



REF - ISSN 1808-0804 Vol. VII (4), 22 - 29, 2010

**AVALIAÇÃO DE PROPRIEDADES TOXICOLÓGICAS DE FÁRMACOS *IN SILICO* NO CURSO EXPERIMENTAL DE QUÍMICA MEDICINAL**

***IN SILICO* EVALUATION OF DRUGS TOXICOLOGICAL PROPERTIES IN THE PRACTICAL COURSE OF MEDICINAL CHEMISTRY**

**Monique Araujo de Brito**

Email da autora para correspondência: [moniquebrito@vm.uff.br](mailto:moniquebrito@vm.uff.br)

*Recebido em 15/06/2010, Aceito em 27/10/2010*

**Resumo**

As ferramentas computacionais constituem importante meio para auxiliar o entendimento de conceitos na disciplina de Química Medicinal. Neste trabalho mostra-se um roteiro de aula prática realizada dentro desta disciplina utilizando quatro fármacos com diferentes tempos de mercado e um programa gratuito de avaliação toxicológica dos riscos mutagênico e tumorigênico, efeitos irritantes e sobre o sistema reprodutivo de compostos químicos. O objetivo foi apresentar aos alunos esta metodologia *in silico* atual, discutir conceitos toxicológicos com base nos resultados obtidos e analisar a importância dos estudos toxicológicos na área farmacêutica. Os fundamentos da matéria foram contextualizados e a nova abordagem mostrou-se uma ferramenta importante no processo ensino-aprendizagem.

**Palavras-chave:** Química medicinal, Ensino, Biologia computacional, Propriedades toxicológicas.

**Abstract**

The computational tools are important to help the understanding of concepts in the medicinal chemistry discipline. This work shows a guide of practical lesson within this discipline using four drugs with different market time and a free program of toxicological evaluation of mutagenic and tumorigenic risks, irritant and reproductive effects of chemical compounds. The objective was to introduce students to the current *in silico* methodology, to discuss toxicological concepts based on the results and to analyze the importance of toxicological studies in the pharmaceutical area. The fundamentals of the discipline were contextualized and the new approach proved to be an important tool in the teaching-learning process.

**Keywords:** Medicinal chemistry, Education, Computational biology, Toxicological properties.

**Introdução**

Novas estratégias vem sendo incorporadas às aulas práticas de Química Medicinal (Q.M.) com o objetivo de melhorar o processo de ensino-aprendizagem, tendo em vista a importância desta disciplina do currículo farmacêutico. Posto que inúmeras

transformações e melhorias vem marcando a área de Q.M. nos últimos anos, é importante que os alunos de Graduação sejam inseridos nessas novas abordagens da área, com o uso de recursos tecnológicos necessários e fundamentais. O uso de métodos e metodologias de modelagem molecular é um

exemplo de inovação incorporada às aulas práticas da disciplina (XIE, 2002).

No conteúdo das aulas de Química Medicinal são abordados tópicos que envolvem as fases farmacêutica, farmacocinética e farmacodinâmica. A fase farmacêutica relaciona-se à via de administração dos fármacos (enteral ou parenteral) e à forma farmacêutica (comprimido, solução, etc). A fase farmacocinética diz respeito a quatro etapas: Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME). Também vem sendo incorporado ao estudo da fase farmacocinética a avaliação toxicológica de candidatos a novos fármacos, acrescentando à sigla ADME o acrônimo Tox, resultando no estudo "ADME-Tox". E a fase farmacodinâmica relaciona-se à interação fármaco-macromolécula, quando se trata de um fármaco estruturalmente específico (THOMAS, 2003; KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Quando a fase farmacocinética é abordada em sala de aula discute-se sobre a importância dos estudos toxicológicos com candidatos a fármacos, enfocando os aspectos mutagênico, teratogênico, efeitos irritantes, carcinogenicidade, entre outros, dando definições e exemplos. O potencial mutagênico está relacionado ao risco do composto de interagir com o DNA causando mutações que podem ser transmitidas aos descendentes; os potenciais tumorigênico, irritante e sobre a reprodução relacionam-se, respectivamente, ao risco de causar tumores, de ser irritante ao organismo humano e de ser teratogênico, causando defeitos físicos em fetos, ou atuar sobre o sistema reprodutivo em geral (KLAASSEN, 2006).

Um exemplo muito divulgado e difundido na literatura científica e em salas de aula é o da talidomida, fármaco com alto potencial teratogênico que causou deformações grotescas em milhares de crianças nas décadas de 1960, 70 e 80. O desastre com a talidomida serviu como exemplo para avaliações cada vez mais rigorosas de candidatos a fármacos por parte da indústria farmacêutica e de centros que desenvolvem fármacos (THOMAS, 2003; KOROLKOVAS & BURCKHALTER, 1988).

Atualmente, para auxiliar a avaliação toxicológica de candidatos a fármacos, a indústria farmacêutica e centros de pesquisa no mundo inteiro realizam *screening* (avaliação) de seus compostos *in silico*, ou seja, com a ajuda do computador. Uma vez

que o planejamento de um novo fármaco seguido dos testes necessários a sua liberação comercial consome investimentos em Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) da ordem de milhões de dólares e décadas de trabalho de uma equipe multidisciplinar, para otimizar tempo e custos novas ferramentas vem sendo introduzidas nesse processo de avaliação de um candidato a fármaco (TETKO et al, 2006). O uso de inovações científicas e tecnológicas, combinando conhecimentos multidisciplinares de informática, biotecnologia, química e biologia, traduz-se em um planejamento mais seguro e efetivo de um novo fármaco, o que é incentivado e apoiado pela agência regulatória de fármacos e alimentos norte-americana (*Food and Drug Administration*, FDA) (VALERIO, 2009).

Seguindo esse contexto, um dos principais desafios para o desenvolvimento de fármacos é a avaliação de sua toxicidade em seres humanos (DREWS, 2003). Atualmente, métodos toxicológicos *in silico* estão demonstrando enorme utilidade na produção de informação para a indústria farmacêutica e grupos de pesquisa em Universidades no estágio de planejamento de fármacos, ajudando a identificar em fase pré-clínica compostos com baixo potencial toxicológico (VALERIO, 2009; SNYDER, 2009; FDA/CDER, 2008; MUSTER et al, 2008). Bons artigos de revisão publicados por especialistas na área descrevem programas específicos para isso (KAVLOCK et al, 2008; MUSTER et al, 2008).

O termo "toxicidade *in silico*" refere-se a experimentos computacionais, cálculos matemáticos ou análise científica de dados de substâncias químicas através de ferramentas computacionais que os analise e faça a predição da uma possível atividade toxicológica. A agência de proteção ambiental dos Estados Unidos da América (*Environmental Protection Agency*, EPA) define toxicidade *in silico* como "a integração da computação e tecnologia da informação com biologia molecular para melhorar a priorização de requerimentos e predizer o potencial de risco de compostos químicos" (KAVLOCK et al, 2008).

Neste trabalho reporta-se uma aula prática computacional na disciplina de Q.M. mostrando as bases e a utilização do uso do aplicativo *web* Osiris para predição *in silico* da toxicidade de fármacos (Osiris®, Actelion Pharmaceutical Ltd.). O objetivo específico da aula foi apresentar aos alunos esta ferramenta computacional disponível na *web*, de uso

gratuito, uma vez que na aula teórica da disciplina é abordado que as tecnologias atuais *in silico* vem se tornando ferramentas importantes no processo de planejamento de fármacos (*drug design*). Nesse sentido, as aulas tornam-se mais atrativas e os conteúdos são mais facilmente absorvidos quando eles podem realizar na prática esse processo.

É válido ressaltar que o Osiris<sup>®</sup> vem sendo usado por alguns grupos de pesquisas na avaliação *in silico* de potenciais efeitos tóxicos de candidatos a fármacos (ANDRIGHETTI-FROHNER et al, 2009; SILVA et al, 2009).

## Materiais e Métodos

### Escolha dos fármacos para a avaliação de propriedades toxicológicas *in silico*

Para a prática de avaliação da toxicidade *in silico* foram escolhidos os fármacos raltegravir (Isentress<sup>®</sup>, Merck), atorvastatina (Lipitor<sup>®</sup>, Pfizer), nifurtimox (Lampit<sup>®</sup>, Bayer) e benznidazol (Rochagan<sup>®</sup>, Hoffman-La Roche) (Figura 1). Foram escolhidos poucos fármacos porque o objetivo da aula era tão somente apresentar esta nova e atual ferramenta aos alunos e suscitar uma discussão breve sobre os parâmetros a que temos acesso no Osiris<sup>®</sup>.

A escolha baseou-se no tempo de lançamento dos fármacos para uma posterior discussão sobre as exigências atuais na área de avaliação toxicológica. O raltegravir é o fármaco mais novo, seguido da atorvastatina, nifurtimox e benznidazol.

Antes de desenhá-los no Osiris, os alunos procurariam as estruturas químicas dos fármacos no site do Banco de Dados de Fármacos, DrugBank ([www.drugbank.ca](http://www.drugbank.ca)).

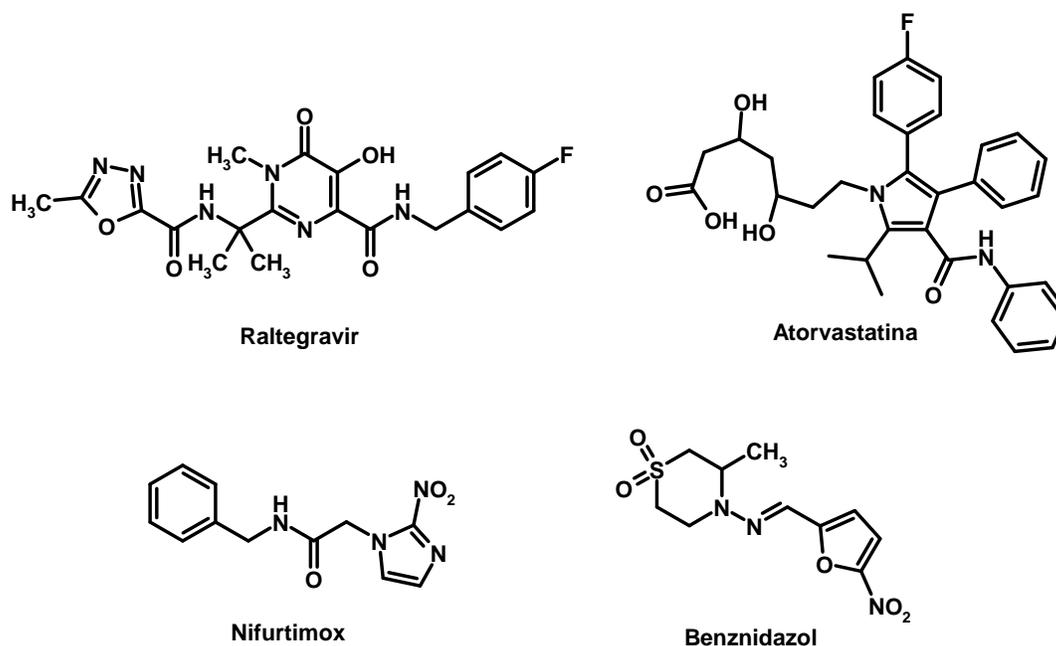


Figura 1. Estruturas químicas dos fármacos escolhidos para avaliação do risco toxicológico *in silico*.

### Critério de avaliação toxicológica do Osiris<sup>®</sup>

Quando se desenha uma estrutura química no Osiris<sup>®</sup> o algoritmo preditivo do programa avalia o potencial risco toxicológico da entidade química. Essa predição baseia-se na comparação do conjunto de fragmentos estruturais que a estrutura possui com o conjunto de fragmentos do "Registo de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas" (*Registry of Toxic Effects of Chemical Substances*, RTECS)

do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (*Center for Disease Control and Prevention*, CDC), órgão norte-americano (<http://www.cdc.gov/>), e com mais de 3 mil fármacos comerciais. Assumindo-se que fármacos comerciais são em sua maior parte isentos de efeitos tóxicos, um fragmento é considerado de risco se ele ocorrer na lista do RTECS e não ocorrer ou ocorrer raramente nos fármacos comerciais do banco de dados. Da coleção de compostos do RTECS, 7504 tem propriedades mutagênicas, 2841 apresentam

propriedades tumorigênicas, 2372 apresentam efeitos irritantes e 3570 possuem efeitos sobre o sistema reprodutivo (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/tox.html>).

As predições são registradas através de um código de cores que indica o grau dos efeitos. Composto com alto risco de mutagenicidade, por exemplo, é avaliado na cor vermelha, enquanto que a cor verde registra um composto isento de efeito tóxico; a cor amarela indica um alerta para determinada propriedade. Estes alertas são uma indicação de que o composto pode ser perigoso no que diz respeito à categoria especificada. Entretanto, alertas de risco não objetivam ser uma predição de certeza de toxicidade, como é especificado no próprio *site*. Nem deve ser concluído pela ausência de risco mostrada pelo programa que aquela substância é isenta de qualquer efeito tóxico.

## Resultados e Discussão

O primeiro fármaco avaliado foi o raltegravir, um fármaco recente aprovado pelo FDA para tratamento da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (*Human Immunodeficiency Virus*, HIV) e que tem como alvo a enzima integrase do HIV-1. O raltegravir é exemplo de fármaco planejado baseado na estrutura do receptor (*Receptor-Based Drug Design*, RBDD), com o auxílio de técnicas computacionais (*Computer-Aided Drug Design*, CADD).

Os alunos procuraram a estrutura do raltegravir no *DrugBank*, desenharam a estrutura no servidor *web* Osiris® e constataram que ele não apresenta nenhum efeito tóxico no que diz respeito a mutagenicidade, tumorigenicidade, efeitos irritantes ou sobre a reprodução, pois todos os círculos estavam verdes (Figura 2). No entanto, foi discutido com eles que a despeito desses efeitos avaliados pelo programa, outros efeitos adversos podem ocorrer com o fármaco, que já está em avaliação em fase clínica IV.

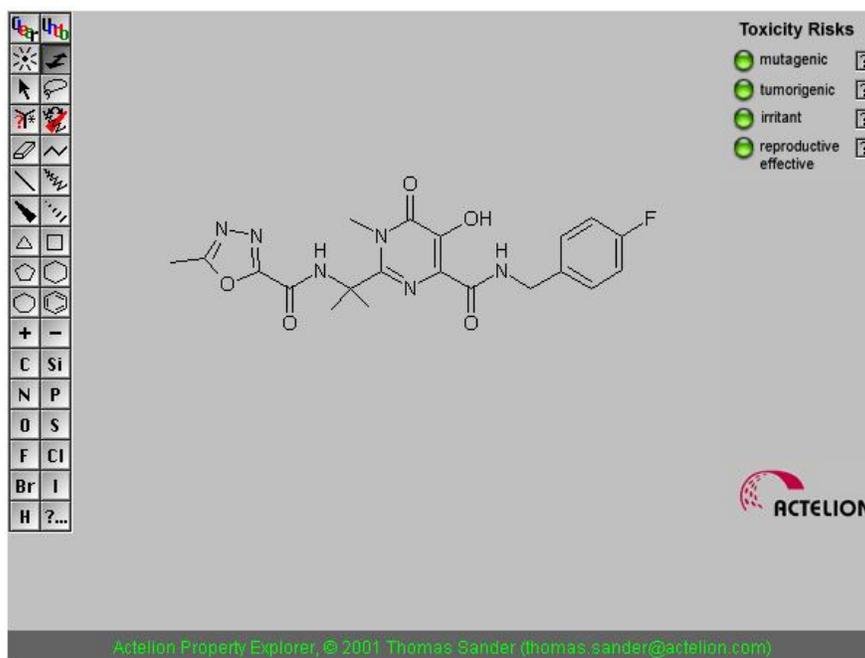


Figura 2. Avaliação toxicológica *in silico* do fármaco raltegravir pelo Osiris.

O segundo fármaco avaliado foi a atorvastatina, da classe das estatinas, um *blockbuster* inibidor da hidroximetilglutaril coenzima A redutase (HMG-CoA redutase), enzima importante na via de biossíntese do colesterol humano. A atorvastatina também é exemplo de fármaco planejado por uma equipe multidisciplinar de químicos medicinais.

Assim como para o raltegravir, a atorvastatina também não demonstrou nenhum risco tóxico *in silico* no que diz respeito às características levadas em conta pelo programa (Figura 3).

Desde que foi lançada no mercado, já há diversos estudos mostrando que esta classe de inibidores da HMG-CoA possui um efeito adverso comum, a rabdomiólise. Dessa forma,

já há pesquisas envolvendo inibidores para outras enzimas responsáveis pela biossíntese

do colesterol, que apresentem menores efeitos adversos.

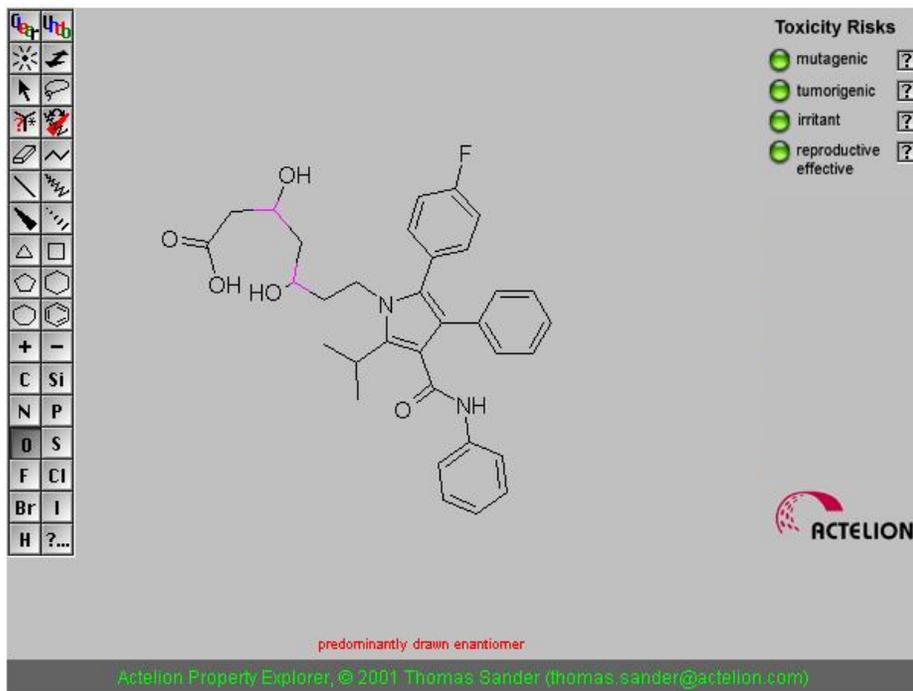


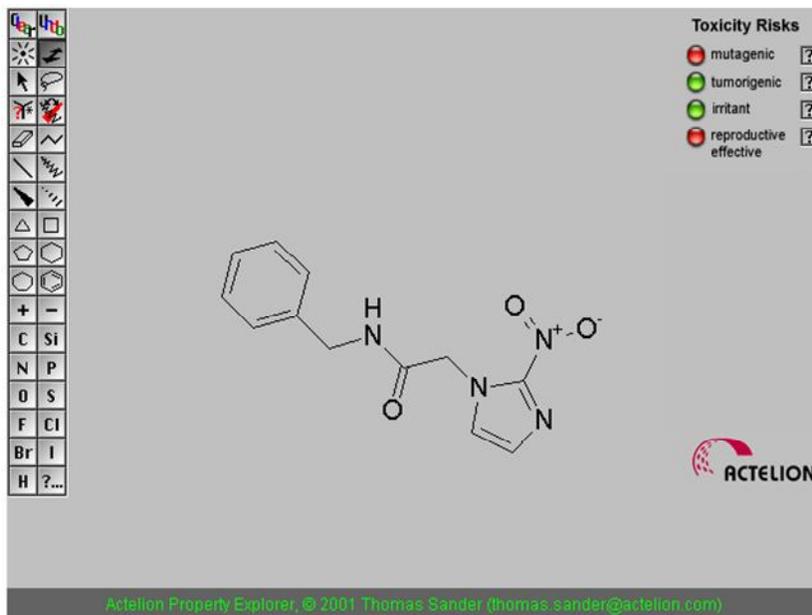
Figura 3. Avaliação toxicológica *in silico* do fármaco atorvastatina pelo Osiris.

Os dois últimos fármacos a serem avaliados foram o benznidazol e o nifurtimox, ambos fármacos antigos, com sérios efeitos indesejados ao paciente, e mecanismos de ação ainda discutidos na literatura científica, usados no tratamento da doença de Chagas desde a década de 1960.

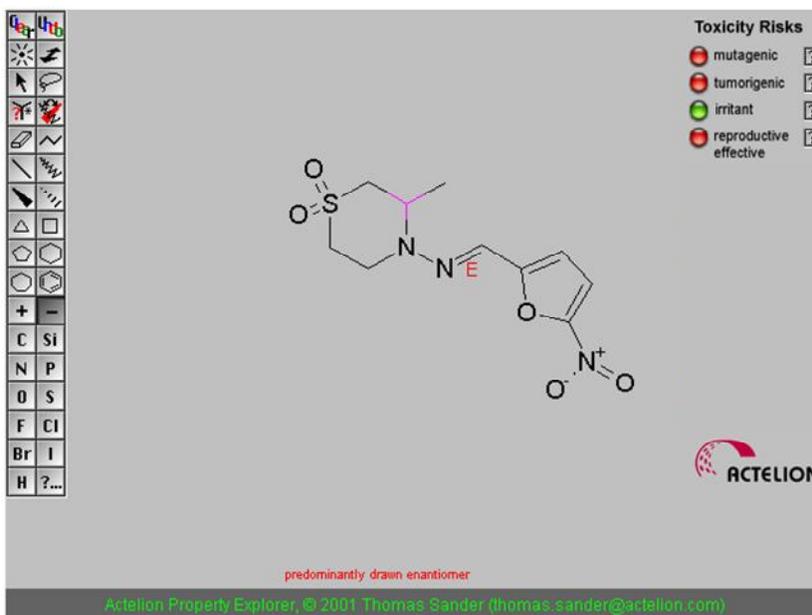
A avaliação *in silico* mostrou efeitos mutagênico e sobre o sistema reprodutor para o benznidazol e o nifurtimox, e este último apresentou também efeito tumorigênico (Figura 4). Os alunos foram estimulados a procurar no PubMed por que eles apresentavam estes efeitos e encontraram após uma rápida pesquisa bibliográfica indicações do potencial tóxico do grupo nitro (-NO<sub>2</sub>) que encontra-se presente nos dois fármacos; no benznidazol ele está ligado ao

anel imidazol e no nifurtimox ao anel furano. de Mecca e cols. em 2002 publicaram um trabalho em que encontraram evidências *in vitro* de que o nifurtimox era biotransformado gerando íons nitrito e outros metabólitos reativos com potencial efeito tumorigênico. Iatropoulos e cols. em 2006 mostraram experimentalmente a toxicidade crônica e carcinogenicidade do nifurtimox em camundongos.

De fato, em fármacos recentes aprovados pelo FDA para diversas aplicações clínicas, há bastante tempo não se vê presente o grupo químico nitro (HUGHES, 2010; HUGHES, 2009; HUGHES, 2008), o que sugere que suas propriedades químicas estejam sendo substituídas por outros grupos funcionais, com menores riscos tóxicos.



(a)



(b)

Figura 4. Avaliação toxicológica *in silico* dos fármacos benznidazol (a) e nifurtimox (b) pelo Osiris.

Ao aproveitar o ensejo da aula prática mostrando o potencial tóxico desses fármacos foi ressaltada a necessidade de pesquisas na área de fármacos contra a doença de Chagas e contra as doenças negligenciadas em geral, como a doença do sono, a leishmaniose, a malária, a esquistossomose, entre outras. A indústria não considera estas patologias em suas pesquisas de primeira linha porque são doenças que afligem principalmente países em

desenvolvimento (e.g. Brasil, Venezuela, Colômbia) ou subdesenvolvidos (e.g. países da África), portanto não gerarão renda suficiente para justificar o investimento.

### Conclusões

A aula prática computacional utilizando o Osiris<sup>®</sup> foi muito atraente para os alunos, que desenvolveram as atividades com desenvoltura e sedimentaram melhor o conhecimento adquirido na aula teórica da disciplina. Os relatórios entregues mostraram boa sedimentação do conhecimento e amadurecimento sobre o tema da aula. Na avaliação interna informal sobre a prática, todos os alunos disseram que a utilização dessa ferramenta contribuiu para seu entendimento acerca da matéria e que o uso de ferramentas computacionais deveria ser incorporado a outras disciplinas. Certamente a aula contribuiu para uma melhor relação ensino-aprendizagem.

Foi observado que o programa apresenta vantagens e desvantagens. A maior vantagem que eles puderam perceber é de poder realizar sem nenhum custo monetário uma avaliação prévia de um candidato a fármaco, antes mesmo de sua síntese. A desvantagem relatada por eles foi que se um fragmento potencialmente tóxico não estiver presente no banco de dados do programa, ele não poderá ser predito. Logo, perceberam que é importante ter um banco de dados com o

maior número de compostos e que apresente diversidade estrutural. Além do Osiris<sup>®</sup>, os alunos aprenderam a procurar informações confiáveis sobre fármacos no DrugBank, ao invés de fazerem pesquisas de estruturas muitas vezes errôneas.

É importante salientar que as predições *in silico* não substituem nem desqualificam testes experimentais. O objetivo daqueles é trabalhar em parceria com estes. Ensaios de toxicidade experimentais, *in vitro* e *in vivo*, são de importância ímpar para a avaliação de um novo fármaco, sendo, portanto, indispensáveis.

Há outros programas de avaliação de toxicidade *in silico*, e.g. ADC/Tox Suite, da empresa ACD-Labs, porém são programas pagos.

### Agradecimentos

À Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação (PROPPi) da Universidade Federal Fluminense.

### Referências Bibliográficas

ANDRIGHETTI-FROHNER CR, DE OLIVEIRA KN, GASPAR-SILVA D, PACHECO LK, JOUSSEF AC, STEINDEL M, SIMOES CMO, DE SOUZA AMT, MAGALHAES UO, AFONSO IF, RODRIGUES CR, NUNES RJ, CASTRO HC. Synthesis, biological evaluation and SAR of sulfonamide 4-methoxychalcone derivatives with potential antileishmanial activity. Eur. J. Med. Chem. 2009; 44(1): 373-383.

DA SILVA FD, DE SOUZA MCBV, FRUGULHETTI IIP, CASTRO HC, SOUZA SLD, DE SOUZA TML, RODRIGUES DQ, SOUZA AMT, ABREU PA, PASSAMANI F, RODRIGUES CR, FERREIRA VF. Synthesis, HIV-RT inhibitory activity and SAR of 1-benzyl-1H-1,2,3-triazole derivatives of carbohydrates. Eur. J. Med. Chem. 2009, 44: 373-383.

DE MECCA MM, DIAZ EG, CASTRO JA. Nifurtimox biotransformation to reactive metabolites or nitrite in liver subcellular fractions and model systems. Toxicol. Lett. 2002, 136(1).

DREWS J. Strategic trends in the drug industry. Drug Disc. Today. 2003, 8: 411-420.

FDA Challenge and opportunity on the critical path to new medical products [online]. Disponível na URL: <http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/CriticalPathOpportunitiesReports/ucm077262.htm>. [Acessado em 27 de outubro de 2010].

FDA/CDER. Guidance for industry, genotoxic and carcinogenic impurities in drug substances and products: recommended approaches. Draft Guidance. December. U.S. Department of Health and Human Services, Silver Spring, MD [online]. Disponível na URL: <http://www.fda.gov/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/default.htm>. [Acessado em 27 de outubro de 2010].

HUGHES B. 2009 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008, 9: 89-92.

HUGHES B. 2008 FDA drug approvals. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2009, 8: 93-96.

HUGHES B. 2007 FDA drug approvals: a year of flux. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2008, 7: 107-110.

IATROPOULOS MJ, WANG CX, VON KEUTZ E, WILLIAMS GM. Assessment of chronic toxicity and carcinogenicity in an accelerated cancer bioassay in rats of Nifurtimox, an antitrypanosomiasis drug. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2006, 57(5-6): 397-404.

KAVLOCK RJ, ANKLEY G, BLANCATO J, BREEN M, CONOLLY R, DIX D, HOUCK K, HUBAL E, JUDSON R, RABINOWITZ J, RICHARD A, SETZER RW, SHAH I, VILLENEUVE D, WEBER E. Computational toxicology—a state of the science mini review. *Toxicol. Sci.* 2008, 103: 14–27.

KLAASSEN CD. Princípios de toxicologia e tratamento do envenenamento. In: GOODMAN & GILMAN. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. McGrawHill, 2006.

KOROLKOVAS A, BURCKHALTER JH. *Química Farmacêutica*. Ed. Guanabara Koogan, 1988.

MUSTER W, BREIDENBACH A, FISCHER H, KIRCHNER S, MULLER L, PAHLER A. Computational toxicology in drug development. *Drug Discov. Today*. 2008, 13: 303–310.

SNYDER RD. An update on the genotoxicity and carcinogenicity of marketed pharmaceuticals with reference to *in silico* predictivity. *Environ. Mol. Mutagen.* 2009, 50(6): 435–450.

TETKO IV, BRUNEAU P, MEWES H, ROHRER DC, PODA GI. Can We Estimate the Accuracy of ADMET Predictions? *Drug Disc. Today*. 2006, 11: 700-707.

THOMAS G. *Fundamentals of Medicinal Chemistry*. John Wiley & Sons, 2003.

VALERIO LG. *In silico* toxicology for the pharmaceutical sciences. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2009, 241: 356–370.

XIE XQ. Molecular modeling and *in silico* drug design. In: LEMKE TL, WILLIAMS DA. *Foye's principles of medicinal chemistry*. Lippincott Williams & Wilkins; 2008.