a investigação da complementaridade molecular em estruturas 3D de substâncias bioativas e seus correspondentes biorreceptores (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008). Esta etapa foi essencial e necessária à elucidação das interações responsáveis pelo reconhecimento molecular da micromolécula pelo sítio receptor e útil na etapa de modificação estrutural correspondente à sua otimização (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

Atualmente, a abordagem fisiológica é a principal estratégia para o desenho molecular de novos candidatos a fármacos. Neste contexto, pode-se aplicar as técnicas de modelagem molecular por meio de dois caminhos distintos: direto ou indireto (Itai, A. *et al.*, 1996) (Figura 2).

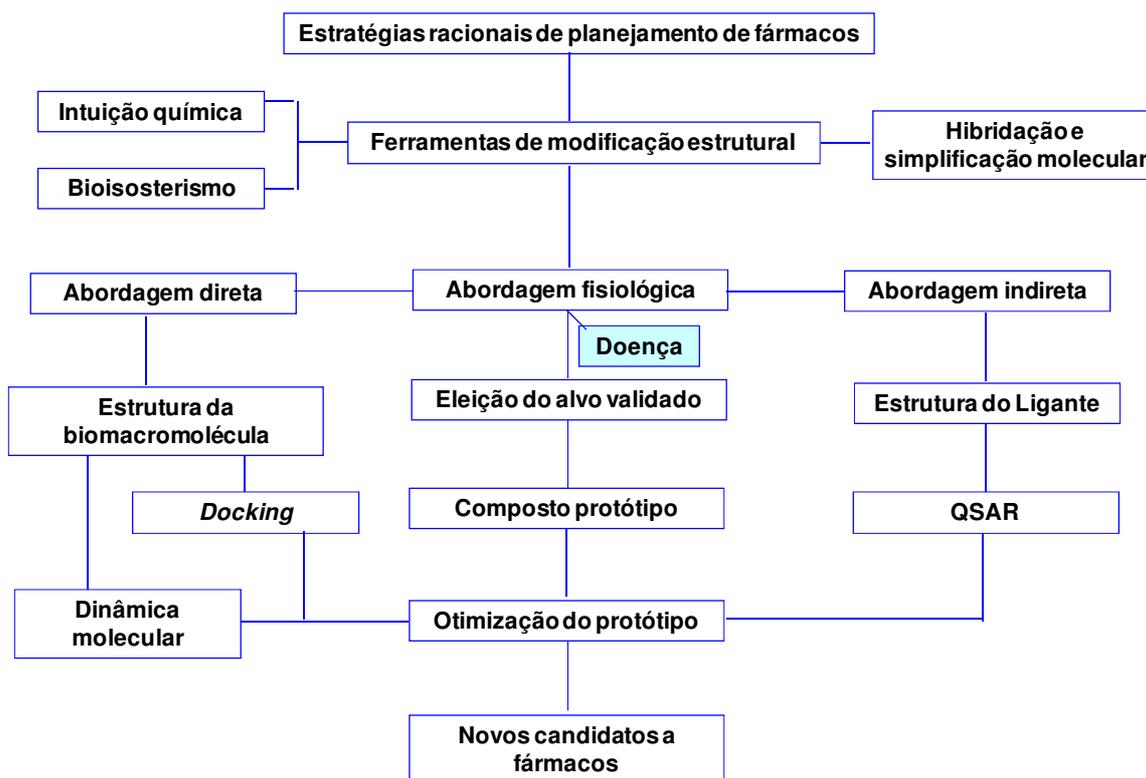


Figura 2. Representação das diferentes estratégias racionais para o planejamento de novos candidatos a fármacos segundo a abordagem fisiológica.

Na abordagem direta, a estrutura terciária da proteína ou biomacromolécula-alvo é conhecida, por cristalografia ou ressonância magnética nuclear, e encontra-se disponível em bancos de dados de biomacromoléculas do *Protein Data Bank* (PDB) (Disponível em: <http://www.rcsb.org.pdb>) ou do Banco de Dados de Cambridge (Disponível em: <http://www.ccdc.cam.ac.uk>). A entrada das coordenadas cartesianas que indicam a disposição espacial 3D dos átomos desta biomacromolécula em programas de modelagem molecular com interfaces gráficas adequadas permite a reprodução *in silico* da geometria adotada na estrutura cristalina.

O uso de estruturas cristalinas de complexos ligantes-biomacromoléculas é desejável por permitir a correta identificação da região da biomacromolécula que corresponde ao sítio-receptor, isto é, o farmacóforo envolvido no reconhecimento molecular. Além disso, permite realizar operações de simplificações de sua estrutura por meio de cortes esféricos (*CUT-off*) de dimensões variadas, dependendo da influência de resíduos de aminoácidos periféricos sobre a conformação adotada pelos resíduos do sítio ativo (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

Seguindo esta estratégia, após a adequada remoção do ligante que se encontra, originalmente, complexado ao sítio do receptor, pode-se explorar programas de atracamento (*docking*) molecular como DOCK, Flex, FlexE, Gold, *Molegro Virtual Docker*, ICM mol dock, dentre outros, para inserir no sítio ativo novos ligantes, virtuais ou não. Esses ligantes são desenhados por meio de ferramentas de planejamento molecular com o objetivo de avaliar o modo e as energias envolvidas em sua interação com o sítio de reconhecimento molecular do biorreceptor (Mohan V.; 2005). Estudos desta natureza permitem a hierarquização entre ligantes virtuais, podendo selecionar os candidatos mais promissores que mereçam ser obtidos sinteticamente para sua posterior avaliação farmacológica. Testes experimentais podem confirmar os resultados obtidos *in silico* para oferecer maior confiabilidade ao estudo de planejamento de fármacos (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

Por outro lado, quando a estrutura terciária da biomacromolécula não é conhecida, o processo racional de descoberta de candidatos a fármacos deve explorar a abordagem indireta, também conhecida como abordagem baseada na estrutura dos ligantes.

Neste contexto, a compreensão das relações entre a estrutura dos ligantes e sua afinidade pelo biorreceptor (SAfiR) não deve ser limitada às análises 2D, mas envolve suas

propriedades estereo-eletrônicas 3D. Para isso, pode-se utilizar métodos conhecidos como QSAR-3D, isto é, relações quantitativas entre estrutura tridimensional e atividade (Kubinyi H. *et al.*, 1998). Diversos programas computacionais são capazes de fazer tais correlações, com destaque para o método de *análise comparativa de campos moleculares* (CoMFA), que pode ser empregado na análise de relações quantitativas entre a atividade biológica de um conjunto de compostos com um alinhamento específico e suas propriedades eletrônicas e estéricas tridimensionais. Variações deste método, como a análise comparativa de índices de similaridade molecular (CoMSIA), permitem avaliar outras propriedades estruturais como hidrofobicidade, capacidade de promover interações hidrofóbicas com o biorreceptor e também a ligação de Hidrogênio (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

As limitações mais relevantes dos métodos de QSAR-3D residem na identificação correta da conformação bioativa, o que reflete a qualidade do alinhamento dos ligantes do banco de dados escolhido. Ademais, este banco de compostos exige que todos os ligantes incluídos tenham sido avaliados por meio do mesmo protocolo de bioensaio (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

A despeito das vantagens e limitações dos métodos *in silico*, sejam aqueles da abordagem direta ou indireta, o emprego de técnicas computacionais no planejamento de novos ligantes, na proposta de novos candidatos a protótipos a partir de *hits* ou na otimização de protótipos pelas estratégias tradicionais de desenho molecular da Química Medicinal (p. ex.; bioisosterismo, hibridação, anelação e simplificação molecular), além da intuição química de um experiente químico farmacêutico medicinal, representam táticas válidas de emprego para a descoberta de novos candidatos a fármacos.

1.4. Propriedades Físico-químicas e Atividade Biológica

As propriedades físico-químicas de determinados grupos funcionais são de fundamental importância na fase farmacodinâmica da ação dos fármacos e na etapa de reconhecimento molecular, uma vez que a afinidade de um fármaco pelo seu biorreceptor é dependente das forças de interação dos grupamentos farmacofóricos com sítios complementares da biomacromolécula (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

Adicionalmente, a fase farmacocinética, que engloba os processos de absorção, distribuição, metabolização e excreção, repercute diretamente na biodisponibilidade e no tempo de meia-vida do fármaco na biofase e também pode ser drasticamente afetada pela variação das propriedades físico-químicas de um fármaco (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

As principais propriedades físico-químicas de uma micromolécula capazes de alterar o seu perfil farmacoterapêutico são o coeficiente de partição, que expressa a lipofilicidade relativa da molécula e o coeficiente de ionização, expresso pelo pKa, que traduz o grau de contribuição relativa das espécies neutra e ionizada.

A grande maioria dos fármacos disponíveis é absorvida passivamente, tendo de transpor a bicamada lipídica que constitui o ambiente hidrofóbico das membranas biológicas. Por isso, destaca-se a importância das propriedades físico-químicas, isto é, lipofilicidade e pKa, para que o fármaco atinja concentrações plasmáticas capazes de reproduzir o efeito biológico evidenciado em experimentos *in vitro* (Barreiro, E.J. *et al.*, 2008).

A lipofilicidade (LogP) é definida pelo coeficiente de partição de uma substância entre uma fase aquosa e uma fase orgânica. O conceito atualmente aceito para coeficiente de partição (P) pode ser definido pela razão entre a concentração da substância na fase

orgânica (*Org*) e sua concentração na fase aquosa (*Caq*) em um sistema de dois compartimentos sob condições de equilíbrio. Os fármacos que apresentam maior coeficiente de partição, ou seja, têm maior afinidade pela fase orgânica, tendem a ultrapassar com maior facilidade as membranas biológicas, apresentando melhor perfil de biodisponibilidade. Esta característica pode refletir um melhor perfil farmacológico (Fraga C.A.M.; Barreiro E.J.; 1996).

O coeficiente de partição (P) emprega o álcool primário, *n*-octanol como fase orgânica devido a sua semelhança estrutural com os fosfolípídeos de membrana. Os valores do logaritmo do coeficiente de partição (LogP) são normalmente correlacionados com a atividade biológica, descrevendo em geral um modelo parabólico bilinear (Kubinyi H. 1977). Este modelo pode indicar a lipofilicidade ótima, sendo capaz de expressar requisitos farmacocinéticos e farmacodinâmicos ideais, cujo incremento leva à progressiva redução da atividade biológica (Kubinyi H. 1977).

Neste contexto, Lipinski e colaboradores (Lipinski, C.A. *et al.*, 1997) contribuíram para o desenvolvimento de novos fármacos em termos de uma abordagem experimental e computacional para estimar solubilidade e permeabilidade de novos candidatos a fármacos. Neste estudo, os autores formularam a regra dos cinco que prediz que uma molécula candidata a fármaco que apresentar pobre absorção e permeabilidade possui os seguintes parâmetros: LogP > 5, massa molecular MM > 500, números de doadores de ligação de H > 5 e número de aceptores de ligação de H > 10. Após a imensa contribuição de Lipinski, diversas metodologias semelhantes foram desenvolvidas e permitiram desenvolver vários softwares para predição de novos candidatos a fármacos, incluindo todos os parâmetros ADMETox da farmacocinética.

1.5. Validação do alvo - FAK e Hipertrofia Cardíaca

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), doenças cardíacas são responsáveis por 1/3 das causas de morte em todo o mundo. Nos Estados Unidos, cerca de 44% das mortes são causadas por doenças cardiovasculares (Dorn II, G. W. *et al.*, 2004).

A hipertrofia cardíaca constitui-se um fator de risco para diversas doenças cardiovasculares, como eventos isquêmicos, infartos e arritmias cardíacas. A hipertrofia é causada principalmente por hipertensão arterial e segundo dados de 2011, o Brasil possui 25% da população com hipertensão, sendo que aproximadamente metade destes pacientes desconhece a doença (Giorgi, D.M.A. 2011).

O músculo cardíaco exibe marcante grau de plasticidade fenotípica em resposta ao aumento de sobrecarga. Essa plasticidade é refletida principalmente pelo aumento no tamanho (i.e. hipertrofia) dos miócitos existentes, a qual é regulada por múltiplas vias de sinalização intracelular que culmina no aumento na síntese protéica e na biogênese de organelas (Frey, N *et al.*, 2004). A resposta hipertrófica inicialmente é benéfica, uma vez que aumenta o número de unidades contráteis e restabelece a tensão na parede das câmaras sobrecarregadas (Grossman, W *et al.*, 1975; Sadoshima, J & Izumo, S 1997; Russell, B *et al.*, 2000; Ruwhof, C & van der Laarse, A 2000; Frey, N *et al.*, 2004). Esta adaptação funcional é explicada pela Lei de Laplace que estabelece que a tensão na parede das câmaras cardíacas é determinada pela pressão intracavitária, pelo raio intracavitário e pela espessura da parede ventricular.

Seguindo a relação:

$$T = pr/2h$$

Onde:

T - é a tensão na parede das câmaras cardíacas;

p - é a pressão intracavitária;

r - é o raio interno da câmara;

h- é a espessura da parede das câmaras

Na sobrecarga hemodinâmica, o aumento de pressão resulta em sobrecarga de tensão no coração, e o aumento reativo da espessura da parede normaliza a tensão e preserva a função sistólica (Grossman, W *et al.*, 1975) (Figura 3).

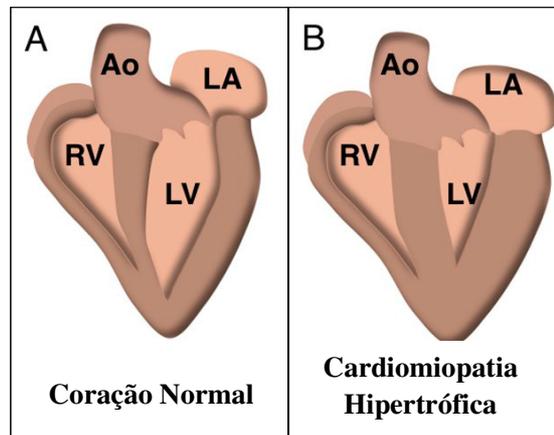


Figura 3. Ilustração esquemática da cardiomiopatia hipertrófica. **(a)** Coração saudável com volume das câmaras e espessura das paredes normais; **(b)** cardiomiopatia hipertrófica. Hipertrofia assimétrica do septo intraventricular e da parede posterior ventricular esquerda. Ao: aorta; LA: átrio esquerdo; LV: ventrículo esquerdo; RV: ventrículo direito. Figura adaptada de Harvey, PA & Leinwand, LA, 2011.

Contudo, a resposta hipertrófica prolongada pode promover alterações estruturais que levam a disfunção da contratilidade e do relaxamento do miocárdio que repercutem clinicamente como insuficiência cardíaca, condição grave, responsável por parte significativa das elevadas morbidade e mortalidade das doenças cardiovasculares.

A insuficiência cardíaca (I.C.) é uma síndrome clínica que consiste em grupo de sinais e sintomas principalmente relacionados à congestão de fluidos e diminuição da função ventricular (Ritter, O. *et al.*, 2003), sendo a fibrose miocárdica e a degeneração e morte dos miócitos os principais problemas fisiopatológicos no quadro de I.C (Dorn II, G. W. *et al.*, 2004).

A insuficiência cardíaca afeta cerca de 5 milhões de americanos com aproximadamente 400 mil novos casos diagnosticados a cada ano com um custo anual de mais de 20 bilhões de dólares. A realidade desses dados alarmantes está relacionada com a falta de terapias eficazes ou ainda que consigam reverter formas graves de I.C. (Dorn II, G. W. *et al.*, 2004).

Apesar do vasto conhecimento sobre os componentes individuais da sinalização mecânica, que promove a hipertrofia e insuficiência cardíaca, ainda pouco se sabe sobre a integração desses componentes. Aparentemente a mecanotransdução envolve proteínas que promovem a ativação de vias de sinalização de sobrevivência, hipertrofia e também remodelamento (Sussman, M.A. *et al.*, 2002).

Dentre as proteínas que respondem ao estresse mecânico, a quinase de adesão focal (FAK) tem se destacado com importante papel na regulação do crescimento hipertrófico e na sobrevivência do músculo cardíaco (Wang, H.B. *et al.*, 2001; Mitra, S.K. *et al.*, 2005; Cox, B.D. *et al.*, 2006;).

A quinase de adesão focal (FAK – *Focal Adhesion Kinase*) é uma proteína tirosina quinase não receptora, com papel essencial durante o desenvolvimento embrionário e na patogênese de doenças humanas, incluindo câncer e doenças cardiovasculares (Vadali, K. *et al.*, 2007; Golubovskaya, V.M. *et al.*, 2009). A expressão de FAK é requerida em vários tecidos para o desenvolvimento normal, sendo sua expressão necessária para o

desenvolvimento apropriado do coração (Shen, T.L.; *et al.*, 2005; Hakim, Z.S. *et al.*, 2007). De fato, tentativas de produzir camundongos com deleção gênica ampla da FAK resultaram em inviabilidade do embrião devido a defeitos no desenvolvimento (Ilic D. *et al.*, 1995).

FAK é expressa em abundância no miocárdio, sendo rapidamente ativada por sobrecarga pressora e também por agonistas como endotelina e angiotensina II (Eble, D.M. *et al.*, 2000; Taylor, J.M. *et al.*, 2000). Esta proteína sinalizadora foi originalmente descrita na década de 90 (Wang, H.B. *et al.*, 2001) em células em cultura localizada nos sítios de adesão ao substrato, o que despertou o interesse de caracterizá-la como um sinalizador envolvido na mecanotransdução entre o ambiente e as células. Em adição ao seu papel na adesão célula-matriz extracelular, FAK regula muitos outros processos biológicos, como migração, proliferação e sobrevivência celular (Mitra, S.K. *et al.*, 2005; Cox, B.D. *et al.*, 2006).

De acordo com a Figura 4, a estrutura primária da proteína é definida por um domínio central catalítico flanqueado pelo domínio N-terminal, conhecido como FERM (band four.1–ezrin–radixin–moesin) e a região C-terminal que compreende duas regiões ricas em prolina e um domínio de direcionamento as adesões focais (*FAT- Focal Adhesion Targeting*). FAT é composto por 4 α -hélices (Arold, S.T. *et al.*, 2002; Hayashi, I. *et al.*, 2002), e é crítico para a localização da FAK nos pontos de adesão focal. Via ligação à paxilina esse domínio não parece estar envolvido na regulação catalítica da FAK (Parsons, J.T. 2003; Lietha, D. *et al.*, 2007).

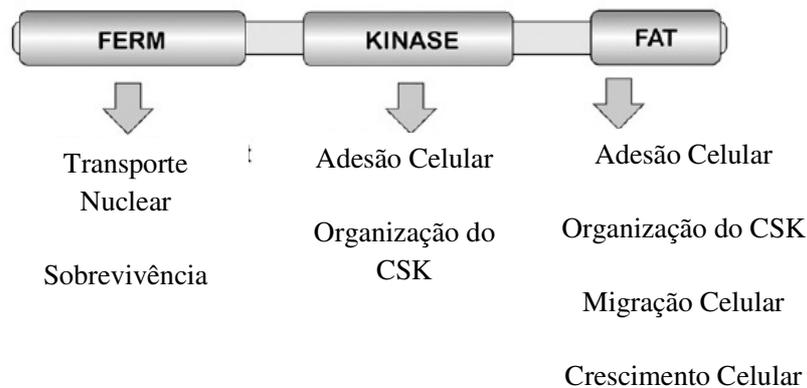


Figura 4. Estrutura da FAK e suas funções. FAK possui três domínios que consistem de um domínio quinase central que está intercalado pela região N-terminal e a região C-terminal. Múltiplas funções celulares mediadas pela sinalização relacionada a regiões específicas e domínios da FAK são indicadas no diagrama abaixo. Figura adaptada de Franchini, KG 2011.

Os três domínios são arranjados como uma estrutura globular tripartida com o domínio FERM organizado em uma compacta conformação em trevo com três subdomínios independentes (F1, F2 e F3). FERM conecta-se ao domínio catalítico por um *linker* desestruturado que contém o resíduo tirosina 397, importante na ativação enzimática (Figura 5). O domínio quinase é conectado ao domínio FAT pela região desenovelada rica em prolina (Nowakowski, J. *et al.*, 2002; Ceccarelli, D.F. *et al.*, 2006; Lietha, D. *et al.*, 2007).

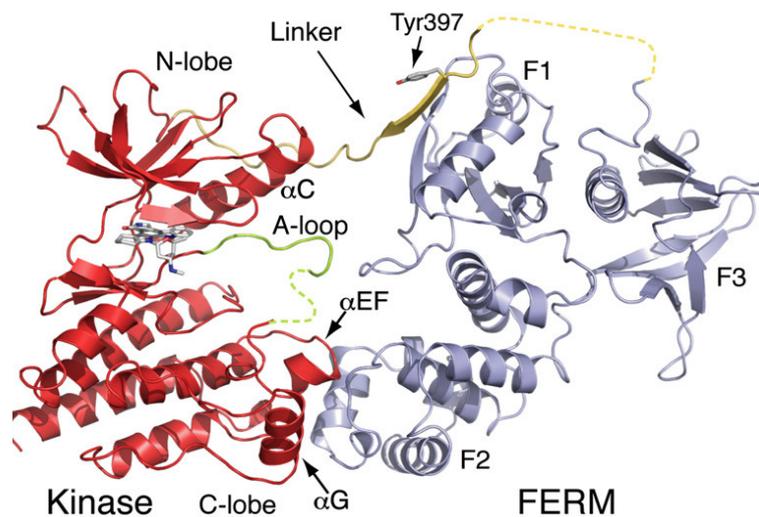


Figura 5. Estrutura auto-inibitória da FAK. O domínio FERM (representado em azul) liga-se ao domínio quinase (vermelho), por meio de uma interação entre o subdomínio F2 de FERM e o lóbulo C da quinase. A região de *linker* que contém o sítio de autofosforilação Tyr397 (amarelo) interage com o subdomínio F1 de FERM e o lóbulo N da quinase. O domínio FERM bloqueia o acesso ao sítio de ativação da quinase – loop A. Figura adaptada de Lietha, D. *et al.*, 2007.

A ativação da FAK depende da auto-fosforilação do resíduo de tirosina 397 (Tyr397) no *linker* entre FERM e quinase (Calalb, M.B. *et al.*, 1995; Polte, T.R. & Hanks, S.K. 1997; Franchini, K.G. *et al.*, 2000; Torsoni, A.S.; *et al.*, 2003). A Tyr397 fosforilada recruta outra tirosina quinase conhecida como Src, que, uma vez ativada, fosforila os resíduos Tyr576-577 da FAK incrementando sua atividade. A ativação local da FAK também promove recrutamento e agregação (“clusters”) de outras moléculas de FAK, amplificando o sinal do complexo protéico. A Src ativada também promove a fosforilação de resíduos adicionais da FAK como a Tyr 925 no domínio FAT. A fosforilação desse resíduo de tirosina forma um sítio de alta afinidade para proteínas como Grb2, Cas e

paxilina. Esta seqüência de ativação da FAK, bem como a estreita cooperação entre FAK e Src para a ativação, inicialmente demonstradas em outros tipos celulares, foi confirmada em miócitos cardíacos em resposta a estímulos mecânicos (Franchini, K.G. *et al.*, 2000; Domingos, P.P. 2002; Torsoni, A.S.; *et al.*, 2003). FAK é prontamente ativada pelo estresse mecânico que culmina com aumento da expressão de ANF e β -MHC, o que indica o potencial desta enzima como elemento de controle das alterações fenotípicas dos miócitos cardíacos induzidas por estímulos mecânicos (Torsoni, A.S.; *et al.*, 2003; Torsoni, A.S. *et al.*, 2005).

A importância da sinalização da FAK no crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo provocado por estímulos mecânicos também foi estudada em camundongos transgênicos, onde a expressão de FAK foi depletada de maneira condicional em cardiomiócitos (Di Michele, L.A. *et al.*, 2006; Peng, X. *et al.*, 2006). Nestes modelos, o coração se desenvolveu normalmente e apresentou função normal em condições basais. Contudo, de acordo com os resultados obtidos por Peng e colaboradores (2006), os animais submetidos à sobrecarga hemodinâmica apresentaram hipertrofia cardíaca excêntrica, fibrose intersticial multifocal, marcadores de hipertrofia aumentados quando comparados com animais controle, o que confirma as alterações fenotípicas do ventrículo esquerdo em decorrência de estímulos mecânicos. Por outro lado, DiMichele, L.A e colaboradores (2006), mostraram que a perda da expressão de FAK atenuava a resposta hipertrófica dos cardiomiócitos em relação à coarctação da aorta, incluindo a expressão de marcadores moleculares de hipertrofia. Quando os autores deste trabalho avaliaram a resposta do ventrículo esquerdo (VE) dos camundongos transgênicos à sobrecarga pressórica crônica, demonstraram que a sinalização da FAK pode ser importante na prevenção da deterioração funcional cardíaca. Contudo, existem estudos que sugerem que a ativação crônica da

sinalização da FAK pode contribuir para a deterioração do miocárdio, levando à insuficiência cardíaca. Bayer (2002) mostraram que as anormalidades estruturais e funcionais do VE de ratos submetidos à coarctação crônica da aorta abdominal suprarenal eram paralelas ao aumento da expressão e atividade da FAK no miocárdio. Lopes e colaboradores (2007) demonstraram a expressão elevada da FAK em biópsias de corações em falência provenientes de pacientes com regurgitação da mitral. Nestes estudos, o aumento da expressão de FAK parece ser devido à expressão nos fibroblastos, localizados nas regiões de fibrose, e não a FAK presente nos cardiomiócitos. Em um trabalho utilizando RNA de interferência específico para FAK, Clemente e colaboradores (2007) demonstraram que o silenciamento transiente da FAK em cardiomiócitos e fibroblastos previne as anormalidades estruturais e funcionais da hipertrofia do ventrículo esquerdo, assim como reverte a hipertrofia induzida por sobrecarga pressórica em camundongos.

Recentemente, também com o objetivo de entender o papel da FAK na hipertrofia cardíaca, Clemente e colaboradores (2011) desenvolveram camundongos transgênicos específicos para FAK no miócito cardíaco. Neste trabalho, foi observado que o aumento moderado da expressão de FAK induz características funcionais, estruturais e moleculares de uma hipertrofia cardíaca concêntrica compensada.

Em conjunto, estes dados sugerem que a FAK possui papel importante na instalação da hipertrofia cardíaca em resposta a sobrecarga pressórica, sendo um alvo biológico promissor para interferência farmacológica para o tratamento de hipertrofia cardíaca.

1.6. Validação do alvo - FAK e Câncer

A quinase de adesão focal (FAK) é uma importante mediadora da sinalização dos fatores de crescimento, proliferação, sobrevivência e migração celular. O desenvolvimento de malignidade está frequentemente associado à perturbações nestes processos, portanto, não é surpresa que a atividade da FAK esteja alterada em células cancerosas. Modelos animais têm mostrado que a expressão de FAK está aumentada na formação e progresso de tumores em diferentes locais como mama, colón, tireoide, próstata, pescoço, ovários, dentre outros (McLean G.W.; *et al.*, 2005). De fato, a expressão e atividade de FAK aumentada têm sido correlacionadas com metástase e pior prognóstico (Schlaepfer, D.D.; *et al.*, 2004).

Interessantemente, a fosforilação de FAK em sítios específicos parece estar associada com diferentes tipos de tumor. No tecido ovariano, por exemplo, FAK fosforilada no resíduo Tyr397 foi detectada em tumores invasivos, mas não no epitélio normal (Grisaru-Granovsky, S. *et al.*, 2004). Em câncer de colon, a fosforilação de FAK parece estar associada à expressão de peptídeo liberador de gastrina e diferenciação tumoral (Matkowskyj, K. A. *et al.*, 2003). Além disso, FAK tem sido encontrada em células endoteliais de vasos sanguíneos angiogênicos de astrocitomas malignos, onde parece contribuir para a angiogênese. Estas observações mostram que a expressão e a atividade de FAK são fatores importantes no desenvolvimento e progressão tumoral (Lechertier, T.; Hodivala-Dilke, K.; 2012). Em conjunto, todas as constatações, colocam a FAK como um alvo terapêutico potencialmente importante, podendo direcionar o desenvolvimento de inibidores de FAK também para o tratamento de câncer.

1.7. Obtenção de um protótipo - Quinazolinonas

Quinazolinona é um composto que possui um núcleo quinazolinona (**1**, 1,3-benzodiazinona) e quinazolina (**2**, 1,3-benzodiazina) possui um anel benzênico acoplado a uma pirimidina. Outras estruturas nitrogenadas tais como a cinolina (1,2-benzodiazina), a ftalazina (2,3-benzodiazina), e a quinoxalina (1,4-benzodiazina) são os isômeros identificados pelas posições dos dois átomos de nitrogênio no anel benzênico da pirimidina (Armarego, W. L. F. *et al.* 1996). As quinazolinonas podem apresentar atividade biológica diversa o que as tornam um bom modelo para geração de bibliotecas de compostos químicos (Selvam T.P.; Kumar P.J. 2011). A primeira quinazolinona sintética foi denominada *Cyanoquinazolinone* foi preparada em 1860, e a primeira quinazolinona com interesse médico foi denominada Febrifugine® usada no tratamento de malária (Keller, T.C. 2012). O desenvolvimento da pesquisa de compostos quinazolinônicos com atividade biológica iniciou quando o composto 2-metil-1,3,4-triazoloquinazolinona foi sintetizado. Este composto tem ação soporífera e sedativa. Nos últimos quinze anos em pesquisa médica, as quinazolinonas têm sido caracterizadas por vantagens significativas (Selvam T.P.; Kumar P.J. 2011). Em 1968, apenas dois derivados foram usados como sedativo e anticonvulsivante (methaqualone) e diurético (quinathazone). Em 1980, cerca de cinquenta tipos de derivados desta classe incluindo compostos medicinais com diferentes ações biológicas foram utilizados, tais como: sedativo, tranqüilizante, analgésico, anticonvulsivante, antitussígeno, miorelaxante, antireumático, hipotensivo, antialérgico, broncodilatador, antidiabético, colagogo, diurético, antimalárico, espermicida, etc. (Selvam T.P.; Kumar P.J. 2011).

Atualmente, as quinazolinonas têm sido usadas como fármacos, alguns exemplos estão descritos a seguir:

Prazosin (Shen, H. 2008) é um fármaco usado para o tratamento de hipertensão. Este fármaco é um inibidor α -adrenérgico que é capaz de abaixar a pressão sanguínea por causar vasodilatação e reduzir a resistência periférica. Prazosin é seletivo para receptores α_1 na músculo liso vascular. Esses receptores são responsáveis pela ação vasoconstritora da noraepinefrina que normalmente aumenta a pressão sanguínea.

Gefitinib (Pao W.; Miller V.; Sakowski M. 2004) também conhecido como Iressa[®] comercializado pela Astra Zeneca e Teva. É um fármaco usado no tratamento de certos tipos de câncer. Gefitinib é um inibidor do EGEF (*epidermal growth factor receptor*), isto é, receptor do fator de crescimento epidermal.

Erlotinib (Selvam T.P. 2011) recebe o nome de Taceva[®] é um fármaco usado para o tratamento de certos tipos de câncer de pulmão, pâncreas e vários outros tipos de câncer.

Trimetrexate (Smith H.O. *et al.*, 2002) é um inibidor de ácido fólico através da inibição da enzima diidrofolato redutase. Este fármaco tem sido testado como agente antineoplásico e como agente antiparasitário

Além dos exemplos acima, existem outras quinazolininas que são consideradas fármacos (Selvam T.P. 2011).

Recentemente, nosso grupo obteve uma quinazolinina patenteada como inibidor de adenosina quinase (Franchini, K.G. *et al.*, 2004).

O inibidor da FAK desenvolvido pela Novartis que é um derivado pirrolopirimidínico (Choi, H.-S. *et al.*, 2006) apresenta um grupo farmacofórico bastante semelhante às quinazolininas o que justificou a escolha das quinazolininas como escolha do protótipo deste trabalho.

1.8. Otimização do protótipo – Quinazolininas substituídas.

Ferramentas computacionais, tais como estudo de *docking* molecular, determinação de parâmetros farmacocinéticos *in silico*, métodos experimentais de triagens com células que superexpressam uma proteína de interesse denominado sistema Flp-In permitem selecionar inibidores mais promissores. Utilizando essas ferramentas torna-se possível realizar a otimização do protótipo. Um bom exemplo dessas ferramentas são as células que superexpressam uma proteína de interesse. Utilizando tais células pode-se fazer uso de teste para inibidores em diferentes concentrações para determinar quais inibidores são melhores em teste *in vitro* para descoberta de novos fármacos. Ensaio de quinase *in vitro* também permitem avaliar os inibidores mais promissores. Diante de ensaios preliminares é possível realizar as substituições necessárias nas quinazolininas para escolher e/ou fazer a otimização do protótipo que pode ser denominado como composto líder.

1.9. Hipótese

- 1) Novas quinazolininas sintetizadas de acordo com planejamento racional de fármacos podem ter capacidade de inibir a Quinase de Adesão Focal (FAK).
- 2) Uma vez que a FAK está com atividade aumentada em quadros de hipertrofia e fibrose cardíaca que pode levar ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, e também em diversos tipos de câncer, um novo inibidor desta enzima poderá ser um bom fármaco contra estas morbidades.

1.10. Objetivo

O objetivo geral deste projeto foi planejar, sintetizar e caracterizar derivados inéditos de quinazolininas e avaliá-los quanto ao potencial de inibição sobre a quinase de adesão focal (FAK) *in vitro* e *in vivo*.

De acordo com objetivo geral deste projeto, foram realizados os seguintes experimentos:

2.1 - Ensaios virtuais por meio de estudo de *docking molecular* entre inibidores propostos e a FAK, para a seleção de potenciais inibidores que possam ser sintetizados.

2.2 - Síntese e caracterização de novas quinazolininas de acordo com os estudos computacionais realizados para inibição da FAK.

2.3 – Ensaios experimentais *in vitro* para determinar os compostos mais promissores como inibidores da FAK. Seleção por triagem em células cancerosas (leucêmicas e tumor sólido). Identificação de um composto líder para realizar os estudos em modelos animais.

2.4 – Estudos em modelos animais de hipertrofia cardíaca e fibrose para avaliar os efeitos do composto líder para tratamento preventivo e curativo de hipertrofia e fibrose cardíaca.

2.5 – Avaliação do composto líder em animais transgênicos específico para a FAK.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Estudos Computacionais:

2.1. Estudos Computacionais dos parâmetros ADME-TOX para os compostos candidatos a fármaco como inibidores da FAK.

A avaliação *in silico* entre os compostos propostos para a síntese e também o composto inibidor seletivo da FAK foi realizada pelo software *Monlinspirations e Pharma Algorithms* (Pharma Algorithms, Toronto, Canada, 2008). Os compostos foram desenhados em programas apropriados e salvos em arquivos específicos. Estes possuem extensões compatíveis com o software *Pharma Algorithms* o qual realiza todas as predições dos parâmetros farmacocinéticos referentes aos compostos desenhados.

Os parâmetros avaliados pelo *Pharma Algorithms* são:

- a) Biodisponibilidade oral – consegue-se obter um relatório rápido de uma série de propriedades e fatores que impedem uma alta biodisponibilidade oral.
- b) Absorção passiva – o movimento da droga na circulação sanguínea pode ser importante para o efeito medicinal ocorrer. A absorção é o foco primário na descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.
- c) Penetração da barreira hemato encefálica – permite evitar o uso dos testes dispendiosos *in vitro* na triagem inicial para prever a penetração na barreira hemato encefálica, expresso pela constante de log PS *in silico* obtido para os compostos.
- d) Distribuição – muitos fatores estão envolvidos na distribuição de fármacos, uma vez que os mesmos se encontram na circulação sistêmica. Este modelo estima a força de ligação do fármaco à proteína plasmática, que tem um papel chave na determinação da distribuição do fármaco no corpo, além de estimar o volume de distribuição aparente (VD).

e) Especificidade CYP3A4 – permite compreender o potencial metabólico dos compostos candidatos a fármacos. Este modelo calcula a probabilidade de um composto ser um substrato ou inibidor de CYP3A4.

d) Dose máxima recomendada diariamente - este modelo fornece uma estimativa aproximada de dose oral máxima de fármacos que podem ser usados na clínica.

f) Genotoxicidade – fácil identificação de compostos com potencial carcinogênico pela triagem *in silico*. Permite prevenir futuras falhas no desenvolvimento de novos fármacos e serve como um guia de síntese química para evitar genotoxicidade. Neste módulo, consegue-se obter predições para a probabilidade de um teste AMES positivo.

g) Toxicidade aguda – a toxicidade aguda de um composto, isto é, o potencial acumulativo que causa efeitos agudos e morte. Neste módulo, consegue-se obter valores estimados de DL₅₀.

h) Efeito saúde – prevê a probabilidade de toxicidade de um composto em um órgão ou sistema em particular. Baseado em estudos de longo prazo para avaliar a toxicidade específica englobando várias vias de administração.

Os cálculos são amparados por resultados estatísticos presentes em intervalos de confiança para cada correlação. As estimativas são classificadas de acordo com o índice de confiabilidade (RI) (Pharma Algorithms, Inc.; Tauro 12, Vilnius 2001, Lithuania), representado abaixo:

RI < 0,3 – não confiáveis

RI no intervalo de 0,3 – 0,5 – limite de confiabilidade

RI no intervalo de 0,5 – 0,75 – confiabilidade moderada

RI ≥ 0,75 – alta confiabilidade

2.2. Modelos de predição

a) Biodisponibilidade oral

O modelo construído para a predição de biodisponibilidade oral humana de novos compostos utiliza uma combinação de dois métodos – probabilístico e mecanístico. Para que uma droga seja biodisponível deve cumprir os seguintes requisitos:

- Dissolver no estômago e intestino sobre variação de pH,
- Resistir à hidrólise ácida em $\text{pH} < 2$,
- Permeiar através das membranas plasmáticas das células da mucosa intestinal por transporte ativo ou passivo,
- Resistir ao efeito de primeira passagem no fígado.

O software permite uma avaliação dos fatores que afetam a biodisponibilidade oral, tais como:

- 1) **Solubilidade em água**: uma boa solubilidade em água é obtida para valores de $\log SW > -4$ ($SW = 1 \times 10^{-4}$ mg/ml) para eletrólitos e $\log SW > -3$ ($SW = 1 \times 10^{-3}$ mg/ml) para não eletrólitos. Para compostos com pobre solubilidade têm-se calculado $\log SW < -6$ ($SW = 1 \times 10^{-6}$ mg/ml) para eletrólitos e $\log SW < -4.5$ ($SW = 1 \times 10^{-4.5}$ mg/ml) para não eletrólitos.
- 2) **Estabilidade**: susceptibilidade à hidrólise ácida no estômago.
- 3) **Absorção passiva**: capacidade de atravessar as membranas das células da mucosa intestinal por difusão passiva.
- 4) **Metabolismo de primeira passagem**: susceptibilidade às transformações metabólicas catalisadas por enzimas hepáticas e intestinais.

O *Pharma Algorithms* realiza uma análise comparativa entre a molécula desenhada e um banco de dados contendo aproximadamente 790 compostos para estimar a sua biodisponibilidade oral (%F), onde: F% (oral) – é o valor médio experimental de biodisponibilidade oral humana.

b) Solubilidade

A predição de solubilidade (log SW, mg/ml) de um composto em água pura a 25°C pode ser obtida pelos cálculos comparativos entre a estrutura e um conjunto de dados com mais de 6800 compostos tabelados. Também são calculadas as estimativas de log de S para diferentes valores de pH fisiológicos.

Nota: As classes de solubilidade podem ser definidas em relação aos valores citados abaixo:

- Alta insolubilidade – $SW < 0,1$ mg/ml
- Insolubilidade – $SW < 1$ mg/ml
- Moderada solubilidade – $SW > 1$ mg/ml
- Solúvel – $SW > 10$ mg/ml

c) Absorção

O modelo de predição de absorção permite avaliar propriedades físico-químicas tais como os valores de logP, de pKa (ácido), de pKb (base), de limite máximo da absorção intestinal passiva, de sua permeabilidade no jejuno humano e de sua taxa de absorção. Esse modelo foi construído com base em aproximadamente 600 pontos de dados de absorção intestinal e utiliza propriedades físico-químicas tais como a constante de

lipofilicidade e de ionização (calculada ou experimental). As seguintes propriedades são relacionadas com a absorção:

- Absorção intestinal: Quando solúvel – a dissolução não é um fator limitante.
- Permeabilidade no jejuno em cm/s.
- Taxa de absorção (K_a) em min^{-1} .

d) Distribuição (%PPB)

Este modelo pode ser utilizado para estimar a fração de proteínas plasmáticas e a constante de equilíbrio para um composto ligado à soroalbumina. Este parâmetro pode ser obtido através dos valores de propriedades físico-químicas (lipofilicidade, constantes de ionização, capacidade de ligação de hidrogênio) e dos descritores estruturais dos compostos.

e) Volume de Distribuição

Este modelo contém um algoritmo preditivo que gera uma estimativa quantitativa do volume aparente de distribuição de um composto. Parâmetros físicos, estado de carga, lipofilicidade, capacidade de ligação de hidrogênio são automaticamente computados e utilizados como *inputs* para o modelo preditivo do volume de distribuição.

f) Coeficiente de Partição - Log P

Este modelo calcula o valor do coeficiente de partição em octanol-água. Considerando a molécula da aspirina, as partes lipofílicas da molécula são destacadas

em verde, grupos hidrofílicos em vermelho e a intensidade da cor indicam o grau de lipofilicidade e hidrofílicidade de um átomo ou uma subestrutura (Figura 6).

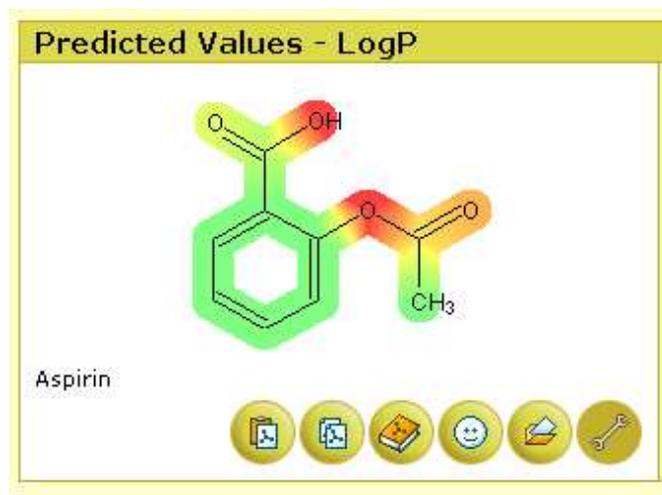


Figura 6. As partes lipofílicas da molécula da aspirina em verde e grupos hidrofílicos em vermelho.

g) Predição de Ionização

A predição baseia-se na ionização de mais de 12000 compostos cadastrados. O software calcula a constante de dissociação, frações de diferentes estados da molécula e coeficientes de partição aparente em octanol-água. O cálculo de pKa, baseia-se:

- Calcular as constantes de dissociação K_a para o ácido e os centros básicos de ionização. Resultados apresentados em uma escala logarítmica ($pK_a = -\log K_a$).
- Calcular o número total de grupos ionizáveis e cargas permanentes.
- Calcular frações de quatro principais formas para variações de pH.

h) Genotoxicidade

Este modelo realiza previsões utilizando mais de 8500 compostos diversos e fornece dados referentes ao potencial de mutagenicidade da molécula analisada no teste de AMES. A Figura 7 apresenta uma estrutura proposta no estudo que foi calculada para avaliar a sua mutagenicidade.



Figura 7. As partes da estrutura com propriedade mutagênica estão destacadas em vermelho e em verde a parte que não está envolvida com atividade mutagênica.

O teste de AMES é utilizado como *screening* inicial para determinar propriedades mutagênicas de novas substâncias. Trata-se do uso em curto prazo para mutação reversa em um teste bacteriano. Este teste é realizado em várias espécies de bactérias como *Salmonella thyphimurium* e *Escherichia coli*.

i) Efeitos na saúde

Este modelo avalia os efeitos à saúde com base em estudos em longo prazo com os efeitos adversos notificados em determinados órgãos ou sistemas orgânicos. Dados de estudos de carcinogenicidade crônica, sub crônica e aguda em várias espécies e vias de administração. A base de dados é composta por mais de 100.000 compostos. A Figura 8 apresenta uma ilustração do efeito nocivo à saúde, onde em

amarelo são as partes da molécula que não estão relacionadas com o efeito saúde e em vermelho são seções que estão associadas à ação tóxica do composto em um determinado órgão.

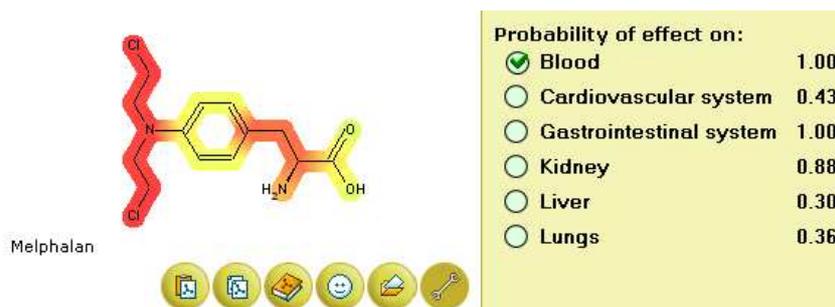


Figura 8. A estrutura do *Melphalan*, dada como exemplo, apresenta efeito tóxico no sangue com probabilidade de 100%. Cada sistema fisiológico pode ser avaliado para efeito tóxico.

j) Toxicidade aguda DL₅₀

A toxicidade aguda sistêmica da substância química é definida como uma dose que é letal para 50% dos animais tratados. É chamada de dose letal 50 (DL₅₀). A dose letal DL₅₀ (mg/kg) pode ser calculada para doses administradas via oral, intraperitoneal, intravenosa e subcutânea para ratos e camundongos. Os dados de mais de 100.000 compostos são utilizados no desenvolvimento deste módulo de cálculos. Fragmentos de compostos e estudos de QSAR (relações quantitativas estrutura-atividade) foram utilizados para a construção do algoritmo, sendo que a DL₅₀ foi descrita como linha na matriz da base de cálculos. As previsões são corrigidas de acordo com a análise experimental dos valores de DL₅₀ para compostos semelhantes. As estimativas de DL₅₀ levam em conta a:

- Similaridade dos compostos testados para definir a formação;

- Diferença entre DL_{50} prevista para compostos testados e valores experimentais para compostos semelhantes;
- Consistência dos valores experimentais de compostos semelhantes.

Primeiramente, foi descrito alguns dos parâmetros que podem ser estimados a partir do desenho das estruturas. A predição de parâmetros tais como log P, distribuição, toxicidade e solubilidade podem ajudar na redução de tempo e custos experimentais.

Todos os procedimentos computacionais foram realizados com Algoritmo Builder (AB). Ele é um sistema de multitarefa que fornece todos os métodos necessários para a realização dos cálculos em um único programa. A Figura 9 mostra o desenvolvimento dos procedimentos. Estes incluíram: (1) cálculo dos descritores físico-químicos, (2) fracionamento dos compostos em fragmentos e interações, (3) generalização de fragmentos e interações baseadas na similaridade e agrupamento hierárquico (HC), (4) automatização e geração de dados como matriz (linhas-estruturas, colunas-descritores), (5) particionamento recursivo (RP), que fragmenta as moléculas para a correlação, e (6) a construção do rastreo de filtro para a seleção dos melhores descritores moleculares (AB / HIA) (Zmuidinavicius, *et al.*, 2003). RP é um método estatístico de agrupamento de compostos em classes de acordo com semelhanças estruturais e de atividades biológicas (Chen, X. *et al.*, 1999). É um procedimento multifuncional que identifica a maioria dos fatores estruturais e físico-químicos mais importantes que podem afetar as atividades biológicas. A cada passo todos os descritores moleculares são analisados seqüencialmente para encontrar o melhor critério para a divisão dos compostos em duas classes (como classificação "boa" ou "pobre"). Se um dado descritor apresenta valores discretos (por exemplo, descritores fragmentados), cada valor é utilizado como um critério separado. Se outro descritor tem valores contínuos (por exemplo, descritores físico-químicos), esses valores são analisados como simples critérios

qualitativos. Quando o melhor critério é encontrado, o procedimento é repetido para cada uma das classes de compostos. O processo vai sendo executado até que uma significância estatística seja atingida para o fracionamento de compostos. O resultado é uma relação C-SAR (*Compound-Structure Activity Relationship*) baseada em descritores moleculares mais importantes que podem definir uma atividade biológica potencial para o composto.

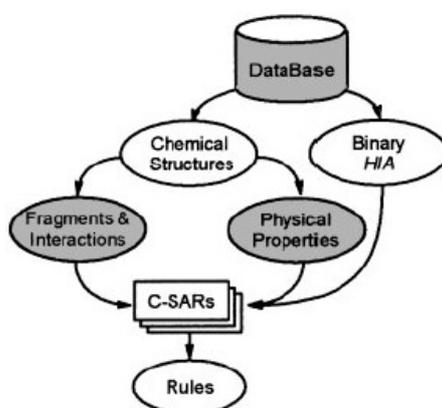


Figura 9. Processos evolutivos na coleta, análise e hierarquização e correlação para análise dos fragmentos de compostos submetidos aos cálculos. Adaptado por Zmuidinavicius *et al.*, 2003.

2.3. Docking Molecular

A aproximação do receptor, conhecida por estudo de *docking*, é um recurso computacional importante para realizar comparações entre moléculas análogas e o sítio ativo da enzima de interesse. O modo de interação das moléculas com essas enzimas permite a opção de seletividade de compostos análogos frente a uma enzima alvo. A docagem e a dinâmica molecular dos sistemas em *docking* são realizadas por uma variedade de programas computacionais, como, por exemplo, MVD (Molegro Virtual

Docker) (Thomsen, R.; Christensen, M.H.; 2006) e SOFTDOCK-ICM (Abagyan, R.A.; *et al.*, . 1994).

O método baseia-se no uso de coordenadas atômicas para representar uma molécula em *docking* com outras moléculas, utilizando campos de força atômicos simulados computacionalmente. Várias representações da superfície molecular e volume têm sido desenhados. O método está, muitas vezes, relacionado à pesquisa de algoritmos de soluções espaciais. A solução espacial é definida pela rotação relativa e translação entre as moléculas em *docking* e também outros graus de liberdade, incluindo a flexibilidade conformacional do ligante e do receptor (Thomas, G.; 2003).

Neste estudo, foi utilizado o banco de dados de proteína (PDB) e o programa GRAMM (<http://reco3.ams.sunysb.edu/gramm>) que iguala elementos da estrutura secundária com as bases de dados. A vantagem disso é permitir uma melhor compreensão dos princípios da estrutura de proteína que pode facilitar o desenvolvimento de melhores métodos para a predição das estruturas de proteínas.

Coordenadas do cristal da enzima em estudo (FAK) ligada com inibidor seletivo foram obtidas do banco de dados de proteínas (código PDB: 2ETM). Os compostos candidatos à síntese foram submetidos aos estudos de *docking*, dentro do sítio ativo da FAK. As estruturas tridimensionais (3D) dos compostos foram obtidas a partir do programa SOFTDOCK – ICM, utilizando-se os cristais das estruturas do inibidor seletivo ligado à FAK como modelo. Subsequentemente, as geometrias completamente otimizadas e os cálculos de distribuição das cargas atômicas dos ligantes foram realizados com o mesmo programa, utilizando o método semi-empírico AM1. Os compostos foram “docados” dentro do sítio ativo da enzima FAK, empregando-se o *Molegro Virtual Docker* (MVD). Esse programa permite prever a conformação mais provável com que um ligante poderia se

ligar a uma macromolécula. A função MolDock de “*scoring*” (*Mol Dock score*), utilizada pelo programa MVD, é derivada do *Potencial linear piecewise*, PLP e estendida no *Generic evolutionary method for molecular DOCK* (GEMDOCK) com um novo termo de ligações de hidrogênio e novos esquemas de cargas (Yang, J-M.; *et al.*, 2004). O algoritmo de busca do estudo de *docking* foi o MVD baseado em técnicas interativas de otimizações, inspiradas pela teoria evolucionista de Darwin (algoritmos evolucionários – AE). O potencial sítio de ligação do receptor FAK foi calculado utilizando-se o algoritmo do programa para detecção da cavidade do receptor. Moléculas ligantes e um conjunto de regiões compostas de todos os resíduos de aminoácidos (cadeia lateral), tendo pelo menos um átomo distante a 12 Å do centro do ligante seletivo, foram considerados flexíveis durante a simulação de *docking*. Foi então selecionada a conformação de cada composto usando suas melhores similaridades espaciais com o inibidor seletivo, que foram representadas pelas estruturas com as energias de interações mais favoráveis entre o posicionamento do ligante e a proteína. Uma segunda simulação foi realizada com os mesmos parâmetros, porém utilizando o software SOFTDOCK – ICM para corroborar com os resultados deste estudo.

2.4. Síntese

As sínteses das novas quinazolininas 2,4,8-substituídas foram propostas pelos esquemas das Figuras 10, 11a e 11b.

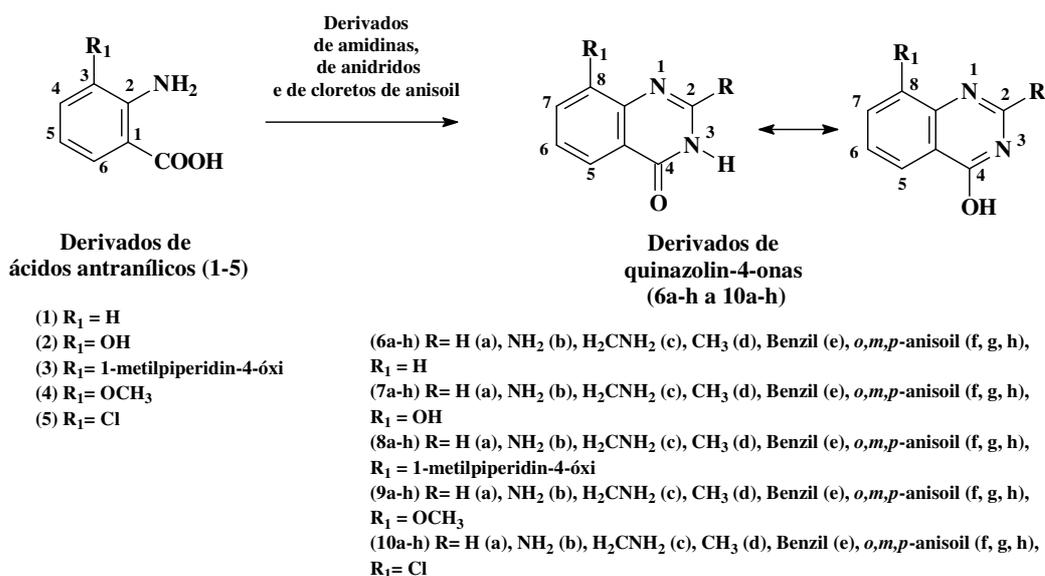
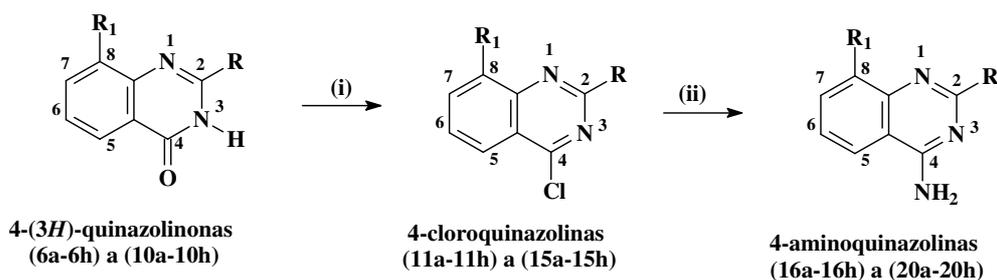


Figura 10. Procedimento de ciclização para derivados de 4-(3*H*)-quinazolinonas. *Reagentes e condições:* (a) acetato de formamidina, 140°C, 8 horas (Tobe, M. *et al.*, 2003); (b) dicloridrato de guanidina; NaOEt, EtOH, 130°C, 5 horas. (c) dibromidrato de 2-aminoacetamidina, MeOH, 80°C, 6 horas; (Connolly, T.J.; *et al.*, 2005) (d-e) anidridos acético e benzóico, refluxo, 2 horas e NH₃; (f-h) (i) Cloreto de *o, m, p*-anisoila, Et₃N, THF, TA, 3 horas; (ii) NH₃; (iii) 5% KOH aq, EtOH, refluxo, 1 hora.



(6, 11, 16) R= H (a), NH₂ (b), H₂CNH₂ (c), CH₃ (d), Benzil (e), *o,m,p*-anisoil (f, g, h),
R₁ = H
(7, 12, 17) R= H (a), NH₂ (b), H₂CNH₂ (c), CH₃ (d), Benzil (e), *o,m,p*-anisoil (f, g, h),
R₁ = OH
(8, 13, 18) R= H (a), NH₂ (b), H₂CNH₂ (c), CH₃ (d), Benzil (e), *o,m,p*-anisoil (f, g, h),
R₁ = 1-metilpiperidin-4-óxi
(9, 14, 19) R= H (a), NH₂ (b), H₂CNH₂ (c), CH₃ (d), Benzil (e), *o,m,p*-anisoil (f, g, h),
R₁ = OCH₃
(10, 15, 20) R= H (a), NH₂ (b), H₂CNH₂ (c), CH₃ (d), Benzil (e), *o,m,p*-anisoil (f, g, h),
R₁ = Cl

Figura 11. (a). Etapas para a formação de derivados de cloroquinazolinas e aminoquinazolinas. *Reagentes e condições:* (i) Derivado clorado: 1) SOCl₂ ou POCl₃, DMF catalítico, refluxo, 3horas; 2) CH₂Cl₂, H₂O, NaHCO₃. (ii) 1) NH₃, isopropanol, refluxo, 2horas. (Tobe, M. *et al.*, 2003). (iii) Condições de alquilação: 1) Me₂SO₄, NaOH, EtOH, refluxo, 3horas; 2) 1-metilpiperidin-4-ol, trifenilfosfina (Ph₃P), DTAD (di-*terc*-butilazacarboxilato), diclorometano (DCM), T. A.; 2horas.

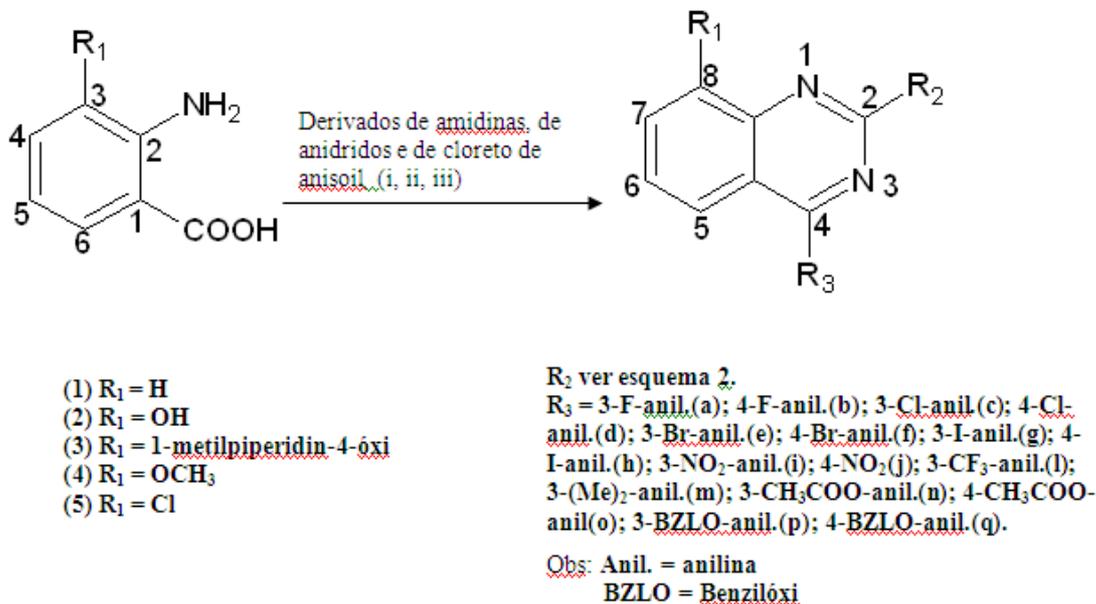


Figura 11 (b). Etapas para a formação de derivados de cloroquinazolinonas e aminoquinazolinonas. *Reagentes e condições:* (i) Derivado clorado: 1) SOCl₂ ou POCl₃, DMF catalítico, refluxo, 3horas; 2) Retirada do SOCl₂ ou POCl₂. (ii) 1) R₃, isopropanol, refluxo, 2horas.(Tobe, M. *et al.*, 2003) (iii) Condições de alquilação: 1) Me₂SO₄, NaOH, EtOH, refluxo, 3horas; 2) 1-metilpiperidin-4-ol, trifetilfosfina (Ph₃P), DTAD (di-*tert*-butilazocarboxilato), diclorometano (DCM), T. A.; 2horas.

2.4.1. Protocolo de síntese

Em um balão de fundo redondo de 50 ml foram adicionados 5,08 mmol de derivado de ácido antranílico e 45,4 mmol de acetato de formamida (em excesso molar de 8,94), os quais foram homogenizados. A reação foi conduzida em fase sólida durante 5 horas com aquecimento a 110°C. Após às 5 horas foram adicionados 4 ml de ácido acético glacial. O produto obtido foi filtrado a vácuo utilizando-se papel de filtro qualitativo e lavado com água abundantemente, para remoção do excesso de acetato de formamida. Após a secagem, foi determinado o rendimento desta etapa, que ficou entre 92-93 %. Os produtos

cíclicos, derivados de quinazolinonas, foram utilizados na segunda etapa sintética, em que 0,85 mmol deste foi reagido com 2,5 ml de cloreto de tionila (SOCl₂), na presença de 10 µl de *N,N*-dimetilformamida (DMF), num sistema de refluxo. A síntese foi conduzida a 80°C por 2 horas. O excesso de SOCl₂ foi removido por destilação à vácuo e/ou neutralização. Logo, o produto (4-cloroquinazolina) obtido foi reagido com orto, meta, para - anilina (~1 mmol), utilizando-se 5 ml de isopropanol como solvente para o último passo sintético. Esta reação foi conduzida utilizando sistema de refluxo a 110°C por 3 horas. O produto obtido foi filtrado à vácuo aplicando papel de filtro qualitativo e lavado abundantemente com isopropanol. A 4-anilinoquinazolina foi levada à secagem para caracterização e rendimentos.

2.5. Caracterização dos compostos quinazolínicos sintetizados

2.5.1. Ressonância Magnética Nuclear ¹H e Ressonância Magnética Nuclear ¹³C

Os experimentos de RMN foram realizados utilizando o espectrômetro Agilent/Varian Inova de 600-MHz do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), equipado com uma sonda de ressonância tripla criogênica. As amostras foram diluídas em DMSO deuterado e analisados em software específico.

2.5.2. Espectrometria de Massas

As medidas de massa exata foram feitas em um instrumento Waters Synapt HDMS (Manchester, UK), com geometria quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), equipado com fonte de ionização *porelectrospray* (ESI). As amostras foram solubilizadas em DMSO em concentrações na faixa de mM, diluídas para concentrações entre 1 e 10 µM com solução de H₂O/MeCN 50:50 contendo 0,1% de ácido fórmico (v/v). Em seguida, as amostras foram

coletadas com uma seringa de 250 µl (Hamilton) e injetadas por infusão direta a um fluxo de 10 µl/min pela bomba de seringa do próprio instrumento. Os espectros de MS (*fullscan*) foram adquiridos no modo *reflectron-W* a uma taxa de 1 espectro/s. Previamente às análises, o instrumento foi calibrado com oligômeros de ácido fosfórico (solução de H₃PO₄ 0,05% v/v em H₂O/MeCN 50:50) de *m/z* 90 a 1000. Os espectros adquiridos foram processados no próprio software do instrumento (MassLynx v.4.1.).

2.6. Avaliação da Pureza do composto do 4-BZLO por HPLC

As análises cromatográficas foram realizadas em um equipamento Alliance série Waters 2695 (Milford, Mass, USA), equipado com bomba quaternária, injetor e desgaseificador automáticos e detector espectrofotométrico UV-Vis (PDA) série Waters 2996. A separação dos compostos [4-BZLO e 3I (padrão interno)] foi realizada, à temperatura ambiente, em uma coluna cromatográfica de fase reversa OmniSpher C18 (250 mm x 4.6 mm de diâmetro interno e 5 µm de tamanho de partículas) protegida com uma pré-coluna ChromoSep SS (10 mm x 3 mm) (ambas obtidas da Varian, CA, USA). A fase móvel usada para promover a separação cromatográfica foi composta de 70% de acetonitrila e 30% de tampão acetato de amônio (0,1 mol L⁻¹ e pH 7,2) (v/v). A fase móvel foi preparada diariamente e filtrada em um sistema a vácuo através de um filtro de 0,45 µm (Millipore, Milford, Mass, USA). A coluna foi equilibrada e eluída sob condições isocráticas, utilizando fluxo de 1.0 ml/minuto. O comprimento de onda máximo de detecção dos compostos e do padrão interno 3I foi estabelecido em 330 nm e o tempo total de corrida para cada amostra foi de 8 minutos.

O controle do sistema, a aquisição e o processamento dos dados foram realizados através de um computador PC-Pentium IV da Dell, que operou com o programa Microsoft Windows XP Professional versão 2003 e com o programa cromatográfico Empower 2002.

Os gráficos de calibração foram calculados através de análise de regressão linear da razão da área do pico do **4-BZLO** pela área do pico do padrão interno 3I (compostos/3I) (eixo y) versus a concentração do padrão nominal dos compostos (eixo x), utilizando o programa Excel versão 2003.

2.7. Screening *in vitro* para teste de inibição enzimática em células Flp-In que superexpressam a FAK.

O sistema Flp-InTMT-RexTM (www.invitrogen.com) permite a geração de linhagens de células de mamíferos (HEK – *Human Embryonic Kidney*) estáveis que expressam um gene de interesse induzível por tetraciclina. Para gerar as linhagens celulares, o sistema Flp-InTMT-RexTM envolve os seguintes passos:

- Integração independente de dois plasmídeos dentro do genoma da linhagem de célula de mamífero escolhida para gerar a linhagem hospedeira Flp-InTMT-RexTM, sendo:
 - a) Um plasmídeo contendo um sítio para alvo de recombinação, chamado sítio FRT (*Flp Recombination Target*).
 - b) Um plasmídeo expressando o repressor Tet.
- Integração de um vetor de expressão contendo seu gene de interesse sobre o controle de um promotor CMV (Citomegalovírus) regulado por tetraciclina (operador TetO₂) dentro do genoma via recombinação de DNA mediada por Flp recombinase no sítio alvo de recombinação FRT (O’Gorman, S. *et al.*, 1999).

- Indução do gene de interesse pela adição de tetraciclina.

As linhagens HEK 293 com expressão induzível da construção FLAG-FAK (Sistema Flp-In T-REx – Invitrogen) foram construídas para *screening in vitro* para teste de inibição enzimática em células. Uma vez estabelecida, esta linhagem permite a expressão do gene exógeno em altos níveis e de forma controlada, por meio da adição do indutor no meio de cultura. O plasmídeo pcDNA 5 (Figura 12) foi construído para a co-transfecção com o plasmídeo pOG44, o qual contém a *Flp* recombinase que promove a inserção do gene de interesse no genoma por meio de recombinação. Uma vez que o vetor pcDNA5/FRT/TO[®] foi integrado de forma estável ao genoma no sítio FRT, a expressão de proteínas recombinantes de interesse podem ser induzidas pela adição de tetraciclina (mais informações em Manual pcDNA 5/FRT/TO - Invitrogen).

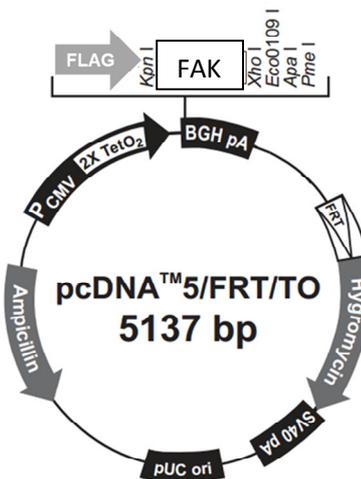


Figura 12. Plasmídeo utilizado para a produção da linhagem HEK 293 com expressão induzível de FLAG-FAK.

Após a linhagem de células que superexpressam a FAK (HEK-FAK) ter sido estabelecida em nosso laboratório pela assistente de pesquisa Renata Rocha, experimentos com os candidatos a inibidores da FAK foram realizados como se segue:

2.7.1. Metodologia para testar os compostos inibidores da FAK.

Para avaliar a inibição da FAK por diferentes compostos quinazolínicos sintetizados foi realizado *screening* dos compostos utilizando células HEK-293 que superexpressam a FAK. Abaixo seguem as etapas do processamento das amostras:

- 1) As células HEK-FAK foram descongeladas e mantidas em cultura para serem lançadas em diferentes garrafas;
- 2) As células HEK-FAK foram plaqueadas em garrafas, na densidade de $1,2 \times 10^6$ céls/ml. Ao atingir a confluência ideal (~90%), iniciou-se o experimento com os diferentes compostos testados (**D1** – 6, 7 – OMe-Trimetoxi; **D2** – 8-Cl-Trimetoxi; **D3**– 6,7 OMe-4SO₂; **D4**-6,7 – OMe-4-BZLO; **D5** – 6,7 – OMe-4-Morpholino; **D6**- 8Cl-4-BZLO), com e sem indutor (tetraciclina);
- 3) Na primeira abordagem de *screening*, concentrações fixas de 10 µM dos diferentes compostos (D1-D6) foram utilizadas.
- 4) Como controle negativo foi utilizado o solvente DMSO nas condições não-induzida e induzida.
- 5) Após a indução por tetraciclina, imediatamente foram adicionados os compostos nas diferentes garrafas e as células foram incubadas por 48 horas em estufa com 95% de O₂ e 5% de CO₂, à 37° C.
- 6) Ao final do período experimental, as células foram rapidamente removidas, homogenizadas imediatamente em tampão de extração RIPA (Tris-HCl 50mM

pH7,5; NaCl 150mM; EDTA 1mM; NP40 1%; Ácido Deoxicolato 0,25% ; Na₃VO₄ 2mM; NaF 5mM; Inibidores de protease 1:1000; PMSF 1mM).

- 7) Os homogenatos foram sonicados (3 pulsos de 5 segundos, nível 2). Após 30 minutos de incubação em gelo, os homogenatos foram centrifugados a 4°C, 11000 rpm, por 20 minutos para remover o material insolúvel e o sobrenadante utilizado para os ensaios.
- 8) A determinação do conteúdo de proteínas totais do sobrenadante foi feita pelo método de Lowry.
- 9) Após quantificação das proteínas, 400µl de amostra acrescida de 100µl de tampão de SDS-PAGE 5x (0,0625M Tris-HCl pH 6.8; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 10% glicerol e 0,01% bromofenol) e 0,015g de DTT, foram aquecidos a 100° C por 5 minutos.
- 10) Em seguida, foram realizados ensaios de *western blotting* para avaliar a atividade da FAK (anti-Tyr397FAK). Como controle experimental foi realizado *blots* para Flag e FAK.
- 11) Após análise do *western blotting*, foi selecionado o composto que obteve melhor resultado para inibição da atividade da FAK.
- 12) Após a seleção do melhor composto, novo ensaio com as células HEK-FAK foi realizado utilizando concentrações crescentes (1µM, 10µM, 100µM, 1000µM) do melhor candidato a inibidor da FAK (**D4** - 6,7-OMe-4-BZLO);
- 13) Todos os passos acima citados foram novamente realizados para análise da inibição da atividade da FAK pelo composto 6,7-OMe-4-BZLO.

2.7.2. Western Blotting

As amostras de proteínas normalizadas foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 10% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120V em aparelho miniaturizado de transferência da BIO-RAD.; utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl; 20% metanol; 0,02% SDS; 192mM glicina).

A membrana foi incubada por 45 minutos, a temperatura ambiente, em tampão de bloqueio (5% BSA; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) para minimizar ligação inespecífica dos anticorpos e depois lavadas por 15 minutos em solução basal (10mM Tris-HCl; 150mM NaCl; 0,05% Tween 20).

Para a imunomarcação, as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais anti-Fak (diluição 1:100), anti-p397Fak (diluição 1:200), anti-Flag (diluição 1:5000), GAPDH (diluição 1:100) em tampão de anticorpo (3% BSA; 10mM Tris; 150mM NaCl; 0,02% Tween 20) durante toda a noite, a 4° C.

Após serem lavadas por 15 minutos em solução basal, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase por 120 minutos. Após este período, as membranas foram novamente lavadas por 30 minutos em solução basal. As membranas foram expostas a um agente quimioluminescente, e a reação produziu fluorescência proporcionalmente à quantidade de proteína. As imagens foram adquiridas no Image QuantTM 300 da GE Healthcare.

As bandas das imagens foram quantificadas por densitometria óptica através do software ImajeJ.

2.8. Ensaio de tirosina quinase *in vitro*

De acordo com a metodologia (Hastie, C.S. *et al.*, 2006), o ensaio de tirosina quinase *in vitro* foi realizado utilizando a proteína FAK recombinante humana expressa em sistema de baculovírus, adquirida comercialmente pela INVITROGEN® (número do catálogo: PV3832). A proteína recombinante FAK a uma concentração de 0,2µM foi incubada com 6µl de tampão MOPS (4mM MgCl₂, 16mM MOPS, 0.4mM EDTA, pH 7,5) e 3µl de solução de ATP radioativo (3µCi of [γ -³²P]ATP) previamente diluído em tampão MOPS. Em uma das reações foi adicionado 1µl de DMSO, nas demais reações foi adicionado 1 µl do composto 4-BZLO em concentrações crescentes (1nM, 10nM, 100nM, 1000nM). Como controle negativo foi utilizado ATP “frio” (50µM) sem adição de DMSO ou composto 4-BZLO. Após a adição [γ ³²P] ATP, os reagentes foram incubados por 30min a 30° C. Para parar a reação, foi adicionado tampão da amostra SDS-PAGE 2x. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de acrilamida 10% - SDS-PAGE em aparelho de eletroforese BIO-RAD *miniature slab gel apparatus* (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA). A banda referente ao [γ ³²P] ATP foi detectada por autoradiografia em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). As bandas das imagens foram quantificadas por densitometria óptica utilizando o software Imaje J.

2.9. Metodologia de *screening in vitro* para teste de viabilidade celular em células cancerosas leucêmicas e tumores sólidos.

O ensaio tem como objetivo avaliar a viabilidade celular de 24 tipos diferentes de neoplasias sendo elas: K562, HL60, NB4 *human Mieloid Leukemia cell line*, RAMOS, RAJI *human Burkitt Linfoma cell line*, JURKAT, CEM, MOLT4 *human Lymphoid T leukemia cell line*, NALM6, NALM16, B15, RS4 *human Lymphoid B leukemia cell line*,

PC3, Lncap *human Prostatic Adenocarcinoma cell line*, Ovcar 3, NCI ADR *human Ovarian carcinoma cell line*, HELA *human Malignant Neoplasm cervix uteri cell line*, MCF7 *human breast adenocarcinoma cell line*, HOS, U20S, MG63 *human osteosarcoma cell line*, U138MG *human glioblastoma cell lines*, NCI-H1299 *human lung cancer cell line*, B16F10 *mouse melanoma cell line*.

Para avaliar a viabilidade celular foi utilizada a técnica de MTT (Mosmann, T.; 1983) que tem como princípio a redução do sal solúvel tetrazolium, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide] de coloração amarela, pela deidrogenase mitocondrial de células viáveis, resultando em um produto chamado de formazan, um precipitado insolúvel púrpura, liberado no meio de cultura. Os diferentes tipos celulares foram cultivados em meio de cultura composto por RPMI 1640 (Sigma R6504) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Nutricell), em garrafas de cultura mantidas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂). Ao atingirem 90% de confluência, as células foram removidas da garrafa utilizando-se solução de tripsina 0,25% (Sigma) e centrifugadas por 10 minutos a 1500 rpm. O *pellet* foi homogenizado em meio de cultura, as células foram contadas, com o corante de exclusão azul de tripan, em câmara de Neubauer e plaqueadas na densidade de 3*10⁴ células por poço em placas de 96 poços. Os 24 diferentes tipos de células foram distribuídos em placas com 96 poços, sendo uma placa de 96 poços para cada tipo celular. Durante 24 horas as placas contendo as células foram incubadas em estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂). Em seguida, os distintos tipos celulares foram tratados com os diferentes compostos quinazolínicos nas concentrações de 1µM 10µM e 100µM na triagem com células leucêmicas e somente na concentração de 10µM na triagem de células de carcinoma. O tratamento foi realizado em triplicata, ou seja, cada composto

foi incubado em três poços de cada placa com distinto tipo celular. Após o tratamento, as células foram incubadas por 48 horas em estufa. Em seguida, as placas foram centrifugadas, o meio foi descartado e as células ressuspensas em 100µl de PBS 1x pH7,4 (137mM NaCl, 27mM KCl, 43mM Na₂HPO₄, 14mM KH₂PO₄), então foi adicionado 10 µl de *Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide*, MTT, na concentração de 5mg/ml em PBS, (Sigma M2128). Procedeu-se a incubação das placas por 4 horas na estufa (atmosfera de 95% de O₂ suplementado com 5% CO₂). Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi adicionado 150 µl de álcool isopropílico em cada poço. A leitura foi realizada em leitor de Elisa com o filtro 570nm. Ao término do experimento foi possível determinar o IC₅₀ de cada composto testado em relação à viabilidade celular.

2.10. Avaliação do efeito do composto 4-BZLO na atividade da FAK em células de glioblastoma (U87)

As células U87 foram cultivadas em meio de cultura composto por RPMI 1640 (Sigma R6504) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% de penicilina-estreptomicina (Nutricell), em garrafas de cultura mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37° C. Ao atingirem 90% de confluência, as células foram tratadas com concentrações crescentes do composto **4-BZLO** (1µM, 10µM, 100µM) e mantidas em estufa por 24 horas. Em seguida, as células foram removidas da garrafa, homogenizadas imediatamente em tampão de extração RIPA e ensaios de *Western Blotting* para pTyrFAK e FAK foram realizados. GAPDH foi utilizado como controle interno.

2.11. Avaliação da absorção

Para avaliar a absorção do composto **4-BZLO** no plasma de animais tratados, a metodologia desenvolvida pela pesquisadora Dra. Silvana Rocco foi realizada. As curvas geradas representam o perfil das concentrações séricas de **4-BZLO** em plasma de ratos (em $\mu\text{mol L}^{-1}$) *versus* tempo (em minutos) das amostras coletadas após administração por gavagem (solução aquosa de goma arábica 10% como agente de suspensão da substância) de uma dose única de **4-BZLO** de 100 mg/kg em ratos de ~ 250 g. Os tempos de coletas das amostras de plasma foram: 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420,...; 2220 minutos. Um total de 22 amostras sanguíneas (~300 μL cada) foi coletado em tubos plásticos (Eppendorfs) contendo heparina (anticoagulante). Estas amostras foram obtidas de forma que os tempos de coleta correspondessem ao período após a administração oral do composto e, portanto, o tempo zero corresponde a uma coleta em que o animal ainda não ingeriu o composto. Após a coleta sanguínea, as amostras foram imediatamente centrifugadas (4000 rpm, 5 minutos) para separar o plasma e o mesmo foi mantido a -80°C até o momento da análise feita por *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) .

2.12. Coarctação da Aorta

Os camundongos foram anestesiados por via intraperitoneal com mistura de cetamina e xilazina na dose de 5mg/Kg e 100mg/Kg. Em seguida, a cavidade torácica foi aberta no segundo espaço intercostal esquerdo, a croça da aorta foi dissecada e constricta com fio de sutura 8-0 (Dafilon, B. Braun Melsungen AG, Germany) tendo como guia uma agulha 20G (Figura 13). A cavidade torácica foi fechada e após a recuperação anestésica os camundongos foram acomodados em gaiolas. Os animais controle foram submetidos à

cirurgia fictícia (sham), com abertura da cavidade torácica, porém, sem constricção da croça da aorta.

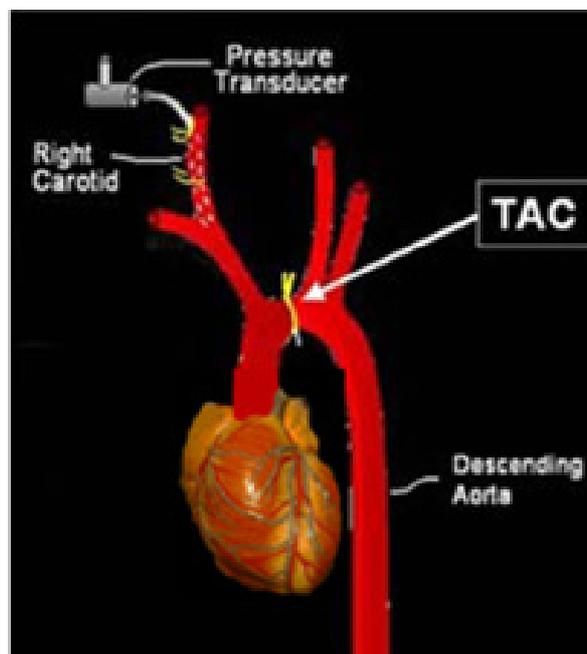


Figura 13. Ilustração do procedimento de coarctação da croça da aorta

2.12.1. Ecocardiografia, Histologia, Fibrose Miocárdica

a) Ecocardiografia

Para avaliar a função do ventrículo esquerdo, camundongos foram submetidos à ecocardiografia modo 2D-M, utilizando o aparelho Phillips modelo HD11 Toshiba PowerVision e o transdutor linear 12 MHz. Para tanto, os animais foram anestesiados com a mistura de 5mg/kg de xilazina e 100mg/kg de cetamina, de acordo com (Roth *et al.*, 2002). O exame foi iniciado após 15 minutos da aplicação do anestésico. Cortes transversais do ventrículo esquerdo, na altura dos músculos papilares, foram feitos para medida do

septo, parede posterior e diâmetro diastólico no final da diástole e diâmetro sistólico no pico da sístole. Cada medida foi repetida três vezes com arquivo fotográfico das mesmas (Clemente C.F.M.Z, *et al.*, 2007).

A sobrecarga pressórica foi acompanhada por 15 e 30 dias. A fração de encurtamento (%FS) foi calculada pela fórmula:

$$\%FS = (DDVE - DSVE) / DDVE * 100$$

Onde:

DDVE: diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo,

DSVE: diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo.

b) Gravimetria do ventrículo esquerdo

Os camundongos foram eutanasiados sacrificados e o coração foi retirado, lavado em solução fisiológica e seco delicadamente com uma gaze para a retirada do sangue intracavitário. O ventrículo direito, os átrios e a base do coração foram retirados com a ajuda de uma tesoura de ponta fina e o ventrículo esquerdo foi pesado utilizando uma balança de alta precisão. A gravimetria foi calculada pela razão entre a medida da média da massa do ventrículo esquerdo pela média do peso corporal final dos animais, multiplicado por um fator 10000 (Guido M.C.; *et al.*, 2007).

c) Histologia e Morfometria do ventrículo esquerdo

Após a obtenção da massa do ventrículo esquerdo, uma fatia transversal do miocárdio na porção equatorial do ventrículo foi processada em parafina e dela obtidos cortes histológicos de 5 µm de espessura. Lâminas foram coradas com hematoxilina-eosina e Tricrômio de Mansson, conforme etapas abaixo:

Coloração Hematoxilina-eosina

- hematoxilina de Ehrlich – 5 minutos
- lavagem em água – 12 minutos
- eosina – 5 minutos

Coloração Tricrômico de Masson

- Hematoxilina de Groat – 5 a 10 minutos
- Lavar em água corrente e depois em água acidificada 1%
- Rouge Malloty – 10 a 15 minutos
- Lavar em água acidificada 1%
- Passar em ácido fosfomolibdico 10%
- Passar em água acidificada 1%
- Verde luz – 13 a 15 minutos

As secções foram desidratadas, montadas em bálsamo sintético Entellan e as medidas morfométricas foram realizadas utilizando-se um sistema computadorizado de imagens (Leica Q500iW e Leica DMLS, Leica Imaging Systems ltd, Cambridge, UK).

d) Hipertrofia cardíaca

Para a avaliação da hipertrofia cardíaca, foram utilizados cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE), sob aumento de 400x. A hipertrofia foi medida pelo diâmetro dos miócitos em torno do núcleo (μm). Foram selecionados apenas miócitos

da parede do ventrículo esquerdo com disposição longitudinal e núcleos ovalados e centralizados (Guido M.C.; *et al.*, 2007).

e) Fibrose miocárdica

Para avaliação da fibrose miocárdica foram utilizados cortes corados com Tricômio de Masson, sob aumento de 200x. A fibrose foi estimada pela fração de volume do colágeno (%), calculada pela razão percentual entre a área de tecido corado positivamente para colágeno, em azul, e a área total do miocárdio. Para estas análises, 20 campos foram examinados (Guido M.C.; *et al.*, 2007).

2.13. Tratamento preventivo e curativo

Os experimentos foram realizados em duas condições: tratamento preventivo e curativo, sendo que o tempo de tratamento foi de 15 e 30 dias.

No tratamento preventivo, os animais foram tratados diariamente com o composto **4-BZLO** de maneira preventiva, isto é, a dose de 30mg/Kg/dia começou a ser administrada antes da cirurgia de coarctação e sham. Nesse tratamento os animais foram tratados por 15 dias antes da cirurgia, e após a cirurgia por 15 ou 30.

No tratamento curativo, os animais foram tratados diariamente de maneira curativa, isto é, a dose de 30mg/Kg/dia de **4-BZLO** foi administrada após a cirurgia de coarctação e sham, sendo que o tratamento seguiu por 15 ou 30 dias.

2.14. Avaliação da Inibição da FAK pelo composto 4-BZLO em camundongos transgênicos para a FAK

Camundongos transgênicos para a FAK foram utilizados para avaliar o efeito do composto **4-BZLO** na inibição da FAK. Os animais transgênicos foram obtidos pela injeção de vetor de lentivírus em oócitos fertilizados de camundongos FVB, conforme descrito por Clemente, C.F.M.Z. *et al.*, 2011. Camundongos transgênicos e selvagens com seis semanas de vida foram tratados por 15 dias com o composto **4-BZLO**, administrado diariamente por via oral (gavagem) na dose de 30mg/Kg. Após o tratamento foram avaliados parâmetros ecocardiográficos, hemodinâmica e morfometria. Além disso, foi realizado *western blotting* para pTyr397FAK e para FAK a fim de avaliar o efeito do tratamento com **4-BZLO** na atividade da FAK.

2.15. Análise estatística

As leituras densitométricas dos *immunoblots* foram representadas como o percentual de alteração (em relação aos controles ou ao grupo tratado com inibidor) para um número de *n* experimentos independentes. Cada experimento foi realizado com amostras distintas. As comparações estatísticas das leituras densitométricas foram feitas utilizando-se ANOVA (*one way*), seguida pelo teste de escala múltipla de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados com significância estatística. Para realizar as comparações estatísticas entre os animais controle e tratados com o **4-BZLO** utilizou-se também ANOVA e teste de escala múltipla de Bonferroni. O mesmo estudo estatístico descrito acima foi realizado para as comparações entre os animais tratados com o **4-BZLO** e os animais controle para medidas do diâmetro dos cardiomiócitos e intensidade do interstício. Para tais estudos os valores de

p <0,05 foram considerados com significância estatística. Os testes estatísticos foram realizados pelo software Prisma 5.0 /2006.

3. RESULTADOS

3.1. Estudos computacionais para propor um composto protótipo com capacidade de inibir a FAK

O presente estudo é multidisciplinar e teve como objetivo o desenvolvimento de novos alvos farmacológicos e terapêuticos. O alvo biológico do nosso estudo é bem validado para doenças como insuficiência cardíaca e câncer que possuem alta taxa de mortalidade e morbidade. Além disso, há grande interesse em validar a ação de derivados de quinazolininas em modelos experimentais de doenças em que a FAK esteja envolvida. Em se tratando de insuficiência cardíaca, estudos realizados em nosso laboratório têm demonstrado que a FAK participa dos processos de sinalização celular em miócitos cardíacos e demais células cardíacas durante o estímulo mecânico (Clemente, C. M. F. Z. *et al.* 2007 ; Marin, T. M. *et al.*; 2008). As evidências disponíveis indicam que esta enzima tem papel crítico para o desenvolvimento da hipertrofia cardíaca induzido por sobrecarga mecânica (Clemente, C. M. F. Z. *et al.* 2007; Costa, AP.D. *et al.* 2010). Assim, pode-se sugerir que a inibição da atividade da FAK pode potencialmente se constituir em alternativa terapêutica para a hipertrofia e insuficiência cardíaca.

Após justificativa acima, nossa primeira abordagem experimental baseou-se na tentativa de obter um composto protótipo com capacidade de inibir a FAK, para isso foram utilizadas ferramentas computacionais que permitiram atingir tal objetivo.

3.1.1. Cálculo de Log P

Foi realizado um *design* para novas quinazolininas com o objetivo de desenvolver compostos com a capacidade de inibir a FAK. As posições R₁, R₂, R₃ e R₄ foram amplamente variadas com substituintes que possibilitassem uma síntese química viável. Uma vez que o anel quinazolina é bastante semelhante ao anel pirrolopiridínico do inibidor

da FAK desenvolvido pela Novartis (Shoi X, *et al.* 2006), os substituintes para as quinazolininas foram escolhidos também pela semelhança estrutural com o inibidor da Novartis. Foi desenhado um total de 140 estruturas levando em consideração os requisitos acima. Pela regra de cinco de Lipinski, todas as estruturas que apresentaram $\log P > 5,0$ foram excluídas porque poderiam apresentar problemas de biodisponibilidade oral. A Tabela 2 em anexo, representa todas as estruturas propostas e o resultado do cálculo de Log P. Para todas as 140 estruturas propostas, 31 apresentaram valores de $\log P > 5,0$ (representado em vermelho na Tabela 2 do anexo) sendo, portanto excluídas de etapas posteriores (ver Tabela 2 em anexo).

3.1.2. Cálculo de docking entre a FAK e novas quinazolininas

Após excluir todas as estruturas que apresentaram $\log P > 5,0$, as 109 estruturas restantes foram submetidas para avaliação por *docking* molecular em relação à FAK. Utilizando a estrutura do domínio quinase da FAK já depositado no PDB (2ETM), as estruturas foram “docadas” e o resultado do cálculo expresso em Kcal/mol. Os resultados das interações foram computados e os programas procuraram encontrar as conformações mais estáveis para o complexo enzima-ligante. A Tabela 3 (ver Tabela 3 em anexo) representa todas as 109 moléculas e seu respectivo resultado do cálculo de *docking*. Para as 109 estruturas, 28 (representado em negrito na Tabela 3) apresentaram resultados promissores pela avaliação de *docking molecular*. O valor de energia de *docking* considerado favorável às conformações mais estáveis para o complexo enzima-ligante foi de -115kcal/mol, portanto, aqueles resultados de energia de *docking* abaixo desse valor foram considerados promissores. Inibidores da FAK como (PF 562271) desenvolvido pela Pfizer e 2-amino-9-aryl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines da Novartis também foram usados

no modelo de *docking* para a FAK e serviram como referência para o cálculo de *docking*. Os resultados dos cálculos para tais estruturas foram respectivamente: (*Energia de docking* = - 140,12 Kcal/mol e - 123,07 Kcal/mol).

Dentre os resultados obtidos de *docking* molecular, a estrutura **4-BZLO** (destaque em amarelo na Tabela 3 em anexo) mostrou-se promissora apresentando um dos menores valores de energia de *docking* ($E = -139,93 \text{ kcal/mol}$). A Figura 14 apresenta a formação de um complexo estável entre o sítio ativo da quinase da FAK e o **4-BZLO**.

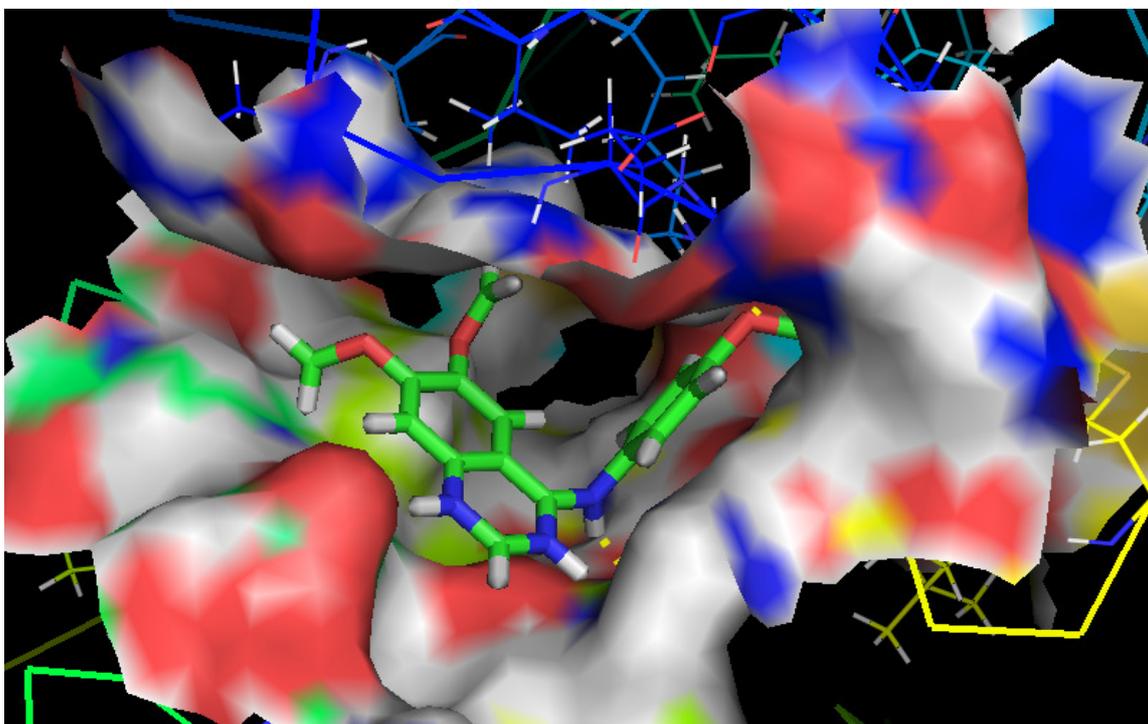


Figura 14. Estrutura do **4-BZLO** dentro do sítio ativo da quinase da FAK (PDB: 2ETM). O perfeito encaixe do composto no sítio permite a formação de um complexo estável entre enzima-ligante.

3.1.3. Avaliação computacional dos parâmetros farmacocinéticos

Após a seleção por log P e *docking* molecular, os 28 compostos quinazolínicos com potencial de inibição para a FAK tiveram seus parâmetros farmacocinéticos *in silico* calculados. Os cálculos foram realizados utilizando a plataforma *Pharma Algorithms* (Pharma Algorithms, Toronto, Canada, 2008). Todos os parâmetros farmacocinéticos avaliados [solubilidade, Log P e de ADME-TOX (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade)] foram favoráveis (ver Tabela 4 em anexo), confirmando o resultado anteriormente obtido para a regra de cinco de Lipinski.

Com a utilização das ferramentas computacionais foi possível fazer uma seleção a partir de 140 compostos quinazolínicos propostos para inibição da FAK, de 28 estruturas selecionadas como as mais promissoras (Figura 15).

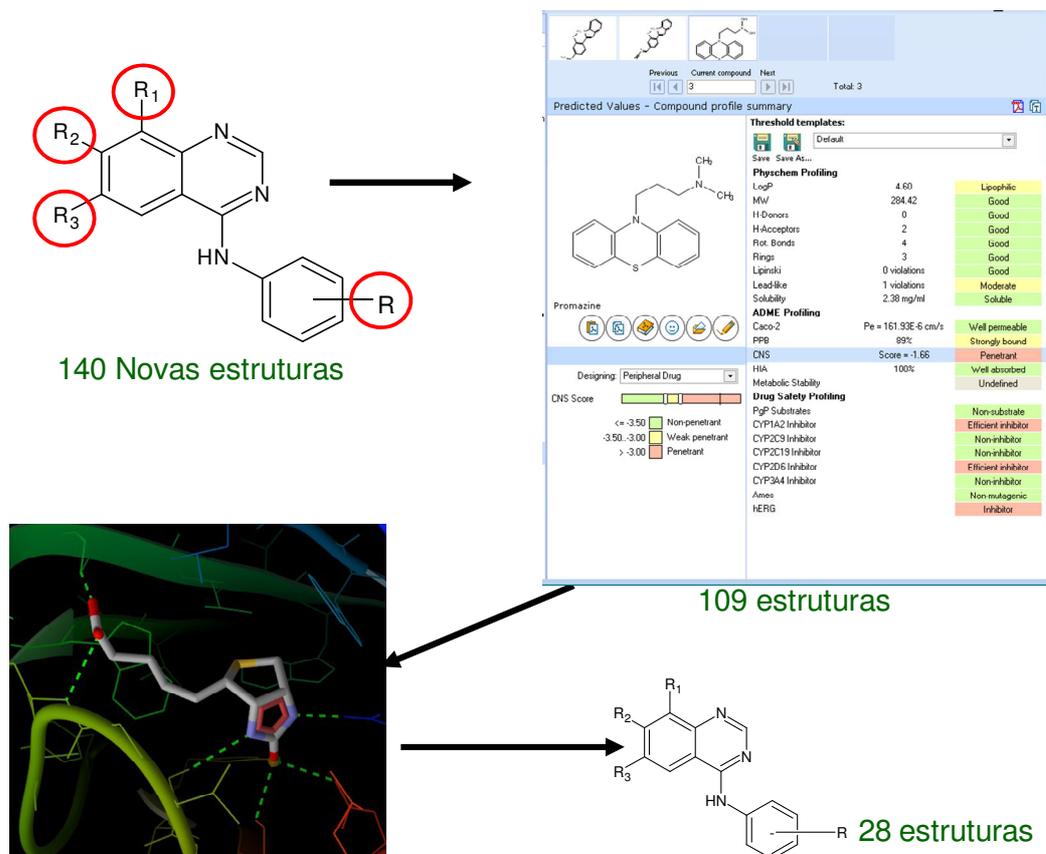


Figura 15. Representação do esquema para selecionar as estruturas mais promissoras para a síntese de inibidores de FAK a partir de estudos computacionais.

3.2. Síntese dos compostos

Dentre as estruturas que apresentaram melhores resultados do estudo de *docking* e parâmetros farmacocinéticos *in silico* 6 foram sintetizadas. A Tabela 5 (ver Tabela 5 em anexo) mostra os compostos que foram sintetizados.

3.2.1. Caracterização dos compostos sintetizados

Os compostos foram caracterizados por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C e espectroscopia de massa. A Figura 16 apresenta o espectro de ^1H do composto **4-BZLO** sintetizado. A Figura 17 apresenta o espectro de ^{13}C do composto **4-BZLO** sintetizado. A Figura 18 apresenta o espectro de massas do composto **4-BZLO** sintetizado.

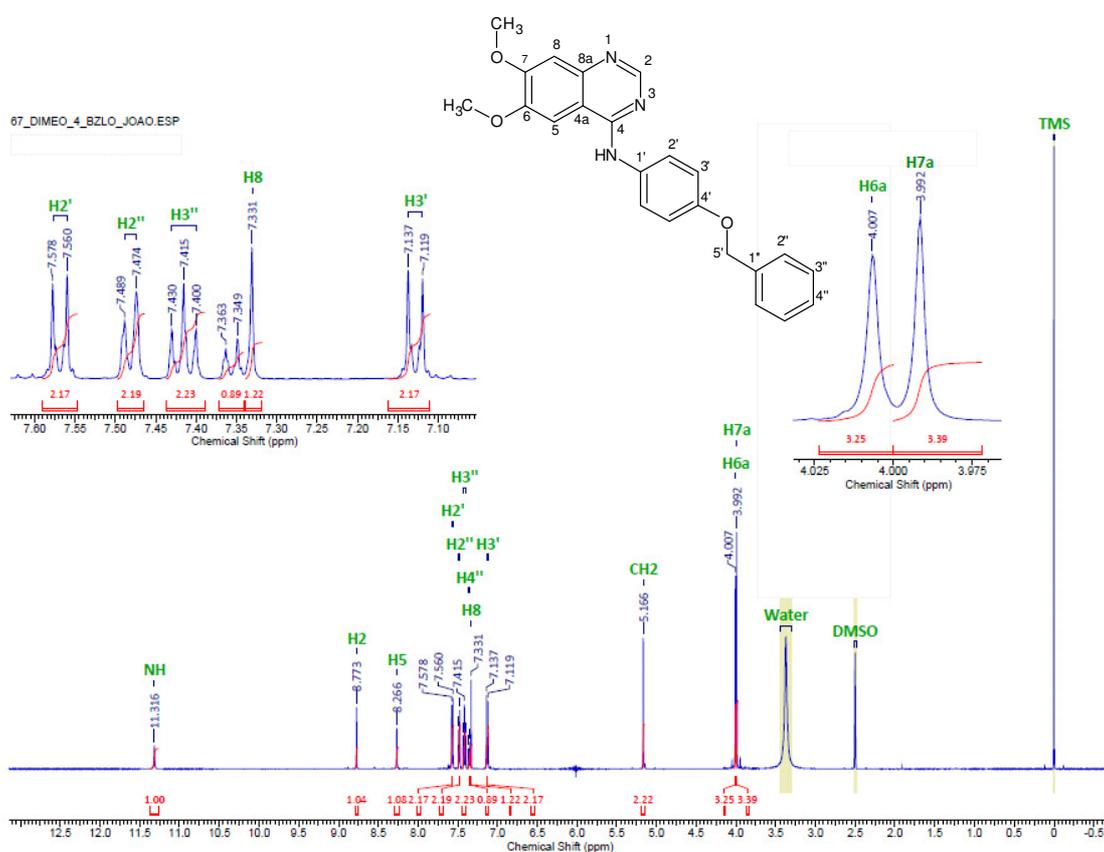


Figura 16. Espectro RMN de ^1H do *N*-[4-(benzyloxy)phenyl]-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amine, denominado 4-BZLO. RMN de ^1H [500 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm]. δ : 11,3 (1H,s,NH); 8,70 (1H, s, H2); 8,26 (1H, s,H5); 7,56 (2H,d, $^3J=9,0\text{Hz}$,H2'); 7,48 (2H,d, $^3J=7,0\text{Hz}$, H2''); 7,41(2H, d, $^3J=7,6\text{Hz}$, H3''); 7,35 (1H, $^3J=7,1\text{Hz}$, H4''); 7,33(1H,s,H8); 7,12(2H,d, $^3J=9,0\text{Hz}$,H3'); 5,2(2H,s,CH₂);. 4,00 (3H,s,-OCH₃); 3,9 (3H,s,-OCH₃).

67_dIMEQ_4_BZLO_C13.esp

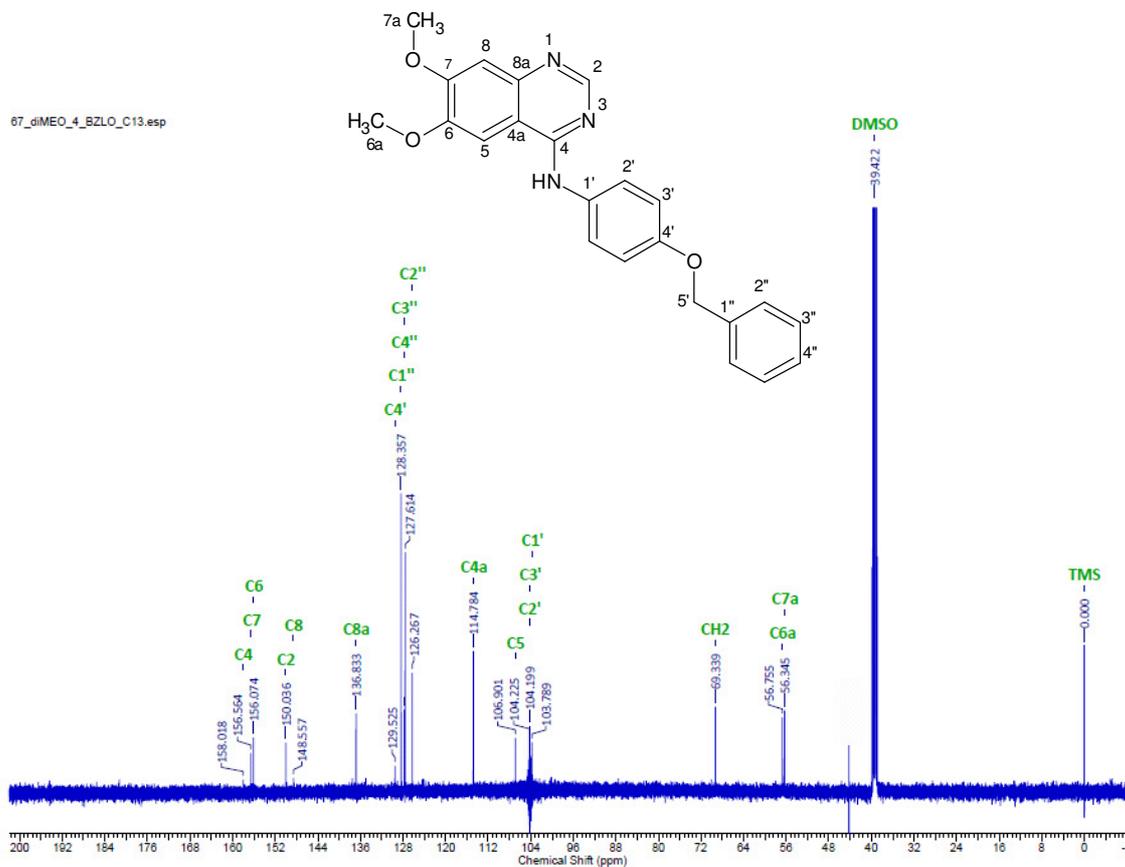


Figura 17. Espectro RMN de ^{13}C do *N*-[4-(benzyloxy)phenyl]-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amine, denominado 4-BZLO. RMN de ^{13}C [125,6 MHz, DMSO- d_6 , TMS, ppm]. δ : 158,0 (C4); 156,5 (C7); 156,0 (C6); 150,0 (C2); 148,5 (C4'); 136,8 (C8a); 129,5 (C8); 128,3 (C3'), (C5'), (C3''), (C5''); 127,8 (C2'), (C6'), (C2''), (C6''); 127,8 (C4''); 126,2 (C2''); 114,7 (C4a); 106,9 (C5); 69,3 (CH₂); 56,7 (C6a); 56,3 (C7a).

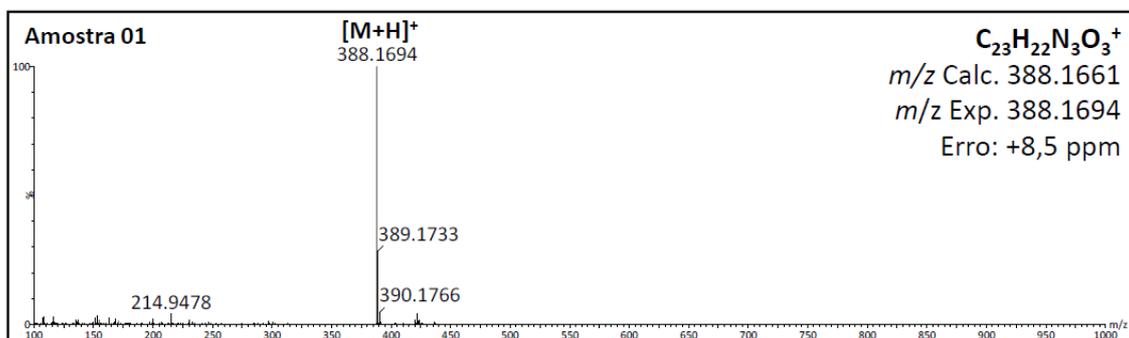
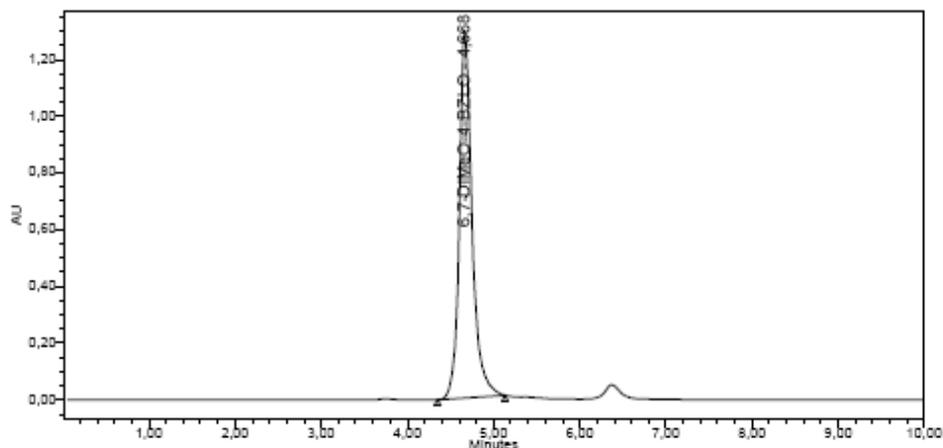


Figura 18. Espectro de MS (EI), do íon de m/z 388,1, mostrando que o valor de m/z calculado é igual ao valor de m/z experimental.

Também foi calculado o rendimento da reação de cada composto sintetizado. No caso do **4-BZLO**, o rendimento foi em torno de 56,4%. Além disso, o ponto de fusão do **4-BZLO** foi calculado, apresentando uma faixa estreita entre 244-248°C, sendo indicativo de pureza do composto sintetizado. Diante dos resultados obtidos foi confirmada, caracterizada e validada a síntese dos compostos propostos.

Além disso, foi utilizada a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para avaliar a pureza da síntese dos compostos. A Figura 19 representa o perfil de cromatograma do **4-BZLO**. A presença de apenas um pico que é caracterizado pela substância analisada indica a pureza do composto sintetizado.

SAMPLE INFORMATION			
Sample Name:	6,7-DiMeO-4-BZLO	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Date Acquired:	17/8/2010 16:41:34
Vial:	5	Acq. Method Set:	Quinazolinás_2010_MS
Injection #:	1	Date Processed:	17/8/2010 17:35:53
Injection Volume:	25,00 ul	Processing Method:	dma
Run Time:	10,0 Minutes	Channel Name:	Wvin Ch1
Sample Set Name:	Novas Quinazolinás_17_08_10	Proc. Chnl. Descr.:	PDA, 254,0 nm



	Peak Name	RT	Area	% Area	Height
1	6,7-DiMeO-4-BZLO	4,668	13221815	100,00	1293722

Figura 19. Cromatograma da análise do **4-BZLO** em HPLC.

Após realizar a síntese e a caracterização dos compostos mais promissores para inibir a FAK *in silico*, os seis compostos sintetizados foram avaliados em sua capacidade de inibir a FAK *in vitro*.

3.3. O composto 4-BZLO é capaz de inibir a atividade da FAK *in vitro*

Para avaliar a capacidade dos compostos sintetizados de inibir a atividade da FAK em células, foram realizados experimentos com as células Flp-In-FAK, que superexpressam a FAK (células HEK-FAK). A Figura 20 mostra a triagem de seis compostos sintetizados

para inibir a FAK em células HEK-FAK. O resultado demonstrou que o **4-BZLO** foi o melhor entre outros compostos para inibir a FAK na concentração de 10 μ M.

Imunoblottings de Flag foram usados como controles internos.

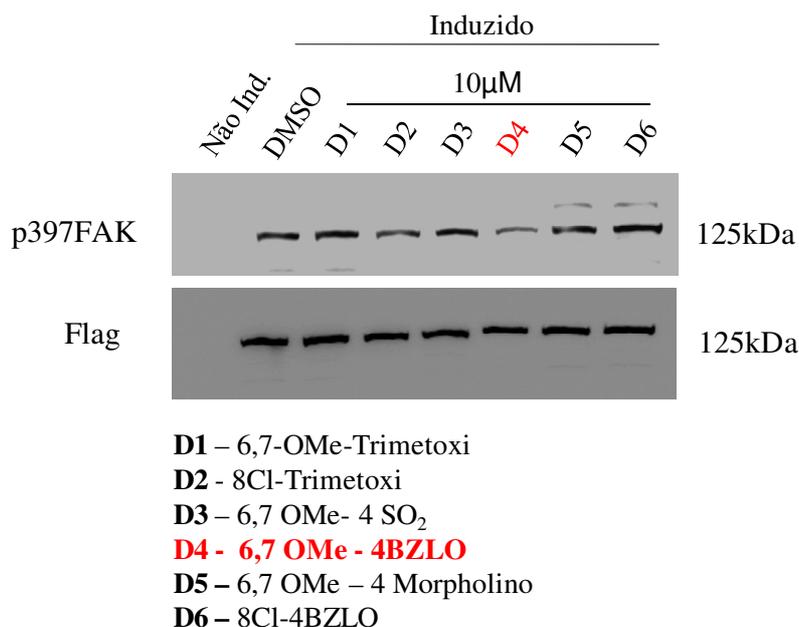


Figura 20. O composto **4-BZLO** (D4 - destaque em vermelho) apresentou melhor capacidade de inibir a atividade da FAK. Apenas o tratamento das células HEK-FAK com o composto 4-BZLO foi capaz de inibir a fosforilação no resíduo Tyr397 da FAK. *Loading* com anticorpo anti-Flag mostrando a mesma quantidade de Flag-FAK em todas as amostras (n=4).

Diante do resultado anterior e na tentativa de avaliar o perfil de inibição do composto **4-BZLO** para a FAK em células, foi realizado experimento com as células Flp-In (HEK-FAK) incubadas com diferentes concentrações do **4-BZLO** (10nM, 100nM, 1 μ M, 10 μ M e 100 μ M) após a indução com tetraciclina. Como demonstrado na Figura 21 a concentração de 10 μ M de **4-BZLO** foi capaz de inibir 50% da atividade da FAK. *Imunoblottings* de Flag foram usados como controles internos.

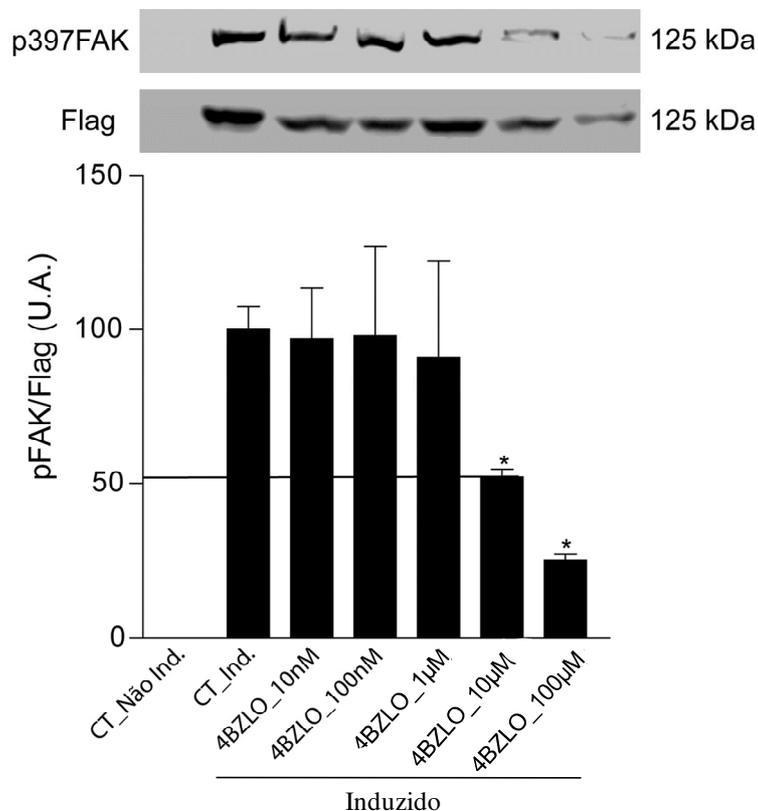


Figura 21. O composto **4-BZLO** na concentração de 10µM inibiu aproximadamente 50% da atividade da FAK em células Flp-In. Blot representativo e gráfico de barras mostrando a atividade da FAK (anti-pTyr397-FAK) em células HEK-FAK, após indução com tetraciclina e tratamento com concentrações crescentes de **4-BZLO** (10nM, 100nM, 1µM, 10µM e 100µM). *Loading* com anticorpo anti-Flag mostrando a mesma quantidade de Flag-FAK em todas as amostras, * $p < 0.05$ vs Controle (CT_Ind.) (n=3 culturas).

Uma vez que o composto **4-BZLO** foi considerado o melhor inibidor da FAK em células Flp-In dentre outras quinazolininas avaliadas, tornou-se necessário investigar se o mesmo composto teria capacidade de inibir a FAK recombinante purificada em ensaio *in vitro*. Para isso, foi realizado ensaio com ATP radioativo para detectar a incorporação de γ - $[^{32}\text{P}]$ ATP no sítio ativo da proteína recombinante FAK, na ausência ou presença de

concentrações crescentes do **4-BZLO**. A Figura 22 mostra que o **4-BZLO** foi capaz de inibir a atividade da FAK *in vitro*.

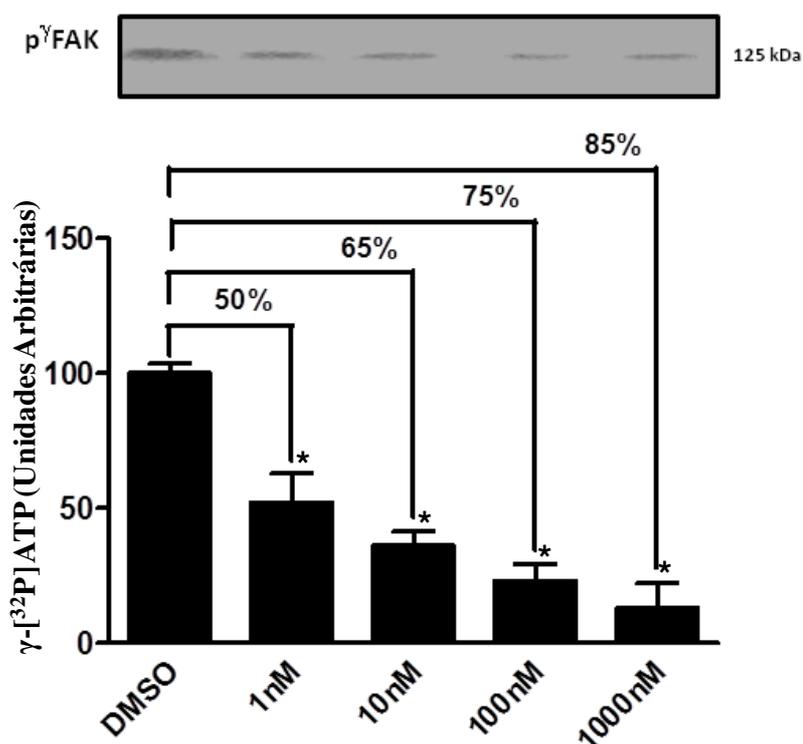


Figura 22. O composto **4-BZLO** foi capaz de inibir a atividade da FAK em 50% com aproximadamente 1nM em ensaio de fosforilação *in vitro* com ATP radioativo. Gel SDS-PAGE representativo e gráfico de barras mostrando a capacidade do composto **4-BZLO** em concentrações crescentes (1nM, 10nM, 100nM e 1000nM) inibir a incorporação do γ -[³²P] ATP no sítio ativo da proteína recombinante FAK, * p<0.05 vs DMSO (n=4).

Com o conjunto de resultados anteriores e sabendo-se que a FAK é importante na formação e progressão de tumores (McLean G.W.; *et al.*, 2005), experimentos foram realizados para avaliar se o composto **4-BZLO** é eficaz na inibição da formação de tumores com concomitante inibição da atividade da FAK.

3.4. Avaliação *in vitro* do composto 4-BZLO em teste de viabilidade celular para células cancerosas leucêmicas e tumores sólidos.

Para avaliar a viabilidade celular de 24 diferentes tipos de neoplasias de células tumorais foram utilizadas células concedidas pelo Centro Infantil Boldrini/ CIPOI (Centro Integrado de Pesquisas Ocohematológicas na Infância). Foi realizada uma triagem entre 12 substâncias, entre elas as seis quinazolininas sintetizadas e outros compostos quinazolínicos anteriormente sintetizados pelo nosso grupo e a Vincristina (VCR) como controle. Conforme apresentado na Figura 23, o composto **4-BZLO** foi capaz de inibir a viabilidade de diferentes linhagens de células leucêmicas como CEM- *human Lymphoid T leukemia cell line* em aproximadamente 4 μ M, K562 - *human Myeloid Leukemia cell line* e RAMOS - *human Burkitt Lymphoma cell line* com aproximadamente 20 μ M. Já a VCR inibiu CEM em aproximadamente 2 μ M, mas não apresentou efeito em RAMOS e inibiu a K562 com concentração acima de 40 μ M.

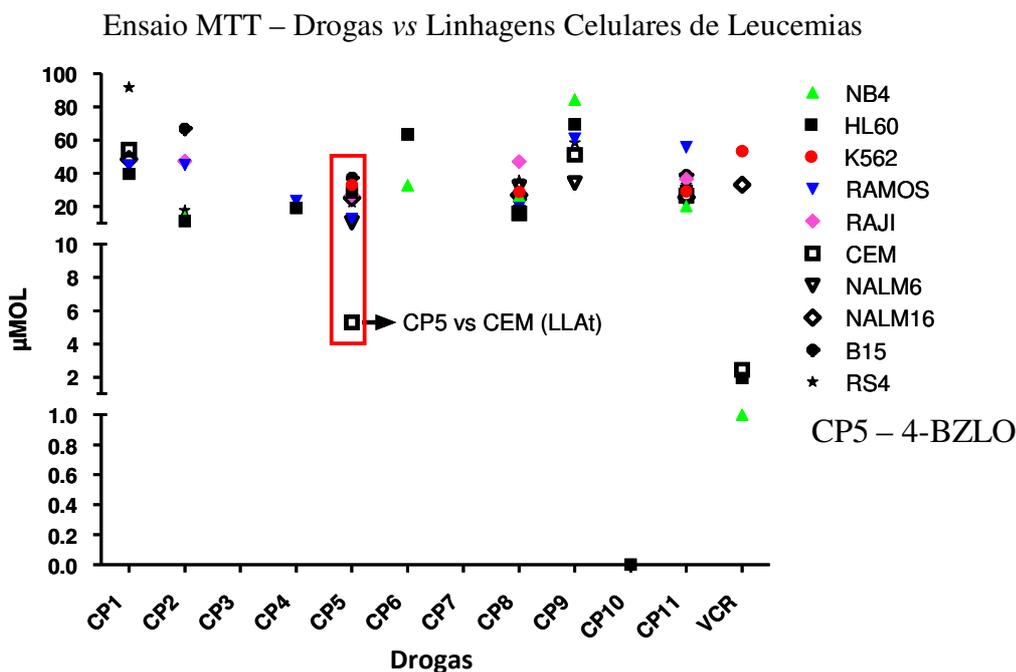


Figura 23. Gráfico representativo do teste de triagem para 12 compostos em 10 diferentes linhagens de células leucêmicas. CP5 representa o composto **4-BZLO** (em destaque - caixa vermelha) apresentou o melhor resultado para a inibição da viabilidade celular da linhagem de células CEM *human Lymphoid T leukemia cell line* com inibição em aproximadamente 4 μ M (n=3).

O mesmo protocolo de teste também foi utilizado para triagem com células de tumores sólidos tais como carcinomas. Neste ensaio, os seis compostos sintetizados neste trabalho foram avaliados e 15 quinazolininas anteriormente sintetizadas pelo nosso grupo. Novamente, o composto **4-BZLO** representado por D5 (Figura 24), apresentou o melhor resultado dentre as substâncias testadas. As linhagens ROS - *human osteosarcoma cell line*, NCI - *human lung cancer cell line*, U87 - *human glioblastoma-astrocytoma* tiveram suas viabilidades celulares inibidas pelo composto **4-BZLO** em aproximadamente 90 a 100%.

Tal resultado foi melhor quando comparado a Doxorubicina usada como fármaco de referência.

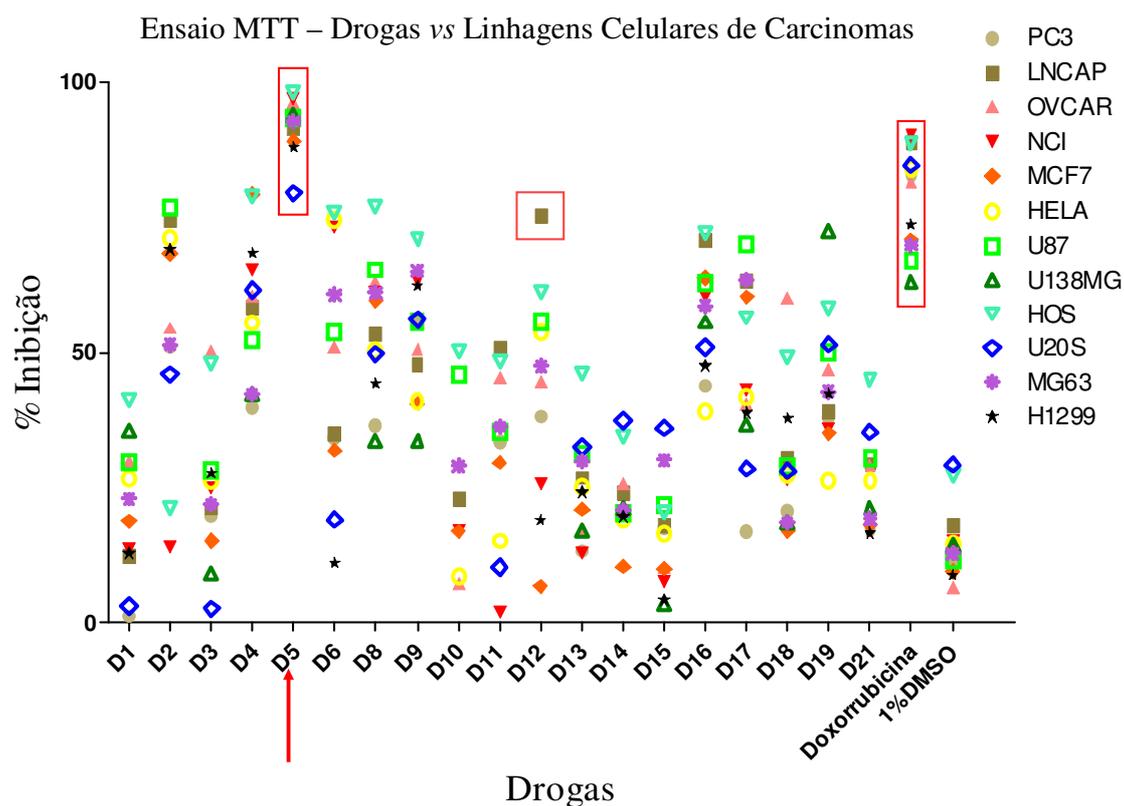


Figura 24. Gráfico representativo do teste de triagem para 22 compostos em 12 diferentes linhagens de células de tumores sólidos. D5 (em destaque – seta vermelha) representa o **4-BZLO** e apresentou o melhor resultado para as linhagens celulares ROS - *human osteosarcoma cell line*, NCI - *human lung cancer cell line*, U87 - *human glioblastoma-astrocytoma* em relação à Doxorubicina usada como fármaco de referência (n=3).

As linhagens celulares que tiveram suas viabilidades celulares inibidas pelo **4-BZLO**, representado por D5, foram testadas para avaliar o efeito do DMSO usado como solvente para diluir os compostos. A Figura 25 demonstra que a linhagem de glioblastoma humano U87 apresentou menor efeito de influência do DMSO dentre as células que foram inibidas pelo **4-BZLO**.

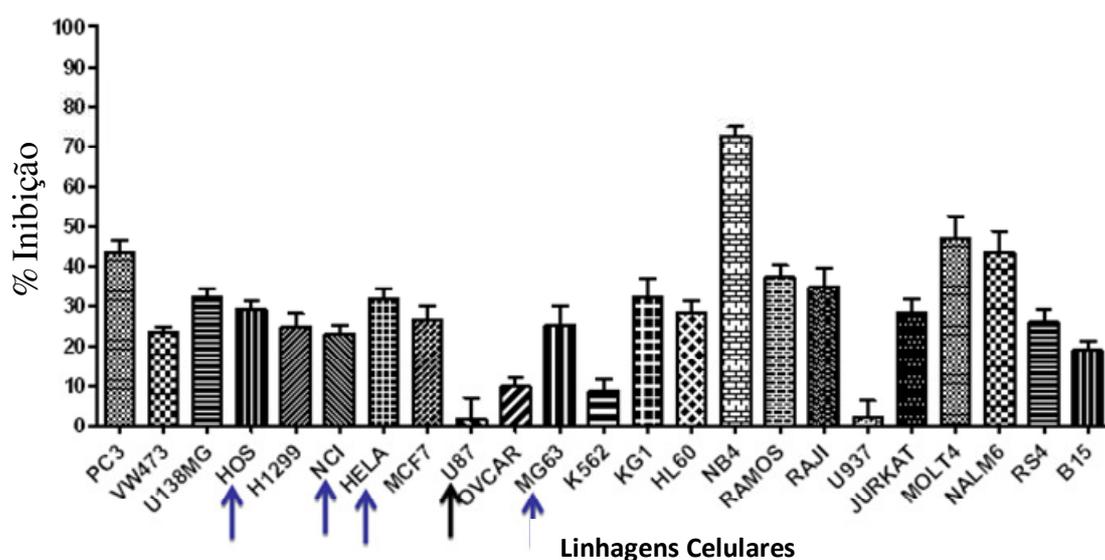


Figura 25. As linhagens celulares marcadas com a seta azul foram aquelas que apresentaram maior inibição da viabilidade celular em presença do **4-BZLO**. Dentre elas, a U87 (seta preta) foi a linhagem que apresentou menor influência do DMSO na concentração de 1% (n=3).

A linhagem celular de glioblastoma humano (U87) foi escolhida para avaliar se o **4-BZLO** possui a capacidade de inibir a atividade da FAK nessas células. Assim, o composto **4-BZLO** foi incubado com as células U87 em diferentes concentrações (1 μ M, 10 μ M e 100 μ M). Como apresentado na Figura 26, a concentração de 10 μ M de **4-BZLO** foi capaz

de inibir aproximadamente 50% da atividade da FAK nas células U87. *Imunoblottings* de FAK e GAPDH foram usados como controles internos.

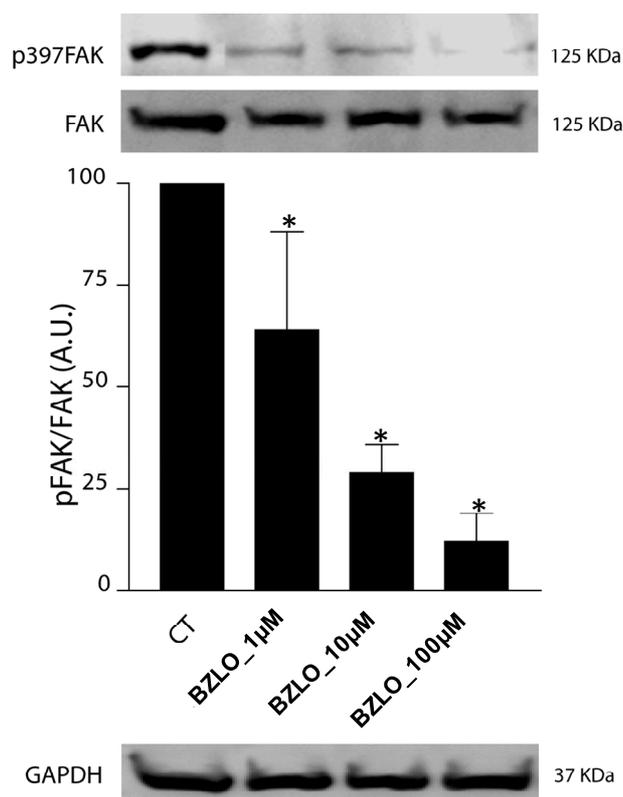


Figura 26. O composto **4-BZLO** na concentração de 10µM foi capaz de inibir a atividade da FAK em aproximadamente 50%. Blot representativo e gráfico de barras mostrando a atividade da FAK (anti-pTyr397-FAK) em células U87, após tratamento com concentrações crescentes de **4-BZLO** (1µM, 10µM e 100µM). *Loading* com anticorpo anti-FAK, anti-GAPDH mostrando a mesma quantidade de FAK em todas as amostras, * p<0.05 vs Controle (n=3 culturas).

A escolha do composto protótipo, ou seja, do composto líder deste estudo foi baseado no resultado de estudo de *docking*, estudo farmacocinético *in silico*, síntese e a pureza do composto sintetizado e ensaios de triagem para inibição da FAK *in vitro*. O composto **4-BZLO** apresentou resultados promissores nos requisitos acima, portanto, tal composto foi eleito como composto líder para ser inibidor da FAK.

Após a escolha do composto líder (**4-BZLO**), testes em animais, ou seja, estudos *in vivo* foram realizados.

3.5. Absorção *in vivo* dos compostos sintetizados

A absorção do composto **4-BZLO** pode ser avaliada pelo uso de técnica analítica como, por exemplo, cromatografia líquida de alta eficiência. A Figura 27 representa o perfil de absorção e eliminação para o **4-BZLO**. O composto apresentou uma concentração plasmática máxima (C_{max}) de 25,65ng/ml que corresponde a 66,27 μ mol/L, tempo em que a concentração máxima (T_{max}) de 6h e somente após 25h o **4-BZLO** é totalmente eliminado do plasma do rato. Tais resultados permitem concluir que o composto citado apresenta absorção *in vivo*. Além disso, tal composto também apresenta elevado tempo de eliminação o que poderia refletir em uma boa biodisponibilidade.

Distribuição plasmática do BZLO em ratos

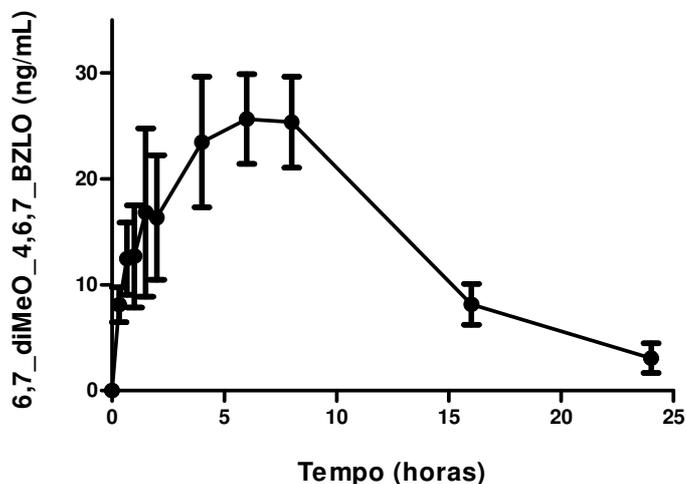


Figura 27. Perfil da concentração sérica em ng/mL do **4-BZLO** em plasma de ratos *versus* o tempo (em horas) de coletas, após a administração por gavagem de uma dose de 100 mg/Kg suspensa em solução aquosa de goma arábica 10%.

3.6. Análise da medida da massa ventricular e ecocardiografia de coração hipertrófico de camundongos tratados com o composto 4-BZLO

O modelo de coarctação da croça da aorta em camundongos vem sendo utilizado rotineiramente em nosso laboratório. A hipertrofia do Ventrículo Esquerdo (V.E.) resulta do aumento de resistência ao fluxo sanguíneo na aorta e, posteriormente, progride para a insuficiência cardíaca. Parâmetros tais como peso médio do ventrículo esquerdo sobre peso corpóreo de cada animal (LVW/BW), medida da espessura da parede do ventrículo esquerdo (LVWT) e medida do diâmetro dos miócitos cardíacos por cortes histológicos podem ser utilizados para avaliar tal condição. Os resultados apresentados são para os animais tratados com o **4-BZLO**. Em tal experimento, os animais foram tratados após a coarctação da aorta. Para avaliar qual seria a resposta a um tratamento preventivo e

curativo, os animais foram tratados antes e após a cirurgia por um período de 15 e 30 dias. Não houve diferença entre os resultados para 15 e 30 dias, portanto, foram mostrados apenas os resultados para 30 dias. Os resultados demonstraram que houve redução do peso médio do coração (HW), peso médio do ventrículo esquerdo sobre peso médio corpóreo dos animais (LVW/BW) ou (IMVE) para os animais tratados com o **4-BZLO** em comparação ao controle representado pelo grupo coarctado (veículo) (Figura 28).

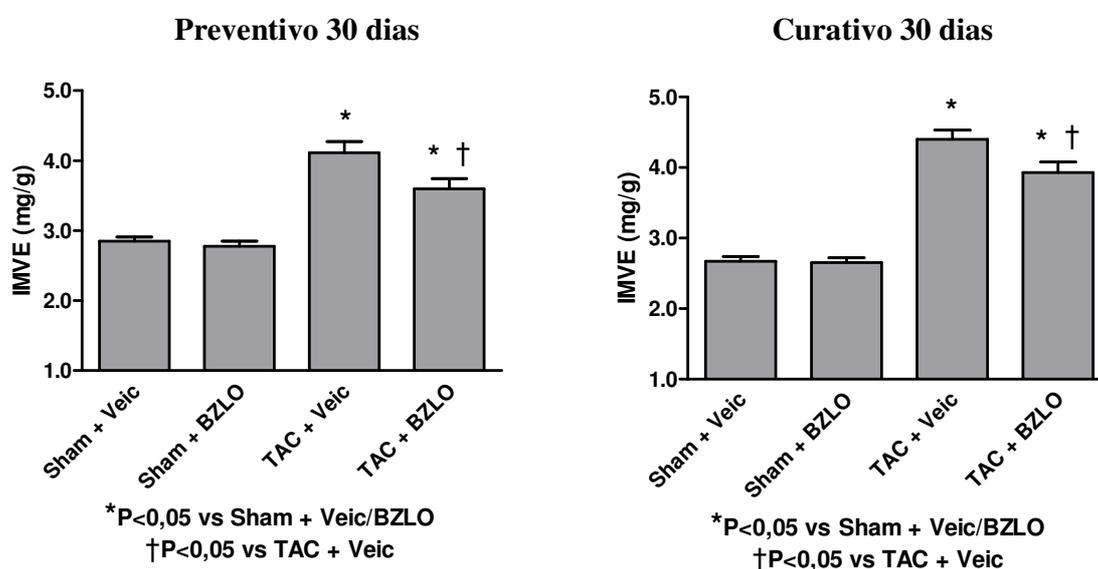
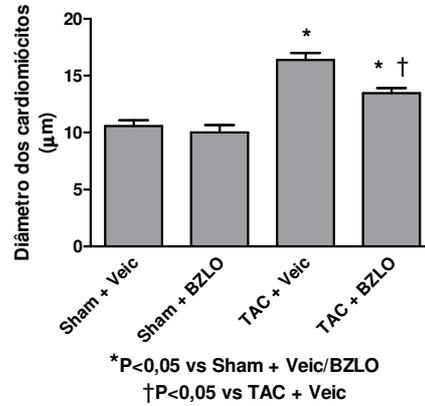
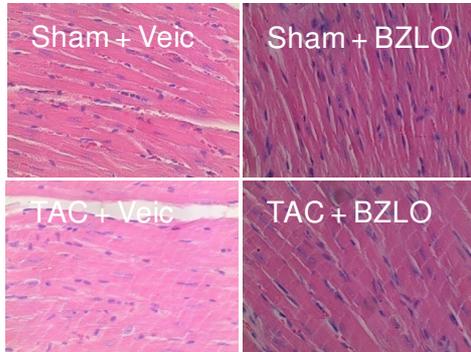


Figura 28. Medida do peso médio do ventrículo esquerdo sobre peso corpóreo dos animais controles (sham + veículo e sham + composto **4-BZLO**), do animal com cirurgia de coarctação da aorta (TAC + veículo) e dos animais após a cirurgia e tratados com o **4-BZLO** (TAC + composto) para tratamento preventivo e curativo 30 dias, *p<0.05 em relação sham + veículo; #Pp <0.05 em relação a TAC + veículo; †Pp <0.05 em relação a TAC + 4BZLO (n=10).

O parâmetro histológico para a avaliação de hipertrofia cardíaca foi a medida do diâmetro dos miócitos cardíacos nas lâminas com secção de coração dos animais tratados com **4-BZLO** de modo preventivo e curativo por 30 dias, corados com Hematoxina e Eosina (200x). Já para a avaliação da fibrose miocárdica foram utilizados cortes corados com Tricômio de Masson, sob magnificação de 200x. O resultado para os animais tratados com **4-BZLO** de modo preventivo e curativo por 30 dias apresentou uma redução significativa da acumulação de colágeno quando se comparou os animais tratados e os animais controles (TAC + veículo) (Figuras 29 e 30).

Preventivo 30 dias



Curativo 30 dias

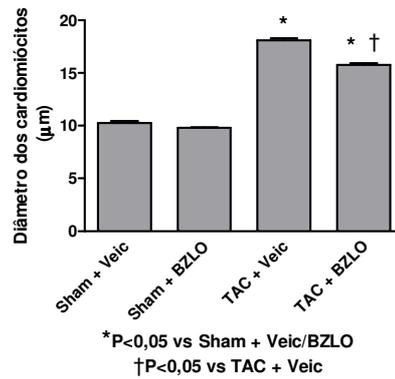
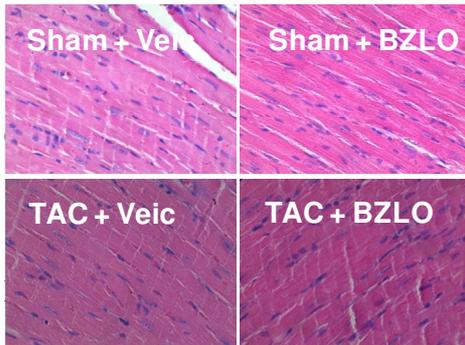
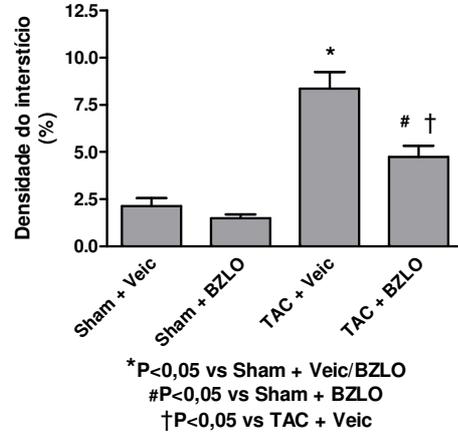
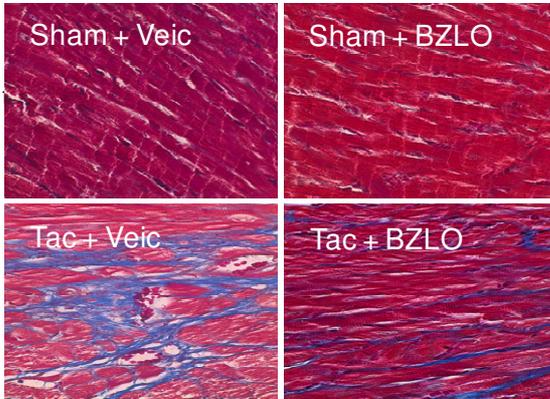


Figura 29. Medida do diâmetro dos miócitos de corte histológico dos grupos de animais controle (Sham + veículo, Sham + composto), animais com cirurgia da coarctação da aorta (TAC + veículo) e animais após a cirurgia e tratados com o composto **4-BZLO** (TAC + BZLO) para o tratamento preventivo e curativo de 30 dias. *p<0.05 em relação sham + veículo; #p<0.05 em relação a TAC + veículo; †Pp <0.05 em relação a TAC + 4BZLO (n= 10).

Preventivo 30 dias



Curativo 30 dias

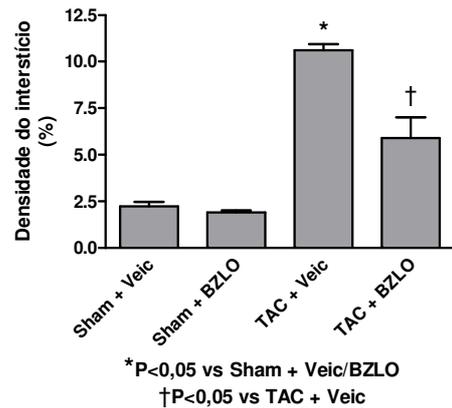
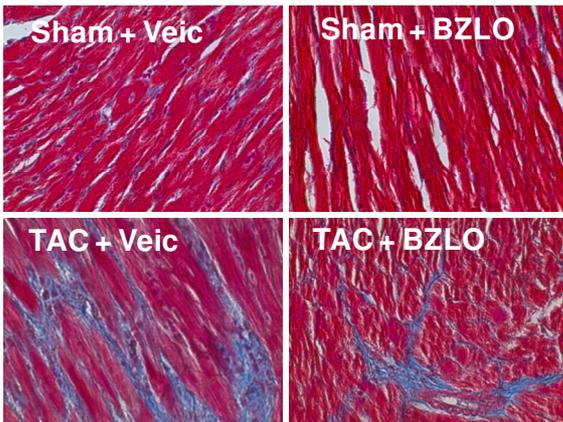


Figura 30. Medida da intensidade do interstício (grau de fibrose) de corte histológico dos grupos de animais controle (Sham + veículo, Sham + composto), animais com cirurgia da coarctação da aorta (TAC + veículo) e animais após a cirurgia e tratados com o composto líder (TAC + 4-BZLO) para o tratamento preventivo e curativo de 30 dias. *p<0.05 em relação sham + veículo; #p<0.05 em relação a TAC + veículo; †Pp <0.05 em relação a TAC + 4BZLO (n = 11).

Para avaliar se o composto **4-BZLO** é capaz de inibir a FAK *in vivo*, ensaios de *western blotting* foram realizados com os extratos proteicos provenientes dos corações dos animais tratados de maneira preventiva e curativa após a coarctação da aorta e comparados com os animais controle. Como demonstrado na Figura 31, o tratamento dos animais com o **4-BZLO** reduziu a expressão e atividade da FAK quando comparados aos animais controles (coarctados e não tratados com **4-BZLO**).

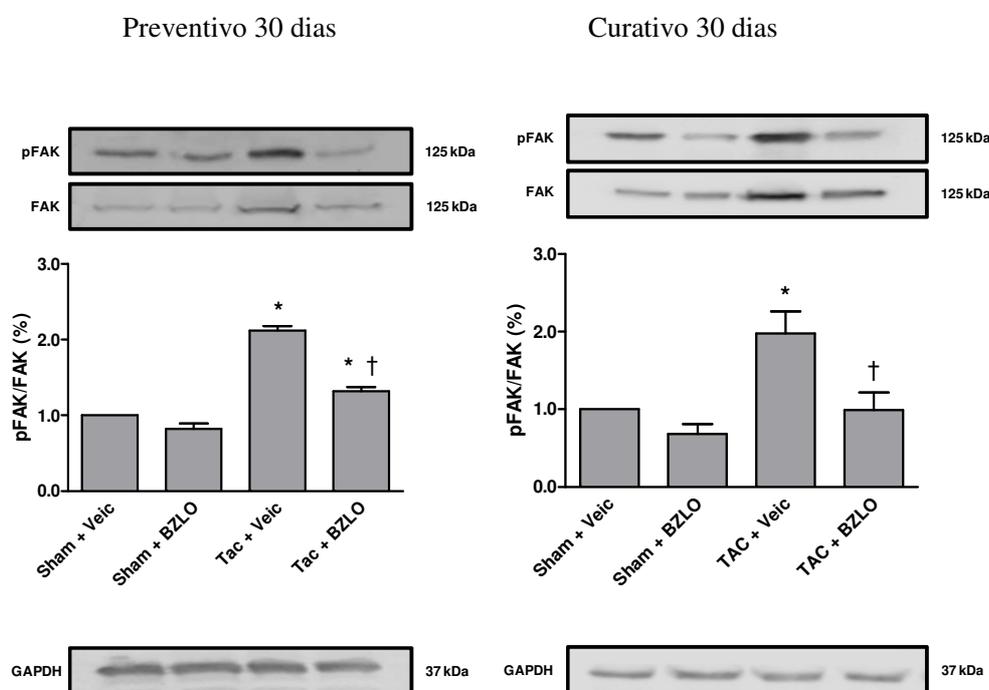


Figura 31. O composto **4-BZLO** diminui a atividade e expressão da FAK em corações de ratos após a coarctação da aorta (representado por TAC + BZLO). * $p < 0.05$ em relação sham + veículo; † $Pp < 0.05$ em relação a TAC + 4BZLO (n = 8).

3.7. Tratamento com 4-BZLO é capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca de animais transgênicos específicos para a FAK

Nosso laboratório desenvolveu camundongos transgênicos específico para a FAK cardíaca que desenvolve moderada hipertrofia cardíaca (Clemente, C.F.M.Z, *et al.* 2011). Assim, tal modelo permitiu testar a eficiência do composto 4-BZLO para tratamento da hipertrofia cardíaca induzida pela FAK. A Figura 32 mostra que o tratamento com o composto **4-BZLO** foi capaz de regredir a hipertrofia em animais transgênicos específicos para a FAK em relação aos animais selvagens. Isto pode ser observado pelos resultados de ecocardiograma como, por exemplo, diminuição da espessura da parede do ventrículo esquerdo e gravimetria (peso médio do ventrículo/ peso médio corporal).

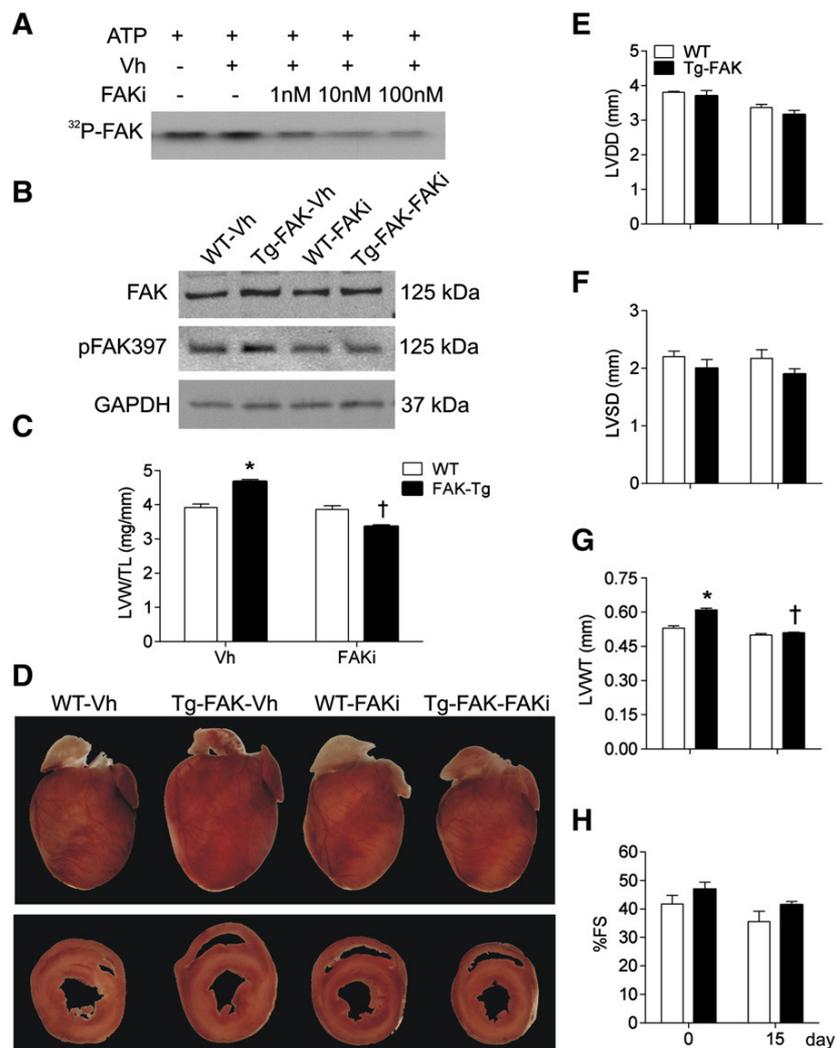


Figura 32. Composto **4-BZLO** foi usado como inibidor farmacológico da FAK e regrediu a hipertrofia cardíaca em animais transgênicos específicos para a FAK. (a) Atividade tirosina quinase da FAK recombinante tratada com veículo (Vh) ou inibidor da FAK (FAKi). (b) *Western blottings* realizado com anticorpos anti-FAK p-FAK397 e anti-GAPDH em extratos de miocárdios de animais selvagens (WT) e transgênicos para FAK (FAK-Tg) tratado com veículo ou inibidor da FAK (**4-BZLO**) (n=8). (c) Valores médios do peso ventrículo esquerdo/comprimento do raio para os animais tratados com veículo ou **4-BZLO**. (d) Figura representativa dos corações e cortes transversos de WT e animais FAK-TG tratados com veículo ou inibidor da FAK (**4-BZLO**). (e-f) Valores de ecocardiografia para o diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (LVDD), diâmetro sistólico final do

ventrículo esquerdo (LVSD), espessura da parede posterior (LVWT) e fração de encurtamento (FS) de WT e corações FAK-Tg para dia 0 e 15 dias depois do tratamento com o composto líder (**4-BZLO**) (n = 8). *p<0.05 para VW-Vh e †p<0.05 para FAK-Tg-Vh.

4. DISCUSSÃO

4.1. Descoberta de novos fármacos, identificação e validação do alvo

O termo descoberta de um fármaco refere-se ao processo pelo qual laboratórios farmacêuticos, de biotecnologia, acadêmicos e governamentais identifiquem ou analisam substâncias para encontrar agentes terapêuticos potencialmente ativos (Golan, D. *et al.* 2009). Portanto, a primeira etapa na descoberta de novos fármacos é identificação e validação de um alvo.

Nos últimos anos, vários estudos têm destacado a importância da sinalização pela FAK nos mecanismos de mecanotransdução em miócitos cardíacos. Em essência, a FAK mantém níveis basais de atividade e em resposta ao estresse mecânico no qual ela rapidamente se ativa por meio da autofosforilação do resíduo tirosina 397 (Torsoni, A.S.; *et al.*, 2003; Fonseca, P.M. *et al.*, 2005) e contribui para as alterações estruturais e funcionais instaladas durante o processo de hipertrofia cardíaca (Clemente, C.F.M.Z. *et al.*, 2007; Peng, X. *et al.*, 2006; DiMichele, L.A. *et al.*, 2006). Nosso laboratório tem demonstrado que a ativação prolongada da FAK no miocárdio contribui para a deterioração estrutural e funcional do ventrículo esquerdo de camundongos com sobrecarga pressórica crônica (Clemente, C.F.M.Z. *et al.*, 2007). Isto sugere que a inibição da atividade da FAK pode potencialmente se constituir em alternativa terapêutica para a hipertrofia e insuficiência cardíacas. Além disso, estudos científicos indicam que a FAK é um importante mediador da sinalização que envolve fator de crescimento, proliferação, sobrevivência e migração celular. Fica evidente que o desenvolvimento de malignidade está frequentemente associado com perturbações nestes processos, e não é surpresa que a atividade da FAK está alterada em células cancerosas. Modelos animais têm mostrado que a FAK está envolvida na formação e progressão de tumores, e outros estudos mostram que a expressão da FAK

está aumentada em tumores humanos tornando a FAK um importante e potencial alvo para novas terapias contra o câncer (Gordon W. *et al.* 2005).

A partir da identificação e validação do alvo, seis achados importantes foram obtidos durante a realização deste trabalho: 1) a escolha do composto protótipo foi baseada na similaridade entre o inibidor da FAK desenvolvido pela Novartis (Choi, H.; *et al.* 2006) e as novas quinazolinas propostas, 2) foram realizados estudos computacionais para escolha das quinazolinas que apresentaram melhores resultados *in silico*. As quinazolinas mais promissoras obtidas pelo estudo computacional foram sintetizadas e caracterizadas, 3) após a síntese, foi realizada uma triagem em células Flp-In que supressam a FAK com as quinazolinas sintetizadas. A quinazolina denominada **4-BZLO** apresentou o melhor resultado nessa triagem, 4) a inibição da FAK foi confirmada pelo ensaio de quinase *in vitro*, 5) os modelos animais de hipertrofia cardíaca e fibrose demonstraram que o **4-BZLO** foi capaz de diminuir a hipertrofia e a fibrose nesses animais após tratamento. A atividade e a expressão de FAK estavam diminuídas nos animais tratados com 4-BZLO, 6) o modelo de animais transgênicos específicos para FAK confirmou que o **4-BZLO** diminuiu a hipertrofia e melhorou os parâmetros do ecocardiograma também nesses animais.

O processo de triagem virtual não envolve somente a descoberta de moléculas bioativas com elevada diversidade química, mas também a identificação de compostos usando como base uma molécula bioativa de estrutura química definida (Mestres, J. *et al.*, 2003). O processo de busca computacional por similaridade é uma estratégia útil que envolve a identificação de novas moléculas estruturalmente similares à molécula bioativa, sendo que esta busca pode ser de natureza 2D ou 3D de acordo com a informação disponível (Mestres, J. *et al.*, 2000). O uso de busca computacional por similaridade foi usado para escolher as quinazolinas similares estruturalmente ao inibidor da FAK

desenvolvido pela Novartis (Choi, H. *et al.* 2006). Foi utilizada análise da estrutura 2D para comparar os substituintes do inibidor da FAK e as quinazolininas propostas no estudo. Desse estudo, foram selecionadas 140 moléculas de quinazolininas para iniciar uma triagem para procurar estruturas mais promissoras em termos farmacocinéticos e capacidade de inibir a FAK *in silico*. Para o desenvolvimento do projeto as quinazolininas foram escolhidas por ser uma classe de compostos químicos que já tem suas rotas sintéticas bem estabelecidas. As quinazolininas são compostos químicos que vem sendo sintetizados desde a descoberta do PD 153035, que é um inibidor do fator de crescimento epidermal (EGFR) (Bos, M. *et al.* 1997), usado em pesquisas para câncer. Para executar um projeto de desenvolvimento de fármacos torna-se necessário a experiência em síntese, assim nosso grupo, especialmente a Dra. Silvana Rocco (pesquisadora no LNBIO/CNPEM), tem sintetizado quinazolininas há bastante tempo o que permitiu a colaboração na execução deste estudo.

4.2. Estudos computacionais de farmacocinética e *docking* molecular para escolha do protótipo

A regra de Lipinski, conhecida com a “regra dos 5” descreve sobre o perfil de biodisponibilidade oral de fármacos (Lipinsky, C.A. *et al.*, 1997). Essa regra é uma das estratégias mais usadas mundialmente na organização de bases de dados contendo moléculas com propriedades adequadas de ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) (Lipinski, A.C. 2000). A regra de Lipinski está amparada em parâmetros estatísticos robustos e serve como ferramenta disponível para filtragem de moléculas em triagens iniciais para descoberta de novos fármacos (Lipinski, A.C. *et al.*, 1997). Nesse sentido, foi utilizada a regra de Lipinski para selecionar as quinazolininas propostas. Para um

total de 140 moléculas desenhadas, 31 foram excluídas por violar a regra de Lipinski, uma vez que, não apresentaram propriedades farmacocinéticas adequadas.

O estudo de *docking* molecular pode ser utilizado para escolha do protótipo. A expressão *molecular docking*, é usada em projetos de fármacos para se referir aos métodos que tentam identificar compostos capazes de interagir com um dado sítio macromolecular e, a partir daí, identificar a geometria adotada por ambos no processo de encaixe (Lybrand, T.P. 1995). Aplicações bem sucedidas do uso de programas de *docking* incluem a descoberta de inibidores para importantes alvos biológicos como protease do HIV-1 (Desjarlais, R.L. *et al.*, 1990), de *Plasmodium falciparum* (Li, R.S. *et al.*, 1996), diidrofolato redutase de *Pneumocystis carinii* (Gschwend, D.A. *et al.*, 1997) e timidilato sintase (Shoichet, B.K. *et al.*, 1994). Uma vez que o estudo de *docking* está bem estabelecido como importante ferramenta na descoberta de novos fármacos, as quinazolininas selecionadas pelo uso da regra de Lipinski foram avaliadas para a capacidade de inibir a FAK. O resultado do estudo de *docking* selecionou 28 estruturas que apresentaram melhores resultados (Tabela 3 em anexo). Além disso, todas as 28 estruturas foram avaliadas em relação aos parâmetros farmacocinéticos pelo uso da plataforma computacional *Pharma Algorithms* (Tabela 4 em anexo). O resultado obtido confirmou aquele resultado obtido para seleção das estruturas pela regra de Lipinski (Tabela 2 em anexo). Os resultados obtidos nos estudos computacionais demonstraram a importância do uso de técnicas computacionais na descoberta de novos fármacos, isto é, a partir de um grande número de estruturas candidatas (de um total de 109 estruturas) apenas 28 foram selecionadas como potenciais inibidores da FAK por *docking*. Isso reduziu tempo e custo para o desenvolvimento do projeto, já que apenas as estruturas previamente selecionadas nos estudos *in silico* foram sintetizadas (Tabela 5 em anexo).

4.3. Síntese, caracterização e absorção das quinazolininas

A síntese orgânica envolve diversas etapas de variadas complexidade. Após a padronização de todas as etapas sintéticas o produto obtido deve estar puro. Os compostos sintéticos devem ser caracterizados por técnicas específicas como Ressonância Nuclear Magnética (RMN) e Espectrometria de Massa (Westphal, F. *et al.* 2012). As quinazolininas foram sintetizadas e caracterizadas como, por exemplo, os espectros obtidos para quinazolinina denominada **4-BZLO**. Além disso, a pureza das quinazolininas foi confirmada por HPLC. O perfil cromatográfico para o composto **4-BZLO** (Figura 19) apresentou apenas um pico de detecção o que determina a obtenção de um composto puro, uma vez que se o mesmo não estivesse puro, o perfil cromatográfico seria diferente devido à presença de contaminantes.

A absorção é a transferência de um fármaco do seu local de administração para a corrente sanguínea (Rowland, R. D. *et al.*, 2007). Na análise quantitativa dos extratos do **4-BZLO** de amostras de plasma de ratos, utilizamos o método de CLAE de fase reversa. A concentração máxima foi aproximadamente 25,65 ng/mL que corresponde a 66µM do **4-BZLO** no plasma do rato. Tal resultado é bastante promissor uma vez que fármacos que apresentam boa biodisponibilidade oral também apresentam elevados níveis de concentração plasmática máxima (Rowland, R. D. *et al.*, 2007).

4.4. Estudos de inibição da FAK *in vitro*

Em geral, os ensaios bioquímicos e celulares são usados no início do processo de descoberta do fármaco, ao passo que estudos mais complexos em órgão e em animais são usados na fase de otimização do protótipo para caracterizar as propriedades farmacológicas

da molécula (Golan, D.E. *et al.*, 2008). Os ensaios bioquímicos avaliam o mecanismo de ação do candidato a fármaco em nível molecular. Os ensaios da atividade enzimática medem a capacidade do fármaco de inibir a atividade de uma enzima-alvo. Nos ensaios celulares, os pesquisadores tentam determinar se a(s) molécula(s) do protótipo atua(m) de modo adequado em um ambiente mais semelhante ao uso *in vivo* (Golan, D.E. *et al.*, 2008). Para selecionar o protótipo deste trabalho, foi utilizado ensaio enzimático e ensaio em células. No ensaio em célula foi utilizado o sistema de células Flp-In (Hillen, W. & Berens, C.; 1994) que superexpressam uma proteína de interesse, ou seja, a proteína alvo do estudo (FAK). O resultado da triagem em células Flp-In que superexpressam a FAK (Figuras 20 e 21) demonstrou que o composto **4-BZLO** foi o que apresentou melhor resultado para inibir a FAK na concentração de 10 μ M.

Ensaio de quinase permite obter concentrações inibitórias para algumas drogas (Ilanguaman, S.; *et al.* 1999). De acordo com a metodologia usada nos ensaios de quinase, observou-se que o composto **4-BZLO** foi capaz de diminuir em 50% a incorporação do ATP radioativo no sítio ativo da FAK com uma concentração de 1nM (Figura 22). Outros inibidores da FAK como, por exemplo, 7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines desenvolvido pela Novartis foi capaz de inibir a FAK com aproximadamente 4 nM (Choi, H. *et al.* 2006) e o PF 228 desenvolvido pela Pfizer também inibiu a FAK com aproximadamente 4 nM (Slack-Davis, J.K. *et al.* 2007). Dessa forma, o **4-BZLO** foi capaz de inibir a FAK na mesma potência dos inibidores da Novartis e Pfizer. De acordo com a literatura científica, bons inibidores são aqueles com capacidade de inibir seus alvos na concentração de μ M em células e nM para ensaios com enzima-ligante utilizando proteínas purificadas (Gautschi, O. *et al.* 2006; Copeland, R.A. *et al.* 2001), portanto, o **4-BZLO** pode ser considerado um bom inibidor da FAK.

A quinase de adesão focal (FAK) é um importante mediador da sinalização que envolve fator de crescimento, proliferação, sobrevivência e migração celular. Fica evidente que o desenvolvimento de malignidade está freqüentemente associado com perturbações nestes processos, e não é surpresa que a atividade da FAK está alterada em células cancerosas. Modelos animais têm mostrado que a FAK está envolvida na formação e progressão de tumores, e outros estudos mostram que a expressão da FAK está aumentada em tumores humanos tornando a FAK um importante e potencial alvo para novas terapias (Gordon, W.; *et al.* 2005). Por meio de colaboração com CIPOI (Centro Integrado de Pesquisas Oncohematológicas na Infância) foram utilizadas células tumorais fornecidas pelo Centro Infantil Boldrini para realizar teste de viabilidade celular de 24 diferentes tipos de neoplasias. Utilizou-se o método MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenila ou brometo de tetrazolina). Foi realizado uma triagem entre 12 substâncias dentre elas o composto **4-BZLO** representado por CP-5 e a Vincristina (VCR) como controle. O composto (**4-BZLO**) foi capaz de inibir a viabilidade de diferentes linhagens de células leucêmicas CEM- *human Lymphoid T leukemia cell line* em aproximadamente 4 μ M, K562 - *human Myeloid Leukemia cell line* e RAMOS - *human Burkitt Linfoma cell line* com aproximadamente 20 μ M. Já a VCR inibiu CEM em aproximadamente 2 μ M, mas não apresentou efeito em RAMOS e inibiu a K562 com concentração acima de 40 μ M (Figura 23). O mesmo protocolo de teste também foi utilizado para triagem com células de tumores sólidos como carcinomas. Novamente, o composto 4-BZLO representado por D5 (Figura 24), apresentou o melhor resultado dentre outras substâncias testadas. As linhagens ROS - *human osteosarcoma cell line*, NCI e H1299 - *human lung cancer cell line*, U87 - *human glioblastoma-astrocytoma, epithelial-like cell line*, o composto 4-BZLO apresentou capacidade de inibição da viabilidade celular em aproximadamente 90 a 100% para as

linhagens citadas acima. Tal resultado foi melhor do que resultado encontrado para a Doxorrobicina usada como fármaco de referência. Vários estudos científicos têm demonstrado a importância da FAK no câncer, podemos destacar: Ozkal e colaboradores (Ozkal, S. *et al.* 2009) realizaram estudos científicos com a linhagem de células leucêmicas CEM e constataram que a expressão da FAK estava aumentada nesta linhagem celular. Edward Kyu-ho Han e colaboradores (Kyu-ho han, E. *et al.* 2004) e Julius e colaboradores (Julius L. *et al.* 2001) demonstraram que a FAK também apresentava sua expressão aumentada em linhagens de células de câncer de pulmão H1299 e NCI. Gonzales, L. e colaboradores (Gonzales, L. *et al.* 2006) demonstraram que a linhagem de células cancerosas MCF7 encontradas em câncer de pulmão apresentou aumento de atividade da FAK pelo aumento de fosforilação de tirosina 397. Gregory G. e colaboradores (Giannone, G. *et al.* 2002) investigaram a relação entre a concentração de Ca^{2+} e aumento de fosforilação da FAK em linhagens de células de astrocitoma U87. Parece haver um aumento de expressão e/ou atividade da FAK em diversas linhagens de células cancerosas.

O veículo usado para diluir os compostos nesta triagem foi o DMSO. Devido ao fato de que o DMSO afetou em menor intensidade a linhagem celular U87 (Figura 25), isto é, menor diminuição da viabilidade celular sob a influência do DMSO. O composto **4-BZLO** apresentou bom resultado nessa linhagem celular e, portanto, decidimos avaliar se o tratamento com o composto **4-BZLO** afeta a atividade da FAK nessa linhagem de células. O resultado demonstrou que o composto **4-BZLO** foi capaz de inibir a atividade da FAK nessas células (Figura 26) o que pode ser interessante, uma vez que os tumores ditos astrocitomas são raros e não existem muitos fármacos no mercado para tratamento desse tipo de câncer (Americam Brain Tumor Association). Os resultados obtidos no teste de viabilidade celular com as linhagens de células cancerosas demonstraram que o composto

4-BZLO obteve o melhor resultado em comparação a outros compostos, e isto pode ser, por via de inibição da FAK, uma vez que o composto **4-BZLO** tem demonstrado ser um potencial inibidor desta enzima.

4.5. Estudos de inibição da FAK *in vivo* – Hipertrofia e Fibrose Cardíaca

A quinase de adesão focal, em miócitos cardíacos, pode ser ativada por várias vias de sinalização, que inclui estímulos químicos e físicos (Franchini, K.G. 2011). Muitos estudos têm demonstrado que a habilidade de sinais químicos tais como, fatores de crescimento, angiotensina II, endotelina I e agonistas adrenérgicos promovem a ativação da FAK em miócitos cardíacos (Seko, Y. *et al.* 1999). Entretanto, já foi demonstrado que a FAK é sensível ao estresse mecânico, (Wang, H.B. 2001) e por isso uma particular atenção foi dada para a relevância de FAK na resposta de miócitos cardíacos ao estresse mecânico.

A coarctação da croça da aorta em camundongos é um modelo que tem sido rotineiramente utilizado em estudos de hipertrofia cardíaca. Neste modelo, há um rápido crescimento hipertrófico do ventrículo esquerdo VE em resposta à sobrecarga pressórica, evoluindo para a insuficiência cardíaca. Os animais foram tratados com **4-BZLO** de maneira curativa e preventiva com uma dose de 30 mg/Kg/dia para dois grupos de tratamento de 15 e 30 dias. Antes e após o tratamento os animais foram analisados para medidas de parâmetros ecocardiográficos e gravimétricos. Não houve diferença dos resultados entre os grupos de 15 e 30 dias. Também não houve diferença marcante entre os resultados obtidos para os grupos de animais tratados de maneira preventiva e curativa. Nos animais coarctados os parâmetros do ecocardiograma mostraram aumento da espessura da parede do ventrículo esquerdo condizente com a hipertrofia cardíaca. No grupo coarctado e

tratado com **4-BZLO** a espessura da parede do ventrículo esquerdo foi reduzida o que demonstra que o **4-BZLO** foi eficiente para reduzir a espessura da parede do ventrículo esquerdo nesses animais tratados. O resultado da gravimetria também contribuiu para demonstrar que o **4-BZLO** reduziu a hipertrofia cardíaca nos animais tratados. No estudo de gravimetria, os animais coarctados apresentaram um índice de massa do ventrículo esquerdo (relação do peso médio do ventrículo esquerdo sobre o peso médio corporal total dos animais) aumentados em relação aos animais sham. Já nos animais coarctados e tratados com o **4-BZLO**, o índice de massa do ventrículo esquerdo estava diminuído em relação aos animais coarctados e não tratados (Figuras 28 e 29). O aumento do diâmetro dos miócitos cardíacos é um marcador de hipertrofia cardíaca (Clemente, C.F.M.Z. *et al.* 2007). No grupo dos animais coarctados houve aumento do diâmetro dos cardiomiócitos em relação ao grupo sham. Tal aumento foi reduzido no grupo de animais coarctados e tratados com o **4-BZLO**. Esse resultado contribui para a hipótese de que o **4-BZLO** é capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca em animais coarctados. Os resultados mostraram que a diminuição da hipertrofia imposto pela coarctação da aorta se deve possivelmente pela inibição da FAK. Para confirmar essa hipótese, estudos demonstraram aumento da expressão e atividade (fosforilação da tirosina 397) da FAK no miocárdio hipertrófico de camundongos submetidos à coarctação da aorta crônica (Franchini, K. *et al.* 2000; Domingos, P. *et al.* 2002). Para avaliar se o composto **4-BZLO** inibiu a FAK *in vivo* mediu-se atividade e a expressão da FAK em tecido cardíaco nos animais dos grupos sham, coarctados e coarctados/tratados. O resultado demonstrou que a expressão e a atividade da FAK estavam aumentadas nos animais coarctados e diminuídas nos animais coarctados e tratados com o **4-BZLO** (Figura 31). Os dados obtidos corroboram com a inibição da FAK *in vitro*, ou seja, o composto **4-BZLO** inibiu a FAK *in vitro* e também *in vivo*.

Evidências científicas indicam que a FAK participa de sinalização em vias de desenvolvimento de má adaptação hipertrófica (Peng *et al.* 2007; DiMichele, L. *et al.* 2006, Clemente, C.F.M.Z *et al.* 2007). Corroborando esta ideia, estudos demonstraram que FAK encontra-se com sua expressão e atividade aumentada em ventrículos esquerdos de ratos com disfunção crônica por sobrecarga (Bayer, A.L. *et al.* 2002). Em tal modelo, uma correlação foi demonstrada entre o grau de hipertrofia e expressão de FAK durante a transição da hipertrofia ventricular esquerda compensada para insuficiência cardíaca. Interessantemente, embora a FAK fosse detectada em miócitos cardíacos em ratos Sham e em ratos portadores de estenose aórtica, muito do aumento da expressão da FAK ocorre no interstício cardíaco, isto sugere que tal aumento de expressão da FAK no interstício foi devido à proliferação de fibroblastos cardíacos. Entretanto, neste modelo foi demonstrado que a FAK também estaria aumentada em alguns miócitos cardíacos adjacentes às áreas de fibrose, isto implica que a ativação da FAK em miócitos cardíacos pode também contribuir para deterioração de corações de ratos com sobrecarga crônica (DiMichele, L. *et al.* 2006). Resultado similar também foi obtido em ventrículos esquerdos de camundongos submetidos à sobrecarga crônica (Clemente, C.F. *et al.* 2007). Além disso, o aumento da expressão e atividade da FAK foi observado em amostras de células cardíacas obtidas de cirurgia realizadas em indivíduos com regurgitação mitral comparados com amostras de coração transplantados (Lopes, M.M. *et al.* 2007). Nas amostras dos corações transplantados à detecção da FAK foi quase que exclusivamente restrito aos miócitos cardíacos, mas nas amostras de corações com insuficiência cardíaca a FAK estava localizada preferencialmente no interstício. A fibrose é caracterizada por deposições excessivas de colágeno e remodelamento de matriz extracelular que leva a falha orgânica e a morte. O processo fibrótico é o resultado de uma resposta aberrante para uma lesão que

induz a migração, proliferação e ativação de células mesenquimais com a geração de miofibroblastos que tem papel chave na fibrogênese de tecido (Wynn, T.A. *et al.* 2007). Assim, existe muito interesse tanto da clínica como da indústria farmacêutica para identificar mecanismos de inibição da atividade de miofibroblastos ou de sua função.

Sabendo-se que a fibrose cardíaca é uma condição importante para a disfunção cardíaca, houve a necessidade de investigar a resposta para o tratamento com o **4-BZLO** em modelo de fibrose cardíaca. No presente estudo os animais foram tratados de maneira preventiva e curativa por 15 e 30 dias, no entanto não houve diferenças marcantes entre os grupos citados acima. No grupo de animais coarctados observou um aumento do acúmulo de colágeno em relação ao grupo sham, portanto, houve aumento da área de fibrose cardíaca nesses animais. No grupo coarctado e tratado com o **4-BZLO** ocorreu uma expressiva redução no acúmulo de colágeno, isto é, nesses animais o **4-BZLO** foi capaz reduzir a fibrose cardíaca. Esse resultado é bastante promissor, uma vez que a fibrose é uma condição que provoca a perda da capacidade funcional do coração e, portanto, um novo fármaco que consiga agir na redução da fibrose poderá melhorar o funcionamento do coração em pacientes com insuficiência cardíaca.

4.6. Avaliação do 4-BZLO em modelo de animal transgênico específico para FAK

Nosso laboratório desenvolveu camundongos transgênicos específicos para a FAK que desenvolve moderada hipertrofia cardíaca (Clemente, C.F.M.Z. *et al.* 2011). Em tal modelo, procurou-se determinar se a FAK sinaliza vias funcionais para o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca. Foi observado que moderado aumento na expressão da FAK induz a modificações funcionais, estruturais e moleculares de uma concêntrica, mas compensada

hipertrofia cardíaca. Consistente com este fenótipo, miócitos isolados de camundongos transgênicos apresentavam um aumento da área seccional cruzada, sem alteração no comprimento, quando comparado com camundongos selvagens. Também com esse modelo, evidências que efeitos pro-hipertróficos da FAK são comumente mediados por sinalização das vias AKT e mTOR foram demonstrados (Clemente, C.F.M.Z. *et al.* 2011). O modelo de camundongos transgênico específico para a FAK constatou que a resposta à sobrecarga pressórica é preservada nos corações hipertróficos destes animais. Também ficou evidenciado nos animais transgênicos para a FAK que a hipertrofia cardíaca requer aumento da atividade da FAK (Clemente, C.F.M.Z. *et al.* 2011). Assim, tal modelo permitiu testar a eficiência do composto **4-BZLO** para tratamento da hipertrofia cardíaca induzida pela FAK. Parâmetros de ecocardiografia foram avaliados, como por exemplo, a medida da espessura da parede do ventrículo esquerdo que se encontrava aumentada nos animais transgênicos em relação ao selvagem e diminuída nos animais transgênicos tratados com o **4-BZLO**. Os parâmetros gravimétricos também foram avaliados. A relação do peso médio do ventrículo esquerdo sobre o peso médio corporal dos animais transgênicos estava aumentada em relação ao selvagem e foi diminuída após o tratamento com o **4-BZLO** (Figura 32). Os resultados obtidos com os animais transgênicos específicos para a FAK demonstraram que o **4-BZLO** foi capaz de reduzir a hipertrofia cardíaca devido a inibição da FAK nesses animais.

5. SUMÁRIO

O presente trabalho descreve uma nova quinazolina com capacidade de inibir a quinase de adesão focal (FAK). Para isso foi necessário o uso de estudos computacionais que permitiram selecionar estruturas propostas para a síntese de maneira racional, portanto houve economia de tempo e de dinheiro.

O composto **4-BZLO** apresentou grau de pureza satisfatório e apresentou absorção *in vivo*. Tal composto foi o que apresentou melhor resultado para inibir a atividade da FAK em células (Flp-In) que superexpressam essa enzima. Além disso, o mesmo composto foi capaz de inibir a atividade da FAK em aproximadamente 50% com 1nM em ensaio enzimático. O composto **4-BZLO** também apresentou capacidade de inibir a FAK *in vivo* nos animais tratados com esse composto.

O **4-BZLO** apresentou resultados satisfatórios em teste de *screening* para diferentes linhagens de células leucêmicas e tumor sólido. A linhagem U87, que representa um glioblastoma humano, foi uma das linhagens que mais sofreu influência do **4-BZLO** no teste de *screening*. O composto **4-BZLO** inibiu a atividade da FAK nessa linhagem celular, o que pode sugerir que o resultado promissor no *screening* pode ser devido à inibição da atividade da FAK.

Em experimento de coarctação da aorta que leva a um aumento da massa cardíaca (hipertrofia) e fibrose, os animais foram tratados com **4-BZLO** de maneira curativa e preventiva. Como resultado demonstramos que houve redução da hipertrofia e da fibrose nos animais tratados, quando comparado aos animais controle. Finalmente, em camundongos transgênicos que superexpressam a FAK em miócitos cardíacos apresentaram hipertrofia cardíaca compensada e após tratamento com **4-BZLO**, houve redução da hipertrofia cardíaca.

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que o composto quinazolina denominado **4-BZLO** é um bom candidato a fármaco como inibidor da FAK.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Armarego, W. L. F. In *The Chemistry of Heterocyclic Compounds*, (Ed.: Brown, D. J.), *Interscience*, New York, *Vol. 24*, 1967(a); Barton, D.; Ollis, W. D. In *Comprehensive Organic Chemistry. Pergamon Press*, Oxford, *Vol. 4*, 1979, p. 122.(b); Brown, D. J. Quinazolines. In *The Chemistry of Heterocyclic Compounds (supplement D)*; Wiley, New York, *Vol. 55*, 1996 (c).

Arold, S.T.; Hoellerer, M.K.; Noble, M.E. The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure*. 2002, *10*: 319–327.

Barreiro, E. J. *As Bases Moleculares da Ação dos Fármacos*, Fraga, C.A.M 2ª ed.; Porto Alegre, 2008, P.41.

Bayer, A.L.; Heidkamp, M.C.; Patel, N.; Porter, M.J.; Engman, S.J.; Samarel, A.M. PYK2 expression and phosphorylation increases in pressure overload-induced left ventricular hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002, *283*:H695–706.

Bos, M.; Mendelsohn, J.; Kim, Y.M.; Albanell, J. Fry; D.W.; Baselga, J. PD153035, a tyrosine kinase inhibitor, prevents epidermal growth factor receptor activation and inhibits growth of cancer cells in a receptor number-dependent manner. *Clin. Cancer Res*. 1997, *11*: 2099-106.

Botwen, J.P.; Cory, M. Computer-assisted drug design. In: Swarbrick, J. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*. New York: Dekker. 2002, P.585-604.

Calalb, M.B.; Polte, T.R.; Hanks, S.K. (1995). Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol. Cell. Biol.* 1995, 15: 954–963.

Ceccarelli, D.F.; Song, H.K.; Poy, F.; Schaller, M.D.; Eck, M.J. Crystal structure of the FERM domain of focal adhesion kinase. *J. Biol. Chem.* 2006, 281: 252-259.

Chen, X.; Rusinko, A.; Tropsha, A.; Young, S.S. Automated Pharmacophore Identification for Large Chemical Data Set. *J. Chem. Inf. and Model.* 1999, 39, 887-896.

Choi, H.-S.; Wang Z.; Richmond. W.; He, X.; Yang, K.; Jiang, T.; Sim, T.; Karanewsky, D.; Gu, X.; Zhou, V.; Liu, Y.; Ohmori, O.; Caldwell, J.; Gray, N.; He, Y. Design and synthesis of 7*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyrimidine as focal adhesion Kinase inhibitors. Part 1. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16: 2173-2176.

Choi, H.S.; Wang, Z.; Richmond, W.; He, X.; Yang, K.; Jiang, T.; Karanewsky, D.; Gu, X.J.; Zhou, V.; Liu, Y.; Che, J.; Lee, C.C.; Caldwell, J.; Kanazawa, T.; Umemura, I.; Matsuura, N.; Ohmori, O.; Honda, T.; Gray, N.; He, Y. Design and synthesis of 7-*H*-pyrrolo[2,3-*d*]pyridines as focal adhesion kinase inhibitors. Part 2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2006, 16 : 2689-2692.

Clemente, C.F.M.Z.; Tornatore, T.F.; Theizen, T.H.; Deckmann, A.C.; Pereira, T.C.; Lopes-Cendes, I.; Souza, J.R.; Franchini, K.G. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ. Res.* 2007, *101*: 1339-1348.

Clemente, C.F.M.Z.; Xavier-Neto, J.; Dalla Costa, A.P.; Consonni, S.R.; Antunes, J.E.; Rocco, S.A.; Pereira, M.B.; Judice, C.C.; Strauss, B.; Joazeiro, P.P.; Matos-Souza, J.R.; Franchini, K.G. Focal adhesion kinase governs cardiac concentric hypertrophic growth by activating the AKT and mtor pathways. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology.* 2012, *52*: 493-501.

Cohen N.C. The molecular modeling perspective in drug design. In: Cohen N.C. Guidebook on molecular modeling in drug design. California: *Academic Press.* 1996. P.1-17.

Connolly, T. J.; McGarry, P.; Sukhtankar, S. An eco-efficient pilot plant scale synthesis, of two 5- Substituted – 6, 7- Dimetoxi – 1- H- Quinazoline-2,4-Diones. *Green Chem.* 2005, *7*: 586–589.

Copeland, R.A.; Anderson, P.S. Enzymes and Enzymes Inhibitors In Textbook of Drug Design and Discovery, 3. ed.; Krogsgaard-Larsen, P.; Liljefors, T.; Madsen, U. (eds.), New York, Taylor and Francis. 2001, pp. 328-363.

Cox, B.D.; Natarajan, M.; Stettner, M.R.; Gladson, C.L. New concepts regarding focal adhesion kinase promotion of cell migration and proliferation. *J. Cell. Biochem.* 2006, 99:35–52.

Dalla Costa, A.P.; Clemente, C.F.; Carvalheira, J.B.; Nadruz, W.Jr.; Franchini, K.G. FAK mediates the activation of cardiac fibroblasts induced by mechanical stress through regulation of the mTOR complex. *Cardiovasc. Res.* 2010, 86: 421-31.

Desjarlais, R.L.; Seiibel, G.L.; Kuntz, I.D.; Furth, P.S.; Alvarez, J.C.; Demontellano, P.R.O.; Decamp, D.L.; Babe, L.M.; Craik, C.S. Structure-Based Design of Nonpeptide Inhibitors Specific for the Human Immunodeficiency Virus-1 Protease, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990, 87:6644.

DiMichele, L. A.; Doherty, J.T.; Rojas, M.; Beqqs, H.E.; Reichardt, L.F.; Mack, C.P.; Taylor, J.M.. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ. Res.* 2006, 99: 636-45.

Do Amaral, A. T.; Montanari, C. A. Química Medicinal: 25 anos de planejamento racional de fármacos. *Química Nova.* 2002, 25, 39-44.

Domingos, P.P.; Fonseca, P.M.; Nadruz Jr.; W.; Franchini, K.G. Load-induced focal adhesion kinase activation in the myocardium: role of stretch and contractile activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002, 282: H556–564.

Dorn II, G. W.; Molkeni, J.D. Manipulating cardiac contractility in heart failure. *Circulation Research*. 2004, *109*: 150-158.

Eble, D.M.; Strait, J.B.; Govindarajan, G.; Lou, J.; Byron, K.L.; Samarel, A.M. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000, *278* (5):1695-1707.

Engel T. Basic overview of chemoinformatics. *J. Chem. Informat. Model.* 2006, *46*:2267-77.

Fonseca, P.M.; Inoue, R.Y.; Kobarg, C.B.; Crosara-Alberto, D.P.; Kobarg, J.; Franchini, K.G. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2005, *96*:73-81.

Fraga C.A.M.; Barreiro E.J. Cardiotônicos: histórico e perspectiva de uma antiga e importante classe de agentes terapêuticos. *Quim. Nova.* 1996,*19*:182-9.

Franchini, K.G.; Torsoni, A.S.; Soares, P.H.; Saad, M.J. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ. Res.* 2000, *87*:558–565.

Franchini, K. G.; Marin, R. M.; Saad, M. J. A.; Rittner, R; Rocco, S. A. 4-Anilinoquinazolines with adenosine-kinase inhibitor properties. 2004, BR2004PI00869; WO2004BR00196.

Franchini, K.G. Focal adhesion kinase The basis of local hypertrophic signaling domain. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2011, 52(2):485-492.

Frey, N.; Katus, H.A.; Olson, E.N.; Hill, J.A. Hypertrophy of the Heart: A New Therapeutic Target? *Circulation.* 2004, 109:1580 - 1589.

Fry, D.W.; Bridges, A.J.; Denny, W.A.; Doherty, A.; Greis, K.D.; Hicks, J.L.; Hook, K.E.; Keller, P.R.; Leopold, W.R.; Loo, J.A.; McNamara, D.J.; Nelson, J.M.; Sherwood, V.; Smail, J.B.; Trumpp-Kallmeyer, S.; Dobrusin, E.M. Specific, irreversible inactivation of the epidermal growth factor receptor and erbB2, by a new class of tyrosine kinase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998, 95: 12022-12027.

Gautschi, O.; Purnell, P.; Evans, C.P.; Yang, J.C.; Holland, W.S.; Bold, R.J.; Virudachalam, S.;Lara, P.N.; Gandara, P.N.; Gumerlock, P.H. Preclinical evaluation of the dual specific Src/Abl Kinase inhibitor AZD0530 in lung cancer. *Journ. Clinic. Onc.* 2006, 24: 13108.

Golan, D. E.; Tashjian, A. H.; Jr.; Armstrong, E. J. April W. Armstrong, A. W. *Principle of Pharmacology*, 2^a ed. 2009, Willians & Wilkins,.3-7.

Gordon, W.; McLean, N. O.; Carragher, E. A.; Evans, J.; Brunton, V. G.; Frame M. C. The role of focal-adhesion kinase in cancer — a new therapeutic opportunity. *Nature Reviews Cancer*. 2005, 5: 505-515

Golubovskaya, V.M.; Kweh, F.A. Cance, W.G. Focal adhesion kinase and cancer. *Histol. Histopathol*. 2009,24: 503-510.

Giannone, G.; Rondé, P.; Gaire, M.; Haiech, J.; Takeda, K. Calcium Oscillations Trigger Focal Adhesion Disassembly in Human U87 Astrocytoma Cells. *J. Biol. Chem*. 2002, 277: 26364–26371.

Giorgi, D.M.A. Diretrizes brasileiras de monitorização ambulatorial e residencial da pressão arterial. *Revista Hipertensão*. 2011, 14: 6-11.

González, L.; Agulló-Ortuño, M.T.; García-Martínez, J.M.; Calcabrini, A.; Gamallo, C.; Palacios, J.; Aranda, A.; Martín-Pérez, J. Role of c-Src in Human MCF7 Breast Cancer Cell Tumorigenesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281: 20851–20864.

Grisaru-Granovsky, S.; Salah, Z.; Maoz, M.; Pruss, D.; Beller, U.; Bar-Shavit, R. Differential expression of Protease activated receptor 1 (Par1) and py397fak in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int. J. Cancer*. 2004, 113: 372–378.

Grossman, W.; Jones, D.; McLaurin, L.P. Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J. Clin. Invest.* 1975, *56(1)*: 56-64.

Gschwend, D.A.; Sirawawaraporn, W.; Santi, D.V.; Kuntz, I.D. Specificity in Structure-Based Drug Design: Identification of a Novel, Selective Inhibitor of *Pneumocystis carinii* Dihydrofolate Reductase. *Proteins.* 1997, *27*: 59.

Guido, M.C.; de Carvalho Frimm, C.; Koite, M.K.; Cordeiro, F.F.; Moretti, A.I.; Godoy, L.C. Low coronary driving pressure is associated with subendocardial remodeling and left ventricular dysfunction in aortocaval fistula. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2007, *34*:1165-72.

Hakim, Z. S.; DiMichele, L. A.; Doherty, J. T.; Homeister, J. W.; Beggs, H. E.; Reichardt, L. F.; Schwartz, R. J.; Brackhan, J.; Smithies, O.; Mack, C. P. et al. Conditional deletion of focal adhesion kinase leads to defects in ventricular septation and outflow tract alignment. *Mol. Cell Biol.* 2007, *27*: 5352-5364.

Hastie, C.J.; McLauchlan, H.J.; Cohen, P. Assay of protein kinase using radiolabeled ATP: a protocol. *Nat. protoc.* 2006, *2*: 968-71.

Hanks, S.K.; Hunter, T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J.* 1995, *9*:576-596.

Hansch C. Quantitative structure-activity relationships and the unnamed science. 1993, *Acc. Chem. Res.* 1993, 26:147-53.

Harvey, P.A.; Leinwand, L.A. Cellular mechanisms of cardiomyopathy. *J. Cell Biol.* 2011, 194: 355-365.

Hayashi, I.; Vuori, K.; Liddington, R.C. The focal adhesion targeting (FAT) region of focal adhesion kinase is a four-helix bundle that binds paxillin. *Nat. Struct. Biol.* 2002, 9: 101-106.

Head-Gordon M. Quantum chemistry and molecular process. *J. Phys. Chem.* 1996, 100:13213-25.

Hillen, W. & Berens, C. Mechanisms Underlying Expression of Tn10 Encoded Tetracycline Resistance. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994, 48: 345-369.

Ilanguraman, S.; Arni, S.; Echten-Deckert, G.V.; Borisch, B.; Hoessli, D.C. Microdomain-dependent regulation of Lck and Fyn protein-tyrosine kinase in T lymphocyte plasma membranes. *Mol. Biol. Cell.* 1999, 10:891-905.

Ilic, D.; Furuta, Y.; Kanazawa, S.; Takeda, N.; Sobue, K.; Nakatsuji, N.; Nomura, S.; Fujimoto, J.; Okada, M.; Yamamoto, T. Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature.* 1995, 377: 539-544

Itai A.; Mizutani M.Y.; Nishibata Y.; Tomioka N. Computer-assisted new lead design. In: Cohen N.C. Guidebook on molecular modeling in drug design. California: *Academic Press*. 1996, P. 93-135.

Keller, T.C.; Zocco, D.; Sundrud, M.S.; Hendrick, M.; Edenius, M.; Yum, J.; Kim, Y.J.; Lee, H-K. Cortese, J.F.; Wirth, D.F.; Dignam, J.D.; Rao, A.; Yeo, C-Y.; Ralph Mazitschek, R.; Whitman, M. Halofuginone and other febrifugine derivatives inhibit prolyl-t-RNA synthetase. *Nat. Chem. Biol.* 2012, 8: 311-17.

Klutchko, S. R.; Zhou, H.; Winters, R. T.; Tran, T. P.; Bridges, A. J.; Althaus, I. W.; Amato, D. M.; Elliott, W. L.; Ellis, P. A.; Meade, M. A. et al. Tyrosine kinase inhibitors. 19. 6-Alkynamides of 4-anilinoquinazolines and 4-anilinopyrido[3,4-d]pyrimidines as irreversible inhibitors of the erbB family of tyrosine kinase receptors. *J. Med. Chem.* 2006, 49: 1475-1485.

Kubinyi H. Quantitative structure-activity relations. The bilinear model, a new model for nonlinear dependence of biological activity on hydrophobic character. *J. Med. Chem.* 1977, 20: 625-9.

Kubinyi H. Folkek G.; Martin Y.C. 3D QSAR in drug design. *Recent advances*. London: Kluwer/ESCOM. 1998, Vol. 3.

Kyu-ho han, E.; Mcgonigal, T.; Wang, J.; Giranda, V.L.; Luo, Y. Functional Analysis of Focal Adhesion Kinase (FAK) Reduction by Small Inhibitory rnas, *Anticancer Research*. 2004, 24: 3899-3906.

Lechertier, T. & Hodivala-Dilke, K. Focal adhesion kinase and tumour angiogenesis. *J Pathol*. 2012, 226: 404–412.

Li, R.S.; Chen, X.W.; Gong, B.Q.; Selzer, P.M.; Li, Z.; Davidson, E.; Kurzban, G.; Miller, R.E.; Nuzum, E.O.; McKerrow, J.H.; Fletterick, R.J.; Gillmor, S.A.; Craik, C.S.; Kuntz, I.D.; Cohen, F.E.; Kenyon, G.L.; Structure-Based Inhibitor Design of Parasitic Protease Inhibitors, *Bioorg. Med. Chem*. 1996, 4:1421.

Lietha, D.; Cai, X.; Ceccarelli, D.F.; Li, Y.; Schaller, M.D.; Eck, M.J. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell*. 2007,129: 1177-1187.

Lipinski, C.A.; Lombardo, F.; Dominy, B.W.; Feeney, P.J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 1997,23:3-25.

Lipinski, C.A. Drug-Like Proprerties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 2000, 44: 235-249.

Lopes, M.M.; Ribeiro G.C.; Tornatore T.F. Clemente CF, Teixeira VP, Franchini KG. Increased expression and phosphorylation of focal adhesion kinase correlates with dysfunction in the volume-overloaded human heart. *Clin. Sci.* 2007, *113*:195–204.

Lybrand, T.P. Ligand Protein Docking and Rational Drug Design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 1995, *5*: 224.

Marin, T.M.; Clemente, C.F.M.Z.; Santos, A.M.; Picardi, P.K.; Pascoal, V.D.B.; Lopes-Cendes, I.; Saad, M.J.A.; Franchini, K.G. Shp2 Negatively Regulates Growth in Cardiomyocytes by Controlling Focal Adhesion Kinase/Src and mTOR Pathways. *Circ. Res.* 2008, *103*: 813-824.

Matkowskyj, K. A.; Keller, K.; Glover, S.; Kornberg, L.; Tran-Son-Tay, R.; Richard V. Benya, R.V. Expression of GRP and its receptor in well-differentiated colon cancer cells correlates with the presence of focal adhesion kinase phosphorylated at tyrosines 397 and 407. *J. Histochem. Cytochem.* 2003, *51*:1041–1048.

McClean, G.W.; Carragher, N.O.; Avizienyte, E.; Evans, J.; Brunton, V.G.; Frame, M.C. The role of focal-adhesion kinase in cancer - a new therapeutic opportunity. *Nat Rev Cancer.* 2005, *5*: 505–515.

Mellinghoff, I.K.; Tran, C.; Sawyers, C.L. Growth Inhibitory Effects of the Dual ErbB1/ErbB2 Tyrosine Kinase Inhibitor PKI-166 on Human Prostate Cancer Xenografts. *Cancer Res.* 2002, *62*:5254-5259.

Mestres, J.; Veeneman, G.H. Identification of 'latent hits' in compound screening collections. *J. Med. Chem.* 2003, *46*: 3441–3444.

Mitra S.K.; Hanson D.A.; Schlaepfer D.D. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2005, *6*: 56–68.

Mohan V. Gibbs A.C.; Cummings M.D.; Jaeger E.P.; Desjarlais R.L. Docking: Success and challenges. *Curr. Pharm. Design.* 2005, *11*:323-33.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 1983, *65*: 55-63.

Nowakowski, J.; Cronin, C.N.; McRee, D.E.; Knuth, M.W.; Nelson, C.G.; Pavletich, N.P. Structures of the cancer-related Aurora-A, FAK, and EphA2 protein kinases from nanovolume crystallography. *Structure.* 2002,*10*: 1659–1667.

O’Gorman, S.; Fox, D. T.; Wahl, G. M. Recombinase-Mediated Gene Activation and Site-Specific Integration in Mammalian Cells. *Science.* 1999, *251*: 1351-1355.

Ozkal, S.; Paterson, J.C. Tedoldi, S.; Hansmann, M.L.; Kargi, A.; Manek, S.; Mason, D.Y.; Marafioti, T. *Focal adhesion kinase (FAK) expression in normal and neoplastic lymphoid tissues. Pathol Res Pract.* 2009, *11*: 781-88.

Pao, W.; Miller, V.; Sakowski, M. EGF receptor gene mutation are common in lung cancer from “never smoker” and are associated with sensitive of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proced. Of the Nat. Acad. Of Scienc. Of U.S.A.* 2004, *36*:13306-11.

Parsons, J.T. Focal adhesion kinase: the first ten years. *J. Cell. Sci.* 2003, *116*:1409–1416.

Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J. Clin. Invest.* 2006, *116*:217–27.

Polte, T.R.; Hanks S.K. Signaling through focal adhesion kinase. *Bioessays.* 1997, *19*(2):137-145.

Ritter, O.; Neyses, L.; The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure, *Trends Mol. Med.* 2003, *9*(7): 313-321.

Roth, D.; Swaney, J.S.; Dalton, N.D.; Gilpin, E.A.; Jr.; J.R. Impact of anesthesia on cardiac fuction during echocardiography in mice. *Am J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2002, *282*:H2134-40.

Rowland, R. D.; Mycek, M.J. *Farmacologia Ilustrada*, 3^a ed. Porto Alegre : Artmed, 2007, 560p.

Russell, B.; Monthagh, D.; Ashley, W.W. Form Follows function: how muscle shape is regulated by work. *J. Appl. Physiol.* 2000, 65: 45-79.

Ruwhof, C.; van der Laarse, A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular Research.* 2000, 47: 23–37.

Sadoshima, J.; Izumo, S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* 1997, 59:551-571.

Schlaepfer, D. D.; Mitra, S. K.; Ilic, D. Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004, 1692: 77–102.

Seko, Y.; Takahashi, N.; Tobe, K.; Kadowaki, T.; Yazaki, Y. Pulsatile stretch activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) family members and focal adhesion kinase [p125(FAK)] in cultured rat cardiac myocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999, 259:8–14.

Selvam, T.P.; Kumar, P.J. Quinazoline marketed drug. *Res. In Pharm.* 2011, 1:1-21.

Shen, T. L.; Park, A. Y.; Alcaraz, A.; Peng, X.; Jang, I.; Koni, P.; Flavell, R. A.; Gu, H.; Guan, J. L. Conditional knockout of focal adhesion kinase in endothelial cells reveals its role in angiogenesis and vascular development in late embryogenesis. *J. Cell Biol.* 2005, *169*: 941-952.

Shen H. Illustrated Pharmacology Memory Cards. *Pharmmnemonics*. 2008. Minireview.

Shoichet, B.K.; Stroud, R.M.; Santi, D.V.; Kuntz, I.D.; Perry, K.M. Structure-Based Discovered of Inhibitors of Thymidylate Synthase, *Science*. 1993, *259*:1445.

Slack-Davis, J.K.; Martin, K.H.; Tilghiman, R.W.; Iwanicki, M.; Ung, E.; Autry, C.; Luzzio, M.J.; Cooper, B.; Kath, J.C.; Roberts, W.G.; Parsons, T. Cellular Characterization of a Novel Focal Adhesion Kinase Inhibitor. *Journ. Biol. Chem.* 2007, *20*:14845-52.

Smith, H.O.; Blessing, J.A.; Vaccarello, L. Trimetrexate in the treatment of recurrent or advanced leiomyosarcoma of the uterus. *Gynecol. Oncol.* 2002, *1*:140-4.

Sussman, M.A.; McCulloch, A.; Borg, T.K. Dance band on the Titanic: biomechanical signaling in cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 2002, *91*: 888-898.

Taylor, J.M. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ. Res.* 2006, *99*: 636-645.

Thomas, G. *In Computer Aided Drug. Fund. Med. Chem.* 2003, 98-109.

Thomsen, R.; Christensen, M.H.; MolDock: A new technique for high-accuracy molecular docking. *Journ. Med. Chem.* 2006, 49: 3315-21.

Tiseo, M.; Loprevite, M.; Ardizzoni, A. Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors: A New Prospective in the Treatment of Lung Cancer. *Curr. Med. Chem: Anti-Cancer Agents.* 2004, 4:139-148.

Tobe, M.; Isobe, Y.; Tomizawa, H.; Nagasaki, T.; Takahashi, H.; Fukazawa, T.; Hayashi, H. Discovery of Quinazolines as a Novel Structural Class of Potent Inhibitors of NF- κ B Activation. *Bioorg. & Med. Chem.* 2003, 11: 383–391.

Torsoni, A.S.; Constancio, S.S.; Nadruz, Jr. W.; Hanks, S.K.; Franchini, K.G. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ. Res.* 2003, 93:140–7.

Torsoni, A.S.; Marin, T.M.; Velloso, L.A.; Franchini, K.G. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2005, 289: 1488-1496.

Traxler, P.; Allegrini, P.R.; Brandt, R.; Brueggen, J.; Cozens, R.; Fabbro, D.; Grosios, K.; Lane, H.A.; McSheehy, P.; Mestan, J.; Meyer, T.; Tang, C.; Wartmann, M.; Wood, J.;

Caravatti, G. A Dual Family Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB2 and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor with Antitumor and Antiangiogenic Activity. *Cancer Research*. 2004, *64*: 4931-4941.

Vadali, K.; Cai, X.; Schaller, D. Focal adhesion kinase: an essential kinase in the regulation of cardiovascular functions. *IUBMB Life*. 2007, *59(11)*: 709-16.

Vansteenkiste, J.F. Gefitinib (Iressa®): a novel treatment for non-small cell lung cancer. *Expert Rev. Anticancer Ther*. 2004, *4*:5-17,

Wang, H.B.; Dembo, M.; Hanks, S.K.; Wang, Y. Focal adhesion kinase is involved in mechanosensing during fibroblast migration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001, *98*: 11295-11300.

Westphal, F.; Junge, T.; Girreser, U.; Greibl, W.; Doering, C.; Mass, NMR and IR spectroscopic characterization of pentedrone and pentylone and identification of their isocathinone by-products. *Forensic Sci. Int*. 2012, *217*: 157-67.

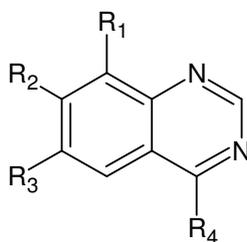
Wissner, A.; Berger, D.M.; Boschelli, D.H.; Floyd, M.B. Jr; Greenberger, L.M. 4-Anilino-6,7-dialkoxyquinoline-3-carbonitrileinhibitors of epidermal growth factor receptor kinase and their bioisosteric relationship to the 4-anilino-6,7-dialkoxyquinazoline inhibitors. *J. Med.Chem*. 2000, *43*: 3244–3256.

Wynn, T.A. Common and unique mechanisms regulate fibrosis in various fibroproliferative diseases. *J. Clin. Invest.* 2007, *117*(3):524-9.

Yang, J-M.; Chen, C.C. GEMDOCK: A generic evolutionary method for molecular docking, *Proteins*. 2004, *55*:288-304.

Zmuidinavicius, D.; Didziapetris, R.; Japertas, P.; Avdeef, A.; Petrauskas, A. Classification structure-activity relations (C-SAR) in prediction of human intestinal absorption, *J. Pharm.Sci.* 2003, *92* :621-33.

Tabela 2. Lista das quinazolininas em relação ao cálculo do Log P. Abaixo representação esquemática do anel quinazolínico com as posições R1, R2, R3, R4 que foram substituídas



Estrutura	R1	R2	R3	R4	Log P
1	OMe	H	H	3-nitro-5-(trifluoromethyl)aniline	4,12
2	OMe	H	H	1,3-benzodioxol-5-amine	2,93
3	OMe	H	H	3,5bis(trifluoromethyl)aniline	5,06
4	OMe	H	H	3-(methylthio)aniline	3,93
5	OMe	H	H	4-(4-chlorophenoxy)aniline	5,41
6	OMe	H	H	4-(methylthio)aniline	3,93
7	OMe	H	H	4-(trifluoromethyl)aniline	4,18
8	OMe	H	H	4-[(4-nitrophenyl)thio]aniline	5,43
9	OMe	H	H	4-chloro-3-(trifluoromethyl)aniline	4,78
10	OMe	H	H	4-aminobenzenesulfonic acid	2,48
11	OMe	H	H	2-[(4-chlorophenyl)thio]aniline	6,09
12	OMe	H	H	3-(difluoromethoxy)benzene-1,2-diamine	4,07
13	OMe	H	H	2-(methylthio)aniline	3,93
14	OMe	H	H	2-(phenylsulfonyl)aniline	4,26
15	OMe	H	H	2-(phenylthio)aniline	5,49
16	OMe	H	H	2-methoxyaniline	4,73
17	OMe	H	H	2-(trifluoromethyl)aniline	4,18
18	OMe	H	H	3-(1,1,2,2-tetrafluoroethoxy)aniline	4,46
19	OMe	H	H	1-(3-aminophenyl)ethanol	2,95
20	OMe	H	H	3-(difluoromethoxy)aniline	4,10
21	OMe	H	H	3-methoxyaniline	4,73
22	OMe	H	H	3-(trifluoromethyl)aniline	4,18
23	OMe	H	H	1-(4-aminophenyl)ethanol	2,95
24	OMe	H	H	4-(2-aminoethyl)aniline	2,72
25	OMe	H	H	4-(4-bromophenoxy)aniline	5,57
26	OMe	H	H	4-(4-fluorophenoxy)aniline	4,94
27	OMe	H	H	4-(4-nitrophenoxy)aniline	4,20
28	OMe	H	H	4-(difluoromethoxy)aniline	4,07

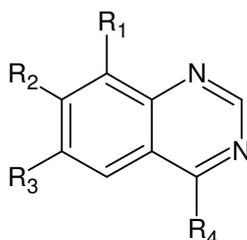
29	OMe	H	H	4-(hexyloxy)aniline	5,36
30	OMe	H	H	4-(pentyloxy)aniline	4,91
31	OMe	H	H	4-(trifluoromethoxy)aniline	4,73
32	OMe	H	H	4-[(trifluoromethyl)sulfonyl]aniline	4,25
33	OMe	H	H	4-[(trifluoromethyl)thio]aniline	5,27
34	OMe	H	H	2,3,5,6-tetrafluoro-4-(trifluoromethyl)aniline	4,75
35	OMe	H	H	2,4-dichloro-6-(trifluoromethyl)aniline	5,39
36	OMe	H	H	2,5-bis(trifluoromethyl)aniline	4,66
37	OMe	H	H	2,6-dibromo-4-methoxyaniline	5,87
38	OMe	H	H	2,6-dibromo-4-(trifluoromethyl)aniline	5,32
39	OMe	H	H	2,6-dichloro-4-(trifluoromethoxy)aniline	5,54
40	OMe	H	H	2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)aniline	4,99
41	OMe	H	H	(2-aminophenyl)methanol	2,53
42	OMe	H	H	2-bromo-4-(trifluoromethoxy)aniline	5,50
43	OMe	H	H	2-bromo-4-(trifluoromethyl)aniline	4,95
44	OMe	H	H	2-bromo-4-chloro-6-(trifluoromethyl)aniline	5,55
45	OMe	H	H	2-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline	4,95
46	OMe	H	H	2-bromo-6-chloro-4-(trifluoromethyl)aniline	5,55
47	OMe	H	H	2-bromo-6-nitro-4-(trifluoromethyl)aniline	6,19
48	OMe	H	H	2-chloro-4-(trifluoromethoxy)aniline	5,34
49	OMe	H	H	2-chloro-4-(trifluoromethyl)aniline	4,78
50	OMe	H	H	4-bromo-2-chloro-6-(trifluoromethoxy)aniline	6,11
51	OMe	H	H	2-chloro-6-(trifluoromethyl)aniline	4,78
52	OMe	H	H	2-chloro-6-nitro-4-(trifluoromethyl)aniline	6,02
53	OMe	H	H	2-fluoro-3-(trifluoromethyl)aniline	4,32
54	OMe	H	H	2-fluoro-6-(trifluoromethyl)aniline	4,32
55	OMe	H	H	2-fluoro-5-(trifluoromethyl)aniline	4,32
56	OMe	H	H	2-methoxy-5-(trifluoromethyl)aniline	4,02
57	OMe	H	H	2-methyl-3-(trifluoromethyl)aniline	4,69
58	OMe	H	H	2-morpholin-4-ylaniline	3,19
59	OMe	H	H	2-nitro-5-(propylthio)aniline	5,95
60	OMe	H	H	2-nitro-6-(trifluoromethyl)aniline	5,42
61	OMe	H	H	(3-aminophenyl)methanol	2,53
62	OMe	H	H	3-chloro-4-(4-chlorophenoxy)aniline	6,01
63	OMe	H	H	3-methoxy-5-(trifluoromethyl)aniline	4,02
64	OMe	H	H	4-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)aniline	2,77
65	OMe	H	H	4-(1H-imidazol-1-yl)aniline	3,03
66	OMe	H	H	4-(6-methyl-1,3-benzothiazol-2-yl)aniline	5,90

67	OMe	H	H	4-(3-thienyl)aniline	4,73
68	OMe	H	H	4-(2-thienyl)aniline	4,73
69	OMe	H	H	tert-butyl (4-aminobenzyl)carbamate	3,92
70	OMe	H	H	(4-aminophenyl)methanol	2,53
71	OMe	H	H	4-bromo-2-(trifluoromethoxy)aniline	4,88
72	OMe	H	H	4-bromo-2-(trifluoromethyl)aniline	4,95
73	OMe	H	H	4-bromo-2-chloro-6-(trifluoromethyl)aniline	5,55
74	OMe	H	H	4-bromo-3-(trifluoromethyl)aniline	4,95
75	OMe	H	H	4-chloro-2-(trifluoromethyl)aniline	5,02
76	OMe	H	H	4-fluoro-2-(trifluoromethyl)aniline	4,32
77	OMe	H	H	4-fluoro-3-(trifluoromethyl)aniline	4,32
78	OMe	H	H	4-methyl-3-(trifluoromethyl)aniline	4,69
79	OMe	H	H	4-nitro-2-(trifluoromethyl)aniline	4,12
80	OMe	H	H	4-nitro-2-(trifluoromethyl)aniline	4,12
81	OMe	H	H	ethyl (4-aminobenzyl)(methoxymethyl)phosphinate	3,44
82	OMe	H	H	N,N-dimethylbenzene-1,3-diamine	3,41
83	OMe	H	H	N,N-dimethylbenzene-1,4-diamine	3,41
84	OMe	H	H	tert-butyl (4-aminophenyl)carbamate	4,78
85	OMe	H	H	2-[(4-chlorophenyl)thio]aniline	6,09
86	OMe	H	H	2-(difluoromethoxy)aniline	4,07
87	OMe	H	H	2-(methylthio)aniline	3,93
88	OMe	H	H	2-(phenylsulfonyl)aniline	4,26
89	OMe	H	H	2-(trifluoromethoxy)aniline	4,73
90	OMe	H	H	2,2'-dithiodianiline	5,07
91	OMe	H	H	3,5-diethoxyaniline	3,70
92	OMe	H	H	2,3-dichloroaniline	4,51
93	OMe	H	H	2,4-dimethoxyaniline	2,99
94	OMe	H	H	2,4-dimethylaniline	4,33
95	OMe	H	H	2,5-difluoroaniline	3,59
96	OMe	H	H	2,5-dimethoxyaniline	2,99
97	OMe	H	H	2,5-dimethylaniline	4,33
98	OMe	H	H	2-(4-chlorophenoxy)aniline	6,02
99	OMe	H	H	2-bromoaniline	4,42
100	OMe	H	H	2-ethylaniline	4,26
101	OMe	H	H	2-phenoxyaniline	4,80
102	OMe	H	H	3,4-dimethoxyaniline	2,99
103	OMe	H	H	3,3'-sulfonyldianiline	3,43
104	OMe	H	H	3-chloro-4-fluoroaniline	4,05
105	OMe	H	H	4,4'-thiodianiline	4,70
106	OMe	H	H	4,4'-methylenedianiline	4,56

107	OMe	H	H	4,4'-ethane-1,2-diyl dianiline	5,01
108	OMe	H	H	4,4'-oxydianiline	4,49
109	OMe	H	H	4-aminobenzonitrile	3,16
110	OMe	H	H	biphenyl-4-amine	4,95
111	OMe	H	H	4,4'-sulfonyldianiline	3,43
112	OMe	H	H	4-butoxyaniline	4,47
113	OMe	H	H	4-chloro-2,5-dimethoxyaniline	3,59
114	OMe	H	H	4-ethoxyaniline	3,50
115	OMe	H	H	4-propylaniline	4,26
116	OMe	H	H	4-isopropylaniline	4,55
117	OMe	H	H	4-phenoxyaniline	5,41
118	OMe	H	H	5-chloro-2,4-dimethoxyaniline	3,59
119	OMe	H	H	4-aminobenzenesulfonamide	1,91
120	OMe	H	H	methyl 4-aminobenzoate	3,31
121	OMe	H	H	2-(4-aminophenyl)ethanol	2,82
122	OMe	H	H	N-(3-aminophenyl)acetamide	2,54
123	OMe	H	H	N-(4-aminophenyl)acetamide	2,54
124	OMe	H	H	4-morpholin-4-ylaniline	3,19
125	OMe	H	H	ethyl 4-aminobenzoate	3,66
126	OMe	H	H	butyl 4-aminobenzoate	4,63
127	OMe	H	H	ethyl 3-aminobenzoate	3,66
128	OMe	H	H	3-amino-N,N-diethyl-4-methoxybenzenesulfonamide	2,91
129	OMe	H	H	methyl 2-aminobenzoate	4,61
130	OMe	H	H	N,N-diethylbenzene-1,4-diamine	4,12
131	OMe	H	H	N-phenylbenzene-1,4-diamine	4,74
132	OMe	H	H	N-(4-amino-2,6-dimethoxyphenyl)benzamide	5,08
133	OMe	H	H	3,4,5-trimethoxyaniline	3,29
*134	H	OMe	OMe	4-(benzyloxy)aniline	3,92
135	Cl	H	H	4-(benzyloxy)aniline	3,92
136	Cl	H	H	3,4,5-trimethoxyaniline	3,91
137	H	OMe	OMe	3,4,5-trimethoxyaniline	2,90
138	Cl	H	H	4,4'-sulfonyldianiline	4,20
139	H	OMe	OMe	4,4'-sulfonyldianiline	3,19
140	OMe	H	H	4-propylaniline	4,70

* 4-BZLO

Tabela 3. Estruturas das quinazolinas e o resultado do cálculo de *Docking* molecular para a FAK. Abaixo representação esquemática do anel quinazolínico com as posições R1, R2, R3, R4 que foram substituídas.



Estrutura	R1	R2	R3	R4	<i>Docking</i> (Kcal/mol)
1	OMe	H	H	3-nitro-5-(trifluoromethyl)aniline	-106,75
2	OMe	H	H	1,3-benzodioxol-5-amine	- 98,97
3	OMe	H	H	3-(methylthio)aniline	- 99,04
4	OMe	H	H	4-(methylthio)aniline	- 97,62
5	OMe	H	H	4-(trifluoromethyl)aniline	- 107,02
6	OMe	H	H	4-chloro-3-(trifluoromethyl)aniline	- 107,12
7	OMe	H	H	4-aminobenzenesulfonic acid	- 114,48
8	OMe	H	H	3-(difluoromethoxy)benzene-1,2-diamine	- 106,32
9	OMe	H	H	2-(methylthio)aniline	- 99,96
10	OMe	H	H	2-(phenylsulfonyl)aniline	- 135,11
11	OMe	H	H	2-methoxyaniline	- 109,12
12	OMe	H	H	2-(trifluoromethyl)aniline	- 104,60
13	OMe	H	H	3-(1,1,2,2-tetrafluoroethoxy)aniline	- 112,27
14	OMe	H	H	1-(3-aminophenyl)ethanol	- 106,60
15	OMe	H	H	3-(difluoromethoxy)aniline	- 111,56
16	OMe	H	H	3-methoxyaniline	- 118,96
17	OMe	H	H	3-(trifluoromethyl)aniline	- 107,02
18	OMe	H	H	1-(4-aminophenyl)ethanol	- 102,45
19	OMe	H	H	4-(2-aminoethyl)aniline	- 116,91
20	OMe	H	H	4-(4-fluorophenoxy)aniline	- 118,99
21	OMe	H	H	4-(4-nitrophenoxy)aniline	- 137,72
22	OMe	H	H	4-(difluoromethoxy)aniline	- 104,69
23	OMe	H	H	4-(pentyloxy)aniline	- 106,20
24	OMe	H	H	4-(trifluoromethoxy)aniline	- 106,10
25	OMe	H	H	4-[(trifluoromethyl)sulfonyl]aniline	- 112,85
26	OMe	H	H	2,3,5,6-tetrafluoro-4-(trifluoromethyl)aniline	- 103,50
27	OMe	H	H	2,5-bis(trifluoromethyl)aniline	- 116,89

28	OMe	H	H	2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)aniline	- 104,77
29	OMe	H	H	(2-aminophenyl)methanol	- 98,72
30	OMe	H	H	2-bromo-4-(trifluoromethyl)aniline	- 99,77
31	OMe	H	H	2-bromo-5-(trifluoromethyl)aniline	- 112,61
32	OMe	H	H	2-chloro-4-(trifluoromethyl)aniline	- 113,69
33	OMe	H	H	2-chloro-6-(trifluoromethyl)aniline	- 104,29
34	OMe	H	H	2-fluoro-3-(trifluoromethyl)aniline	- 111,58
35	OMe	H	H	2-fluoro-6-(trifluoromethyl)aniline	- 98,53
36	OMe	H	H	2-fluoro-5-(trifluoromethyl)aniline	- 110,37
37	OMe	H	H	2-methoxy-5-(trifluoromethyl)aniline	- 111,26
38	OMe	H	H	2-methyl-3-(trifluoromethyl)aniline	- 111,81
39	OMe	H	H	2-morpholin-4-ylaniline	- 106,33
40	OMe	H	H	(3-aminophenyl)methanol	- 102,66
41	OMe	H	H	3-methoxy-5-(trifluoromethyl)aniline	- 116,72
42	OMe	H	H	4-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)aniline	- 132,91
43	OMe	H	H	4-(1H-imidazol-1-yl)aniline	- 105,40
44	OMe	H	H	4-(3-thienyl)aniline	- 111,98
45	OMe	H	H	4-(2-thienyl)aniline	- 111,79
46	OMe	H	H	tert-butyl (4-aminobenzyl)carbamate	- 123,66
47	OMe	H	H	(4-aminophenyl)methanol	- 101,63
48	OMe	H	H	4-bromo-2-(trifluoromethoxy)aniline	-112,07
49	OMe	H	H	4-bromo-3-(trifluoromethyl)aniline	- 115,45
50	OMe	H	H	4-fluoro-2-(trifluoromethyl)aniline	- 101,06
51	OMe	H	H	4-fluoro-3-(trifluoromethyl)aniline	- 116,94
52	OMe	H	H	4-methyl-3-(trifluoromethyl)aniline	- 105,57
53	OMe	H	H	4-nitro-2-(trifluoromethyl)aniline	- 98,55
54	OMe	H	H	4-nitro-2-(trifluoromethyl)aniline	- 103,94
55	OMe	H	H	ethyl (4-aminobenzyl)(methoxymethyl)phosphinate	-118,15
56	OMe	H	H	N,N-dimethylbenzene-1,3-diamine	- 96,73
57	OMe	H	H	N,N-dimethylbenzene-1,4-diamine	- 99,83
58	OMe	H	H	tert-butyl (4-aminophenyl)carbamate	- 118,85
59	OMe	H	H	2-(difluoromethoxy)aniline	- 106,32
60	OMe	H	H	2-(methylthio)aniline	- 99,96
61	OMe	H	H	2-(phenylsulfonyl)aniline	- 135,11
62	OMe	H	H	2-(trifluoromethoxy)aniline	- 109,12
63	OMe	H	H	3,5-diethoxyaniline	- 113,88
64	OMe	H	H	2,3-dichloroaniline	- 99,60
65	OMe	H	H	2,4-dimethoxyaniline	- 94,63
66	OMe	H	H	2,4-dimethylaniline	- 90,41
67	OMe	H	H	2,5-difluoroaniline	- 91,55
68	OMe	H	H	2,5-dimethoxyaniline	- 97,20
69	OMe	H	H	2,5-dimethylaniline	- 100,92
70	OMe	H	H	2-bromoaniline	- 95,76
71	OMe	H	H	2-ethylaniline	- 99,82

72	OMe	H	H	2-phenoxyaniline	- 113,14
73	OMe	H	H	3,4-dimethoxyaniline	- 103,70
74	OMe	H	H	3,3'-sulfonyldianiline	- 131,47
75	OMe	H	H	3-chloro-4-fluoroaniline	- 98,07
76	OMe	H	H	4,4'-thiodianiline	- 135,36
77	OMe	H	H	4,4'-methylenedianiline	- 119,06
78	OMe	H	H	4,4'-oxydianiline	- 133,21
79	OMe	H	H	4-aminobenzonitrile	- 105,26
80	OMe	H	H	biphenyl-4-amine	- 112,02
81	OMe	H	H	4,4'-sulfonyldianiline	- 139,61
82	OMe	H	H	4-butoxyaniline	- 106,20
83	OMe	H	H	4-chloro-2,5-dimethoxyaniline	- 105,63
84	OMe	H	H	4-ethoxyaniline	- 107,52
85	OMe	H	H	4-propylaniline	- 108,37
86	OMe	H	H	4-isopropylaniline	- 97,03
87	OMe	H	H	5-chloro-2,4-dimethoxyaniline	- 97,70
88	OMe	H	H	4-aminobenzenesulfonamide	- 112,27
89	OMe	H	H	methyl 4-aminobenzoate	- 101,65
90	OMe	H	H	2-(4-aminophenyl)ethanol	- 105,53
91	OMe	H	H	N-(3-aminophenyl)acetamide	- 106,49
92	OMe	H	H	N-(4-aminophenyl)acetamide	- 98,11
93	OMe	H	H	4-morpholin-4-ylaniline	- 108,88
94	OMe	H	H	ethyl 4-aminobenzoate	- 109,79
95	OMe	H	H	butyl 4-aminobenzoate	- 112,84
96	OMe	H	H	ethyl 3-aminobenzoate	- 111,81
97	OMe	H	H	3-amino-N,N-diethyl-4-methoxybenzenesulfonamide	- 125,03
98	OMe	H	H	methyl 2-aminobenzoate	- 106,34
99	OMe	H	H	N,N-diethylbenzene-1,4-diamine	- 101,28
100	OMe	H	H	N-phenylbenzene-1,4-diamine	- 118,43
101	H	OMe	OMe	4-morpholine-4-aniline	- 131,26
102	OMe	H	H	3,4,5-trimethoxyaniline	- 112,15
*103	H	OMe	OMe	4-(benzyloxy)aniline	- 139,93
104	Cl	H	H	4-(benzyloxy)aniline	- 130,81
105	Cl	H	H	3,4,5-trimethoxyaniline	- 118,43
106	H	OMe	OMe	3,4,5-trimethoxyaniline	- 116,33
107	Cl	H	H	4,4'-sulfonyldianiline	- 126,21
108	H	OMe	OMe	4,4'-sulfonyldianiline	- 141,09
109	OMe	H	H	4-propylaniline	- 102,75

*4-BZLO

Tabela 4. Avaliação *in silico* da farmacocinética dos 28 compostos selecionados.

Parâmetros	8Cl-4-(benzyloxy)aniline	6,7-OMe-3'-BZLO	8Cl-3,4,5-trimethoxyaniline	6,7-Dimetoxi-4,5-trimethoxyaniline
Biodisponibilidade Oral	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%
Absorção passiva	Alta (Pe jejuno = 5.60E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.25E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.05E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Média (Pe jejuno = 038E-4) Taxa absorção = 0,150min ⁻¹
% PPB*	98,11%	99,49%	99,33%	97,19%
Vd*	2,54L/Kg	2,98L/Kg	2,81 L/Kg	2,75 L/Kg
pKa	2,60	2,60	2,60	2,60
Log P	4,33	3,90	3,90	2,77
Solubilidade em água pura	Log SW = -4,73 Insolúvel	Log SW = -5,22 Insolúvel	Log SW = -5,32 Insolúvel	Log SW = -3,67 Insolúvel
Inibidor seletivo Pglicoproteína	Não inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	Não inibidor
Teste AMES	0,210	0,111	0,111	0,177
Probabilidade de efeitos na saúde	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular, TGI e rins
Toxicidade aguda (DL₅₀ Mouse) dose oral	1100mg/Kg	530mg/Kg	650 mg/Kg	880mg/Kg
Toxicidade aguda (DL₅₀ Rat) dose oral	690mg/Kg	420mg/Kg	530 mg/Kg	1100mg/Kg

Parâmetros	2-(phenylsulfonyl)aniline	3-methoxyaniline	4-(2-aminoethyl)aniline	4-(4-fluorophenoxy)aniline
Biodisponibilidade Oral	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%
Absorção passiva	Alta (Pe jejuno = 5.80E-4). Taxa absorção = 0,080min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.75E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.10E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Média (Pe jejuno = 7.5E-4) Taxa absorção = 0,100min ⁻¹
% PPB*	97,00%	98,57%	99,66%	98,19%
Vd*	2,18L/Kg	2,72L/Kg	3,81L/Kg	1,24 L/Kg
pKa	2,60	2,60	2,60	2,60
Log P	4,03	3,70	3,90	3,87
Solubilidade em água pura	Log SW = -4,73 Insolúvel	Log SW = -4,22 Insolúvel	Log SW = -2,32 Insolúvel	Log SW = -3,67 Insolúvel
Inibidor seletivo Pglicoproteína	Não inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	Não inibidor
Teste AMES	0,117	0,115	0,105	0,177
Probabilidade de efeitos na saúde	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular, TGI e rins
Toxicidade aguda (DL₅₀ Mouse) dose oral	700mg/Kg	630mg/Kg	650 mg/Kg	880mg/Kg
Toxicidade aguda (DL₅₀ Rat) dose oral	640mg/Kg	520mg/Kg	420 mg/Kg	900mg/Kg

Parâmetros	4-(4-nitrophenoxy) aniline	2,5-bis(trifluoromethyl) aniline	3-methoxy-5-(trifluoromethyl) aniline	4-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)aniline
Biodisponibilidade Oral	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%
Absorção passiva	Alta (Pe jejuno = 5.60E-4). Taxa absorção = 0,085min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.25E-4). Taxa absorção = 0,060min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.05E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Média (Pe jejuno = 038E-4) Taxa absorção = 0,090min ⁻¹
%PPB*	92,13%	94,49%	97,47%	97,29%
Vd*	1,34L/Kg	3,38L/Kg	1,81 L/Kg	4,27 L/Kg
pKa	2,60	2,60	2,60	2,60
Log P	3,33	3,70	3,90	3,77
Solubilidade em água pura	Log SW = -5,73 Insolúvel	Log SW = -4,22 Insolúvel	Log SW = -3,32 Insolúvel	Log SW = -1,67 Insolúvel
Inibidor seletivo Pglicoproteína	Não inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	Não inibidor
Teste AMES	0,521	0,411	0,511	0,587
Probabilidade de efeitos na saúde	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI
Toxicidade aguda (DL₅₀ Mouse) dose oral	470mg/Kg	330mg/Kg	350 mg/Kg	480mg/Kg
Toxicidade aguda (DL₅₀ Rat) dose oral	960mg/Kg	540mg/Kg	570 mg/Kg	1800mg/Kg

Parâmetros	tert-butyl (4-aminobenzyl) carbamate	4-bromo-3-(trifluoromethyl) aniline	4-fluoro-3-(trifluoromethyl) aniline	ethyl (4-aminobenzyl)(methoxymethyl)phosphinate
Biodisponibilidade Oral	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%
Absorção passiva	Alta (Pe jejuno = 6.50-4). Taxa absorção = 0,010min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.25E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 5.06E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Média (Pe jejuno = 3.80E-4) Taxa absorção = 0,050min ⁻¹
%PPB*	95,15%	97,69%	99,83%	96,89%
Vd*	3,54L/Kg	3,98L/Kg	2,82 L/Kg	3,70 L/Kg
pKa	2,60	2,60	2,60	2,60
Log P	3,33	2,90	2,90	3,88
Solubilidade em água pura	Log SW = -3,73 Insolúvel	Log SW = -4,22 Insolúvel	Log SW = -4,32 Insolúvel	Log SW = -2,67 Insolúvel
Inibidor seletivo Pglicoproteína	Não inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	Não inibidor
Teste AMES	0,110	0,211	0,211	0,577
Probabilidade de efeitos na saúde	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular, TGI
Toxicidade aguda (DL₅₀ Mouse) dose oral	360mg/Kg	370mg/Kg	560 mg/Kg	380mg/Kg
Toxicidade aguda (DL₅₀ Rat) dose oral	1290mg/Kg	920mg/Kg	1250 mg/Kg	1400mg/Kg

Parâmetros	tert-butyl (4-aminophenyl) carbamate	2- (phenylsulfonyl)aniline	3,3'- sulfonyldianiline	4,4'- thiodianiline
Biodisponibilidade Oral	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%
Absorção passiva	Alta (Pe jejuno = 6.60E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 7.25E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 5.05E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Média (Pe jejuno = 4,78E-4). Taxa absorção = 0,005min ⁻¹
%PPB*	98,49%	96,79%	99,19%	97,19%
Vd*	1,54L/Kg	1,98L/Kg	3,81 L/Kg	3,27 L/Kg
pKa	2,60	2,60	2,60	2,60
Log P	4,33	4,90	4,90	2,17
Solubilidade em água pura	Log SW = -5,22 Insolúvel	Log SW = -5,67 Insolúvel	Log SW = -4,32 Insolúvel	Log SW = -4,90 Insolúvel
Inibidor seletivo Pglicoproteína	Não inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	Não inibidor
Teste AMES	0,210	0,111	0,111	0,577
Probabilidade de efeitos na saúde	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular e rins TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular, TGI
Toxicidade aguda (DL₅₀ Mouse) dose oral	430mg/Kg	330mg/Kg	450 mg/Kg	470mg/Kg
Toxicidade aguda (DL₅₀ Rat) dose oral	990mg/Kg	620mg/Kg	930 mg/Kg	1200mg/Kg

Parâmetros	4,4'-methylenedianiline	4,4'-oxydianiline	4,4'-sulfonyldianiline	3-amino-N,N-diethyl-4-methoxybenzenesulfonamide
Biodisponibilidade Oral	> 70%	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%
Absorção passiva	Alta (Pe jejuno = 5.25E-4). Taxa absorção = 0,010min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.60E-4). Taxa absorção = 0,005min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.75E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Média (Pe jejuno = 6.05 E-4) Taxa absorção = 0,100min ⁻¹
%PPB*	97,49%	96,11%	97,33%	99,19%
Vd*	3,54L/Kg	4,98L/Kg	4,81 L/Kg	3,27 L/Kg
pKa	2,70	2,70	2,60	2,60
Log P	4,33	4,35	3,90	3,77
Solubilidade em água pura	Log SW = -3,22 Insolúvel	Log SW = -4,73 Insolúvel	Log SW = -3,67 Insolúvel	Log SW = -4,57 Insolúvel
Inibidor seletivo Pglicoproteína	Não inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	Não inibidor
Teste AMES	0,110	0,321	0,321	0,677
Probabilidade de efeitos na saúde	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular, TGI
Toxicidade aguda (DL₅₀ Mouse) dose oral	330mg/Kg	410mg/Kg	350 mg/Kg	480mg/Kg
Toxicidade aguda (DL₅₀ Rat) dose oral	890mg/Kg	920mg/Kg	830 mg/Kg	1240mg/Kg

Parâmetros	N-phenylbenzene-1,4-diamine	4-morphline-4-aniline	6,7-Dimetoxi-4,4'-sulfonyldianiline	8Cl-4,4'-sulfonyldianiline
Biodisponibilidade Oral	> 70%	30% e 70%	30% e 70%	30% e 70%
Absorção passiva	Alta (Pe jejuno = 5.60E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.25E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Alta (Pe jejuno = 6.05E-4). Taxa absorção = 0,100min ⁻¹	Média (Pe jejuno = 038E-4) Taxa absorção = 0,005min ⁻¹
%PPB*	98,11%	99,49%	99,33%	97,19%
Vd*	6,54L/Kg	2,98L/Kg	4,81 L/Kg	1,27 L/Kg
pKa	2,60	2,60	2,60	4,60
Log P	4,33	3,90	3,90	1,77
Solubilidade em água pura	Log SW = -4,73 Insolúvel	Log SW = -5,22 Insolúvel	Log SW = -5,32 Insolúvel	Log SW = -3,67 Insolúvel
Inibidor seletivo Pglucoproteína	Não inibidor	Não Inibidor	Não Inibidor	Não inibidor
Teste AMES	0,210	0,111	0,111	0,377
Probabilidade de efeitos na saúde	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular TGI ^a	S. Cardiovascular, TGI e rins
Toxicidade aguda (DL₅₀ Mouse) dose oral	490mg/Kg	530mg/Kg	450 mg/Kg	680mg/Kg
Toxicidade aguda (DL₅₀ Rat) dose oral	1090mg/Kg	920mg/Kg	1530 mg/Kg	1800mg/Kg

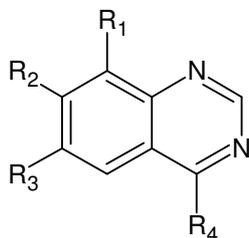
*PPB – percentual que o composto se liga a proteína plasmática humana.

*Vd – volume de distribuição.

^aTGI – trato gástrico intestinal.

6,7-OMe-4-BZLO (**4-BZLO**)

Tabela 5. Quinazolininas selecionadas para síntese.



Estrutura	R1	R2	R3	R4	Docking(Kcal/mol)
1	H	OMe	OMe	4,4'-sulfonyldianiline	-141,09
2	H	OMe	OMe	4-(benzyloxy)aniline	- 139,93
3	Cl	H	H	4-(benzyloxy)aniline	-130,88
4	H	OMe	OMe	4-morpholine-4-aniline	-135,11
5	Cl	H	H	3,4,5-trimethoxyaniline	- 118,43
6	H	OMe	OMe	3,4,5-trimethoxyaniline	- 116,33

