



MODIFICAÇÕES MOLECULARES E TOXICIDADE *in silico* DO RALOXIFENO PARA PROSPECÇÃO DE AGENTES ADJUVANTES DA TERAPÊUTICA E PROFILÁTICA DO CÂNCER DE MAMA

Rodrigo Lopes Gomes Gonçalves¹
Vivianne Rodrigues Amorim²
Ian Jhemes Oliveira Sousa³
Márcia Láis Fortes Rodrigues Mattos⁴
Thiara Lorena Bezerra Da Silva Oliveira⁵

Resumo: O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente nas mulheres e apresenta um aumento em sua incidência nos últimos anos, os antagonistas dos receptores de estrógenos apresentam-se como uma ferramenta promissora para co-tratamento e prevenção da recidiva do câncer mamário, nesse sentido, o presente trabalho constitui-se num instrumento de análise e triagem de propostas de novos fármacos da classe dos moduladores dos receptores de estrógenos, utilizando computação analítica aplicada à análise química. Analisaram-se os riscos fisiológicos por *screening* de toxicidade através de técnicas de análise combinatória de padrões moleculares (toxicidade *in silico*) e também a análise de parâmetros moleculares para classificação molecular quanto ao desenvolvimento de uma droga de utilização via oral. Todos os testes foram realizados utilizando um computador por meio de plataforma fornecida pela Acetilion Pharmaceuticals Ltda. Os derivados esteroidais similares ao modulador estrogênico Raloxifeno foram classificados segundo parâmetros descritos nas regras de Lipinski, sendo possível observar que duas das moléculas testadas (derivados aminado e clorado) tiveram valores considerados mais promissores em comparação ao fármaco original sendo que uma dessas moléculas promissoras mostrou toxicidade (molécula clorada) e outra ausência de toxicidade (molécula aminada) aos ensaios *in silico*, caracterizando a molécula com a substituição do enxofre pelo nitrogênio como promissor para um fármaco de administração oral.

Palavras-chave: Câncer de mama; Modelagem molecular; Moduladores hormonais

Abstract: Breast cancer is the second most frequent type of cancer in women and present an increase in its incidence in recent years, estrogen receptor antagonists present themselves as a promising tool for co-treatment and prevention of recurrence of breast cancer, In this sense, the present. The present invention relates to the use of estrogen receptor modulators in the treatment of cancer of breast. The physiological risks for the screening of toxicity were analyzed by techniques of combined analysis of molecular standards (*in silico* toxicity) and also analysis of molecular sense molecules for the development of a drug for oral use. Acetilion Pharmaceuticals Ltda performed all tests using a computer through the acquisition platform. The steroidal derivatives similar to the estrogenic modulator Raloxifene were the following control parameters in the Lipinski routes, being possible to observe that the two halves of the molecules are tested and treated. (Chlorinated molecule) and another absence of toxicity (amine molecule) to the *in silico* assays, characterizing a molecule with sulfur substitution by nitrogen as promising for an oral administration drug.

Keywords: Breast cancer; Molecular modeling; Hormonal modulators

*¹ Discente da Especialização em Farmacologia Clínica e Prescrição Farmacêutica

*² Orientadora – Mestre em Farmacologia (UFPI).

*³ Coorientador - Especialista em Farmacologia Clínica e Mestre em Farmacologia

*⁴ Coorientador – Especialista em Obstetrícia e Neonatal

*⁵ Coorientador, Especialista em Farmácia Hospitalar e Gestão, Mestre em Engenharia de Materiais, Doutoranda no Renorbio

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública em todo o mundo. É atualmente a segunda causa principal de morte e deve superar doenças cardíacas como a principal causa de morte nos próximos anos. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que o câncer foi responsável por 7,4 milhões de mortes (cerca de 13% das mortes) em 2004. Mortes por câncer no mundo são projetadas para continuar crescendo, com estimativa de 12 milhões de mortes em 2030 (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2015; FREITAS et al., 2016)

O segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres é o câncer de mama e sua incidência vem aumentando ao longo do tempo, concomitantemente ao aumento da industrialização e da urbanização. A neoplasia maligna de mama é responsável por cerca de 20% da incidência de câncer e por 14% do total de mortes associadas às neoplasias (INUMARU; SILVEIRA; NAVES, 2011).

Em um estudo desenvolvido por Cuzick et al. (2003) a efetividade do Raloxifeno como agente de profilaxia tumoral foi avaliada em um estudo denominado MORE3 (*Multiple Outcome of Raloxifen Evaluation*), no qual foi possível comprovar que a utilização do Raloxifeno (60 mg/dia) por mulheres na pós-menopausa reduziu em 65% o risco de câncer de mama quando comparado ao placebo, sendo o estudo realizado em quatro anos (OLIVEIRA; ALDRIGHI, 2006).

No entanto, a utilização do Raloxifeno é restringida pelas suas propriedades moleculares que o dão uma característica desfavorável do ponto de vista farmacológico, pois, após a administração oral, o Raloxifeno é absorvido a partir do trato gastrointestinal e a sua biodisponibilidade (definida como a taxa e a extensão que uma molécula ativa é absorvida e torna-se disponível para sua ação no sítio farmacológico) é cerca de 2%. Vários fatores podem interferir na biodisponibilidade de um fármaco, dentre elas as características físico-químicas da molécula (solubilidade, peso molecular, coeficiente de partição, pH em solução) (FONTANA et al., 2014; RODRIGUES NETO, 2015).

Na química medicinal, existem diversos métodos utilizados para a gênese e otimização de fármacos. Dentre eles, os processos de modificação molecular

são largamente utilizados pela indústria farmacêutica. Esses processos partem de uma substância definida como protótipo e, a partir dela, fazem-se modificações estruturais simples ou especiais, com o objetivo de identificar o grupamento farmacofórico e obter informações essenciais para o processo de planejamento de fármacos. A partir desta identificação, sintetiza-se uma molécula com características farmacocinéticas mais adequadas do que o protótipo, com maior atividade e efetividade ou menor toxicidade, apresentando, portanto, maior interesse terapêutico (AVER; KREUTZ; SUYENAGA, 2015).

Com o intuito de obter sucesso no desenvolvimento de novos fármacos, métodos de planejamento assistido por computador (*in silico*) tem sido empregados, pois, fornecem importantes informações sobre dados experimentais e mecanismo de ação, além de poder sugerir estruturas moleculares antes mesmo de sua síntese, ajudando desta forma na tomada de decisões de custo-benefício (LIAO et al., 2011).

Desta forma, este trabalho objetiva investigar e avaliar a viabilidade de compostos relacionados ao Raloxifeno como propostas de agentes farmacológicos para administração oral que possam servir como agentes coadjuvantes no tratamento do câncer de mama através de otimização farmacocinética e estudos de toxicidade *in silico*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar e avaliar a viabilidade farmacocinética de compostos relacionados ao Raloxifeno, como propostas de agentes farmacológicos para administração oral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propor modificações moleculares do fármaco Raloxifeno para obter moléculas de fármacos relacionados estruturalmente com esse modulador estrogênico;

- Analisar os parâmetros químicos relacionados à farmacocinética (cLogP, peso molecular, riscos toxicológicos, quantificação dos doadores/aceptores de elétrons e o *Drug Score*) das moléculas relacionadas ao Raloxifeno;
- Avaliar a toxicidade *in silico* para obter uma predição do potencial toxicológico dos derivados relacionadas ao Raloxifeno frente aos sistemas orgânicos com base em análise combinatória de farmacóforos.

3 METODOLOGIA

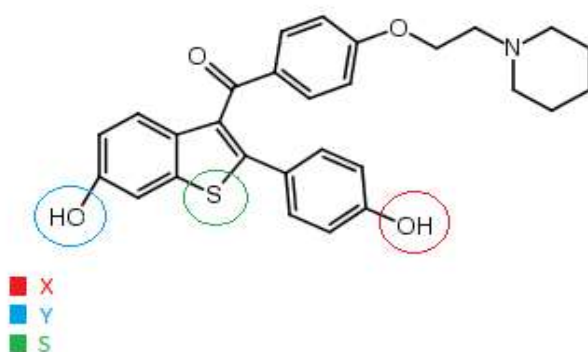
Utilizou-se o protótipo Raloxifeno com estrutura obtida de Kayath (1999). Foi desenhada a estrutura protótipo que, a partir de então, foi submetido a cinco modificações moleculares nos doadoras de elétrons com a adição de grupos como substituintes das hidroxilas e também inserções de átomos no anel pentano central da molécula, estas modificações foram idealizadas usando princípios da química orgânica clássica. Posteriormente, analisaram-se os parâmetros cLogP, peso molecular, riscos toxicológicos, quantificação dos doadores/aceptores de elétrons e o *Drug Score*, avaliados pela técnica de “Drug-Likeness”, que consiste em uma técnica de computação que compara a estrutura química teste com as propriedades físicas e químicas da maioria dos fármacos conhecidos, que estão depositados em um banco de dados. Essas propriedades, principalmente a lipofilicidade, juntamente com as características farmacofóricas, fazem parte de um conjunto de regras de um modelo de toxicidade *in silico* conhecido como ADME/Tox (BISWAS; ROY; SEN, 2006; SRINIVAS et al., 2014). Desta forma, é possível comparar a viabilidade farmacocinética das propostas de moduladores dos receptores de estrógeno forma preliminar. Os estudos foram realizados com o programa freeware Osiris® da Acetilion Pharmaceuticals Ltda.

4 RESULTADOS

As substituições na molécula foram realizadas utilizando a estrutura disponível em Kayath (1999), disposta na Figura 1, onde estão esquematizados os pontos de substituições X, Y e S, visto que pela localização dos doadores de

elétrons ou alteração no grupamento eletronegativo por elementos com maior eletronegatividade, pode-se ter uma grande influência nas propriedades de cargas da molécula por consequência em sua polaridade e parâmetros farmacocinéticos.

Figura 1. Estrutura molecular do Raloxifeno e pontos de modificações moleculares para prospecção de novos fármacos



Fonte: adaptado a partir de Kayath (1999).

A Tabela 1 mostra os resultados da análise da toxicidade *in silico*, que foi realizada através da predição dos riscos toxicológicos (mutagenicidade, tumorigenicidade, potencial de irritabilidade e efeitos reprodutivos) utilizando análise combinatória com a base de dados do *software*.

Tabela 1. Resultados do *screening* toxicológico *in silico* dos derivados de substituição da molécula do Raloxifeno.

MOLÉCULA	MUTAGENICIDADE	TUMORIGENICIDADE	IRRITABILIDADE	EFEITOS REPROD.
Raloxifeno	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
X-CH ₃ , Y-CH ₃	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
X-CH ₃ , Y-Cl	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
X-F, Y-CH ₃	Ausência	Ausência	Ausência	Presença
Cl em S	Presença	Ausência	Ausência	Presença
N em S	Ausência	Ausência	Ausência	Presença

Fonte: O autor.

Observou-se que a proposta de substituição do enxofre pelo cloro na molécula do Raloxifeno apresentou efeitos tóxicos, tendo indicativo de propriedades mutagênicas e desta forma não sendo promissor. Os agentes mutagênicos são substâncias que induzem alterações no material genético celular, que podem ser corrigidas pelo próprio mecanismo de reparo das células. Alterações não reparadas, ou reparadas erroneamente, originam mutações de ponto e/ou 17 cromossômicas, tais como quebras e "gaps" que são normalmente visualizadas em cromossomos metafásicos (SCHERER; STROHSCHOEN, 2013).

As demais moléculas propostas mantiveram o mesmo padrão de toxicidade no *screening*, além de possuírem efeitos sobre o sistema reprodutor, o que é esperado, e explicado pelo fato do protótipo ser um antagonista hormonal.

É importante ressaltar que a toxicidade predita não é totalmente confiável, nem garante que esses compostos são completamente isentos de efeitos tóxicos. Contudo, enaltece o perfil promissor dessas substâncias para estudos experimentais mais aprofundados.

A otimização destas propriedades, por modificações moleculares de compostos promissores, é essencial na seleção de substâncias candidatas com maiores probabilidades de não serem descartados na fase clínica. Assim, atualmente, estudos ADME/Tox vêm sendo aplicados em etapas anteriores do desenvolvimento de fármacos, economizando tempo e delineando melhor o estudo de novos compostos (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

O planejamento racional de fármacos compreende estudos que visam o aumento da potência e da seletividade, a adequação dos perfis farmacocinético e toxicológico (diminuição da toxicidade) de uma substância protótipo. Durante o processo de pesquisa e desenvolvimento de um fármaco, um estudo ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) eficiente é essencial para que a Indústria Farmacêutica tenha uma economia de tempo e dinheiro, visto que a toxicidade é a terceira causa de falhas no processo de desenvolvimento de fármacos (PASSAMANI, 2009).

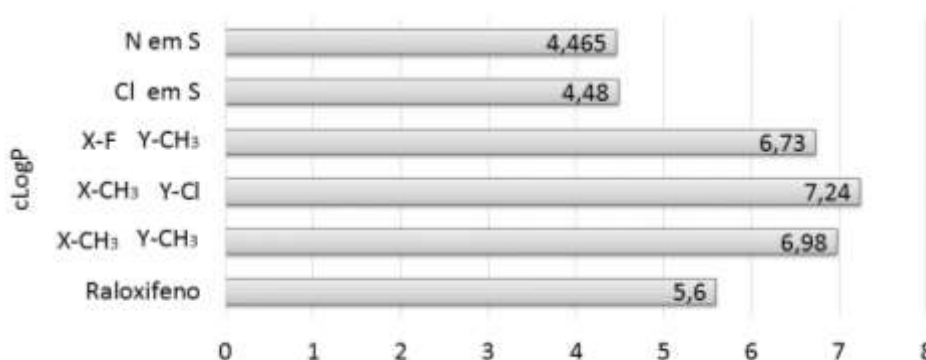
Lipinski et al. (2001) desenvolveram um dos primeiros princípios para estabelecer correlação entre características estruturais moleculares com suas respectivas absorções/permeações, a chamada "regra dos cinco" (do inglês

“ruleoffive”). Esta regra foi elaborada com base em dados de absorção oral humana de 2245 compostos disponíveis no *Word Drug Index*. De acordo com essa regra, para que uma molécula tenha potencial para ser absorvida oralmente deverá seguir quatro critérios com resultados múltiplos de 5:

- Número de doadores de hidrogênio ≤ 5 (soma de OH e NH);
- Número de aceptores de hidrogênio ≤ 10 (soma de O e N);
- $\text{Log P} \leq 5$;
- Massa molecular $\leq 500 \text{ g.mol}^{-1}$.

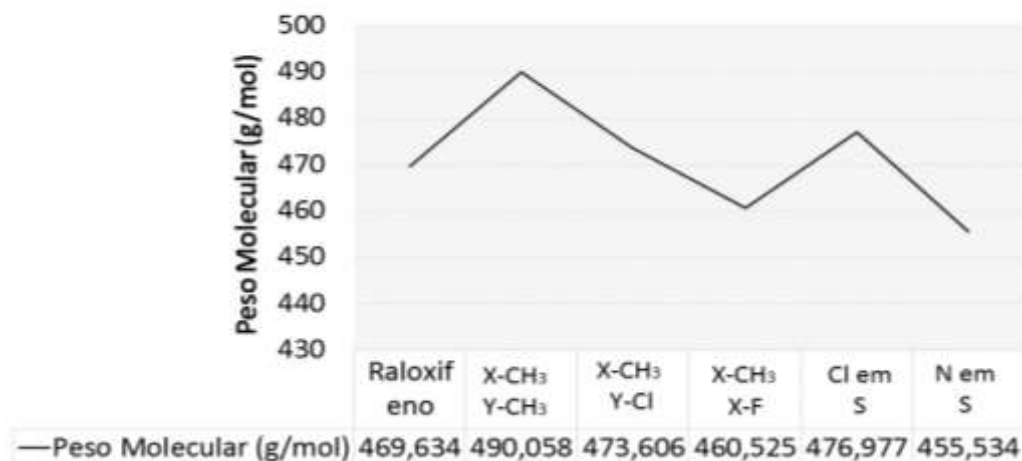
As Figuras 1 e 2 mostram a distribuição do cLog-P e massa molecular, respectivamente, em que os valores de cLog-P representam um coeficiente de partição Água-Octano1-ol, comumente utilizado para mensurar a lipofilicidade de um fármaco através do coeficiente de partição entre os fluidos plasmáticos (fase aquosa) e as membranas biológicas (fase orgânica). O número valor proposto no sistema Osiris® é uma unidade despojada de logaritmo (base 10) de medida da solubilidade em mol/ litro e o valor de massa molar da substância foi calculado usando ao padrões da química clássica (PEREIRA, 2007).

Figura 1. Distribuição dos resultados obtidos na simulação do cLog-P das moléculas relacionadas ao Raloxifeno



Fonte: O autor.

Figura 2. Distribuição dos resultados obtidos na avaliação do pelo molecular dos fármacos propostos pelas substituições na molécula do Raloxifeno.



Fonte: O autor.

Sabendo-se que boa absorção oral de um fármaco pode ser relacionada com os parâmetros abordados na regra dos cinco, observou-se que em relação aos valores de cLogP das substâncias estudadas, apenas a substituição do Nitrogênio por Enxofre (N em S) e Cloro pelo Enxofre (Cl em S), obtiveram valores menores do que 5.0, comportando-se como bons candidatos a fármacos de boa absorção via oral. Porém, como a substituição pelo Cloro apresentou potencial mutagênico, portanto, apenas o derivado aminado apresentou-se promissor.

Um balanço adequado entre solubilidade em água e lipofilicidade é de fundamental importância para a absorção passiva de fármacos. Fármacos muito polares ou hidrofílicos tendem a apresentar baixa biodisponibilidade, em virtude de suas baixas permeabilidades pelas membranas celulares, que são de natureza lipoproteica. Baixa absorção também é frequentemente observada para fármacos muito apolares ou lipofílicos, como resultado da baixa solubilidade em água e das características de dissolução destes compostos no meio biológico (PEREIRA, 2007).

Com isso, o derivado aminado do Raloxifeno (N em S) apresentou propriedades químicas promissoras como protótipo de medicamento para via oral e a avaliação subjetiva dos parâmetros químicos mostram que suas propriedades chegam a ser melhores que a molécula principal, satisfazendo o objetivo de “otimização molecular”.

Quanto à massa molar dos fármacos propostos, todas as moléculas relacionadas ao Raloxifeno propostas tem massa molar inferior a 500 g.mol⁻¹, e similares ao peso molecular do RRaloxifeno, especialmente a molécula aminada que obteve uma redução de aproximadamente 3,8% do peso molecular em relação ao fármaco padrão, apresentando-se com a menor massa molecular em comparação com o Raloxifeno e as demais moléculas propostas neste estudo

A variação da presença de doadores e aceptores de elétrons está descrita na Tabela 2, sendo que todos os derivados se mostraram dentro da regra de Lipinski, reforçando que as interações polares existentes não são prejudiciais aos parâmetros farmacocinéticos dos fármacos e ainda que o perfil de doadores/aceptores de elétrons das moléculas clorada/aminada (Cl em S e N em S) são iguais ao da molécula do fármaco padrão (Raloxifeno).

Tabela 2. Número de doadores/aceptores de elétrons por molécula dos derivados relacionados ao Raloxifeno.

MOLÉCULA	Doadores de Elétrons	Aceptores de Elétrons
Raloxifeno	2	4
X-CH ₃ , Y-CH ₃	0	4
X-CH ₃ , Y-Cl	0	5
X-F, Y-CH ₃	0	5
Cl em S	2	4
N em S	2	4

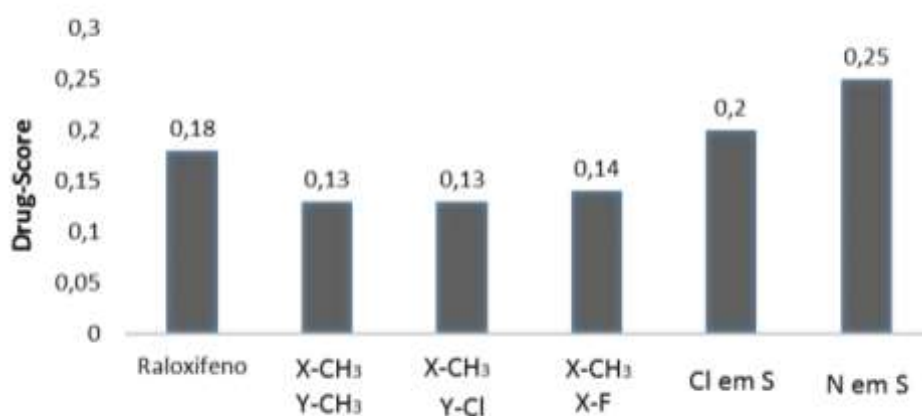
Fonte: O autor.

O *Drug-Score* é outra propriedade disponível no programa Osiris®, que é utilizado para inferir o potencial de um composto de se tornar um fármaco. Trata-se de um indicador mais amplo de similaridade a fármacos. Este índice combina os valores de drug-likeness (compostos que possuem grupos funcionais e/ou propriedades físico-químicas parecidas com a maioria dos fármacos conhecidos), que engloba além da similaridade estrutural, características de cLogP (lipofilia), LogS (solubilidade em água), peso molecular e risco de toxicidade em um único valor. Os valores variam entre 0 e 1, valores mais próximos de 1 (um) indicam um bom perfil Drug-Score, ao passo que valores

mais próximos de 0 (zero) indicam um perfil não compatível em comparação a fármacos viáveis para a administração pela via oral (PASSAMANI, 2009; MATOS, 2014).

Na Figura 3 observa-se que a substituição do Enxofre pelo Nitrogênio no protótipo Raloxifeno proporciona melhores propriedades relacionadas ao ADME. O conceito Drug-Score aponta que o fármaco proposto pode apresentar uma melhor viabilidade teórica de administração oral do que o Raloxifeno atualmente disponível, dando uma avaliação preliminar da viabilidade farmacocinética do fármaco a ser sintetizado para ser utilizado pela via de administração oral.

Figura 3. Distribuição dos resultados obtidos no cálculo do Drug-Score dos fármacos propostos a partir das substituições da molécula do Raloxifeno



Fonte: O autor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As modificações moleculares de fármacos podem ser boas estratégias para o desenvolvimento de medicamentos de forma planejada. A adaptação de fármacos já utilizados no mercado para serem coadjuvantes terapêuticos ou agentes profiláticos, por sua vez, é uma vertente das ciências farmacêuticas que está em grande destaque, sempre aliada com novas ferramentas tecnológicas, como por exemplo, ferramentas computacionais de simulação. A substituição do Enxofre pelo Nitrogênio no protótipo Raloxifeno mostrou-se com características mais promissora em relação as outras modificações, o que pode servir de

premissa válida para a síntese destes fármacos relacionados para que se melhore a eficácia e efetividade dos moduladores estrogênicos na terapêutica/profilática do câncer de mama.

6 REFERÊNCIAS

AVER, G. M.; KREUTZ, O. C.; SUYENAGA, E. S. Sob a Óptica Da Química **Medicinal Methods of Obtaining Drugs**, p. 62–72, 2015.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

BISWAS, D.; ROY, S.; SEN, S. A simple approach for indexing the oral druglikeness of a compound: Discriminating druglike compounds from nondruglike ones. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 46, n. 3, p. 1394–1401, 2006.

CUZICK, J.; POWLES, T.; VERONESI, U.; FORBES, J.; EDWARDS, R.; ASHLEY, S.; BOYLE, P. Overview of the main outcomes in breast-cancer prevention trials. **Lancet**, v. 361, n. 9354, p. 296–300, 2003.

FONTANA, M. C.; BECKENKAMP, A.; BUFFON, A.; BECK, R. C. Controlled release of raloxifene by nanoencapsulation: effect on in vitro antiproliferative activity of human breast cancer cells. **Int J Nanomedicine**, v. 9, p. 2979–2991, 2014.

FREITAS, E. O.; VIEIRA, M. M. S.; TSUNEMI, M. H.; PESSINI, L.; GUERRA, G. M. A influência da espiritualidade na qualidade de vida do paciente oncológico: reflexão bioética. **Revista Nursing**, v. 17, n. 222, p. 1266–1270, 2016.

INUMARU, L. E.; SILVEIRA, E. A. Da; NAVES, M. M. V. Risk and protective factors for breast cancer: a systematic review. **Cadernos de saúde pública, Rio de Janeiro**, v. 27, n. 7, p. 1259–70, 2011.

KAYATH, M. J. Raloxifeno e osteoporose: revisão de um novo modulador seletivo do receptor de estrógeno. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 43, p. 433–441, 1999.

LIAO, C.; SITZMANN, M.; PUGLIESE, A.; NICKLAUS, M. C. Software and resources for computational medicinal chemistry. **Future medicinal chemistry**, v. 3, n. 8, p. 1057–1085, 2011.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1–3, p. 3–26, mar. 2001.

MATOS, I. D. E. A. **Planejamento in silico de inibidores da enzima dihidrofolato redutase**. 2016. 138 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2016.

OLIVEIRA, V. M. de; ALDRIGHI, J. M. Nova alternativa farmacológica na prevenção do câncer de mama após a menopausa. **Rev Assoc Med Bras**, v. 52, n. 4, p. 1–2, 2006.

PASSAMANI, F. **Modelagem molecular e avaliação da relação estrutura-atividade acoplados a estudos físico- químico e toxicológicos in silico de derivados heterocíclicos com atividade antiviral**. 2009.104 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 171–177, 2007.

RODRIGUES NETO, E. M. **Estudo de biodisponibilidade comparativa entre duas formulações de cloridrato de metformina, comprimidos revestidos de 850 mg, administradas a voluntários sadios**. 2015. 103 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós graduação em Farmacologia, Universidade

Federal do Ceará, 2015.

SCHERER, K.; STROHSCHOEN, A. A. G. Genotoxicidade do teste cometa para análise de genotoxicidade como atividade de ensino para graduação na área da saúde. **Revista Destaques Acadêmicos**, v. 5, n. 3, p. 49–60, 2013.

SIEGEL, R.; MILLER, K.; JEMAL, A. Cancer statistics , 2015 . **Cancer Journal Clinical**, v. 65, n. 1, p. 29, 2015.

SRINIVAS, N.; SANDEEP, K. S.; ANUSHA, Y.; DEVENDRA, B. N. In Vitro Cytotoxic Evaluation and Detoxification of Monocrotaline (Mct) Alkaloid : An In Silico Approach. **International Invention Journal of Biochemistry and Bioinformatics**, v. 2, n. 2, p. 20–29, 2014.