

**Rafael Filipe Battisti Cavichion**

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DOS EFEITOS CITOTÓXICOS E  
ANTIMETASTÁTICOS DOS HÍBRIDOS MOLECULARES ENTRE  
DIHIDROPIRIMIDINONAS E ÁCIDOS FENÓLICOS EM CÂNCER  
DE PULMÃO

Dissertação submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Farmácia da Universidade  
Federal de Santa Catarina para a  
obtenção do Grau de Mestre em  
Farmácia.

Orientador: Dra. Tânia Beatriz  
Creczynski Pasa

Florianópolis  
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cavichion, Rafael Filipe Battisti  
Avaliação in vitro dos efeitos citotóxicos e  
antimetastáticos dos híbridos moleculares entre  
dihidropirimidinonas e ácidos fenólicos em câncer de  
pulmão / Rafael Filipe Battisti Cavichion ;  
orientadora, Tânia Beatriz Creczynski Pasa, 2019.  
143 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,  
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,  
2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Câncer. 3. Câncer de pulmão. 4.  
Dihidropirimidinonas. 5. Atividade antimetastática.  
I. Creczynski Pasa, Tânia Beatriz. II. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Farmácia. III. Título.

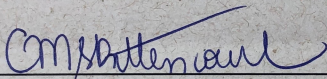
**“AVALIAÇÃO in vitro DOS EFEITOS  
CITOTÓXICOS E ANTIMESTASTÁTICOS DOS  
HÍBRIDOS MOLECULARES ENTRE  
DIHIDROPIRIMIDINONAS E ÁCIDOS  
FENÓLICOS EM CÂNCER DE PULMÃO”**

**POR**

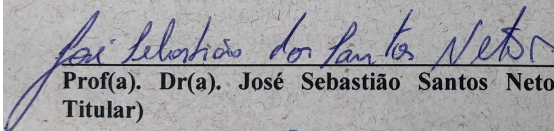
**Rafael Filipe Battisti Cavichion**

**Dissertação julgada e aprovada em  
sua forma final pelo(a)  
Orientador(a) e membros da  
Banca Examinadora, composta  
pelos Professores Doutores:**

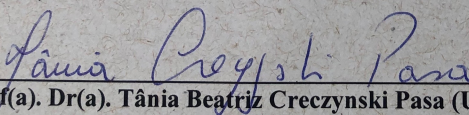
**Banca Examinadora:**



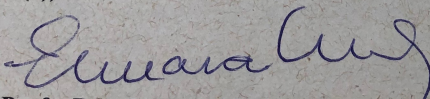
**Prof(a). Dr(a). Christiane Meyre da Silva Bittencourt (UFSC –  
Membro Titular)**



**Prof(a). Dr(a). José Sebastião Santos Neto (UFSC – Membro  
Titular)**



**Prof(a). Dr(a). Tânia Beatriz Creczynski Pasa (UFSC –  
Orientador(a))**



**Profa. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da  
UFSC**

**Florianópolis, 26 de março de 2019.**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a minha mãe, avós e família que me incentivaram e deram suporte durante toda a vida.

A Professora e orientadora Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa por me acolher em seu grupo de pesquisa, pela oportunidade de iniciar este trabalho e todo o ensinamento transmitido.

A todos os demais professores da Universidade Federal de Santa Catarina, por terem sido peça fundamental durante todo o meu percurso acadêmico.

Ao meu orientador de estágio do programa Ciência sem Fronteiras na universidade Holandesa Radboud University Nijmegen, David Willians, por todo o conhecimento transmitido, paciência e apoio dentro e fora da universidade.

Aos grandes amigos que pude fazer durante meu intercambio, em especial, Rafa Cachorro Louco, Kauê, Mateus, Vitão, Vitim, Lucas, Rodrigo, André e Amanda por todas as festas, viagens e boa companhia, o que tornou tudo mais divertido.

A todos os moradores da república 82 do Hoogeveltdt, especialmente Larissa Amora e Katrine Jessen, duas irmãs que o intercambio me deu.

Aos meus amigos que levo para a vida, Suede, Eduardo, Hiago, Eric, Pime, roque e mariane a todos os melhores momentos da vida e pelo suporte nos momentos não tão bons. Aos amigos que fiz durante a graduação em química, em especial a Kauê, Mayara, Gustavo e Dodo, que me acompanharam durante toda a trajetória acadêmica.

A todas pessoas que fazem parte do grupo de pesquisa GEIMM e que vou levar para sempre no coração, especialmente a Adny, Laura, Michele, Gabi, Najla, Fernanda, Leônidas, Juliana, Daine, Tania, Dayzinha, Anne, Alice e a Karen.

A Ana Gabriela Rosa, minha companheira para todas as horas e todos os momentos, por estar sempre ao meu lado, pelo carinho e cuidado incondicional.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com este trabalho;

Ao programa de pós-graduação em farmácia da UFSC, que possibilitou a realização deste trabalho, CNPQ e CAPES pelo suporte financeiro. E a todos os outros que contribuíram de alguma forma durante todo o processo.



Viver é estar continuamente motivado. O significado da vida não é simplesmente existir, sobreviver, mas sim crescer, alcançar e conquistar.  
(Arnold Schwarzenegger)





## RESUMO

O Câncer de pulmão é o tipo de câncer mais comum em todo o mundo desde 1985, tanto em incidência quanto em mortalidade. As estratégias quimioterápicas contra essa doença evoluíram consideravelmente nos últimos anos, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes. Novos compostos com capacidade de ativar especificamente as vias de reparo do DNA e não somente agir sobre um único gene ou proteína, podem ser promissoras opções ao tratamento do câncer de pulmão. O uso de modelos *in vitro* de câncer de pulmão possibilita a obtenção de resultados rápidos na prospecção de novos agentes antitumorais. As dihidropirimidinonas apresentam diversas atividades farmacológicas, como antibacteriana, anti-hipertensiva e também antitumoral, assim como alguns ácidos fenólicos. Neste sentido, este trabalho focou em investigar potenciais agentes antineoplásicos para o tratamento do câncer de pulmão, a partir de híbridos moleculares de dihidropirimidinonas e ácido fenólicos, bem como caracterizar os respectivos mecanismos de ação utilizando a linhagem celular de carcinoma pulmonar humano NCI-H460. Primeiramente observou-se que os híbridos FA247 e FA260 apresentaram efeito citotóxico moderado nas células tumorais. A partir deste resultado, dois novos híbridos derivados destes foram sintetizados, o FA339 e o FA438, onde substituiu-se o oxomonastrol pelo monastrol como a dihidropirimidinona dos híbridos. Os derivados apresentaram maior citotoxicidade que os precursores. Os híbridos FA339 e FA438 foram capazes de inibir o crescimento celular em 50% das células ( $IC_{50}$ ), com concentrações de 31,5 e 29,3  $\mu M$ , respectivamente. Ainda, os dois compostos causaram um forte bloqueio no ciclo celular na fase G2/M, mesmo utilizando concentrações menores que as respectivas  $IC_{50}$ . O composto FA438 apresentou um índice de seletividade igual 2,5. Além disso, os híbridos causaram uma diminuição significativa na invasão celular, inclusive diminuíram os níveis de proteína VCAM-1 nas células expostas, proteína cuja super-expressão está associada a progressão do câncer e desenvolvimento de metástases. Ainda, os fármacos paclitaxel e carboplatina foram combinados com os compostos FA339 e FA438 e testados. Esta combinação resultou em efeito sinérgico dos dois híbridos para com o paclitaxel e efeito aditivo do FA438 com a carboplatina. Conclui-se que os compactos FA339 e FA438 apresentam potencial ação antitumoral, provavelmente pela via

inibição do desenvolvimento de metástases, o que incentiva a continuidade dos estudos.

**Palavras chaves:** câncer de pulmão, dihidropirimidinonas, atividade antimetastática, sinergismo, paclitaxel.

## ABSTRACT

Lung cancer is the most common cancer in the world since 1985, both in incidence and mortality. The chemotherapeutic strategies against lung cancer have evolved considerably in recent years, improving the prognosis of the disease and patient's life quality. New compounds specifically able to activate DNA repair pathways and not only act on a single gene or protein, can be a promising option for lung cancer treatment. The use of in vitro lung cancer models provides rapid results in the prospection of new antitumor compounds. Dihydropyrimidinones have several biological activities, such as antibacterial, antihypertensive and antitumor, as well as some phenolic acids. Therefore, this work focuses on potential antineoplastic agents against lung cancer from molecular hybrids of dihydropyrimidinones and phenolic acids, as well as on the investigation of the respective mechanisms of action in the NCI-H460 cell line. Firstly, FA247 and FA261 hybrids exhibited a significant cytotoxic effect on tumoral cells. From it, two new hybrids derived from FA247 and FA261 were synthesized resulting in the FA339 and FA438. Both derivatives demonstrated greater cytotoxicity than the precursors. FA339 and FA438 hybrids presented 50% inhibition of cell growth ( $IC_{50}$ ) of 31.5 and 29.3  $\mu$ M, respectively. Furthermore, the two compounds caused a strong block on the cell cycle in G2 / M phase, even using concentrations lower than the respective  $IC_{50}$ . FA438 presented a selectivity index of 2.5. In addition, the hybrids derivatives caused a significant decrease in cell invasion as well as a decrease in VCAM-1 protein level in the cells exposed, being these last two results very well correlated, since VCAM-1 is a protein whose overexpression is associated with cancer progression and metastasis. Additionally, the drugs Paclitaxel and Carboplatin were combined with compounds FA339 and FA438. The combination resulted in a synergistic effect of the two hybrids with Paclitaxel and an additive effect of FA438 with Carboplatin. In conclusion, the compounds FA339 and FA438 have a potential antitumoral action, probably due to metastases development inhibition, which encourages the progress of the studies.

**Keywords:** lung cancer, dihydropyrimidinones, antimetastatic activity, synergism, paclitaxel.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	31
<b>Figura 2.</b> Diagrama das fases do ciclo celular.....	36
<b>Figura 3.</b> Características morfológicas da morte celular.....	39
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática das vias que levam à apoptose .	42
<b>Figura 5.</b> Estrutura do monastrol e do núcleo das dihidropirimidinonas.....	46
<b>Figura 6.</b> Ensaio clonogênico.....	71
<b>Figura 7.</b> Avaliação do tipo de morte celular induzido pelos híbridos na linhagem NCI-H460.....	73
<b>Figura 8.</b> Quantificação de tipo de morte celular induzida pelos compostos FA339 e FA438 na linhagem celular NCI-H460...	74
<b>Figura 9.</b> Efeito dos híbridos sobre a distribuição das células no ciclo celular na linhagem NCI-H460.....	75
<b>Figura 10.</b> Efeito dos híbridos sobre a distribuição das células no ciclo celular na linhagem NCI-H460.....	76
<b>Figura 11.</b> Sítio ativo alostérico da Cinesina EG5, ilustrando as interações com a cristalografia do monastrol.....	77
<b>Figura 12.</b> Efeito dos híbridos sobre a capacidade de Invasão Celular.....	79
<b>Figura 13.</b> Efeito dos híbridos sobre a capacidade de Invasão Celular.....	80
<b>Figura 14.</b> Quantificação relativa da proteína VCAM-1 em células NCI-H460 após tratamento com FA339 e FA438.....	81
<b>Figura 15.</b> Ilustração da proteína VCAM-1.....	82
<b>Figura 16.</b> Avaliação do índice combinatório (IC) dos compostos FA339 e FA438 com o fármaco Paclitaxel para $Fa = 0,5$ .....	84
<b>Figura 17.</b> Avaliação do índice combinatório (IC) dos compostos FA339 e FA438 com o fármaco Carboplatina para $Fa = 0,5$ .....	85
<b>Figura 18.</b> Isobogramas das combinações entre Paclitaxel e Carboplatina com os híbridos moleculares FA339 e FA438 nos $Fa$ 0,5, 0,75 e 0,9.....	87



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Perfil de absorção UV dos híbridos moleculares e respectivos precursores.	65
<b>Tabela 2</b> - Coeficiente de variação referente a diferentes tipos de armazenamento em relação aos ensaios iniciais.	67
<b>Tabela 3</b> - Concentração do composto que causa toxicidade a 50% das células ( $IC_{50}$ ).	68
<b>Tabela 4</b> - Índice de seletividade (IS) calculado por meio da razão entre a $IC_{50}$ da linhagem não tumoral HUVEC e a $IC_{50}$ da linhagem tumoral NCI-H460.	70
<b>Tabela 5</b> - Índice combinatório entre os fármacos Paclitaxel e Carboplatina e os híbridos moleculares FA339 e FA438 em diferentes <i>Fa</i> .	86





## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1.</b> Estrutura química de fármacos antitumorais.....	34
<b>Quadro 2.</b> Lista de reagentes.....	49
<b>Quadro 3.</b> Estrutura química e características dos compostos.....	53
<b>Quadro 4.</b> Delineamento experimental proposto mostrando os pontos a curva de dose - resposta de dois compostos para análise de índice combinatório.....	60



## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BSA	Albumina sérica bovina
CBP	Carboplatina
DHPM	Dihidropirimidinonas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FITC	Isotiocianato de fluorescina
HUVEC	Célula endotelial da veia umbilical humana
IC	Índice combinatório
IC <sub>50</sub>	Concentração do composto que causa inibição de 50% da proliferação celular
IS	Índice de seletividade
NCI-H460	Células de câncer de pulmão de células não pequenas
NSCLC	Carcinoma de pulmão de células não pequenas
PTX	Paclitaxel
SCLC	Carcinoma de pulmão de células pequenas
VCAM-1	Proteína de adesão vascular celular 1
ICAM-1	Proteína de adesão intercelular 1



## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	29
<b>2.1 Câncer: Aspectos gerais</b> .....	29
<b>2.2 Dados epidemiológicos</b> .....	30
<b>2.4 Tratamento do câncer de pulmão</b> .....	33
<b>2.6 Morte celular</b> .....	38
<b>2.6.1 Apoptose</b> .....	41
<b>2.7 Metástase</b> .....	43
<b>2.8 Dihidropirimidinona e seus derivados</b> .....	45
<b>2.9 Híbridos moleculares de dihidropirimidinonas e ácidos fenólicos</b> .....	47
3. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	49
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	49
4. MÉTODOS .....	51
<b>4.1 Materiais e reagentes</b> .....	51
<b>4.2 Híbridos moleculares entre as DHPM e os ácidos fenólicos</b> ..	53
<b>4.2.1 Procedimento para a síntese dos híbridos moleculares entre dihidropirimidinonas e ácidos fenólicos FA247, FA260 e FA261</b>	53
<b>4.2.2 Procedimento para a síntese do híbrido molecular FA339</b>	54
<b>4.2.3 Procedimento para a síntese do híbrido molecular FA438</b>	54
<b>4.2.4. Estruturas dos híbridos moleculares</b> .....	55
<b>4.3 Cultura celular</b> .....	56
<b>4.4 Incubação das linhagens celulares NCI-H460 e HUVEC com os híbridos moleculares</b> .....	57
<b>4.5 Determinação das curvas de concentração-resposta para viabilidade celular (método Alamar Blue)</b> .....	57

<b>4.6 Determinação da curva dependente de concentração e índice de seletividade</b> .....	58
<b>4.7 Análise do ciclo celular</b> .....	58
<b>4.8 Avaliação do tipo de morte celular pelo método Anexina V-FITC e PI</b> .....	59
<b>4.9 Avaliação da invasão celular</b> .....	60
<b>4.10 Ensaio clonogênico</b> .....	61
<b>4.11 Índice combinatório</b> .....	61
<b>4.12 Investigação de proteínas envolvidas em processos de invasão celular por Western Blot</b> .....	63
<b>4.13 Estabilidade e pureza dos compostos</b> .....	64
<b>4.14 Análise estatística</b> .....	65
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	67
5.1 PERFIL DE ABSORÇÃO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES E SEUS PRECURSORES NA REGIÃO ULTRAVIOLETA DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO E MÉTODO ANALÍTICO... ..	67
5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS EM DIFERENTES MEIOS DE ARMAZENAMENTO .....	68
5.3 EFEITO CITOTÓXICO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER .....	70
5.4 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 E FA438 NO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO NCI-H460 .....	73
5.5 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 e FA438 NA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO NCI-H460 .....	74
5.6 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 e FA438 NAS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO NCI-H460 .....	77
5.7 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 e FA438 NA INVASÃO E METÁSTASE NAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO NCI-H460 .....	81

5.8 INVESTIGAÇÃO SOBRE EFEITO SINÉRGICO ENTRE OS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 E FA438 COM OS FÁRMACOS PACLITAXEL E CARBOPLATINA .....	85
7. PERSPECTIVAS .....	93
8. REFERÊNCIAS.....	95
9. APÊNDICES .....	111





## 1. INTRODUÇÃO

Durante mais de 2.000 anos, o desenvolvimento de uma medicina moderna e uma abordagem renovada para o tratamento de doenças ficou estagnada, permanecendo o uso de substâncias fundamentadas em teorias empíricas ligadas ao equilíbrio de "humores" do corpo, consistindo em otimistas, melancólicos, fleumáticos e coléricos. Numerosos medicamentos, a maioria deles sendo preparados com extratos de plantas, eventualmente eficazes, estavam disponíveis, porém nenhum deles poderia responder a uma definição química do que hoje chamamos de fármaco, exceto aos provenientes do reinado mineral. Com a chegada da revolução industrial e o surgimento da química orgânica, o foco migrou do isolamento de moléculas ativas das plantas para a obtenção de produtos semissintéticos e sintéticos puros com atividade farmacológica, conduzindo químicos e farmacêuticos para a síntese orgânica (WERMUTH; DE LA FONTAINE, 1996).

Desde o final do século XX, foram intensificados estudos sobre função, alvo molecular, regulação e natureza dos compostos produzidos. A biossíntese foi a responsável pela transição para a compreensão de novos processos moleculares, levando a criação de novos protótipos de fármacos. A partir disso, vários cientistas das áreas afins têm usado técnicas de *screening* para detectar moléculas com atividades biológicas relevantes (HAERBORN; DEY, 1991).

A busca por compostos promissores por meio de *screening* racional de novos agentes antineoplásicos sintéticos, assim como naturais, como forma alternativa para o tratamento de câncer em relação a antitumorais já estabelecidos tem norteado pesquisas para obtenção de novos fármacos (BOGO, 2009). Entre 1981 e 2014, 61% das pequenas moléculas introduzidas como fármacos foram derivadas de produtos naturais. Este valor sobe para 74% em relação aos antitumorais (ROUHI, 2003; NEWMAN; CRAGG, 2016).

O grupo de doenças denominado câncer tem sido registrado desde 1600 a.C., quando Edwin Smith descreveu o câncer de mama em seu papiro no Egito Antigo. Hipócrates (cerca de 460 aC - 370 aC), considerado o pai da medicina, foi o primeiro a usar uma palavra para definir de fato a doença como conhecemos hoje, descrevendo vários tipos de câncer, e assim como Claudius Galen referiu-se a eles com a palavra grega *καρκίνος* *karkinos* (caranguejo), pela semelhança imaginária de um caranguejo, em vista dos prolongamentos laterais do tumor e das veias dilatadas adjacentes (HAJDU, 2011).

Atualmente, câncer é um termo genérico que descreve um grupo de mais de 100 doenças as quais se caracterizam pelo crescimento de células anormais além de seus limites habituais, originárias de fatores genéticos espontâneos ou induzidos por agentes patogênicos externos que causam alterações na atividade celular, que podem invadir partes adjacentes do corpo e / ou espalhar-se para outros órgãos (WHO, 2018).

Em organismos multicelulares, a taxa de proliferação celular é controlada, permitindo a replicação com precisão dentro dos limites homeostáticos normais. A formação de um tumor, apesar de ocorrer lentamente, é o resultado da proliferação e crescimento descontrolado de células que possuem danos no DNA, constituindo a base do que é chamado de neoplasia<sup>1</sup>. Além disso, a capacidade de burlar os mecanismos de morte celular programada, indução de angiogênese, assim como a capacidade de metástase evidencia o desenvolvimento tumoral (MAJNO; JORIS, 2004; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Embora as células possuam meios para reparar danos ao DNA, os fatores que os provocaram podem gerar mudanças permanentes ao genoma, introduzindo mutações a célula, que a partir disso podem ativar os proto-oncogenes (responsáveis pela estimulação da proliferação celular assim como a proteção contra a morte), ou então inativar genes que inibem a proliferação celular (BERTRAM, 2000).

Os tratamentos convencionais para o câncer não atingem somente as células tumorais, mas também os tecidos saudáveis apresentando uma série de efeitos adversos que podem levar a complicações severas. Desta forma, pesquisas no desenvolvimento de novas estratégias que apresentem menor toxicidade são de extrema importância e de grande impacto científico.

A hibridização molecular é uma estratégia utilizada em química medicinal que se baseia na combinação ou junção de diferentes grupos farmacofóricos em uma única molécula, levando a propriedade bioativas superiores (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

As Diidropirimidinonas (DHPM) são heterociclos que podem ser obtidas com alta diversidade estrutural, conhecidas por várias atividades biológicas, entre elas a antitumoral (KAPPE; STADLER, 2004; KLEIN et al., 2007; JOSEPH; JAIN; SAIN, 2006; KAPPE, 2000;

---

<sup>1</sup> Neoplasia significa literalmente "crescimento novo", uma proliferação anormal de células autonomamente que tendem a perder a sua capacidade de diferenciação. (MAJNO, JORIS, 2004).

SANDHU, 2012). Os ácidos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal podendo-se destacar os ácidos cinâmico, ferúlico e cafeico devido as interessantes atividades antitumorais descritas (LEE et al., 2003), podendo induzir a morte celular apoptótica (NIERO et al., 2013).

Diante deste cenário, para o presente projeto, pretende-se avaliar o efeito antitumoral de híbridos moleculares entre as DHPM e os ácidos fenólicos, buscando caracterizar um potencial superior para aplicação como agentes antitumorais.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Câncer: Aspectos gerais

A definição científica de câncer refere-se ao termo neoplasia, especificamente aos tumores malignos, como sendo uma doença caracterizada pelo crescimento descontrolado de células transformadas (ALMEIDA, et al., 2005). É um termo genérico utilizado para uma série de doenças que afetam uma ou mais partes do corpo, decorrentes do colapso de mecanismos celulares envolvidos em processos de proliferação e maturação celular, chamado de carcinogênese (HANAHAN; WEINBERG, 2000; WHO, 2018).

As causas dessas neoplasias são variadas, principalmente relacionadas a fatores de risco que podem ser encontrados no meio ambiente<sup>2</sup> (80% dos casos) (INCA, 2018), sendo induzidas por agentes patológicos externos<sup>3</sup> (WHO, 2018) e/ou alterações celulares e genéticas espontâneas, provocando alterações no ciclo celular e morte celular programada (ALMEIDA et al., 2005).

Segundo Almeida et al. (2005) a malignização de uma célula não tumoral abrange alguns estágios até o desenvolvimento do câncer: **iniciação** - Células não tumorais são afetadas por um agente carcinógeno, tendo como resultado alteração de genes; **promoção**- as células agora geneticamente alteradas são transformadas lentamente pela ação de agentes oncopromotores; **progressão**- as células malignas se multiplicam desenfreadamente, surgindo manifestações clínicas do câncer. Segundo INCA (2018), o processo de carcinogênese, em geral se dá lentamente, podendo levar vários anos para que uma célula cancerosa prolifere e dê origem a um tumor visível.

---

<sup>2</sup> Entende-se por meio ambiente o meio em geral (água, terra e ar), o ambiente ocupacional (indústrias químicas e afins), o ambiente de consumo (alimentos, medicamentos), o ambiente social e cultural (estilo e hábitos de vida) (INCA, 2018).

<sup>3</sup> Principais agentes externos: radiação ultravioleta e ionizante, produtos químicos como asbesto, aflatoxinas, arsênio, componentes do tabaco, alguns tipos de vírus, bactérias, parasitas, entre outros (WHO, 2018).

A falta de mecanismos que podem reverter a diferenciação da célula, agora maligna, tem como consequência a perda das funções dessas quando comparadas as suas correspondentes sadias. Progressivamente, as células cancerosas substituem as não neoplásicas, fazendo com que os tecidos invadidos percam as funções ao longo do tempo (INCA, 2018; SIEBER; HEINIMANN; TOMLINSON, 2003). Basicamente, as alterações fisiológicas mais comuns entre diferentes tipos de tumores são a autossuficiência em sinais de proliferação, assim como insensibilidade a sinais inibitórios deste mecanismo, evasão a morte programada, potencial de replicação ilimitado, angiogênese sustentada, migração e invasão de tecidos adjacentes ou metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

Entre as diferenças morfológicas, moleculares e funcionais das células neoplásicas pode-se citar o polimorfismo (células diferem muito em relação ao tamanho e número), aneuploidia (quantidade anormal de cromossomos), citoplasma basófilo e o citoesqueleto desorganizado, características que variam muito entre diferentes células neoplásicas. A partir deste conhecimento, métodos para o diagnóstico do câncer, fundamentados nessas diferenças, utilizando técnicas como citometria de fluxo, diagnóstico molecular, marcadores tumorais e métodos histológicos e citológicos, tornam-se progressivamente mais precisos. (KUMAR et al., 2005).


## **2.2 Dados epidemiológicos**

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. Globalmente, quase 1 em cada 6 mortes é atrelada a essa doença. Entre as causas mais comuns de morte por câncer estão os cânceres de pulmão (1,69 milhões de mortes), fígado (788,000 mortes), colo retal (774,000 mortes), estômago (754,000 mortes) e mama (571,000 mortes). Estima-se que caso evitados os fatores de risco poder-se-iam prevenir entre 30 a 50% dos cânceres. Outro fator que poderia reduzir esses números seria a implementação de estratégias de prevenção das mortes pela detecção e tratamento precoce (WHO 2018)

Para o Brasil, estima-se que no biênio 2018-2019, 600 mil novos casos de câncer irão ocorrer a cada ano. À exceção do câncer de pele não melanoma (170 mil novos casos), ocorrerão 420 mil novos caso no país, números que incluem os cânceres de próstata, pulmão,

mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes, além de altas taxas dos cânceres de colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2018).

**Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.**

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Homens	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Números arredondados para múltiplos de 10. Fonte: (INCA, 2018).

Cada região do Brasil possui um perfil característico na magnitude e nos tipos de câncer. As regiões Sul e Sudeste do Brasil concentram 70% da ocorrência de novos casos, sendo que na região Sudeste encontra-se quase a metade da incidência. Na região Sul e Sudeste, por exemplo, predominam os cânceres de próstata e mama feminina, assim como os de pulmão de intestino. Na região Centro-Oeste, os mais incidentes são os de colo de útero e estômago. Regiões como o Norte e Nordeste, apesar de os cânceres de próstata e mama feminina estarem entre os principais, a incidência dos cânceres do colo do útero e estômago tem grande impacto (INCA, 2018).

Diante dessas estatísticas, expõe-se a necessidade de investimentos e desenvolvimento de ações para o controle do câncer, desde o desenvolvimento de novos compostos antitumorais, assistência informativa aos pacientes sobre a doença, detecção precoce e promoção da saúde em todas as regiões no Brasil.

### 2.3 Câncer de pulmão

O Câncer de pulmão é o tipo de câncer mais comum em todo o mundo desde 1985, tanto em incidência quanto em mortalidade. Segundo o INCA, 13% de todos os novos casos desta doença são de pulmão. (INCA, 2018). A última estimativa feita em 2012 apontou que no mundo, ocorreram cerca de 1,8 milhões de novos casos de câncer de pulmão. No Brasil, o número de mortes registrado no Atlas de Mortalidade por câncer 2015 - INCA - é de 26.498, sendo que a estimativa de novos casos para o ano de 2018 era de 31.270 casos, sendo que destes, cerca de 60% são atribuídos a homens e 40% a mulheres.

Diferentemente do que se observa em cânceres localizados em outros tecidos, a taxa de sobrevida relativa em cinco anos para o câncer de pulmão é, em média, 18% (15% para homens e 21% para mulheres) (INCA, 2018). Estes números podem estar associados, em parte, às limitações em diagnósticos precoces e tratamentos da doença devido a alta complexidade e heterogeneidade molecular e histológica (PIKOR et al., 2013), Apenas 16% dos cânceres são diagnosticados em estágio inicial, sendo que para estes, a taxa de sobrevida de cinco anos chega a 56% (INCA, 2018).

O câncer de pulmão pode ser dividido em duas categorias: carcinoma de pulmão de células pequenas (SCLC, do inglês, small cell lung cancer), que responde a 15% dos casos nos pacientes; e carcinoma de pulmão de células não-pequenas (NSCLC, do inglês, non-small cell lung cancer), que corresponde a 85% dos casos (SOCIETY, 2019). As NSCLC podem ser divididas em três subtipos histológicos principais: I) adenocarcinoma; II) carcinoma de células escamosas; III) carcinoma de células grandes. Além disso, é possível que a doença apresente, raramente, em sua histologia, células características das duas categorias, sendo assim denominado câncer de células pequenas / não pequenas combinadas (do inglês, combined small cell / non-small cell cancer) (PIKOR et al., 2013). Além de apresentarem características biológicas diferentes, os dois grupos diferem quanto ao tipo celular de origem, localização no tecido pulmonar, padrão de crescimento celular, entre outros, indicando serem doenças distintas, desenvolvendo-se a partir de mecanismos moleculares diferentes (PIKOR et al., 2013).

Apesar de todos os subtipos histológicos de câncer de pulmão serem fortemente associados ao consumo de tabaco, as categorias SCLC e carcinoma de células escamosas são mais facilmente encontradas em pacientes tabagistas, por serem originadas predominantemente nas vias respiratórias centrais. Enquanto o carcinoma de células escamosas é originário de células basais de vias aéreas centrais e o adenocarcinoma, advém do epitélio glandular do parênquima pulmonar de pneumócitos do tipo II (TRAVIS et al, 2011; BARASH et al., 2012; PINSKY et al., 2013).

Com as recentes modificações na composição de cigarros, com menos alcatrão e nicotina, e redução do número de fumantes, o quadro de incidência de tipos histológicos do câncer de pulmão apresentou uma mudança: houve um declínio nos registros de casos de SCLC e carcinoma de células escamosas, enquanto o adenocarcinoma de pulmão tornou-se a forma mais corriqueira atualmente (cerca de 50% de todos os casos) (PIKOR et al., 2013).



Observações em pacientes revelaram que o câncer de pulmão pode envolver rapidamente com metástases no fígado, glândulas adrenais, ossos e cérebro. A metástase é o resultado de muitas etapas sequenciais, como migração de locais primários para vasos sanguíneos ou linfáticos, quimiotaxia não aleatória para órgãos-alvo preferenciais, invasão de vasos para locais secundários, suporte da proliferação no ambiente metastático e crescimento de um novo tumor com o surgimento de angiogênese (HIRATSUKA et al., 2002). A preferência do órgão de metástase é estabelecida pela migração original e invasão de células tumorais para locais metastáticos específicos (NICOLSON, 1993).

O carcinoma de células grandes pode surgir em diversas partes do pulmão, onde cresce e propaga-se rapidamente, o que pode reduzir as chances de tratamento. O prognóstico de pacientes com adenocarcinoma pulmonar tende a ser ainda pior com relação a outros subtipos de câncer de pulmão. A identificação e classificação do tipo celular de câncer de pulmão é fundamental para avaliar qual é o provável desenvolvimento e progressão da doença, além de destacar o melhor tratamento para o paciente. (SOCIETY, 2019).

## **2.4 Tratamento do câncer de pulmão**

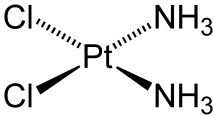
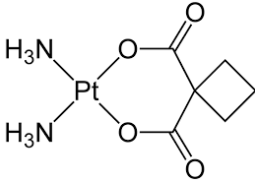
O tratamento mais eficaz atualmente para cânceres de pulmão de células não pequenas é a intervenção cirúrgica. Porém, em pacientes que possuem a doença avançada, com metástases nodais e/ou viscerais no diagnóstico (cerca de 70% dos casos) esse método não pode ser aplicado. A partir disso, buscam-se melhores estratégias de tratamento, visando-se agentes antitumorais com eficácia elevada (SOCIETY, 2019).

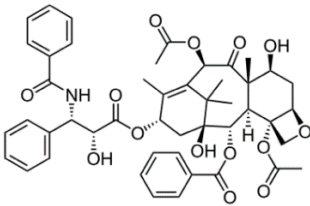
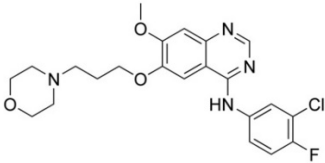
As estratégias quimioterápicas contra o câncer de pulmão evoluíram consideravelmente nos últimos anos, melhorando o prognóstico da doença e qualidade de vida dos pacientes. A quimioterapia tem como objetivo parar o crescimento de células malignas por meio de morte celular ou causar uma parada no ciclo celular, além de outros mecanismos. Nas NSCLC o uso de quimioterápicos a base de cisplatina é considerada a terapia padrão. Como a cisplatina é o composto com eficácia terapêutica que vem sendo utilizado há mais tempo, muitos trabalhos focam nos alvos moleculares que este alveja (MOK, 2011).

Novos compostos com capacidade de ativar especificamente uma das vias de reparo do DNA e não somente agir sobre um único gene ou proteína, podem ser uma promissora opção ao tratamento do câncer de pulmão. Com a introdução de novos fármacos como, por exemplo: gemcitabine, vinorelbine, docetaxel e placitaxel, o perfil de tratamento para o câncer de pulmão do tipo NSCLC sofreu uma mudança, pois até então compostos de platina eram utilizados independentemente do subtipo histológico (RECK et al., 2013). Esta mudança trouxe um aumento na taxa de sobrevida aos pacientes graças às relações de fármaco-subtipo histológico, que potencializou a eficiência do tratamento (SCAGLIOTTI et al., 2008).

Em casos em que a primeira linha de tratamento é a quimioterapia, a *Food and Drug Administrations* (FDA) possui uma lista com todos os fármacos aprovados para o tratamento do câncer de pulmão do tipo NSCLC. Nesta lista pode-se encontrar combinações de fármacos, como terapia combinada ou sinergismo. Como exemplos encontrados na lista estão o Avastin (Bevacizumab), Carboplatina, Cisplatina, Crizotinib, Erlotinib, Gefitinib, Paclitaxel, Carboplatina-Taxol, Gemcitabina-Cisplatina (INSTITUTE, 2019).

**Quadro 1 - Estrutura química de fármacos antitumorais.**

Fármaco	Estrutura molecular
Cisplatina	
Carboplatina	

Placitaxel	
Gefitinib	

## 2.5 Ciclo celular

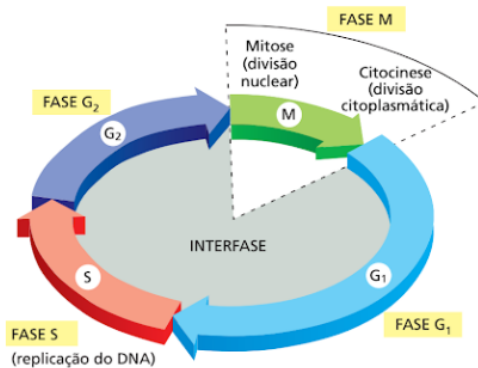
O ciclo celular é um conjunto de eventos que permite a proliferação e diferenciação celular. Possui uma função fundamental quanto a replicação de DNA e segregação cromossomal para as duas células originadas na divisão celular. Uma série de etapas do ciclo é controlada por proteínas, garantindo que o processo ocorra corretamente, evitando possíveis alterações e mantendo o fenótipo da célula normal (SCHAFER, 1998; SCHWARTZ; SHAH, 2005).

As células malignas possuem a habilidade de serem imortalizadas, ou seja, a capacidade de uma célula produzir infinitas gerações de descendentes. Células mortais, como as epiteliais humanas normais, em cultura, produzem de 40 a 50 gerações e depois entram em senescência, enquanto que as imortais continuam a dividir-se indefinidamente, possuindo alterações em seu ciclo celular (RANG et al., 2016).

Os protooncogenes e os genes supressores de tumores são os mais diretamente relacionados à regulação do ciclo celular, inibindo a divisão celular quando necessária ou sinalizando a morte programada da célula. A definição dos mecanismos moleculares destes processos é de suma importância para a compreensão da mecanística da transformação neoplásica (ALMEIDA et al., 2005; SCHWARTZ; SHAH, 2005).

As células em divisão podem estar em processos de mitose (M) ou então na interfase (G1, S e G2). As fases G1 e G2 representam dois intervalos no ciclo celular que ocorrem antes da síntese de DNA e mitose. Neste primeiro intervalo (G1), a célula aumenta de tamanho e prepara-se para a síntese de DNA, que ocorre na fase S, em que o DNA é duplicado de 2N para 4N. Após a replicação, a célula entra no segundo intervalo (G2), em que se prepara para entrar em mitose (M) (SCHAFER, 1998). O estágio de mitose inclui a prófase, metáfase, anáfase e telófase. As fases G1, S, G2 e M são as subdivisões tradicionais do ciclo celular padrão. Células em G1 podem, antes da replicação do DNA, entrar em um estado de latência (G0). As células em G0 são responsáveis pela maior parte das células que não estão em processo de crescimento e proliferação no corpo humano (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

**Figura 2. Diagrama das fases do ciclo celular.**



Fases G1, S e G2 participam da interfase. Fase M representa a mitose celular (ALBERTS et al., 2017).

A transição de uma fase do ciclo celular para outra ocorre de forma ordenada e é regulada por meio da fosforilação de diferentes proteínas celulares. As proteínas reguladoras chave são as quinases dependentes de ciclina (CDK; do inglês *cyclin-dependent kinases*), uma família de proteínas quinases serina/treonina que são ativadas em pontos específicos do ciclo celular, transmitindo sinalizações de uma fase a outra do ciclo e pontos de checagem (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003), evitando que erros no processo

ocorram, ou evitando a continuidade da divisão celular até que esses possam ser reparados.

Os pontos de checagem garantem que o estágio antecessor foi completado sem erros, garantindo que o DNA a ser replicado não contenha nenhum tipo de dano (primeiro ponto de checagem) e que a síntese de DNA e a segregação dos cromossomos sejam feitas corretamente (segundo ponto de checagem). O ciclo pode ser parado nestes pontos pela modulação da atividade de CDK, permitindo que as células reparem os defeitos, impedindo a transmissão do mesmo para as células filhas e contribuindo com a manutenção da estabilidade genômica (MALUMBRES; BARBACID, 2009). Desta forma, a fase seguinte do ciclo celular é bloqueada, e só será reiniciada após todos os processos da fase anterior serem concluídos. Se o reparo não for bem sucedido devido a danos excessivos no DNA ou defeitos genéticos no ponto de checagem ou na maquinaria de reparo de DNA, as células podem entrar em senescência ou sofrer apoptose (ASSUNÇÃO, 2013; MALUMBRES e BARBACID, 2009; NIGG, 2001). Se não forem realizados os devidos reparos no DNA por meio destes mecanismos moleculares, pode ocorrer o processo de oncogênese.

A p53 é uma das proteínas que atua nos pontos de checagem do ciclo celular. A proteína funciona no controle das células humanas com o DNA danificado no G1 e contribui para a parada do G2 (FETT-CONTE e SALLES, 2002). Mesmo sendo um fator de transcrição, a p53 é instável em condições normais, porém, o DNA danificado de alguma forma estabiliza a proteína, cuja concentração é aumentada conseqüentemente. Um dos genes que tem sua transcrição estimulada pela p53 é o p21, um inibidor da atividade das enzimas CDK que impede a progressão do ciclo celular e previne a replicação do DNA danificado (LODISH et al., 2000; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003; ABBAS e DUTTA, 2009). Como resultado as células ficam presas em G1 até que o DNA seja reparado e os níveis de p53 e p21 voltem ao normal. Se o dano no DNA for extenso, o p53 ativa a expressão de genes que levam à apoptose (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). Já no ponto de checagem em G2, a p53 atua através da inibição do complexo CDK1-ciclina B, que regula a mitose (MALUMBRES e BARBACID, 2009; NIGG, 2001).

Células com mutações em ambos os alelos do gene que transcreve a p53 não exibem entrada retardada na fase S, como quando o gene da proteína tem danos leves, e podem não sofrer apoptose quando apresentam danos mais extensos. Se tais células sofrerem danos no

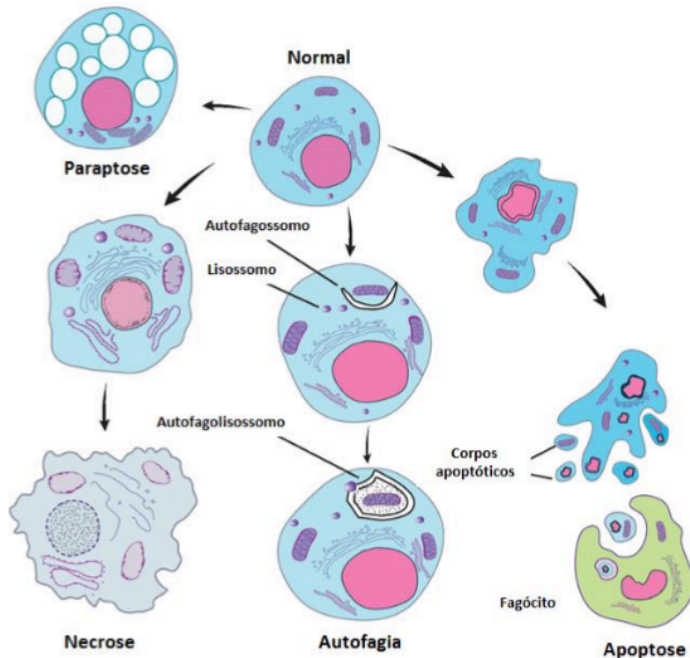
DNA, o material genético danificado pode ser replicado e ocorre a produção de mutações e rearranjos que contribuem para o desenvolvimento de uma célula metastática altamente transformada (KASTAN; CANMAN; LEONARD, 1995).

As anomalias referentes ao ciclo celular encontram-se envolvidas em grande parte das neoplasias humanas (SCHWARTZ e SHAH, 2005). Estudos vêm sendo realizados buscando alvos terapêuticos moleculares ciclo-celular específicos, assim como os ciclo-celular não específicos, visando a indução das células tumorais à morte programada de modo efetivo, com menos efeitos adversos (ALMEIDA et al., 2005).

## **2.6 Morte celular**

A morte celular não é um evento necessariamente aleatório, mas sim um fenômeno programado e controlado na maioria das vezes (MELINO, 2010). Em 2012 o Comitê de Nomenclatura de Morte Celular (NCCD; do inglês *Nomenclature Committee of Cell Death*) fez uma classificação dos tipos de morte celular levando em conta os progressos de pesquisas em mecanismos bioquímicos. Assim, morte celular pode ser classificada como: mitose catastrófica, necrose regulada, morte celular autofágica e apoptose (extrínseca e intrínseca dependente ou independente de caspases) (KROEMER et al., 2009; GALLUZZI et al., 2012).

**Figura 3- Características morfológicas da morte celular.**



Paraptose: Ausência de fragmentação nuclear ou formação de corpos apoptóticos com uma extensa vacuolização citoplasmática, inchaço e aglomeração das mitocôndrias. Necrose: aumento do volume citoplasmático, seguido de perda de integridade da membrana celular e extravasamento do material citosólico. Autofagia: formação de autofagossomos e autolisossomos que fazem a digestão do material celular por enzimas lisossomais. Apoptose: condensação e fragmentação da cromatina, formação de corpos apoptóticos pela divisão do citoplasma e organelas em pedaços menores, culminando na fagocitose do material celular (ALTMAN; RATHMELL, 2012) e adaptado por ASSUNÇÃO (2013).

A mitose catastrófica é resultado da sinalização de mecanismos celulares utilizados para evitar a instabilidade dos genes que sofreram danos no DNA, problemas de replicação ou segregação cromossomal durante o processo de mitose (CASTEDO et al., 2004; MORSE et al., 2005; EOM et al., 2005). Este tipo de morte celular é caracterizado pela condensação cromossomal prematura, formação de células grandes

com múltiplos micronúcleos (CASTEDO et al., 2004; GALLUZZI et al., 2012).

A morte celular por necrose ocorre por indução de estresse severo, seguido de uma catástrofe bioenergética da célula, comprometendo processos como a troca iônica sódio/potássio intracelular, causando o desequilíbrio osmótico e levando a ruptura da membrana celular (ALTMAN; RATHMELL, 2012; COLOFF; ZHAO; RATHMELL, 2009; DEGENHARDT et al., 2006). As principais mudanças morfológicas presentes são: aumento das organelas e volume total celular, formação de vacúolos citoplasmáticos, desnaturação de proteínas citoplasmáticas e perda da integridade da membrana plasmática, culminando no extravasamento do conteúdo celular (VITALE et al., 2011; EDINGER; THOMPSON, 2004; GOLSTEIN; KROEMER, 2007). A remoção do conteúdo citoplasmático extravasado é lenta, gera danos e induz a morte das células da região, afetando uma grande parte da população celular local, podendo desencadear um processo inflamatório capaz de alterar irreversivelmente os tecidos ou órgãos (GOLSTEIN; KROEMER, 2007; CURTIN; DONOVAN; COTTER, 2002).

A autofagia pode ser considerada como uma resposta a privação de nutrientes ou fatores de crescimento e outras situações de estresse celular como ativação de oncogenes, apresentando-se como um mecanismo de morte citoprotetora. Este processo catabólico faz a degradação de proteínas intracelulares e organelas sequestradas por vesículas de membrana dupla (chamadas autofagossomos) no lisossoma, deixando a célula com um aspecto vacuolizado (CODOGNO; MEIJER, 2005; ROSENFELDT; RYAN, 2011; MELINO, 2010). A autofagia também pode ser considerada um mecanismo supressor tumoral, visto que reduções na capacidade autofágica das células fornecem estímulos oncogênicos, causando a formação de células neoplásicas (ASSUNÇÃO, 2013; CODOGNO; MEIJER, 2005; DALBY et al., 2010).

Senescência é um conjunto de fenômenos correlacionados ao processo natural de envelhecimento celular, em que as células têm uma diminuição até o esgotamento na capacidade proliferativa após um determinado número de divisões celulares. Esse processo ocorre por meio de uma programação genética, envolvendo a degeneração dos telômeros e ativação de genes supressores de tumor (DIMRI, 2005; LEVINE, 2005; LUM et al., 20005). No início do estado de senescência as células continuam metabolicamente ativas até o momento que é induzido a morte por apoptose (BROWN; ATTARDI, 2005).



### **2.6.1 Apoptose**

A forma alternativa de morte celular é através de uma sequência programada de eventos e é denominada apoptose. Este termo foi utilizado pioneiramente por Wyllie, Kerr e Currie (1972). É um conjunto de mecanismos celulares altamente regulados causados por uma série de estímulos endógenos e exógenos, que ocorrem durante toda a vida de um organismo, garantindo a homeostase dos tecidos, renovação de células hematopoiéticas e atuam também no desenvolvimento embrionário, por exemplo. (COTTER et al., 1990; ELMORE 2007).

Este tipo de morte celular é caracterizado por uma diminuição no volume celular e conseqüentemente a perda da aderência com a matriz extracelular. A célula apoptótica reorganiza o citoesqueleto, condensando a cromatina nuclear, juntamente com a clivagem do DNA em fragmentos menores a partir da ativação de uma endonuclease endógena específica. Os fragmentos formados no citoplasma celular separam-se e são circundados por uma membrana, contendo partes do núcleo e organelas intactas. Esses fragmentos são chamados de corpos apoptóticos, sendo ligeiramente fagocitados e reconhecidos por antígenos de superfície que são gerados durante o processo. Esses corpos envoltos por membrana impedem que haja vazamento do citoplasma para o meio extracelular, não havendo resposta inflamatória, ao contrário da necrose (ELMORE, 2007; KROEMER et al., 2009; EDINGER, THOMPSON, 2004; HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980).

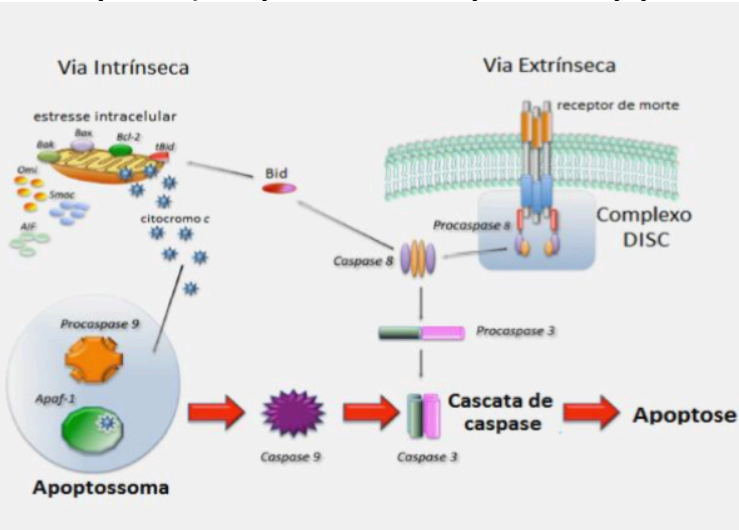
Durante o processo de apoptose há a externalização da fosfatidilserina, um fosfolípido encontrado na parte interna da membrana celular. Quando este processo ocorre, há a promoção da perda de assimetria na composição dos fosfolípidos, identificando a superfície da célula apoptótica para ser fagocitada (ELMORE, 2007).

### **2.6.2 Regulação da Apoptose**

O mecanismo de apoptose é regulado por diversos fatores, como por exemplo, proteínas da família Bcl-2, proteína p53 e também por proteases chamadas caspases (proteínas aspartato-específicas). O sistema de cascata de caspases exerce uma função primordial na indução, tradução e amplificação dos sinais apoptóticos, regulando as duas principais vias da apoptose: intrínseca e extrínseca, podendo ser

classificadas como iniciadoras (caspases-2, -8, -9 e -10) e as efetoras (caspases-3, -6 e -7) (BLAGOSKLONNY, 2000; AMARANTE-MENDES, 2003; RIEDL; SHI, 2004).

**Figura 4. Representação esquemática das vias que levam à apoptose.**



A via extrínseca é iniciada pela ativação dos receptores de morte, formação do complexo DISC e ativação da caspase-8. Na via intrínseca, ocorre liberação do citocromo c da mitocôndria e ativação da caspase-9. A caspase-8 e a caspase-9 ativam a cascata de caspase, como caspase-3, e resultam em morte celular (FAVALORO et al., 2012; adaptado por CISILOTTO, 2014).

A via extrínseca (ou via citoplasmática) é induzida por proteínas sinalizadoras e receptores localizados na membrana, que formam complexos com ligantes extracelulares como Fas e fator de necrose tumoral (TNF). Esses fatores, quando estimulados, associam-se as caspases iniciadoras por meio de proteínas adaptadoras como a FADD (Fas-associated Protein with Death Domain), ativando-as, podendo assim ativar as pró-caspases executoras para resultar na morte celular. Já na via intrínseca (via mitocondrial) estímulos vindos do interior da célula como danos ao DNA, privação de fatores de crescimento celular e malformação de proteínas, por exemplo, acumulam fatores pró-apoptóticos (Bak e Bax), que quando levados até a membrana mitocondrial, induzem a permeabilização e liberação do citocromo c, proteínas SMAC/Diablo (segunda ativadora de caspases derivada da mitocôndria) e o AIF (Fator indutor de apoptose) para o citosol. O

citocromo *c* conjuga-se com o fator ativador de proteases (APAF-1) e com a pró caspase-9, formando o apoptossoma, que na presença de ATP ativa a caspase 9, que ativará a caspase-3 e -7, executando o processo de apoptose. A SMAC/Diablo exerce o seu papel nesse processo inativando algumas proteínas inibidoras de apoptose, ativando a caspase-3, que executa a morte celular (HAAKE; POLAKOWSKA, 1993; BLAGOSKLONNY, 2000; MELINO; VAUX, 2010).

Algumas outras proteínas servem como pró apoptóticas e antiapoptóticas. A p53, uma das mais importantes em relação a reparação de danos ao DNA, induz as células a apoptose quando o dano ao material genético celular é demasiadamente extensivo, excedendo os limites relacionados aos mecanismos de reparo (ROOS; KAINA, 2006). Os membros da família de proteínas Bcl-2 exercem funções opostas. Algumas como Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1, têm atuação antiapoptóticas, induzindo a célula à sobrevida, enquanto outras como Bax, Bak, Bad e Bid, participam da sinalização de morte celular por apoptose. Estas agem na supressão ou estímulo de alterações de permeabilização da membrana mitocondrial, inibindo ou possibilitando a liberação do citocromo *c* para o citosol, induzindo a cascata de caspases e levando a apoptose (BLAGOSKLONNY, 2000; GHOBRIAL, WITZIG; ADJEI, 2005).

Por ser uma espécie de morte programada fisiológica da célula, a apoptose é a via mecanística mais investigada para o desenvolvimento de novos compostos antitumorais. A expressão de certas proteínas antiapoptóticas é encontrada em muitos tumores, fazendo com que as mesmas sejam alvos relevantes na busca por novas terapias (ASSUNÇÃO, 2013; OKADA; MAK, 2004; BLAGOSKLONNY, 2000).

## **2.7 Metástase**

Metástase é o fenômeno em que há a disseminação de células tumorais de um tumor primário para um sítio secundário dentro do corpo humano. Grandes esforços foram tomados para entender o mecanismo molecular subjacente às etapas distintas da metástase, que são (I) o descolamento de células tumorais do tumor primário, (II) a invasão do tecido circundante, (III) o intravasamento no sangue ou vasos linfáticos, (IV) disseminação na corrente sanguínea ou no sistema linfático e, finalmente, (V) extravasamento e crescimento em um local secundário. Cada um destes passos requer uma rota molecular distinta,

na qual a modulação da adesão de células malignas, assim como a modulação de propriedades migratórias e, do citoesqueleto das células tumorais disseminadas desempenha um papel essencial (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009; SCHLESINGER; BENDAS, 2015).

Adicionalmente, para separarem-se do tumor primário e invadir o tecido circundante, as células tumorais precisam quebrar as interações célula-célula, remodelar a interação células-matriz do novo sítio de adesão e seguir um caminho quimioatrativo através da matriz extracelular, através das proteinases secretadas (YILMAZ; CHRISTOFORI, 2009).

Neste sentido, a molécula de adesão intercelular ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) e a molécula de adesão vascular VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) pertencem à família das imunoglobulinas e estão envolvidas no processo de forte adesão de células mononucleares às células endoteliais (MACKAY, 1993; PARDI; INVERARDI; BENDER, 1992). A ICAM-1 é expressa nas células endoteliais sendo super-regulada em resposta à endotoxinas, fatores de necrose tumoral -alfa- (TNF- $\alpha$ ), Interleucina-1 ou Interferon- $\gamma$ . A proteína também está presente na superfície de fagócitos mononucleares e outras células não imunes, como fibroblastos e células epiteliais (ROTHLEIN et al, 1986; ROTHLEIN et al., 1988). A VCAM-1 não é expressa nas células endoteliais, mas pode ser induzida na presença de Interleucina-1, TNF- $\alpha$  e Interleucina-4 (RICE; MUNRO; BEVILACQUA, 1990; THORNHILL; HASKARD, 1990). A VCAM-1 é expressa em vários tipos de células não vasculares, incluindo populações de células da medula óssea e células do estroma (SPRINGER, 1990).

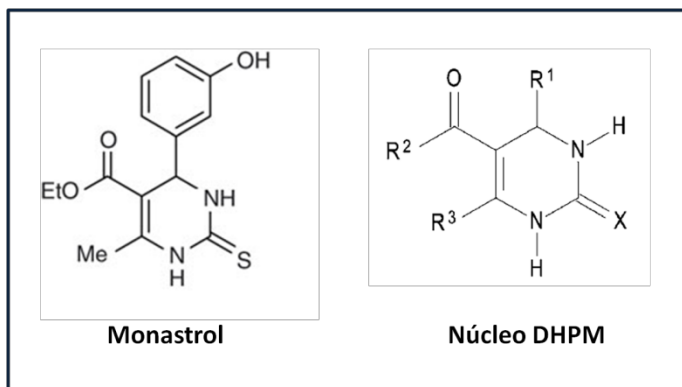
Destaca-se que as interações de adesão entre células tumorais e células adjacentes ou matriz extracelular são importantes para o processo de crescimento tumoral maligno. Estudos mostraram que a ativação de células endoteliais por citocinas inflamatórias pode provocar um aumento na adesão de células tumorais in vitro (BERETA et al., 1991; DEJANA et al., 1988). Neste sentido, o aumento dos conteúdos de ICAM-1 e VCAM-1 está relacionado a progressão de diversos tipos de câncer, sendo que o surgimento desta super-expressão aumenta consideravelmente o risco de metástase (JOHNSON et al., 2016). Estudos apresentam dados em que estas moléculas de adesão estariam super-expressas em carcinomas e melanomas (JONJIC et al., 1992). Staal-Van Den Brekel e colaboradores (1996) demonstraram que ICAM-1 e VCAM-1 também são expressas em 75% das células do tipo

NSCLC de câncer de pulmão, independentemente do estágio da doença ou do subtipo histológico.

Diante do que foi apresentado frente a incidência de câncer de pulmão, capacidade proliferativa e disponibilidade de terapias efetivas, surge a necessidade da busca de moléculas mais eficazes que possam contribuir para os meios de tratamento já existentes.

## **2.8 Dihidropirimidinona e seus derivados**

As dihidropirimidinonas (DHPM) são heterociclos que podem ser obtidos com alta diversidade estrutural devido à ampla possibilidade de variação dos três blocos de construção (KAPPE; STADLER, 2004; KLEIN et al., 2007), e vêm atraindo muito a atenção dos pesquisadores devido ao fato da plataforma de dihidropirimidina ser multifuncional representando um sistema heterocíclico com eficiência farmacológica notável (KAPPE, 2000). As DHPM são também amplamente conhecidas por apresentarem diversas atividades farmacológicas, como antibacteriana, anti-hipertensiva, antioxidante e antitumoral (JOSEPH; JAIN; SAIN, 2006; KAPPE, 2000; SANDHU, 2012). Essa classe de compostos é sintetizada a partir de uma reação multicomponente descrita por Pietro Biginelli (BIGINELLI, 1893), sendo um dos métodos mais elegantes para a síntese de DHPMs (RAMOS, et al., 2013).

**Figura 5. Estrutura do monastrol e do núcleo das dihidropirimidinonas**

Fonte: (KAPPE; STADLER, 2004).

A primeira pequena molécula permeável às células contendo o núcleo DHPM descrita foi o monastrol (MAYER et al., 1999). Esta molécula de baixo peso molecular, assim como outros compostos contendo o núcleo DHPM, tem sua atividade baseada na inibição reversível e específica da motilidade da cinesina mitótica Eg5 por meio da inibição alostérica da hidrólise de ATP (BRIER et al., 2004; COCHRAN et al., 2005; HEALD, 2000; MALIGA et al., 2002; PETERS et al., 2006; SAKOWICZ et al., 2004). O monastrol causa um bloqueio no ciclo celular de células durante a mitose, as quais passam a apresentar fuso monoastrol, de onde derivou o seu nome (MAYER et al., 1999). Russowsky e colaboradores (2006) mostraram que o monastrol e alguns de seus análogos apresentaram atividade antiproliferativa em diversas linhagens de células tumorais humanas como MCF-7 (mama), OVCAR03 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colo do útero), 786-0 (renal) e UACC62 (melanoma). Alguns compostos derivados da 3,4-dihidropirimidinona já testados também apresentaram atividade antitumoral em células Hep-G2 (carcinoma hepatocelular) e HCT-116 (carcinoma colorretal) (TAWFIK et al., 2009).

Assim, desde a descoberta do monastrol, diversos grupos vêm buscando desenvolver novas moléculas com estrutura análoga a ele, mantendo-se o núcleo DHPM e variando os outros blocos de construção (R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> e R<sup>3</sup>, figura 5). Além disso, foi observado que nos compostos contendo o núcleo DHPM, a configuração esterequímica influenciava

em seus efeitos biológicos, onde, por exemplo, o isômero (S)-Monastrol apresenta maior atividade que o isômero (R)-Monastrol (KAPPE, 2000).

O objetivo é a otimização da atividade antitumoral desses compostos, apresentando um efeito mais potencializado, específico e conseqüentemente menos danoso a outros tipos celulares não tumorais. Estas características fazem com que compostos contendo o núcleo DHPM se tornem excelentes opções de uso como agentes antimitóticos, com inestimáveis oportunidades para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais com menores efeitos adversos.

## **2.9 Híbridos moleculares de dihidropirimidinonas e ácidos fenólicos**

A hibridização molecular é uma estratégia utilizada em química medicinal baseada na combinação ou junção de diferentes grupos farmacofóricos em uma única molécula. Esta combinação resulta na formação de híbridos moleculares com propriedades bioativas superiores, quando comparados com as moléculas isoladas (VIEGAS-JUNIOR et al., 2007).

Os ácidos fenólicos são amplamente distribuídos no reino vegetal e constituem um dos grupos mais importantes de metabólitos secundários das plantas. Podem-se destacar os ácidos cinâmico, ferúlico e cafeico devido às interessantes atividades antitumorais já descritas. Derivados do ácido transcinâmico como o ácido ferúlico e o ácido cafeico, tem apresentado efeito citotóxico significativo contra várias linhagens de células tumorais (LEE et al., 2003). Estudos sobre o mecanismo de ação dos ácidos fenólicos indicaram que o ácido cinâmico pode induzir a morte celular apoptótica e a disrupção do citoesqueleto em células neoplásicas humanas (NIERO et al., 2013).

No intuito de gerar novas moléculas para o tratamento de câncer de pulmão, ou também, que possam ser usadas concomitantemente junto a outros fármacos já estabelecidos na clínica, este trabalho aborda a atividade antitumoral de híbridos moleculares entre DHPM e ácidos fenólicos frente ao câncer de pulmão.





### 3. OBJETIVO GERAL E OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 3.1 Objetivo geral

- Este estudo tem como objetivo principal avaliar *in vitro* os efeitos citotóxicos e anti metastáticos dos híbridos moleculares entre as DHPM e os ácidos fenólicos, em linhagem de células de câncer de pulmão.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar a estabilidade dos híbridos moleculares para armazenamento em diferentes temperaturas (-20 °C, 0-4 °C, temperatura ambiente e 37 °C);
- Investigar o efeito citotóxico dos diferentes híbridos moleculares formados de DHPM e os ácidos cinâmico, ferúlico e cafeico sobre células de linhagens de câncer de pulmão humano de células não pequenas (NCI-H460) e célula endotelial da veia umbilical humana (HUVEC);
- Realizar análises de concentração-resposta da citotoxicidade dos híbridos moleculares nas linhagens celulares NCI-H460 e HUVEC e determinar o índice de seletividade;
- Identificar alterações no ciclo celular provocadas pelos híbridos moleculares na linhagem tumoral investigada;
- Avaliar se os híbridos moleculares induzem a morte na linhagem tumoral e identificar o mecanismo;
- Analisar o efeito dos híbridos moleculares na capacidade de migração e invasão celular da linhagem tumoral;
- Comparar o efeito citotóxico dos híbridos moleculares na linhagem tumoral quando associados com os fármacos Paclitaxel ou Carboplatina;
- Avaliar a expressão das proteínas ICAM-1 e VCAM-1 na linhagem tumoral após incubação com os híbridos moleculares;



## 4. MÉTODOS

### 4.1 Materiais e reagentes

**Quadro 2. Lista de reagentes**

Reagente	Sigla	Marca
Acetonitrila	ACN	J.T. Baker <sup>®4</sup>
Ácido Acético Glacial P.A.	-	J.T. Baker <sup>®4</sup>
Ácido etanossulfônico de hidroxietil- Hepes piperazina	HEPES	Ludwig <sup>®7</sup>
Albumina sérica bovina	BSA	Sigma <sup>®11</sup>
Álcool Etilico	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Merck <sup>®8</sup>
Álcool isopropílico	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Merck <sup>®8</sup>
Anexina-V-FITC	-	BD Pharmingen <sup>™1</sup>
Azul de Tripán	-	Sigma <sup>®11</sup>
Anticorpo primário ICAM-1 (H-108): sc-7891		Santa Cruz Biotechnology <sup>14</sup>
Anticorpo primário VCAM-1 (H276): sc-8304		Santa Cruz Biotechnology <sup>14</sup>
Anticorpo primário β-actina		Santa Cruz Biotechnology <sup>14</sup>
Anticorpo secundário IgG		
Bicarbonato de sódio	NaHCO <sub>3</sub>	LAFAN <sup>®6</sup>
Carboplatina	-	*
Cloreto de potássio	KCl	Vetec <sup>®13</sup>
Cloreto de sódio	NaCl	Vetec <sup>®13</sup>
Dimetilsulfóxido	DMSO	Synth <sup>®12</sup>

Fosfato de sódio monobásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Synth <sup>®12</sup>
Glutaraldeído	-	Synth <sup>®12</sup>
Iodeto de Propídio	IP	Sigma <sup>®11</sup>
Matrigel Matrix	-	Corning <sup>®2</sup>
Meio de cultivo celular (RPMI-1640)	RPMI	Gibco <sup>®4</sup>
Paclitaxel	-	*
Penicilina/estreptomicina	-	Cultilab <sup>®3</sup>
RNase	-	Promega <sup>®9</sup>
Sal de sódio de resazurina	-	Sigma <sup>®11</sup>
Soro Fetal Bovino	SBF	Cultilab <sup>®3</sup>
Tripsina	-	Cultilab <sup>®3</sup>
Triton X-100	-	Sigma <sup>®11</sup>

**Notas:**

1 BD Biosciences, San Jose, California EUA

2 Corning, NY, EUA

3 Cultilab, Campinas, SP, Brasil

4 Gibco, Corporation, Grand Island, NY, EUA

5 J. T. Baker Red School Lane, Phillipsburg, NJ, EUA

6 LAFAN Química Fina, Várzea Paulista, SP, Brasil

7 Ludwig Biotecnologia Ltda., Alvorada, RS, Brasil

8 Merck, Darmstadt, Germany

9 Promega C

10 São Jose ANTICORPOS

11 Sigma-Aldrich Corporate, St. Louis, MO, EUA

12 Synth, Diadema, SP, Brasil

13 Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caxias, RJ, Brasil

14 Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, TX, EUA

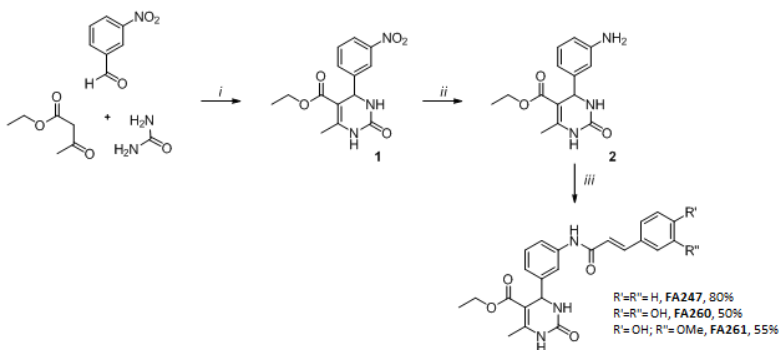
\*Doados

## 4.2 Híbridos moleculares entre as DHPM e os ácidos fenólicos

Os híbridos moleculares entre as DHPM e os ácidos fenólicos utilizados neste trabalho foram sintetizados por Flávio Augusto Rocha Barbosa, MSc, orientando do professor Dr. Antônio Luiz Braga, do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). As rotas sintéticas dos híbridos estão descritas a seguir:

### 4.2.1 Procedimento para a síntese dos híbridos moleculares entre dihidropirimidinonas e ácidos fenólicos FA247, FA260 e FA261

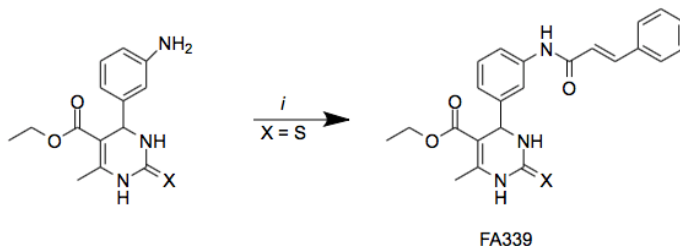
Inicialmente, a reação de Biginelli (ZHU; BIENAYMÉ, 2006) foi realizada utilizando os componentes: 3-nitrobenzaldeído, etil acetoacetato e uréia, sob catálise ácida, que gerou o produto 1 com rendimento adequado. A redução do grupo nitro do produto 1 foi realizada usando  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  como agente redutor. Através desta técnica três híbridos foram então sintetizados, contendo o núcleo oxo-DHPM e as partes ácido transcinâmico (FA247), transcafeico (FA260) e transferúlico (FA261). Após a preparação da anilina 2, a síntese dos híbridos foi realizada por acoplamento de amida usando tetrafluoroborato de O-(benzotriazol-1-il) -N, N, N', N'-tetrametilurônio (TBTU) como agente de acoplamento, que resultou na formação dos produtos utilizados neste estudo.



**Esquema 1** - *i*)  $\text{HCl}_{\text{cat}}$ , 100 °C, pureza, rendimento: 82%; *ii*)  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , EtOH, refluxo, então  $\text{NaHCO}_3$  até pH~8, rendimento: 76%; *iii*) ácidos transcinâmico, TBTU,  $\text{Et}_3\text{N}$ , THF, 72 h.

#### 4.2.2 Procedimento para a síntese do híbrido molecular FA339

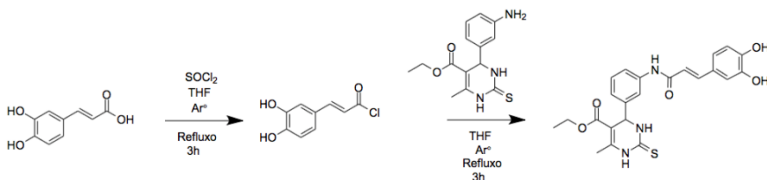
O composto nomeado de FA339 foi sintetizado pelo acoplamento de amina da anilina 2 (método 4.2.1), que foi obtido a partir do análogo com o átomo de enxofre e ácido transcinâmico na presença de TBTU como um agente de acoplamento. O produto FA339 foi obtido após 72 h de reação (Esquema 2).



**Esquema 2 - i)** Ácido transcinâmico, TBTU, Et<sub>3</sub>N, THF, 72 h. Rendimento: 91%.

#### 4.2.3 Procedimento para a síntese do híbrido molecular FA438

Em um balão de duas bocas, munido de barra magnética de agitação, e condensador de refluxo, sob atmosfera de argônio, o ácido cafeico (1,0 mmol) foi solubilizado em THF seco (20 mL). A essa solução foi adicionado SOCl<sub>2</sub> (10 mmol) e foi refluxada por 3 horas. Após este tempo, o solvente e o excesso de SOCl<sub>2</sub> foram removidos sob vácuo. Em seguida, o resíduo amarelo contendo o cloreto do ácido foi solubilizado em THF seco (10 mL) e a DHPM (1 mmol) foi adicionada e levou-se a temperatura de refluxo. Após 3 horas, a mistura reacional foi diluída com acetato de etila e lavada com HCl 1 M (3 × 20 mL) e água, e, após, a fase orgânica seca com MgSO<sub>4</sub> e o solvente removido sob vácuo. O produto FA438 foi purificado por cromatografia líquida em coluna eluindo-se com uma mistura apropriada de hexano/acetato de etila.



**Esquema 3** – Rendimento: 38%.

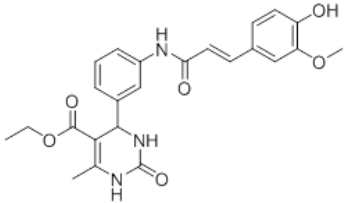
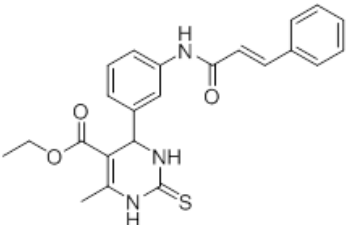
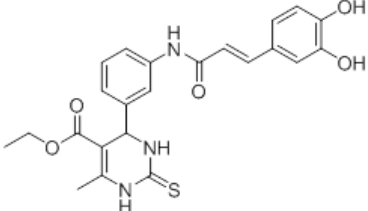
#### 4.2.4. Estruturas dos híbridos moleculares

As estruturas, peso molecular (PM) e fórmula molecular dos compostos estão descritos no Quadro 2.

Para este estudo, os compostos foram solubilizados em DMSO e armazenados a 4 °C. Para realização dos experimentos, as soluções-estoque foram diluídas em meio de cultura (RPMI-1640) para atingirem as concentrações desejadas nos experimentos. Nos ensaios realizados, a concentração de DMSO não ultrapassou 0,5%.

**Quadro 3 - Estrutura química e características dos compostos**

Compostos	Estrutura	Massa e fórmula molecular
FA247		PM - 405,45 g/mol Fórmula - C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub>
FA260		PM - 451,47 g/mol Fórmula - C <sub>24</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub>

FA261		PM - 437,45 g/mol Fórmula - $C_{23}H_{23}N_3O_6$
FA339		PM - 421,51 g/mol Fórmula - $C_{23}H_{23}N_3O_3S_1$
FA438		PM - 453,51 g/mol Fórmula - $C_{23}H_{23}N_3O_5S_1$

### 4.3 Cultura celular

As células foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro. As células da linhagem de câncer de pulmão humano do tipo “células não pequenas” (NCI-H460), e da linhagem não tumoral endotelial da veia umbilical humana (HUVEC) foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640, suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 mg/mL) e 10 mM de tampão de ácido N-[2-hidroxiethyl]piperazina-N'-[2-etanosulfônico] (HEPES), 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e mantidas em estufa umidificada, a 37 °C, em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). As passagens celulares foram realizadas por tripsinização das células assim que atingiram aproximadamente 80% de confluência, utilizando solução tampão fosfato salino (PBS) para lavagem e, após, incubação com 1 ml de solução de tripsina em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de O<sub>2</sub> a 37°C durante 3 minutos. A reação



foi interrompida com a adição de 1 mL de meio de cultura e, após, foram centrifugadas a  $800 \times g$  por 5 minutos. As células foram ressuspensas e homogeneizadas em meio de cultura. Para a realização dos ensaios, as células foram coradas utilizando o corante Azul de Tripán sendo possível diferenciar as células viáveis e não viáveis, e contadas em câmara de Neubauer. O corante é internalizado por células que apresentam membrana rompida, corando-as de azul. O tempo de incubação e o número de células plaqueadas foram determinados de acordo com a necessidade de cada experimento. As células foram utilizadas com no mínimo 3 e no máximo 6 passagens a partir do lote estoque.

#### **4.4 Incubação das linhagens celulares NCI-H460 e HUVEC com os híbridos moleculares**

Os híbridos moleculares sintéticos provenientes do monastrol e dos ácidos fenólicos, foram dissolvidos em DMSO na concentração final de 20 mM e armazenados a 4°C. Para o ensaio, as células das linhagens NCI-H460 e HUVEC foram semeadas na densidade de  $5 \times 10^3$  e  $10 \times 10^3$  células/poço respectivamente, com volume de 100  $\mu\text{L}$  / poço em meio de cultura em placas de 96 poços, em condições estéreis. Estas foram mantidas a 37°C e 5%  $\text{CO}_2$  por 24 h em incubadora. No dia seguinte, foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de solução diluída de cada um dos compostos em concentrações crescentes, com 0,25% de DMSO (v/v). As placas foram mantidas nas mesmas condições previamente descritas pelo período de 72h. Foram utilizadas células incubadas na ausência dos compostos e na presença de DMSO, sendo nomeadas como **Células Controle**. O DMSO foi diluído em meio de cultura na mesma proporção utilizada para dissolver os compostos (0,25% de DMSO (v/v)). As células incubadas na presença dos compostos foram nomeadas como **Células Teste**.

#### **4.5 Determinação das curvas de concentração-resposta para viabilidade celular (método Alamar Blue)**

O método de viabilidade celular Alamar blue baseia-se no emprego do corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). A resazurina é um indicador de oxirredução permeável às células que pode ser usado para monitorar o número de células viáveis. O indicador pode ser dissolvido em tampões fisiológicos (resultando em

uma solução de cor azul profunda) e adicionado diretamente às células em cultura em um formato homogêneo. Células viáveis com metabolismo ativo podem reduzir a resazurina em resorufina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona), que é rosa e fluorescente, a partir de desidrogenases mitocondriais que fazem essa conversão majoritariamente (RISS, 2016). A presença de resorufina foi comprovada pela leitura da absorção de fluorescência usando um conjunto de filtros de excitação em 560 nm / emissão em 590 nm (RISS et al., 2016). As células foram semeadas em placas de 96 poços em densidades adequadas e incubadas com concentrações crescentes (1, 12,5, 25, 50, 75 e 100 µM) dos compostos por 72 h. Após a incubação, o meio contendo os compostos foi substituído por uma solução contendo meio de cultura com 10% de Alamar Blue 1,0 mg/mL, e incubado novamente por 1,5 h. Posteriormente a fluorescência foi lida em condições descritas neste item em leitor de microplacas. A fluorescência obtida do grupo controle foi considerada equivalente a 100% de células viáveis e a viabilidade celular das demais condições de incubação foi calculada por regra de três.

#### **4.6 Determinação da curva dependente de concentração e índice de seletividade**

Para determinar a curva dependente de concentração, as células foram incubadas com os compostos em concentrações crescentes, seguido do ensaio de Alamar Blue. Para o cálculo da IC<sub>50</sub> (concentração do composto necessária para 50% de inibição *in vitro*) foi utilizado o software GraphPad Prism 7. O índice de seletividade dos híbridos moleculares foi calculado pela equação:

$$IS = \frac{IC_{50} \text{ linhagem não tumoral}}{IC_{50} \text{ linhagem tumoral}}$$

#### **4.7 Análise do ciclo celular**

A técnica de citometria de fluxo, utilizada com o objetivo de determinar o conteúdo de DNA celular, emprega corantes intercalantes fluorescentes como o iodeto de propídio (PI). O PI intercala-se na estrutura helicoidal do DNA e o sinal de fluorescência emitido é diretamente proporcional ao conteúdo de DNA no núcleo da célula (SWERTS, et al, 2007; BROWN; WITTEWER, 2000), podendo ser avaliada a distribuição das células em cada uma das fases do ciclo

(TAVARES; TAVARES 2009). A análise do ciclo celular foi feita por citometria de fluxo seguindo o método descrito por Yang et al. (2007). As células da linhagem tumoral foram semeadas em placas de 12 poços em densidade  $70 \times 10^3$  células / poço, incubadas por 24 h e posteriormente tratadas com os compostos FA339 e FA438 na concentração de suas respectivas  $IC_{50}$  e  $\frac{1}{2} IC_{50}$ , e incubadas novamente por um período de 72 h. Monastrol  $80 \mu M$  foi utilizado como controle positivo. Após a incubação as células foram removidas, centrifugadas e lavadas com tampão PBS. Em seguida, fixou-se as células com etanol a 70% e estas foram mantidas por 30 min a  $4^\circ C$ . Posteriormente as células foram centrifugadas por 10 minutos a  $800 \times g$  e  $4^\circ C$  e lavadas duas vezes com PBS. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 1 mL de solução de PBS contendo RNase ( $100 \mu g/mL$ ) e 0,1% Triton, e foram transferidas para tubos especiais de citometria. No momento da análise, adicionou-se  $20 \mu g/mL$  de iodeto de propídeo. A análise do DNA foi realizada por citometria de fluxo e a população de células em cada fase do ciclo juntamente com a análise estatística foram determinadas utilizando software Flowing 2.5.

#### **4.8 Avaliação do tipo de morte celular pelo método Anexina V-FITC e PI**

Este método é baseado no fenômeno no qual a fosfatidilserina é exposta durante apoptose, e na capacidade da anexina V de ligar-se ao lipídeo com alta afinidade. A anexina V marcada com FITC liga-se a resíduos de fosfatidilserina que são translocados da camada interna para a externa da membrana plasmática de células apoptóticas (BEVERIS et al., 1999). A anexina V não é capaz de se ligar às células viáveis, uma vez que a molécula não é capaz de penetrar na bicamada fosfolipídica. Nas células mortas, no entanto, o interior da membrana está disponível para ligação com anexina V, pois ocorre a perda da integridade da membrana plasmática. Para diferenciar as células necróticas das células apoptóticas, um alquilante (com propriedade de emissão de fluorescência) de DNA impermeável à membrana, como o iodeto de propídeo (PI) pode ser adicionado simultaneamente a suspensão celular. Assim, células viáveis, apoptóticas e necróticas podem ser identificadas com base numa dupla marcação entre anexina V e PI, e analisada por citometria de fluxo (VAN ENGELAND et al., 1998). As células da linhagem tumoral foram semeadas em placas de 12 poços em densidade  $70 \times 10^3$  células / poço, incubadas por 24h, tratadas com os compostos

FA339 e FA438 em concentrações determinadas pela  $IC_{50}$  e  $\frac{1}{2} IC_{50}$ , e incubadas novamente pelo período de 72 h. Posteriormente, o meio foi removido, as células lavadas com PBS (1×), homogeneizadas em tampão de ligação (1×) e marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídio (20  $\mu\text{g/mL}$ ) e avaliadas em citômetro de fluxo FACS CANTO II (BD Biosciences). Os histogramas foram analisados com software Flowing 2.5.

#### 4.9 Avaliação da invasão celular

Conforme descrito por Valster e colaboradores (2005) e adaptado por Cisilotto (2015), para a realização deste ensaio foram utilizados inserts Millicell® com filtros de policarbonato de 12 mm e poros de 8  $\mu\text{m}$ . Cada filtro foi recoberto com 60  $\mu\text{L}$  de Matrigel® (extrato de proteínas da membrana basal) diluído (1:10) em meio RPMI-1640 gelado. O Matrigel® foi polimerizado, em estufa a 37°C, por 30 minutos. Na parte superior do insert, em cima do gel, foram adicionadas células na densidade  $40 \times 10^3$  células / poço em meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB). Ainda neste compartimento, foram adicionados os compostos FA339 e FA438 nas concentrações de  $\frac{1}{2} IC_{50}$  e  $\frac{1}{4} IC_{50}$ . Na parte inferior do *insert*, foi adicionado meio de cultura suplementado com SFB. A placa foi incubada por 72 h, em estufa, a 37 °C. As células que permaneceram no compartimento superior dos *inserts* foram removidas com auxílio de uma haste flexível com algodão. As células migrantes foram fixadas com glutaraldeído 5%, por 10 min e coradas com cristal violeta 0,5% por 15 minutos e secas em temperatura ambiente, por 24 h. Após este período, os *inserts* foram colocados em uma lâmina de vidro, para visualização e aquisição das imagens no aumento de 100 ×. Com auxílio do software Image J, foi realizada a contagem das células que migraram pela membrana em dez campos de visualização. Calculou-se assim a porcentagem de células que invadiram o Matrigel® e atravessaram a membrana. Além de quantificado pelo número de células, determinou-se a porcentagem de invasão espectroscopicamente, em que as células coradas foram eluídas com ácido acético 33% e a absorbância da solução foi lida em 595 nm, onde o resultado obtido foi expresso em relação ao controle.

#### 4.10 Ensaio clonogênico

Células da linhagem tumoral NCI-H460 foram semeadas em placas de 6 poços em uma densidade de 300 células / poço e incubadas por 24 h. Os compostos FA339 e FA438 foram então adicionados na concentração de suas respectivas  $IC_{50}$  e incubados pelo período de 72 h. Após, os compostos foram removidos, os poços lavados com PBS e meio de cultura foi adicionado (3 mL) em cada poço. As células foram mantidas em cultura por mais 7 dias a 37°C em uma atmosfera contendo 5% de  $CO_2$ . O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. Subsequentemente, as células foram fixadas com paraformaldeído 4%, coradas com cristal violeta 0,5% e fotografadas. Todas as colônias com 50 células ou mais foram contadas. A área das colônias foi analisada utilizando o software ImageJ e o plugin ColonyArea.

#### 4.11 Índice combinatório

Para o tratamento de câncer, a modulação de moléculas voltadas para um alvo específico é de extrema importância. Estes alvos podem estar presentes tanto em tecidos saudáveis quanto em tecidos afetados pela doença. Ainda, mecanismos de resistência e/ou compensatórios em sistemas biológicos complexos (KITANO, 2007) podem frustrar a eficácia de fármacos e novas moléculas voltadas ao tratamento do câncer. A superação desta possível compensação, geralmente, requer altas doses de fármacos, que podem induzir efeitos adversos em outras partes do organismo (LEHÁR, *et al.*, 2009). Deste modo, embora o design de moléculas baseadas em alvos específicos não seja um grande desafio, encontrar candidatas eficientes que não gerem efeitos adversos que impeçam o respectivo uso *in vivo* em doses efetivas consiste em um grande obstáculo (HOPKINS, 2008).

Combinações sinérgicas de dois ou mais fármacos podem diminuir a toxicidade e outros efeitos colaterais associados a altas doses de medicamentos isolados, pois permitem a redução da dosagem de cada composto, ou o acesso a mecanismos envolvendo mais de um alvo específico simultaneamente (LEHÁR, *et al.*, 2009).

Para determinar se dois compostos distintos possuem efeito sinérgico ou antagônico, primeiramente é preciso saber a potência para cada composto isolado, como também o efeito que os dois geram quando combinados, podendo assim ser calculado o seu índice combinatório (IC). Com as  $IC_{50}$  dos compostos FA339 e FA438 já

definidas, foram feitas curvas concentração-resposta para os fármacos Paclitaxel (PTX) e Carboplatina (CBP), no tempo de 72h, em que a viabilidade celular foi definida utilizando o ensaio com alamar blue, e as respectivas  $IC_{50}$  calculadas.

Para a combinação dos compostos com os fármacos, foram utilizadas concentrações em razão de equipotência [por exemplo,  $(IC_{50})_1 / (IC_{50})_2$ ] para que as contribuições dos efeitos de cada composto ou fármaco para a combinação seja aproximadamente igual, como descrito no quadro abaixo:

**Quadro 4. Delineamento experimental proposto mostrando os pontos da curva de dose - resposta de dois compostos para análise de índice combinatório.**

		Composto 1					
		0	$\frac{1}{4}$ $(IC_{50})_1$	$\frac{1}{2}$ $(IC_{50})_1$	$(IC_{50})_1$	$2 \times$ $(IC_{50})_1$	$4 \times$ $(IC_{50})_1$
Composto 2	0	Controle $(Fa)_0$	$(Fa)_1$	$(Fa)_1$	$(Fa)_1$	$(Fa)_1$	$(Fa)_1$
	$\frac{1}{4}$ $(IC_{50})_2$	$(Fa)_2$	$(Fa)_{1,2}$				
	$\frac{1}{2}$ $(IC_{50})_2$	$(Fa)_2$		$(Fa)_{1,2}$			
	$(IC_{50})_2$	$(Fa)_2$			$(Fa)_{1,2}$		
	$2 \times$ $(IC_{50})_2$	$(Fa)_2$				$(Fa)_{1,2}$	
	$4 \times$ $(IC_{50})_2$	$(Fa)_2$					$(Fa)_{1,2}$

$(Fa)$  = fração afetada; Fonte: adaptado de CHOU, 2006.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular foram analisados pelo uso de CompuSyn (versão 1.0) (CHOU, 2006), um software que executa cálculos de concentração - efeito para combinação de compostos e determina a presença de antagonismo, efeito aditivo ou sinergismo entre as diferentes condições de incubação. O programa define valores de índice de combinação (IC) como: <0,9 indicam sinergia, valores entre 0,9 e 1,0 indicam efeito aditivo, e valores >1.1 indicam efeito antagônico.

#### **4.12 Investigação de proteínas envolvidas em processos de invasão celular por Western Blot**

Para a avaliação do conteúdo proteico de ICAM-1 e VCAM-1, as células NCI-H460 foram plaqueadas numa densidade de  $5 \times 10^5$  células/poço em placa de 6 poços e incubadas com 31,5  $\mu\text{M}$  de FA339 e 29,3  $\mu\text{M}$  de FA438 por 72 h. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a  $400 \times g$  por 10 minutos e lavadas  $2 \times$  com 1 mL de PBS. A extração de proteínas foi feita com a utilização de 120  $\mu\text{L}$  de tampão RIPA contendo inibidores de protease (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, 1% de Triton X-100<sup>TM</sup>, 0,1% de SDS, 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de aprotinina, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptina e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de pepstatina), seguido da quantificação de proteínas totais pelo método de Lowry (1951). Após quantificação, 30  $\mu\text{g}$  de proteínas totais foram separadas eletroforéticamente em gel de dodecilsulfato de poliacrilamida 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose seguido de bloqueio com 5% de albumina bovina em solução salina tamponada com Tris e Tween-20<sup>®</sup> (TBS-T). Em seguida as membranas foram incubadas overnight a 4° C com anticorpos monoclonais específicos para detecção de ICAM-1 e VCAM-1 ou  $\beta$ -actina nas diluições de 1:100, 1:1000 e 1:250, respectivamente (diluição em TBS-T contendo 2,5 % de albumina sérica bovina). Após, as membranas foram lavadas com TBS-T e incubadas com anticorpo secundário anti-IgG rabbit e murino conjugado à peroxidase (diluição de 1:100 e 1:5000 respectivamente) para visualização de complexos quimioluminescentes utilizando Amersham ECL<sup>TM</sup> (GE Healthcare, GB) detectados com ChemiDoc MP (Bio-Rad, CA, EUA). As imagens das proteínas foram analisadas com o programa ImageLab e os dados foram normalizados pela quantidade de  $\beta$ -actina encontrada em cada amostra.

### 4.13 Estabilidade e pureza dos compostos

O Guia de Estabilidade para Indústrias Químicas baseia-se em parâmetros indicados pelo *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*, ICH, para estudos de estabilidade em países de zona climática IV-B, onde se encontra o Brasil. O propósito dos testes de estabilidade é fornecer evidências de como a qualidade de um produto varia com o tempo, sob influência de uma variedade de fatores tais como temperatura, umidade e luz, por exemplo, e estabelecer um prazo de validade para os produtos além de recomendar condições de armazenamento adequadas (ORIQUI et al., 2013). Um método analítico foi desenvolvido em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) JASCO modelo X-LC<sup>TM</sup> equipado com uma bomba de alta pressão X-LC<sup>TM</sup> 3185-PU, injetor automático X-LC<sup>TM</sup> 3159AS, forno para coluna X-LC 3067-C0 e um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo X-LC<sup>TM</sup> 3110-MD. Os parâmetros físico-químicos estabelecidos para as análises como: coluna cromatográfica, fase móvel, fluxo, temperatura e volume de injeção foram delineados e otimizados para cada um dos híbridos moleculares e respectivos precursores. No desenvolvimento do método por CLAE, várias combinações de água e acetonitrila foram testadas para a composição da fase móvel. Ácido fórmico a 0,1% (v/v) foi mantido como aditivo em todas as condições testadas, visto que os híbridos possuem hidrogênios ácidos, entretanto os pKa exatos ainda não foram determinados. A adição de um ácido na fase móvel é necessária para a obtenção de picos com resolução adequada (NEWBY; MALLETT, 1997). Fase móvel eluída isocroticamente com 70:30 acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v) foi eficiente para eluir os compostos além do tempo morto da coluna e gerar picos simétricos. A coluna utilizada foi a Agilent ZORBAX Eclipse Plus<sup>TM</sup>, C18, 4,6 mm × 150 mm (5,0 µm), Agilent Technologies<sup>®</sup>, mantida a 30°C. O volume de injeção foi estabelecido em 5 µL.

Os híbridos e seus precursores foram submetidos a testes em diferentes condições de armazenamento: -20°C ± 5°C, 4°C ± 3°C e temperatura ambiente durante 0 (zero), 1 (um) mês, e a 37°C durante 72 h, para análises qualitativas e quantitativas referentes a possíveis produtos de degradação. Foram preparadas soluções de concentrações conhecidas com as quais foram realizados os ensaios iniciais t(0), e a partir destas, alíquotas foram armazenadas nas condições especificadas acima mediante semelhante tipo de armazenamento. Também foram



submetidas a testes de descongelamento, em que cada alíquota foi descongelada e congelada por 5 vezes. Todos os ensaios foram feitos em triplicata, a análise dos resultados foi realizada em software adequado apresentando média, desvio padrão e coeficiente de variação.

#### **4.14 Análise estatística**

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média de determinações feitas em triplicata, por meio do programa Graphpad Prism<sup>®</sup>. As comparações estatísticas foram realizadas por meio da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnet para comparação com o grupo controle. Um valor de probabilidade menor que 0,05 ( $p < 0,05$ ) foi considerado estatisticamente significativo.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 PERFIL DE ABSORÇÃO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES E SEUS PRECURSORES NA REGIÃO ULTRAVIOLETA DO ESPECTRO ELETROMAGNÉTICO E MÉTODO ANALÍTICO

Devido ao fato de os compostos híbridos utilizados neste trabalho serem inéditos, algumas medidas de caracterização química fundamentais para os nossos objetivos foram realizadas. Primeiramente, foram feitas varreduras de 250 nm a 400 nm com a concentração do analito ajustada para 250  $\mu\text{M}$  para os híbridos FA247 (DHPM - Ácido cinâmico), FA260 (DHPM - Ácido Cafeico) e FA261 (DHPM - Ácido Ferúlico), e 500  $\mu\text{M}$  para os precursores ácido cinâmico, ácido cafeico e ácido ferúlico, e também 500  $\mu\text{M}$  para o Monastrol, cujas concentrações representam menos de 1 mg/mL. Os outros dois híbridos (FA339 e FA438) não fizeram parte dos ensaios pois estes resultaram de modificações estruturais feitas posteriormente a fim de aferir maior atividade citotóxica aos compostos. Além disso, pela dificuldade de preparo e purificação das moléculas, obteve-se baixas quantidades dos produtos puros, o que levou a decisão de deixar os derivados de fora dos ensaios de estabilidade, priorizando-os para os ensaios de caracterização da atividade farmacológica.

Os picos mais intensos de cada composto foram obtidos: 288 nm para o FA247, 330 nm para o FA260, 328 nm para o FA261, 303 nm para o monastrol, 322 nm para o ácido cafeico, 273 nm para o ácido cinâmico e 320 nm para o ácido ferúlico. Os cromatogramas e espectros de UV para cada composto estão apresentados no apêndice A. Os dados e os cromatogramas dos ensaios dos híbridos moleculares e de seus respectivos precursores estão na Tabela 1e no apêndice B.

**Tabela 1. Perfil de absorção UV dos híbridos moleculares e respectivos precursores.**

Ensaio inicial (t=0)			
Compostos	Concentração	Área dos picos (média ± desvio padrão)	Tempo de retenção (média ± desvio padrão)
FA247	250 µM	543074 ± 8703,47	2,88 ± 0,02
FA260	250 µM	405102 ± 3893,48	2,54 ± 0,00
FA261	250 µM	501811 ± 2172,08	2,64 ± 0,00
Monastrol	500 µM	241326 ± 1755,90	2,77 ± 0,01
Ácido cafeico	500 µM	527197 ± 316,11	2,53 ± 0,00
Ácido ferúlico	500 µM	624829 ± 3134,18	2,64 ± 0,00
Ácido cinâmico	500 µM	843526 ± 2565,70	3,03 ± 0,01
Fenol (P.A.)	500 µM	66132 ± 2969,86	2,93 ± 0,06

Soluções estoque concentradas (10 mM) dos híbridos moleculares e precursores foram feitas no dia chamado de T=0. Aliquotas foram diluídas na fase móvel empregada no método analítico e injetadas no mesmo dia. Os resultados representam média ± desvio padrão dos ensaios em triplicata (n=3).

## 5.2 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE DOS COMPOSTOS EM DIFERENTES MEIOS DE ARMAZENAMENTO

Após 30 dias (T= 30), exceto para armazenamento em estufa (37°C) (após 3 dias (T= 3)), alíquotas retiradas da solução estoque inicial e armazenadas em diferentes locais foram avaliadas referente ao coeficiente de variação em relação às injeções iniciais (T= 0), utilizando como referência o padrão analítico fenol. As tabelas contendo média ± desvio padrão das áreas dos picos e tempo de retenção (TR) dos ensaios estão nos apêndices C, e os cromatogramas dos respectivos ensaios encontram-se nos apêndices D ao G.

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), o critério para aceitação de repetibilidade é a condição de medição num conjunto de condições, as quais incluem o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições de operação e o mesmo local, assim como medições repetidas no mesmo objeto ou em objetos

similares durante um curto período de tempo. Normalmente este critério está associado ao nível de concentração em que analitos com razão em  $10^{-6}$  podem apresentar coeficientes de variação de até 11%. Como pode-se observar na Tabela 2, a condição de armazenamento que melhor satisfaz este quesito é o armazenamento de 0°C a 4°C (geladeira). Na condição de armazenamento em temperatura ambiente, pode-se observar picos de possíveis produtos de degradação nos cromatogramas (ácido cafeico e ácido ferúlico).

A variação apresentada pelo fenol nas intensidades nos picos dos cromatogramas, foi utilizada para normalizar o experimento, visto que o fenol é uma molécula estável, susceptível para ser padrão de referência para este experimento, podendo corrigir possíveis erros na mensuração de intensidades dos picos.

Como os compostos armazenados em temperatura de 0°C a 4°C, apresentaram pouca variação na intensidade nos picos dos cromatogramas, e como mesmo após 30 dias havia repetibilidade nos outros ensaios quando utilizados os compostos, considerou-se que os híbridos não degradam em outros subprodutos, e são estáveis por determinado tempo em solução.

**Tabela 2. Coeficiente de variação referente a diferentes tipos de armazenamento em relação aos ensaios iniciais.**

Compostos	Concentração	Coeficiente de variação			
		Arm. 0-4°C (%)	Arm. -20°C (%)	Arm. Estufa 37°C (72h) (%)	Arm. Temp ambiente (%)
FA247	250 µM	6,99	14,57	9,24	14,52
FA260	250 µM	6,75	14,20	14,56	8,83
FA261	250 µM	9,39	15,59	13,07	16,92
Monastrol	500 µM	9,81	15,28	13,58	16,25
Ácido cafeico	500 µM	6,24	15,12	11,99	3,27
Ácido ferúlico	500 µM	8,46	10,84	8,86	4,07
Ácido cinâmico	500 µM	9,94	15,93	8,38	16,17

Soluções estoque concentradas (10 mM) dos híbridos moleculares e seus precursores foram feitas no dia chamado de T=0. Aliquotas foram armazenadas por período de tempo específico e, após, diluídas na fase móvel empregada no método analítico e injetadas no equipamento para o ensaio. Os resultados representam média ± desvio padrão dos ensaios em triplicata (n=3). Todos os ensaios seguiram o mesmo método analítico. Os resultados apresentam a variação em % em relação ao T=0.

### 5.3 EFEITO CITOTÓXICO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES EM LINHAGENS CELULARES DE CÂNCER

Primeiramente, o efeito citotóxico dos híbridos moleculares entre a DHPM e os ácidos fenólicos, compostos FA247, FA260, FA261, foi avaliado frente a linhagem celular tumoral, NCI-H460. Na tabela 3 estão descritas as concentrações de IC<sub>50</sub> que foram determinadas empregando o método de avaliação de viabilidade celular. O composto com a citotoxicidade mais pronunciada entre os três foi o FA247 (62,0 µM), seguido do FA260 (109,6 µM) e FA261 (72,7 µM). Estes valores podem ser devido às substituições no anel benzênico da parte ácido fenólico da estrutura dos híbridos. Os dois compostos com substituintes no anel benzênico (FA260 e FA261) podem ter uma maior polaridade quando comparado ao composto que não possui nenhuma substituição (FA247),

alterando a lipossolubilidade, dificultando sua penetração na membrana celular, o que pode explicar o menor efeito citotóxico.

A partir dos compostos FA247 e FA261, por apresentarem uma citotoxicidade ligeiramente maior entre os três compostos híbridos testados, foram desenvolvidos derivados destas moléculas com modificações na estrutura do núcleo da DHPM, a fim de elucidar o comportamento das células, comparando-se com as estruturas dos compostos iniciais. Os compostos FA339 e FA438 resultaram em efeitos citotóxicos mais pronunciados do que os híbridos precursores. Resultado que ressalta o fato de que a substituição da molécula de oxigênio (O) por uma molécula de enxofre (S) no núcleo da DHPM (utilizando o monastrol como "core" da estrutura) altera de forma expressiva o efeito sobre as células tumorais de câncer de pulmão utilizadas neste trabalho. Estes dois últimos compostos foram os que apresentaram a menor IC<sub>50</sub> frente a linhagem tumoral estudada, com concentrações de 31,5 µM para o FA339 e 29,3 para o FA438.

As concentrações obtidas de IC<sub>50</sub> foram utilizadas como parâmetros para os próximos experimentos.

**Tabela 3 - Concentração do composto que causa toxicidade a 50% das células (IC<sub>50</sub>).**

Compostos	IC <sub>50</sub> (µM)	
	Não tumoral	Tumoral
	HUVEC	NCI-H460
FA247	119,6 ± 13,4	62,0 ± 2,6
FA260	> 150,0	109,6 ± 2,0
FA261	72,7 ± 3,4	71,9 ± 6,3
FA339	39,4 ± 2,0	31,5 ± 2,3
FA438	73,0 ± 3,1	29,3 ± 1,8

Método utilizado: *alamar blue*, Dados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3), tempo de incubação 72 h.

A linhagem não tumoral de células endoteliais da veia umbilical humana - HUVEC - foi utilizada a fim de comparar valores de

citotoxicidade com as da linhagem tumoral NCI-H460 e seletividade dos compostos estudados. Esta linhagem celular foi selecionada pois recobre o tecido endotelial de vasos e capilares sanguíneos. Como a grande maioria de tratamentos quimioterápicos é feita por via endovenosa, esta linhagem celular não-tumoral é adequada para este tipo de ensaio. MUKHHOPADHYAY e colaboradores (2002) também apresentaram o índice de seletividade de mebendazol comparando as duas linhagens utilizadas neste estudo.

Como os tratamentos com quimioterápicos convencionais são, via de regra, acompanhados por efeitos colaterais graves como: mielossupressão, toxicidade renal e náuseas (BAI, *et al.*, 2009), a busca por novas moléculas com menor potencial tóxico para células não-tumorais se faz necessária. Os compostos FA339 e FA438 apresentaram efeitos citotóxicos mais pronunciados na linhagem tumoral NCI-H460 do que na linhagem não tumoral após 72 h de incubação. Esta é uma característica importante, que pode favorecer a eficácia o tratamento, priorizando células tumorais frente as não tumorais.

O índice de seletividade (IS) calculado dos compostos é apresentado na tabela 4. Quanto maior este índice, maior é a toxicidade dos compostos para as células tumorais. Um IS igual a 2, por exemplo, significa que as células tumorais são 100% mais sensíveis aos compostos do que as não tumorais. Neste estudo os compostos com melhores IS foram o FA438 (IS= 2,5), seguido do FA339 (IS= 1,2). Os outros híbridos moleculares acabaram sendo igualmente citotóxicos para as células da linhagem não-tumoral e para a linhagem tumoral ou, para o caso do FA260, como este apresentou citotoxicidade baixa (>150,0  $\mu$ M) para a linhagem tumoral, não foi realizado o ensaio de alamar blue deste composto para a linhagem HUVEC. Esta diferença na citotoxicidade indicada pelos valores de IS podem ser relativas às diferenças estruturais das moléculas testadas, como também diferenças entre os alvos de ação dos compostos entre as linhagens de células tumorais e não tumorais.

Como os compostos FA339 e FA438 foram mais citotóxicos entre todos os híbridos testados, e possuem índice de seletividade maior que 1,0, estes foram selecionados para dar prosseguimento aos demais ensaios.

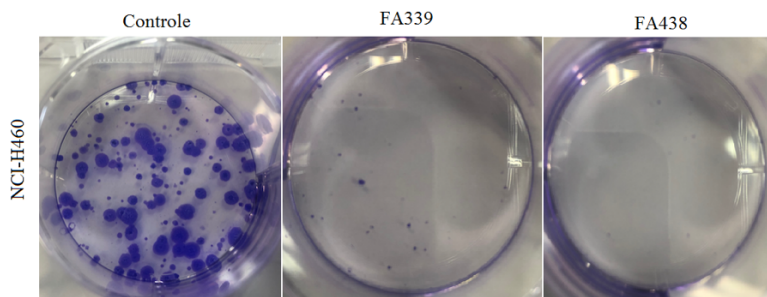


**Tabela 4. Índice de seletividade (IS) calculado por meio da razão entre a  $IC_{50}$  da linhagem não tumoral HUVEC e a  $IC_{50}$  da linhagem tumoral NCI-H460.**

	Índice de Seletividade	
	Composto	HUVEC / NCI-H460
Análogos	FA247	1,9
	FA260	-
	FA261	1,0
Derivados	FA339	1,2
	FA438	2,5

#### 5.4 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 E FA438 NO POTENCIAL DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS DAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO NCI-H460

Após observar o efeito dos compostos na proliferação celular, o ensaio clonogênico foi realizado para investigar os efeitos dos híbridos no potencial de formação de colônias das células NCI-H460. Os dois compostos, FA339 e FA438, promoveram uma redução no número total de colônias formadas e também na densidade celular de cada colônia quando comparadas com as Células Controle. As concentrações dos compostos utilizadas neste ensaio foram as respectivas  $IC_{50}$ . O resultado representativo exibido na Figura 6 mostrou que as Células Controle, formaram 130 colônias, enquanto que quando incubadas com o FA339 e o FA438 (Células Teste), formaram 22 e 9 colônias de baixa densidade, respectivamente.

**Figura 6. Ensaio clonogênico.**

As células foram incubadas por 24 h em meio de cultura. Após, a incubação com FA339 e FA438 por 72 h foi adicionado. Passado esse período, substituiu-se o meio e este foi trocado a cada 3 dias durante 7 dias. Após, as colônias foram fixadas e coradas com cristal violeta 0,5%.

O ensaio clonogênico ou de formação de colônias é realizado *in vitro* e visa avaliar a sobrevivência celular baseado na capacidade de uma única célula transformar-se numa colônia. Uma colônia é considerada como tal quando for constituída de pelo menos 50 células. O ensaio testa, essencialmente, todas as células da população pela capacidade de sofrer divisão "ilimitada". O ensaio clonogênico consiste no método de escolha para determinar a morte reprodutiva celular após a exposição aos agentes citotóxicos e assim determinar as respectivas eficácias (FRANKEN et al., 2006).

Quando comparada a resposta de tumores humanos estabelecidos *in vivo*, e testes de ensaio clonogênico *in vitro*, aos da resposta clínica, 62% das comparações para sensibilidade a fármacos e 92% das comparações para resistência a fármacos foram similares (FIEBIG; MAIER; BURGER, 2006).

Considera-se este resultado de inibição de proliferação celular significativo motivando o prosseguimento do estudo.

### 5.5 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 e FA438 NA INDUÇÃO DE MORTE CELULAR EM CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO NCI-H460

O conhecimento dos mecanismos de ação de compostos antitumorais é extremamente importante. O tipo de morte celular envolvido no efeito biológico de moléculas é relevante no sentido de desenvolvimento de novos fármacos e/ou melhoramento de outros. O

desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas é voltado na indução de morte de células malignas por apoptose (GALLUZZI et al., 2012). Ainda, na literatura, não existem referências sobre os híbridos moleculares estudados neste trabalho, e quais os possíveis efeitos que estes podem exercer sobre a linhagem tumoral de câncer de pulmão NCI-H460. Neste sentido, analisou-se o tipo de morte celular causada pelos híbridos moleculares FA339 e FA438 por citometria de fluxo, utilizando a marcação com Anexina-V-FITC e Iodeto de propídeo.

A análise do tipo de morte celular neste ensaio dá-se pela translocação da fosfatidilserina, que é externalizada na membrana plasmática após processo de transformação na bicamada fosfolipídica, fenômeno conhecido como *flip-flop* que acontece no início do processo de morte celular por apoptose. Assim, células apoptóticas podem ser marcadas com anexina-V conjugada com o fluorocromo FITC. Em estágios avançados da apoptose, quando a membrana plasmática perde a integridade e passa a apresentar poros (como ocorre na necrose), pode ocorrer uma dupla marcação nas células com Anexina-V e a conjugação de iodeto de propídeo ao DNA. Nesse caso, aponta-se o tipo de morte celular como apoptose tardia, não como uma nova classificação de morte celular, mas sim como um termo relacionado a metodologia utilizada (KRYSKO et al., 2008; FERREIRA et al., 2000).

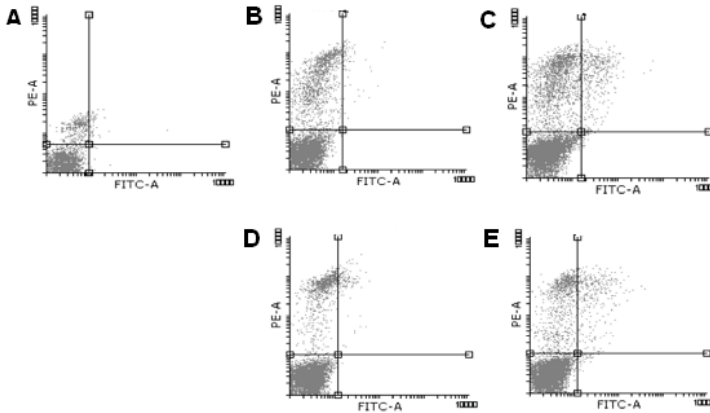
Por este motivo, duas concentrações diferentes foram empregadas neste método a fim de elucidar de forma mais clara o mecanismo envolvido na morte celular induzido pelos compostos testados.

Nos gráficos do tipo *dot plots* representativos dos experimentos que estão mostrados na figura 7 (e apêndice H) é possível verificar que não houve uma mudança do número de eventos do quadrante inferior esquerdo (células viáveis), comparando-se os *dot plots* das Células Controle e as Células Teste. Nos ensaios com as duas concentrações diferentes ( $IC_{50}$  e  $\frac{1}{2} IC_{50}$ ), os resultados sugerem que nenhum dos dois compostos foram capazes de induzir morte na linhagem de células NCI-H460, apenas um pequeno aumento na população do quadrante esquerdo superior, que indica células em necrose, estatisticamente não significativo ( $p = 0,30$ ).

Neste sentido, diversos estudos têm mostrado que outros produtos da reação de Biginelli (ZHU; BIENAYMÉ, 2006), podem ter atividade pró-apoptótica em algumas linhagens de câncer de pulmão como a A549 (MOSTAFA; SELIM, 2018) ou na linhagem de leucemia promielocítica aguda HL60 (RAGAB, et al., 2017), porém na grande maioria de linhagens tumorais, esses compostos causam apenas um

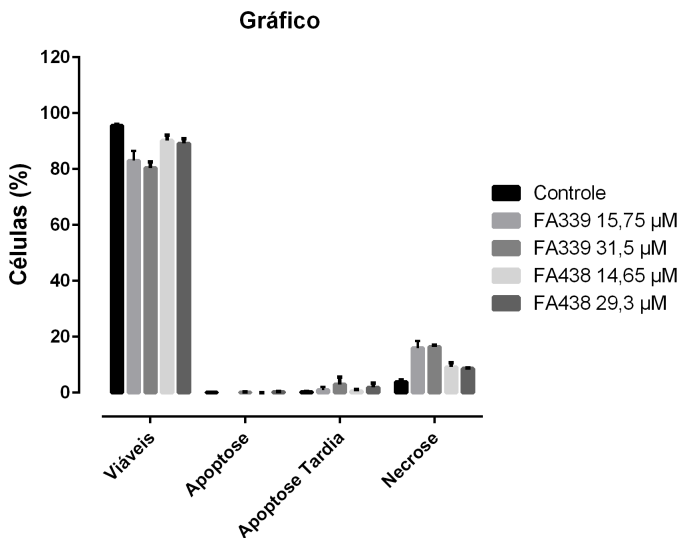
bloqueio no ciclo celular, assim como o monastrol (KAPOOR, et al., 2000), o precursor dos compostos aqui testados. Os resultados dos *dot plots*, representados pela Figura 8, indicam que a citotoxicidade dos compostos FA339 e FA438 pode estar associada a uma inibição do crescimento da colônia celular e não com um mecanismo associado à morte celular.

**Figura 7. Avaliação do tipo de morte celular induzido pelos híbridos na linhagem NCI-H460**



As Células Teste foram incubadas por 72 h com os compostos FA339 e FA438 nas concentrações de suas respectivas  $IC_{50}$  e  $\frac{1}{2} IC_{50}$ . Os gráficos (*dot plots*) representam um dos experimentos realizados, sendo  $n=3$ . As populações de células em cada quadrante foram determinadas utilizando o programa Flowing (2.5). O quadrante inferior esquerdo representa as células viáveis, o quadrante inferior direito representa as células em apoptose, o canto superior esquerdo representa as células em necrose e o canto superior direito as células duplamente marcadas. Células Controle (A); Células Teste: incubadas com  $15,75 \mu\text{M}$  de FA339 (B),  $31,5 \mu\text{M}$  de FA339 (C)  $14,65 \mu\text{M}$  de FA438 (D) e  $29,30 \mu\text{M}$  de FA438 (E).

**Figura 8. Quantificação do tipo de morte celular induzida pelos compostos FA339 e FA438 na linhagem celular NCI-H460.**



As Células Teste foram incubadas por 72 h com os compostos FA339 e FA438 nas concentrações de suas respectivas  $IC_{50}$  e  $\frac{1}{2} IC_{50}$ . O gráfico de barras representa a porcentagem de células referentes em cada quadrante. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão de um  $n=3$ . Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com as Células Controle.

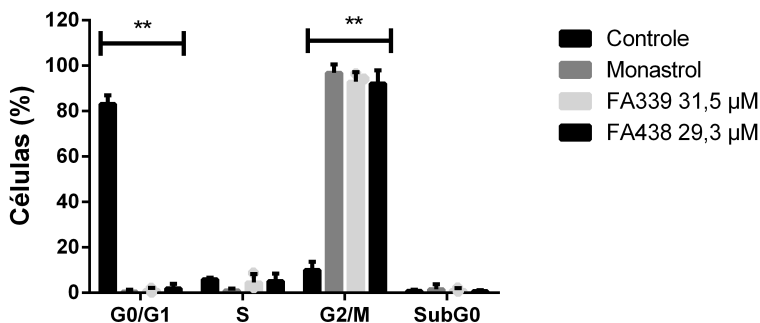
## 5.6 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 e FA438 NAS FASES DO CICLO CELULAR NAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO NCI-H460

O efeito dos híbridos moleculares FA339 e FA438 na progressão do ciclo celular da linhagem celular NCI-H460 foram avaliados após 72 h de incubação, pela determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. As populações celulares foram divididas nas fases G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>/M do ciclo celular. O monastrol foi utilizado como controle positivo, devido aos efeitos inibitórios conhecidos exercidos na mitose, causando uma pausa na fase G<sub>2</sub>/M (LEIZERMAN et al. 2004). Os histogramas representativos do experimento para avaliação do ciclo celular da linhagem NCI-H460 encontram-se no apêndice I.

A análise da fase específica do ciclo celular, na qual as células se encontram, é importante para avaliar a resposta da linhagem diante dos efeitos de agentes terapêuticos (WILLIAMS; STOEBER, 2012). Este ensaio resulta da quantificação do conteúdo de DNA de cada célula, e a técnica mais rápida e eficaz para este fim é a citometria de fluxo (DARZYNKIEWICZ et al., 2011).

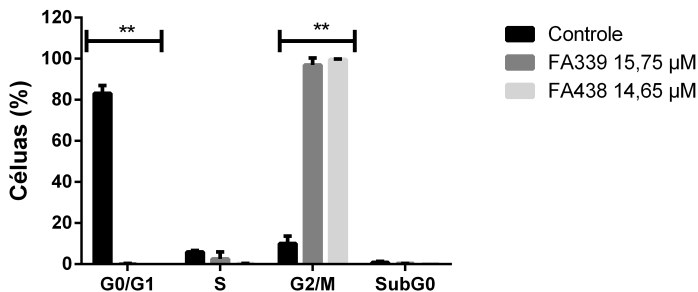
Em comparação com as células controle (células que foram incubadas na ausência dos compostos), as células incubadas com os híbridos mostraram uma mudança significativa nas fases do ciclo celular. Houve um bloqueio extremamente significativo na fase G2/M ( $p = 0.003$ ), tanto utilizando-se a  $IC_{50}$  dos compostos, como mostrado na Figura 8, assim como utilizando apenas a  $\frac{1}{2} IC_{50}$  (Figura 9). O controle positivo utilizado (monastrol) também causou uma parada na fase G2/M como esperado. Porém, a concentração utilizada de monastrol foi pelo menos 2,5 vezes ( $80 \mu\text{M}$ ) maior do que a concentração dos compostos em estudo para atingir o mesmo nível de bloqueio.

**Figura 9. Efeito dos híbridos sobre a distribuição das células no ciclo celular na linhagem NCI-H460.**



As células foram incubadas com a  $IC_{50}$  dos compostos, ou  $80 \mu\text{M}$  de monastrol (controle positivo) por 72 h e analisadas por citometria de fluxo. A distribuição no ciclo celular está representada pelas fases G0/G1, S e G2/M. A quantificação das células foi realizada com auxílio do programa Flowing 2.5. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$  (\*\*) foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com as Células Controle em cada fase do ciclo celular.

**Figura 10. Efeito dos híbridos sobre a distribuição das células no ciclo celular na linhagem NCI-H460.**



As células foram incubadas com a  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> dos compostos por 72 h e analisadas por citometria de fluxo. A distribuição no ciclo celular está representada pelas fases G0/G1, S e G2/M. A quantificação das células foi realizada com auxílio do programa Flowing 2.5. Cada barra representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$  (\*\*) foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com as Células Controle em cada fase do ciclo celular.

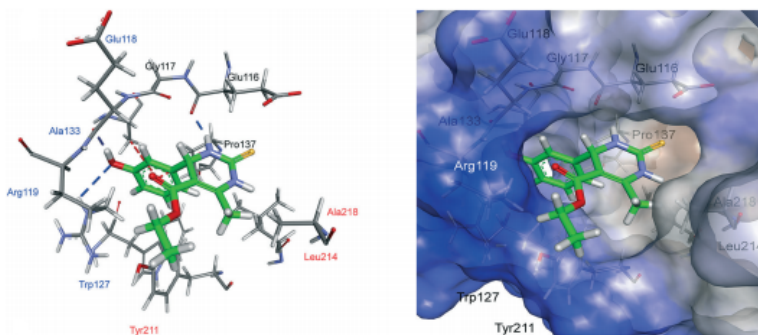
Ainda em referência ao ciclo celular, durante a divisão celular, o DNA replicado é segregado em duas células-filhas por um fuso bipolar. Os microtúbulos do fuso são formados por polímeros dinâmicos, ao longo dos quais são direcionados os movimentos dos cromossomos. Estes microtúbulos são isolados por centrossomos e proteínas associadas aos centrossomos, e são organizados em matrizes bipolares por proteínas motoras. Somente após a montagem de um fuso funcional, com cada cromossomo corretamente conectado aos microtúbulos, a segregação das cromátides-irmãs é permitida pelas proteínas do ponto de checagem, e a divisão celular é então concluída (RIEDER; SALMON, 1998).

O monastrol é uma molécula de baixo peso molecular, permeável às células, e atua como inibidor da maquinaria mitótica e não tem como alvo as tubulinas, diferentemente de fármacos utilizados na clínica como os derivados de taxol. O monastrol retém as células na mitose com fusos monoastrais, constituídos por uma matriz radial de microtúbulos rodeados por um anel de cromossomas, não afetando microtúbulos em células interfásicas ou a polimerização de microtúbulos *in vitro*, induzindo a formação de um único fuso mitótico,

substituindo o fuso bipolar que é uma característica comum da divisão celular (MAYER et al., 1999).

Os compostos FA339 e FA438, por terem uma alteração no anel benzenico (inclusão do ácido fenólico), são mais lipofílicos que o monastrol, possivelmente pela despolarização da molécula. Como consequência a molécula pode atravessar com maior eficácia a membrana celular, aumentando assim o efeito ativo. Esta conclusão foi baseada no estudo de docking molecular (GONÇALVES et al., 2018), ilustrado na Figura 11. No estudo, os autores avaliaram as interações entre o monastrol e o sítio ativo da cinesina EG5. Os nitrogênios de um dos anéis do monastrol fazem interações de hidrogênio com os resíduos de aminoácidos da cinesina EG5, assim como o oxigênio do anel fenólico, enquanto o oxigênio do éster da cadeia lateral tem interações hidrofóbicas com resíduo de glicina, isoleucina e prolina. Com a substituição da hidroxila do anel fenólico pelo ácido transcinâmico (FA339) ou ácido transcafeico (FA438), a partir de uma ligação amida, o composto pode ter mais interações com o sítio ativo a partir dos pares de elétrons isolados do nitrogênio e oxigênio da amida, assim como interações com elétrons  $\pi$  do anel do ácido fenólico e suas hidroxilas no caso do FA438.

**Figura 11. Sítio ativo alostérico da Cinesina EG5, ilustrando as interações com a cristalografia do monastrol.**



As interações são representadas como linhas tracejadas nas seguintes cores: ligações de hidrogênio (azul escuro), interações hidrofóbicas (vermelho) e interações ânion -  $\pi$  (azul ciano) (GONÇALVES et al., 2018).



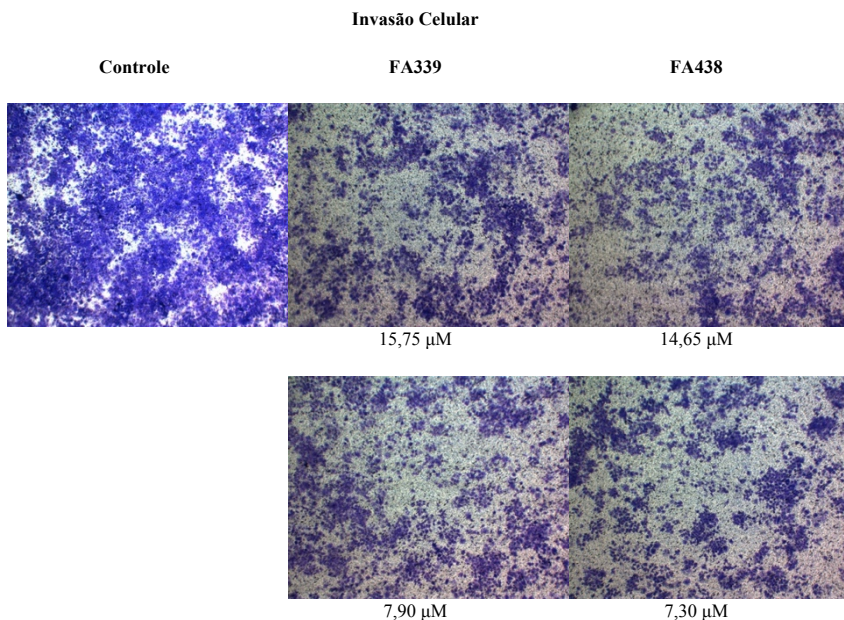
## 5.7 EFEITO DOS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 e FA438 NA INVASÃO E METÁSTASE NAS CÉLULAS DE CÂNCER DE PULMÃO HUMANO NCI-H460

Um material muito utilizado em ensaios de invasão celular é o Matrigel<sup>®</sup>. Este material consiste em um extrato composto por proteínas da membrana basal, que mimetiza um gel 3D a 37°C, e suporta a morfogênese, diferenciação celular e o crescimento tumoral *in vitro*, permitindo a avaliação do potencial antimetastático de compostos que possam agir sobre células tumorais, alterando a motilidade sobre moléculas de adesão e metaloproteínas. A composição do Matrigel<sup>®</sup> é feita de proteínas estruturais como laminina, entactina e colágeno, além de fatores de crescimento e outras proteínas. A partir desta composição, o uso deste gel permite avaliar a invasividade celular (KLEINMAN; MARTIN, 2005).

Baseados nestas premissas, foi realizada a avaliação da capacidade das células tumorais da linhagem NCI-H460 invadirem o Matrigel<sup>®</sup>, atravessando uma membrana de 8 µm. As concentrações dos compostos foram de  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> e  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub>. Com esta estratégia, evita-se que o grupo teste não apresente morte celular significativa causada pelos compostos, e avalie-se somente a capacidade antimetastática.

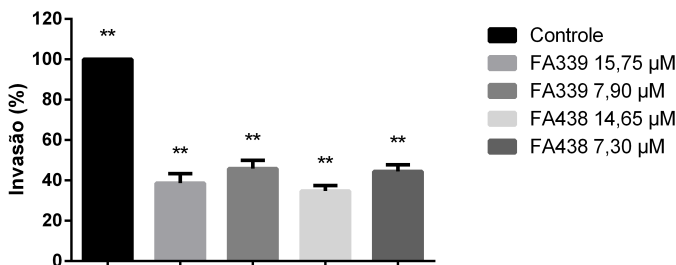
Na figura 12, observa-se que as células incubadas com os compostos FA339 e FA438 foram afetadas quanto a capacidade de atravessar o Matrigel<sup>®</sup>, quando comparadas as células controle. Quando estes resultados foram quantificados espectrofotometricamente (Figura 13) observa-se que apenas  $38,6 \pm 4,7\%$  das células atravessaram na presença da  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub> do FA339 e  $45,8 \pm 4,2\%$  quando com  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub> FA339. Já para os compostos FA438, observa-se que quando as células foram incubadas com  $\frac{1}{2}$  IC<sub>50</sub>, apenas  $34,7 \pm 2,7\%$  destas atravessaram o Matrigel<sup>®</sup> e  $44,5 \pm 3,2\%$  quando incubadas com  $\frac{1}{4}$  IC<sub>50</sub>.

Os resultados obtidos foram estatisticamente significativos segundo o teste ANOVA de uma via, com  $p = 0.02$ , sugerindo um potencial antimetastático destes compostos. Porém, outros ensaios são necessários para avaliar qual mecanismo os compostos utilizam para alterar a capacidade invasiva das células da linhagem NCI-H460 *in vitro*.

**Figura 12. Efeito dos híbridos sobre a capacidade de Invasão Celular.**

As células NCI-H460 foram incubadas com os compostos por 72 h. Após esse período, as células que invadiram o Matrigel<sup>®</sup> e atravessaram a membrana foram fixadas com glutaraldeído 5% em BSA e coradas com cristal violeta 0,5% para melhor visualização. O controle representa as células incubadas na ausência dos compostos. As fotomicrografias no aumento de 100 $\times$  representam dados de um dos três experimentos independentes. As imagens foram feitas com auxílio do programa ImageJ.

**Figura 13. Efeito dos híbridos sobre a capacidade de Invasão Celular.**



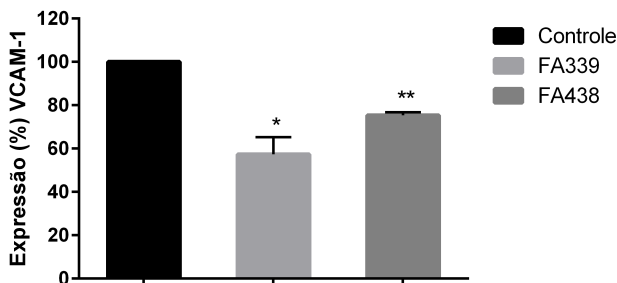
As células NCI-H460 foram incubadas com os compostos por 72 h. Após este período, as células que invadiram o Matrigel® e atravessaram a membrana foram fixadas com glutaraldeído 5% em BSA e coradas com cristal violeta 0,5% para melhor visualização. A quantificação das células que atravessaram a membrana foi feita espectrofotometricamente em 595 nm. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$  (\*\*) foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com as células do grupo controle.

Baseando-se nos resultados de invasão celular em que os compostos inibiram fortemente o processo, realizou-se um ensaio verificando a expressão da molécula de adesão VCAM-1. Ensaio de expressão de moléculas de adesão são interessantes para elucidar os efeitos de compostos sobre a metástase tumoral. Particularmente, durante os processos inflamatórios, as moléculas de adesão vascular desempenham um papel importante. Interações entre célula e matriz extracelular são necessárias para a adesão e extravasamento de leucócitos. A regulação positiva das moléculas de adesão nas células endoteliais é uma característica do estado inflamatório (BEVILACQUA, 1993; SPRINGER, 1990), em que a ativação de células endoteliais por citocinas inflamatórias pode provocar um aumento na adesão de células tumorais *in vitro* (BERETA et al., 1991; DEJANA et al., 1988). Além disso, o aumento do nível de VCAM-1 está relacionado a progressão de diversos tipos de câncer, sendo que o surgimento desta super-expressão aumenta consideravelmente o risco de metástase (JOHNSON et al., 2016).

Baseados nestas premissas, o nível de expressão da proteína VCAM-1 foi quantificado por meio de *Western Blot*, comparando-se Células Controle da linhagem NCI-H460 e Células Teste, incubadas com as concentrações referentes às  $IC_{50}$  dos compostos FA339 e FA438.

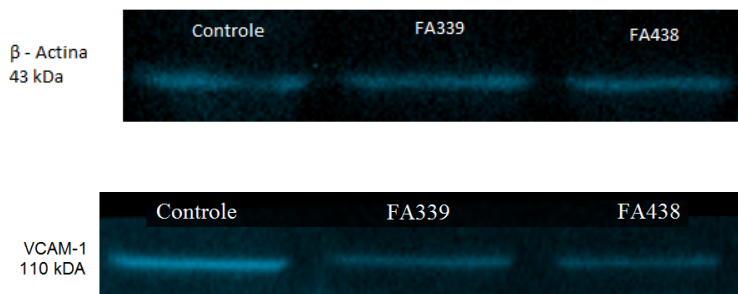
O gráfico da Figura 14 mostra a quantidade (em %) da proteína VCAM-1 em relação ao controle após normalização pelo controle endógeno ( $\beta$ -Actina). De acordo com os resultados, houve diminuição do conteúdo da proteína após exposição das células com FA339 e FA438, resultando em uma inibição de 42,7% e 24,7% respectivamente, após 72 h de incubação. A Figura 14 por sua vez mostra a imagem representativa das bandas imunomarcadas. O teste ANOVA de uma via seguido pelo teste Dunnett comprova que os dados são estatisticamente significativos em que o valor de p foi igual a 0.02. Com estes resultados, pode-se indicar que os compostos possuem uma potencial atividade antimetastática.

**Figura 14. Quantificação relativa da proteína VCAM-1 em células NCI-H460 após tratamento com FA339 e FA438.**



Análise da densidade óptica relativa do nível de expressão da proteína VCAM-1 em Células Teste e em Células Controle em valores de %, em que o controle foi considerado 100%. Os resultados expressam a média  $\pm$  desvio padrão. Para análise estatística foi utilizada ANOVA de uma via, seguida do teste de Dunnett. Valores de  $p < 0,05$  (\*) e  $p < 0,01$  (\*\*) foram considerados estatisticamente significativos quando comparados com o mesmo grupo de células controle.

**Figura 15. Ilustração da proteína VCAM-1.**



O controle endógeno foi a proteína  $\beta$ -actina. As imagens representam dados de um dos três experimentos independentes de “immunoblotting”. As imagens foram obtidas com auxílio do programa ImageLab<sup>TM</sup> 6.0.1 - BIO-RAD.

### 5.8 INVESTIGAÇÃO SOBRE EFEITO SINÉRGICO ENTRE OS HÍBRIDOS MOLECULARES FA339 E FA438 COM OS FÁRMACOS PACLITAXEL E CARBOPLATINA

Como já mencionado na seção 2.4, os fármacos carboplatina e paclitaxel são aprovados pela FDA para utilização no tratamento quimioterápico para o câncer de pulmão. A combinação de fármacos, por vezes, gera efeitos anticancerígenos sinérgicos, reduz a toxicidade individual relacionada aos fármacos, suprime o fenômeno de resistência através de diferentes mecanismos de ação e reduz a dose de cada agente (ZHANG et al., 2016).

Como não se encontrou na literatura dados de  $IC_{50}$  dos fármacos carboplatina paclitaxel para os ensaios *in vitro* no período de 72 h de incubação, primeiramente fizemos as curvas de citotoxicidade pelo mesmo método (*Alamar Blue*), utilizado para os compostos aqui testados, para a carboplatina e o paclitaxel.

O valor de concentração encontrado que afeta a viabilidade celular em 50% para o paclitaxel foi 4,9 nM ( $4,9 \pm 0,5$ ). Este fármaco derivado dos taxois é um agente antitumoral largamente utilizado para o tratamento de câncer de pulmão, incluindo o subtipo histológico NSCLC. O paclitaxel estabiliza os microtúbulos por inibir a despolimerização da tubulina e, como resultado, interfere nas alterações dinâmicas que ocorrem durante a formação e desmonte do fuso mitótico, levando a uma parada do ciclo celular durante a mitose e, subsequente

indução de morte celular (JORDAN et al., 1993). A ação do fármaco é diferente de outros fármacos antitumorais, como os agentes alquilantes de DNA, possuindo mecanismos distintos subjacentes que levam a indução de apoptose (O'CONNOR et al., 1997).

WANG e colaboradores (1999) demonstraram evidências do envolvimento de várias vias de sinalização, incluindo a ação de várias proteína-quinases, tais como as proteínas quinases ativadas por mitógenos, quinases dependentes da fosforilação de Bcl-2, e a via da p53 no mecanismo molecular pelo qual a parada no ciclo celular durante a mitose, induzida pelo paclitaxel, leva a morte celular por apoptose.

A via da p53 parece ser dispensável para a apoptose induzida por paclitaxel, pois as taxas de resposta clínica ao tratamento com o fármaco demonstraram ser semelhantes entre os pacientes com os tipos mais agressivos de câncer ou outros tipos com mutações na p53 (BACUS et al., 2001; TAKAHASHI et al., 1989). Os cânceres com o tipo celular NCI-H460 possuem anormalidades na p53 facilmente detectáveis quando comparados ao tecido saudável de pulmão (TAKAHASHI, 1989).

Já para o fármaco carboplatina, a concentração de IC<sub>50</sub> encontrada para o tratamento *in vitro* de 72 h pelo método *Alamar Blue* foi 61,4 µM (61,4 ± 1,9). A carboplatina age como a cisplatina, formando complexos de platina-DNA e tem atividade antitumoral semelhante à cisplatina (SIDDIK, 2003). Em comparação com a cisplatina, a carboplatina não apresenta nefrotoxicidade, é menos tóxica para o trato gastrointestinal e menos neurotóxica; em contraste, a mielossupressão, principalmente trombocitopenia, é efeito limitante para tratamentos com doses mais elevadas de carboplatina. Os complexos formados pela carboplatina e o DNA são essencialmente os mesmos que aqueles formados pela cisplatina, mas é necessária uma concentração de carboplatina de 20 a 40 vezes maior, e a taxa de complexação é cerca de 10 vezes mais lenta (KNOX et al., 1989).

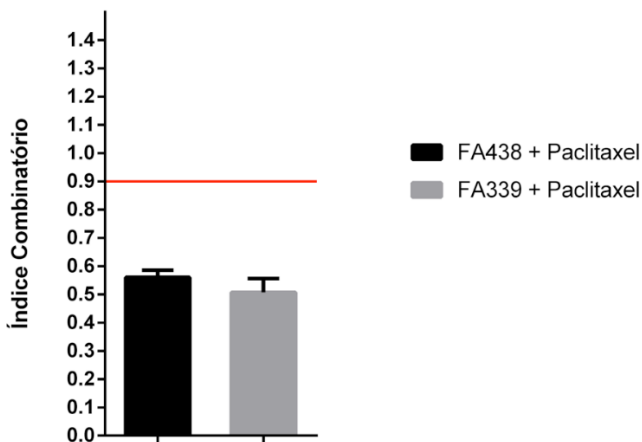
O mecanismo de ação da cisplatina (e da carboplatina) envolve a ligação covalente da platina às bases purina do DNA, ativando várias vias de transdução de sinal como, por exemplo, aquelas envolvidas no reconhecimento e reparo de danos ao DNA, parada do ciclo celular e morte celular programada (KELLAND, 2007; SIDDIK, 2003).

Neste trabalho, com o objetivo de melhorar a resposta dos fármacos paclitaxel (PTX) e carboplatina (CBP), adicionou-se concentrações equivalentes de fármaco + composto na incubação as células NCI-H460 a fim de determinar se há um efeito sinérgico, aditivo ou antagônico entre as moléculas, baseando-se na definição de Chou

(2006) que diz que o sinergismo consiste em um efeito maior do que simplesmente o efeito aditivo, ou seja, o somatório dos efeitos isoladamente, e o antagonismo como um efeito menor do que o aditivo.

A combinação (PTX + FA339, PTX + FA438, CBP + FA339 e CBP + FA438) foi analisada pelo programa CompuSyn. Este programa calcula o Índice Combinatório (IC), baseado na proposta de Chou e Talalay (1984), avaliando o efeito das curvas dose-resposta dos compostos isolados, seguido pela resposta citotóxica que envolve a combinação dos compostos com os fármacos. Na figura 16, observa-se que a combinação do FA339 com o PTX resultou em um efeito sinérgico para a linhagem NCI-H460, com um índice combinatório IC igual a 0,51, enquanto que a combinação do FA438 com o mesmo fármaco resultou em um índice combinatório igual a 0,56. Os dois resultados de índice combinatório são representativos para um  $Fa = 0,5$ , que significa que os dois compostos combinados com o PTX são sinérgicos quando o objetivo é causar toxicidade em 50% das células.

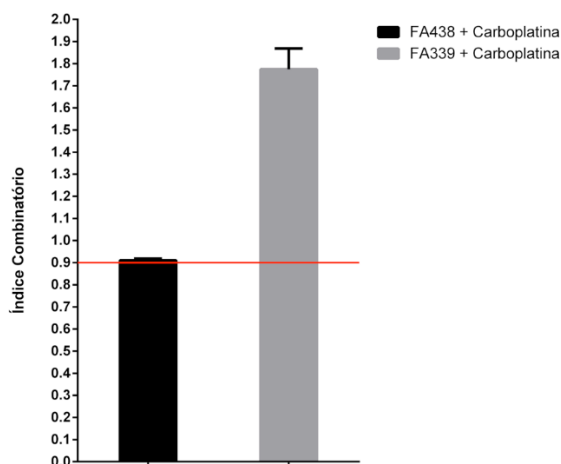
**Figura 16. Avaliação do índice combinatório (IC) dos compostos FA339 e FA438 com o fármaco Paclitaxel para  $Fa = 0,5$ .**



Para determinar o efeito da combinação entre compostos e fármaco foi utilizado o programa CompuSyn (versão 1.0). Índices combinatórios < 0,90 (valores abaixo da barra vermelha) são considerados sinérgicos, valores entre 0,9 - 1,0, efeito aditivo e valores > que 1,0 são considerados antagonísticos. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes

Por outro lado, quando os dois compostos (FA339 e FA438) foram combinados com o fármaco CBP, os resultados encontrados diferiram da resposta da combinação com o PTX. Apesar dos dois fármacos serem utilizados na clínica para o tratamento do câncer de pulmão de células do tipo NSCLC, como também serem utilizados em tratamentos combinados (SANDLER et al., 2006; JOHNSON et al., 2004), a combinação do fármaco CBP e dos híbridos moleculares resultou em um efeito aditivo, quando combinados a CBP e FA438, com um IC igual a 0,91, e um efeito antagônico quando combinado com o FA339, apresentando um IC igual a 1,77. Os dois resultados de índice combinatório são representativos para um  $Fa = 0,5$ , como mostrado na Figura 17.

**Figura 17. Avaliação do índice combinatório (IC) dos compostos FA339 e FA438 com o fármaco Carboplatina para  $Fa = 0,5$ .**



Para determinar o efeito da combinação entre compostos e fármaco, foi utilizado o programa CompuSyn (versão 1.0). Índices combinatórios  $< 0,90$  (valores abaixo da barra vermelha) são considerados sinérgicos, valores entre 0,9 - 1,0 efeito aditivo e valores  $>$  que 1,0 são considerados antagônicos. Cada ponto representa a média  $\pm$  desvio padrão de três experimentos independentes.

Posteriormente, foi verificado se os índices combinatórios iriam variar caso a índice inibitório desejado fosse mais alto. Análises a partir de isobogramas foram feitas para determinar se havia efeito sinérgico, aditivo ou antagônico em  $Fa$  iguais a 0,5, 0,75 e 0,9. Como se observa



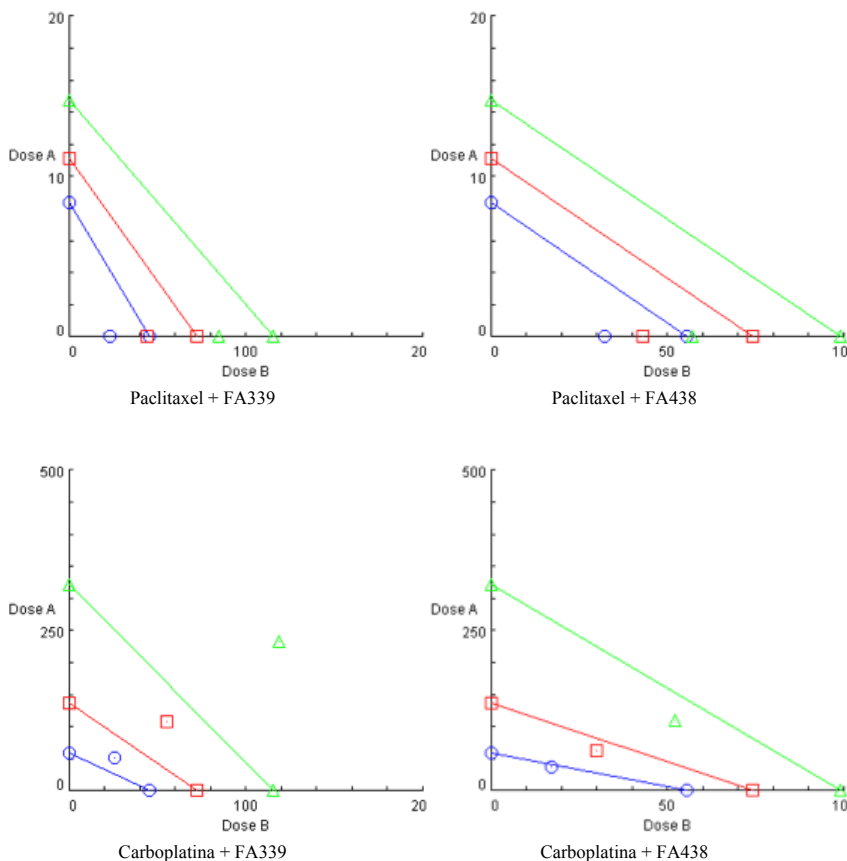
na tabela 5, em todos os índices de inibição analisados a combinação de PTX e FA339 assim como a combinação de PTX e FA438 indicam sinergismo. A combinação de CBP e FA438, nos três *Fa* analisados, resulta em um efeito aditivo, enquanto que a combinação de CBP e FA339 além resultar em um efeito antagônico nos três *Fa* analisados, há um incremento do efeito a medida que se utiliza um índice inibitório mais alto.

**Tabela 5. Índice combinatório entre os fármacos Paclitaxel e Carboplatina e os híbridos moleculares FA339 e FA438 em diferentes *Fa*.**

Índice Combinatório			
Combinação	<i>Fa</i> = 0,5	<i>Fa</i> = 0,75	<i>Fa</i> = 0,9
Paclitaxel + FA339	0,51 ± 0,05	0,62 ± 0,01	0,75 ± 0,04
Paclitaxel + FA438	0,56 ± 0,03	0,56 ± 0,02	0,56 ± 0,06
Carboplatina + FA339	1,77 ± 0,09	2,28 ± 0,26	3,06 ± 0,48
Carboplatina + FA438	0,91 ± 0,01	0,96 ± 0,21	0,92 ± 0,19

O índice combinatório em diferentes *Fa* foi calculado utilizando o programa CompuSyn (versão 1.0). Índices combinatórios < 0,90 são considerados sinérgicos, valores entre 0,9 - 1,0, efeito aditivo e valores > que 1,0 são considerados antagônicos. Cada dado representa a média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

**Figura 18. Isobogramas das combinações entre Paclitaxel e Carboplatina com os híbridos moleculares FA339 e FA438 nos  $Fa$  0,5, 0,75 e 0,9.**



Os isobogramas foram gerados utilizando o programa CompuSyn (versão 1.0). A linha diagonal é a linha de aditividade. Pontos de dados experimentais, representados por pontos, localizados abaixo, sobre ou acima da linha indicam sinergia, aditividade ou antagonismo, respectivamente.

A combinação de fármacos utilizados na clínica para o tratamento de câncer de pulmão com novos compostos ou moléculas específicas pode ser uma boa estratégia para melhorias nas terapias da doença. A associação dos compostos FA339 e FA438 com o PTX mostrou uma resposta relevante, que pode ser um estímulo para a realização de ensaios *in vivo* visando a diminuição da dose do fármaco.

## 6. CONCLUSÕES

Entre os híbridos testados neste trabalho, os que apresentaram melhor efeito citotóxico e melhor índice de seletividade entre as linhagens não tumoral HUVEC e tumoral de câncer de pulmão NCI-H460 foram os compostos FA339 e FA438. Por este motivo, estes foram escolhidos para dar continuidade aos experimentos.

Apesar de nenhum dos compostos induzir à morte celular por apoptose significativa, os dois compostos causaram bloqueio do ciclo celular na transição da fase G2/M, mesmo quando usadas concentrações menores que as respectivas IC<sub>50</sub>.

Além disso, os dois derivados foram capazes de causar uma diminuição da invasão celular da linhagem NCI-H460, além de diminuir os níveis de proteínas de adesão como a VCAM-1, cuja super-expressão está associada à progressão de diversos tipos de câncer e risco do desenvolvimento de metástases.

Ainda, a associação dos híbridos moleculares FA339 e FA438 ao fármaco Paclitaxel resultaram em um significativo efeito sinérgico, enquanto que a combinação de FA438 e Carboplatina resultou em um efeito aditivo.



## 7. PERSPECTIVAS

Até o fim deste trabalho, conclusões pertinentes foram obtidas. Porém, alguns estudos sobre esses compostos ainda podem ser realizados, para melhor elucidação dos mecanismos moleculares aqui propostos, como por exemplo:

- Avaliar a proteína ICAM-1 após a exposição aos híbridos moleculares FA339 e FA438 na linhagem celular NCI-H460.
- Avaliar as proteínas p53 e p21 após a exposição aos compostos para determinar o mecanismo causador de bloqueio do ciclo celular.
- Testar o efeito citotóxico dos compostos em outras linhagens tumorais de câncer de pulmão.
- Realizar testes *in vivo* dos compostos FA438 e FA339, além da combinação destes com o fármaco Paclitaxel.
- Comparar a efetividade dos compostos em comparação com os fármacos disponíveis no mercado.



## 8. REFERÊNCIAS

- ABBAS, Tarek; DUTTA, Anindya. p21 in cancer: intricate networks and multiple activities. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 6, p. 400, 2009.
- ALBERTS, Bruce et al. **O ciclo de divisão celular**. 4. ed. São Paulo: Artmed, 2017. 605 p.
- ALMEIDA, VL de et al. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ALTMAN, Brian J.; RATHMELL, Jeffrey C. Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 9, p. a008763, 2012.
- AMARANTE-MENDES, Gustavo P. Apoptose: programa molecular de morte celular. **Einstein**, v. 1, p. 15-18, 2003.
- ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA- RDC N° 45, DE 25 DE SETEMBRO DE 2014**. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+45\\_2014\\_AI-tera+RDC+42\\_2011\\_.pdf/fa71a5d9-f852-42c8-b10e-7f71feffa80?version=1.0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/Resolu%C3%A7%C3%A3o+RDC+45_2014_AI-tera+RDC+42_2011_.pdf/fa71a5d9-f852-42c8-b10e-7f71feffa80?version=1.0)>. Acesso em: 14 março 2019
- ASSUNÇÃO, Laura Sartori. **Avaliação da citotoxicidade de derivados de sais de isotiourônio e tiazinodionas para estudo de leucemia in vitro**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.
- BACUS, Sarah S. et al. Taxol-induced apoptosis depends on MAP kinase pathways (ERK and p38) and is independent of p53. **Oncogene**, v. 20, n. 2, p. 147, 2001.
- BARASH, Orna et al. Classification of lung cancer histology by gold nanoparticle sensors. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 8, n. 5, p. 580-589, 2012.

BERETA, Michal et al. Effect of inflammatory cytokines on the adherence of tumor cells to endothelium in a murine model. **Cellular Immunology**, v. 136, n. 2, p. 263-277, 1991.

BERTRAM, J. S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v.21, n. 6, p. 167-223, 2000.

BEVERS, Edouard M. et al. Lipid translocation across the plasma membrane of mammalian cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1439, n. 3, p. 317-330, 1999.

BEVILACQUA, Michael P. Endothelial-leukocyte adhesion molecules. **Annual Review of Immunology**, v. 11, n. 1, p. 767-804, 1993.

BIGINELLI, P\_. Aldehyde-urea derivatives of aceto-and oxaloacetic acids. **Gazzetta chimica italiana**, v. 23, n. 1, p. 360-413, 1893.

BLAGOSKLONNY, M. V. Cell death beyond apoptosis. **Leukemia**, v. 14, n. 8, p. 1502, 2000.

BOGO, Danieli. **Avaliação in vitro da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós- Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2009.

BRIER, Sébastien et al. Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Biochemistry**, v. 43, n. 41, p. 13072-13082, 2004.

BROWN, J. Martin; ATTARDI, Laura D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 2, p. 231, 2005.

BROWN, Michael; WITWER, Carl. Flow cytometry: principles and clinical applications in hematology. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1221-1229, 2000.

CASTEDO, Maria et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825, 2004.



COCHRAN, Jared C. et al. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12658-12667, 2005.

CHOU, Ting-Chao. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621-681, 2006.

CISILOTTO, Júlia et al. Isothiouonium salts reduce NRAS expression, induce apoptosis and decrease invasion of melanoma cells. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 15, n. 3, p. 353-362, 2015.

CODOGNO, Patrice; MEIJER, A. J. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. **Cell death and Differentiation**, v. 12, n. S2, p. 1509, 2005.

COLOFF, Jonathan L.; ZHAO, Yuxing; RATHMELL, Jeffrey C. The Integration of Metabolism and Cell Death. In: **Essentials of Apoptosis**. Humana Press, 2009. p. 223-237.

CORY, Giles. Scratch-wound assay. In: **Cell Migration**. Humana Press, 2011. p. 25-30.

COTTER, T. G. et al. Cell death via apoptosis and its relationship to growth, development and differentiation of both tumour and normal cells. **Anticancer Research**, v. 10, n. 5A, p. 1153-1159, 1990.

CURTIN, James F.; DONOVAN, Maryanne; COTTER, Thomas G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **Journal of Immunological Methods**, v. 265, n. 1-2, p. 49-72, 2002.

DALBY, Kevin et al. Targeting the pro-death and pro-survival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. **Autophagy**, v. 6, n. 3, p. 322-329, 2010.

DARZYNKIEWICZ, Zbigniew et al. Cytometry of DNA replication and RNA synthesis: Historical perspective and recent advances based on “click chemistry”. **Cytometry Part A**, v. 79, n. 5, p. 328-337, 2011.

DEGENHARDT, Kurt et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. **Cancer Cell**, v. 10, n. 1, p. 51-64, 2006.

DEJANA, E. et al. Interleukin 1 promotes tumor cell adhesion to cultured human endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 82, n. 4, p. 1466-1470, 1988.

DIMRI, Goberdhan P. What has senescence got to do with cancer? **Cancer cell**, v. 7, n. 6, p. 505-512, 2005.

EDINGER, Aimee L.; THOMPSON, Craig B. Death by design: apoptosis, necrosis and autophagy. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 6, p. 663-669, 2004.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

EOM, Young-Woo et al. Two distinct modes of cell death induced by doxorubicin: apoptosis and cell death through mitotic catastrophe accompanied by senescence-like phenotype. **Oncogene**, v. 24, n. 30, p. 4765, 2005.

FAVALORO, Bartolo et al. Role of apoptosis in disease. **Aging (Albany NY)**, v. 4, n. 5, p. 330, 2012.

FERREIRA, Carlos G. et al. Chemotherapy triggers apoptosis in a caspase-8-dependent and mitochondria-controlled manner in the non-small cell lung cancer cell line NCI-H460. **Cancer Research**, v. 60, n. 24, p. 7133-7141, 2000.

FETT-CONTE, Agnes C.; SALLES, A. B. C. F. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 85-89, 2002.

FIEBIG, H. H.; MAIER, A.; BURGER, A. M. Clonogenic assay with established human tumour xenografts: correlation of in vitro to in vivo activity as a basis for anticancer drug discovery. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 6, p. 802-820, 2004.

FRANKEN, Nicolaas AP et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315, 2006.

GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107, 2012.

GHOBRIAL, Irene M.; WITZIG, Thomas E.; ADJEI, Alex A. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, n. 3, p. 178-194, 2005.

GOLSTEIN, Pierre; KROEMER, Guido. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 32, n. 1, p. 37-43, 2007.

GONÇALVES, Itamar Luís et al. Effect of N-1 arylation of monastrol on kinesin Eg5 inhibition in glioma cell lines. **MedChemComm**, v. 9, n. 6, p. 995-1010, 2018.

HAAKE, Anne R.; POLAKOWSKA, Renata R. Cell death by apoptosis in epidermal biology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 101, n. 2, p. 107-112, 1993.

HAERBORNE, j.b., DEY, p.m. (Ed). **Methods in Plant Biochemistry**. San Diego: Academic press, 1991; 6: 360p.

HAJDU, S. I., A note from history: Landmarks in history of cancer, part 1. **Cancer**, 117: 1097-1102, (2011).

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p. 57-70, 2000.

HEALD, Rebecca. Motor function in the mitotic spindle minireview. **Cell**, v. 102, n. 4, p. 399-402, 2000.

HIRATSUKA, Sachie et al. MMP9 induction by vascular endothelial growth factor receptor-1 is involved in lung-specific metastasis. **Cancer Cell**, v. 2, n. 4, p. 289-300, 2002.

HOPKINS, Andrew L. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 11, p. 682, 2008.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva -. **O que é câncer?** Disponível em: <[http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?id=322](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322)>. Acesso em: 14 março 2019.

INCA, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva -. **Estimativa 2018** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>>. Acesso em: 14 março 2019.

INMETRO. **Orientações sobre validação de métodos analíticos:** documento de caráter orientativo: DOQ-CGCRE-008: revisão 05-agosto/2016. Rio de Janeiro, 2011b. Disponível em: <[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_05.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf)>. Acesso em: 14 março. 2019

INSTITUTE, National Cancer. **Drugs Approved for Lung Cancer.** Disponível em: <<https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/lung>>. Acesso em: 29 jan. 2019.

JOHNSON, David H. et al. Randomized phase II trial comparing bevacizumab plus carboplatin and paclitaxel with carboplatin and paclitaxel alone in previously untreated locally advanced or metastatic non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 11, p. 2184-2191, 2004.

JOHNSON, Judith P. et al. De novo expression of intercellular-adhesion molecule 1 in melanoma correlates with increased risk of metastasis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 2, p. 641-644, 1989.

JONJIC, Nives et al. Regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human malignant melanoma. **The American Journal of Pathology**, v. 141, n. 6, p. 1323, 1992.

JORDAN, Mary Ann et al. Mechanism of mitotic block and inhibition of cell proliferation by taxol at low concentrations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 20, p. 9552-9556, 1993.

JOSEPH, J. K.; JAIN, S. L.; SAIN, B. Ion exchange resins as recyclable and heterogeneous solid acid catalysts for the Biginelli condensation: An improved protocol for the synthesis of 3,4-dihydropyrimidin-2-ones. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 247, n. 1, p. 99–102, 2006.

KAPOOR, Tarun M. et al. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 5, p. 975–988, 2000.

KAPPE, C. Oliver. Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. New tricks from an old dog. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 879–888, 2000.

KAPPE, C. Oliver. Review Biologically active dihydropyrimidinones of the Biginelli-type — a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, p. 1043–1052, 2000.

KAPPE, C. O.; STADLER, A. The Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. **Organic Reactions**, v. 63, 2004.

KASTAN, Michael B.; CANMAN, Christine E.; LEONARD, Christopher J. P53, cell cycle control and apoptosis: implications for cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 14, n. 1, p. 3–15, 1995.

KELLAND, Lloyd. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 8, p. 573, 2007.

KITANO, Hiroaki. A robustness-based approach to systems-oriented drug design. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 3, p. 202, 2007.

KLEIN, E. et al. New chemical tools for investigating human mitotic kinesin Eg5. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 19, p. 6474–88, out. 2007.

KLEINMAN, Hynda K.; MARTIN, George R. Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. In: **Seminars in Cancer Biology**. Academic Press, 2005. p. 378–386.

KNOX, Richard J. et al. Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum (II) and

cis-diammine-(1, 1-cyclobutanedicarboxylato) platinum (II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA. **Cancer Research**, v. 46, n. 4 Part 2, p. 1972-1979, 1986.

KROEMER, Guido et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death and Differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3, 2009.

KRYSKO, Dmitri V. et al. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. **Methods**, v. 44, n. 3, p. 205-221, 2008.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C.. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2015. Cap. 2, 7, p. 31-70; 269-348.

LEE, Y.-J. et al. Involvement of tumor suppressor protein p53 and p38 MAPK in caffeic acid phenethyl ester-induced apoptosis of C6 glioma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 2281-9, 15 dez. 2003.

LEHÁR, Joseph et al. Synergistic drug combinations tend to improve therapeutically relevant selectivity. **Nature Biotechnology**, v. 27, n. 7, p. 659, 2009.

LEVINE, Beth. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. **Cell**, v. 120, n. 2, p. 159-162, 2005.

LIBERAL, Francisco Diogo Carvalho Guerra. **Avaliação e Caracterização por Métodos Computacionais de Diferentes Radioisótopos no Contexto da Terapia Paliativa de Metástases Ósseas**. 2013. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Engenharia Biomédica, Univeridade do Porto, Porto, 2013.

LODISH, Harvey et al. Molecular cell biology 4th edition. **National Center for Biotechnology Information, Bookshelf**, 2000.

LUM, Julian J. et al. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. **Cell**, v. 120, n. 2, p. 237-248, 2005.

MACKAY, Charles R.; IMHOF, Beat A. Cell adhesion in the immune system. **Immunology Today**, v. 14, n. 3, p. 99-102, 1993.

MAJNO, Guido; JORIS, Isabelle. **Cells, Tissues, and Disease: Principles of General Pathology**. Oxford University Press, 2004, p.735-885.

MALIGA, Zoltan; KAPOOR, Tarun M.; MITCHISON, Timothy J. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Chemistry & biology**, v. 9, n. 9, p. 989-996, 2002.

MALUMBRES, Marcos; BARBACID, Mariano. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 3, p. 153, 2009.

MAYER, Thomas U. et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971-974, 1999.

MELINO, Gerry; VAUX, David (Ed.). **Cell Death**. Chichester: John Wiley & Sons, 2010. 316 p.

MOK, Tony SK. Personalized medicine in lung cancer: what we need to know. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 8, n. 11, p. 661, 2011.

MORSE, David L. et al. Docetaxel induces cell death through mitotic catastrophe in human breast cancer cells. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 4, n. 10, p. 1495-1504, 2005.

MOSTAFA, Amany S.; SELIM, Khalid B. Synthesis and anticancer activity of new dihydropyrimidinone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 156, p. 304-315, 2018.

MUKHOPADHYAY, Tapas et al. Mebendazole elicits a potent antitumor effect on human cancer cell lines both in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 8, n. 9, p. 2963-2969, 2002.

NEWBY, Craig S.; MALLET, Anthony L. Rapid simultaneous analysis of prostaglandin E2, 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and arachidonic acid using high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 11, n. 15, p. 1723-1727, 1997.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NICOLSON, Garth L. Paracrine and autocrine growth mechanisms in tumor metastasis to specific sites with particular emphasis on brain and lung metastasis. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 12, n. 3-4, p. 325-343, 1993.

NIERO, E. L. DE O. et al. Cinnamic acid induces apoptotic cell death and cytoskeleton disruption in human melanoma cells. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 32, n. 1, p. 31, 2013.

NIGG, Erich A. Cell division: mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 1, p. 21, 2001.

O'CONNOR, Patrick M. et al. Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. **Cancer Research**, v. 57, n. 19, p. 4285-4300, 1997.

OKADA, Hitoshi; MAK, Tak W. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 8, p. 592, 2004.

ORIQUI, Luciana R. et al. Guide For Determining The Stability Of Chemical Products [guia para a aeterminação da estabilidade de produtos químicos]. **Química Nova**, 2013.

PARDI, Ruggero; INVERARDI, Luca; BENDER, Jeffrey R. Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers. **Immunology Today**, v. 13, n. 6, p. 224-230, 1992.

PETERS, Tanja et al. Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 372, n. 4, p. 291-299, 2006.



PIKOR, Larissa A. et al. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. **Lung Cancer**, v. 82, n. 2, p. 179-189, 2013.

PINSKY, Paul F. et al. The National Lung Screening Trial: results stratified by demographics, smoking history, and lung cancer histology. **Cancer**, v. 119, n. 22, p. 3976-3983, 2013.

RAGAB, Fatma AF et al. Design, synthesis and anticancer activity of new monastrol analogues bearing 1, 3, 4-oxadiazole moiety. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 138, p. 140-151, 2017.

RANG, Humphrey Peter et al. **Farmacologia: Rang & Dale**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda., 2016. 784 p.

RECK, Martin et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments. **The Lancet**, v. 382, n. 9893, p. 709-719, 2013.

RICE, G. EDGAR; MUNRO, J. MICHAEL; BEVILACQUA, MICHAEL P. Inducible cell adhesion molecule 110 (INCAM-110) is an endothelial receptor for lymphocytes. A CD11/CD18-independent adhesion mechanism. **Journal of Experimental Medicine**, v. 171, n. 4, p. 1369-1374, 1990.

RIEDER, Conly L.; SALMON, E. D. The vertebrate cell kinetochore and its roles during mitosis. **Trends in Cell Biology**, v. 8, n. 8, p. 310-318, 1998.

RIEDL, Stefan J.; SHI, Yigong. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. **Nature reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 11, p. 897, 2004.

RISS, Terry L. et al. Cell viability assays. 2016.

ROOS, Wynand P.; KAINA, Bernd. DNA damage-induced cell death by apoptosis. **Trends In Molecular Medicine**, v. 12, n. 9, p. 440-450, 2006.

ROSENFELDT, Mathias T.; RYAN, Kevin M. The multiple roles of autophagy in cancer. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 7, p. 955-963, 2011.

ROTHLEIN, R. et al. Induction of intercellular adhesion molecule 1 on primary and continuous cell lines by pro-inflammatory cytokines. Regulation by pharmacologic agents and neutralizing antibodies. **The Journal of Immunology**, v. 141, n. 5, p. 1665-1669, 1988.

ROTHLEIN, Robert et al. A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. **The Journal of Immunology**, v. 137, n. 4, p. 1270-1274, 1986.

ROUHI, A. Maureen. Rediscovering natural products. **Chemical & Engineering News**, v. 81, n. 41, p. 77, 2003.

SAKOWICZ, Roman et al. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. **Cancer research**, v. 64, n. 9, p. 3276-3280, 2004.

SANDHU, Jagir S. et al. Past, present and future of the Biginelli reaction: a critical perspective. **ARKIVOC: Online Journal of Organic Chemistry**, 2012.

SANDLER, Alan et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 24, p. 2542-2550, 2006.

SCAGLIOTTI, Giorgio Vittorio et al. Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 21, p. 3543-3551, 2008.

SCHAFER, K. A. The cell cycle: a review. **Veterinary Pathology**, v. 35, n. 6, p. 461-478, 1998.

SCHLESINGER, Martin; BENDAS, Gerd. Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)—An increasing insight into its role in tumorigenicity and metastasis. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 11, p. 2504-2514, 2011.

SCHWARTZ, Gary K.; SHAH, Manish A. Targeting the cell cycle: a new approach to cancer therapy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 36, p. 9408-9421, 2005.

SIDDIK, Zahid H. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7265, 2003.

SIEBER, Oliver M.; HEINIMANN, Karl; TOMLINSON, Ian PM. Genomic instability—the engine of tumorigenesis? **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 9, p. 701, 2003.

SOCIETY, American Cancer. **Key Statistics for Small Cell Lung Cancer**. Disponível em: <<https://www.cancer.org/cancer/small-cell-lung-cancer/about/key-statistics.html>>. Acesso em: 28 jan. 2019.

SPRINGER, Timothy A. Adhesion receptors of the immune system. **Nature**, v. 346, n. 6283, p. 425, 1990

STAAL-VAN DEN BREKEL, Agnes J. et al. Expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 in non-small-cell lung carcinoma. **Virchows Archive**, v. 428, n. 1, p. 21-27, 1996.5.

SWERTS, Katrien et al. DRAQ5: improved flow cytometric DNA content analysis and minimal residual disease detection in childhood malignancies. **Clinica Chimica Acta**, v. 379, n. 1-2, p. 154-157, 2007.

TAKAHASHI, Takashi et al. p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. **Science**, v. 246, n. 4929, p. 491-494, 1989.

TAWFIK, Hanaa A. et al. Tumor anti-initiating activity of some novel 3, 4 dihydropyrimidinones. **Pharmacological Reports**, v. 61, n. 6, p. 1153-1162, 2009.

THORNHILL, M. H.; HASKARD, D. O. IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN-gamma. **The Journal of Immunology**, v. 145, n. 3, p. 865-872, 1990.

TRAVIS, W. D. et al. International Association for the study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Classification of Lung Adenocarcinoma. **Journal Thoracic Oncology**, v. 6, n. 2, p. 244-85, 2011.

VAN ENGELAND, Manon et al. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, n. 1, p. 1-9, 1998.

VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Proliferation**, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.

VIEGAS-JUNIOR, C. et al. Molecular hybridization: a useful tool in the design of new drug prototypes. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 17, p. 1829-52, jan. 2007.

VITALE, Ilio et al. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 6, p. 385, 2011.

WANG, Long G. et al. The effect of antimicrotubule agents on signal transduction pathways of apoptosis: a review. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 44, n. 5, p. 355-361, 1999.

WERMUTH, Camille G.; DE LA FONTAINE, J. Molecular variations based on isosteric replacements. **The Practice of Medicinal Chemistry**, v. 2, 1996.

WHO. **World Health Organisation**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 14 março 2019

WHO. **World Health Organisation**. Disponível em: <<http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 14 março 2019.

WILLIAMS, Gareth H.; STOEBER, Kai. The cell cycle and cancer. **The Journal of Pathology**, v. 226, n. 2, p. 352-364, 2012.

WYLLIE, Andrew H.; KERR, JF Ro; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. In: **International Review of Cytology**. Academic Press, 1980. p. 251-306.

YANG, L.; WU, S.; ZHANG, Q.; LIU, F.; WU, P. 23,24-Dihydrocurbitacin B induces G2/M cell-cycle arrest and

mitochondria-dependent apoptosis in human breast cancer cells (Bcap37). **Cancer Letters**, v. 256, n.2, p.267-278, 2007.

YILMAZ, Mahmut; CHRISTOFORI, Gerhard. EMT, the cytoskeleton, and cancer cell invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 15-33, 2009.

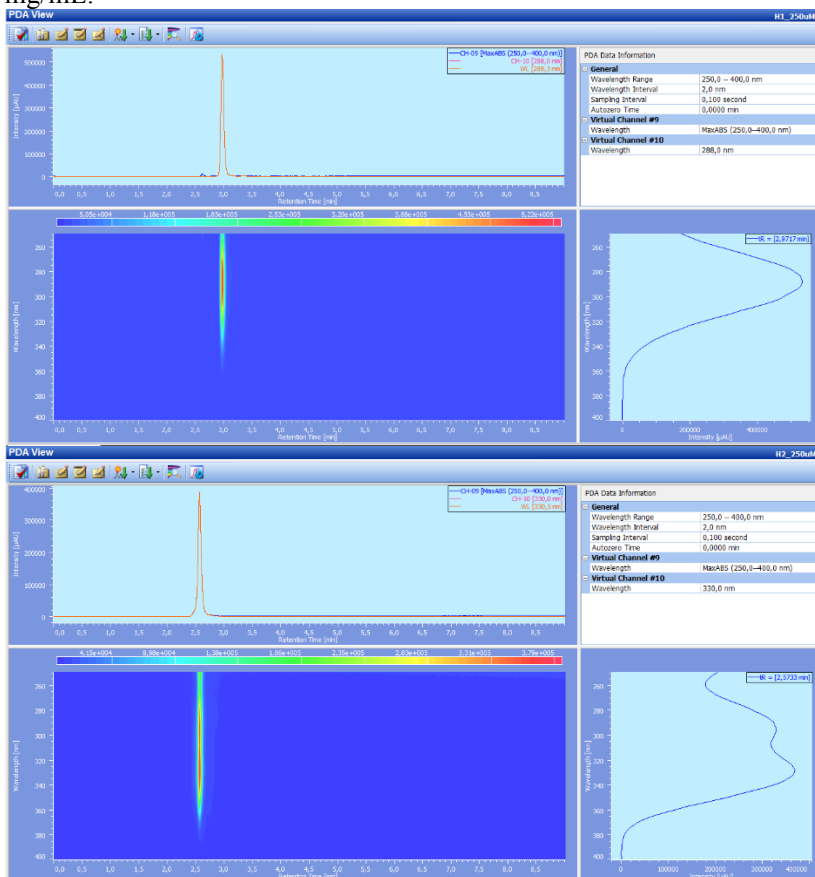
ZHANG, Wen et al. Prodrug-based nano-drug delivery system for co-encapsulate paclitaxel and carboplatin for lung cancer treatment. **Drug Delivery**, v. 23, n. 7, p. 2575-2580, 2016.

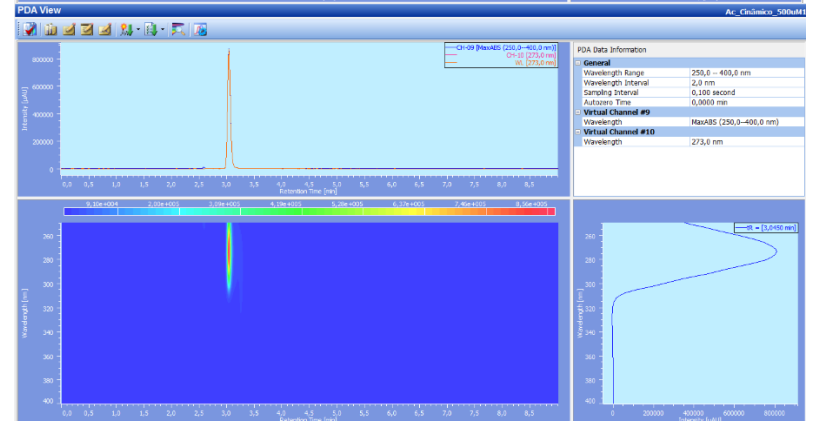
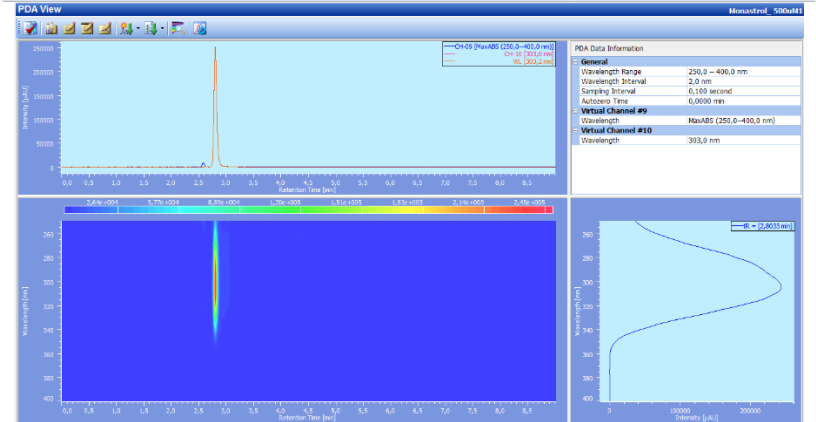
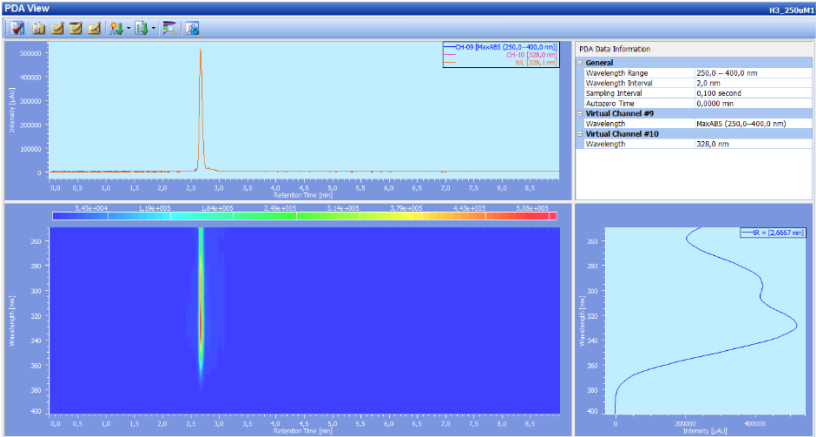
ZHU, Jieping; BIENAYMÉ, Hugues (Ed.). **Multicomponent Reactions**. Weinheim: Wiley-vhc, 2005. 484 p.



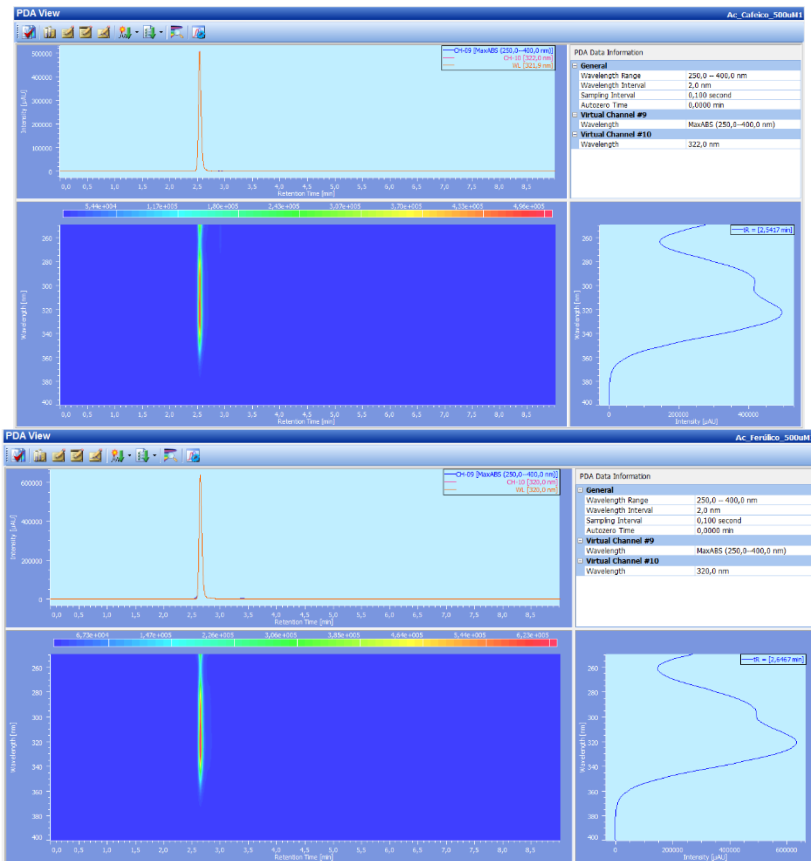
## 9. APÊNDICES

**APÊNDICE A - Perfil de absorção na região ultravioleta do espectro eletromagnético do híbrido molecular FA247, FA260, FA261 e seus precursores.** Foram feitas varreduras de 250nm a 400nm com a concentração do analito ajustada para 250  $\mu\text{M}$  para os híbridos FA247, FA260 e FA26, e 500  $\mu\text{M}$  para os precursores monastrol, ácidos cinâmico, cafeeiro e ferúlico. Concentração que representa menos de 1 mg/mL.

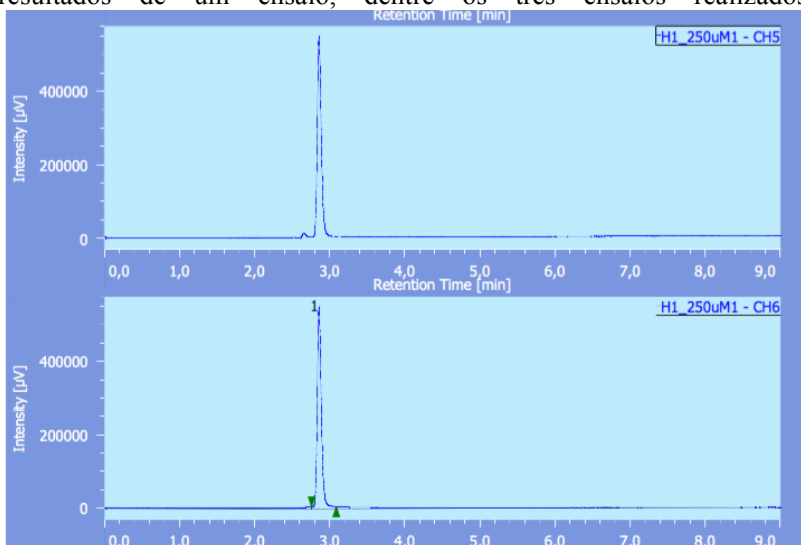


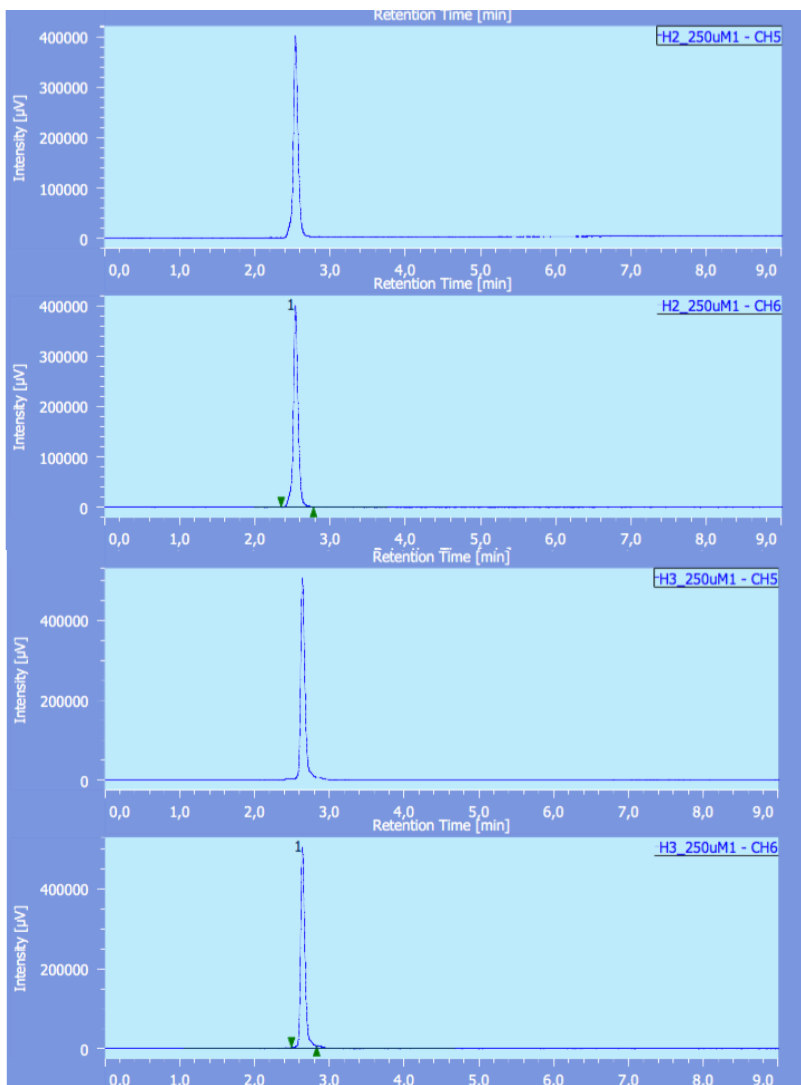


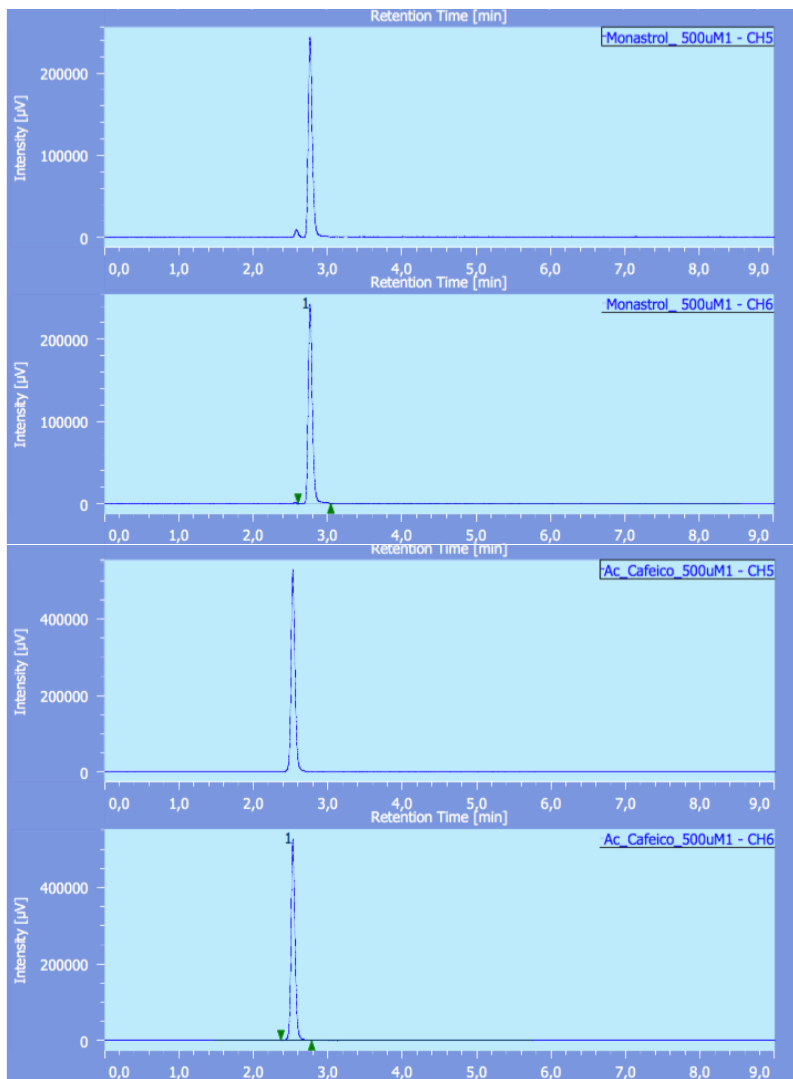


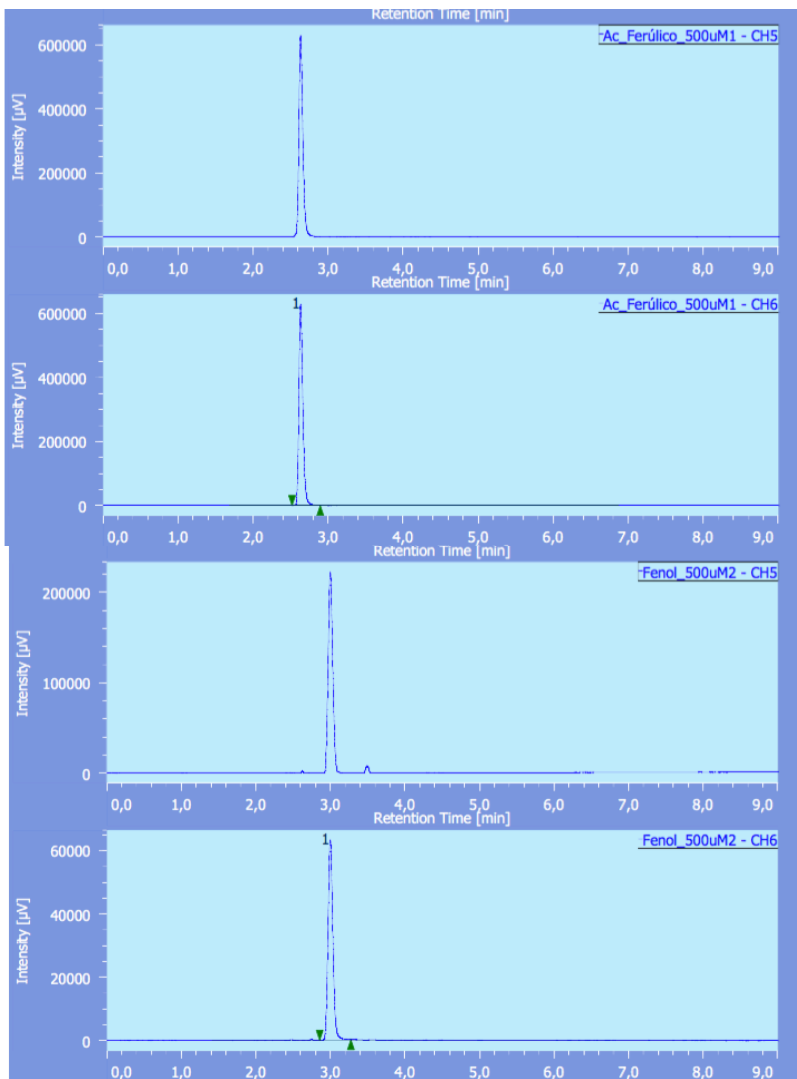


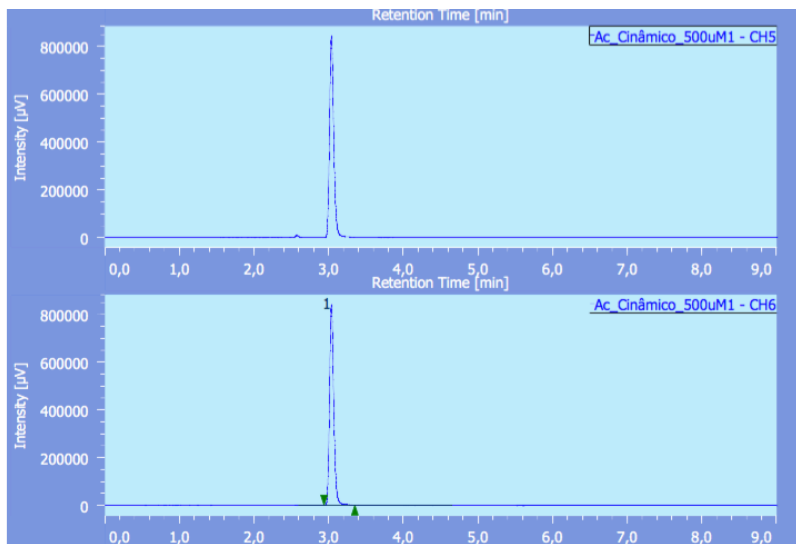
**APÊNDICE B - Cromatogramas dos ensaios iniciais dos híbridos moleculares FA247 (H1), FA261 (H2), FA260 (H3) e seus precursores monastrol, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico assim como o padrão analítico fenol. Os ensaios foram feitos em modo isocrático com 70:30 acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v), coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus™, C18, 4,6 mm x 150 mm (5,0 µm), Agilent Technologies®, mantida a 40°C e um volume de injeção de 5 µL. Os canais 5 (varredura de absorvância 250 nm - 400 nm) e 6 (absorvância máxima no comprimento de onda específico para cada composto) foram selecionados. Os cromatogramas representam os resultados de um ensaio, dentre os três ensaios realizados.**











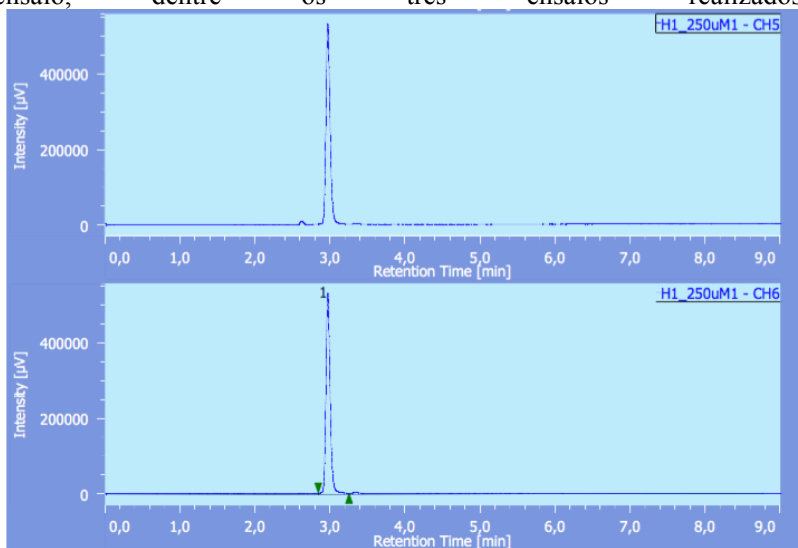
**APÊNDICE C - Tabelas contendo média  $\pm$  desvio padrão das áreas dos picos e tempo de retenção (RT) dos ensaios em diferentes tipos de armazenamento dos híbridos moleculares FA247, FA261, FA260 e seus precursores monastrol, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico.**

Compostos	Concentração	Ensaio arm. - 20°C (t=30 dias)		Ensaio arm. Estufa 37°C (t=72h)	
		Área dos picos (média $\pm$ desvio padrão)	Tempo de retenção (média $\pm$ desvio padrão)	Área dos picos (média $\pm$ desvio padrão)	Tempo de retenção (média $\pm$ desvio padrão)
FA247	250 $\mu$ M	544640 $\pm$ 6038,75	2.99 $\pm$ 0,02	552216 $\pm$ 11845,21	3.03 $\pm$ 0,05
FA261	250 $\mu$ M	404145 $\pm$ 2623,98	2.55 $\pm$ 0,01	456152 $\pm$ 2472,06	2.56 $\pm$ 0,00
FA260	250 $\mu$ M	514444 $\pm$ 1261,25	2.66 $\pm$ 0,00	550281 $\pm$ 2228,44	2.66 $\pm$ 0,00
Monastrol	500 $\mu$ M	246085 $\pm$ 2361,97	2.80 $\pm$ 0,01	267127 $\pm$ 418,30	2.79 $\pm$ 0,00
Ácido cafeico	500 $\mu$ M	534623 $\pm$ 3129,97	2.53 $\pm$ 0,00	565912 $\pm$ 1315,49	2.53 $\pm$ 0,00
Ácido ferúlico	500 $\mu$ M	585067 $\pm$ 2063,28	2.64 $\pm$ 0,00	632658 $\pm$ 2656,14	2.65 $\pm$ 0,01
Ácido cinâmico	500 $\mu$ M	870583 $\pm$ 10950,40	3.05 $\pm$ 0,00	844497 $\pm$ 2811,53	3.03 $\pm$ 0,00
Fenol (P.A.)	500 $\mu$ M	51119 $\pm$ 1360,91	2.95 $\pm$ 0,06	57205 $\pm$ 170,30	2.94 $\pm$ 0,01

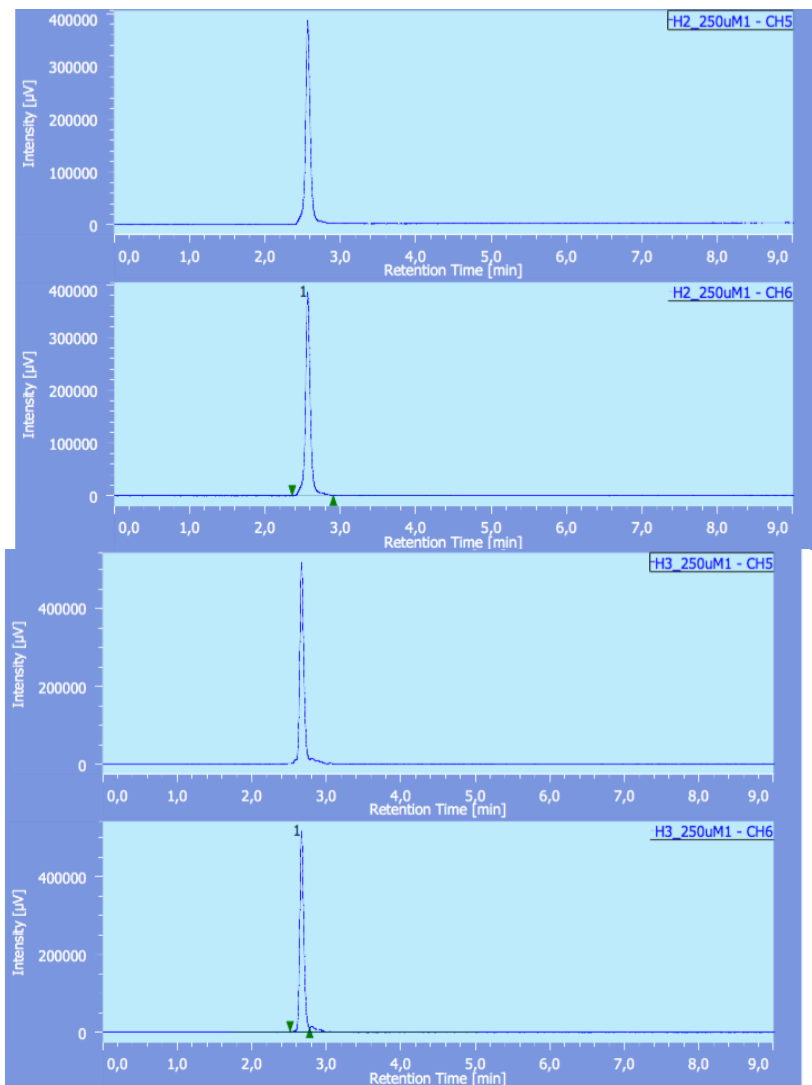
  

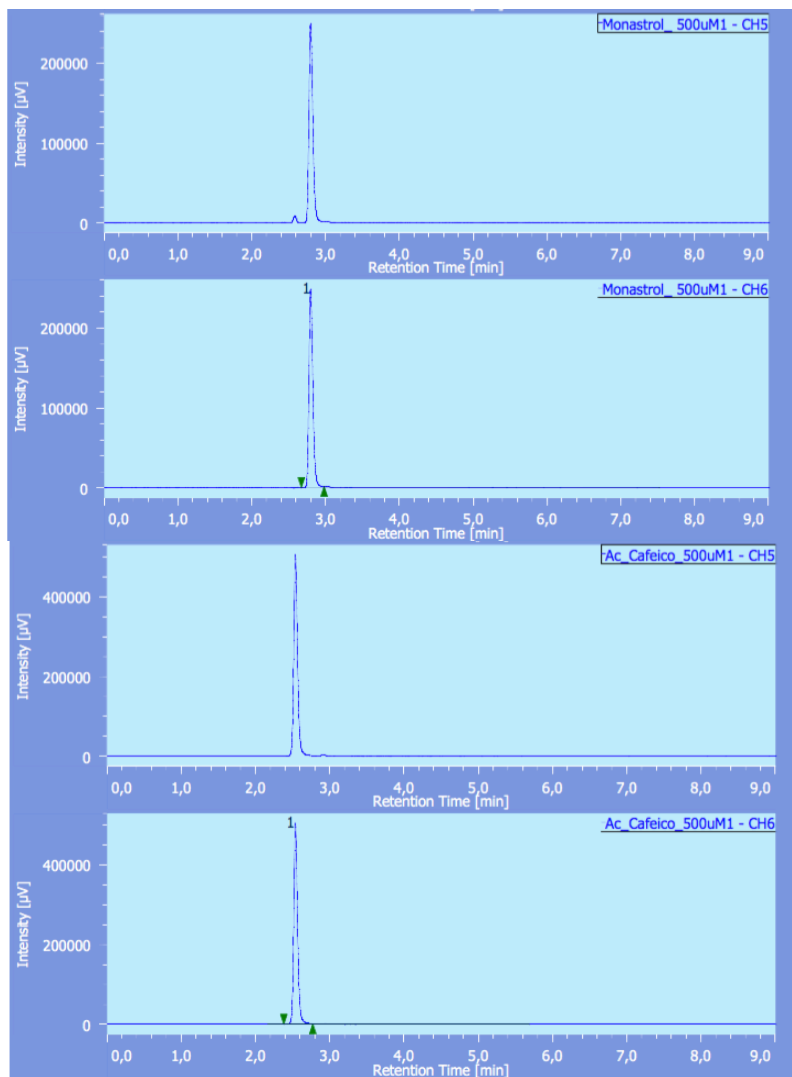
Compostos	Concentração	Ensaio arm. 0-4°C (t=30 dias)		Ensaio arm. temperatura ambiente (t=30 dias)	
		Área dos picos (média $\pm$ desvio padrão)	Tempo de retenção (média $\pm$ desvio padrão)	Área dos picos (média $\pm$ desvio padrão)	Tempo de retenção (média $\pm$ desvio padrão)
FA247	250 $\mu$ M	530078 $\pm$ 2372,72	2.98 $\pm$ 0,01	536755 $\pm$ 1799,16	3.02 $\pm$ 0,00
FA261	250 $\mu$ M	391364 $\pm$ 5235,32	2.56 $\pm$ 0,00	358290 $\pm$ 1215,00	2.56 $\pm$ 0,00
FA260	250 $\mu$ M	513092 $\pm$ 3237,11	2.67 $\pm$ 0,00	519047 $\pm$ 883,79	2.67 $\pm$ 0,01
Monastrol	500 $\mu$ M	248710 $\pm$ 320,05	2.80 $\pm$ 0,00	246395 $\pm$ 565,22	2.79 $\pm$ 0,00
Ácido cafeico	500 $\mu$ M	505890 $\pm$ 3138,66	2.54 $\pm$ 0,00	412659 $\pm$ 287,87	2.53 $\pm$ 0,00
Ácido ferúlico	500 $\mu$ M	627416 $\pm$ 5479,62	2.65 $\pm$ 0,00	503150 $\pm$ 1691,30	2.64 $\pm$ 0,00
Ácido cinâmico	500 $\mu$ M	870497 $\pm$ 3020,17	3.04 $\pm$ 0,00	859614 $\pm$ 915,06	3.03 $\pm$ 0,00
Fenol (P.A.)	500 $\mu$ M	57204 $\pm$ 170,30	2.94 $\pm$ 0,01	50173 $\pm$ 211,83	3.00 $\pm$ 0,01

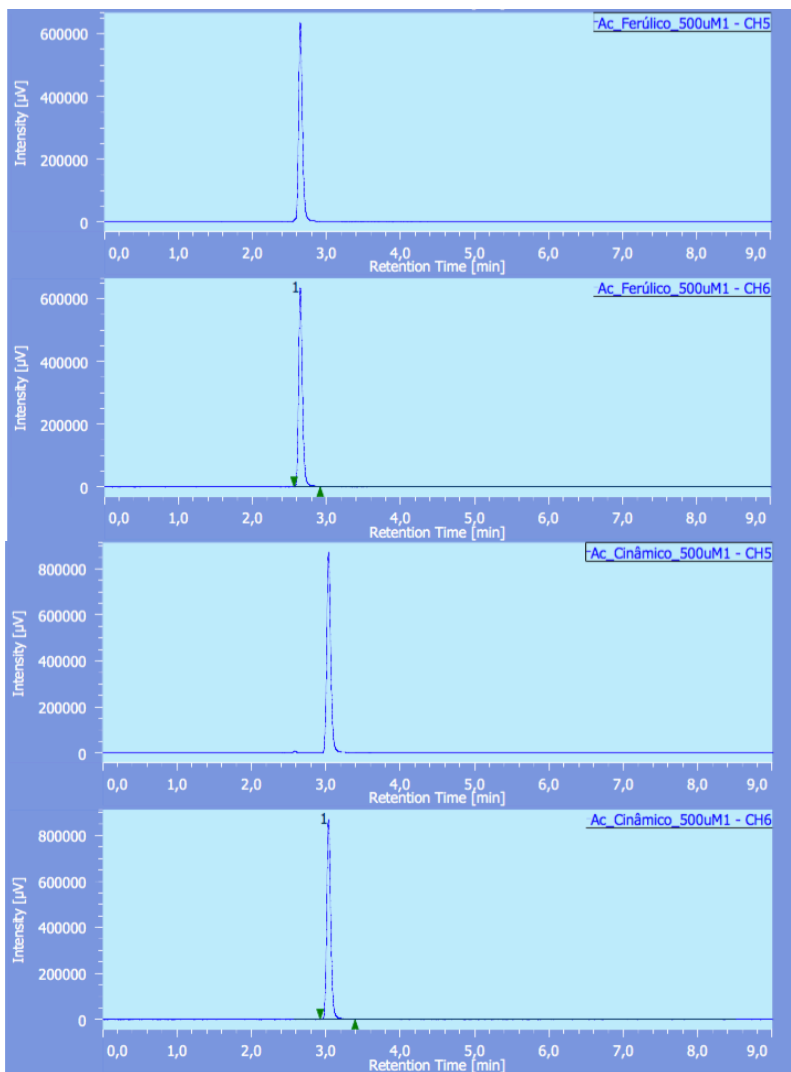
**APÊNDICE D - Cromatogramas dos ensaios em T=30 em armazenamento de 0-4°C dos híbridos moleculares FA247 (H1), FA261 (H2), FA260 (H3) e seus precursores monastrol, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico assim como o padrão analítico fenol. Os ensaios foram feitos em modo isocrático com 70:30 acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v), coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus™, C18, 4,6 mm, 150 mm, 5,0 mm, Agilent Technologies®, mantida a 40°C e um volume de injeção de 5 µL. Os canais 5 (varredura de absorbância 250 nm - 400 nm) e 6 (absorbância máxima no comprimento de onda específico para cada composto) foram selecionados. Os cromatogramas representam os resultados de um ensaio, dentre os três ensaios realizados.**

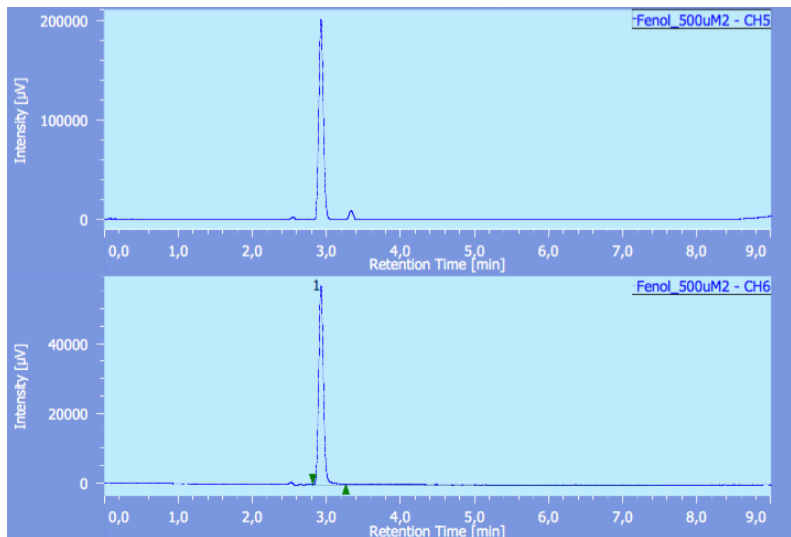




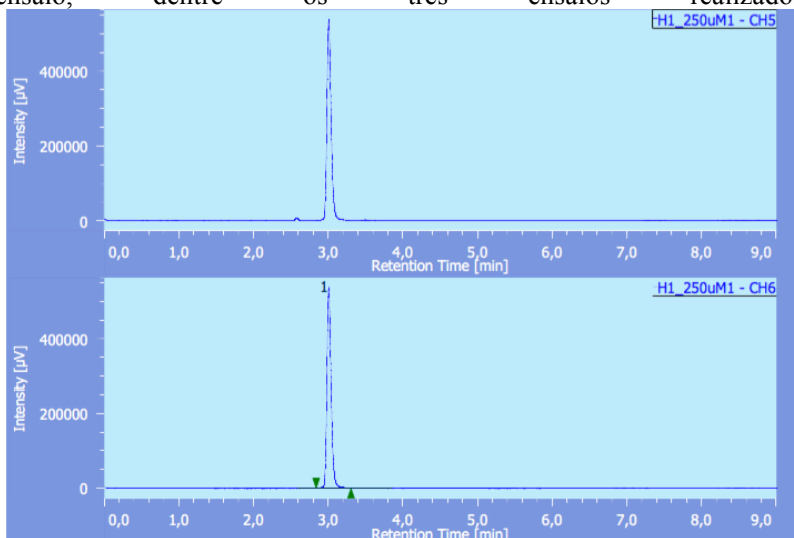


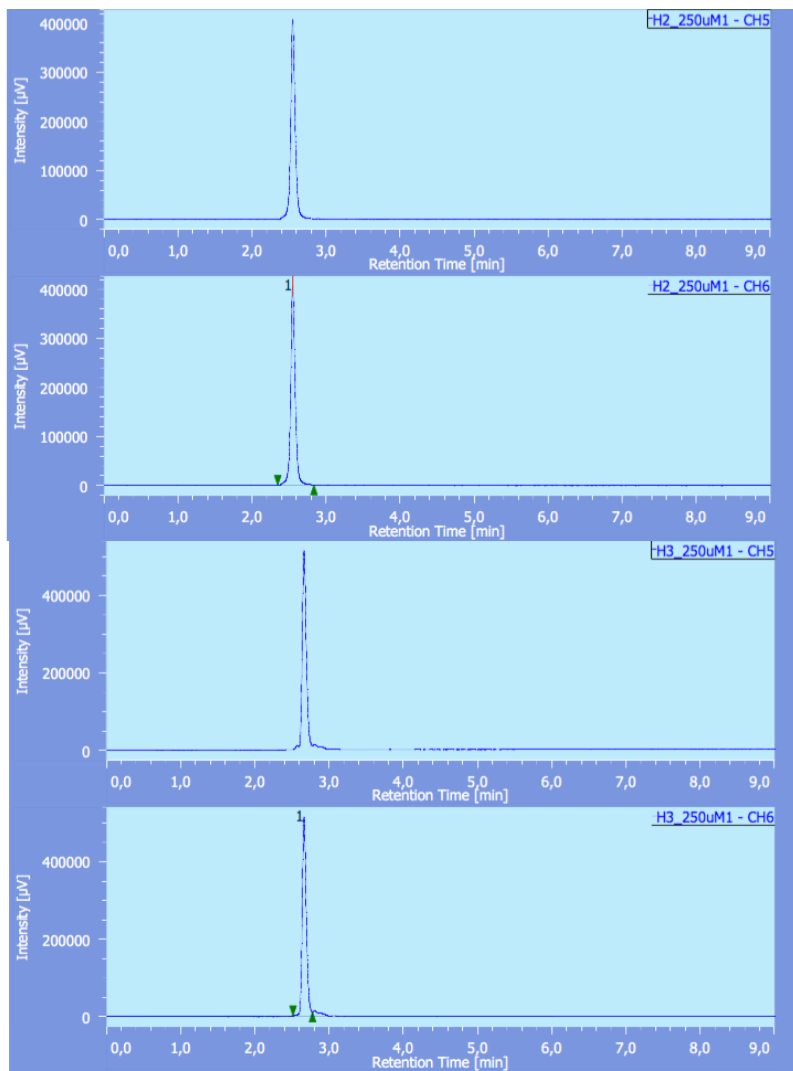


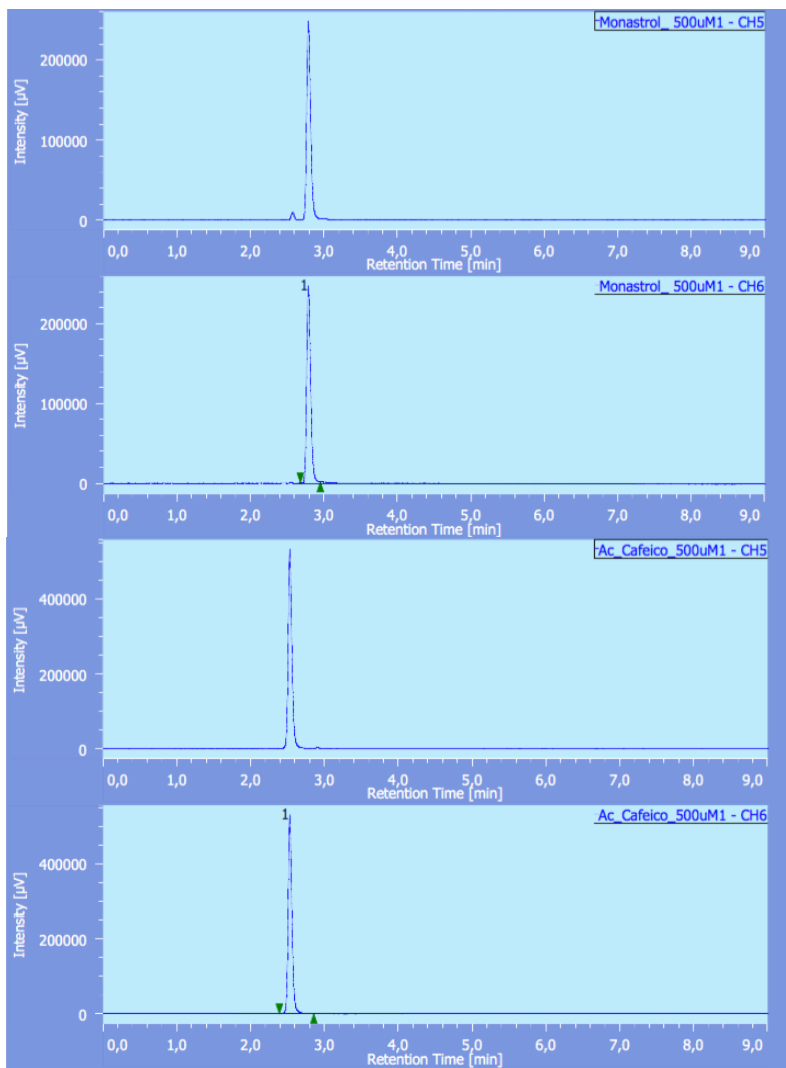


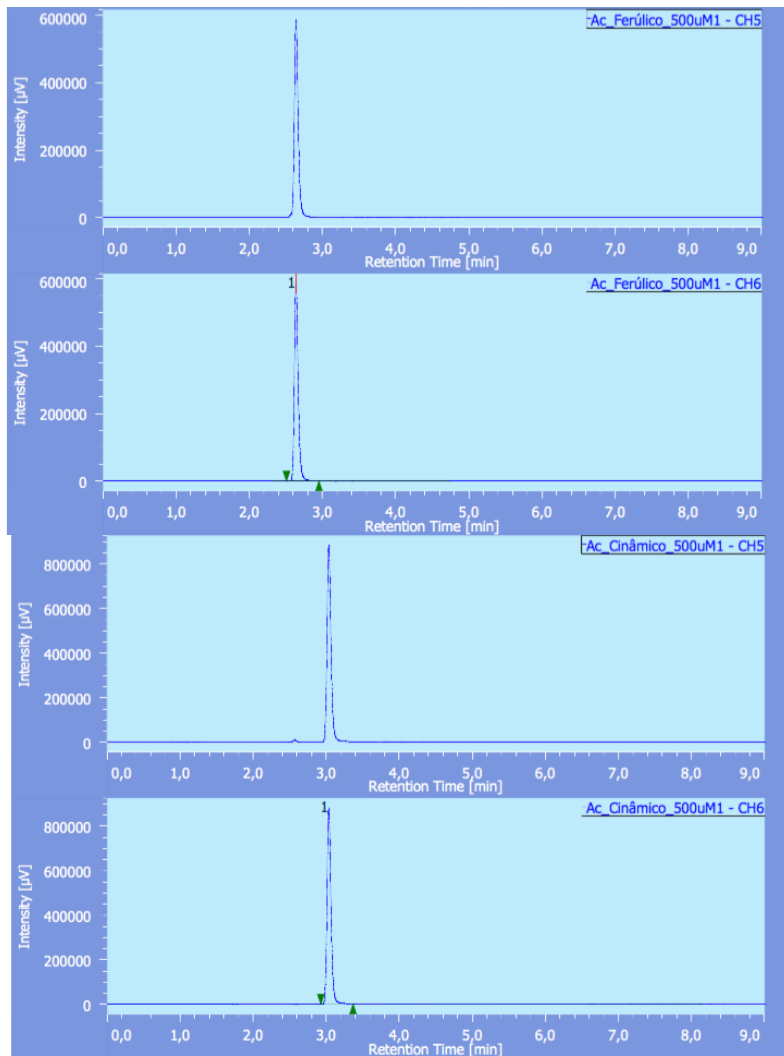


**APÊNDICE E - Cromatogramas dos ensaios em T=30 em armazenamento de -20°C dos híbridos moleculares FA247 (H1), FA261 (H2), FA260 (H3) e seus precursores monastrol, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico assim como o padrão analítico fenol.** Os ensaios foram feitos em modo isocrático com 70:30 acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v), coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus™, C18, 4,6 mm, 150 mm, 5,0 mm, Agilent Technologies®, mantida a 40°C e um volume de injeção de 5 µL. Os canais 5 (varredura de absorvância 250 nm - 400 nm) e 6 (absorvância máxima no comprimento de onda específico para cada composto) foram selecionados. Os cromatogramas representam os resultados de um ensaio, dentre os três ensaios realizados.

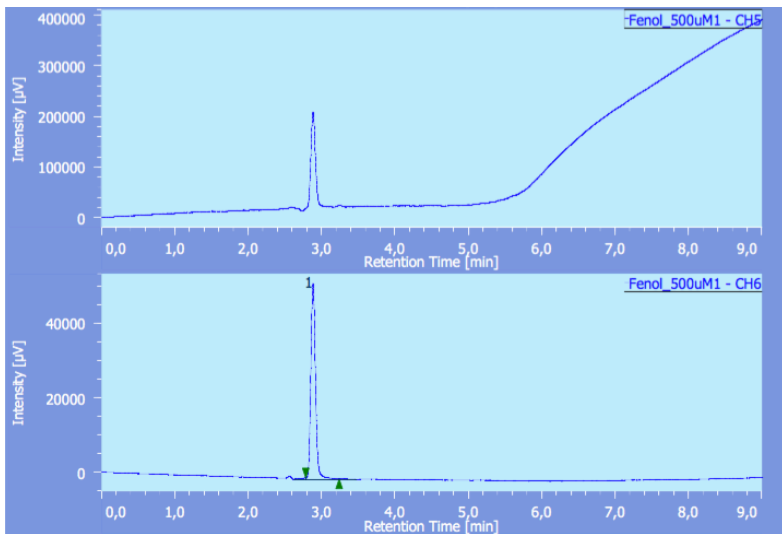




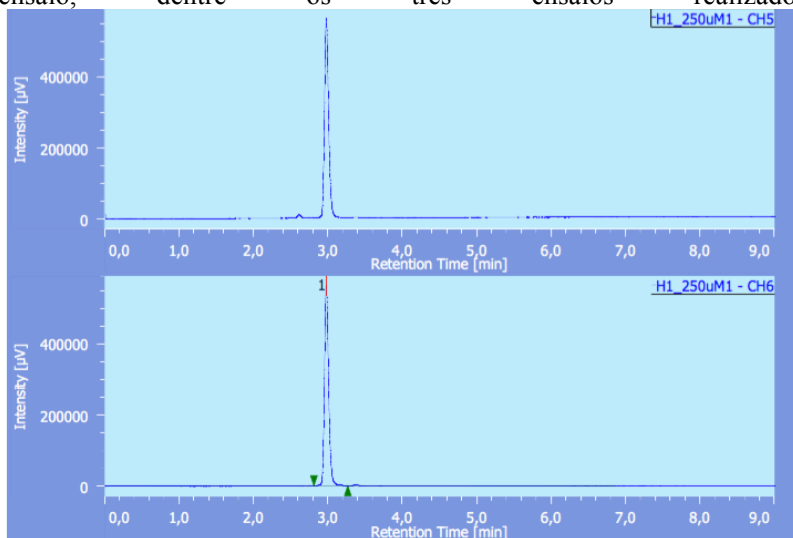


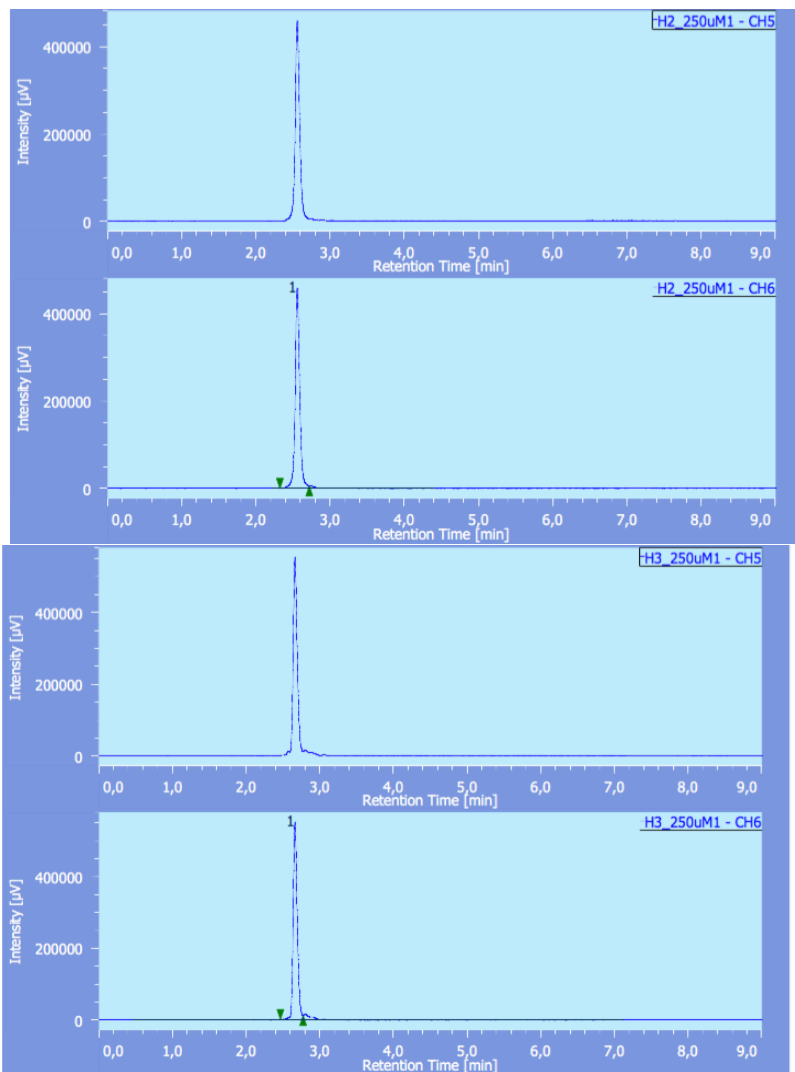


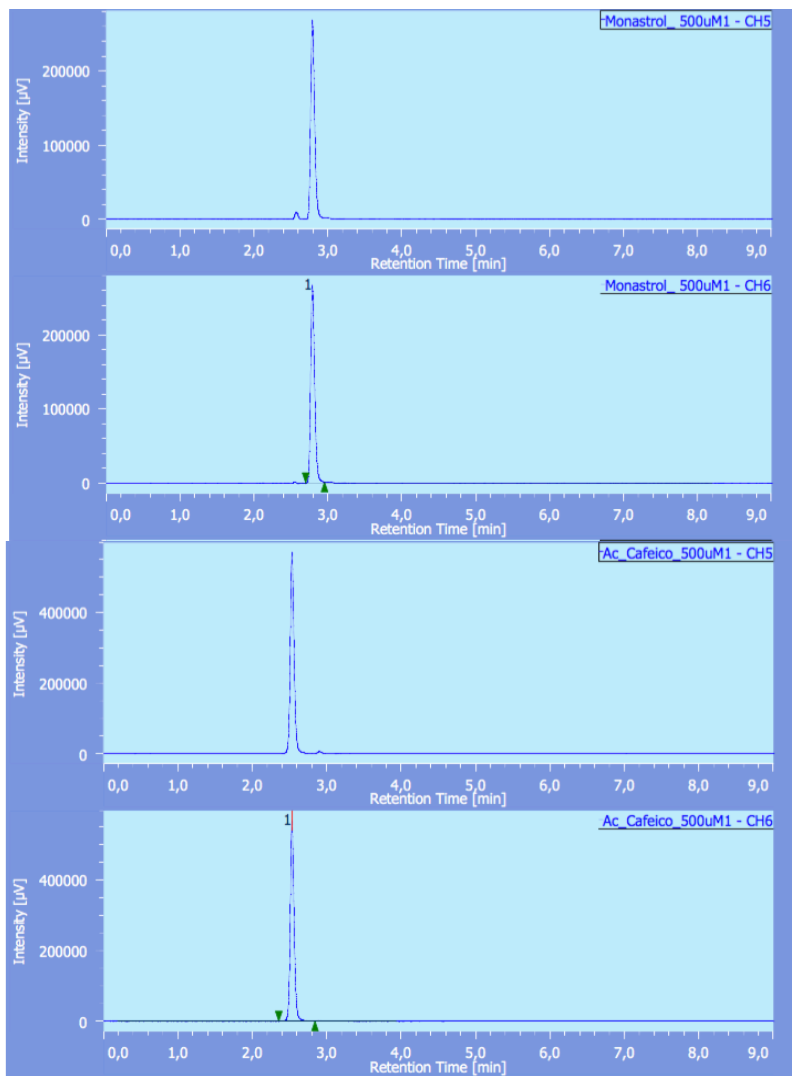


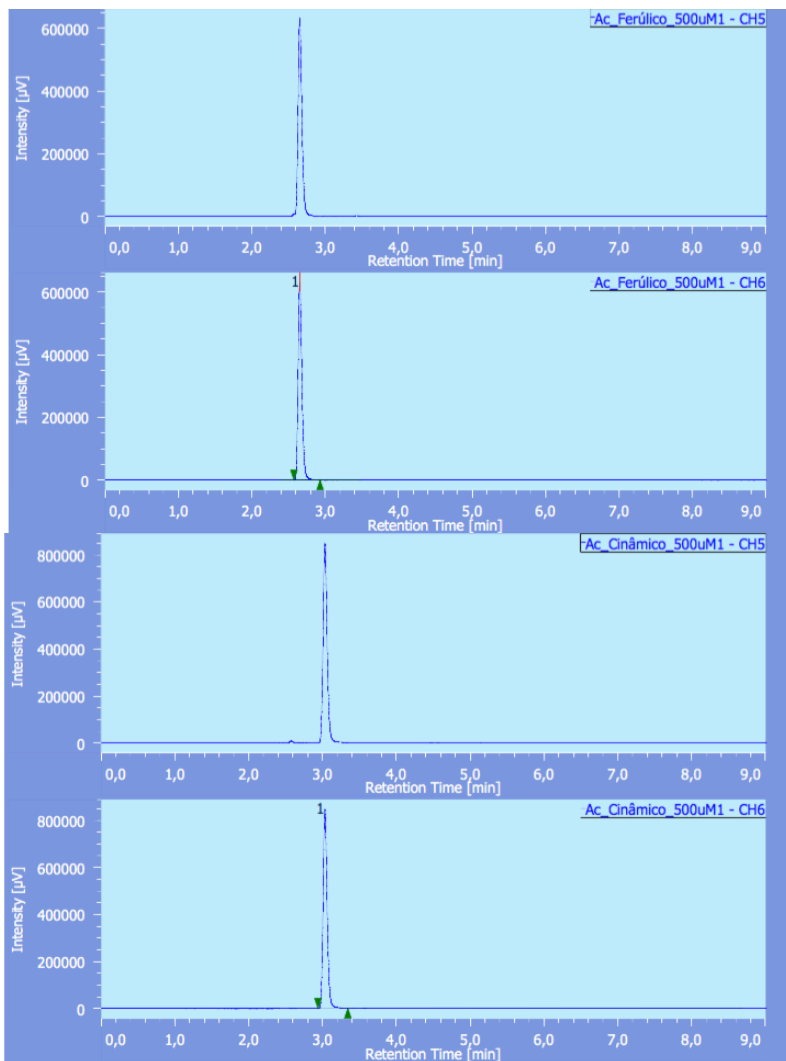


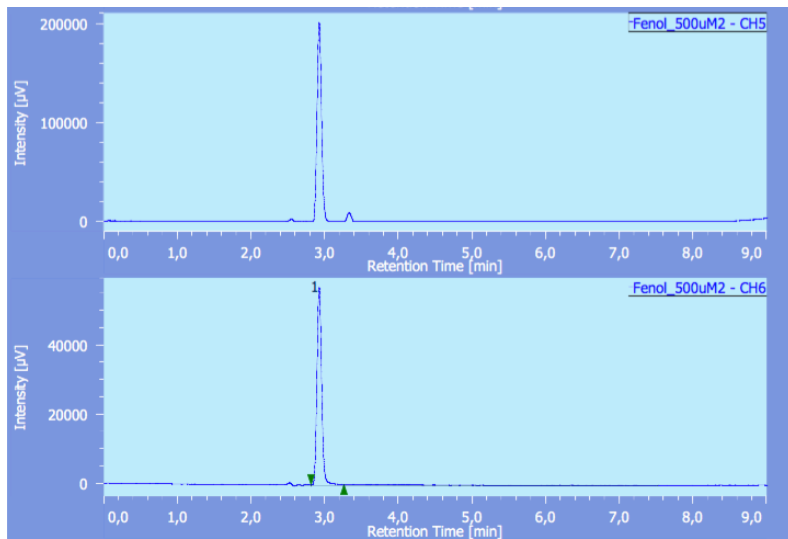
**APÊNDICE F - Cromatogramas dos ensaios em T=30 em armazenamento em estufa a 37°C dos híbridos moleculares FA247 (H1), FA261 (H2), FA260 (H3) e seus precursores monastrol, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico assim como o padrão analítico fenol. Os ensaios foram feitos em modo isocrático com 70:30 acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v), coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus™, C18, 4,6 mm, 150 mm, 5,0 mm, Agilent Technologies®, mantida a 40°C e um volume de injeção de 5 µL. Os canais 5 (varredura de absorvância 250 nm - 400 nm) e 6 (absorvância máxima no comprimento de onda específico para cada composto) foram selecionados. Os cromatogramas representam os resultados de um ensaio, dentre os três ensaios realizados.**



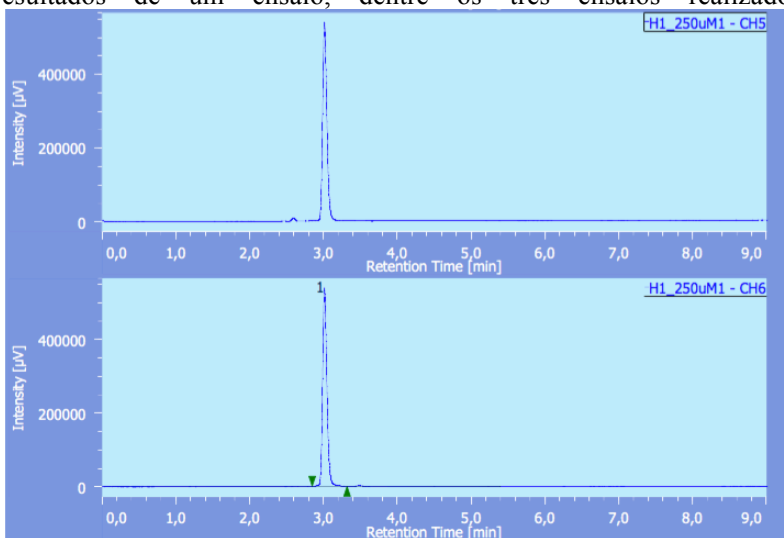


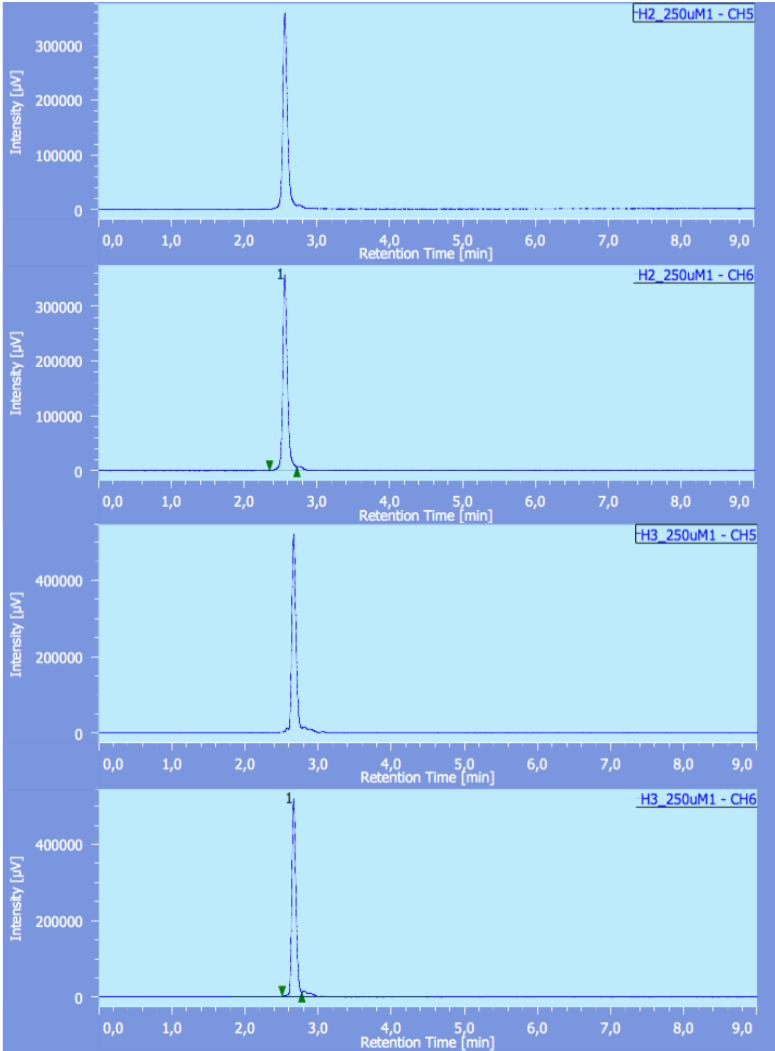




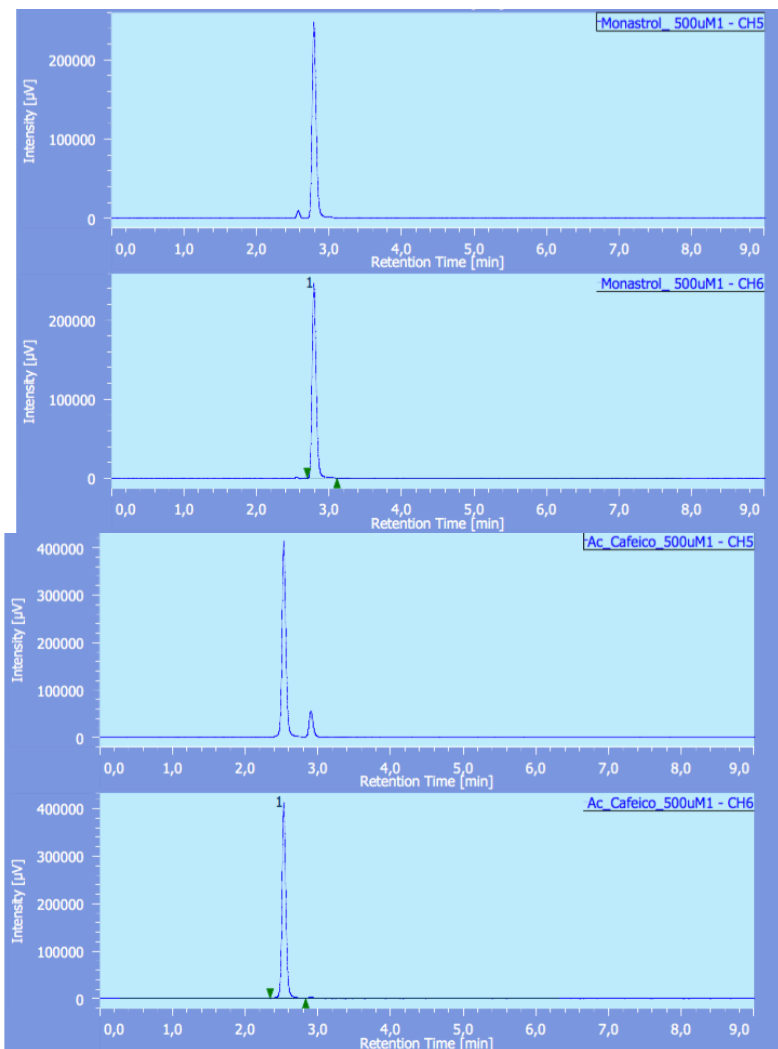


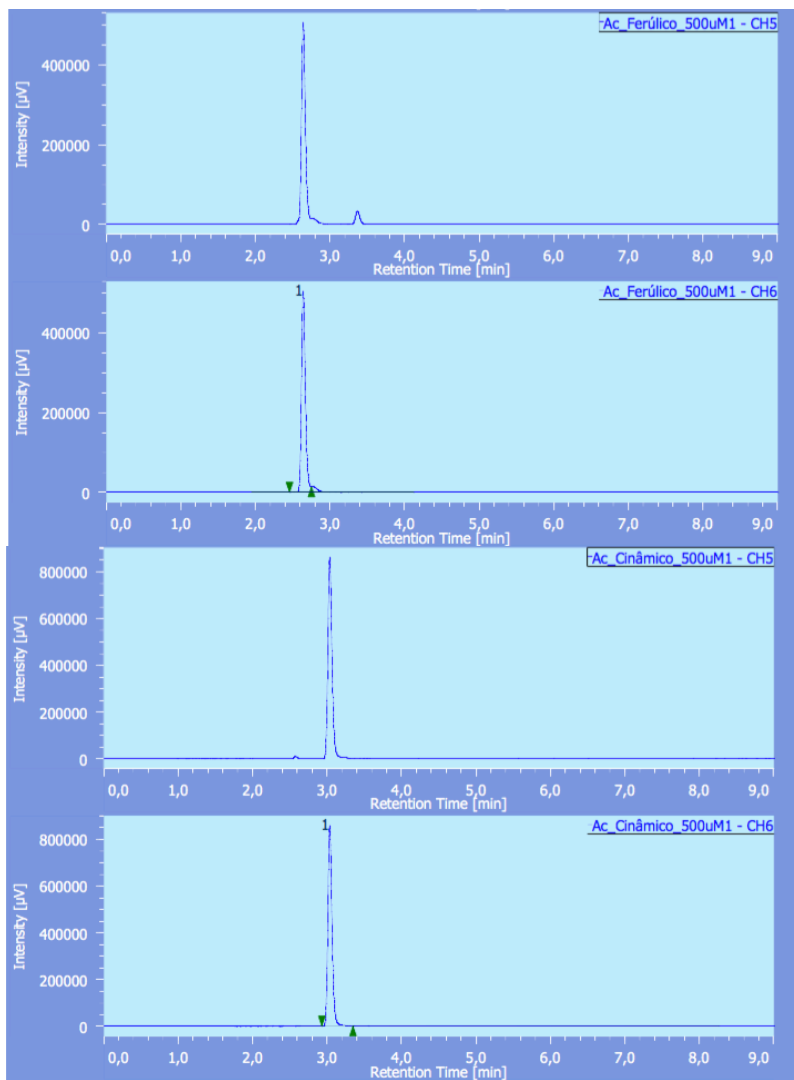
**APÊNDICE G - Cromatogramas dos ensaios em T=30 em armazenamento em temperatura ambiente (ausência de luz) dos híbridos moleculares FA247 (H1), FA261 (H2), FA260 (H3) e seus precursores monastrol, ácido cafeico, ácido ferúlico e ácido cinâmico assim como o padrão analítico fenol.** Os ensaios foram feitos em modo isocrático com 70:30 acetonitrila/ácido fórmico 0,1% (v/v), coluna Agilent ZORBAX Eclipse Plus™, C18, 4,6 mm, 150 mm, 5,0 mm, Agilent Technologies®, mantida a 40°C e um volume de injeção de 5 µL. Os canais 5 (varredura de absorvância 250 nm - 400 nm) e 6 (absorvância máxima no comprimento de onda específico para cada composto) foram selecionados. Os cromatogramas representam os resultados de um ensaio, dentre os três ensaios realizados.

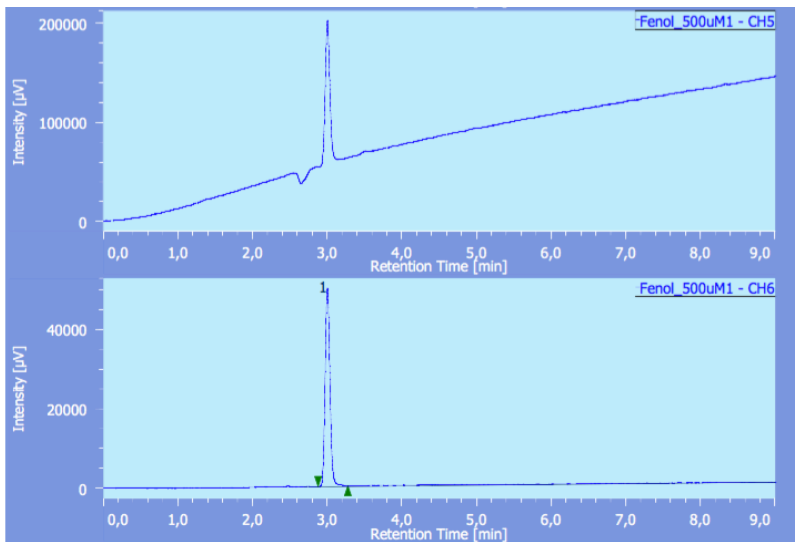




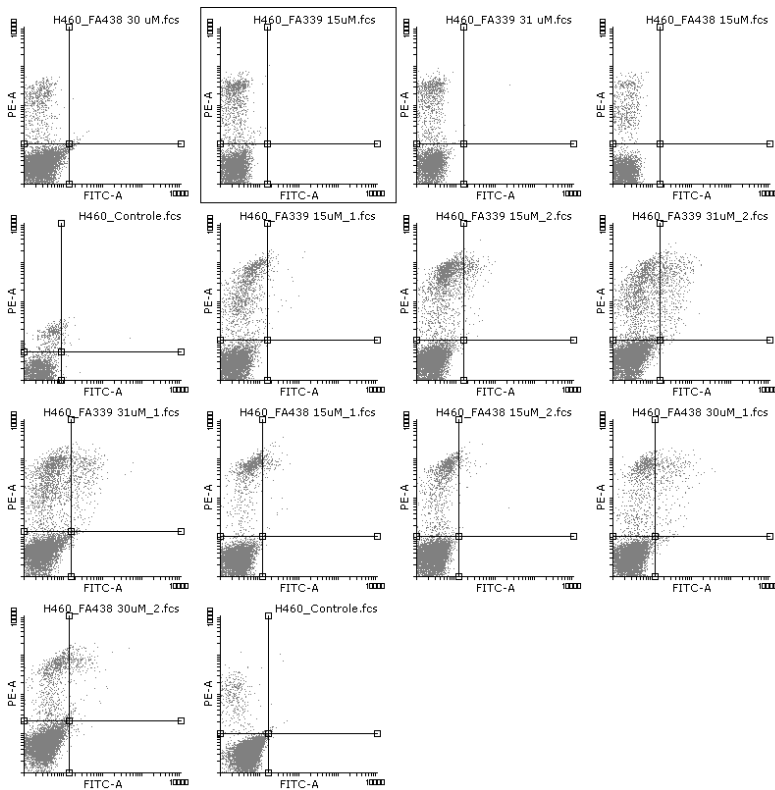








**APÊNDICE H - Efeito no tipo de morte celular dos compostos FA339 e FA438 na linhagem celular NCI-H460 após 72h de incubação com tratamento na concentração de suas respectivas  $IC_{50}$  e  $\frac{1}{2} IC_{50}$ . As células foram marcadas com Anexina-V-FITC e iodeto de propídeo. Células localizadas no quadrante superior esquerdo responde a necrose, quadrante superior direito responde a apoptose tardia, quadrante inferior direito responde a apoptose e quadrante inferior esquerdo responde ao controle (células sem tratamento).**



**APÊNDICE I - Efeito dos híbridos moleculares FA247 e FA261, e do monastrol na progressão do ciclo celular das linhagens celulares NCI-H460.** As células NCI-H460 foram incubadas por 72h na ausência (grupo controle) e na presença dos híbridos na concentração de suas respectivas  $IC_{50}$  e  $\frac{1}{2} IC_{50}$ , e do monastrol (80  $\mu M$ ), e avaliadas após 72h de incubação, pela determinação do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. As populações celulares foram divididas nas fases G0/G1, S e G2/M do ciclo celular. Os histogramas representam os resultados do experimento realizado no citômetro de fluxo BD FACSCanto (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e avaliada pelo software Flowing 2.5.

