

ANDRÉ NAZÁRIO DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VIVO* E *IN VITRO* DE
COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS E IDENTIFICAÇÃO DO ÁCIDO
HOMOVANÍLICO POR ESPECTROMETRIA DE RESSONÂNCIA
MAGNÉTICA NUCLEAR DE HIDROGÊNIO (^1H)**

**Campinas
2009**

ANDRÉ NAZÁRIO DE OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE COMPOSTOS QUINAZOLÍNICOS E IDENTIFICAÇÃO
DO ÁCIDO HOMOVANÍLICO POR ESPECTROMETRIA DE
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE
HIDROGÊNIO (^1H).**

Tese de Mestrado apresentada junto à Pós
Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como requisito à
obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas,
área de concentração Ciências Biomédicas.

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Nelci Fenalti Höehr

Co-orientador(a): Prof. Dr. Roberto Rittner

CAMPINAS

FCM-Unicamp

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Ol4d Oliveira, André Nazário de
Determinação da toxicidade *in vitro* e *in vivo* de compostos
quinazolínicos e identificação do ácido homovanílico por
espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H) /
André Nazário de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2009.

Orientadores : Nelci Fenalti Höehr, Roberto Rittner
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Quinazolinas. 2. Toxicidade. 3. Ácido homovalínico. 4.
Ressonância magnética nuclear. I. Höehr, Nelci Fenalti. II.
Rittner, Roberto. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. IVI. Título.

Título em inglês : *In vivo* and *in vitro* toxicity determination of quinazolinic compounds and identification of homovanilic acid by hydrogen (¹H) nuclear magnetic resonance spectrometry

Keywords: • Quinazolines
• Toxicity
• Homovanilic, acid
• Nuclear magnetic resonance

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profº. Drº. Nelci Fenalti Höehr

Profº. Drº. Cláudio Lucio Rossi

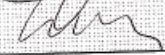
Profº. Drº. Ernani Arbicht Basso

Data da defesa: 31- 08 – 2009

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado
André Nazário de Oliveira

Orientadora: Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr

Membros:

1. Profa. Dra. Nelci Fenalti Höehr - 
2. Prof. Dr. Ernani Abicht Basso - 
3. Prof. Dr. Claudio Lucio Rossi - 

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 31/08/2009

Dedicatória

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, pela força, incentivo e ao eterno apoio. A todos àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Agradecimentos

A Deus e aos bons espíritos por toda força e fé ao longo dessa caminhada;

Aos meus pais e irmãos pelo amor sincero, eterno apoio e compreensão;

À minha Cris, pelo amor, carinho e compreensão indispensáveis nos momentos de ansiedade e apreensão;

Às amigas Aline e Eloá, pela amizade desde a época de faculdade e que sempre estiveram por perto quando precisei;

Ao Thiago, pela amizade e por sempre estar disposto à ajudar;

Aos amigos Sílvio e Roger pela amizade, companheirismo, apoio e saberem “driblar” as dificuldades na época em que moramos juntos;

À Prof^a. Dr.^a. Nelci Höehr, pela orientação deste trabalho, por sempre abrir as portas quando precisei, pela confiança e amizade;

Ao Prof. Dr. Roberto Rittner, pela co-orientação, ensinamentos, apoio e principalmente pela amizade;

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA, principalmente o Prof. Dr. João Ernesto, por disponibilizar o local, o material e as linhagens de células tumorais humanas, pela participação na banca do Exame de Qualificação. À Sirlene, Ana Possenti e Ana Ruiz, pelo apoio e ajuda na realização dos experimentos;

Ao pessoal do Laboratório de Bioenergética em Neurodegeneração, principalmente ao Prof. Dr. Roger Castilho, por disponibilizar o laboratório para realização dos experimentos com células PC12. À Sandra por abrir mão do seu tempo, inclusive de alguns finais de semana para me ajudar com os experimentos;

Ao pessoal do Instituto de Química, principalmente à Gláucia pelo apoio e ensinamentos da técnica de Espectrometria de RMN de Hidrogênio (^1H). Ao Thiago, pela síntese dos compostos deste trabalho;

Ao Prof. Dr. Cleverson Bocca, pelos ensinamentos, contribuição com nosso trabalho através do método de “Docking” Molecular e pela participação na banca do Exame de Qualificação;

Ao pessoal do CEMIB, por disponibilizarem os animais sempre que precisei;

Ao Prof. Dr. Cláudio Rossi, pelos ensinamentos nas aulas de Imunoquímica e participação na banca do Exame de Qualificação e banca Examinadora da Defesa de Tese;

Ao Prof. Dr. Ernani Basso pelas contribuições ao nosso trabalho através da participação na banca Examinadora da Defesa de Tese;

As secretárias Regina e Marcinha, pela paciência e pela disposição em sempre ajudar aos alunos da Pós-Graduação;

Aos Profs. examinadores dos relatórios anuais de atividade, pelas críticas construtivas, sugestões e ensinamentos;

A Todos que de forma direta e/ou indireta contribuíram para realização deste trabalho.

Agradecimentos institucionais

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela bolsa concedida;

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo apoio financeiro para compra de material necessário para realização desta pesquisa;

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pelo apoio financeiro para compra de material necessário para realização desta pesquisa.

Lista de abreviaturas

ANOVA	<i>Analysis of variance.</i> Análise de variância simples;
ATCC	<i>American Type Culture and Collection;</i>
C	Absorbância do branco de células;
CA	Contorção abdominal;
céls/mL	Células por mililitro;
cm²	Centímetro quadrado;
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica da Ciência em Animais de Laboratório;
Cols.	Colaboradores;
COMT	Catecol- Θ -Metil transferase
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas;
D₂O	Água deuterada;
DL50	Dose Letal para 50 por cento;
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium.</i> <i>Dullbecco</i> modificado por <i>Eagle</i> ;
DMSO	Dimetil sulfóxido;
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid.</i> Ácido Desoxirribonucléico;
DOXO	Doxorrubicina;
EGF	<i>Epidermal Grow Factor.</i> Fator de Crescimento Epidérmico;
EGFR	<i>Epidermal Grow Factor Receptor.</i> Recetor para o Fator de Crescimento Epidérmico;
ES	Explora a superfície;
EUA	Estados Unidos da América;
FCM	Faculdade de Ciências Médicas;

g	Gramas;
HeR-2/ERBB	Gene codificador do Receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico 2;
HVA	<i>Homovanillic acid</i> . Ácido homovanílico;
Hz	Hertz;
IC50	Inibição de Crescimento de 50 por cento;
INCA	Instituto Nacional do Câncer;
IQ-UNICAMP	Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas;
kDa	Quilo Dalton;
kg	Quilograma;
MA	Marcha anormal;
MAO	Monoamino oxidase;
mg	Miligramas;
MHz	Megahertz;
mL	Mililitros;
mol/L	Mols por litro;
NCI	<i>U.S. National Cancer Institute</i> . Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos;
NES	Não explora a superfície;
nm	Nanômetro;
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> ;
P	Significância estatística;
ppm	Parte Por Milhão;
PC12	<i>Pheo Chromocythoma 12</i> . Células de feocromocitoma de rato;
PDB	<i>Protein Data Bank</i> ;
RI	Respiração intensa;
RMN	Ressonância Magnética Nuclear;

SNC	Sistema Nervoso Central;
SRB	Sulforhodamina B;
STM	Sem tônus muscular;
St	<i>Straub</i> ;
T	Média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula;
T₀	Absorbância do controle de células na placa T ₀ ;
TM	<i>Trade Mark</i> . Marca Registrada;
TMS	Trimetilsilano;
U	Urinou;
UI	Unidade internacional;
UNECE	<i>United Nations Economic Commission for Europe</i> ;
UV	Ultravioleta;
VMA	<i>Vanilmandellic acid</i> . Ácido vanilmandélico;
www	<i>World Wide Web</i> . Rede Mundial de Acesso;
vs.	<i>Versus</i> ;
Å	Angström
°C	Graus <i>Celsius</i> ;
α	Alfa;
β	Beta;
%	Percentual;
©	<i>Corporate</i> . Corporativo;
®	Registrado;
[HVA]	Concentração do ácido homovanílico;
µL	Microlitro;
µg/mL	Micrograma por mililitro.

Figura 1.	Quinazolina;
Figura 2.	Compostos quinazolínicos sintetizados no IQ-UNICAMP;
Figura 3.	Agentes alquilantes usados como antineoplásicos;
Figura 4.	Representação esquemática do EGFR da Tirosina Quinase;
Figura 5.	Câncer de mama inflamatório;
Figura 6.	Estrutura molecular do Lapatinib (aminoquinazolina);
Figura 7.	Complexo 3D do Lapatinib ligado ao sítio de ATP do EGFR;
Figura 8.	Células PC12;
Figura 9.	Reconstrução tridimensional de uma célula PC12 isolada;
Figura 10.	Catecolaminas;
Figura 11.	Síntese das catecolaminas;
Figura 12.	Metabolismo da dopamina;
Figura 13.	Espectro do etanol;
Figura 14.	Compostos quinazolínicos usados como anti-neoplásicos;
Figura 15.	Células inviáveis em azul, pelo corante azul de tripan;
Figura 16.	Contagem das células viáveis em câmara de <i>Neubauer</i> ;
Figura 17.	Desenho experimental da placa de 96 poços;
Figura 18.	Doxorrubicina;
Figura 19.	TMS usado como pico de referência para o deslocamento químico;
Figura 20a.	EGFR acoplada ao composto quinazolínico com substituinte CH ₃ ;
Figura 20b.	EGFR acoplada ao composto quinazolínico com substituinte H;

Figura 21. Acoplamento em 3D dos compostos com os substituintes CH₃ e H;

Figura 22. Espectro obtido a partir da amostra com HVA puro;

Figura 23. Espectro obtido a partir da amostra de urina.

Tabela 1. Estimativa de casos de câncer no Brasil, válida também para 2009;

Tabela 2. Drogas de alvo molecular para Her2 em uso clínico;

Tabela 3. Tabela dos efeitos de toxicidade aguda;

Tabela 4. Preparação das soluções de HVA para curva de calibração.

Lista de gráficos

- Gráfico 1.** IC50 da população celular de PC12 expostas ao composto com o substituinte $\text{N}(\text{CH}_3)_2$;
- Gráfico 2.** IC50 da população celular de PC12 expostas ao composto com substituinte Br;
- Gráfico 3.** IC50 da população celular de PC12 expostas ao composto com substituinte CH_3 ;
- Gráfico 4.** IC50 da população celular de PC12 expostas ao composto com substituinte H;
- Gráfico 5.** IC50 das linhagens tumorais humanas expostas à Doxorubicina (controle);
- Gráfico 6.** IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte $\text{N}(\text{CH}_3)_2$;
- Gráfico 7.** IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte Br;
- Gráfico 8.** IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte CH_3 ;
- Gráfico 9.** IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte H;
- Gráfico 10.** Curva de calibração área HVA/TMS x [HVA] à partir de espectros de RMN de Hidrogênio (^1H).

RESUMO	XIX
<i>ABSTRACT</i>	XX
1. INTRODUÇÃO	21
1.1. TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	33
2. HIPÓTESES	42
3. OBJETIVOS	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1. QUINAZOLINAS	44
4.2. MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS	44
4.2.1. CÉLULAS PC12	44
4.2.2. LINHAGEM CELULAR TUMORAL	45
4.3. “DOCKING” MOLECULAR	46
4.3.1. Modelo de ligação	46
4.3.2. “Docking”	47
4.4. TOXICIDADE E DETERMINAÇÃO DA TAXA DE SOBREVIVÊNCIA CELULAR	47
4.4.1. Células PC12	49
4.4.2. Linhagem Tumoral	50
4.5. TOXICIDADE AGUDA EM CAMUNDONGOS	54
4.6. ESPECTROMETRIA DE RMN DE HIDROGÊNIO (¹ H) DO HVA URINÁRIO	55
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA	58

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	59
5.1. TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	59
5.1.1 Células PC12	59
5.1.2. Linhagem Tumoral	63
5.2. “DOCKING” MOLECULAR	66
5.3. TOXICIDADE <i>IN VIVO</i>	70
5.4. ESPECTROMETRIA DE RMN DE HIDROGÊNIO (¹ H) DO HVA	74
6. CONCLUSÕES	75
7. REFERÊNCIAS	78
7.1. Bibliografia	91
8. ANEXOS	92

Este projeto tem a finalidade de analisar as características toxicológicas de novos compostos quinazolínicos, que foram sintetizados recentemente no Instituto de Química-UNICAMP. Uma série de derivados de 4-fenilamino quinazolinas foi sintetizada como potentes inibidores da proteína quinase e sua citotoxicidade foi demonstrada através de técnicas de Inibição de Crescimento de 50% da população celular, onde procuramos estabelecer alguns efeitos biológicos desses novos compostos quinazolínicos, através de cultura de células PC12 e de cultura de células tumorais humanas, recomendadas pelo NCI (*The U.S. National Cancer Institute*) para ensaios anti-proliferativos para estudos do câncer. A utilização da metodologia de “docking molecular” nos levou ao descobrimento do sítio de ação dos compostos quinazolínicos em células tumorais de mama (MCF07).

Estudos com camundongos foram realizados, utilizando a metodologia recomendada pela OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), para determinação *in vivo* da toxicidade aguda pelos compostos quinazolínicos, descrevendo os efeitos causados pelas diferentes concentrações dos compostos quinazolínicos em estudo aplicadas aos animais.

Através da Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) pôde-se identificar o metabólito final das catecolaminas, o ácido homovanílico em urina, escolhido por ser um composto que aparece em grandes concentrações na urina e por ser de excelente precisão diagnóstica em algumas doenças neurológicas.

This project aims to analyze the toxicological characteristics of new quinazoline compounds, which were summarized recently in the Institute of Chemistry-UNICAMP. The compound 4-phenylamino quinazoline was synthesized as a potent inhibitor of protein kinase and its cytotoxicity was demonstrated by an inhibitory activity on growth of human tumor cell lines. Through techniques of 50% Growth Inhibition of cell lines we provide some biological effects of these new quinazoline compounds through PC12 cell culture and culture of human tumor cells, as recommended by the NCI (*The U.S. National Cancer Institute*) for testing anti-proliferative for studies of cancer. The use of the methodology of "molecular docking" has led to the discovery the binding site of action of quianzoline compounds in breast tumor cells (MCF07).

Studies with mice were performed, using the methodology recommended by the OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*), to determine *in vivo* toxicity of the quinazoline compounds, describing the effects caused by different concentrations of quinazoline compounds under study applied to animals.

Through the Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry of Hydrogen (^1H) was able to identify the final metabolite of catecholamines, the acid in urine homovanílico, chosen to be a compound that appears in high concentrations in urine and to be an excellent diagnostic marker in some neurological diseases.

1. Introdução.

Os compostos quinazolínicos fazem parte de uma das estruturas mais fascinantes no campo do descobrimento de novos fármacos por apresentarem uma série de substituintes¹. A quinazolina é uma 1,3-benzodiazina e possuem derivados que podem ser encontrados na natureza (vasicina, evodiamina, febrifugina, etc). São compostos fisiologicamente ativos, porém pouco usados terapeuticamente². A quinazolina possui estrutura semelhante às bases pirimídicas (uracila, timina e citosina) presentes nos ácidos nucleicos³. Algumas quinazolinas são conhecidas como agentes anti-maláricos⁴, como neurotoxinas, hipnóticos, diuréticos, algumas também possuem atividade contra parasitas sanguíneos, anestésicos locais⁵ e agentes anti-neoplásicos, inibidores da proteína Tirosina Quinase do Fator de Crescimento Epidérmico⁶⁻⁸. Esses compostos podem apresentar uma variedade de substituintes como, como mostra a estrutura abaixo (Figura 1):

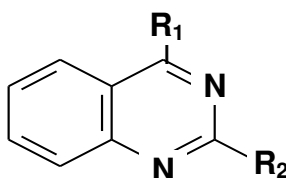


Figura 1. Quinazolina. R₁ = H ou CH₃ e R₂ = Alquila¹.

Os compostos quinazolínicos que foram usados nesta pesquisa (Figura 2) para avaliação tóxica *in vitro* e *in vivo* foram sintetizados no Instituto de Química (IQ-UNICAMP) e fornecidos pelo Prof. Dr. Roberto Rittner

A introdução no mercado de novas drogas, cosméticos, aditivos de alimentos e outras substâncias, exige que as mesmas passem por extensivos testes de toxicidade antes de obterem autorização para sua comercialização⁹.

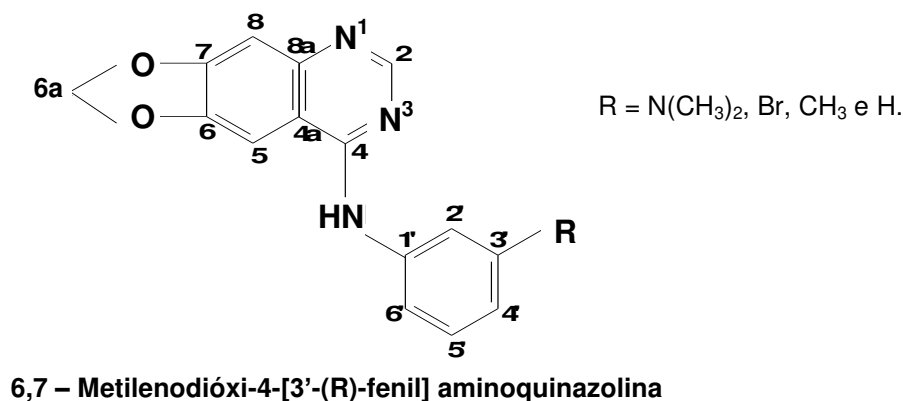


Figura 2. Compostos quinazolínicos sintetizados no IQ-UNICAMP^{10,11}.

No decorrer da vida, nosso material genético pode sofrer mutações que são causadas por erros que ocorrem no momento da duplicação do DNA. Exposição direta a agentes mutagênicos ou fatores de risco como radiação ionizante, raios UV, substâncias químicas, além de infecções por microrganismos, também podem alterar a sequência do DNA, favorecendo o aparecimento de mutações no organismo. Muitas dessas mutações podem passar despercebidas, porém, alguns genes específicos quando sofrem mutações contribuem para o crescimento exacerbado de células, promovendo a formação de massas celulares (tumores) que se infiltram em diversos locais do organismo.

Atualmente, o tratamento desses indivíduos consiste por meio de diferentes terapias isoladas ou combinadas entre si, de forma a melhorar a qualidade de vida e prolongar a

sobrevida desses pacientes. Porém, tendo em vista que além da doença, o tratamento quimioterápico resulta em vários efeitos colaterais¹².

Um dos tratamentos mais usados contra o câncer é a quimioterapia antineoplásica, método que pode ser aplicado isoladamente ou em associação com outro método, como a radioterapia. Na quimioterapia se utilizam compostos químicos específicos para inibir o crescimento e proliferação celular¹³. Devido às projeções para o aumento de câncer nos próximos anos, não só no Brasil (Tabela 1), mas em todo mundo, o uso e o desenvolvimento de novos quimioterápicos também se elevará proporcionalmente^{14,15}.

Tabela 1. Estimativa de casos de câncer no Brasil, válida também para 2009.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa de casos novos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	-	49.530
Mama Feminina	-	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Colo do Útero	-	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5.920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas as Neoplasias	231.860	234.870	466.730

FONTE: INCA - Instituto Nacional do Câncer, 2008¹⁶.

Os agentes alquilantes (Figura 3) foram as primeiras drogas utilizadas no tratamento do câncer e, apesar de sua toxicidade, constituem a base da maioria dos tratamentos antineoplásicos. A cisplatina é um dos fármacos antitumorais de maior importância clínica desde a sua descoberta em 1965 por ROSBERG e cols¹⁷. Anos depois, visando um tratamento menos citotóxico, porém de mesma importância clínica, surge em 1978 experimentos utilizando a carboplatina, um fármaco semelhante à cisplatina¹⁸⁻²⁰.

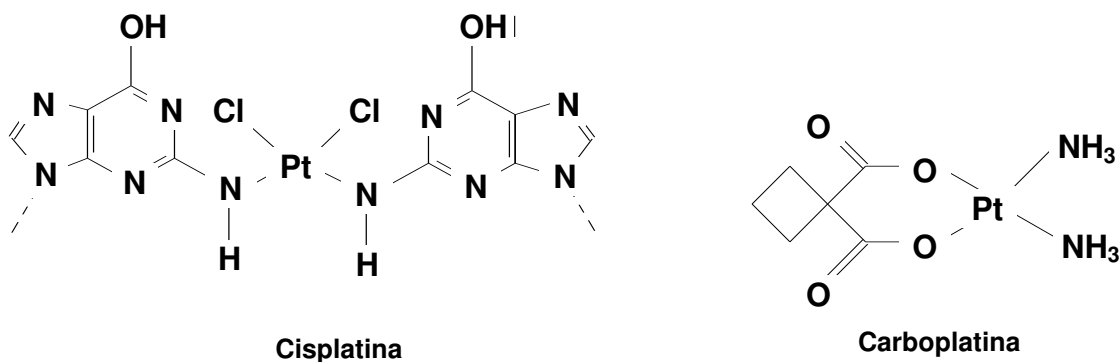


Figura 3. Agentes alquilantes usados como antineoplásicos.

A cisplatina vem sendo utilizada nos últimos anos como fármaco de escolha altamente eficiente no tratamento antitumoral de diversas neoplasias, tais como as de pulmão, cabeça, estômago, linfomas, melanoma, osteosarcoma, de mama, pélvis, testículo e próstata²¹⁻²³.

Muitos estudos relacionados ao câncer priorizam o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico do tipo Tirosina Quinase (EGFR) (Figura 4) que é uma proteína de 170 kD, composta de um domínio extracelular (621 aminoácidos) para o ligante Fator de Crescimento Epidérmico (EGF), de uma região transmembrana (23 aminoácidos hidrofóbicos) e do domínio intracelular (542 aminoácidos)^{8,24}.

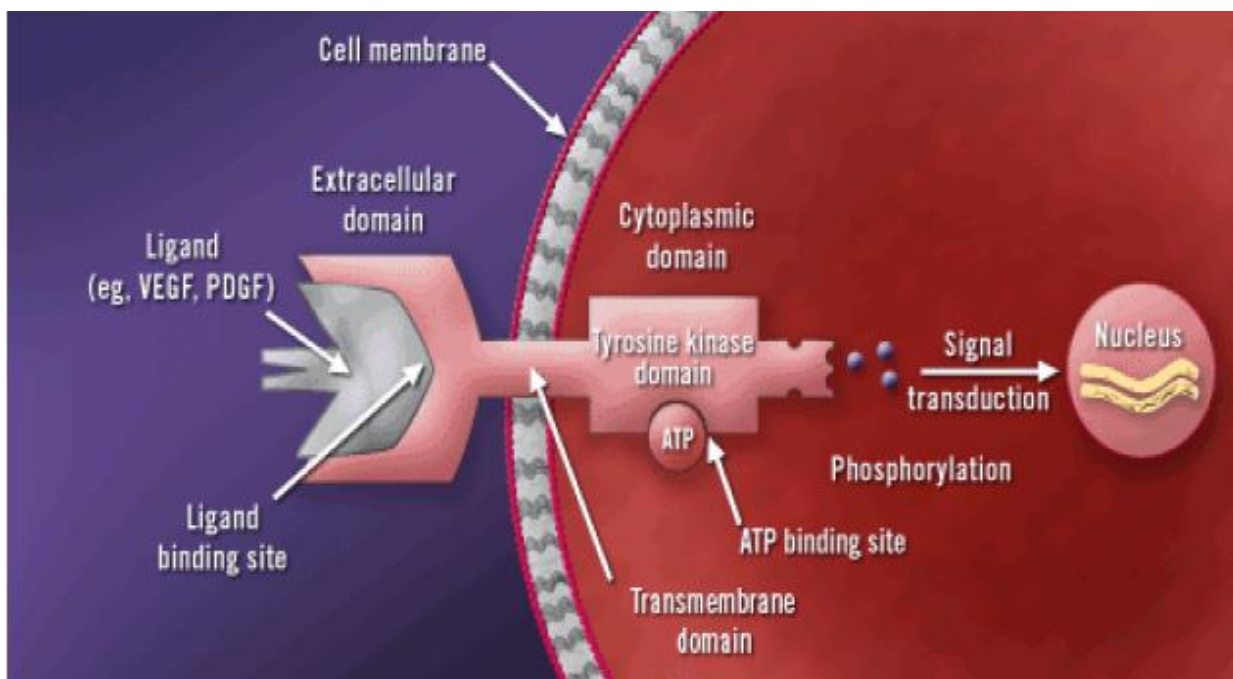


Figura 4. Representação esquemática do EGFR da Tirosina Quinase.

O EGFR está diretamente relacionado com processos regulatórios de proliferação, manutenção e sobrevivência celular²⁵⁻³⁰. Subclasses do EGFR da Tirosina Quinase consistem em quatro membros: EGFR/Her1, Her2, Her3 e Her4³⁰. Todos os membros têm um sítio de ligação na região extracelular, na região entre membranas e na região do domínio citoplasmático da Tirosina Quinase.

Atualmente muitos genes³² estão diretamente relacionados com o surgimento do câncer, dentre eles o Her2, também conhecido como ERBB2, que tem sido amplamente estudado como um alvo molecular^{33,34} escolhido na terapêutica de combate ao câncer, principalmente o de mama (Figura 5), que é considerado mundialmente um dos tipos mais frequentes, atingindo em 2002 como o mais prevalente no mundo sendo também a principal causa de morte por câncer e o tipo mais frequente entre as mulheres^{35,36} (23 a 25% de todas as neoplasias)^{37,38}. Assim como a história familiar³⁹, a maioria dos fatores de risco descrita

na literatura está relacionada com o tempo de vida da mulher e sua exposição ao estrógeno: menarca precoce e menopausa tardia, números totais altos de ciclos menstruais e ao uso de estrógeno-progesterona³⁸.



Figura 5. Câncer de mama inflamatório.

O Her2 está intimamente correlacionado com a malignidade da doença e com a falta de efetividade dos tratamentos quimioterápicos isolados ou como adjuvantes⁴⁰⁻⁴². Em condições normais, Her2 desempenha um importante papel na transdução de sinal no crescimento, sobrevivência e diferenciação celular^{29,30,44}. Her2 é o gene do EGFR 2 da Tirosina Quinase localizado no cromossomo 17, codifica uma glicoproteína de membrana de 185 KD ($\text{p185}^{\text{Her2}}$) e seus receptores são expressos em vários tecidos epiteliais, mesenquimais e neuronais^{28,30,33,45}.

Atualmente, existem vários compostos para alvos moleculares usados nas terapias anticâncer Her2 positivo e que despertam interesse clínico pela sua eficácia⁴⁶. A Tabela 2 mostra alguns desses medicamentos usados como monoterápicos ou adjuvantes com afinidade pela família de receptores Her/ERBB⁴⁷, porém uma dessas drogas se destaca por apresentar grandes resultados quando analisadas junto ao câncer de mama: o Lapatinib (Figura 6), um composto quinazolínico, conhecido devido sua grande afinidade com o receptor Her2 da Tirosina Quinase^{27,45,46}.

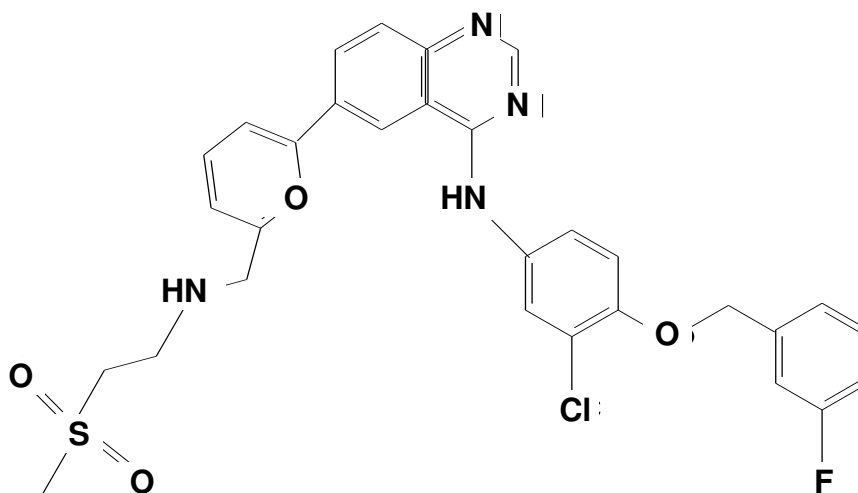


Figura 6. Estrutura molecular do Lapatinib (aminoquinazolina).

Tabela 2. Drogas de alvo molecular para Her2 em uso clínico⁴⁷

Composto	Tipo	Alvo	Indústria	Comentários
Trastuzumab	Anticorpo Monoclonal Humanizado	Her2	Genentech/Roche	Aprovado para o tratamento de Câncer de mama Her2 positivo, podendo ser associado à outras drogas.
Pertuzumab	Anticorpo Monoclonal Humanizado	Her2	Genentech	Estudos de Fase II para o tratamento de cânceres de ovário, mama, próstata e NSCLC, baseado na sua habilidade de bloquear a dimerização de Her2.

Cetuximab	Anticorpo Monoclonal Quimérico	EGFR/Her2	ImClone/Merck KgaA Bristol-Myers Squibb	Aprovado para o tratamento de CRC, podendo ser combinado com várias drogas para o tratamento de câncer de pâncreas, HNSCC e NSCLC.
Matuzumab	Anticorpo Monoclonal Humanizado	EGFR/Her2	Merck KgaA	Estudos de fase I para NSCLC, cânceres ginecológico, de pâncreas e esôfago.
Panitumab	Anticorpo Monoclonal Humanizado	EGFR/Her2	Abgenix	Usado para CRC, RCC e NSCLC.
Gefitinib	Inibidor Específico da Tirosina Quinase	EGFR/Her2	AstraZeneca	Aprovado para o tratamento de NSCLC após falha de outros tratamentos. Usados para cânceres do trato gastrointestinal e de pâncreas
Erlotinib	Inibidor Específico da Tirosina Quinase	EGFR/Her2	Genentech/OSI Pharmaceuticals	Aprovado para o tratamento de NSCLC após falha de outros tratamentos em vários tipos de cânceres
Lapatinib	Inibidor Específico da Tirosina Quinase	EGFR/Her2	GlaxoSmithKline	Estudos de fase III em pacientes com câncer de mama que são refratários ao Trastuzumab e quimioterapia.
AEE788	Inibidor Específico da Tirosina Quinase	EGFR/Her2/VEGFR	Noavrtis	Estudos de fase I – primeira multifunção como inibidor de EGFR/Her2/VEGF muitas indicações potenciais.
CI-1033	Irreversível Inibidor Específico da Tirosina Quinase	EGFR/Her2	Pfizer	Estudos de fase II em Cânceres de mama e NSCLC.
EKB-569	Irreversível Inibidor Específico da Tirosina Quinase	EGFR/Her2	Wyeth-Ayerst	Estudos de fase III em NSCLC.
EXEL 7647/EXEL	Inibidor Específico da Tirosina Quinase	EGFR/Her2/VEG	EXELIXIS	Estudos de fase I.

CRC – Câncer de colo-retal; EGFR – Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico; HNSCC – Câncer de cabeça e pescoço célula-escamosa; NSCLC – Câncer de pulmão não-pequenas células; RCC – Câncer de células renais; VEGFR – Receptor do fator de Crescimento Vascular Endotelial.

Estudos *in vitro*, revelam que o Lapatinib inibe o crescimento celular e induz apoptose em várias linhagens tumorais humanas (pulmão, cabeça e pescoço, mama, vulva e estômago)²⁹.

Muitas vezes usados quando há resistência à outras drogas, o Lapatinib em pacientes com câncer de mama apresenta uma maior eficácia, principalmente quando associados à outras drogas, como a Capecitabina, por exemplo⁴⁸.

Alguns estudos, como a pesquisa de De LAURENTIIS e cols. (2005)⁴⁹ e RUIZ e cols. (2008)⁵⁰, revelam que drogas como o Trastuzumab têm mais eficácia quando utilizado em concomitância com o Lapatinib, que por sua vez é tido, entre os pesquisadores clínicos, como grande promessa na terapêutica contra o câncer de mama.

O Lapatinib é comercializado nos Estados Unidos (Tykerb®) há algum tempo e sua chegada ao Brasil se deu no ano passado, como diz a matéria publicada em 20/02/2008, no Jornal O GLOBO: “*Tykerb – remédio contra câncer de mama já pode ser vendido no Brasil*”.

O NCI (*The U.S. National Cancer Institute*) sugere, para estudos relacionados ao câncer, o emprego de 60 linhagens celulares diferentes para ensaios anti-proliferativos *in vitro*⁵¹. Desses 60 tipos celulares, utilizamos 9 linhagens de células tumorais humanas: melanoma (UACC-62), mama (MCF7), ovário resistente a múltiplas drogas (NCIADR), rim (786O), pulmão (NCI460), próstata (PCO3), ovário (OVCAR3), cólon (HT29) e leucemia linfóide (K562).

Considerando que na literatura algumas quinazolinas são conhecidas por inibirem o EGF da Tirosina Quinase^{6,7,8,31,33,34}, assim direcionamos o estudo da interação quinazolina-receptor para o EGFR da Tirosina Quinase, conhecendo seu sítio de ação através do método

de “docking” molecular, realizado no IQ-UNICAMP pelo Prof. Dr. Cleverson Cassero Bocca.

Recentes avanços nas descobertas de drogas contribuíram para um aumento acentuado de ensaios bioquímicos e celulares *in vitro*, consequentemente maior tempo e custo a fim de elucidar o mecanismo biológico de determinados compostos e seus respectivos alvos de interação. Para desvendar o sítio de ação de determinadas drogas, principalmente as novas, atualmente o método de “docking” molecular vêm sendo amplamente utilizado em pesquisas referentes à interação droga-receptor. “Docking” é frequentemente usado para prever a orientação de uma pequena estrutura molecular (drogas, por exemplo) candidatas a um alvo protéico a fim de definir a atividade e afinidade dessas drogas⁵⁵. Assim podendo ser definido como o melhor acoplamento entre o receptor e seus ligantes através dos ajustes conformacionais das estruturas moleculares à partir de dados dos algoritmos.

No caso do “docking”, um algoritmo é uma seqüência de dados, onde através de funções matemáticas, o *software* computacional irá fornecer o melhor caminho para que se obtenha o acoplamento ideal, formando um complexo estável entre o receptor e seu ligante⁵⁶.

A simulação do processo “docking” é um evento mais complexo do que parece ser. Nestes termos, a proteína e seu ligante são separados fisicamente, e o ligante encontra sua posição dentro do sítio ativo dessa proteína após certos números de movimentos dentro do seu espaço conformacional. Os movimentos estão relacionados com as transformações no corpo da molécula como rotações e translações, por exemplo, bem como mudanças internas na estrutura do ligante como torção e rotação angular. Cada um desses movimentos no

espaço conformacional do ligante induz a um gasto de energia total do sistema, assim, depois de todos esses movimentos, o gasto de energia total é calculado pelo *software*.

A flexibilidade estrutural das moléculas, são analisadas e observadas em estruturas tridimensionais (3D) (Figura 7) obtidas à partir de modelos de alta resolução por Raio-X ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN), disponíveis em banco de dados eletrônico, como o *Protein Data Bank* (PDB)⁵⁷.

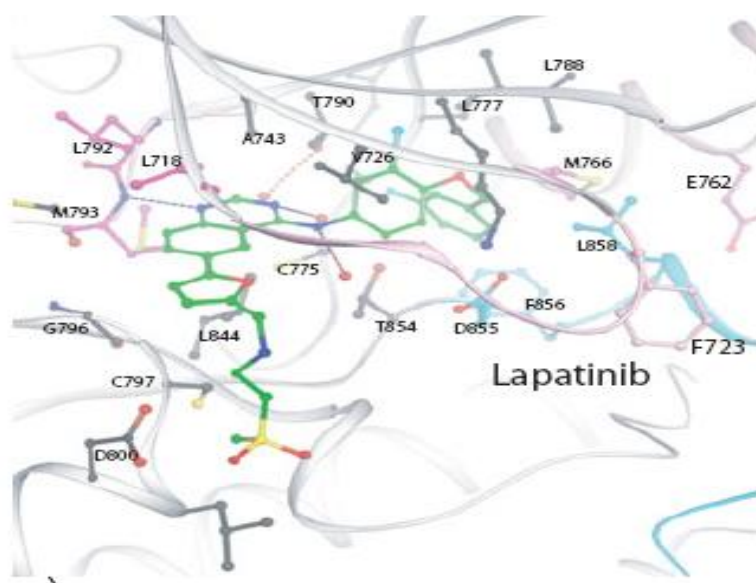


Figura 7. Exemplo de um complexo 3D do Lapatinib (em verde) ligado ao sítio de ATP do EGFR⁵⁸.

Assim, a capacidade de simular uma situação real de interação entre o ligante e o receptor em um curto espaço de tempo, bem como de substituir ou complementar outros métodos de análise de flexibilidade do ligante para incorporá-lo ao receptor, são as grandes vantagens do método de “docking” molecular^{59,60}.

Além de sua capacidade de identificar potenciais ligantes e as conformações dos seus respectivos receptores, o método tem custo reduzido, tendo a vantagem de realizar os

estudos em tempo mínimo, baseando-se em encontrar múltiplos alvos protéicos no qual uma pequena molécula pode se ligar forte ou fracamente ao seu receptor correspondente⁶¹.

Assim como muitos tipos de fármacos, as quinazolininas interferem na função do sistema nervoso simpático e, portanto exercem profundos efeitos sobre a fisiologia dos órgãos inervados por este sistema^{62,63,64}.

Nesta pesquisa, utilizou-se a linhagem celular adrenal feocromocitoma - uma neoplasia das células cromafins da medula adrenal - de rato PC12 (**P** = **P**heo; **C** = **C**hromocytoma **12**), uma linhagem clonada inicialmente de células tumorais de rato e expressam uma grande variedade de receptores envolvidos no sistema nervoso e canais iônicos, assim liberam catecolaminas continuamente (Figuras 8 e 9).

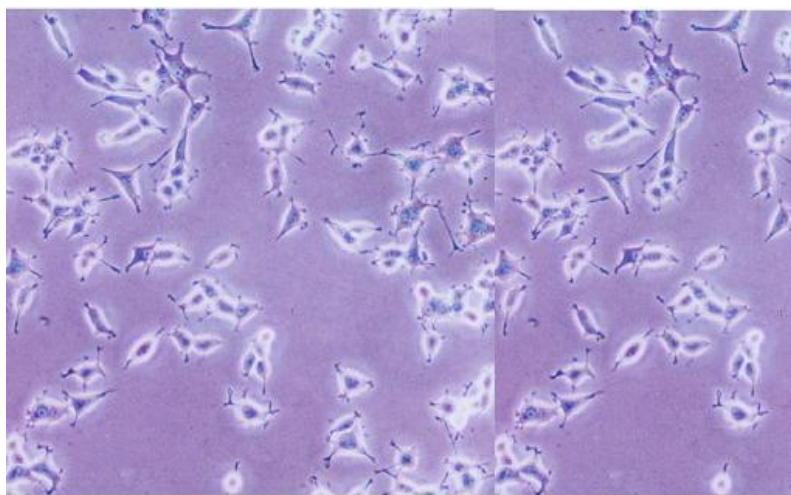


Figura 8. Células PC12⁶⁵.

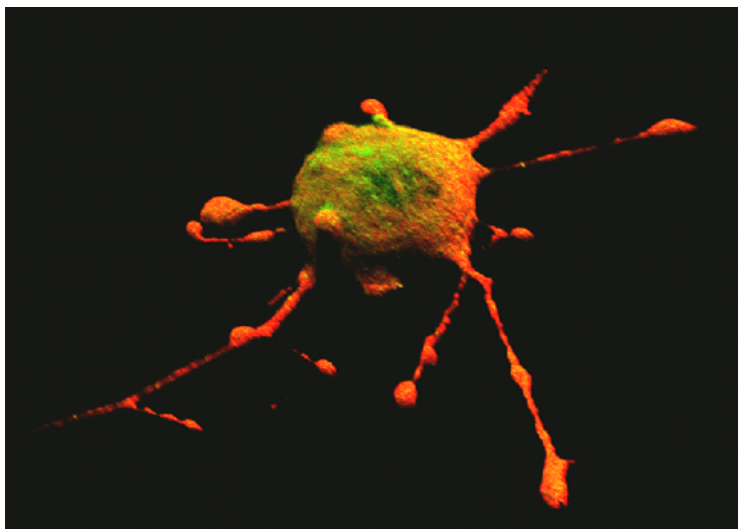


Figura 9. Reconstrução tridimensional de uma célula PC12 isolada.

Além disso, estas células possuem as características catecolaminérgicas intactas, razão pela qual são bastante utilizadas em estudos de neurobiologia e neuroquímica, ou como modelos neuronais para doenças neurodegenerativas^{66,67}.

1.1. Toxicidade *in vivo*.

Testes de toxicidade aguda realizados em animais, envolvem avaliação de um efeito tóxico geral de uma única dose de um composto químico, ou em muitos casos, o efeito de múltiplas doses. O estudo de toxicidade aguda tem como objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz a determinação da dose letal 50 (DL50) que corresponde a concentração do composto estudado que é letal para 50% da população estudada. Geralmente a substância estudada é administrada em ratos ou camundongos por via oral ou intraperitonal em várias doses até atingir a faixa letal. O número de animais mortos num período de 14 dias é utilizado para calcular a DL50⁶⁸.

Os testes de toxicidade aguda fornecem a base para classificar produtos químicos com relação à sua manipulação, transporte e uso, também para definir mecanismos de ação

tóxica, estabelecer níveis de doses para outros testes e propor recomendações médicas em casos de superdosagem. Estes testes envolvem normalmente um grande número de animais, os quais são caros e acarretam problemas de ordem ética⁶⁹.

Apesar das diferenças, a realização dos experimentos *in vitro* e *in vivo* para simular uma resposta toxicológica em humanos tem se mostrado muito útil na proteção da população⁷⁰.

Muitos estudos têm demonstrado boa correlação entre citotoxicidade *in vitro* obtida com linhagens celulares indiferenciadas e dados de DL50^{71,72}.

A medula adrenal sintetiza 3 hormônios ativos catecolamínicos (amina contendo derivados de catecol 1,2 diidroxibenzeno): dopamina, norepinefrina e epinefrina (Figura 10).

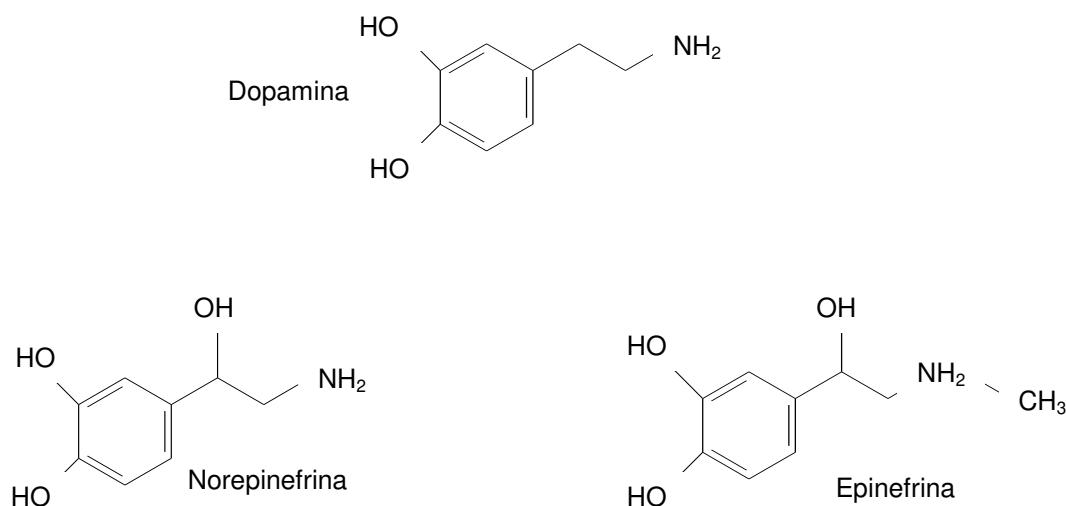


Figura 10. Catecolaminas.

Nos últimos anos, foram acumuladas inúmeras informações sobre as catecolaminas e compostos relacionados, em parte, devido à importância das interações entre catecolaminas endógenas e muitos medicamentos usados no tratamento da hipertensão, distúrbios mentais e várias outras doenças. Sob esse título geral, estão incluídas a noradrenalina (transmissor da maioria das fibras sinápticas pós-ganglionares e alguns tratos do SNC) e a dopamina (transmissor predominante no sistema extrapiramidal dos mamíferos e várias vias neuronais (mesocorticais e mesolímbicas), assim como a adrenalina (hormônio principal da medula supra-renal)⁷³. Essas catecolaminas constituem uma classe de neurotransmissores químicos e hormônios que desempenham papel fundamental na regulação de processos neurológicos, endócrinos e fisiológicos⁷⁴ e são liberadas por vesículas de armazenamento da medula adrenal em resposta ao medo, exercício, frio e baixos níveis de glicose no sangue, bem como aumentam a degradação de triglicerol e glicogênio, aumentam o débito cardíaco e a pressão arterial. Estes efeitos são partes de uma resposta coordenada para preparar o indivíduo para emergências, frequentemente denominada reações de “luta ou fuga!”⁷⁵.

Os efeitos biológicos dessas catecolaminas são mediados por 3 classes de receptores, o alfa (α), o beta (β) e os receptores dopaminérgicos. As quinazolininas possuem afinidade para os receptores adrenérgicos, especialmente o subtipo α -1⁷³, estas glicoproteínas foram originalmente identificadas baseando-se nas mais variadas respostas a certos antagonistas e agonistas⁷⁶. O bloqueio dos receptores α -1 adrenérgicos inibe a vasoconstrição induzida pelas catecolaminas endógenas; pode ocorrer vasodilatação em vasos de resistência arteriolar e em veias. O resultado consiste em queda da pressão arterial, devido à menor resistência periférica. A magnitude desses efeitos depende da

atividade do sistema nervoso simpático no momento em que se administra o antagonista, sendo, portanto menor em indivíduos em posição supina do que em posição ortostática e particularmente pronunciada se houver hipovolemia. O bloqueio dos receptores α -1 adrenérgicos, também inibe a vasoconstrição e a elevação da pressão arterial produzida pela administração da amina simpaticomiméticas.

O conhecimento atual sobre os locais e mecanismos celulares da síntese, armazenamento e liberação das catecolaminas foi conseguido pelos estudos dos órgãos de inervação adrenérgica e do tecido da medula supra-renal, onde são armazenadas em grânulos cromafins.

Estes hormônios são sintetizados da tirosina (Figura 11) e armazenados em grânulos até sua liberação exocitária conforme o controle do sistema nervoso simpático⁷⁷.

As duas principais enzimas envolvidas no metabolismo das catecolaminas são a Catecol- O -Metil transferase (COMT) e Mono-Amino Oxidase (MAO)⁷⁷⁻⁷⁹. A COMT é amplamente distribuída em tecidos, sendo localizada intracelularmente como uma enzima citoplasmática. A atividade enzimática é aumentada no fígado e rins, também está presente nas células dos músculos liso e cardíaco e outros tecidos inervados pelos nervos adrenérgicos.

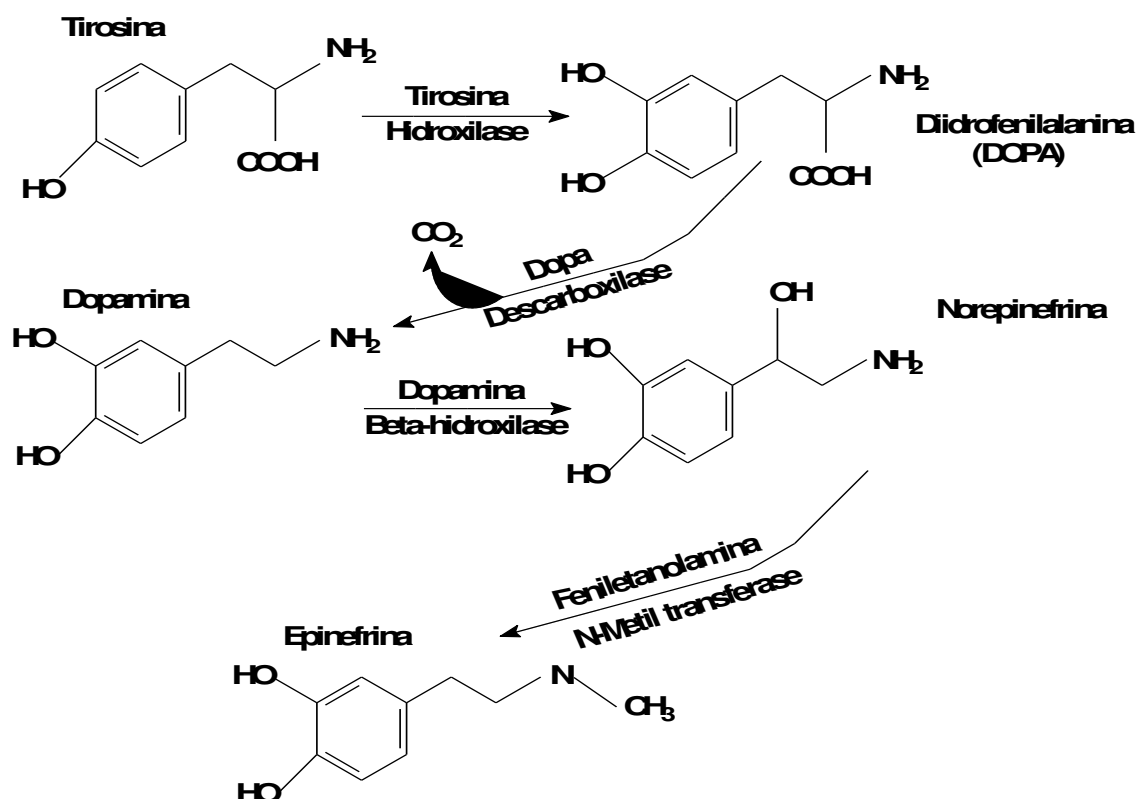


Figura 11. Síntese das catecolaminas.

A MAO ocorre dentro das células ligando-se à membrana da superfície da mitocôndria, catalisa a deaminação oxidativa das catecolaminas e em larga escala das outras aminas para formar seus aldeídos. A deaminação oxidativa das catecolaminas foi originalmente descrita em 1930⁷⁴. É uma enzima mitocondrial e parece estar localizada entre a parte externa e interna da membrana mitocondrial^{78,80}, é abundante nas terminações nervosas noradrenérgicas, mas também está presente em muitos outros locais, como o fígado e o epitélio intestinal.

O HVA é o produto correspondente da degradação metabólica da dopamina (Figura 12), que por sua vez é um precursor metabólico imediato da noradrenalina e da adrenalina.

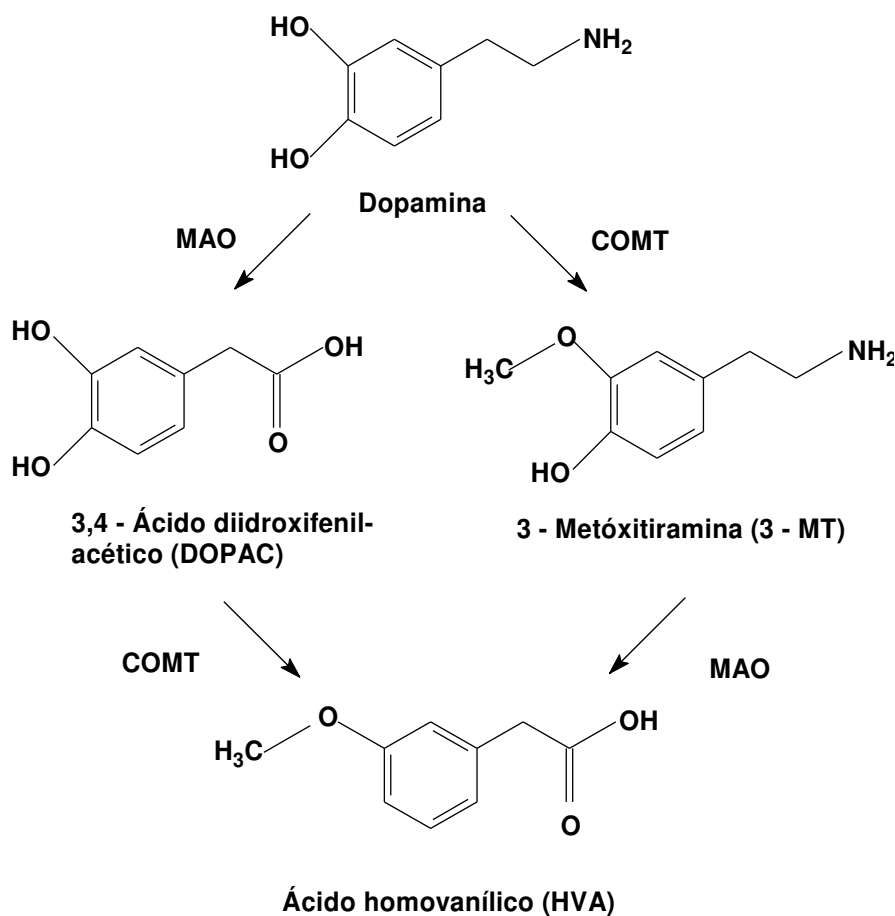


Figura 12. Metabolismo da dopamina.

A dopamina trata-se de um neurotransmissor central, particularmente importante na regulação do movimento, dotado de importantes propriedades farmacológicas intrínsecas. Este neurotransmissor é um substrato da MAO e COMT, de modo que é ineficaz quando administrada por via oral⁷³.

O HVA é um dos principais marcadores do neuroblastoma, um tumor sólido freqüente na infância que acomete principalmente abdome, mediastino posterior e região paravertebral. As metástases são precoces e atingem com freqüência ossos, medula óssea, linfonodos e fígado. Em cerca de 90% dos neuroblastomas ocorrem a produção de

catecolaminas, cujos metabólitos podem ser mensurados na urina: ácido vanil-mandélico (VMA), HVA e norepinefrina⁸¹. Na prática, os marcadores mais utilizados são o VMA e o HVA. Em alguns países a pesquisa destes marcadores (VMA e HVA) na urina tem sido realizada em lactentes para testes de triagem (*screening*), objetivando a detecção precoce do tumor^{82,83}. Estes marcadores são importantes no diagnóstico e no acompanhamento dos pacientes com neuroblastoma. Além dos neuroblastomas, outros tumores que produzem catecolaminas, como ganglioneuroblastoma e feocromocitoma⁸⁴, uma neoplasia das células cromafins da medula adrenal, produtoras de catecolaminas, causa hipertensão secundária e seu diagnóstico pode ser confirmado pelo aumento excessivo de catecolaminas plasmáticas e metabólitos urinários catecolamínicos, como o HVA, por exemplo⁸⁵.

A quantidade de HVA urinário é uma medida da secreção endógena das catecolaminas, assim pretendemos analisar a degradação metabólica das catecolaminas, identificando o principal analito, o metabólito final da dopamina (HVA) urinário, por ser um composto de excelente precisão diagnóstica⁸⁶, através de estudos de Espectrometria de RMN de Hidrogênio (^1H).

Quando se ouve falar em Ressonância Magnética Nuclear, possivelmente a primeira idéia que se vem à cabeça é dos exames médico-diagnósticos por imagem realizados por aqueles grandes aparelhos tubulares, no qual o paciente fica dentro, na posição horizontal para que seja feita a varredura anatômica do seu corpo. Essa associação se justifica, pois dezenas de milhares desses exames são realizados anualmente pelo mundo, porém a RMN vai além do diagnóstico por imagem, hoje em dia é utilizada em centros de pesquisas biológicas, agrônomicas, farmacêuticas, etc. O princípio físico da técnica aplicada para o diagnóstico médico e da RMN de Hidrogênio é o mesmo, diferindo no modo como as

amostras são processadas e apresentadas, ou seja, ao invés de imagens anatômicas na qual estamos acostumados, temos a representação gráfica dos picos de absorção nos espectros, identificando o conteúdo químico das amostras, através dos hidrogênios ou outros núcleos de suas estruturas químicas.

De acordo com SILVERSTEIN e cols. (1987)⁸⁷, a RMN de Hidrogênio (^1H) é basicamente uma outra forma de espectrometria de absorção, semelhante à espectrometria no infravermelho ou no ultravioleta. Sob condições apropriadas uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em frequência de acordo com as características estruturais da amostra. Um registro gráfico das frequências dos picos de absorção contra suas intensidades constitui um espectro de RMN.

Partindo do princípio que todos os núcleos possuem carga, e em alguns casos a carga gira em torno do próprio eixo nuclear gerando um momento angular, que pode ser medido através do número de *spin* I , que pode assumir os valores de 0, 1/2, 1, 3/2, etc ($I = 0$ corresponde a um núcleo que não gira em torno do próprio eixo)^{87,88}.

Vários núcleos apresentam número de *spin* $I = 1/2$ (^1H , ^{19}F , ^{13}C e ^{31}P) e, portanto uma distribuição de carga mais esférica e uniforme. O número de *spin* I determina o número de orientações diversas que um núcleo pode assumir quando colocado dentro de um campo magnético externo e uniforme, de acordo com a fórmula $2 \times I + 1$, ou seja no caso do ^1H , que possui o número de *spin* $I = 1/2$, apresenta duas orientações possíveis^{87,89}.

Estabelecido as duas orientações possíveis ou os dois estados de energia para ^1H , pode-se introduzir agora uma quantidade de energia em MHz em um campo magnético, fazendo com que o núcleo passe do seu estado fundamental (de menor energia) para o de maior energia, nesse momento o sistema está em ressonância^{87,90}.

Com a necessidade de uma maior sensibilidade e melhor resolução dos espectros, hoje são fabricados aparelhos de 300 à 500 MHz, e amplamente disseminados pelo mundo, chegando até a existir aparelhos de 900 MHz.

Para instrumentação e manuseio da amostra, o solvente ideal não deve conter prótons em sua estrutura para não haver interferência na leitura dos espectros, deve ter baixo ponto de ebulição, ser barato e inerte^{87,88}.

A área do pico é proporcional ao número de hidrogênios, sendo assim apenas um pico apareceria no espectro representando todos os ^1H da estrutura química presente na amostra. Felizmente, a situação não é tão simples assim. Sob influência magnética, os núcleos são “blindados” fracamente por uma nuvem de elétrons que os cercam, essa nuvem de elétrons ou densidade eletrônica varia de acordo com a localização do ^1H na estrutura química (essa localização também é conhecida como ambiente químico), fazendo com que os núcleos absorvam mais ou menos energia de acordo com seu grau de blindagem, resultando no aparecimento de picos de absorção em locais diferentes de um espectro. A diferença na posição de um pico de absorção, em relação ao pico padrão, é chamada de deslocamento químico do hidrogênio, como, por exemplo, o deslocamento químico dos ^1H do etanol na figura abaixo (Figura 13)⁸⁷:

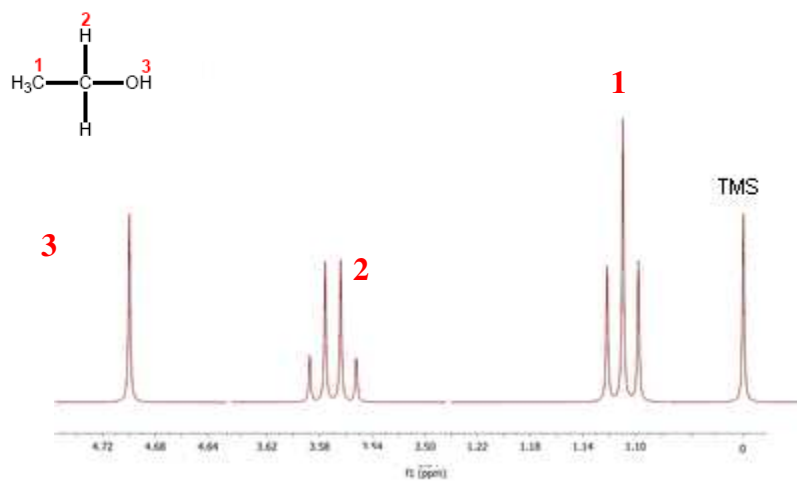


Figura 13. Espectro do etanol e seus ^1H com picos de absorção em posições diferentes.

2. Hipóteses

Como as quinazolininas são conhecidas por apresentarem diversas atividades biológicas, pretendemos analisá-las frente às ferramentas que temos disponíveis, como técnicas de toxicidade *in vitro* e *in vivo*, por exemplo, a fim de elucidar o papel biológico desses novos compostos e saber se estamos diante de drogas promissoras, tais como algumas das quinazolininas conhecidas (Tarceva[®], Iressa[®], Tykerb[®], etc) (Figura 14).

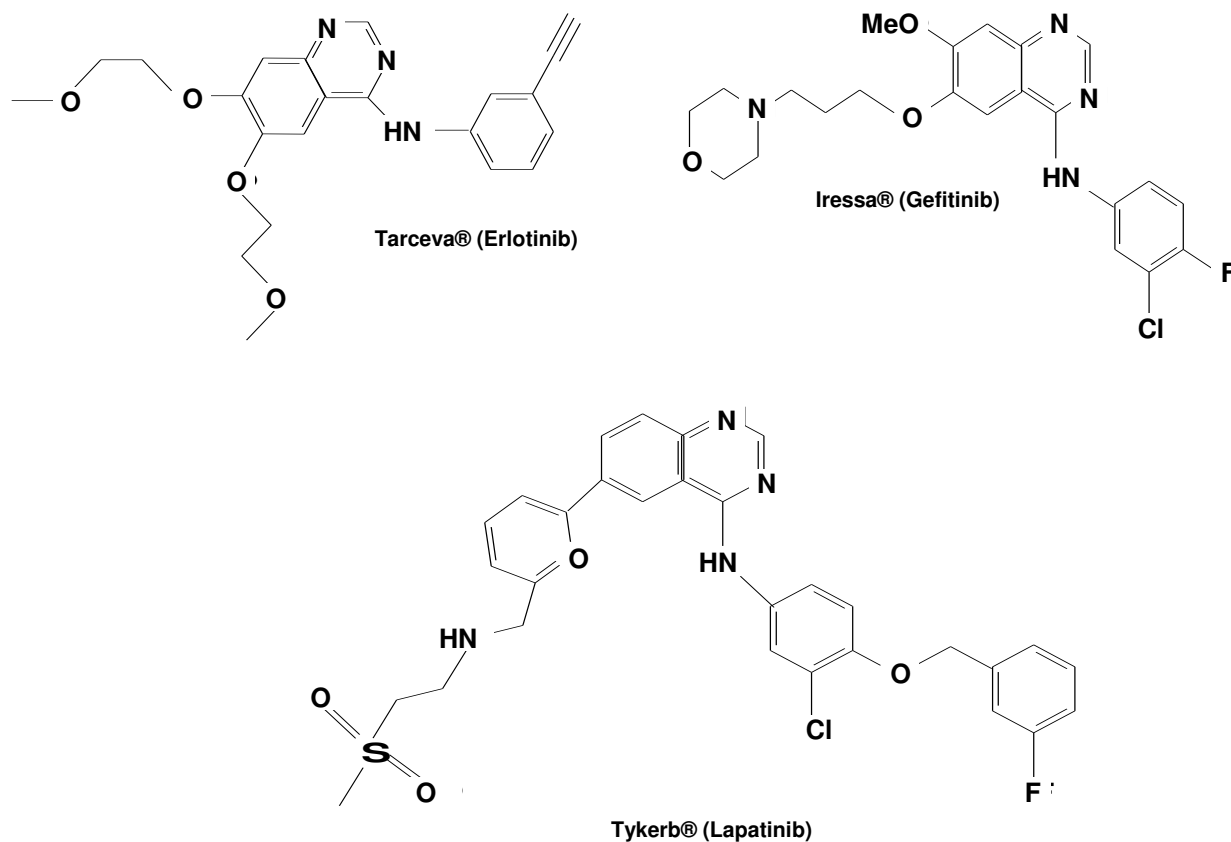


Figura 14. Compostos quinazolínicos usados como anti-neoplásicos.

3. Objetivos.

Avaliar a toxicidade *in vitro* dos compostos quinazolínicos para isso utilizando células PC12 e 09 linhagens de células tumorais humanas: melanoma (UACC-62), mama (MCF7), ovário resistente a múltiplas drogas (NCIADR), rim (786O), pulmão (NCI460), próstata (PCO3), ovário (OVCAR3), cólon (HT29) e leucemia linfóide (K562).

Elucidar o sítio de ação onde ocorre a interação entre a droga e o receptor em células tumorais de mama (MCF07), através do método de “Docking” Molecular;

Observar sinais de toxicidade aguda *in vivo*, através de testes hipocráticos;

Identificar o HVA urinário, metabólito das catecolaminas, através de Espectrometria de RMN de Hidrogênio (^1H).

4. Materiais e Métodos.

4.1. Quinazolininas.

Os compostos quinazolínicos (6,7-Metilenodioxi-4-[3'-(R)-fenil]aminoquinazolina)^{10,11} utilizados nessa pesquisa foram sintetizados no Instituto de Química (IQ-UNICAMP) e fornecidos pelo Prof. Dr. Roberto Rittner.

As células PC12 e os camundongos foram tratados com os compostos quinazolínicos e seus diferentes substituintes [Br, H, CH₃, N(CH₃)₂], tendo como veículo o meio *Dullbecco* modificado por *Eagle* (DMEM) suplementado para as células e salina para os animais. Inicialmente foram feitos testes com diferentes concentrações dos compostos quinazolínicos para se determinar seus efeitos tóxicos.

4.2. Manutenção das células.

4.2.1. Células PC12.

As células PC12 foram provenientes da ATCC (*American Type Culture and Collection*), cuja identificação é CRL-1721TM e foram fornecidas pelo Prof. Dr. Roger Castilho. Estas células possuem receptores catecolamínicos para os neurotransmissores, sendo semelhantes às células adrenérgicas^{64,91}. Por apresentarem estas características, as células PC12 foram utilizadas ao longo desta pesquisa para avaliação da neurotoxicidade, sendo expostas a diferentes concentrações dos compostos quinazolínicos.

As células foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas com superfície de 75 cm², com pescoço inclinado e tampa com filtro (TPPTM,

EUA), contendo 20 mL do meio DMEM com fenol e 4,5 g de glicose (Cultilab[®], Brasil), suplementado com 10% de soro fetal equino inativado por calor (Sigma-Aldrich[™], EUA), 5% de soro bovino inativado (Cultilab[®], Brasil) e 1% de penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL (Gibco[™], EUA). Para os repiques periódicos, a cada 48 horas aproximadamente, aspirou-se todo o meio da garrafa e adicionou-se 10 mL do próprio meio suplementado. Com o auxílio de um *cell scraper* (TPP[™], EUA) as células eram deslocadas e transferidas para novas garrafas contendo meio DMEM suplementado como descrito acima. Para cultura contínua, esses repiques foram realizados periodicamente a cada 48 horas aproximadamente, acompanhando o crescimento logarítmico de 7×10^5 céls/mL. Todos os experimentos dessa fase foram realizados em câmara de fluxo laminar com desinfecção prévia dos materiais e bancada de trabalho por luz ultra-violeta (UV) durante 15 minutos e álcool 70%.

4.2.2. Linhagem celular tumoral.

Foram utilizadas 9 linhagens de células tumorais humanas imortalizadas provenientes da ATCC e fornecidas pelo Prof. Dr. João Ernesto do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), local onde foram mantidas e realizados os ensaios anti-proliferativos *in vitro*. As 9 linhagens de células tumorais humanas disponibilizadas foram: melanoma (UACC-62), mama (MCF7), ovário resistente a múltiplas drogas (NCIADR), rim (786O), pulmão (NCI460), próstata (PCO3), ovário (OVCAR3), cólon (HT29) e leucemia linfóide (K562). Todas essas linhagens foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas com superfície de 25 cm², com pescoço inclinado e tampa com filtro

(TPP™, EUA), contendo meio RPMI 1640 (Cultilab®, Brasil), suplementado 5% de soro bovino inativado (Cultilab®, Brasil) e 1% de penicilina 10.000 UI/mL e estreptomicina 10 mg/mL (Gibco™, EUA).

Para deslocamento das células aspirou-se todo o meio RPMI 1640 dentro das garrafas e adicionou-se tampão de *Hank's* (StemCell™, EUA) em cada garrafa, fazendo movimentos oscilatórios suaves. Em seguida, aspiraram-se novamente todas as garrafas e adicionou-se 500 µL de tripsina (a 37 °C) em cada garrafa, após isso agitou-se fortemente as garrafas para acelerar o desprendimento das células, colocando 5 mL do meio RPMI 1640 suplementado, transferindo 0,2 ml da suspensão celular para uma nova garrafa, incubando-as novamente em estufa a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂. Para cultura contínua eram realizados os repiques das linhagens tumorais usadas, acompanhando o crescimento logarítmico de 3x10⁷ céls/mL. Todos os experimentos dessa fase foram realizados em câmara de fluxo laminar com desinfecção prévia dos materiais e bancada de trabalho por luz ultravioleta (UV) durante 15 minutos e álcool 70%.

4.3. “Docking” Molecular

4.3.1. Modelo de ligação

Os cálculos de modelagem molecular foram realizados utilizando o programa Gaussian 03⁹². As geometrias mais estáveis dos compostos quinazolínicos com os substituintes CH₃ e H foram obtidas através do cálculo da energia potencial de superfície (PES), através do nível de teoria HF/3-21G. Em seguida, essas geometrias mais estáveis foram otimizadas pela teoria de densidade funcional (DFT) com os cálculos B3LYP híbrido funcional, que consiste na alternância de locais funcionais de Becke de três parâmetros fixados⁹³ e no local de não correlação funcional de LEE e cols, (1998)⁹¹. A 6-311G (d,p) da

base fixa de Pople^{95,96} foram utilizados para realizar estes cálculos. Pontos estacionários foram totalmente otimizados e caracterizados pela frequência de cálculos vibracionais, que também proporcionou energias de ponto zero vibracional (ZPE).

4.3.2. “Docking”

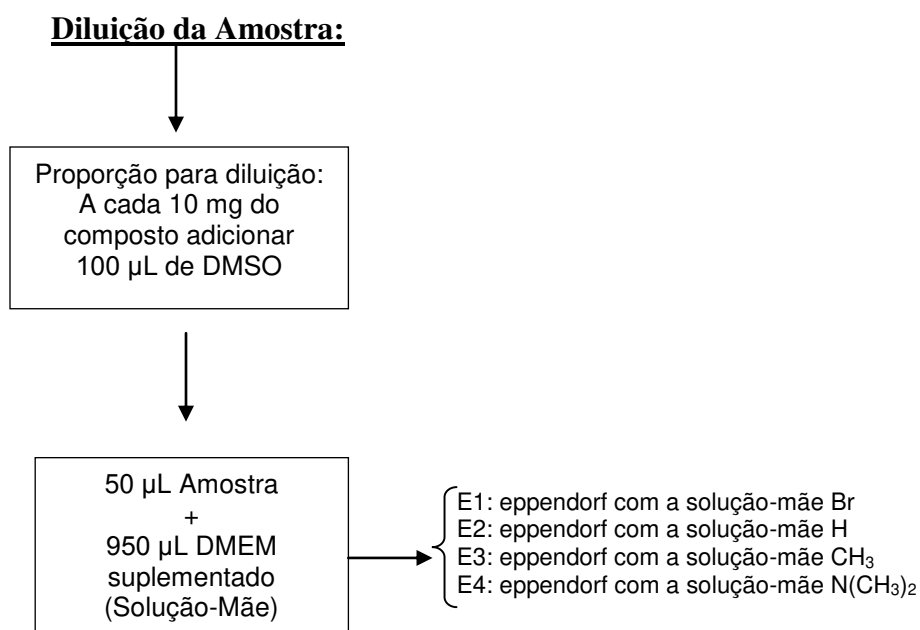
Experimentos através de “docking” foram realizados utilizando Autodock 4.0.32. O método de pesquisa utilizado foi Lamarckian, um algoritmo Genético (GIG) executado com 100 LGA⁹⁷. O número máximo de avaliações energia foi fixado em 1,0 M. Outros parâmetros foram deixados aos respectivos valores padrão. Durante este processo de busca, os ligantes (por exemplo, substratos) e os resíduos enzimáticos Phe699, Lys721 e Met769 foram considerados flexíveis. Os compostos foram fixados no centro dos resíduos flexíveis, onde o tamanho do espaço rotacional foi normalmente fixado em 100, 100 e 100 Å (x, y, e z) a uma resolução de 0,281 Å.

4.4. Toxicidade e determinação da taxa de sobrevivência celular.

4.4.1. Células PC12.

Os estudos de citotoxicidade foram feitos a partir de discos de cultura de células com dimensões de 35 mm x 10 mm (TPP™, EUA). Após as células terem atingido uma confluência de 80% nas garrafas de 75 cm² foram colocados o meio DMEM com vermelho de fenol, suplementado, como descrito no tópico 4.2.1., as células PC12 e os compostos quinazolínicos em diferentes concentrações, não excedendo o volume final de 2 mL por disco de cultura. A placa foi mantida em estufa a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, durante 48 horas.

As células nos discos de cultura foram tratadas com diferentes concentrações das drogas, que por sua vez foram previamente diluídas em Dimetil Sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich™, EUA), onde a cada 10 mg do composto foram diluídos em 100 μL de DMSO. Dessa diluição, 50 μL foram adicionados em 950 μL do meio suplementado (solução-mãe 5 mg/mL). A partir daí, através da equação $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$, foram distribuídas nas concentrações de 2,5, 25, 100, 150, 250, 300, 400 e 500 $\mu\text{g/mL}$ dos compostos quinazolínicos.



Como controle, utilizou-se células apenas na presença do meio DMEM suplementado.

Para saber se o DMSO estaria apresentando algum efeito citotóxico sobre as células, utilizou-se um controle DMSO, onde as células foram colocadas na presença de 0,1 μL de DMSO diluídos no meio. Todas as placas tinham como volume final 2 mL.

Para a taxa de sobrevivência celular, foi utilizado o método de exclusão por azul de Tripán (*Trypan Blue*), que consiste no princípio de que a célula é impermeável à este corante quando sua membrana celular está intacta, assim quando essa mesma membrana sofre lesão, o corante penetra na célula ligando-se a dupla fita de DNA, onde as células inviáveis apresentam uma coloração nuclear azulada, como no exemplo da figura abaixo (Figura 15).

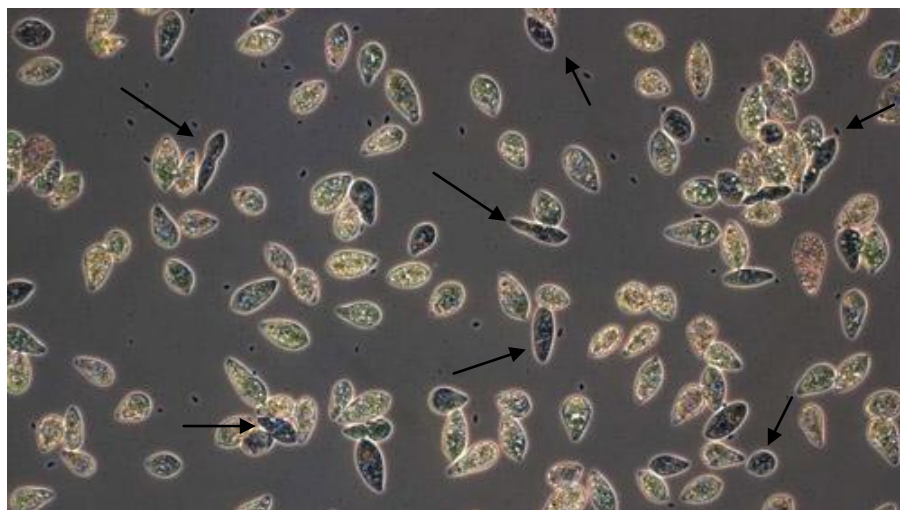


Figura 15. Células inviáveis em azul, pelo corante azul de Tripán.

As células foram expostas a diferentes concentrações dos compostos quinazolínicos por 48 horas. Para obtenção da IC₅₀ (inibição de crescimento de 50% da população celular), as células foram deslocadas do disco de cultura, e 100 μL dessa suspensão celular foram transferidas para um recipiente contendo 900 μL de azul de Tripán. A concentração celular foi determinada por contagem em câmara de *Neubauer* sob microscopia^{98,99}. As células foram contadas nos mesmos quadrantes onde são contados os leucócitos em exames hematológicos (Figura 16).

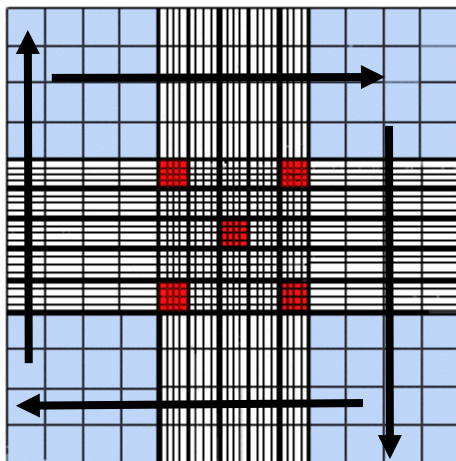


Figura 16. Contagem das células viáveis em câmara de *Neubauer*.

Para o resultado encontrado na câmara de *Neubauer*, utilizamos a seguinte expressão: n total de céls/4 x 10 x 10⁴, onde 10 = fator de diluição e 10⁴ = fator de correção da câmara de *Neubauer*, para expressão dos resultados em cél/mL.

Todos os testes de citotoxicidade foram feitos em duplicata, tendo um $n = 4$ para cada composto quinazolínicos. Foram obtidas as médias da quantidade de células expostas às diferentes concentrações das drogas e os resultados foram expressos em porcentagem em função da média do grupo controle, inseridos nos gráficos feitos no *software Origin Plus*⁹⁸.

4.4.2. Linhagem tumoral.

Foram preparadas as suspensões celulares para semeadura nas placas de 96 compartimentos. Após a realização das etapas de lavagem como descrito anteriormente, quando as células estavam soltas, foram adicionados 5 mL de meio RPMI 1640 suplementado, lavando-se bem a garrafa com o próprio meio RPMI. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, aplicou-se uma pequena quantidade da suspensão celular em uma câmara de *Neubauer*, para a contagem da quantidade de células, como descrito na Figura 16. Por regra

de três, calculou-se quantos ml foram necessários da suspensão para se preparar a suspensão na densidade de confluência pré-determinada (3×10^7 céls/mL).

Uma vez pronta a suspensão celular, procedeu-se então a inoculação de 100 μ L por compartimento da mesma na placa de 96 poços, seguindo o desenho experimental a seguir (Figura 17):

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G		UACC-62	MCF-7	NCI-ADR	786-0	NCI-460	PC-3	OVCAR-3	HT-29	K562		
H												

 Suspensão celular

Figura 17. Desenho experimental da placa de 96 poços.

No mesmo dia, foi preparada a placa T₀, através da inoculação de 100 μ L de suspensão celular por compartimento, seguindo o desenho experimental acima.

No segundo dia de experimento, diluiu-se cada composto, onde a cada 10 mg do mesmo, adicionou-se 100 μ L de DMSO (Sigma-Aldrich™, EUA) (amostra), partindo dessa amostra, adicionou-se 50 μ L da mesma em 950 μ L do meio RPMI 1640 suplementado (solução-mãe). Foi feito isso para os 4 compostos - substituintes: Br, H, CH₃, N(CH₃)₂ - e para o controle positivo Doxorrubicina (DOXO), um quimioterápico conhecido por apresentar propriedades anti-neoplásicas (Figura 18):

Diluição da Amostra:

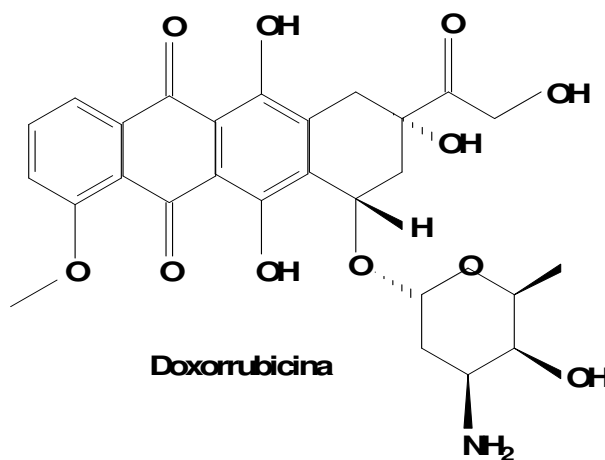
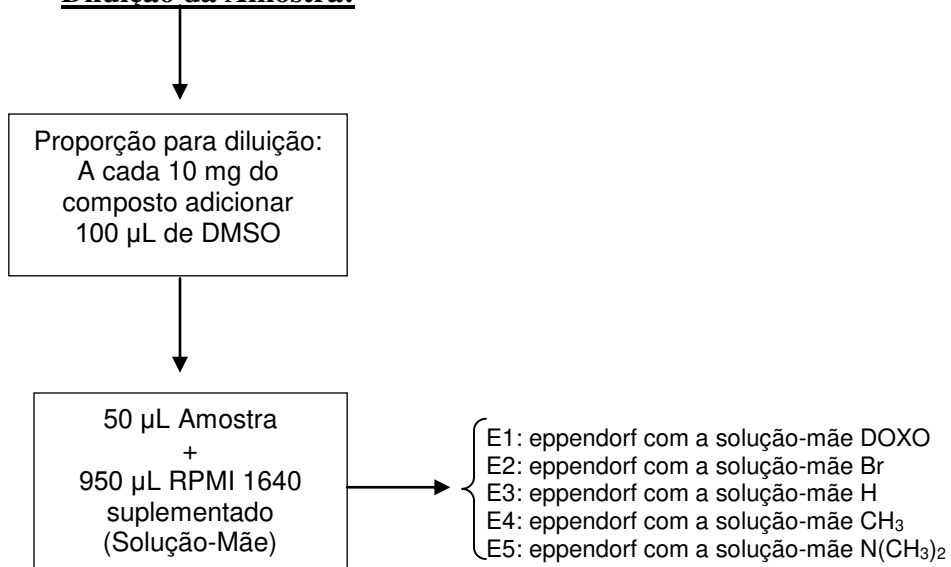
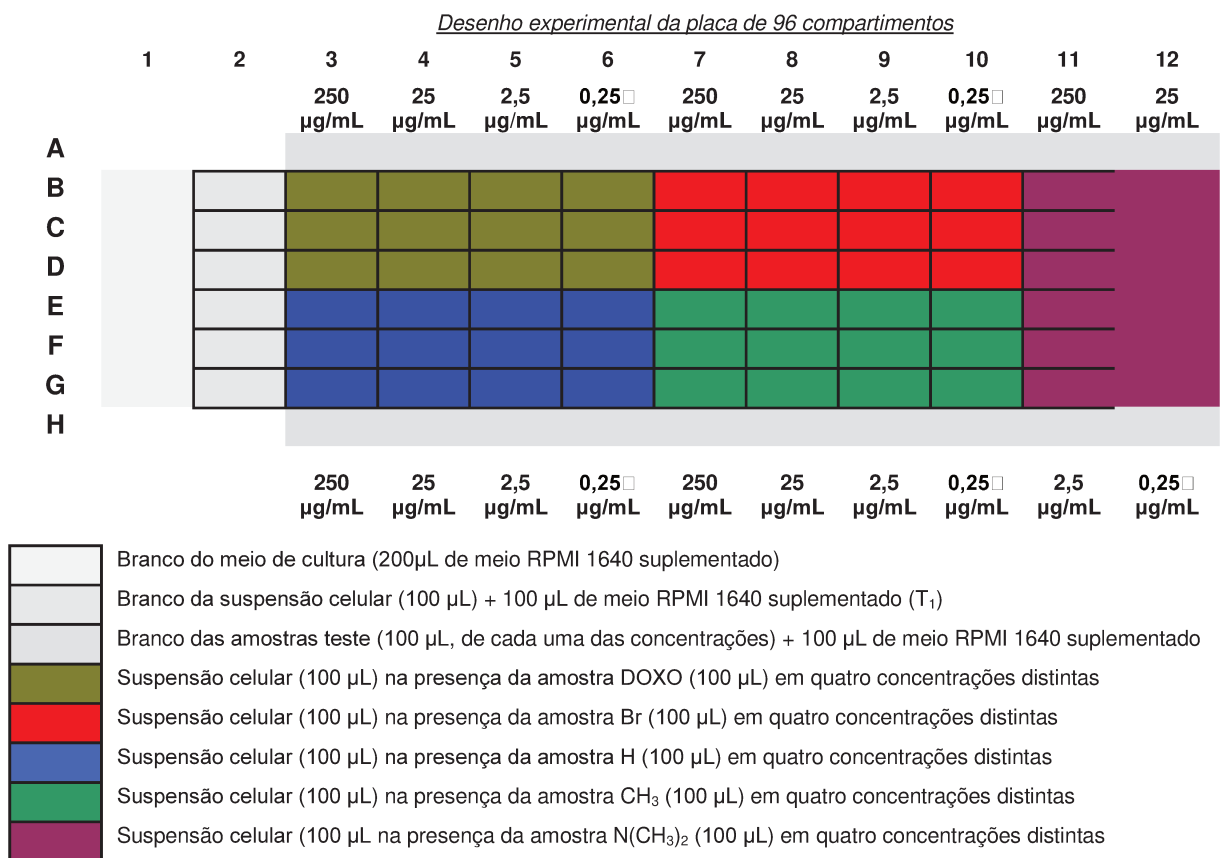


Figura 18. Doxorrubicina, quimioterápico amplamente usado contra o câncer.

As células aderidas foram fixadas pela adição de 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) à 10% e incubadas por 1 hora à 4°C. O sobrenadante foi descartado e as placas foram lavadas 5 vezes com água deionizada. Cem microlitros (100 µL) de solução de Sulforhodamina B (SRB) 0.4% diluída em ácido acético à 1% foi adicionado em cada poço e a placa foi incubada novamente por 10 minutos em temperatura ambiente. O SRB não conjugado às células foi removido através da lavagem (5 vezes) com ácido acético à 1%.

Após secagem das placas, as células conjugadas aos SRB foram solubilizadas com tampão Tris e a absorbância foi lida por um espectrômetro com leitor de placas (desenho experimental da placa de 96 compartimentos, abaixo), num comprimento de onda de 515 nm, conforme metodologia descrita por SKEHAN e cols. (1990)⁵², VICHAI e KARTIKARA (2006)¹⁰⁰.



O cálculo da inibição de crescimento (IC) foi feito à partir de:

Se $T > C \rightarrow$ estímulo de crescimento celular;

Se $T \geq T_0$ e $T < C \rightarrow$ atividade citostática: $IC = 100 \times [(T-T_0)/(C-T_0)]$;

Se $T < T_0 \rightarrow$ atividade citotóxica: $IC = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$.

Onde:

T = média da absorbância da célula tratada – absorbância amostra sem célula

C = absorbância do branco de células

T_0 = absorbância do controle de células na placa T_0 .

Cada teste de cultura foi realizado uma vez em triplicata ($n = 1$) e seus resultados foram plotados em gráficos construídos no *software Origin Plus*, disponível no local da realização dos experimentos (CPQBA).

4.5. Toxicidade aguda em camundongos.

Para essa pesquisa foram utilizados camundongos *Swiss*, adultos, machos, aproximadamente entre 30-35 g, mantidos com ração e água *ad libitum*, ambientados a 22°C com fotoperíodo de 12/12h, fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB) e mantidos no Biotério do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), sob supervisão do Prof. Dr. João Ernesto. Dos animais disponíveis, essa linhagem é a que mais se assemelha à fisiologia humana, motivo pela qual a utilizamos. A pesquisa com esses animais foi aprovada pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UNICAMP, segundo protocolo 1114-1 (em anexo).

Para a realização dos testes hipocráticos⁹⁸, utilizou-se 01 (hum) animal para cada concentração dos compostos previamente dissolvidos, que por sua vez foram administrados por via intraperitoneal, por ser uma região amplamente vascularizada, contribuindo para um metabolismo mais rápido da droga ou ainda evitando que a droga sofra ação do suco gástrico, quando administradas por sonda gástrica. As drogas foram previamente diluídas em *Tween* 80 (10 µl) e administradas com salina a 5% de maneira que o volume injetado não excedesse a 1 ml/100 g de peso corpóreo de acordo com protocolo do Laboratório onde foram realizados os testes (CPQBA), em dose determinada de acordo com as normas da *Organisation for Economic Co-Operation and Development* (OECD) fornecendo informações acerca da dose tóxica e dos riscos para a saúde humana¹⁰².

Após a injeção das doses os animais eram colocados em uma superfície plana com espaço suficiente para que o mesmo explorasse tal região e observamos se havia morte durante as primeiras 4 horas.

Adicionalmente à taxa de mortalidade, foi observada a ocorrência de sinais ou sintomas do sistema nervoso autônomo (salivação, diarreia, etc) e do sistema nervoso central e periférico (tremor, convulsão, coma etc).

Nos casos em que a DL50 será determinada, os compostos quinazolínicos receberão uma classificação de acordo com “*The Globally Harmonized System for Hazard Classification and Labelling*” (disponível em <http://www.unece.org>) da organização UNECE (*United Nations Economic Commission for Europe*) (anexo).

4.6. Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (^1H) do HVA urinário.

Nestes experimentos, realizamos uma curva de calibração utilizando HVA diluído em urina humana. Os espectros de RMN de Hidrogênio (^1H) foram obtidos através do espectrômetro Brucker[®], disponível no Instituto de Química (IQ-UNICAMP), que opera na faixa de 400 MHz para ^1H em vários solventes. Num tubo de vidro de 5 mm, como solvente de escolha, utilizou-se 250 μl de água deuterada (D_2O) e como padrão, por ter todos os hidrogênios aparecendo na mesma pico de absorção do espectro, utilizou-se o Trimetilsilano (TMS) (Figura 19), amplamente utilizado como referência em ensaios de Espectrometria de RMN de Hidrogênio (^1H), por seus ^1H serem mais blindados e estarem no mesmo ambiente químico⁸⁷.

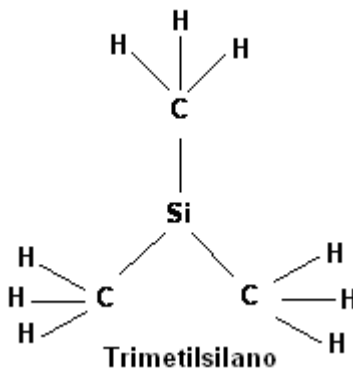


Figura 19. TMS usado como pico de referência para o deslocamento químico.

4.6. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados de toxicidade *in vitro* foi realizada através de Análise de Variância (ANOVA) com correção de *Tuckey*, em *software* disponível (*Origin Plus*) no Laboratório de Lesões Oxidativas, sendo * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ para os testes *in vitro* com células PC12.

5. Resultados e discussão.

5.1. Toxicidade *in vitro* (IC₅₀).

5.1.1. Células PC12.

Nos estudos de citotoxicidade estabelecemos os valores de IC₅₀, que representam os valores da concentração do composto quinazolínicos que apresenta inibição de crescimento de 50% da população celular de PC12. Os valores encontrados foram calculados após contagem de células, a porcentagem dessas células viáveis relacionadas com a concentração do composto inseridas no *software Origin* que nos forneceu os valores de IC₅₀ para cada composto quinazolínicos, expressos nos gráficos à seguir:

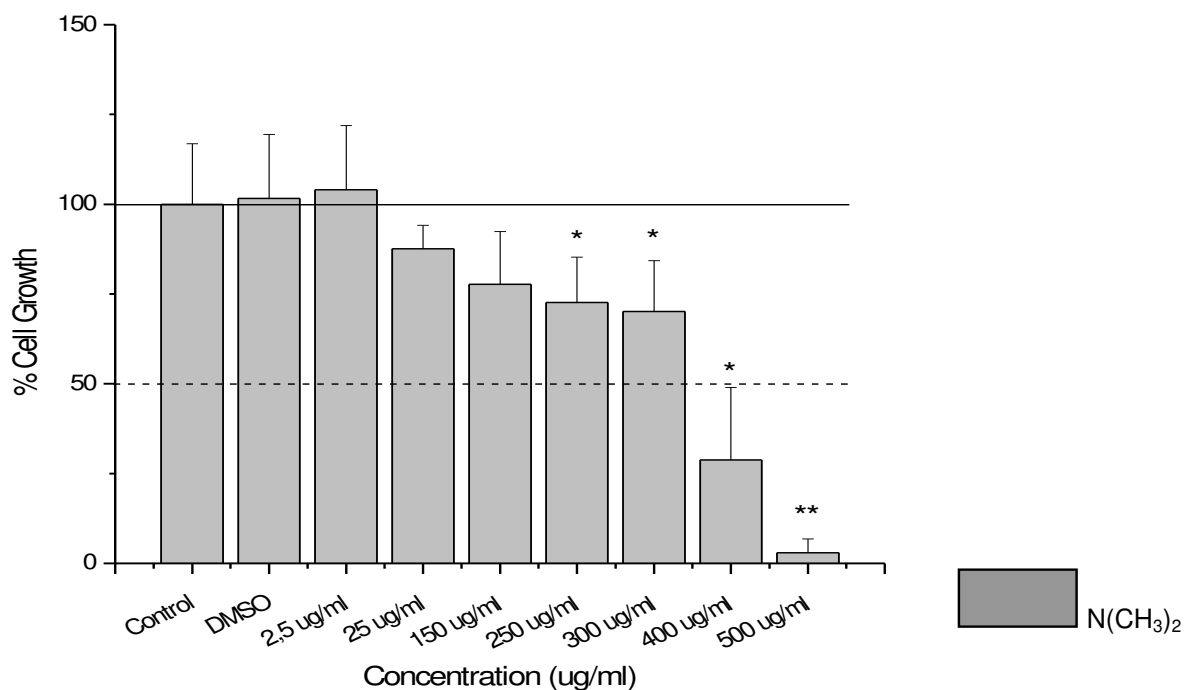


Gráfico 1. IC₅₀ da população celular de PC12 expostas ao composto com o substituinte dimetilamino ($\text{N}(\text{CH}_3)_2$).

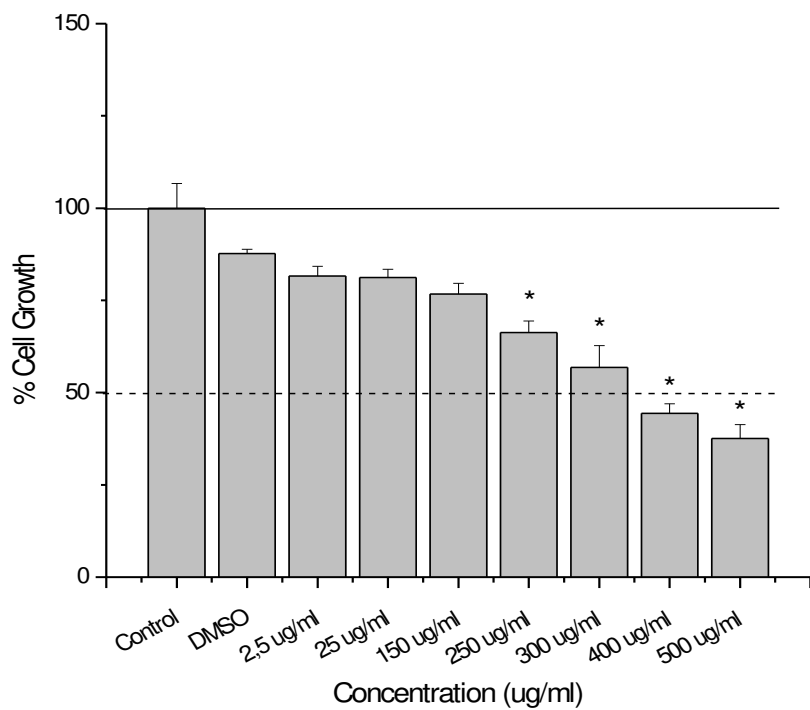


Gráfico 2. IC50 da população celular de PC12 expostas ao composto com substituinte bromo (Br).

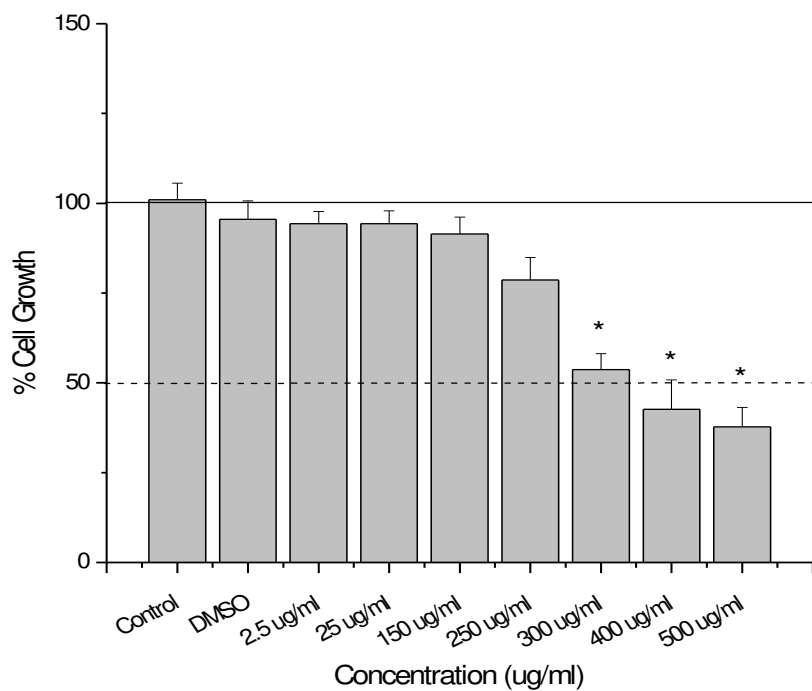


Gráfico 3. IC50 da população celular de PC12 expostas ao composto com substituinte metil (CH_3).



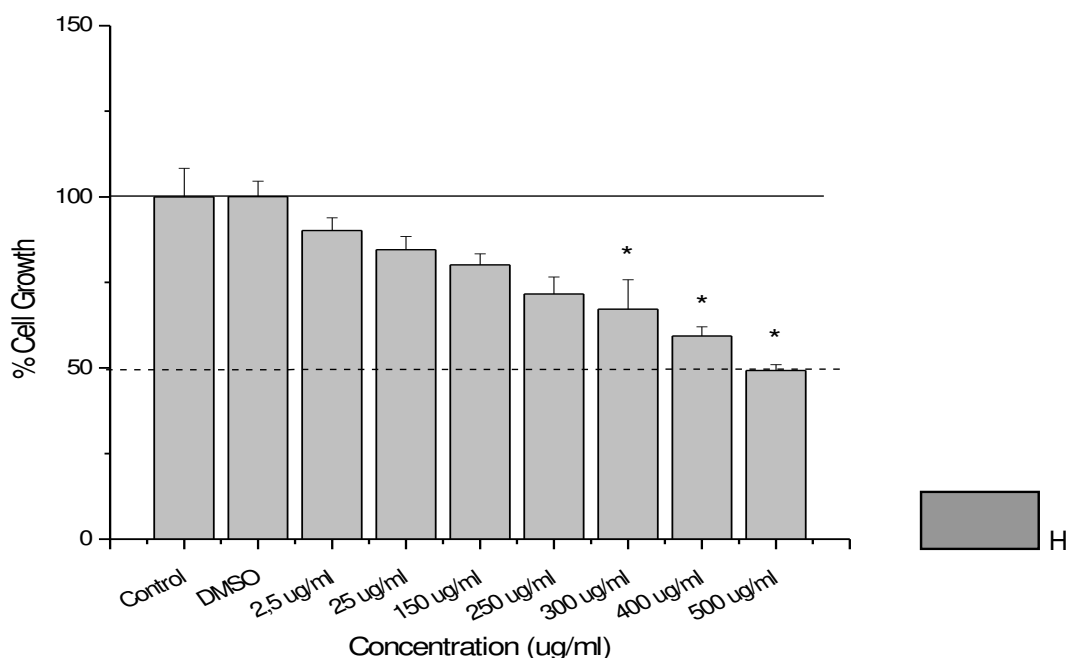


Gráfico 4. IC50 da população celular de PC12 expostas ao composto com substituinte hidrogênio (H).

Podemos observar através dos gráficos 1, 2 e 3 que os compostos com os substituintes Br, CH_3 e $\text{N}(\text{CH}_3)_2$, apresentaram IC50 entre 300 e 400, sendo que este último composto [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$] à 500 $\mu\text{g/ml}$ provocou morte celular em aproximadamente 100% das células PC12, resultando numa maior atividade deste composto em relação aos outros. Por sua vez o composto com o substituinte H apresentou IC50 entre 400 e 500 $\mu\text{g/ml}$, apresentando menos toxicidade *in vitro* do que os outros compostos citados acima.

5.1.2. Linhagem tumoral.

A fim de investigar a atividade anti-tumoral dos compostos quinazolínicos (6,7-Metilenodioxo-4-[3'-(R)-fenil]aminoquinazolina) e sabendo que diferentes linhagens tumorais podem exibir diferentes sensibilidades relacionados à um determinado composto. O uso de mais de uma linhagem celular foi considerada necessário para investigação da

atividade citotóxica dos compostos quinazolinícos, sendo assim utilizamos 09 linhagens de células tumorais humanas de diferentes origens histológicas:

- Melanoma (UACC-62)
- +— Mama (MCF07)
- ▲— Ovário Resistente à Múltiplas Drogas (NCIADR)
- ▼— Rim (7860)
- ◆— Pulmão (NCI460)
- ◆— Próstata (PC03)
- ▶— Ovário (OVCAR3)
- ◆— Cólon (HT29)
- ★— Leucemia Linfóide (K562)

Segundo o NCI (*The U.S. National Cancer Institute*), essas células são modelos para ensaios anti-proliferativos *in vitro* para estudos sobre o câncer.

Para avaliação da citotoxicidade, a proliferação celular foi determinada através do ensaio espectrofotométrico da SRB^{52,100}.

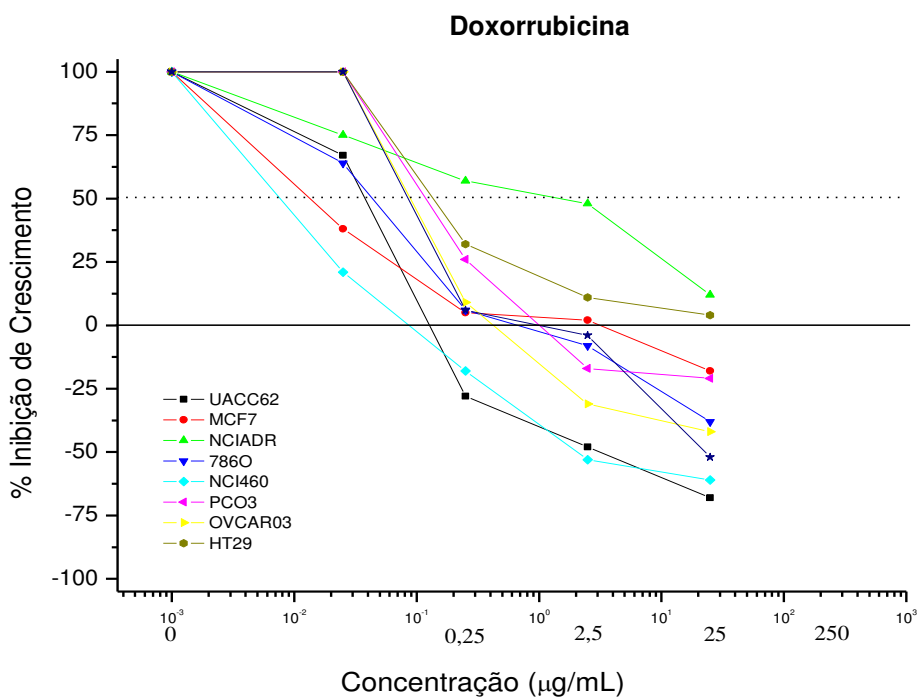


Gráfico 5. IC50 das linhagens tumorais humanas expostas à Doxorrubicina (controle).

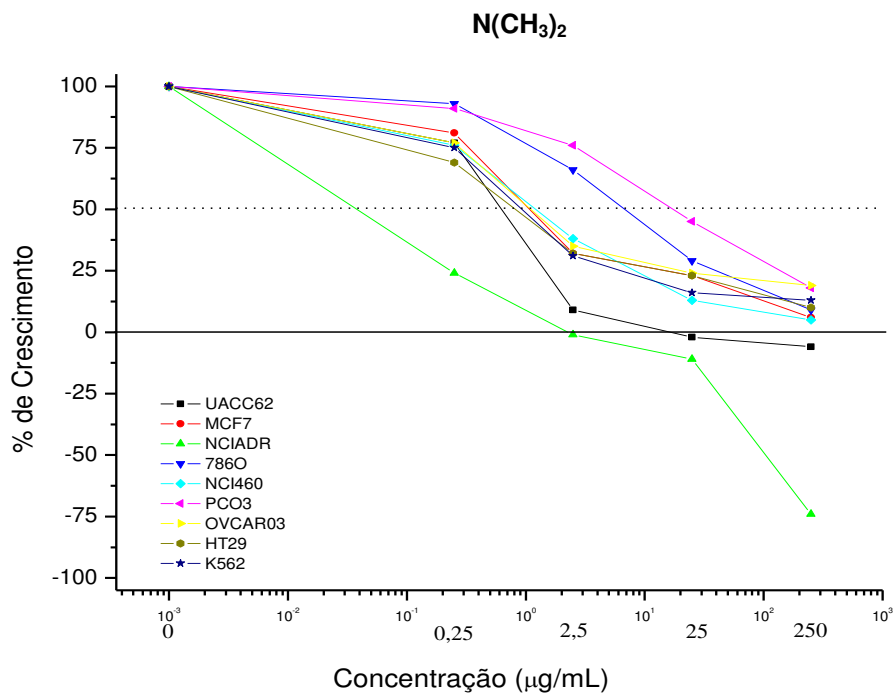


Gráfico 6. IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte dimetilamino [$\text{N}(\text{CH}_3)_2$].

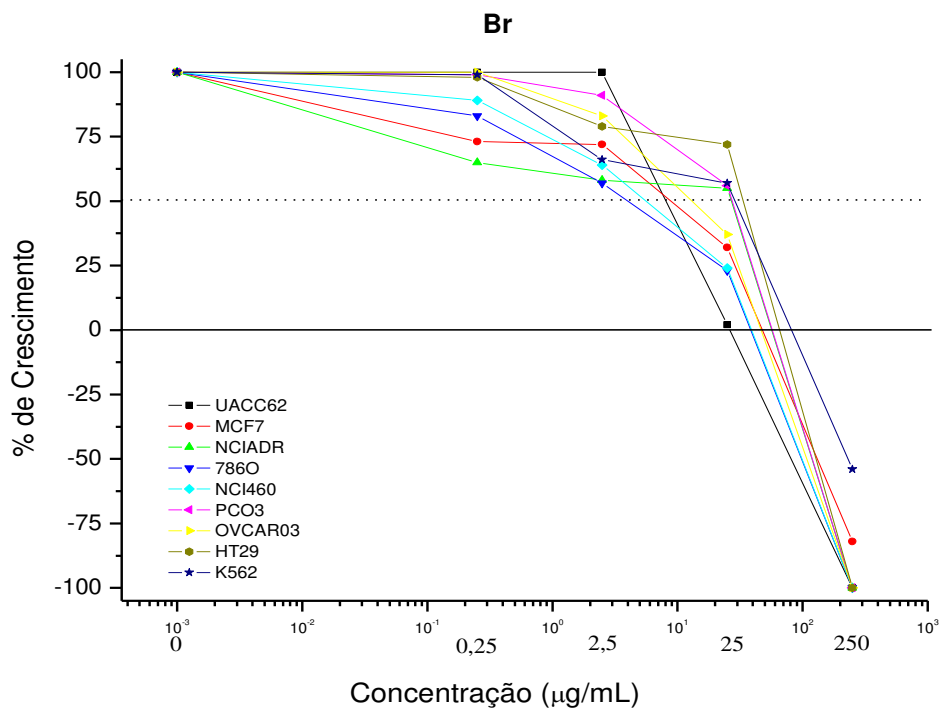


Gráfico 7. IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte bromo (Br).

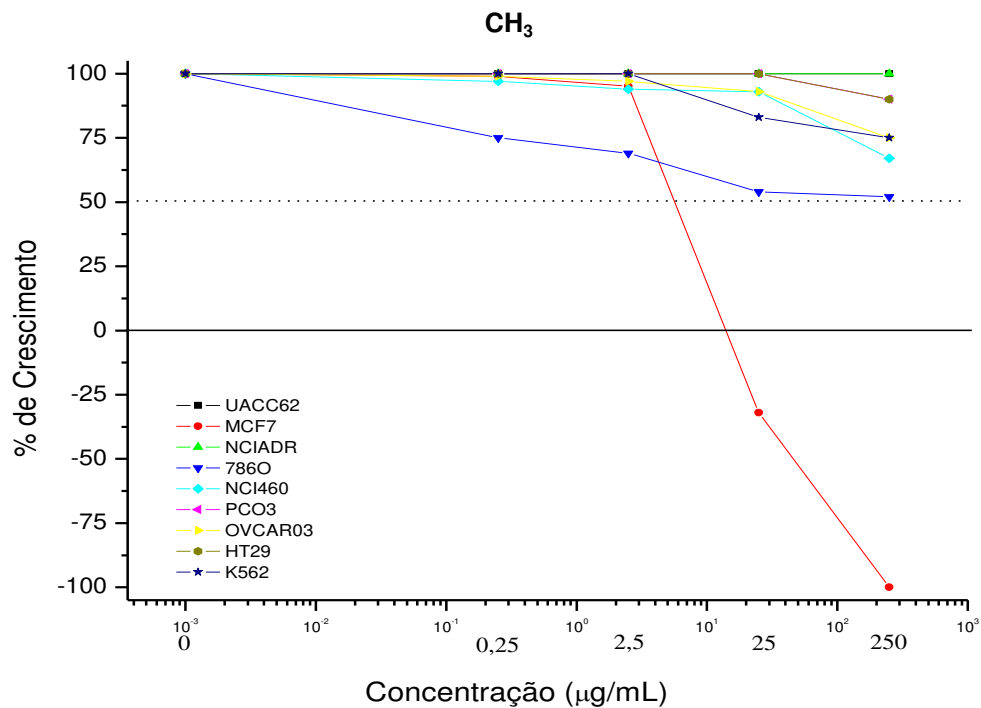


Gráfico 8. IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte metil (CH₃).

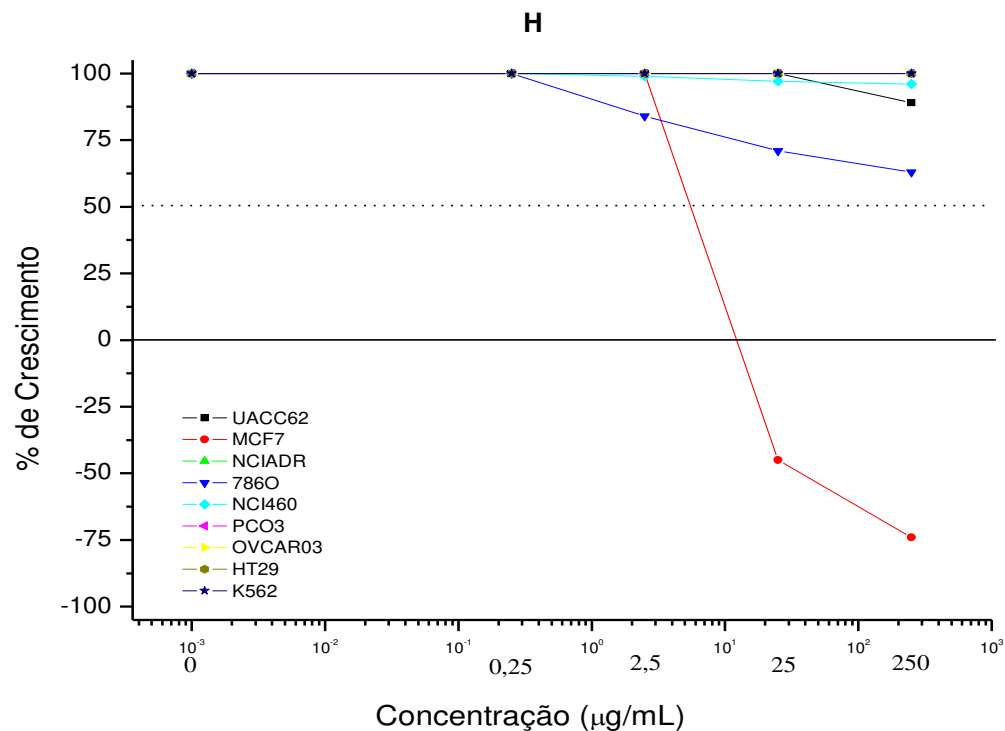


Gráfico 9. IC50 das linhagens tumorais humanas expostas ao composto com o substituinte hidrogênio (H).

Os gráficos mostram IC₅₀ vs. faixa de concentração (0.25 a 250 $\mu\text{g/ml}$) para as substâncias testadas mais o controle. As linhas coloridas representam diferentes tipos de células usadas para o ensaio anti-proliferativo *in vitro*. Os valores entre 0% e 100% representam inibição de crescimento e os resultados abaixo de 0% representam morte celular.

Observamos que a atividade citotóxica é extremamente dependente do substituinte. No caso do $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ este apresentou pequena seletividade para linhagem tumoral de ovário resistente à múltiplas drogas (NCIADR), e o composto com o substituinte Br não apresentou seletividade para nenhuma linhagem celular tumoral, sendo tóxica para todas as células, praticamente nas mesmas concentrações.

Utilizamos o quimioterápico Doxorrubicina como nosso controle positivo, apesar de apresentar efeitos adversos devido à baixa seletividade e agredindo células normais do nosso organismo, é bastante utilizado no tratamento de tumores sólidos. Nossos compostos quinazolínicos são extremamente seletivos para a linhagem tumoral de mama (MCF07) e pouco seletivo para a linhagem tumoral de ovário resistente à múltiplas drogas (NCIADR).

5.2. “Docking” Molecular

Para os experimentos, utilizamos a acoplagem EGFR/Lapatinib no complexo de resolução 2,60 $\text{\AA}^{103}$, foi tomado como modelo partida (APO código: 1m17). O Lapatinib foi retirado do complexo e os resíduos foram devidamente acoplados. Átomos de hidrogênio foram adicionados aos aminoácidos da proteína e os encargos parciais atômicos foram distribuídos usando o formalismo de Gasteigere-Marsili, enquanto todos os possíveis vínculos calculáveis dos ligantes e cargas de Kollman para todos os átomos no EGFR

foram atribuídos, utilizando o AutoDock como ferramenta. A proteína foi apresentada através de um procedimento de minimização usando os do protocolo. Esses procedimentos foram realizados por meio dos parâmetros estabelecidos e implementados no programa Swiss-Pdb Viewer versão 4.0.1¹⁰⁴. Estudos anteriores indicaram que as 4-anilinoquinazolinas provocam inibição através da sua ligação com o sítio de ATP durante a transferência de grupos fosfatos¹⁰⁵⁻¹⁰⁸. A ligação própria do ATP envolve dois importantes hidrogênios nas interações entre as bases do ATP e de proteínas entre os aminoácidos Gln767 e Met769. Nossos compostos quinazolínicos (CH_3 e H) foram posicionados no sítio de ação do Lapatinib de acordo com estrutura publicada¹⁰⁴. Todo o complexo foi então submetido a ciclos de minimização. A Figura 20 mostra os compostos CH_3 (a) e H (b) vinculados ao sítio de ATP do EGFR. De acordo com estudos, o encaixe do composto com substituinte CH_3 (a) (Figura 20a) se liga à uma porção estreita da região terminal hidrofóbica do domínio EGRF, onde N3 do anel da quinazolina interage com o NH do aminoácido Met769 (2,2 Å). O estreito contato do grupo fenil da quinazolina com o resíduo Leu694 (3,4 Å e 3,6 Å, respectivamente), sugere uma interação hidrofóbica. Estas interações estabilizaram o composto no sítio ativo do EGFR contribuindo para um favorável vinculativo de energia (-12,9 kcal/mol). Para o composto com o substituinte H, um vínculo entre o grupo hidrogênio adicional do grupo NH fenil amino e o resíduo Gln767 (1,9 Å) foi observado (Figura 20b) na ligação entre o hidrogênio N3 e o resíduo Met769 diminuindo para 1,9 Å, em comparação com o composto com substituinte CH_3 . A energia observada para o composto com o substituinte H foi próximo ao CH_3 (-13,7 kcal/mol). As Figuras 20a e 20b mostram uma visualização em 3D do EGRF complexado com o composto com substituinte CH_3 , e com o substituinte H, respectivamente, mostrando que ambos os substituintes ocupam o mesmo espaço na proteína.

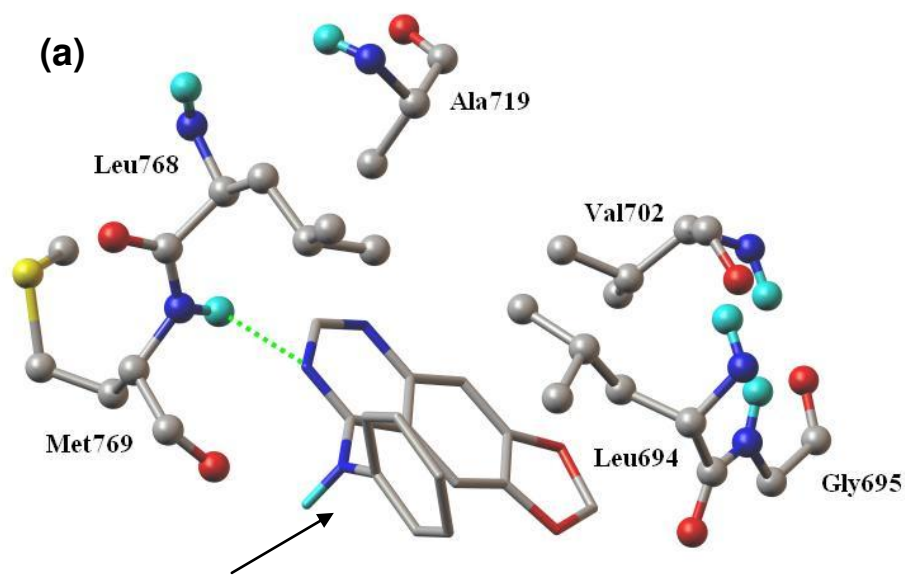


Figura 20a. Composto quinazolínicos com substituinte CH_3

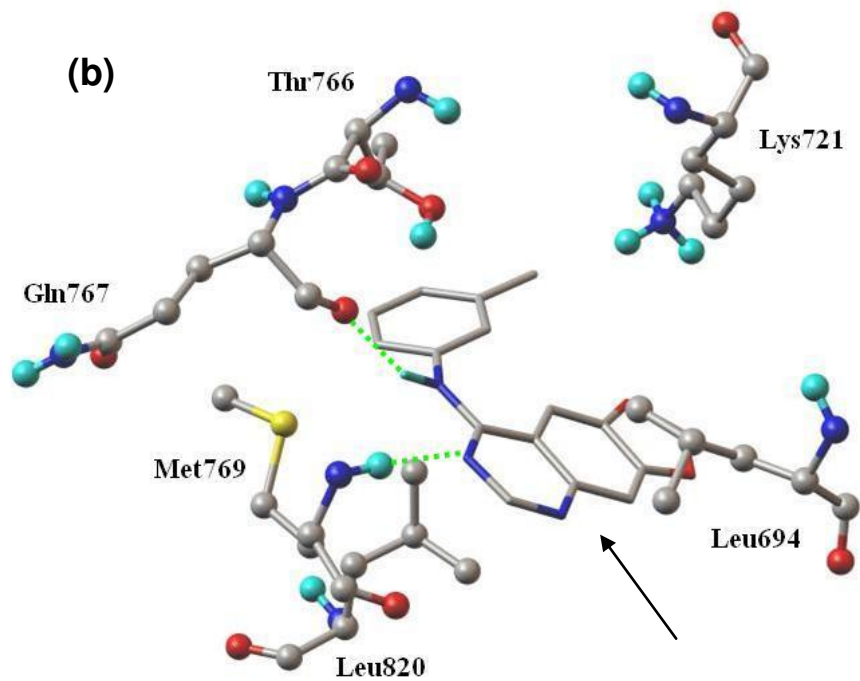


Figura 20b. Composto quinazolínicos com substituinte H

A Figura 21 mostra uma visualização em 3D do EGFR complexado ao composto quinazolínicos com os substituintes CH_3 e H, pois ambos ocupam o mesmo espaço no sítio de ATP.

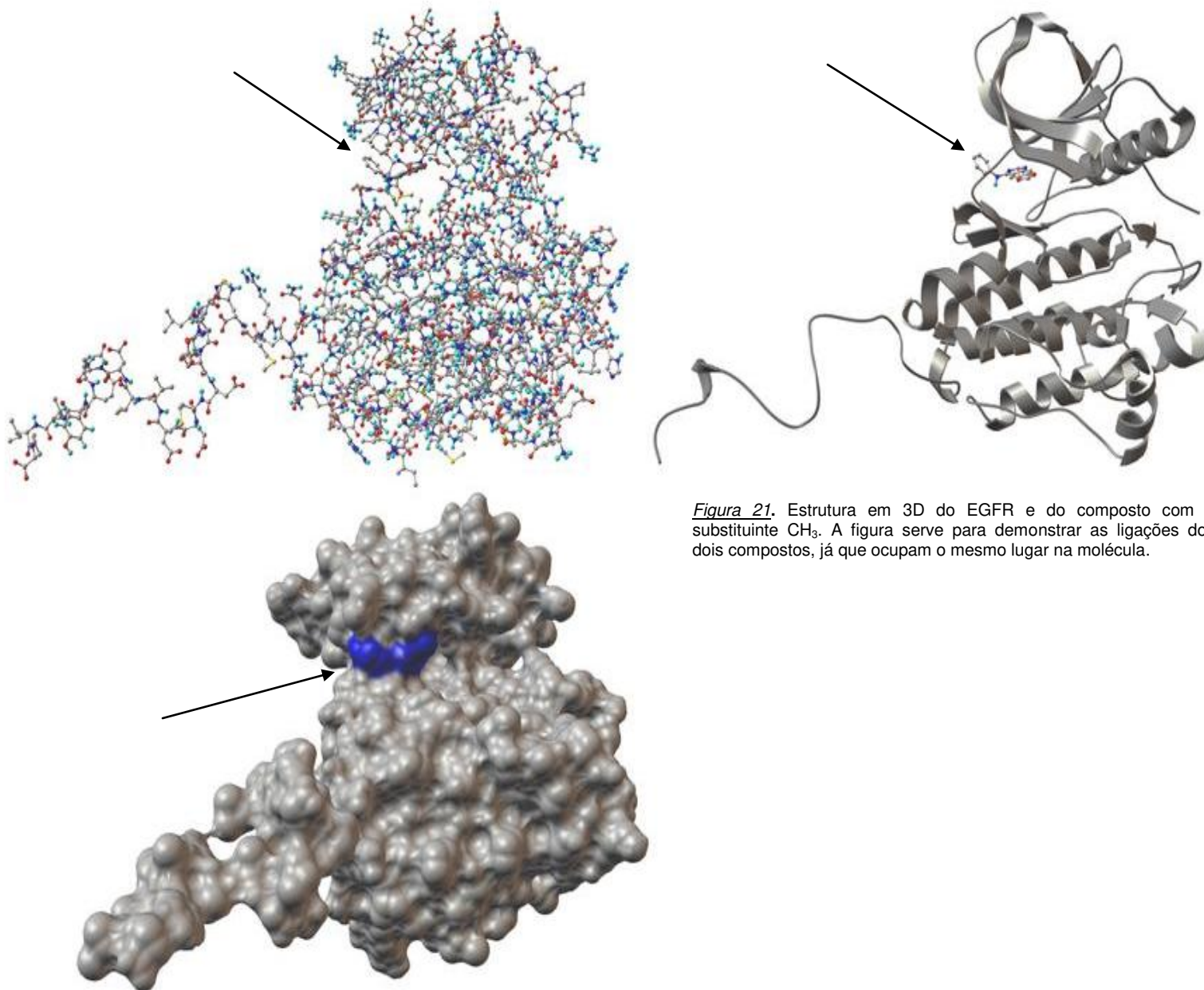


Figura 21. Estrutura em 3D do EGFR e do composto com o substituinte CH_3 . A figura serve para demonstrar as ligações dos dois compostos, já que ocupam o mesmo lugar na molécula.

5.3. Toxicidade *in vivo*.

Para analisar os parâmetros do quadro dos efeitos de toxicidade aguda, abaixo estão alinhados alguns sintomas referentes às drogas em relação ao tempo. Na tabela à seguir podemos observar os resultados dos testes hipocráticos que avaliam os efeitos de toxicidade aguda nos animais testados com os nossos compostos:

Tabela 3. Tabela dos efeitos de toxicidade aguda.

Observações					
Droga	Dosagem (mg/kg)	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora
Controle (Salina)	-	Sem sintomas de toxicidade aguda	Sem sintomas de toxicidade aguda	Sem sintomas de toxicidade aguda	Sem sintomas de toxicidade aguda
N(CH ₃) ₂	100	U; NES; CA.	U; ES; CA.	U; ES; CA.	Desaparecimento gradativo dos sintomas de toxicidade aguda
N(CH ₃) ₂	300	U; NES; CA; RI.	U; NES; CA.	U; ES; CA.	Desaparecimento gradativo dos sintomas de toxicidade aguda
N(CH ₃) ₂	1000	U; CA; St; RI; MA; NES; STM.	St; RI; CA; MA; NES.	U; RI; ES.	Desaparecimento gradativo dos sintomas de toxicidade aguda.
N(CH ₃) ₂	2000	U; CA; MA; St; NES; RI; STM.	CA; MA; St; NES; RI; STM.	U; CA; MA; St; NES; RI; STM.	U; CA; MA; St; NES; RI; STM.
CH ₃	100	U; CA; ES; RI.	U; CA; ES; RI.	U; CA; ES; RI.	Desaparecimento gradativo dos sintomas de toxicidade aguda
CH ₃	300	U; CA; NES; RI.	U; CA; NES; RI.	U; CA; ES.	CA.

Onde:

MA - Marcha anormal; St – *Straub* (cauda contorcida); U – Urinou; CA - Contorção abdominal; RI - Respiração intensa; STM - Sem tônus muscular; ES – Explora superfície e NES - Não explora a superfície.

Os testes hipocráticos são realizados para a determinação de quais concentrações adequadas para realizarmos os testes de DL50 (dose letal para 50% da população de animal estudada). Esses testes de toxicidade *in vivo* foram realizados somente com compostos quinazolínicos com substituintes $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ e CH_3 . Soluções salinas contendo os compostos quinazolínicos nas concentrações 100, 300, 1000 e 2000 mg/kg $[\text{N}(\text{CH}_3)_2]$ e 100 e 300 mg/kg (CH_3) foram administradas aos animais. O composto com o substituinte $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ na maior concentração (2000 mg/kg) produziu todos os sintomas de toxicidade aguda, sem que houvesse desaparecimento dos mesmos, ocorrendo morte do camundongo nas primeiras 24 horas. Para o controle, injetamos apenas salina nos animais.

Inicialmente os animais apresentavam sintomas de toxicidade aguda importantes, mas após 4 horas havia reversão desses sintomas. Devemos dar continuidade a estes testes quando obtivermos uma maior quantidade de amostra dos compostos quinazolínicos.

5.4. Espectrometria de RMN de Hidrogênio (^1H) do HVA.

O sinal observado foi o da razão da área HVA/TMS vs. a concentração de HVA (Tabela 4), levando à curva padrão ($R^2 = 0,9998$) representada pela linha reta obtida no Gráfico 10.

Tabela 4. Preparação das soluções para curva de calibração de HVA¹⁰⁹.

[HVA] (mol/L)	Volume HVA (μL) ^a	Volume D ₂ O (μL)	Volume TMS (μL) ^b	Volume Total (μL)
1.01×10^{-4}	10	240	250	500
5.03×10^{-4}	50	200	250	500
1.01×10^{-3}	100	150	250	500
1.51×10^{-3}	150	100	250	500
2.01×10^{-3}	200	50	250	500

^a Volume usado para obter a concentração final mostrada na primeira coluna;

^b TMS Composto de referência.

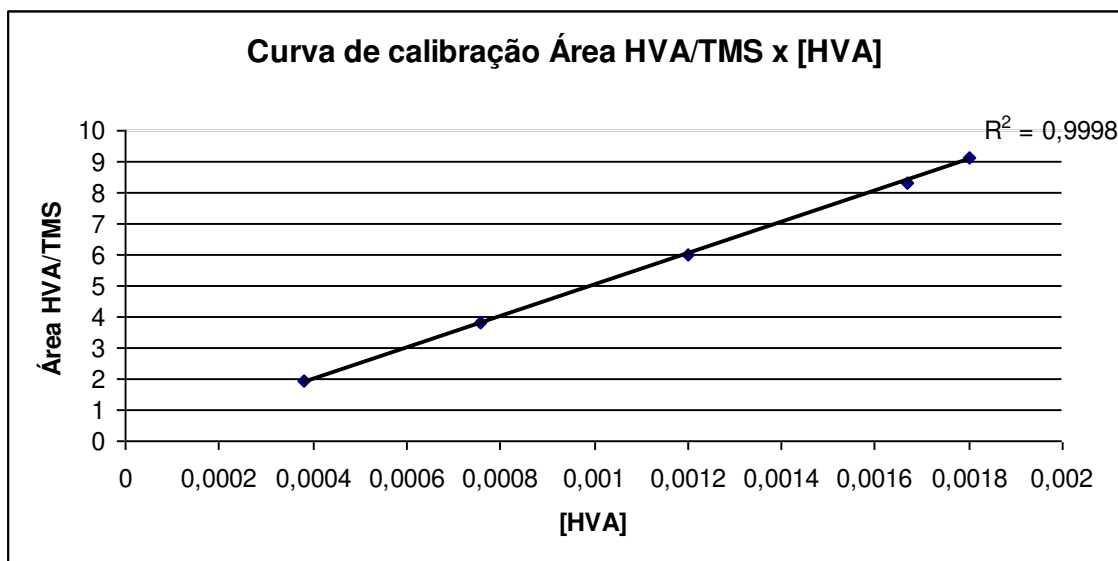


Gráfico 10. Curva de calibração área HVA/TMS x [HVA] à partir de espectros de RNM de Hidrogênio (^1H).

Preparamos uma amostra contendo HVA, diluído em D₂O, adicionado TMS para a realização da curva de calibração. Em uma amostra de urina coletada de um doador humano saudável, foi adicionado HVA para determinação da sua concentração por RMN de ^1H (Figuras 22 e 23).

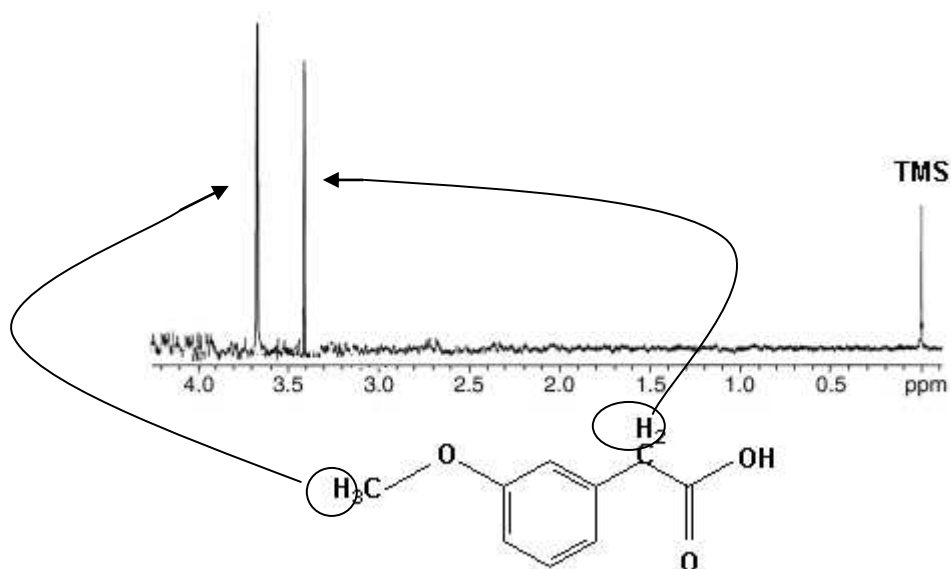


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H do HVA em D_2O .

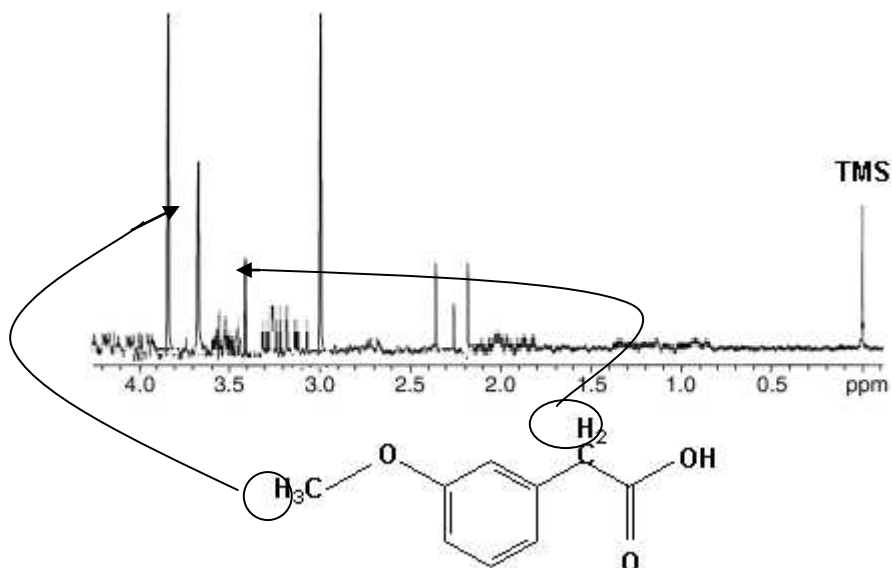


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H de HVA na urina.

Os dois picos de absorção foram observados nas duas amostras, onde os ^1H metilênicos (CH_2) apresentaram um pico de absorção a 3,49 ppm e os ^1H do grupo metila (CH_3) apresentaram um pico de absorção a 3,77 ppm. Não havendo variação no resultado



obtido nas duas amostras, a Espectrometria de RMN de Hidrogênio (^1H) se mostrou eficiente para identificação do HVA.

6. Conclusões

- De acordo com os resultados apresentados para os testes de IC₅₀, pôde-se ver que os substituintes desempenham papel importante para os índices anti-proliferativos *in vitro*, sendo assim, como em outras quinazolininas, a alternância desses substituintes pode caracterizar efeitos biológicos diversos para esses novos compostos;
- O composto Br não apresentou nenhuma seletividade, sendo tóxico para todas as linhagens tumorais, podendo também ser tóxico para células normais do nosso organismo. Mas os compostos CH₃ e H apresentaram significativa seletividade para linhagem tumoral de mama (MCF07). Assim, cada substituinte pode determinar a atividade específica e a função biológica destes compostos. A descoberta do sítio de ação dessas drogas pode constituir novos rumos na terapêutica do tratamento ao câncer de mama;
- Lapatinib é uma droga que além de se destacar pela eficácia contra o câncer da mama, serve como um modelo para a investigação e desenvolvimento de novos compostos inibidores do EGF/HER-2;
- Os resultados dos experimentos com “docking” puderam afirmar que os compostos com os substituintes CH₃ e H podem agir sobre a mesma região alvo onde EGFR é acoplado com drogas conhecidas por seus efeitos anti-tumorais, como o Lapatinib e o Gefitinib, por exemplo;
- Nossas estruturas fornecem a confirmação de muitos estudos teóricos e podem servir como base para o desenho de novos inibidores específicos do EGF da

Tirosina Kinase, contribuindo assim para aumentar o arsenal de medicamentos contra o alvo molecular para o câncer de mama;

- Apesar do composto quinazolínico com o substituinte $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ apresentar maior toxicidade nos experimentos *in vivo* e *in vitro* (células PC12), não se pode afirmar que os mesmos sistemas *in vitro* forneceram dados toxicológicos que foram totalmente equivalentes àqueles derivados de um sistema *in vivo*, da mesma forma que os resultados dos testes com animais não são totalmente representativos de experiência humana à exposição à uma substância tóxica, ainda porque os testes realizados representam ensaios prévios para realização da DL_{50} ¹¹⁴;
- Para dar continuidade nos testes com RMN de ^1H do HVA, necessitamos de uma maior quantidade de amostras de urina para mensurarmos as concentrações de HVA urinário. Essas amostras serão fornecidas por pacientes atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP e que apresentam alguma patologia que altere as concentrações finais de HVA na urina, como por exemplo, neuroblastomas, ganglioneuromas, feocromocitoma etc;
- Para análise do HVA urinário a metodologia mais utilizada nos grandes centros de diagnósticos é o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) que apresenta grande sensibilidade para detecção e quantificação do HVA em urina 24 horas. Assim como o HPLC, a Espectrometria de RMN tem custo elevado e requer conhecimento e manuseio técnico especializado dos aparelhos e interpretação dos resultados;

- A quantificação e identificação de ^1H através de Espectrometria de RMN em amostras de diversos tipos são extremamente importantes para verificação da pureza da mesma, da presença ou não de um determinado composto¹¹⁵;
- As aminoquinazolinas representam avanços significantes nos estudos com câncer de mama, estudos confirmatórios devem ser considerados para promover o uso de terapias anti-EGFR, incluindo segurança e uso clínico. O EGFR tornou-se alvo para drogas, especialmente no câncer. O desenvolvimento de inibidores seletivos do EGF, que podem bloquear ou modular as doenças causadas por anormalidades deste grupo de proteínas é geralmente considerado como uma abordagem promissora para o desenvolvimento de novas drogas.

7. Referências

1. Bayomi AH. Synthesis of 3-Phenyl-4-(3H)-Quinazolinone derivative as privileged templates and for biological screening. Síntesis de derivados de 3-fenil-4-(3H)-quinazolinona como plantillas privilegiadas y para investigación biológica. *Revista de química teórica y aplicada*. 2005;6(517):249-254.
2. Rocco SA. Estudos de Ressonância Magnética Multinuclear de Quinazolininas 4-substituídas [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 1996.
3. Nabih SG. Phosphorus Pentoxide in Organic Synthesis. *Chemical Scripta*. 1986;26:617-621.
4. Ramji Dass OP, *et al.* Anti-Malarials: Quinazoline series-Part I. *J. Sci. Ind. Res.* 1952;11 B: 461.
5. Girgis NS, Moller J, Pedersen EB. New one-step synthesis of 4-aminoquinazolines. Comparison between mass spectra of 4-aminoquinazolines and 6-aminopurines. *Chemica Scripta*. 1986;26:617-621.
6. Thompson AM, Murray DK, Elliott WL, Fry DW, Nelson JA, Showalter HD *et al.* Tyrosine kinase inhibitors. 13. Structure-activity relationships for soluble 7-substituted 4-[(3-bromophenyl)amino]pyrido[4,3-d]pyrimidines designed as inhibitors of the tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1997;24(40).
7. Rewcastle GW, Murray DK, Elliott WL, Fry DW, Howard CT, Nelson JM *et al.* Tyrosine Kinase Inhibitors. 14. Structure-Activity Relationships For Methyl-

- Amino-Substituted Derivates Of 4-[(3-Bromophenyl)Amino]-6-(Methylamino)-Pyrido[3,4-*D*]Pyrimide (Pd 158780), A Potent And Specific Inhibitor Of The Tyrosine Kinase Activity Of Receptors For The Egf Family Of Grow Factors. *Journal Of Medicinal Chemistry*. 1998;5(41).
8. Hou T, Zhu L, Chen L, Xu X. Mapping the Binding Site of a Large Set of Quinazoline Type EGF-R Inhibitors Using Molecular Field Analyses and Molecular Docking Studies. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003;43:273-287.
 9. Freshney RI. Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique. Inglaterra: Wiley and Sons; 2005.
 10. Cabeça LF, Rocco AS, Oliveira PR, Rittner R. Synthesis of new 4-*N*-(Phenylamino)-6,7-methylenedioxyquinazoline derivates. *Trends in Organic Chemistry*. 2008;12:47-52.
 11. Cabeça, LF. Síntese e Caracterização de Novas Quinazolinias Polisubstituídas [Tese - Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
 12. Verweij J, de Longe MJ. Achievments and future of chemotherapy. *Eur J Cancer*. 2000;36:1479-1487.
 13. Nygren P. What is cancer chemotherapy? *Acta Oncol*. 2001;40:166-174.
 14. Novotny L, Szekers T. Cancer therapy: new targets for chemotherapy. *Hematology* 2003;8:129-137.
 15. Kanavos P. The rising burden of cancer in the developing world. *Ann Oncol*. 17 Suppl 8:viii15-viii23, 2006.

16. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007. 83p. (Ministério da Saúde).
17. Rosberg B, Vancamp L, Krigas T. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*. 1965;205:698-699.
18. Cleare MJ, Malerbi BW, Watkins DM. Anti-tumor platinum complexes: relationships between chemical properties and activity. *Biochemie*. 1978;60:835-850.
19. Wilkinson RCP, Jones M, Harrap KR. Selection of potential second generation platinum compounds. *Biochemie* 1978;60:851-857.
20. Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*. 1999;17:409-422.
21. Rozenzweig M, Von Hoff DD, Slavik M, Muggia FM. Cis-diamminedichloroplatinum (II). A new anticancer drug. *Ann Intern Med* 1977;86(6):803-12.
22. Prestayko AW, D'Aoust JC, Issell BF, Crooke ST. Cisplatin (cis diamminedichloroplatinum II). *Cancer Treat Rev*. 1979;6(1):17-39.
23. Loehrer PJ, Einhorn LH. Drugs five years later. Cisplatin. *Ann Intern Med*. 1984;100(5):704-13.
24. Burgess WA, Choo HS, Elgenbrot C, Ferguson KM, Garret TPJ, Leahy DJ *et al*. An open-and-shut case? Recent Insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Molecular Cell*. 2003;12:541-552.

25. Cohen S, Carpenter G, King L Jr. Epidermal Growth Factor Binding and Receptor Distribution in Psoriasis. *J. Biol. Chem.* 1980;255,4834- 4842.
26. Yarden Y, Schlessinger J. Self-phosphorylation of epidermal growth factor receptor: evidence for a model of intermolecular allosteric activation. *Biochemistry.* 1987;26:1434-1442.
27. Halaban R. Growth factors and tyrosine protein kinases in normal and malignant melanocytes. *Cancer Met. Rev.* 1991;10,129-140.
28. Cobleigh MA, Vogel CL., Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L *et al.* Multinational Study of the Efficacy and Safety of Humanized Anti-HER2 Monoclonal Antibody in Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy for Metastatic Disease. *J Clin Oncol.* 1999;17:2639-2648.
29. Bilancia G, Rosati A, Dinota D, Germano R, Manzione L. Lapatinib in breast cancer. *Annals of Oncology 18 (Supplement 6): 26–v0, 2007.*
30. Subramanian A, Mokbel K. The role of Herceptin in early breast cancer. *International Seminars in Surgical Oncology.* 2008;5:9.
31. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J *et al.* Expression of p95HER2, a Truncated Form of the HER2 Receptor, and Response to Anti - HER2 Therapies in Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:628 – 38.
32. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova S, Zhao H *et al.* Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nature Medicine* 2008;14(5):518-27.

33. Tao W, Wang C, Han R, Jiang H. HER2 codon 655 polymorphism and breast cancer risk: a meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;114(2):371-6.
34. Carter P, Presta L, Gormant CM, Ridgway JBB, Hennert D, Wongt WLT *et al.* Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89:4285-4289.
35. Héry C, Ferlay J, Boniol M, Autier P. Quantification of changes in breast cancer incidence and mortality since 1990 in 35 countries with Caucasian-majority populations. *Annals of Oncology.* 2008;19(6):1187-94.
36. Nadler Y, Camp RL, Giltane JM, Moede C, Rimm DL, Kluger HM *et al.* Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast Cancer. *Breast Cancer Research.* 2008;10:R35.
37. Gonçalves ATC, Jobim PFC, Costa F, Vanacor R, Nunes LN, Albuquerque LM *et al.* Câncer de mama: mortalidade crescente na região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. *Cadernos de Saúde Pública.* 2007;23.
38. Kellen E, Greet V, Christiaens RM, Patrick N, Limbergen EV. Lifestyle changes and breast cancer prognosis: a review. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;114(1):13-22.
39. Welsh M L, Buist DSM, Bowles EJA, Anderson ML, Elmore JG, Li CI. Population-based estimates of the relation between breast cancer risk, tumor subtype, and family history. *Breast Cancer Res Treat.* 2008;114(3):549-58.
40. Massod S, Bui MM. Prognostic and Predictive Value of HER2/neu Oncogene in Breast Cancer. *Microscopy Research and Technique.* 2002;59:102-108.

41. Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of Disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2006;3(5):269-280.
42. Grewal J, Kesari S. Breast cancer surface receptors predict risk for developing brain metastasis and subsequent prognosis. *Breast Cancer Research*. 2008;10:104.
43. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF *et al*. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100:672–679.
44. Lottner C, Schwarz S, Diermeier S, Hartmann A, Knuchel R, Hofstaedter *et al*. Simultaneous detection of HER2/neu gene amplification and protein overexpression in paraffin-embedded breast cancer. *J Pathol*. 2005;205:577–584.
45. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A *et al*. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against Her2 for metastatic breast cancer that overexpressing Her2. *N Engl J Med*. 2001;344:11.
46. Jensen MR, Schoepfer J, Radimerski T, Massey A, Guy CT, Brueggen J *et al*. NVP-AUY922: a small molecule HSP90 inhibitor with potent antitumor activity in preclinical breast cancer models. *Breast Cancer Research*. 2008;10:R33.
47. Hynes NE, Lane HA. Erbb receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nature Reviews Cancer*. 2005;5:34.
48. Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T *et al*. Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2006;355:2733-43.

49. De Laurentiis M, Canello G, Zinno L, Montagna E, Malorni L, Esposito A *et al.* Targeting HER2 as a therapeutic strategy for breast cancer: a paradigmatic shift of drug development in oncology. *Annals of Oncology Suppl 4*:iv7-13, 2005.
50. Ruiz M, Salvador J, Bayo J, Lomas M, Moreno A, Valero M *et al.* Phase-II study of weekly schedule of trastuzumab, paclitaxel, and carboplatin followed by a week off every 28 days for HER2+ metastatic breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008;62(6):1085-90.
51. Shoemaker RH. The NCI60 Human Tumour Cell Line anticancer Drug Screen. *Nature Reviews | Cancer.* 2006;6:813-826.
52. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D *et al.* New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J Natl Cancer Inst.* 1990;82(13):1107-12.
53. Monks A, Scudiero D, Skehan D, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, *et al.* Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumour Cells Lines. *Journal of the National Cancer Institute.* 1991;83(11):757-766.
54. Zahnd C, Pecorari F, Straumann N, Wyler E, Pluckthun A. Selection and Characterization of Her2 Binding-designed Ankyrin Repeat Proteins. *The Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(46):35167–35175.
55. Kitchen DB, Decornez H, Furr R, Bajorath J. Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature Reviews | Drug Discovery.* 2004;3:935-949.
56. Lengauer T, Rarey MA. Computational methods for biomolecular docking. *Current Opinion in Structural Biology.* 1996;6:402-406.

57. Schneider TR. A genetic algorithm for the identification of conformationally invariant regions in protein molecules. *Acta Cryst.* 2002;58(D):196–298.
58. Johnson LN. Protein kinase inhibitors: contributions from structure to clinical compounds. *Quarterly Reviews of Biophysics.* 2009;42(1):1–40.
59. Cai W, Shao X, Maigret B. Protein–ligand recognition using spherical harmonic molecular surfaces: towards a fast and efficient filter for large virtual throughput screening. *Journal of Molecular Graphics and Modelling.* 2002;20:313–328.
60. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK *et al.* *J. Comput. Chem.* 1998;19:1639-1662.
61. Chen YZ, Zhi DG. Ligand–Protein Inverse Docking and Its Potential Use in the Computer Search of Protein Targets of a Small Molecule. *PROTEINS: Structure, Function, and Genetics.* 2001;43:217–226.
62. Gilman AG, Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman – As bases farmacológicas da terapêutica. Editora Saúde; 1996. 165p. v.10.
63. Tomita H, Nakazawa T, Sugano E, Abe T, Tamai M. Nipradilol inhibits apoptosis by preventing the activation of caspase-3 via S-nitrosylation and the cGMP-dependent pathway. *European Journal of Pharmacology.* 2002;452:63–268.
64. Kim Y, Park MK, Uhm DY, Shin J, Chung S. Modulation of delayed rectifier potassium channels by α 1-adrenergic activation via protein kinase C and p62 in PC12 cells. *Neuroscience Letters.* 2005;387,43–48.
65. Williams NG, Zhong H, Mineeman KP. Differential Coupling of α_1 -, α_2 -, and β -Adrenergic Receptors to Mitogen-activated Protein Kinase Pathways and Differentiation in Transfected PC12 Cells. *J Biol Chem.* 1998;273(38):24624-24632.

66. Greene LA, Tischler AS. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci* 1976;73(7):2424-8.
67. Wood KW, Roberts TM. Oncogenes and protein kinases in neuronal growth-factor action. *Biochim Biophys Acta*. 1993;1155(2):133-50.
68. Oga S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo: Atheneu; 1996. 61p.
69. Meyer O. Testing and Assessment Strategies, Including Alternative and New Approaches. *Toxicology Letters*. 2003;140-141:21-30.
70. Stark DM, Shopsis C, Borenfreund E, Babich H. Progress and Problems in Evaluating and Validating Alternative Assays in Toxicology. *Food Chem Toxicol*. 1986;24(6-7):449-55.
71. Roguet R, Cotovio J, Gaetani Q, Dossou KG, Rougier A. Citotoxicity of 28 MEIC Chemicals to Rat Hepatocytes Using Two Viability Endpoints: Correlation With Toxicity Data in Rat and Man. *Atla*. 1993;21(2):216-224.
72. Gulden M, Seibert H. *In Vitro-In Vivo* Extrapolation: Estimation of Human Serum Concentrations of Chemicals Equivalent to Cytotoxic Concentrations *In Vitro*. *Toxicology*. 2003; 189(3):211-22.
73. Goodman, AG. Goodman & Gilman - As Bases Farmacológicas da Terapêutica. São Paulo: Guanabara Koogan; 1983. vol.11.
74. Einsenhofer G, Kopin JJ, Goldstein DS. Catecholamine Metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacol Rev*. 2004;56:33-349.

75. Champe PC, Horway RA. Bioquímica ilustrada. São Paulo: Artemid; 1996.
76. Voet D, Voet JG. Biochemistry. Canada: John Miley & Sons Inc; 1995. 12682p.
77. Delvin TM. Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas. São Paulo: Edgard Bruchon LTDA; 1998. 778p.
78. Rang HP, Dole MM, Ritter JM. Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 119-23p.
79. Taran F, Frobert Y, Créminon C, Grassi J, Olichon D, Mioskowski C *et al.* Competitive enzyme immunoassay with monoclonal antibody for homovanillic acid measurement in human urine samples. *Clin Chem.* 1997;43(2):363-8.
80. Bowman WC. Textbook of Pharmacology. London: Blackwell Scientific Publications; 1980.
81. Halperin EC. Pediatric radiation oncology. *Invest Radiol.* 1986;21(5):429-36.
82. Nishihira H, Toyoda Y, Tanaka Y, Ijiri R, Aida N, Takeuchi M *et al.* Natural course of neuroblastoma detected by mass screening: 5-year prospective study at a single institution. *J Clin Oncol.* 2000;18(16):3012-7.
83. Schilling FH, Berthold F, Erttmann R, Michaelis J, Spix C, Sander J *et al.* Population-based and controlled study to evaluate neuroblastoma screening at one year of age in Germany: interim results. *Med Pediatr Oncol.* 2000;35(6):701-4.
84. Warren S, Chute RN. Pheochromocytoma. *Cancer.* 1972;29:327-31.

85. Gerlo EAM, Sevens C. Urinary and Plasma Catecholamines and Urinary Catecholamines Metabolites in Pheochromocytoma: Diagnostic Value in 19 Cases. *Clinical Chemistry*. 1994;40(2).
86. Murray RK, Granmer DK, Mayes PA, Rodwell VW. Bioquímica. São Paulo: Atheneu. 563p.
87. Silverstein RM, Bassler GC, Morrill TC. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Rio de Janeiro: Guanabara S.A.; 1987; 141-172p.
88. Bovey FA, Jelinski L, Mirau PA. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Academic Press*. 1988;2.
89. Pavia DL, Lampman GM, Kriz GS. Introduction to Spectroscopy. A guide for Students of Organic Chemistry. Orlando: Saunders 1996;2.
90. Hesse M, Meier H, Zeeh B. Spectroscopy Methods in Organic Chemistry. Nova Iorque: Thieme. 1997.
91. Zhong H, Minneman P. Differential activation of mitogen-activated protein kinase pathways in PC12 cells by closely related α_1 -adrenergic receptor subtypes. *J. Neurochem*. 1999;72:2388-2396.
92. Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR *et al*. Gaussian 03, revision B.04. Pittsburgh: Gaussian Inc. 2003.
93. Becke ADJ. Density-functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *Chem. Phys*. 1993;98:5648.
94. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density *Phys. Rev*. 1998;B37:785.

95. Raghavachari K, Binkley JS, Seeger R, Pople JA. Self-consistent molecular orbital methods. XX. A basis set for correlated wave functions. *J. Chem. Phys.* 1980;72:650-54.
96. Morris RJ, Najmanovich RJ, Kahraman A, Thornton JM. Real spherical harmonic expansion coefficients as 3D shape descriptors for protein binding pocket and ligand comparisons. *Bioinformatics.* 2005;21(10):2347-2355.
97. Mashhadi HR, Shanechi HM, Lucas C. A new genetic algorithm with Lamarckian individual learning for generation scheduling. *IEEE Trans. Power Syst.* 2003;18:1181-1186.
98. Mirandola SR. Efeito da imunoterapia com Interferon Beta na produção de citocinas em pacientes com Esclerose Múltipla [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
99. Segal EM. Determinação da toxicidade de novos Organofosforados através de estudo *in vivo* e *in vitro* e suas propriedades físico-químicas. [Tese – Mestrado]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2005.
100. Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1(3):1112-6.
101. Malone MH, Robichaud RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia.* 1962;25:320-332.
102. Organisation for Economic Co-Operation and Development. OECD Series on Testing and Assessment N° 20. Guidance Document for Neurotoxicity Testing. Paris: OECD; 2004. 31p. (OECD Environment, Health and Safety Publications).

103. Stamos J, Sliwkowski MX, Eingenbrot CJ. Structure of the epidermal growth factor receptor kinase domain alone and in complex with a 4-anilinoquinazoline inhibitor. *Biol. Chem.* 2002;277:46265-46272.
104. Guex N, Peitsch MC. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 1997;18:2714.
105. Palmer BD, Trumppkallmeyer S, Fry DW, Nelson JM, Showalter HDH, Denny WAJ. Soluble analogues of pyrrolo- and pyrazoloquinazolines as epidermal growth factor receptor inhibitors: synthesis, biological evaluation, modeling of the mode of binding *Med. Chem.* 1997;40:1519-1529.
106. Garcia-Echeverria C, Traxler P, Evans DB. ATP site-directed competitive and irreversible inhibitors of protein kinases. *Med. Res. Rev.* 2000;20:28-57.
107. Wissner A, Berger, DM, Boschelli, DH, Floyd MB, Greenberger LM, Gruber BC *et al.* 4-Anilino-6,7-dialkoxyquinoline-3-carbonitrile inhibitors 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.
108. Bridges AJ. Chemical Inhibitors of Protein Kinases. *Chem. Rev.* 2001;101:2541-2571.
109. Pinheiro GM, Basso EA, Fiorin BC, Cendes F, Rittner R, Oliveira AN *et al.* A fast ¹H NMR spectroscopy procedure for quantitative determination of N-acetylaspartate in urine samples. *Clin Chim Acta.* 2009;404(2):166-8.
110. Brito AS. Manual de ensaios toxicológicos *in vivo*. Campinas: Editora da UNICAMP; 1994. 15-30pp.

111. Burtis CA, Ashwood ER. Tietz Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1994, 1570-73pp.
112. Kwok L. Localized M R Spectroscopy. Basic principles. *Neuroimaging Clin N AM*. 1998;713-31.
113. McLean AD, Chandler GSJ. Contracted Gaussian basis sets for molecular calculations. I. Second row atoms, Z = 11-18. *Chem. Phys*. 1980;72:5639-48.
114. Segal EM, Castilho RF, Höhr NF, Olivato AR, Carvalho CRO, Reis AKCA *et al*. New organophosphorus compounds: cholinesterases inhibition, cytotoxicity and lethal dose. *Clinica Chimica Acta*. 2008;389:177-180.
115. Segal EM, Tormena CF, Oliveira PR, Rittner R, Tinoco LW, Villar JDF, Höhr NF. Solvent Effects in the 2JHH, 3JHH, 1JNC and 2JNC Coupling Constants in the NMR spectrum of Acetylcholine Chloride. *Journal of Molecular Structure*. 2006;797:44-48.

7.1. Bibliografia.

1. American Type Culture and Collection

Disponível em:

<http://www.atcc.org>

2. Leiras D. *Tykerb* remédio contra câncer de mama em estágio avançado já pode ser vendido no Brasil. O Globo, 20 fev. 2008.

Disponível em:

http://oglobo.globo.com/vivermelhor/mulher/mat/2008/02/20/tykerb_remedio_contra_cancer_de_mama_em_estagio_avancado_ja_pode_ser_vendido_no_brasil-425747737.asp



3. *The Globally Harmonized System for Hazard Classification and Labelling* da organização UNECE (United Nations Economic Commission for Europe)

Disponível em:

<http://www.unece.org>



A2.17 Acute toxicity (See Chapter 3.1 for details)

Hazard category	Criteria	Hazard communication elements	
1	$LD_{50} \leq 5$ mg/kg bodyweight (oral) $LD_{50} \leq 50$ mg/kg bodyweight (skin/dermal) $LC_{50} \leq 100$ ppm (gas) $LC_{50} \leq 0.5$ (mg/l) (vapour) $LC_{50} \leq 0.05$ (mg/l) (dust, mist)	Symbol	
		Signal word	Danger
		Hazard statement	Fatal if swallowed. (oral) Fatal in contact with skin (dermal) Fatal if inhaled (gas, vapour, dust, mist)
2	LD_{50} between 5 and less than 50 mg/kg bodyweight (oral) LD_{50} between 50 and less than 200 mg/kg bodyweight (skin/dermal) LC_{50} between 100 and less than 500 ppm (gas) LC_{50} between 0.5 and less than 2.0 (mg/l) (vapour) LC_{50} between 0.05 and less than 0.5 (mg/l) (dust, mist)	Symbol	
		Signal word	Danger
		Hazard Statement	Fatal if swallowed. (oral) Fatal in contact with skin (dermal) Fatal if inhaled (gas, vapour, dust, mist)
3	LD_{50} between 50 and less than 300 mg/kg bodyweight (oral) LD_{50} between 200 and less than 1000 mg/kg bodyweight (skin/dermal) LC_{50} between 500 and less than 2500 ppm (gas) LC_{50} between 2.0 and less than 10.0 (mg/l) (vapour) LC_{50} between 0.5 and less than 1.0 (mg/l) (dust, mist)	Symbol	
		Signal word	Danger
		Hazard statement	Toxic if swallowed. (oral) Toxic in contact with skin (dermal) Toxic if inhaled (gas, vapour, dust, mist)

Continued on next page

Hazard category (cont'd)	Criteria	Hazard communication elements	
4	LD₅₀ between 300 and less than 2000 mg/kg bodyweight (oral) LD₅₀ between 1000 and less than 2000 mg/kg bodyweight (skin/dermal) LC₅₀ between 2500 and less than 5000 ppm (gas) LC₅₀ between 10.0 and less than 20.0 (mg/l) (vapour) LC₅₀ between 1.0 and less than 5.0 (mg/l) (dust, mist)	Symbol	
		Signal word	Warning
		Hazard statement	Harmful if swallowed (oral) Harmful in contact with skin (dermal) Harmful if inhaled (gas, vapour, dust, mist)
5	LD₅₀ between 2000 and 5000 (oral or skin/dermal) For gases, vapours, dusts, mists, LC₅₀ in the equivalent range of the oral and dermal LD₅₀ (i.e., between 2000 and 5000 mg/kg bodyweight). See also the additional criteria: • Indication of significant effect in humans • Any mortality at Category 4 • Significant clinical signs at Category 4 • Indication from other studies.	Symbol	<i>No symbol</i>
		Signal word	Warning
		Hazard statement	May be harmful if swallowed (oral) May be harmful in contact with skin (dermal) May be harmful if inhaled (gas, vapour, dust, mist)

New Substituted Arylquinazolines as potent inhibitors of breast tumor cell lines: *In vitro* and Docking Experiments

André N. de Oliveira, Cleverson C. Bocca, João E. Carvalho, Ana Ruiz Góis, Thiago P. Silva, Roberto Rittner, Nelci F. Hoehr.

ABSTRACT

The arylquinazoline represents significant advances in the clinical management of breast cancer, confirmatory studies must be considered to foster the use of anti-EGFR therapies including safety and clinical use. The Epidermal growth factor receptor have become prime targets for drug intervention in the diseased state, especially in cancer. The development of selective protein kinase inhibitors that can block or modulate diseases caused by abnormalities in these signaling pathways is widely considered a promising approach for drug development.

A series of 4-phenylamino quinazolines derivatives was synthesized as potent kinase inhibitors and its cytotoxicity show potent growth inhibitory activity in breast tumor cell lines (MCF07).

INTRODUCTION

The epidermal growth factor receptor (EGFR) is a 170 000-dalton membrane glycoprotein composed of an extracellular domain, an intermembrane region, and an intracellular domain that presents protein tyrosine kinase activity¹. The binding of EGF to its receptor (EGFR) activates a cascade in which several proteins are phosphorylated, where to from there occur the processes of regulation, maintenance and cell survival^{2,3}.

The EGFR is directly related to regulatory processes of cellular proliferation²⁻⁷. Subclasses of the EGFR tyrosine kinase consisting of four members: EGFR/Her1, HER-2, HER-3 and HER-4⁸. All members have a binding site of the extracellular region, the region between membranes and in the cytoplasmic domain of tyrosine kinase.

Currently many genes are directly related to the appearance of cancer⁹, among them HER-2, also known as erbB2, is the gene of the EGFR tyrosine kinase located on chromosome 17, encodes a membrane glycoprotein of 185 KD (p185Her2) and its receptors are expressed in several epithelial tissues, mesenchymal and neural^{5,7,10} which has been widely studied as a molecular target^{11,12} chosen in therapy against cancer, particularly breast cancer, which is widely considered one of the most frequent, reaching in 2002 as the most prevalent in the world is also the most frequent among women^{13,14} (23 to 25% of all malignancies)¹⁵. As well as family history¹⁶ most of the risk factors described in the literature is related to the life of the woman and her exposure to estrogen: early menarche and late menopause, high total numbers of menstrual cycles and use of estrogen-progesterone¹⁵. Overexpression of these EGFR was found in a number of cancers (e.g., breast), their expression levels often correlate with vascularity, and is associated with poor prognosis in patients.^{17,18} Currently, there are several compounds used in molecular targets for anticancer therapies Her2 positive and that attract by their clinical efficacy¹⁹. Several class of specific inhibitors of tyrosine kinase has been widely studied²⁰⁻²² successfully against molecular targets to combat cancer which highlight the some quinazolines (e.g. 4-Anilinoquinazolines)¹⁸. Our experience with several biologically active compounds (e.g. adenosine kinase inhibitors) has led to synthesize a novel of 4-phenylamino quinazolines derivatives²³ (Figure 1).

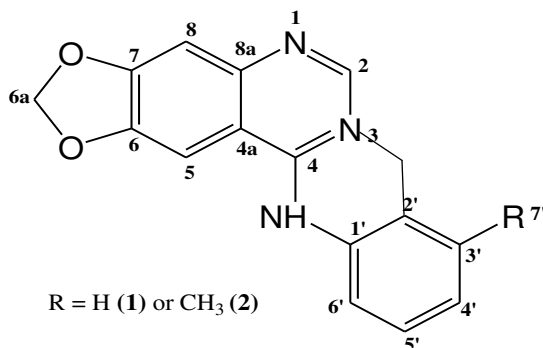


Figure 1. Chemical structures of the 4-phenylamino quinazolines containing key atom numbering.

Materials and methods

Cell culture and maintenance

For this experiment, we used the Sulforhodamine B (SRB) stain assay, a classic methodology for *in vitro* inhibition testing and tracking of new drugs against cancer^{24,25}.

4-phenylamino quinazolines derivatives (substituents CH₃ and H) were synthesized at the Institute of Chemistry, State University of Campinas (IQ-UNICAMP) and tested using 9 human tumor cell lines (Figure 1): melanoma (UACC), breast (MCF07), drug-resistant ovarian (NCIADR), renal cell carcinoma (786O), lungs (NCI460), prostate (PCO3), ovarian (OVICAR3), colon (HT29) and leukemia (K562)²⁶ where cells were plated in 96-multiwell microtiter plate (10⁴ cells/well) for 24 h in RPMI-1640 medium, supplemented with 5% fetal bovine serum before treatment with the compounds to allow attachment of cell to the wall of the plate.

In vitro Inhibition

Test compounds were dissolved in DMSO and diluted with saline to the appropriate volume. Different concentrations of the compound under test (0.25 to 250 µg/ml) were added to the cell monolayer. Triplicate wells were prepared for each individual dose. Cells were incubated with the compound for 48 h at 37 °C and in atmosphere of 5% CO₂. After 48 h, cells were fixed, washed, and stained at room temperature for 30 min with 0.4% (wt/vol) with SRB dissolved in 1% acetic acid. Unbound dye was removed by five washes with 1% acetic acid, and attached stain was recovered with Tris-EDTA buffer solution. Color intensity was measured in an ELISA plates reader at 515 nm. The relation between surviving and drug concentration is plotted to get the survival curve for human tumor cell lines. The concentration required for 50% Growth Inhibition of cell viability (GI₅₀) was calculated and the inhibition curve for Doxorubicine compound (used as a reference compound), CH₃ and H are given in Figures 2, 3 and 4, respectively.

All chemicals and solvents were purchased from Sigma–Aldrich™.

Ligand Modeling

The molecular modeling calculations were performed with the GAUSSIAN 03 package²⁷. The stable geometries of (1) and (2) quinazolines were obtained by calculating the potential energy surface (PES) through HF/3-21G level of theory. Then the most stable geometries were optimized by density functional theory (DFT) calculations with the B3LYP hybrid functional, which consists of the nonlocal exchange functional of Becke's three-parameter set²⁸ and de nonlocal correlation functional of Lee *et al.*, (1998)²⁹. The 6-311G(d,p) Pople's basis set^{30,31} was used to carry out these calculations. Stationary points were fully optimized and characterized by vibrational frequency calculations, which also provided zero-point vibrational energies (ZPE).

Docking

Docking experiments were performed using Autodock 4.0.³². The search method used was a Lamarckian Genetic Algorithm (LGA) with 100 LGA runs³³. The number of individuals in each population was 50. The maximum number of energy evaluations was set at 1,0 M. Other parameters were left to their respective default values.

During this searching process, the ligands (*e.g.* substrates) and the Phe699, Lys721 and Met769 enzyme residues were regarded as flexibles. The grid box was settled at the center of the flexible residues and the box size was normally set at 100, 100, and 100 Å (x, y, and z) at resolution of 0.281 Å.

Result and Discussions:

Anti-proliferative *in vitro* test

Besides the *in vitro* testing for GI50 (SRB), all cell lines in this study are suggested by the NCI (The U.S. National Cancer Institute) for testing anti-proliferative *in vitro*²⁴.

- Melanoma (UACC-62)
- Breast (MCF07)
- ▲ Drug-resistan ovarian (NCIADR)
- ▼ Renal cell carcinoma(7860)
- ◆ Lungs (NCI460)
- ◆ Prostate (PC03)
- ▼ Ovarian (OVCAR3)
- Colon (HT29)
- ★ Leukemia (K562)

Tested cells for *in vitro* inhibition

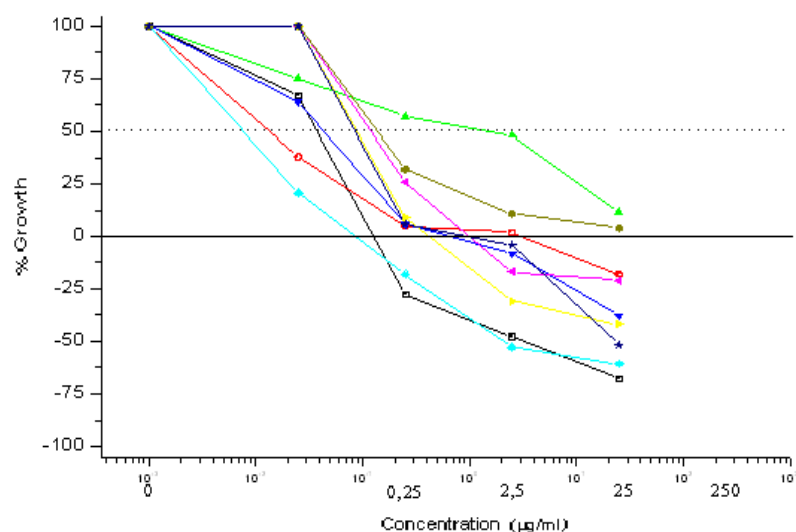


Figure 2. GI50 of human tumor lines exposed to doxorubicin (reference compound).

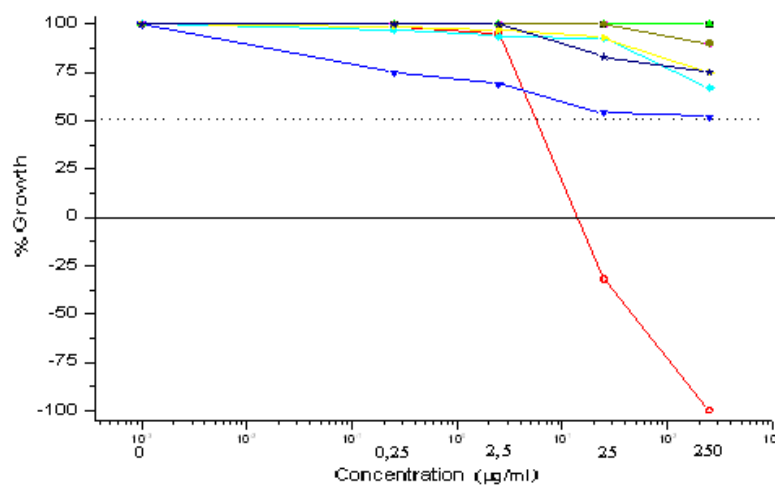


Figure 3. GI50 of human tumor lines exposed to the compound with substituent CH_3 .

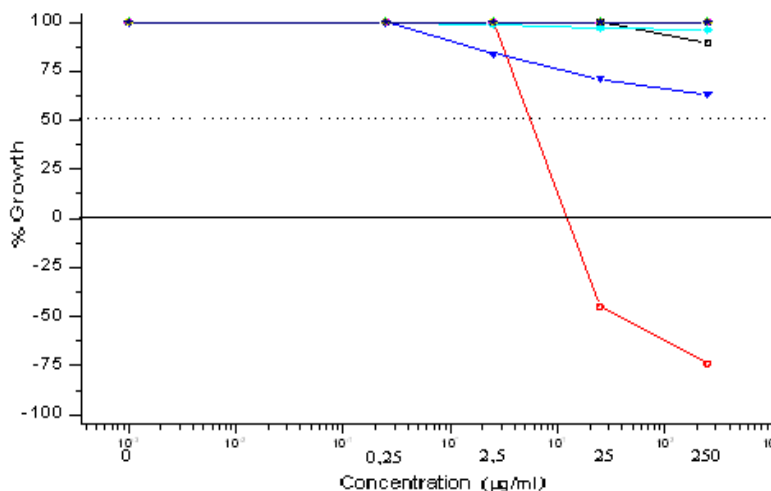


Figure 4. GI50 of human tumor lines exposed to the compound with substituent H.

The obtained data showed that Doxorubicine presented cytotoxicity to all cell lines (Figure 2). Doxorubicin is used with chemotherapy to treat cancer and is associated with adverse effects, not only is toxic to tumor cells, but also toxic to some normal cells in our body. While other compounds (CH_3 and H derivatives) were specific for breast cancer at low concentrations ($\pm 25 \mu\text{g/ml}$) (Figures 3 and 4).

Docking

For the docking experiments the EGFRK/erlotinib complex at 2.60 Å of resolution³⁴, was taken as starting model (PDB code: 1m17). The [6,7-bis(2-methoxy-ethoxy)quinazoline-4-yl]-(3-ethynylphenyl)amine (erlotinib) molecule were removed from the complex and the truncated residues were properly completed. Hydrogen atoms were added to the protein amino acids and the partial atomic charges were assigned using the Gasteigere-Marsili formalism while all possible ratable bonds of the ligands and Kollman charges for all atoms in EGFRK were assigned by using the AutoDock Tools. The protein was submitted a minimization procedure by using 500 steps of steepest descent's protocol. These procedures were carried out by using the GROMOS96 parameters set implemented in the Swiss-PdbViewer version 4.0.1 program³⁵.

Previous studies have indicated that 4-anilinoquinazolines cause inhibition through binding to the site occupied by ATP during phosphotransfer.³⁶⁻⁴⁰ The binding of ATP itself involves two important hydrogen bonding interactions between the purine base of ATP and the protein backbone between amino acids Gln767 and Met769. The 4-phenylamino quinazolines derivatives were positioned in the erlotinib site in accordance with the published crystal structure³⁴. The entire complex was then subjected to cycles of minimization (GROMOS96 parameter sets).

The Figure 5 depicts a stereoview of (1) and (2) compounds in ATP binding site into EGRFK protein. According to docking studies the (1) quinazoline (Figure 5a) binds to a narrow hydrophobic pocket in the N-terminal domain of EGRFK where N3 of the quinazoline ring interacts with the backbone NH of Met769 via hydrogen bond (2.2 Å). The close contact of the phenyl group and quinazoline ring with Leu694 residue (3.4 Å and 3.6 Å, respectively) suggests a hydrophobic interaction. These interactions stabilize the compound into EGFRK active site contributing to a favorable binding energy (-12.9 kcal/mol). For the (2) quinazoline an additional hydrogen bond between NH from phenylamino group and Gln767 (1.9 Å) was observed (Figure 2b) and the hydrogen bond between N3 and Met769 decrease to 1.9 Å compared with (1). The energy

observed to (2) was close to (1), -13.7 kcal/mol. The Figure 6 depicts a 3D view of EGRFK protein complexed with (1) quinazoline, the (2) quinazoline occupies the same space.

The results of the docking experiments could support the postulation that (1) and (2) quinazolines may act on the same enzyme target where EGRFK inhibitor acts quinazoline ring position in the active site remained almost the same for the two compounds, except by a 180° spin x axis in (2) which provides the phenylamino ring against Leu769 residue, probably to minimize the repulsive interaction between methyl group in *meta* position and *iso*-buthyl group present in the residue. The binding energy observed to (2) was close to (1), -13.7 kcal/mol. The Figure 3 depicts a 3D view of EGRFK protein complexed with (1) quinazoline, the (2) quinazoline occupies the same space.

The results of the docking experiments could support the postulation that (1) and (2) quinazolines may act on the same enzyme target where EGRFK inhibitor acts.

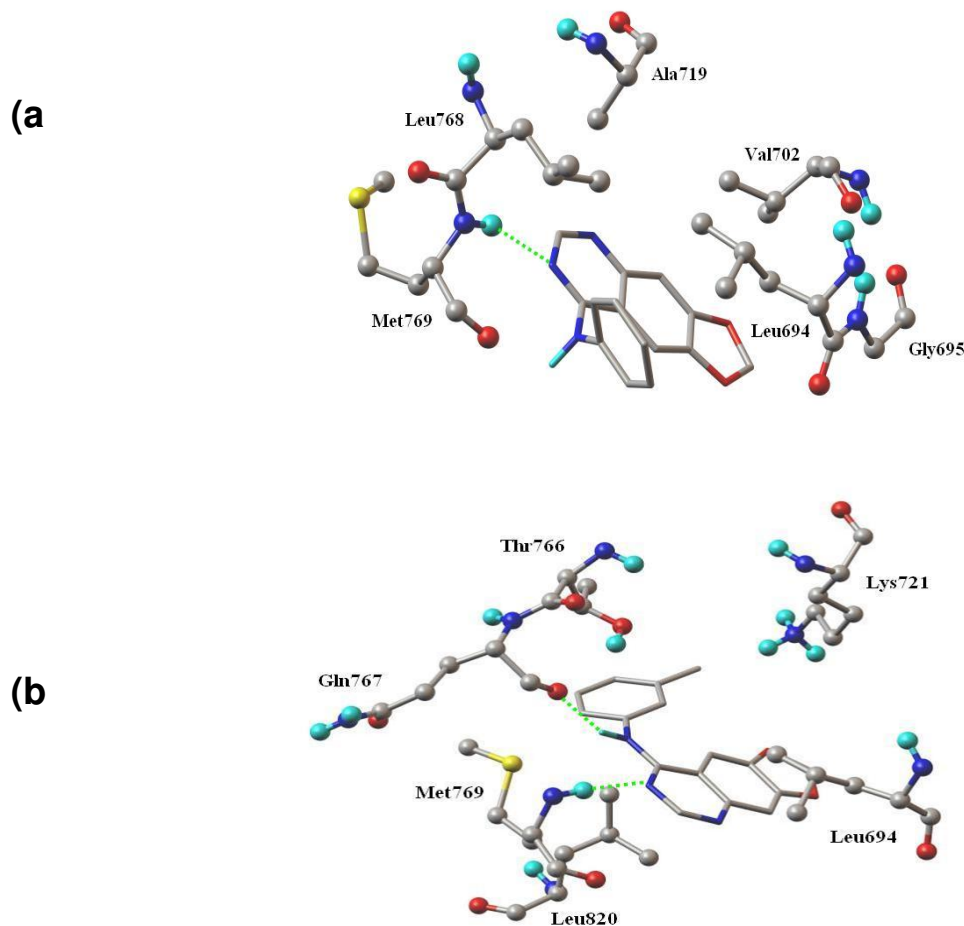


Figure 5. Stereoview of the a) (1) and b) (2) 4-phenylamino quinazolines in the binding site and nearby residues from EGFRK. Dashed line indicates an hydrogen bond from the Met769 amide nitrogen to (1) and (2) and from Gln767 hydroxyl group to (2).

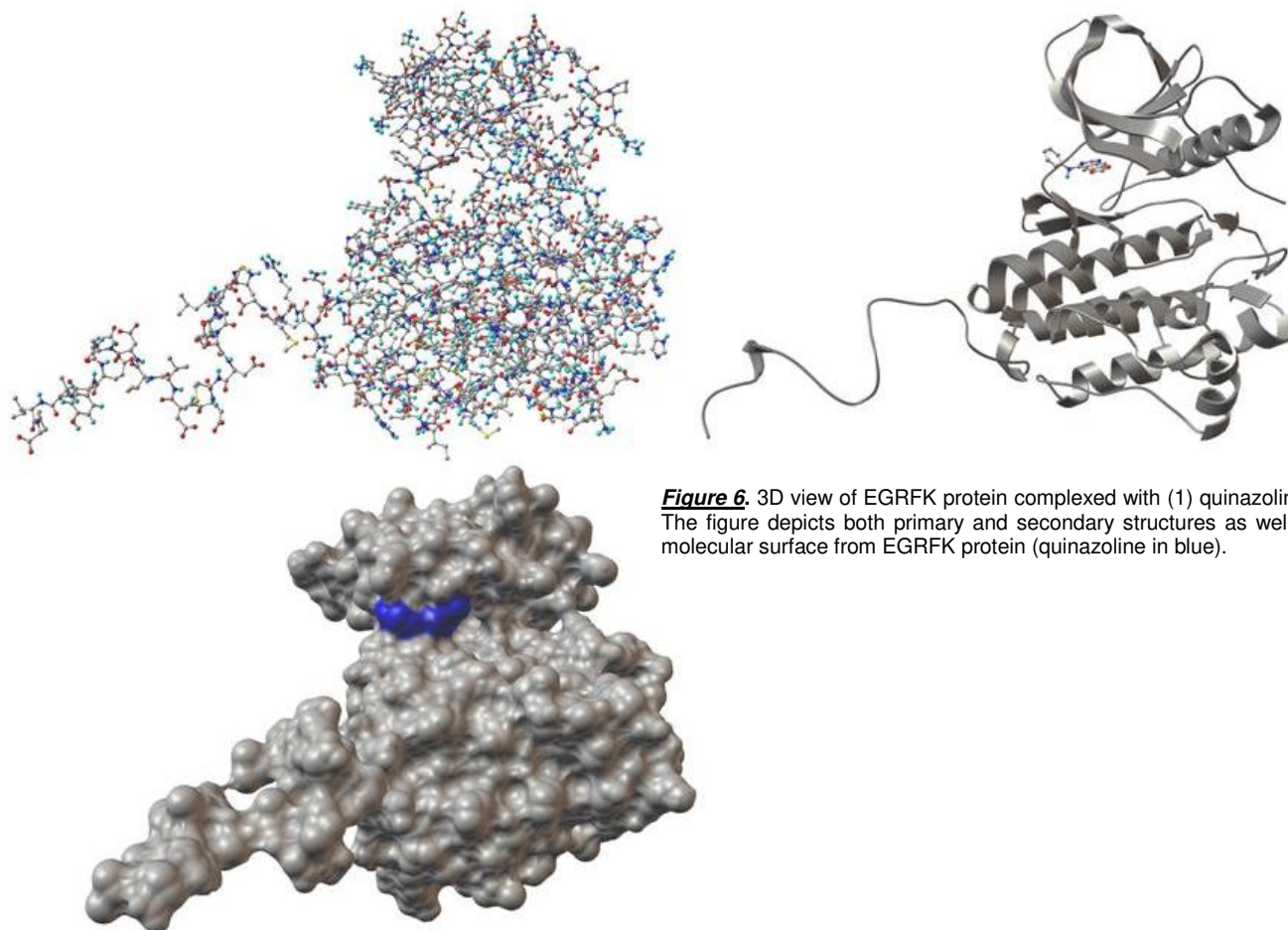


Figure 6. 3D view of EGRFK protein complexed with (1) quinazoline. The figure depicts both primary and secondary structures as well a molecular surface from EGRFK protein (quinazoline in blue).

Conclusions

Breast cancer is a disease that is responsible for approximately 1% of the mortality rate worldwide. The importance of developing new and improved therapies for its treatment is undisputable. Studies of molecular target therapy has led to the development of new drugs against breast cancer, mainly drugs with affinity for EGFR as Lapatinib, for example, drug which will highlight the effectiveness against breast cancer, serves as a model for research and development of new compounds EGFR or HER-2 Inhibitors.

Despite the same framework is present in the tested compounds, the substituent is critical to determine its biological and specific activity. Work is in progress to synthesize new derivatives, to elucidate how changes in the substituents may lead to a higher or smaller activity. Theoretical studies are also being undertaken to elucidate if there is any relationship between electronic structure or steric effects and its biological activity.

Our structures provide confirmation of the many theoretical studies and may serve as a basis for the design of novel inhibitors, thus contributing to increase the arsenal of drugs against the molecular target for breast cancer.

The predicted complex structure of quinazoline type inhibitor with EGFR mapping from molecular docking can interpret the structure activities of the inhibitors well and afford us important information for structure-based drug design.

Recent advances in the discovery of drugs contributed to a sharp increase of biochemical and cellular *in vitro* assays, therefore more time and cost in order to elucidate the mechanism of certain organic compounds and their interaction site. To reveal the target of action of certain drugs, especially the new, the molecular docking methodology is an excellent tool for new drugs tracking and study its active sites.

References

1. Yarden Y, Harari I and Schlessinger JJ. *Biol. Chem.* **1985**, 260, 315-319.
2. Yarden Y and Schlessinger J. *Biochemistry* **1987**, 26, 1434-1442.
3. Cohen S, Carpenter G and King L Jr. *J. Biol. Chem.* **1980**, 255, 4834-4842.
4. Halaban R. *Cancer Met. Rev.* **1991**, 10, 129-140.
5. Cobleigh MA, Vogel CL., Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, *et al.* *J Clin Oncol.* **1999**, 17: 2639-2648.
6. Bilancia G, Rosati A, Dinota D, Germano R and Manzione. *L. Annals of Oncology.* **2007**, 18 (Supplement 6): 26-v0.
7. Subramanian A and Mokbel K. *International Seminars in Surgical Oncology.* **2008**, 5:9.
8. Scaltriti M, Rojo F, Ocaña A, Anido J, Guzman M, Cortes J, Di Cosimo S, Matias-Guiu X, Ramon y Cajal S, Arribas J and Baselga J. *J. Natl Cancer Inst* **2007**, 99: 628 – 38.
9. Finak G, Bertos N, Pepin F, Sadekova S, Souleimanova S, Zhao H, *et al.* *Nature Medicine.* **2008**, 14(5):518-27.
10. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, *et al.* *N Engl J Med.* **2001**, 344: 11.
11. Tao W, Wang C, Han R and Jiang H. *Breast Cancer Res Treat.* **2008**, 114(2):371-6.
12. Carter P, Presta, L, Gormant CM, Ridgway JBB, Hennert D, Wongt WLT, Rowlandf, AM, Kotts C, Carvert ME and Shepards M. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1992**, USA 89:4285-4289.
13. Héry C, Ferlay J, Boniol M and Autier P. *Annals of Oncology.* **2008**, 19(6):1187-94.
14. Nadler Y, Camp RL, Giltnane JM, Moede C, Rimm DL, Kluger HM and Kluger Y. *Breast Cancer Research.* **2008**, 10:R35.
15. Kellen E, Greet V, Christiaens RM, Patrick N and Limbergen EV. *Breast Cancer Res Treat.* **2008**, 114(1): 13-22.
16. Welsh M L, Buist DSM, Bowles EJA, Anderson ML, Elmore JG and Li CI. *Breast Cancer Res Treat.* **2008**, 114(3):549-58.
17. Slichenmeyer WJ, Elliott WL and Fry DW. *Semin. Oncol.* **2001**, 28 (Suppl. 16), 67.
18. Rowinsky E K. Horizons in Cancer Therapeutics: From Bench to Bedside **2001**, 2, 2.
19. Jensen MR, Schoepfer J, Radimerski T, Massey A, Guy CT, Brueggen J, *et al.* *Breast Cancer Research.* **2008**, 10:R33.
20. Adams JA. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2271.
21. Yarden Y and Sliwkowski MX. *Nat. Rev.* **2001**, 2, 127.
22. Dumas J. *Curr. Opin. Drug Discov. Develop.* **2001**, 4, 378.
23. Cabeça LF, Rocco AS, Oliveira PR and Rittner R. *Trends in Organic Chemistry.* **2008**, 12: 47-52.
24. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S and Boyd MR. *J Natl Cancer Inst.* **1990**, 82(13):1107-12.
25. Monks A, Scudiero D, Skehan D, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, *et al.* *Journal of the National Cancer Institute.* **1991**, 83(11): 757-766.
26. Shoemaker RH. *Nature Reviews | Cancer.* **2006**, 6: 813-826.
27. Frisch, MJ.; Trucks, G W.; Schlegel, HB.; Scuseria, GE.; Robb, MA.; Cheeseman, JR.; *et al.* *Gaussian 03, revision B.04; Gaussian, Inc.: Pittsburgh, PA, 2003.*
28. Becke ADJ. *Chem. Phys.* **1993**, 98, 5648.
29. Lee C, Yang W and Parr RG. *Phys. Rev. B.* **1998**, 37, 785.
30. McLean AD and Chandler GSJ. *Chem. Phys.* **1980**, 72, 5639-48.
31. Raghavachari K, Binkley JS, Seeger R and Pople JA. *J. Chem. Phys.* **1980**, 72, 650-54.
32. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK and Olson AJ. *J. Comput. Chem.* **1998**, 19, 1639-1662.
33. Mashhadi HR, Shanechi HM and Lucas C. *IEEE Trans. Power Syst.* **2003**, 18, 1181–1186.

34. Stamos J, Sliwkowski MX and Eingenbrot CJ. *Biol. Chem.* **2002**, 277, 46265-46272.
35. Guex N and Peitsch MC. *Electrophoresis.* **1997**, 18, 2714.
36. Palmer BD, Trumppkallmeyer S, Fry DW, Nelson JM, Showalter HDH and Denny WAJ. *Med. Chem.* **1997**, 40, 1519-1529.
37. Wissner A, Berger, DM, Boschelli, DH, Floyd MB, Greenberger LM, Gruber BC, Johnson, BD, Mamuya N, Nilakantan R, Reich MF, Shen R, Tsou HR, Upeslakis 40E, Wang YF, *et al.* *J. Med. Chem.* **2000**, 43, 3244-3256.
39. Bridges AJ. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2541-2571.
40. Garcia-Echeverria C, Traxler P and Evans DB. *Med. Res. Rev.* **2000**, 20, 28-57.

Acknowledgments

The authors are grateful to FAPESP for financial support of this work, for a scholarship (to A.N.O.) and for a fellowship (to C.C.B.), and to CNPq for fellowships (to R.R. and N.F.H.).