



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**TOPOISOMERASES DO TIPO II COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA A
TERAPIA ANTICANCERÍGENA**

Daniela Felício dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2022



UAAlg

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

UNIVERSIDADE DO ALGARVE

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química e Farmácia

**TOPOISOMERASES DO TIPO II COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA A
TERAPIA ANTICANCERÍGENA**

Daniela Felício dos Santos

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre
em Ciências Farmacêuticas

Trabalho efetuado sob a orientação de:
Professora Doutora Maria de Lurdes dos Santos Cristiano

2022

DECLARAÇÃO DE AUTORIA DE TRABALHO

Declaro ser a autora deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam na listagem de referências incluída.

(Daniela Felício dos Santos)

© 2022 Daniela Felício dos Santos

A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer a toda a minha família pelo apoio incondicional ao longo destes cinco anos de curso, com especial agradecimento aos meus pais, à minha avó e à minha prima Nádia.

Agradeço ainda à minha Orientadora de dissertação, a Professora Doutora Maria de Lurdes Cristiano, pela sua constante disponibilidade e incentivo, que me ajudaram a alcançar este tão desejado objetivo na minha vida, ser Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Agradeço também a todos os Professores com quem me cruzei durante este meu percurso académico, que com os seus ensinamentos, contribuíram sem dúvida alguma para que eu conseguisse alcançar este tão desejado sonho.

Por fim, e não menos importante, quero agradecer a todos os meus amigos e colegas, pela disponibilidade constante e pelo apoio que me deram, nos vários momentos deste meu percurso.

A Todos deixo o meu Muito Obrigado!

RESUMO

As neoplasias estão entre as principais causas de morte do século XXI e caracterizam-se pelo aparecimento de células que crescem de forma descontrolada e indefinida. O risco de desenvolvimento de neoplasia, seja qual for a sua localização, aumenta na presença de fatores tais como a imunossupressão, que pode estar relacionada com o stress, com a idade e/ou com a administração de determinados fármacos, sendo exemplo disso os corticosteroides, antibacterianos, entre outros. O desenvolvimento de fármacos antineoplásicos seletivos e seguros permanece um dos maiores desafios da Química Farmacêutica.

As topoisomerases de ADN são enzimas nucleares ubíquas envolvidas nos processos de regulação do estado topológico do ADN, que apresentam um aumento da sua atividade em vários tipos de cancro, podendo mesmo funcionar como biomarcadores. Desta forma, as topoisomerases são consideradas alvos terapêuticos para a terapia anticancerígena, sendo de especial interesse o desenvolvimento de inibidores de topoisomerases que possam ser utilizados.

Os inibidores das topoisomerases, nomeadamente os do tipo II, são utilizados para o tratamento de vários tipos de cancro e podem ser divididos, de acordo com o seu mecanismo de ação, em venenos de topoisomerases, como a doxorubicina e o etopósido, e em inibidores catalíticos, como a merbarona. Contudo, apesar de serem amplamente prescritos, estes fármacos estão associados à possibilidade de desenvolvimento de efeitos colaterais graves, como cardiotoxicidade e neoplasia secundária iatrogénica, levando ainda ao desenvolvimento de resistências. Estas limitações suscitam a necessidade de desenvolver novas estratégias que permitam uma melhor eficácia terapêutica, sendo exemplos a terapia combinada, a síntese de fármacos com mais do que um alvo terapêutico e ainda a utilização de moléculas orgânicas como modeladores enzimáticos.

Ao longo desta dissertação será apresentada uma revisão crítica do estado da arte no desenvolvimento e otimização de inibidores de topoisomerases.

Palavras chave: neoplasia, topoisomerases, inibidores das topoisomerases, ADN

ABSTRACT

Neoplasms are amongst the leading causes of death in the 21st century and are characterized by the presence of cells that grow in an uncontrolled and undefined way. The risk of developing neoplasms, whatever its location, increases in the presence of factors such as immunosuppression, that may be related to stress, age and/or the administration of certain drugs, such as corticosteroids, antibacterials, and others. The development of selective and safe anticancer drugs remains as one of the biggest challenges in Pharmaceutical Chemistry.

ADN topoisomerases are ubiquitous nuclear enzymes involved in the processes of regulating the topological state of ADN, that increase their activity in the various types of cancer, functioning even as biomarkers. So, topoisomerases are considered as therapeutic targets for anticancer therapy, showing special interest in the development of topoisomerase inhibitors that may be used.

The topoisomerase inhibitors, namely type II, are used for the treatment of numerous types of cancer and can be divided, according to their mechanism of action, into, topoisomerase poisons, such as doxorubicin and etoposide, and catalytic inhibitors, like merbarone. However, despite being widely prescribed, these drugs are associated with the possibility of developing serious side effects, such as cardiotoxicity or iatrogenic secondary neoplasm, and also the emergence of resistances. These limitations raise awareness to the need of developing new strategies that allow good therapeutic efficacy, such as combined therapy, the synthesis of drugs with more than one therapeutic target, and the use of organic molecules as enzymatic modelers.

Throughout this dissertation, it will be present a critical review of the state of the art in the development and optimization of topoisomerase inhibitors.

Key words: neoplasm, topoisomerases, topoisomerase inhibitors, ADN

ÍNDICE REMISSIVO

1	<i>Introdução</i>	1
1.1	Neoplasias	1
1.2	Epidemiologia	1
1.3	Tratamentos antineoplásicos	3
1.3.1	Cirurgia	3
1.3.2	Radioterapia	4
1.3.3	Quimioterapia.....	4
1.3.4	Hormonoterapia.....	5
1.3.5	Imunoterapia	6
2	<i>Fármacos anticancerígenos / citotóxicos</i>	7
2.1	Topoisomerases como alvo terapêutico	7
2.1.1	Topoisomerases do tipo I	8
2.1.2	Topoisomerases do tipo II.....	10
3	<i>Inibidores de Topoisomerases do tipo II</i>	15
3.1	Venenos de Topoisomerases	16
3.1.1	Agentes intercalantes do ADN.....	16
3.1.2	Agentes não intercalantes do ADN.....	18
3.2	Inibidores catalíticos	19
4	<i>Novas estratégias para a inibição das Topoisomerases II</i>	23
4.1	Inibidores de Topoisomerases II em terapêutica de combinação	24
4.2	Inibidores de Topoisomerases II com múltiplos alvos terapêuticos	25
4.2.1	Intercalantes	27
4.2.2	Conjugados.....	28
4.2.3	Não intercalantes.....	29
4.3	Outras estratégias para melhorar a inibição das Topoisomerases II	31
5	<i>Conclusões</i>	33
6	<i>Referências Bibliográficas</i>	35

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1- Representação da ligação da TOPO I à cadeia dupla de ADN, com estabilização da fenda formada. Adaptado de (27).</i>	8
<i>Figura 2- Representação da estrutura das TOPO II com esquematização dos seus domínios. Adaptado de (23,24,26).</i>	10
<i>Figura 3- Representação esquemática do mecanismo de ação das TOPO II. Adaptado de (24).</i>	12
<i>Figura 4- Estrutura química de algumas antraciclinas e da mitoxantrona. Adaptado de (37,63).</i>	17
<i>Figura 5- Representação da estrutura do etopósido e de seus derivados. Adaptado de (41).</i>	19
<i>Figura 6- Representação esquemática das fases do ciclo catalítico onde atuam os diferentes inibidores de TOPO II. Venenos de TOPO II: etopósido, mitoxantrona, doxorubicina. Inibidores catalíticos: aclarubicina, suramina, novobicina, merbarona, derivados da bisdioxipiperizina (ICRF-193, ICRF-187). Adaptado de (43).</i>	20
<i>Figura 7- Estrutura química dos diferentes inibidores catalíticos de TOPO II. Adaptado de (43).</i>	21
<i>Figura 8- Alvos terapêuticos estrutural e funcionalmente semelhantes à enzima TOPO II.</i>	23
<i>Figura 9- Mecanismos pelos quais a combinação terapêutica de CI-994 e etopósido estimulam a apoptose.</i>	25
<i>Figura 10- Estrutura química da indenoquinolina.</i>	27
<i>Figura 11- Estrutura de análogos da indenoquinolina com um grupo carboxamida.</i>	28
<i>Figura 12- Estrutura química da camptotecina, da podofilotoxina e do conjugado.</i>	28
<i>Figura 13- Representação das estruturas do taflupósido e do elomotecano.</i>	29
<i>Figura 14- Representação da estrutura química da oxocrebantina.</i>	30

ÍNDICE DE TABELAS

<i>Tabela 1- Data da descoberta dos inibidores de TOPO. Adaptado de (32).....</i>	<i>15</i>
---	-----------

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN - Ácido desoxirribonucleico

TOPO I - Topoisomerase do tipo I

TOPO II - Topoisomerase do tipo II

1 Introdução

1.1 Neoplasias

As neoplasias caracterizam-se por um crescimento anormal e descontrolado de células onde todo o processo de renovação celular está alterado, que na maioria dos casos leva à formação de uma massa, o tumor ou cancro. (1) Este crescimento deve-se a mutações em genes específicos, denominados proto-oncogenes, que aquando da sua ativação se transformam em oncogenes (2), sendo que as mutações podem ocorrer como resultado da interação entre fatores genéticos e agentes externos (físicos, químicos e/ou biológicos). As células normais passam então a designar-se por células tumorais, num processo que envolve vários estadios. (3)

As células cancerígenas apenas param de crescer se o tumor for removido cirurgicamente, caso o paciente seja submetido a quimioterapia ou outro tipo de tratamento específico, como a terapia hormonal ou radioterapia, ou ainda se o tumor desaparecer sozinho, isto é, se o mesmo entrar em remissão. (4)

Os tumores podem ser designados de benignos ou malignos, sendo que a principal diferença entres eles assenta no facto de estes últimos apresentarem a capacidade de invadir tecidos e órgãos adjacentes, através de um processo denominado por metastização, assumindo então a designação de cancro. (1) As metástases formam novos tumores, com características semelhantes ao inicial, constituindo este processo a principal causa de morte por cancro. (1,3)

1.2 Epidemiologia

São atualmente conhecidos mais de 100 tipos de cancro, sendo que a classificação varia de acordo com o órgão ou tecido no qual têm origem e também com o tipo de células que são formadas. (5)

De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* foram registados, em 2020, cerca de 19,3 milhões de novos casos de cancro e 10 milhões de mortes associadas

à doença. Portanto, esta é uma das principais causas de morte a nível mundial, e a segunda mais frequente antes dos 70 anos de idade, constituindo assim uma barreira para o aumento da esperança média de vida. (3,6)

De entre os cancros mais comuns, é de destacar o cancro da mama feminino (2,26 milhões de novos casos), o cancro do pulmão (2,21 milhões de novos casos), o cancro colorretal (1,93 milhões de novos casos), o cancro da próstata (1,41 milhões de novos casos), o cancro da pele não melanoma (1,20 milhões de novos casos) e o cancro gástrico (1,09 milhões de novos casos). De todos estes, aqueles que apresentaram uma maior taxa de mortalidade no ano de 2020 foram o cancro do pulmão (1,80 milhões de mortes) e o cancro colorretal (916 000 mortes). (3)

Os dados referidos mostram que o cancro configura um problema de Saúde Pública a nível global, prevendo-se um aumento da incidência do mesmo nas próximas décadas. Estima-se que em 2025 o número de novos casos venha a atingir os 20 milhões. (7)

Relativamente a Portugal, dados da *Liga Portuguesa Contra o Cancro* revelam que são identificados cerca de 50 mil novos casos de cancro em cada ano e que a taxa de mortalidade a cinco anos ronda os 50%. Sabe-se também que Portugal é um dos países europeus com melhores taxas de sobrevivência, com cerca de 350 mil sobreviventes nos últimos 20 anos. (8)

A incidência do cancro aumenta com a idade, o que pode estar relacionado com a presença de mecanismos de reparação celular menos eficazes e com a imunossupressão, que por sua vez se correlaciona com o stress, a idade e/ou a ingestão de determinados fármacos, sendo exemplo disso os corticosteroides e os antibacterianos. (3,4) Em idades menos avançadas, alguns dos principais fatores de risco que podem levar ao desenvolvimento de uma neoplasia maligna passam pelo tabagismo, consumo de álcool, hábitos de alimentação pouco saudáveis, sedentarismo e algumas infeções, sendo exemplo a infeção por HIV, que aumenta cerca de 6 vezes o risco de um indivíduo desenvolver cancro. (3)

Nos dias de hoje, estima-se que entre 30 e 50% dos cancros possam ser prevenidos, se forem evitados os principais fatores de risco e se forem implementadas estratégias de prevenção. É também importante que os cancros sejam diagnosticados precocemente, isto é, em fases iniciais da doença, pelo que são promovidos regularmente rastreios à

população. Em Portugal existem três programas de rastreio oncológico. Estes são destinados ao cancro da mama (realização de mamografia a cada dois anos, entre os 50 e 69 anos de idade), cancro colorretal (teste de pesquisa de sangue oculto nas fezes dos 50 aos 74 anos de idade) e cancro do colo do útero (teste de citologia cervical – papanicolau – em mulheres, com início entre os 20 e os 30 anos e até aos 60 anos de idade). Com a implementação destes programas, observou-se uma redução da mortalidade em 30%, 20% e 80%, respetivamente. (3,9)

1.3 Tratamentos antineoplásicos

As formas mais comuns de tratamento anticancerígeno envolvem a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, a hormonoterapia e ainda a imunoterapia. A todos os tratamentos referidos estão associados efeitos adversos, com impacto negativo na qualidade de vida dos doentes. (10) As diferentes terapêuticas podem ser divididas em terapêutica local (cirurgia e radioterapia) e terapêutica sistémica (quimioterapia, hormonoterapia e imunoterapia). A escolha do tratamento depende de fatores como o tamanho do tumor, o tipo de tumor, a localização, a idade do doente, o seu estado de saúde e a existência de metástases. (11)

1.3.1 Cirurgia

A cirurgia visa a remoção da massa tumoral existente numa parte específica do corpo, sendo que esta remoção pode ser total ou parcial. Normalmente é também retirado algum do tecido circundante ao tumor, de forma a garantir que o mesmo não se volta a desenvolver.(12)

Este tipo de tratamento pode apresentar uma função curativa, em estadios precoces da doença, ou paliativa, de forma a diminuir sintomas que resultam da mesma. A cirurgia pode surgir como tratamento isolado ou em combinação com outras formas de tratamento, nomeadamente a radioterapia e a quimioterapia. (11,13)

1.3.2 Radioterapia

De um modo geral, entende-se por radioterapia um tipo de tratamento onde é utilizada radiação com o intuito de destruir as células cancerígenas. Trata-se de um tratamento a nível local, pois apenas é aplicado na zona onde o tumor se encontra. Esta aplicação pode ocorrer a partir do exterior do corpo ou através de pequenos implantes que contêm o material radioativo. Os principais efeitos adversos são fadiga, edema, irritação cutânea local e alopecia, sendo de referir que, regra geral, os sintomas desaparecem com o fim do tratamento. (14)

1.3.3 Quimioterapia

A quimioterapia é um tratamento que atua diretamente ao nível das células tumorais, impedindo que estas se multipliquem através da interferência em processos de crescimento e divisão celular. É de referir que, de uma forma geral, os fármacos utilizados interferem também com as células saudáveis do organismo. Este tratamento pode apresentar objetivos distintos consoante o estadió do cancro que está a ser tratado. Em termos de efeitos adversos, os mais comuns são fadiga, náuseas, vómitos e diarreia. (15)

Ao longo dos tempos têm vindo a ser desenvolvidos diferentes fármacos que podem ser administrados por diversas vias e, desta forma, o tipo de administração da quimioterapia vai sempre depender de diversos fatores, como: propriedades químicas do fármaco prescrito, estadió do tumor e fase de tratamento. Durante muitos anos, o principal foco passou pela via de administração parenteral, evitando assim o efeito de primeira passagem. No entanto, na última década a administração de quimioterapia por via oral tem vindo a aumentar, essencialmente em consequência do desenvolvimento de fármacos que garantem uma maior biodisponibilidade, sendo exemplo disso o metotrexato e a ciclofosfamida. As principais vantagens associadas à via de administração oral passam essencialmente pelo aumento da qualidade de vida dos doentes, promovendo uma maior autonomia. Para além disso, via de administração oral representa um menor custo para os serviços de saúde. (15,16)

Normalmente a quimioterapia é administrada por ciclos, garantindo um período de descanso que permite ao doente recuperar dos efeitos adversos que possam vir a surgir. Os ciclos podem envolver apenas um dia ou abranger dois ou mais dias, sendo que nestes casos recorre-se a bombas infusoras para a administração. (15)

Existem diferentes tipos de quimioterapia, nomeadamente:

- De indução: este tipo de tratamento permite avaliar a sensibilidade do tumor à quimioterapia, podendo influenciar a decisão entre uma cirurgia e/ou um tratamento mais agressivo. É também utilizada para a erradicação de micrometástases e, desta forma, aumentar a sobrevida livre de progressão da doença e consequentemente a sobrevida global do doente. (17)
- Neoadjuvante: este tipo de quimioterapia é administrada antes de um outro tratamento, com o objetivo de diminuir o tamanho do tumor, facilitando a sua posterior remoção.
- Adjuvante: a quimioterapia é administrada após um outro tratamento, como radioterapia e/ou cirurgia, e visa eliminar ou mitigar a probabilidade de doença residual.
- Paliativa: a quimioterapia é administrada quando o tumor se encontra numa fase avançada e com a presença de metástases, sendo que o objetivo passa essencialmente por diminuir a sintomatologia do cancro. (18)

1.3.4 Hormonoterapia

Alguns cancros, nomeadamente os relacionados com o aparelho reprodutor, podem ser desenvolvidos devido a hormonas produzidas pelo próprio organismo. Nesses casos pode ser utilizada uma terapêutica hormonal, que consiste na alteração da quantidade de hormonas circulantes, de forma a diminuir o crescimento e a progressão do tumor. Este tipo de tratamento é geralmente administrado por via oral, podendo também ser administrado por via subcutânea. (19)

1.3.5 Imunoterapia

A imunoterapia ou terapêutica biológica utiliza substâncias que estimulam o sistema imunitário, de forma a combater o cancro. Para este tipo de tratamento utilizam-se os imunomoduladores, também denominados de modificadores da resposta biológica, que são usados não só na terapêutica anticancerígena mas também em situações de transplante e doenças autoimunes. (20,21)

Alguns dos principais efeitos adversos que se fazem sentir após o tratamento por imunoterapia passam por alterações cutâneas, inflamação intestinal, hipofisite, tiroidite, entre outros. (20)

2 Fármacos anticancerígenos / citotóxicos

No grupo 16 da classificação *Anatomical Therapeutic Chemical Code* encontram-se os antineoplásicos (citotóxicos, hormonas e anti-hormonas) e os imunomoduladores. (12)

Focando a atenção nos citotóxicos, estes podem conduzir a apoptose das células através de mecanismos que podem incluir a interferência direta com o ácido desoxirribonucleico (ADN), a interferência com proteínas (enzimas e/ou recetores) essenciais para o processo de divisão celular, ou ambos. (21,22)

Em termos de classificação, os citotóxicos podem ser divididos de acordo com as suas propriedades bioquímicas, modo de ação e especificidade para o ciclo celular. Considerando as propriedades bioquímicas destes fármacos, as principais classes conhecidas são os agentes alquilantes, os citotóxicos relacionados com os agentes alquilantes, os antimetabólicos, os inibidores da topoisomerasas dos tipos I e II (TOPO I e TOPO II), os citotóxicos que intercalam no ADN, os citotóxicos que interferem na tubulina, os inibidores das tirosinacinasas, entre outros. (21–23)

Muitas vezes os diferentes medicamentos citotóxicos são administrados em associação – terapêuticas de combinação – para que ocorra um efeito aditivo ou sinérgico e, desta forma, seja diminuído o potencial para desenvolvimento de resistências por parte das células cancerígenas. É com base neste aspeto que a especificidade para o ciclo celular apresenta maior relevância. (22,23)

Ao longo da presente dissertação serão explorados com maior detalhe os fármacos que atuam por inibição da TOPO II, isto é, fármacos que inibem a atividade enzimática e que levam a uma interrupção irreversível de processos de transcrição e de replicação do ADN, culminando na morte celular por apoptose. (23,24)

2.1 Topoisomerasas como alvo terapêutico

As topoisomerasas de ADN são enzimas nucleares ubíquas envolvidas na regulação do estado topológico do ADN. Estas enzimas encontram-se presentes tanto em organismos procariotas como eucariotas, podendo estes últimos incorporar duas classes distintas, as

TOPO I e as TOPO II. As enzimas de ambas as classes são consideradas excelentes alvos para terapêuticas anticancerígenas. (25)

2.1.1 Topoisomerases do tipo I

As TOPO I são proteínas monoméricas que não necessitam de cofatores para a sua atividade, no entanto utilizam a energia do ADN superenrolado (positiva ou negativamente). (24) Estas enzimas regulam o estado topológico do ADN através da sua ligação a uma cadeia de ADN, podendo esta ligação ocorrer tanto na posição 3' como na 5'. Após a ligação ocorre a quebra de uma fita de ADN de dupla hélice, permitindo assim a passagem da outra fita ou a rotação da cadeia dupla, tal como se encontra representado na *Figura 1*. (25–27)

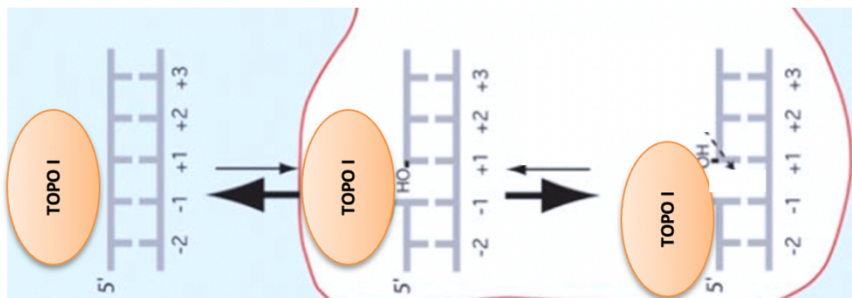


Figura 1- Representação da ligação da TOPO I à cadeia dupla de ADN, com estabilização da fenda formada. Adaptado de (27).

As TOPO I podem classificar-se como TOPO IA, TOPO IB ou TOPO IC com base em fatores como o seu mecanismo de ação (passagem de fita de ADN através da quebra ou rotação da dupla hélice), a ligação entre o ADN e a proteína (3' ou 5') e ainda a dependência de Mg^{2+} . (25,26)

- As TOPO IA, com peso molecular de cerca de 67 kDA, requerem a presença de Mg^{2+} para a sua atividade catalítica. Ligam-se ao ADN através de uma ligação 5'-

fosfodiéster, deixando a extremidade 3'-OH ligada, e impedida de girar livremente. Estas interações resultam na formação de uma fenda que permite a passagem de outra fita de ADN. Após o processo referido, ambas as extremidades do ADN quebrado são religadas. (24)

- As TOPO IB são as únicas TOPO I presentes em organismos eucariotas e por isso serão abordadas com maior detalhe nesta dissertação. Estas enzimas monoméricas apresentam um peso molecular de cerca de 91 kDA, sendo constituídas por 765 aminoácidos que formam 4 domínios distintos: um domínio N-terminal, um domínio ligante, um domínio central e um domínio C-terminal. (24)

A ação da TOPO IB é independente de ATP e Mg^{2+} e apresenta um mecanismo de ação no qual a proteína se liga ao ADN por meio de uma ligação 3'-fosfodiéster, ficando a extremidade 5' disponível para girar em torno da segunda fita de ADN, levando ao seu relaxamento. (25)

Nas células humanas, a função giratória da TOPO I é essencial para remover a tensão super-hélica do ADN durante os processos de transcrição e replicação, sendo também de referir que a atividade desta enzima vem acoplada com a atividade da RNA polimerase II. Acresce que a TOPO IB é a única topoisomerase direcionada exclusivamente para as mitocôndrias, pelo que os danos ao nível desta enzima afetam gravemente a integridade mitocondrial e o metabolismo energético da célula. (26)

- Por fim, a TOPO IC é uma enzima com aproximadamente 110 kDA que foi detetada em *Archaeon Methanopyrus Kandleri*. Não existem informações muito detalhadas acerca desta enzima, no entanto a sua estrutura mostra uma nova dobra que provavelmente se reflete numa localização diferente do sítio ativo da tirosina e, conseqüentemente, num mecanismo de relaxamento diferente do das restantes TOPO I. (26)

2.1.2 Topoisomerases do tipo II

As TOPO II são proteínas homodiméricas que necessitam da presença de ATP e Mg^{2+} para a sua atividade catalítica. São compostas pelos domínios representados na *Figura 2*.

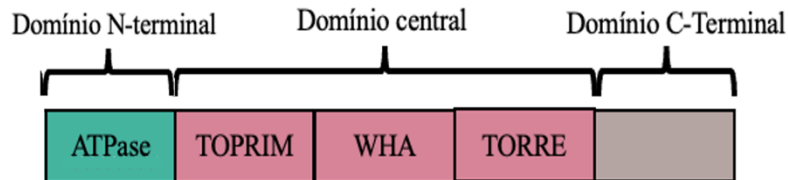


Figura 2- Representação da estrutura das TOPO II com esquematização dos seus domínios. Adaptado de (23,24,26).

Tal como esquematizado nesta figura, a arquitetura das TOPO II é delineada em três regiões funcionais:

- Um domínio N-terminal a partir do qual o ADN entra na enzima, e onde ocorre ligação e hidrólise do ATP, cujos sinais resultantes são transmitidos para o núcleo catalítico da enzima;
- Um domínio central constituído por três componentes: o TOPRIM, responsável por coordenar os iões metálicos bivalentes no sítio ativo da enzima; o WHA (domínio da hélice alada), que inclui o sítio ativo da tirosina; e o domínio TORRE, responsável pela ligação ao ADN;
- Um domínio C-terminal (CTR), variável e responsável pelo reconhecimento do ADN, pois apresenta sinais de localização nuclear e sítios de modificação pós transcricional. (24,25,28).

São conhecidas duas isoformas homodiméricas desta enzima: a TOPO II α , que apresenta um peso molecular em torno dos 170 kDa; e a TOPO II β , cujo peso molecular ronda os 180 kDa. Apesar de serem sintetizadas a partir de genes diferentes, as duas isoformas apresentam cerca de 70% de homologia entre as suas cadeias de aminoácidos. (24–26,28)

A TOPO II α encontra-se sobretudo em células em fase de proliferação, pois associa-se ao crescimento celular, permanecendo fortemente ligada aos cromossomas durante o processo mitótico. O pico da sua expressão é observado nas fases G2-M do ciclo celular, podendo esta isoforma ser utilizada como biomarcador para alguns tipos de cancro. (24–26,28)

Por sua vez, a TOPO II β apresenta um nível de expressão constante e independente do ciclo celular, sendo esta isoforma importante no processo de transcrição de genes regulados por hormonas e no desenvolvimento dos tecidos. (28)

A diferenciação entre a TOPO II α e a TOPO II β é observada em organismos que apresentam as duas isoformas de TOPO II. Nos organismos que transportam uma única isoforma (eucariotas inferiores), a enzima presente deve assumir os papéis de TOPO II α e TOPO II β em simultâneo. (29)

O mecanismo geral de ação das TOPO II encontra-se esquematizado na *Figura 3*.

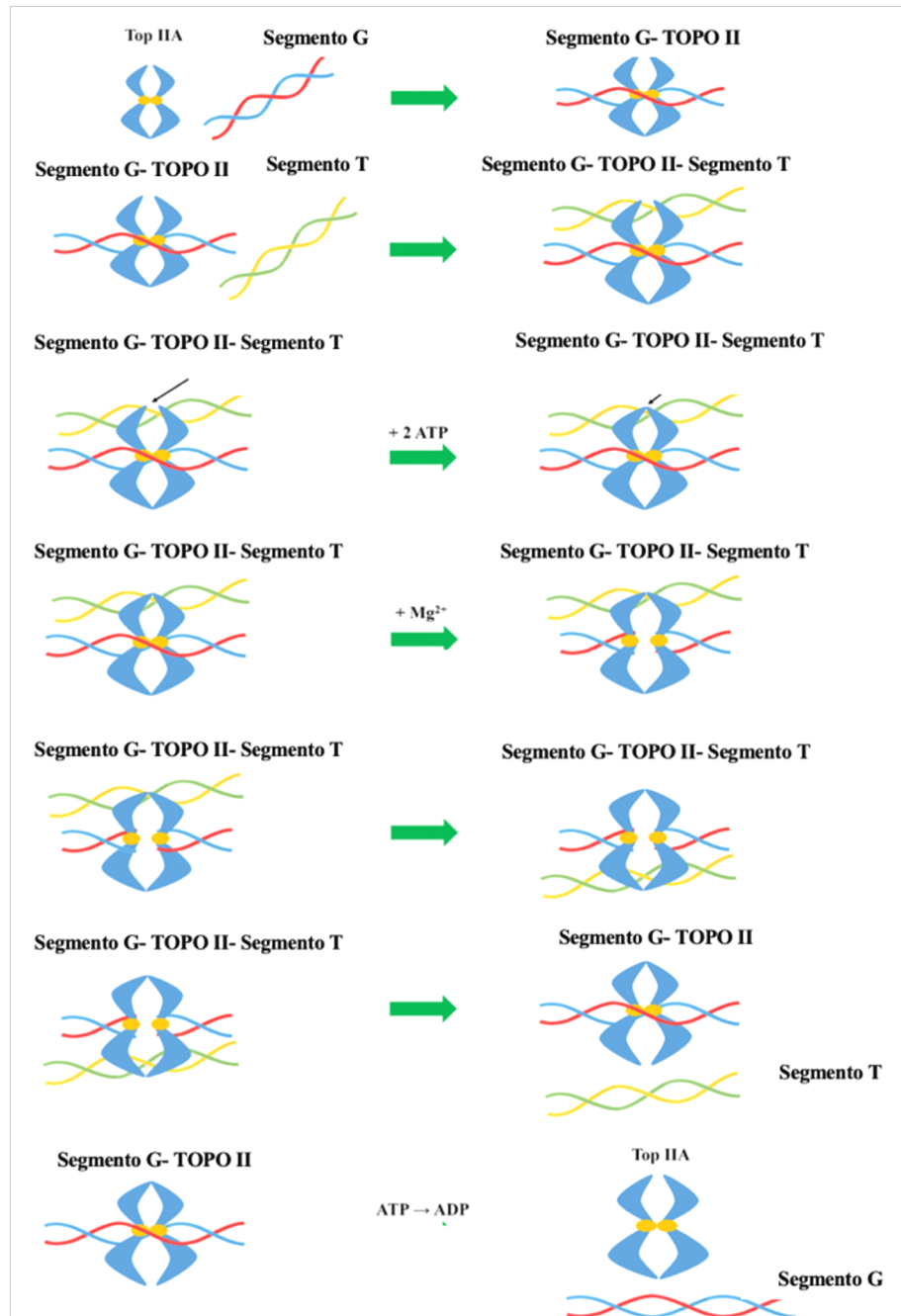


Figura 3- Representação esquemática do mecanismo de ação das TOPO II. Adaptado de (24).

As TOPO II ligam-se ao segmento G da cadeia dupla de ADN, e o complexo formado irá ligar-se ao segmento de transferência – segmento T. (24,26) Posto isto, ocorre a ligação de duas moléculas de ATP, e na presença de iões Mg²⁺ dá-se a consequente clivagem do segmento G, reversível e transitória. Por fim, ocorre a passagem do segmento T pela lacuna criada e posterior religação das fitas quebradas, com hidrólise do ATP. (24,26)

A ação das TOPO II é muito sensível a alterações do ADN, podendo estas provocar uma aceleração da reação de clivagem, favorecendo a proliferação celular, ou o impedimento da religação da cadeia dupla, com consequente acumulação do complexo de clivagem, favorecendo a morte celular. Devido a este fenómeno, e pelo facto destas enzimas se encontrarem em níveis muito elevados em células cancerígenas, surgiu o interesse em estudar o potencial das topoisomerases (tanto a TOPO 1B como a TOPO II α e TOPO II β) como alvos celulares para a terapêutica anticancerígena. Em resultado dos estudos realizados, os inibidores de topoisomerases estão, atualmente, entre os medicamentos anticancerígenos mais amplamente prescritos. (26,30)

Página intencionalmente deixada em branco

3 Inibidores de Topoisomerasas do tipo II

As TOPO II foram identificadas pela primeira vez como alvo terapêutico para fármacos com atividade anticancerígena em 1984. A partir daí foram surgindo vários inibidores das TOPO, tanto TOPO I como TOPO II, que se encontram listados na *Tabela 1*. (31)

Tabela 1- Data da descoberta dos inibidores de TOPO. Adaptado de (32).

Ano de descoberta	Identificação do composto	Enzima inibida
1984	Acridina	TOPO II
1984	Elipticina	TOPO II
1984	Epipodofilotoxinas (Etoposido, tenoposido)	TOPO II
1984	Antraciclinas (Doxorrubicina)	TOPO II
1985	Camptotecina	TOPO I
1986	Antracenediona (Mitoxantrona)	TOPO II
1988	Actinomicina (Actinomicina D)	TOPO I
1989	Benzoquinolinodiona	TOPO II
1992	Indolocarbazol	TOPO I
1993	Bis-benzimidazol	TOPO I
1993	Benzo(c)fenantridina	TOPO I e II
1995	Protoberberina	TOPO I e II
1998	Indenoisoquinolina	TOPO I
1999	Indenoisoquinolinium	TOPO I
2000	Benzacridina	TOPO I
2001	Terpiridina	TOPO I e II
2002	Dibenzonaftiridinona	TOPO I
2002	Isoquino[4,3-c]quinolina	TOPO I
2002	Benzo(a)fenazina-11-carboxamida	TOPO I e II
2003	Aromatacina	TOPO I
2003	Lamelarina (Lamelarina D)	TOPO I
2003	Dibenzol(c,h)cinolina	TOPO I
2003	Benzo(i)fenantridina	TOPO I e II
2005	Norinder isoquinolina	TOPO I
2009	12-Oxobenzo(c)fenantridina	TOPO I
2009	Isoindole-isoquinolina	TOPO I
2009	Evodiamina	TOPO I
2010	Dibenzonaftiridinodiona	TOPO I

Os compostos desenvolvidos para atingir as TOPO II podem atuar através mecanismos distintos: interferir na ligação entre o ATP e a TOPO II; atuar pela estabilização do complexo intermediário TOPO II-ADN; e/ou inibir o acesso da enzima ao ADN. Com base nestes mecanismos de ação, estes agentes são classificados em dois grupos distintos: venenos de topoisomerasas e inibidores catalíticos. (31,33)

3.1 Venenos de Topoisomerasas

Os venenos de topoisomerasas são utilizados na terapêutica anticancerígena, mas também têm utilização como componentes dietéticos e como químicos ambientais. (31) Atuam de forma a aumentar a atividade da enzima TOPO II, através da formação de uma ligação covalente entre a própria TOPO II e o ADN, o que irá promover o aumento da cisão das cadeias duplas de ADN ou a inibição do processo de religação. Ou seja, a formação de compostos intermediários capazes de induzir eventos mutagénicos e letais é amplificada, resultando no efeito citotóxico pretendido com a utilização destes venenos. (25,33)

Uma vez que os níveis de TOPO II são muito elevados em células cancerígenas, comparativamente com os observados em células normais, os venenos de topoisomerasas apresentam uma ação antineoplásica bastante eficaz. (26)

Com base na capacidade de intercalarem ou não o ADN, estes compostos podem ser classificados como agentes intercalantes ou agentes não intercalantes. (31)

3.1.1 Agentes intercalantes do ADN

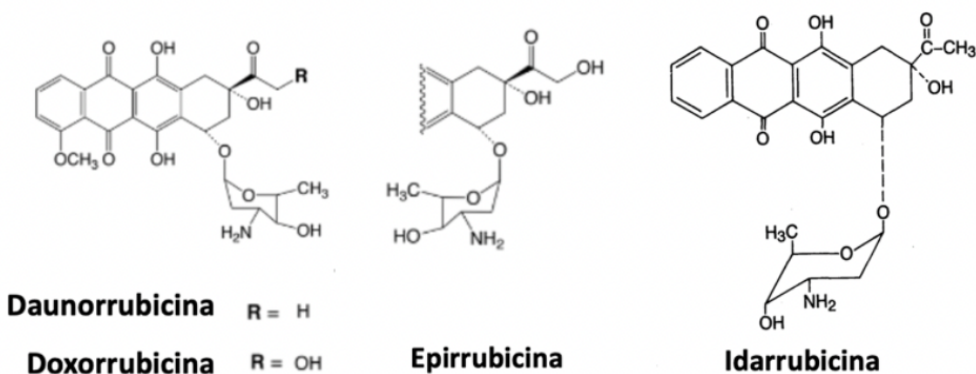
Os venenos de topoisomerasas considerados agentes intercalantes do ADN apresentam estruturas planares capazes de se inserirem entre os pares de bases no complexo de clivagem enzima-ADN, evitando assim a ocorrência de processos como a religação, a replicação e a transcrição do ADN. (31)

Em termos de mecanismo de ação, alguns dos venenos de TOPO II, de que são exemplo as antraciclinas, atuam inibindo a religação do complexo intermediário (TOPOIIcc),

enquanto outros induzem a formação desse mesmo complexo através do aumento da capacidade de cisão das fitas duplas de ADN. (33,34)

Na *Figura 4* estão representadas as estruturas de alguns agentes intercalantes, nomeadamente alguns derivados do antraceno-9,10-diona (antraquinona), que apresentam elevada potência anti tumoral. São exemplos as antraciclina (uma classe que engloba a doxorubicina, a epirrubicina, a daunorrubicina e a idarrubicina) e a mitoxantrona, considerada um análogo das antraciclina. (35,36)

Antraciclina



Análogo das antraciclina

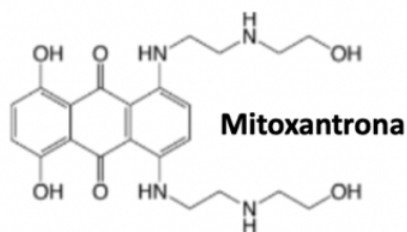


Figura 4- Estrutura química de algumas antraciclina e da mitoxantrona. Adaptado de (37,63).

Como pode ser observado na *Figura 4*, a estrutura das antraciclina incorpora um sistema tetracíclico ligado a um amino-açúcar, originando uma estrutura planar que permite a intercalação destes agentes citotóxicos entre as bases nucleotídicas da cadeia de ADN. Estes agentes citotóxicos apresentam uma elevada eficácia, no entanto, devido à capacidade de formação de complexos ferro-fármaco, podem levar ao aparecimento de

efeitos colaterais, como cardiotoxicidade. (37) Importa referir que a cardiotoxicidade é um efeito adverso dose-dependente, apresentando os pacientes mais jovens uma maior suscetibilidade. (38) Estudos indicam que esta cardiotoxicidade pode estar relacionada com a isoforma TOPO II β , pois a TOPO II α não se encontra presente nos cardiomiócitos. (39) A título de exemplo, a doxorubicina é amplamente utilizada para o tratamento de vários tipos de neoplasia, nomeadamente do ovário, da mama, do sistema nervoso central, da tiróide e linfomas. (24)

A mitoxantrona é um análogo das antraciclinas em que o açúcar daunosamina foi substituído por duas cadeias amino-alquílicas idênticas. Em termos estruturais, apresenta também dois grupos hidroxilo e quatro grupos amina (dois alifáticos e dois anilínicos), sendo que estes podem ser utilizados em estratégias para reduzir a toxicidade dos fármacos antineoplásicos administrados. A estrutura da mitoxantrona, à semelhança da apresentada pelas antraciclinas, é planar, apresentando por isso a capacidade de intercalar entre os pares de bases do ADN. Este composto apresenta um melhor perfil farmacológico quando comparado com a doxorubicina, uma vez que a capacidade de formar radicais livres centrados em oxigénio é bastante menor. No entanto a sua utilização surge também acompanhada de efeitos adversos, como náuseas, vómitos, alopecia, mielossupressão e efeitos mutagénicos, não sendo por isso recomendada durante a gravidez. (24,33,34,40) A mitoxantrona é utilizada no tratamento de leucemias, linfomas, neoplasias do sistema nervoso central, e da próstata. (24) Este fármaco pode ainda atuar de forma sinérgica com outros antineoplásicos, como por exemplo a cisplatina e o 5-fluorouracilo. (40)

3.1.2 Agentes não intercalantes do ADN

Os venenos de TOPO II não intercalantes do ADN não apresentam estruturas planares, atuando por isso através da ligação a um local distal do local ativo do ADN.

Estes agentes não intercalantes inibem a religação das fitas duplas de ADN através da estabilização do complexo intermediário, sendo esta ação responsável pela conversão das TOPO II em toxinas fisiológicas que introduzem altos níveis de clivagens transitórias nas cadeias duplas de ADN. Estas cisões, quando presentes em quantidade significativa, podem desencadear eventos que culminam na morte celular por apoptose. (25,28)

As epipodofilotoxinas são exemplos de venenos de topoisomerases não intercalantes do ADN, destacando-se o pró-fármaco etopósido, cuja estrutura se encontra representada na *Figura 5*. (41)

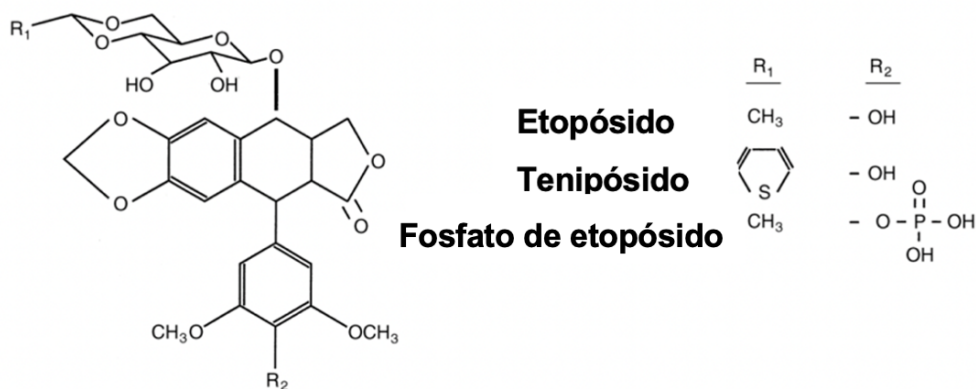


Figura 5- Representação da estrutura do etopósido e de seus derivados. Adaptado de (41).

O etopósido não apresenta uma estrutura planar, não intercalando entre os pares de bases de ADN. Atua sobretudo através da estabilização do complexo intermediário TOPO II-ADN ocorrendo esta estabilização pela ligação de uma molécula de etopósido a cada monómero da enzima TOPO II. (41) O etopósido é frequentemente utilizado no tratamento de linfomas, leucemias, cancro ovárico e cancro testicular. (24)

3.2 Inibidores catalíticos

Os inibidores catalíticos são inibidores da TOPO II que foram ganhando maior expressão, devido à capacidade de provocarem menos danos ao ADN quando comparados com os venenos de topoisomerases acima referidos. Estes inibidores apresentam menor cardiotoxicidade e menor probabilidade de desenvolvimento de metástases. (42)

Os inibidores catalíticos, também designados supressores de TOPO II, são um grupo heterogéneo de compostos capazes de matar as células tumorais através da inibição da atividade enzimática. (33,42,43) Ao contrário dos venenos de TOPO II, podem atuar em diversas fases do ciclo catalítico, tal como ilustrado na *Figura 6*. (43)

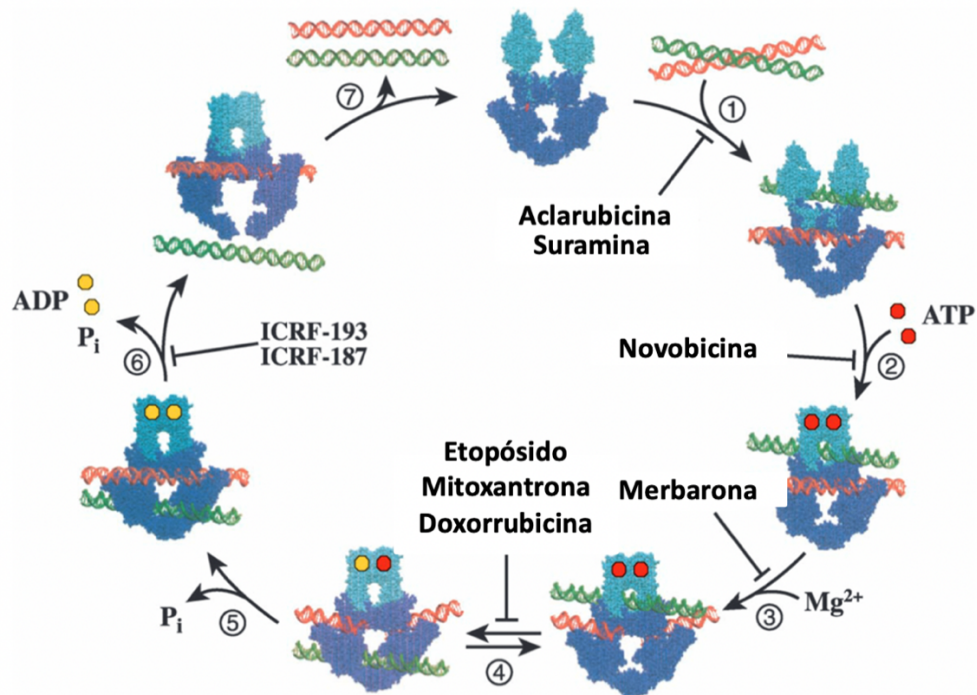


Figura 6- Representação esquemática das fases do ciclo catalítico onde atuam os diferentes inibidores de TOPO II. Venenos de TOPO II: etopósido, mitoxantrona, doxorubicina. Inibidores catalíticos: aclarubicina, suramina, novobicina, merbarona, derivados da bisdioxipiperizina (ICRF-193, ICRF-187). Adaptado de (43).

Os inibidores catalíticos visam impedir a formação do complexo intermediário e, para tal, podem atuar de diversas formas. Mais concretamente, podem atuar interferindo na ligação entre o ADN e a TOPO II (aclarubicina e suramina), inibindo a ligação da enzima ao ATP através do bloqueio do sítio de ligação (novobicina), impedindo a clivagem do próprio ADN (merbarona) ou estabilizando os complexos TOPO II-ADN (derivados de bisdioxipiperizina). (42,43)

A estrutura química dos compostos referidos, com atividade como inibidores catalíticos, encontra-se representada na Figura 7. (43)

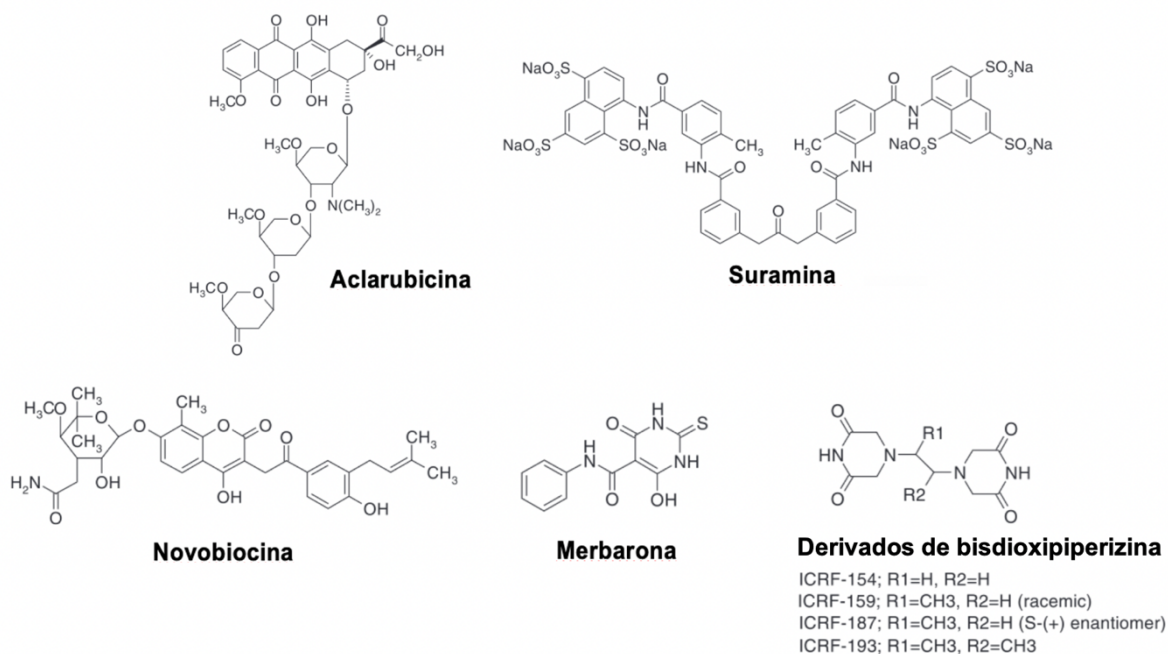


Figura 7- Estrutura química dos diferentes inibidores catalíticos de TOPO II. Adaptado de (43).

A aclarubicina, isolada a partir de *Streptomyces galilaeus*, impede a ligação TOPO II-ADN. Trata-se uma antraciclina que apresenta menor cardiotoxicidade que a doxorubicina, comumente utilizada no tratamento da leucemia mieloide aguda. Considerando as características estruturais deste fármaco considera-se que a aclarubicina é um antagonista dos venenos clássicos de TOPO II. (43,46)

A suramina atua como inibidor catalítico das TOPO II em doses baixas e, tal como a aclarubicina, impede a ligação da enzima ao ADN. Este fármaco é utilizado sobretudo no tratamento do cancro da próstata. (43) Apresenta um tempo de semi-vida no organismo muito longo, superior a 250h, sendo por isso necessário um ajuste individualizado da dose. Dosagens inadequadas podem provocar efeitos colaterais, como neuropatia e linfopenia. (43)

Por sua vez, a novobiocina é um antibiótico aminocumarínico cuja estrutura incorpora dois blocos aromáticos, sintetizados separadamente. Este fármaco pode potenciar a atividade citotóxica de alguns venenos de TOPO II, como o etopósido e o tenipósido. (43,47)

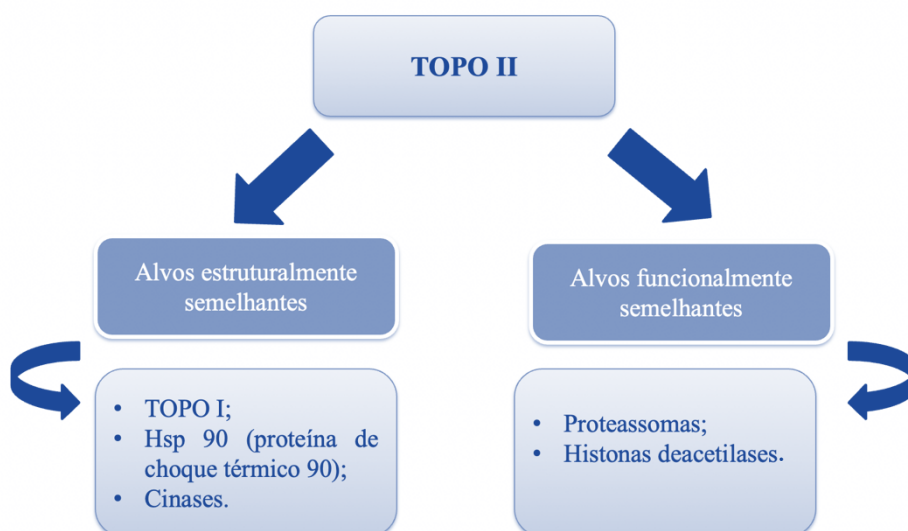
Por fim, a merbarona é um inibidor catalítico que não interage com o domínio ATPase, conhecida por impedir o processo de clivagem das fitas duplas de ADN. (44) Trata-se de um composto derivado do ácido tiobarbitúrico que atua bloqueando a proliferação de várias linhagens de células cancerígenas, tendo já demonstrado efeitos colaterais de nefrotoxicidade. Também apresenta baixa eficácia, em consequência da sua fraca biodisponibilidade a pH fisiológico. (44,45)

De um modo geral, os inibidores catalíticos apresentam menor potência quando comparados com os venenos da TOPO II. Todavia, estes supressores apresentam capacidade para inibir múltiplas topoisomerasas humanas, apresentando potencial para o desenvolvimento de fármacos anticancerígenos muito potentes. (26)

4 Novas estratégias para a inibição das Topoisomerases II

As TOPO II humanas são um importante alvo para a terapêutica antineoplásica. Contudo, apesar dos bons resultados clínicos obtidos pela utilização inibidores de TOPO II o desenvolvimento de resistências conduziu a uma diminuição da sua eficácia. Dados estatísticos mostram que uma das principais causas de morte de pacientes com cancro – cerca de 90% – é atribuída a resistências aos fármacos, uma vez que a perda de eficácia terapêutica leva a dificuldade acrescidas no tratamento do tumor. (23,48)

A resistência aos inibidores de TOPO II resulta, em geral, de uma regulação negativa da enzima alvo, acompanhada por uma regulação positiva compensatória da outra enzima TOPO. Isto é, aquando da utilização de um inibidor de TOPO II, pode-se observar nas células uma diminuição da concentração da TOPO II e, simultaneamente, um aumento da concentração da TOPO I, promovendo uma hipersensibilidade aos inibidores de TOPO I e o aumento da resistência aos inibidores da TOPO II. Obviamente, o processo contrário também pode ocorrer, por isso algumas das estratégias de combate às resistências passam pelo uso de terapias combinadas e pelo desenvolvimento de medicamentos com mais do que um alvo terapêutico. Esta última opção torna-se válida pelo facto das TOPO II serem, do ponto de vista estrutural e funcional, conectadas a muitos outros alvos terapêuticos. (23) Alguns alvos terapêuticos aos quais esta enzima pode ser conectada encontram-se representados na *Figura 8*.



4.1 Inibidores de Topoisomerasas II em terapêutica de combinação

A monoterapia é uma opção terapêutica ainda muito comum. No entanto, quando comparada com a modalidade de terapia combinada é considerada menos eficaz.

A terapêutica combinada envolve a utilização de dois ou mais fármacos, com o objetivo de interferir com vários alvos ou vias metabólicas, retardando o desenvolvimento de resistências em comparação com os tratamentos convencionais. Por envolver vários mecanismos de ação em simultâneo, a terapêutica combinada propicia um efeito sinérgico e/ou aditivo dos fármacos utilizados, sendo necessária uma dose individual menor de cada um deles, o que pode também ser benéfico para o controlo da toxicidade. (49)

Um estudo realizado demonstrou a importância da combinação de CI-994, um inibidor da histona desacetilase 1, com o etopósido, um veneno de TOPO II não intercalante do ADN, no tratamento de um tumor teratóide/rabdóide atípico. Este tumor afeta sobretudo crianças e está associado a um mau prognóstico. Sabe-se que a histona desacetilase 1 se encontra subexpressa nas células tumorais referidas, e aquando da combinação com o etopósido verifica-se um aumento da apoptose. Esta ocorrência foi relacionada com a diminuição da ação da TOPO II e com o aumento da acetilação da histona H3. (50) A *Figura 9* ilustra os mecanismos pelos quais estes fármacos proporcionam o efeito sinérgico pretendido.

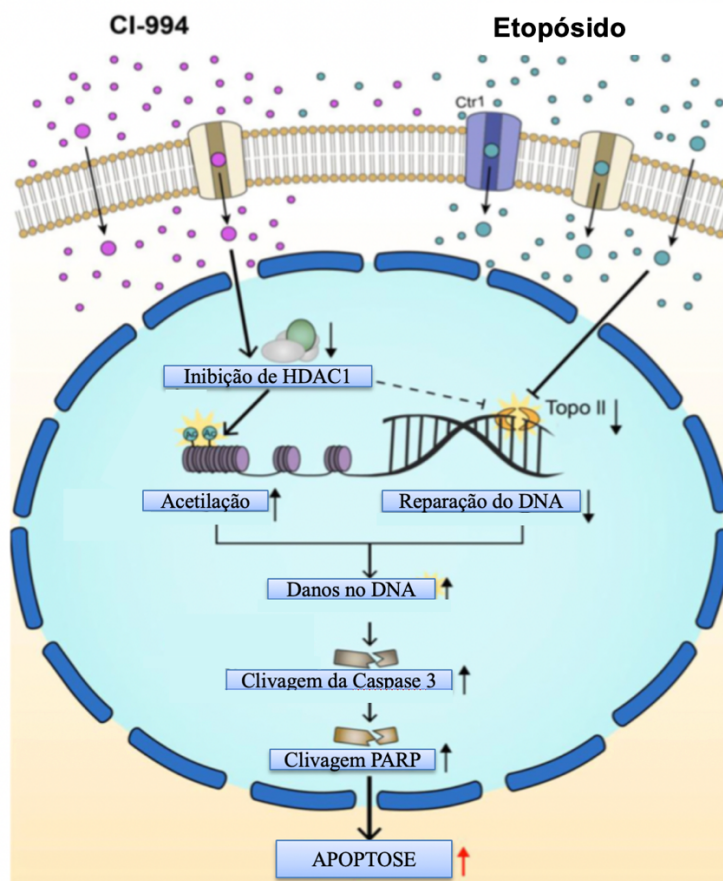


Figura 9- Mecanismos pelos quais a combinação terapêutica de CI-994 e etopósido estimulam a apoptose. HDAC1: histona desacetilase 1. Adaptado de (50).

Na modalidade de terapia combinada, importa destacar que os efeitos obtidos não são apenas dependentes dos fármacos utilizados mas também de outros fatores, nomeadamente, a razão molar dos mesmos e o regime de administração (simultânea ou sequencial). As evidências têm vindo a demonstrar que uma administração sequencial resulta em melhores efeitos no combate ao cancro. (23)

4.2 Inibidores de Topoisomerases II com múltiplos alvos terapêuticos

Na última década, o uso das terapias combinadas foi perdendo espaço face ao *design* e desenvolvimento de fármacos com múltiplos alvos terapêuticos. Esta abordagem traz vantagens que passam por uma farmacocinética mais previsível e menores riscos de interações medicamentosas. (23)

A seleção de alvos para o *design* e desenvolvimento de fármacos com múltiplos alvos terapêuticos baseia-se essencialmente em dados clínicos (obtidos através da administração de terapêuticas de combinação), em dados de triagem fenotípica de combinação de fármacos e/ou em abordagens *in silico*. A estratégia de fármacos multialvo não é somente aplicada na terapêutica antineoplásica, pelo contrário, a sua utilização tem vindo a ser explorada com vista ao tratamento de outras patologias. Um dos exemplos mais bem-sucedidos da aplicação desta abordagem terapêutica conduziu ao aripiprazol, um antipsicótico atípico. (23)

Existem duas estratégias principais de *design* composição e “montagem” de fármacos que atuam em múltiplos alvos, nomeadamente:

- Reações de acoplamento: permitem a introdução de grupos entre duas entidades farmacológicas de alvo único, podendo resultar em perfis farmacocinéticos desfavoráveis e com baixa eficiência;
- Sobreposição de farmacóforos: embora possa ser um processo mais complicado do ponto de vista do *design* molecular e sintético, apresenta geralmente resultados mais aprimorados. Esta sobreposição apenas é aplicável, no caso da TOPO II, quando os alvos terapêuticos possuem semelhanças estruturais e/ou funcionais com a enzima em questão, destacando os mencionados na *Figura 8*. (23)

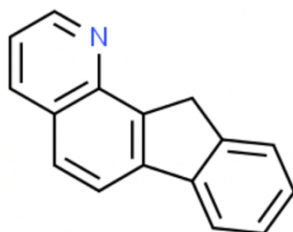
Como referido, as TOPO I e II funcionam sinergicamente, garantindo entre si um mecanismo de compensação, o que faz com que a diminuição dos níveis de uma das TOPO nas células leve a um aumento dos níveis da outra. Logo, inibidores com alvo duplo, que inibam TOPO I e TOPO II permitem atrasar o aparecimento de resistências e produzir a atividade antineoplásica desejada. Estudos realizados mostram que inibidores duplos de TOPO apresentam menor toxicidade e melhor atividade *in vitro*, comparativamente com a terapia combinada. (23,51)

Os inibidores duplos de TOPO I e II podem ser divididos em três grupos: intercalantes, conjugados e não intercalantes. (23)

4.2.1 Intercalantes

À semelhança dos venenos de TOPO II intercalantes do ADN, os inibidores duplos intercalantes de TOPO I e II também apresentam a capacidade de intercalar entre os pares de bases da cadeia dupla de ADN. São moléculas aromáticas com estrutura policíclica planar e representam, atualmente, o maior grupo de inibidores de TOPO I e II. (23)

Neste grupo destacam-se as indenoquinolinas, pela sua elevada capacidade como inibidores das TOPO I e II, sendo também consideradas venenos do ADN. (23) Na *Figura 10*, encontra-se representada a estrutura química do composto parente, a indenoquinolina.



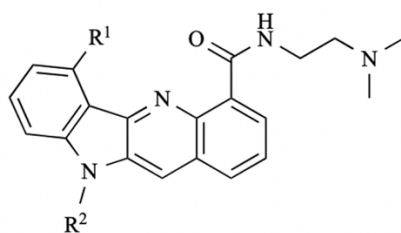
Indenoquinolina

Figura 10- Estrutura química da indenoquinolina.

Software ChemSketch ®

Após a descoberta das indenoquinolinas e das suas propriedades antineoplásicas, foram desenvolvidos análogos com características compartilhadas com alguns inibidores de TOPO I e II de referência, com o objetivo de aumentar a citototoxicidade. (52)

Alguns análogos das indenoquinolinas, que possuem um grupo carboxamida, revelaram propriedades farmacológicas interessantes. Na sequência de estudos de relação estrutura-atividade constatou-se que a introdução de determinados substituintes lipofílicos, como grupos metilo, conduz a análogos com maior atividade de inibição de TOPO I e II. As estruturas encontram-se representadas na *Figura 11*. (52,53)



R¹ = Me; R² = H

R¹ = Me; R² = Me

Análogo da indenoquinolina

Figura 11- Estrutura de análogos da indenoquinolina com um grupo carboxamida.

Software ChemSketch ®

4.2.2 Conjugados

O desenho de conjugados é especialmente útil quando se pretende conjugar grupos farmacofóricos de fármacos que apresentam pouca semelhança entre si. A principal desvantagem desta abordagem é o aumento do peso molecular. (23)

Um exemplo de um fármaco conjugado, cujo desenvolvimento acabou por ser interrompido devido à sua baixa potência, resultou do acoplamento da camptotecina (inibidor da TOPO I) e da podofilotoxina (inibidor da TOPO II), representado na *Figura 12*. (23)

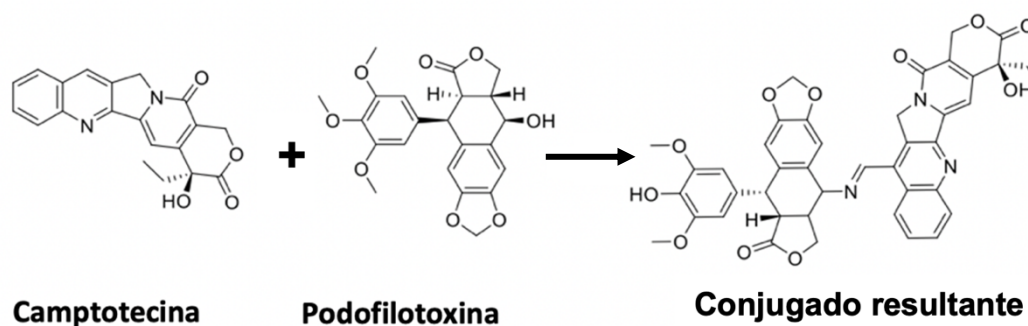


Figura 12- Estrutura química da camptotecina, da podofilotoxina e do conjugado

Software ChemSketch ®.

Para melhor compreender a estratégia subjacente à preparação do conjugado a que se refere a *Figura 12*, é importante lembrar os mecanismos de ação dos fármacos envolvidos. A camptotecina inibe a TOPO I, bloqueando a religação do ADN com consequente acumulação do complexo intermédio na reação. (54) Por sua vez, a podofilotoxina é um precursor de venenos de TOPO II não intercalantes do ADN cujo mecanismo de ação se baseia sobretudo na estabilização do complexo intermédio. (55)

Relativamente a outros conjugados desenvolvidos neste âmbito, a combinação da doxorrubicina e da camptotecina demonstrou ter uma atividade anticancerígena muito promissora, no entanto, este aspeto apenas era verificado para algumas razões molares entre os dois fármacos. Devido às diferentes farmacocinéticas apresentadas torna-se difícil atingir as concentrações ideais, *in vivo*, para a atividade sinérgica desejada. (23)

4.2.3 Não intercalantes

Os fármacos inibidores de TOPO I e II não intercalantes não apresentam capacidade para se posicionarem entre os pares de bases do ADN. As moléculas desta classe que foram desenvolvidas basearam-se numa otimização estrutural que partiu de inibidores seletivos de TOPO I e TOPO II utilizados separadamente, originando posteriormente fármacos com uma atividade inibitória dupla de TOPO I e II. Os principais exemplos desta classe são o taflupósido e o elomotecano, cujas estruturas estão representadas na *Figura 13*.

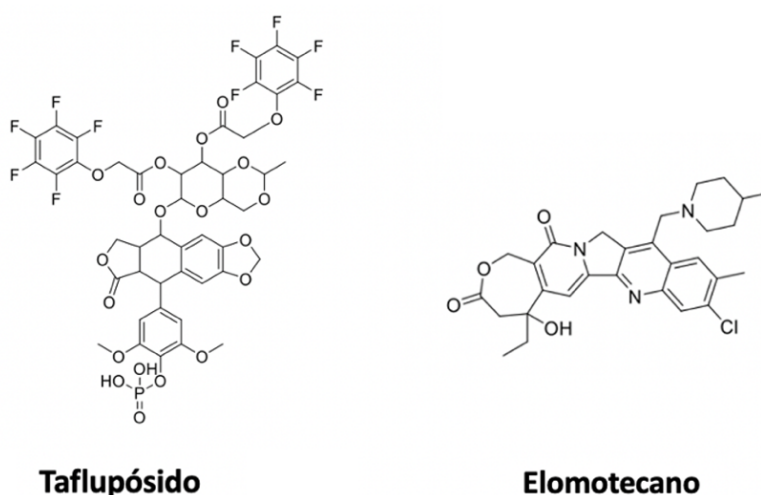


Figura 13- Representação das estruturas do tafluposido e do elomotecano.

Software ChemSketch ®

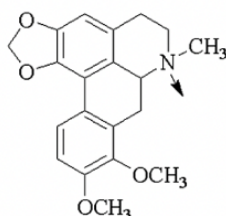
O taflupósido é um inibidor catalítico com atividade tanto para TOPO I como para TOPO II. Este composto mostrou sempre uma citotoxicidade significativa contra células derivadas de tumores hematológicos, tendo a sua excelente atividade citotóxica sido atribuída à indução de apoptose mediada por mitocôndrias. Também é de salientar que o fármaco apresentou uma atividade sinérgica importante quando combinado com a cisplatina, no tratamento do cancro do ovário. Em termos de toxicidade, a exposição ao fármaco conduziu a hepatotoxicidade, sendo esta de curto prazo e reversível. (23,56,57)

O elomotecano é um análogo sintético da camptotecina que apresenta atividade inibitória sobre a TOPO I, apresentando também atividade sobre a TOPO II por inibição catalítica. Estudos mostraram que este composto apresenta maior atividade citotóxica que o irinotecano, o que se justifica pela atividade inibitória concomitante em TOPO II. O elomotecano apresenta perfis farmacocinéticos e toxicológicos aceitáveis. (23,58,59)

Apesar dos dados iniciais promissores, a falta de informações atualizadas, baseadas em estudos mais aprofundados, levou a que o desenvolvimento clínico de ambos os fármacos mencionados fosse interrompido. (23)

De um modo geral, os inibidores com atividade para TOPO I e II são agentes citotóxicos promissores, com menor suscetibilidade a resistências. No entanto, ainda nenhum candidato desta classe foi aprovado para aplicação clínica, pelo que o estudo e desenvolvimento destes fármacos continua a ser essencial. (60)

Mais recentemente, em 2021, realizou-se um estudo sobre a ação anticancerígena de um inibidor duplo como agente antiproliferativo no tratamento do cancro da mama. Trata-se da oxocrebina, que exibe a capacidade de intercalar entre os pares de bases do ADN e cuja estrutura se encontra representada na *Figura 14*. (60)



Oxocrebina

Figura 14- Representação da estrutura química da oxocrebina.

Software ChemSketch ®

O estudo realizado indicou que o fármaco regula os níveis de TOPO I e II e também os níveis de outras proteínas relacionadas com danos no ADN. A capacidade demonstrada pela oxocrebanina em superar os mecanismos de proliferação das células cancerígenas suscita interesse no âmbito do desenvolvimento de novos fármacos antineoplásicos. (60)

4.3 Outras estratégias para melhorar a inibição das Topoisomerases II

Algumas moléculas orgânicas de baixo peso molecular estão a ser investigadas como modeladores enzimáticos, surgindo como uma fonte plausível para futuros medicamentos. As enzimas TOPO II são alvo preferencial no desenvolvimento destas moléculas, que irão influenciar as interações enzima-substrato e/ou bloquear a formação de complexos intermédios, inibindo (ou eliminando) a atividade enzimática. (61)

No caso concreto das TOPO II, estas enzimas têm como substrato o ADN, pelo que o uso de modeladores enzimáticos permitirá interromper o processo de replicação do ADN e as vias de sinalização, causando danos celulares e, conseqüentemente, a morte celular por apoptose. (61) Por exemplo, foram realizados estudos *in vitro* com nanopartículas de ouro, que apresentam uma ligação sequencial e servem como potenciais inibidores enzimáticos para a TOPO II. (61) As nanopartículas de ouro são simples de preparar e o seu tamanho é facilmente modificável, permitindo ajustar a cinética da molécula, aumentar a sua semi-vida e a sua biocompatibilidade. (62)

Página intencionalmente deixada em branco

5 Conclusões

As neoplasias apresentam um crescimento anormal e descontrolado de células, com alterações no processo de renovação celular, resultando na formação de um tumor que pode ser benigno ou maligno. A principal diferença entre ambos reside na capacidade de os tumores malignos invadirem outros órgãos, formando metástases.

O cancro é um problema de saúde pública. São registados anualmente milhões de novos casos e de mortes por cancro. As principais formas de tratamento do cancro são a cirurgia, a radioterapia, a terapia hormonal, a imunoterapia e a quimioterapia. A quimioterapia corresponde à utilização de medicamentos citotóxicos, que geralmente causam a apoptose das células através de mecanismos distintos, como a interferência direta com o ADN ou a interferência com proteínas essenciais para o processo de divisão celular.

Nesta dissertação foi dada especial relevância aos inibidores de topoisomerasas, nomeadamente das TOPO II. Para racionalizar a ação dos inibidores de TOPO II é importante compreender o papel das enzimas TOPO na proliferação celular. As topoisomerasas de ADN são enzimas nucleares ubíquas envolvidas na regulação do estado topológico do ADN. Nos eucariotas, podem surgir as duas classes de TOPO, TOPO I e TOPO II.

As TOPO II são proteínas homodiméricas que necessitam da presença de ATP e Mg^{2+} para a sua atividade catalítica. Do ponto de vista estrutural são constituídas por um domínio N-terminal, um central e um C-terminal.

As TOPO II ligam-se à cadeia dupla de ADN, criando uma incisão de nucleótidos que provoca a quebra da cadeia dupla, de forma reversível e transitória. É através da lacuna criada que é possível a passagem de uma outra cadeia dupla de ADN, sendo o processo novamente revertido através da religação das extremidades de ADN com consequente libertação da TOPO II.

Estas enzimas existem em níveis muito elevados nas células cancerígenas, pelo que os inibidores das TOPO II encontram-se entre os medicamentos anticancerígenos mais amplamente prescritos, podendo estes ser divididos em duas classes, os venenos de topoisomerasas e os inibidores catalíticos.

Os venenos de topoisomerasas atuam aumentando a atividade da enzima, o que resulta ou no aumento da cisão das cadeias duplas ou na inibição do processo de religação. Estes venenos podem subdividir-se em agentes intercalantes e agentes não intercalantes, de acordo com a sua capacidade de se inserirem entre os pares de bases do ADN.

Por sua vez, os inibidores catalíticos, também denominados de supressores de TOPO II, podem atuar impedido a clivagem do ADN, inibindo a hidrólise do ATP ou bloqueando o local de ligação da TOPO II ao ATP.

Apesar dos bons resultados observados durante décadas, o desenvolvimento de resistências tem levado a uma diminuição da eficácia clínica dos inibidores de TOPO II disponíveis para uso clínico. A seleção para resistências a estes fármacos envolve geralmente uma regulação negativa da enzima alvo e uma regulação positiva compensatória de outra enzima TOPO. Por conseguinte, desenvolveram-se estratégias para contornar as resistências aos fármacos: a utilização de terapêuticas combinadas, o desenvolvimento de fármacos com duplo alvo terapêutico, TOPO I e II, e a utilização de modeladores enzimáticos.

A terapia combinada envolve a utilização de dois ou mais fármacos, de forma a interferir com diversas vias catalíticas. Esta modalidade terapêutica permite um controlo da toxicidade e propicia um efeito sinérgico e/ou aditivo, sendo assim necessária uma dose individual mais reduzida de cada um dos agentes.

Os inibidores de múltiplo alvo foram desenvolvidos para alvos estrutural ou funcionalmente semelhantes entre si, como é o caso da TOPO I e TOPO II. Inibidores duplos para TOPO I e II apresentam melhor atividade e menor toxicidade, quando comparados com a terapia combinada. Nenhum inibidor de TOPO I e II foi aprovado para aplicação clínica, pelo que o desenho e desenvolvimento destes fármacos continua a ser essencial e a suscitar interesse na comunidade científica.

A utilização de modeladores enzimáticos, como moléculas orgânicas de baixo peso molecular, no caso concreto das TOPO II, visa a interrupção do processo de replicação do ADN e das vias de sinalização, causando morte celular por apoptose.

6 Referências Bibliográficas

1. Cancro | SNS24 [Internet]. [consultado em 2022 Feb 14]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/cancro/>
2. Almeida V, Leitão A, Reina L, Montanari C, Donnici C, Lopes M. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o ADN: uma introdução. *Quím. Nova*. 2005; 28(1):118–129.
3. Cancer [Internet]. [consultado em 2022 Feb 14]. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
4. Roy P, Saikia B. Cancer and cure: A critical analysis. *Indian J Cancer*. 2016 Jul; 53(3):441-442.
5. Tipos de cancro | SNS24 [Internet]. [consultado em 2022 Feb 14]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-cancro/>
6. Sung H, Ferlay J, Siegel R, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 May; 71(3):209–249.
7. Zugazagoitia J, Guedes C, Ponce S, Ferrer I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L. Current Challenges in Cancer Treatment. *Clin Ther*. 2016 Jul; 38(7):1551–1566.
8. Há 350 mil sobreviventes de cancro em Portugal - Atualidade em Oncologia - SPO [Internet]. [consultado em 2022 Feb 14]. Disponível em: <https://www.sponcologia.pt/pt/comunicados-de-imprensa/ha-350-mil-sobreviventes-de-cancro-em-portugal/>
9. Cancro: Diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso do tratamento da maioria dos cancros - Hospital Distrital de Santarém [Internet]. [consultado em 2022 Feb 14]. Disponível em: <https://www.hds.min-saude.pt/cancro-diagnostico-precoce-e-fundamental-para-o-sucesso-do-tratamento-da-maioria-dos-cancros/>
10. Mun E, Babiker H, Weinberg U, Kirson E, Hoff D. Tumor-treating fields: A fourth modality in cancer treatment. *Clin. Cancer Res*. 2018 Jan; 24(2):266–275.
11. Tipos de tratamento do cancro | SNS24 [Internet]. [consultado em 2022 Feb 16]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-tratamento-do-cancro/>
12. Hickey R, Vouche M, Sze D, Hohlastos E, Collins J, Schirmang T, et al. Cancer concepts and principles: primer for the interventional oncologist-part II. *J Vasc Interv Radiol*. 2013 Aug 24; (8):1167-1188.

13. Cirurgia Oncológica | CUF [Internet]. [consultado em 2022 Feb 16]. Disponível em: <https://www.cuf.pt/cirurgia-oncologica>
14. Radioterapia | SNS24 [Internet]. [consultado em 2022 Feb 16]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-tratamento-do-cancro/radioterapia/>
15. Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil, EPE. Quimioterapia - Guia de Orientação. Porto: 2015. Disponível em: <https://www.ipoport.ipoporto.pt/dev/wp-content/uploads/2017/08/DSN20150006-IPO-Guia-Quimioterapia-E.01.pdf>
16. Intervenção farmacêutica na farmacoterapia com antineoplásicos orais. 2016 [consultado em 2022 Feb 16]; Disponível em: <http://www.nxtbook.com/nxtbooks/calpharm/2013winter/index.php?startid=5#/0>
17. Gau M, Karabajakian A, Reverdy T, Neidhardt EM, Fayette J. Induction chemotherapy in head and neck cancers: Results and controversies. *Oral Oncol.* 2019 Aug 1;95:164–9.
18. Quimioterapia | SNS24 [Internet]. [consultado em 2022 Feb 16]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-tratamento-do-cancro/quimioterapia/>
19. Hormonoterapia | SNS24 [Internet]. [consultado em 2022 Feb 16]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-tratamento-do-cancro/hormonoterapia/>
20. Imunoterapia | SNS24 [Internet]. [consultado em 2022 Feb 16]. Disponível em: <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-oncologicas/tipos-de-tratamento-do-cancro/imunoterapia/>
21. Despacho nº 4742/2014, de 21 de março [Internet]. [consultado em 2022 Feb 16]. Disponível em: https://www.infarmed.pt/documents/15786/1072289/110-AB6_Desp_4742_2014_VF.pdfhttps://www.infarmed.pt/documents/15786/1072289/110-AB6_Desp_4742_2014_VF.pdf
22. Caley A, Jones R. The principles of cancer treatment by chemotherapy. *Surgery.* 2012 Apr;30(4):186–90.
23. Skok Ž, Zidar N, Kikelj D, Ilaš J. Dual Inhibitors of Human ADN Topoisomerase II and Other Cancer-Related Targets. *J Med Chem.* 2019 Feb; 63(3):884–904.
24. Buzun K, Bielawska A, Bielawski K, Gornowicz A. ADN topoisomerases as molecular targets for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020 Jan; 35(1):1781–1799.
25. Baglini E, Salerno S, Barresi E, Robello M, Settimo F, Taliani S, et al. Multiple Topoisomerase I (TopoI), Topoisomerase II (TopoII) and Tyrosyl-ADN Phosphodiesterase (TDP) inhibitors in the development of anticancer drugs. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2021 Jan; 156:105594.

26. Delgado J, Hsieh C, Chan N, Hiasa H. Topoisomerases as anticancer targets. *Biochem J*. 2018 Jan; 475(2):373-398.
27. Pommier Y. ADN Topoisomerase I Inhibitors: Chemistry, biology and interfacial Inhibition. *Chem Rev*. 2009 Jul; 109(7):2894-2902.
28. Vann K, Oviatt A, Osheroff N. Topoisomerase II Poisons: Converting Essential Enzymes into Molecular Scissors. *Biochemistry*. 2021 Jun; 60(21):1630-1641.
29. Lee J, Berger J. Cell cycle-dependent control and roles of ADN topoisomerase II. *Genes (Basel)*. 2019 Nov; 10(11):859.
30. Riccio A, Schellenberg M, Williams R. Molecular Mechanisms of Topoisomerase 2 ADN-Protein Crosslink Resolution. *Cell Mol Life Sci*. 2020 Jan; 77(1):81-91.
31. D'Arcy N, Gabrielli B. Topoisomerase II Inhibitors and Poisons, and the Influence of Cell Cycle Checkpoints. *Curr Med Chem*. 2017 Dec; 24(15):1504-1519.
32. Khadka D, Cho W. Topoisomerase inhibitors as anticancer agents: a patent update. *Expert Opin. Ther. Pat*. 2013; 23(8); 23(8): 1033–1056.
33. ADN topoisomerases e seu papel como alvo farmacológico: uma revisão [Internet]. 2017 [consultado em 2022 Jun 16]; Disponível em: <https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/29252r>
34. Pommier Y, Leo E, Zhang H, Marchand C. ADN Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem Biol*. 2010 May 5; 17(5):421-433.
35. Cytotoxic Antibiotics. LiverTox: Clinical and Research Information on Drug-Induced Liver Injury [Internet]. 2012 [consultado em 2022 Ago 22]; Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643644/>
36. Tikhomirov A, Shtil A, Shchekotikhin A. Advances in the Discovery of Anthraquinone-Based Anticancer Agents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2018 Dec; 13(2):159-183.
37. Pommier Y. Drugging Topoisomerases: Lessons and Challenges. *ACS Chem Biol*. 2013 Jan 1; 8(1):82-95.
38. Bhagat A, Kleinerman E. Anthracycline-Induced Cardiotoxicity: Causes, Mechanisms, and Prevention. *Adv Exp Med Biol*. 2020; 1257:181–192.
39. Singh S, Pandey V, Yadav K, Yadav A, Dwivedi U. Natural Products as Anti-Cancerous Therapeutic Molecules Targeted towards Topoisomerases. *Curr Protein Pept Sci*. 2020 Sep; 21(11):1103–1142.
40. Buczkowski A, Tokarz P, Stepniak A, Lewkowski J, Rodacka A, Palecz B. Spectroscopic and calorimetric studies of interactions between mitoxantrone and cucurbituril Q7 in aqueous solutions. *J Mol Liq*. 2019 Sep 15;290.

41. Hande K. Clinical Oncology Update Etoposide: Four Decades of Development of a Topoisomerase II Inhibitor. *Eur J Cancer*. 1998; 34(10):1514-1521.
42. Hu W, Huang X, Wu J, Yang L, Zheng Y, Shen Y, et al. Discovery of Novel Topoisomerase II Inhibitors by Medicinal Chemistry Approaches. *J Med Chem*. 2018 Oct 25; 61(20):8947–8980.
43. Larsen AK, Escargueil AE, Skladanowski A. Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacol Ther*. 2003 Aug 1;99(2):167–181.
44. Tripathi N, Guchhait SK, Bharatam P v. Pharmacoinformatics analysis of merbarone binding site in human topoisomerase II α . *J Mol Graph Model*. 2019 Jan; 86:1–18.
45. Spallarossa A, Lusardi M, Caneva C, Profumo A, Rosano C, Ponassi M. Bicyclic basic merbarone analogues as antiproliferative agents. *Molecules*. 2021 Feb; 26(3).
46. Cresteil T. Aclarubicin. Reference Module in Biomedical Sciences. 2017 Jan; 1-5.
47. Gómez I, Stevenson C, Usón I, Meyers CL, Walsh C, Lawson D. The crystal structure of the novobiocin biosynthetic enzyme NovP: the first representative structure for the TylF O-methyltransferase superfamily. *J Mol Biol*. 2010 Jan; 395(2):390–407.
48. Bukowski K, Kciuk M, Kontek R. Mechanisms of multidrug resistance in cancer chemotherapy. *Int. J. Mol. Sci. MDPI AG*. 2020; 21(9):3233.
49. Mokhtari R, Homayouni T, Baluch N, Morgatskaya E, Kumar S, Das B, et al. Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*. 2017 Jun 6; 8(23):38022-38043.
50. Kim H, Choi S, Koh E, Kim K, Phi J, Lee J, et al. Combination Treatment of CI-994 With Etoposide Potentiates Anticancer Effects Through a Topoisomerase II-Dependent Mechanism in Atypical Teratoid/ Rhabdoid Tumor (AT/RT). *Front Oncol*. 2021 Jul; 11:648023.
51. Deng X, Luo T, Zhang X, Li Y, Xie L, Jiang W, et al. Design, synthesis and biological evaluation of 3-arylisquinoline derivatives as topoisomerase I and II dual inhibitors for the therapy of liver cancer. *Eur J Med Chem*. 2022 Jul; 237.
52. Lavrado J, Moreira R, Paulo A. Indoloquinolines as Scaffolds for Drug Discovery. *Curr Med Chem*. 2010; 17(22): 2348-2370.
53. Deady L, Desneves J, Kaye A, Finlay G, Baguley B, Denny W. Positioning of the carboxamide side chain in 11-oxo-11H-indeno[1,2-b]quinolinecarboxamide anticancer agents: Effects on cytotoxicity. *Bioorg Med Chem*. 2001 Feb; 9(2):445–452.
54. Liu L, Desai S, Mao Y, Sun M, Sim S. Mechanism of Action of Camptothecin. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 922:1-10.

55. Canel C, Moraes RM, Dayan FE, Ferreira D. Molecules of interest: Podophyllotoxin. *Phytochemistry*. 2000 May 1; 54(2):115–120.
56. Sargent, M. Jean, Elgie, W. Alena, Williamson, J. C, Hill, T. B. Ex vivo effects of the dual topoisomerase inhibitor tafluposide (F 11782) on cells isolated from fresh tumor samples taken from patients with cancer: *Anti-Cancer Drugs*. 2003 Jul; Vol 14:467.473.
57. Delord J, Bennouna J, Dieras V, Campone M, Lefresne F, Aslanis V, Douillard J. First-in-man study of tafluposide, a novel inhibitor of topoisomerase I and II. *Mol Cancer Ther*. 2007 Nov; 6(11_Supplement): A138.
58. Demarquay D, Huchet M, Coulomb H, Lesueur-Ginot L, Lavergne O, Kasprzyk P, et al. The homocamptothecin BN 80915 is a highly potent orally active topoisomerase I poison. *Anticancer Drugs*. 2001 Jan; 12(1):9-19.
59. Lavergne O, Harnett J, Rolland A, Lanco C, Lesueur-Ginot L, Demarquay D, et al. BN 80927: A novel homocamptothecin with inhibitory activities on both topoisomerase I and topoisomerase II. *Bioorg Med Chem Lett*. 1999 Sep; 9(17):2599–2602.
60. Yu L, Han S, Lang L, Song H, Zhang CY, Dong L, et al. Oxocrebanine: A Novel Dual Topoisomerase inhibitor, Suppressed the Proliferation of Breast Cancer Cells MCF-7 by Inducing ADN Damage and Mitotic Arrest. *Phytomedicine*. 2021 Apr; 84:153504.
61. Dubey A, Singh V, Doharey P, Sk M, Samanta S, Nema V, et al. Modulating catalytic activity of human topoisomerase II α enzyme by fluorescent gold nanoclusters. *Int J Biol Macromol*. 2021 Feb; 170:523–531.
62. Önen Ü, Botsali F, Kalyoncu M, Sahin Y, Tinkir M. Design and motion control of a lower limb robotic exoskeleton. *Design, control and applications of mechatronic systems in engineering, InTech Open*. 2017.