



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA
LABORATÓRIO DE BIOQUÍMICA EXPERIMENTAL

Jean Carlos Benassi

POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE NOVOS SELENOÉSTERES
DERIVADOS DE DIIDROPIRIMIDINONAS: ESTUDO *IN VITRO* E *IN SILICO*

Florianópolis

2021

Jean Carlos Benassi

POTENCIAL CITOTÓXICO E ANTIPROLIFERATIVO DE NOVOS SELENOÉSTERES
DERIVADOS DE DIIDROPIRIMIDINONAS: ESTUDO *IN VITRO* E *IN SILICO*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Bioquímica.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Rozangela Curi Pedrosa

Coorientadora: Dr^ª. Valdelúcia M. A. S. Grinevicius

Florianópolis

2021

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

Benassi, Jean Carlos

Potencial citotóxico e antiproliferativo de novos selenoésteres derivados de diidropirimidinonas: estudo in vitro e in silico / Jean Carlos Benassi ; orientador, Rozangela Curi Pedrosa, coorientador, Valdelúcia Maria Alves de Souza Grinevicius, 2021.

140 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Bioquímica, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Bioquímica. 2. Selenoésteres derivados de diidropirimidinonas . 3. Atividade citotóxica e antiproliferativa . 4. Apoptose . 5. Docking e dinâmica molecular . I. Pedrosa, Rozangela Curi . II. Grinevicius, Valdelúcia Maria Alves de Souza . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica. IV. Título.

Jean Carlos Benassi

**Potencial citotóxico e antiproliferativo de novos selenoésteres derivados de
diidropirimidinonas: estudo *in vitro* e *in silico***

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora
composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Eduardo Benedetti Parisotto
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS

Prof. Dr. Alfeu Zanotto-Filho
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Antonio Luiz Braga
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Claus Tröger Pich
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof^ª. Dr^ª. Karina Bettega Felipe
Universidade Federal do Paraná – UFPR

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de doutor em Bioquímica.

Prof^ª. Dr^ª Ariane Zamoner Pacheco de Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação

Prof^ª. Dr^ª. Rozangela Curi Pedrosa
Orientadora

Este trabalho é dedicado à minha amada esposa Juliana e à
minha estimada filha Laura.

AGRADECIMENTOS

Nossas conquistas nunca são resultado de uma caminhada solitária. Ao longo da jornada, encontramos pessoas que nos motivam, outras que nos indicam um caminho mais seguro e outras ainda que se envolvem de corpo e coração como se o sonho fosse delas próprias. Seria muito injusto da minha parte, não reservar esse espaço e não buscar na memória as pessoas que de uma forma ou de outra me ajudaram nessa conquista. Palavras muitas vezes não conseguem expressar tudo o que sentimos, mas vou tentar registrar nas linhas abaixo minha gratidão, respeito e consideração por essas pessoas tão especiais.

Minha gratidão a Deus doador da vida e fonte de todo verdadeiro conhecimento.

Às amadas mulheres da minha vida Laura e Juliana que, juntamente comigo abraçaram este sonho e foram a minha maior motivação para alcançá-lo. Com vocês construí o meu maior e melhor de todos os projetos, nossa família.

À minha querida mãe Onélia e aos meus irmãos José, Rita, Maria, Lauro, Jeane, Everaldo (*in memoriam*) e Jaison. Embora não entendam praticamente nada do que faço, me apoiam e comemoram comigo as conquistas pessoais.

À professora Rozangela que desde a minha graduação, mestrado e doutorado me ensinou muito mais do que é fazer pesquisa, mas também aprendi lições importantes de humanidade e empatia.

À amiga e coorientadora Valdelúcia que me ensinou e me ajudou de inúmeras maneiras sempre com muita paciência e disposição, além de me incentivar nos momentos que o desânimo quis dominar.

Aos meus colegas contemporâneos do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) Cynthia, Daniela, Fabiana, Gabriela, Guilherme, Luiza, Nádia, Raquel, Rodrigo e Tâmila. Vocês me ajudaram em muitas ocasiões e o convívio com vocês tornou essa jornada mais leve e essa conquista possível. Não poderia me esquecer do Wilson tão querido e sempre prestativo. Vocês irão para sempre comigo nas lembranças e no coração.

Ao programa de pós-graduação em Bioquímica na pessoa da professora Ariane Zamoner sempre disposta em resolver as demandas dos estudantes e nos trazer uma palavra de encorajamento nos momentos de crise. E a todos excelentes professores deste programa, que ampliaram meus conhecimentos na área da Bioquímica.

Ao Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio e Telúrio (LabSelen), coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Luiz Braga. Em especial ao Flavio Augusto, que sintetizou

as moléculas do presente trabalho, sendo sempre solícito em todas as dúvidas ao longo dessa jornada.

A todo corpo técnico do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) que sempre me atendeu com muita disposição e prestou um serviço de muita qualidade.

Aos órgãos de fomento que investem em pesquisa e inovação, em especial à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida durante meu doutoramento.

À rede educacional Adventista que me ajudou de várias formas durante estes anos e me apoiou nesta conquista. Em especial a minha coordenadora pedagógica Michele que incentivou o meu retorno à universidade.

A todos servidores, técnicos e mestres da UFSC, que fazem desta universidade pública uma instituição de qualidade e excelência. Esta universidade possibilitou toda minha formação no ensino superior e me fez um profissional mais capacitado e um melhor cidadão.

RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento celular desordenado e por alterações na fisiologia das células. Estima-se um aumento mundial de 45% no número de mortes por câncer entre 2007 e 2030. Este cenário tem incentivado vários pesquisadores a realizar grande esforço no isolamento e síntese de novas moléculas com potencial antitumoral. Os estudos com derivados de dihidropirimidinona (DHPM) e os compostos de organoselênio têm demonstrado resultados muito promissores com relação às suas atividades biológicas, incluindo ao seu potencial antitumoral. Assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o potencial antitumoral *in vitro* e prever *in silico* algumas das possíveis interações de compostos híbridos formados por selonoéster e dihidropirimidinonas (DHPM-Se) com o DNA. A citotoxicidade dos compostos foi avaliada utilizando o ensaio MTT para linhagens celulares tumorais (HeLa, HepG-2 e MCF-7) e não tumoral (McCoy). Após 72 horas, a maioria dos compostos apresentou maior toxicidade do que o monastrol. Esta dihidropirimidinona foi empregada como um controle positivo neste ensaio. Os compostos 49A, 49E e 49H foram os que apresentaram maior citotoxicidade (CI_{50} = 7,42; 8,32 e 7,78 μ M; respectivamente) para HepG2 e com os melhores índices de seletividade (IS = 4,24; 3,66 e 4,38 μ M; respectivamente). O tratamento com composto 49H (CI_{30} = 4,7 μ M; 72 h) apresentou efeito antiproliferativo, reduzindo a formação de colônias. Enquanto os compostos 49A e 49E não diferiram do grupo controle. O composto 49H (CI_{30} = 4,7 μ M; 72 h) causou uma redução de 42% no número de células viáveis e aumentou em seis vezes a frequência da morte celular por apoptose. Adicionalmente, este composto aumentou a expressão das proteínas p53 (60%) e BAX (80%), e causou uma redução na expressão do HIF-1 α (16%). Os ensaios moleculares mostraram que o 49H causou perturbação estrutural no CT-DNA indicado pelo efeito hipocrômico e pelo deslocamento do intercalante iodeto de propídeo (IP). Os estudos *in silico* de *docking* e de dinâmica molecular predisseram o composto 49H como um ligante de fenda menor no DNA e não um agente intercalador. O resultado do ensaio cometa revelou que o índice de dano ao DNA nas células HepG2 tratadas com o 49H (CI_{30} = 4,7 μ M; 72 h) foi 1,5 vezes maior que no controle negativo. Corroborando estes dados, a expressão de γ H2AX foi 2,3 vezes maior para células HepG2 tratadas em comparação com o controle. Porém, o tratamento com 49H não causou a clivagem da PARP. No entanto, a expressão desta proteína foi fortemente reduzida (60%) na presença do composto em comparação com o controle. A análise do ciclo celular revelou que o tratamento com 49H (4,7

μM ; 72 h) aumentou o número de células HepG2 na fase G1 em mais de 20% e reduziu em cerca de 40% a frequência de células na fase S, quando comparado ao controle. Com relação ao controle do ciclo celular, os resultados de imunodeteção revelaram uma redução nos níveis de RB fosforilada e de ciclina A em 21% e 43%, respectivamente comparado ao controle. Os conjuntos de resultados obtidos demonstraram que o composto 49H tem um potencial promissor como composto líder para o desenvolvimento de fármaco antitumoral para o tratamento de hepatocarcinoma. Além disso, foi investigado o potencial das DHPM-Se frente a linhagem tumoral de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7). Entre os oito compostos DHPM-Se testados, apenas 49A e 49F foram os mais citotóxicos para MCF-7 (CI_{50} = 11,3 e 5,46 μM ; respectivamente) e os mais seletivos para a linhagem não tumoral (IS = 2,8 e 3,3 μM ; respectivamente) e reduziram a viabilidade celular de uma maneira dependente do tempo e da concentração. Usando a concentração de IC_{30} somente o composto 49F (3,5 μM) mostrou capacidade antiproliferativa reduzindo em mais de 60% a formação de colônias. Ambos compostos reduziram em mais de 30% a viabilidade das células MCF-7. O composto 49A aumentou em 3,5 vezes a frequência de apoptose e em 2,0 vezes a frequência de necrose. Enquanto que o composto 49F elevou em 2,5 vezes a frequência desses dois tipos de morte. No ensaio molecular, o 49A interagiu com o CT-DNA e causou hiperacromismo, enquanto o 49F causou um efeito hipocrômico. O ensaio de intercalação revelou que os dois compostos causaram desestabilização na molécula de CT-DNA. Esse efeito foi evidenciado pela perda de fluorescência quando os compostos competiram e causaram o deslocamento do iodeto de propídeo. Simulações (*docking* e dinâmica molecular) usando B-DNA trouxeram um maior entendimento das interações do complexo ligante-B-DNA. Além disso, estes ensaios previram que os compostos atuaram como ligantes de sulco menor com estabilização do complexo devida às ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas. No entanto, a forma de interação prevista para 49F foi mais favorável energeticamente e teve ligações de hidrogênio mais estáveis durante o tempo de simulação. Apesar de algumas violações previstas no ADMET para 49F, o conjunto de outros resultados apontam para 49F como um composto líder promissor com potencial antitumoral para câncer de mama especialmente depois de submetido a otimizações adicionais.

Palavras-chave: Selenoésteres derivados de diidropirimidinonas; efeito antiproliferativo e citotóxico; dano ao DNA; parada no ciclo celular; apoptose; *docking*; dinâmica molecular.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by disordered cell growth and changes in cell physiology. Estimates showed a worldwide increase of 45% in cancer deaths between 2007 and 2030. This scenario has encouraged several researchers to make a major effort to isolate and synthesize new molecules with antitumor potential. Studies with dihydropyrimidinone derivatives (DHPMs) and organoselenium compounds have shown very promising results regarding their biological activities, including their antitumor potential. Thus, the objective of this research was to evaluate the *in vitro* antitumor potential and *in silico* molecular interactions of hybrid compounds formed by selonoester and dihydropyrimidinone (DHPM-Se) with DNA. Cytotoxicity of the compounds was evaluated using the MTT assay for tumor (HeLa, HepG-2, HRT-18 and MCF-7) and non-tumor (McCoy) cell lines. After 72 hours, most compounds showed higher toxicity than monastrol. This dihydropyrimidinone was used as positive control to tumor cells. Compounds 49A, 49E and 49H were the most cytotoxic for HepG2 ($IC_{50} = 7.42; 8.32$ and $7.78 \mu\text{M}$; respectively) and with the best selectivity indices ($IC_{50} = 4.24, 3.66$ and $4.38 \mu\text{M}$; respectively). Compound 49H ($IC_{30} = 4.7 \mu\text{M}$; 72 h) showed antiproliferative effect, reducing colony formation. While compounds 49A and 49E did not differ from the control group. Compound 49H ($IC_{30} = 4.7 \mu\text{M}$; 72 h) reduced the number of viable cell (42%) and increased the frequency of apoptotic cell death by six-fold. Additionally, this compound increased the expression of p53 (60%) and BAX (80%) proteins, and caused a reduction in HIF-1 α expression (16%). Molecular assays showed that 49H caused structural disturbance in the CT-DNA indicated by the hypochromic effect and by the displacement of the propidium iodide (PI) intercalant. *In silico* docking and molecular dynamics studies suggest that 49H is a DNA minor groove-binding ligand in DNA and not an intercalating agent. The result of the comet assay revealed that the DNA damage index in 49H-treated HepG2 cells ($IC_{30} = 4.7 \mu\text{M}$; 72 h) was 1.5 times higher than in the negative control. Corroborating these data, γH2AX expression was 2.3 times higher for treated HepG2 cells comparatively to the control. Although, the treatment with 49H did not cause PARP cleavage, the expression of this protein was strongly reduced (60%) in the presence of the compound when compared to control. Cell cycle analysis revealed that 49H ($IC_{30} = 4.7 \mu\text{M}$; 72 h) caused cell arrest in more than 20% of cells in the G1 phase and reduced the frequency of S phase cells by about 40% comparatively to control. Regarding cell cycle control, western blot results revealed a reduction in phosphorylated RB and cyclin A levels by 21% and 43%

respectively when compared to control. The results show that 49H has promising potential as a leading compound for the development of antitumor drug for the treatment of hepatocarcinoma. In addition, we investigated the potential of DHPM-Se against the tumoral line of human mammary adenocarcinoma (MCF-7). Among the eight DHPM-Se compounds tested, only 49A and 49F were the most cytotoxic for MCF-7 ($IC_{50} = 11.3$ and $5.46 \mu\text{M}$; respectively) and the most selective for the non-tumor cells ($IS = 2.8$ and $3.3 \mu\text{M}$, respectively) and reduced cell viability in a time and concentration dependent manner. Using the IC_{30} concentration, only the 49F compound ($3.5 \mu\text{M}$) showed antiproliferative capacity, reducing colony formation by more than 60%. Both compounds reduced the viability of MCF-7 cells by more than 30%. Compound 49A increased the frequency of apoptosis by 3.5 times and by 2.0 times the frequency of necrosis. While the 49F compound increased the frequency of these two types of death by 2.5 times. In the molecular assay 49A interact with CT-DNA and caused hyperchromism while 49F caused a hypochromic effect. The intercalation test revealed that the two compounds caused destabilization in the CT-DNA molecule. This effect was evidenced by the loss of fluorescence when the compounds competed and caused the displacement of propidium iodide. Simulations (docking and molecular dynamics) using B-DNA brought a greater understanding of ligand-B-DNA interactions. Furthermore, they predicted that the compounds act as minor groove ligands and the complex are stabilized through hydrogen bonds and hydrophobic interactions. However, the form of interaction foreseen for 49F was more energetically favorable and had more stable hydrogen bonds during the simulation time. Despite some violations foreseen in the ADMET for 49F, the set of other results point to DHPM-Se as a promising leader compound, with anti-tumor potential for breast cancer, especially after submitted to further optimizations.

Keywords: Dihydropyrimidinone-derived selenoesters; antiproliferative and cytotoxic effect; DNA damage, cell cycle arrest; apoptosis; docking; molecular dynamics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Taxas mundiais de incidência e da mortalidade estimadas para os 10 tipos mais comuns de câncer e que foram padronizadas para homens entre 30 e 75 anos.....	21
Figura 2- Taxas mundiais de incidência e da mortalidade estimadas para os 10 tipos mais comuns de câncer e que foram padronizadas para mulheres entre 30 e 75 anos.....	21
Figura 3- Estimativa para o ano de 2020 de novos casos de câncer, por localização primária (exceto câncer de pele não melanoma).....	22
Figura 4- Anatomia simplificada da mama com destaque para os locais onde se forma o carcinoma ductal <i>in situ</i> e o carcinoma lobular <i>in situ</i>	27
Figura 5- Principais marcadores das células tumorais.....	28
Figura 6- Cascata dos eventos relacionados com a invasão e metástase em tumores malignos.....	29
Figura 7- Pontos de restrição no ciclo celular.....	33
Figura 8- Uma gama de sinais de estresse que pode ativar o p53 e conseqüentemente regular positiva ou negativamente muitos processos celulares que podem contribuir para a supressão do tumor.....	34
Figura 9- Maquinário de Rb e ciclo celular.....	36
Figura 10- Eventos característicos da célula em apoptose.....	37
Figura 11- Vias extrínseca e intrínseca de apoptose.....	40
Figura 12- Representações esquemáticas das diferentes formas de interação com a molécula de DNA.....	44
Figura 13- Síntese das DHPM por Pietro Biginelli.....	49
Figura 14- Estrutura da cinesina Eg5.....	50
Figura 15- Atividade da cinesina Eg5 no fuso mitótico.....	51
Figura 16- Comparação entre as estruturas químicas da diidropirimidinona e do monastrol.....	76
Figura 17- DHPM-Se reduziu a viabilidade celular de modo dose e tempo dependentes nas células HepG2.....	78
Figura 18- O efeito supressor das DHPMs-Se na formação de colônias de HepG2.....	79
Figura 19- Caracterização do tipo de morte celular induzida pelo tratamento com 49H e expressão de proteínas relacionadas com a apoptose.....	80

Figura 20- Análise prevista pela dinâmica molecular dos fatores envolvidos para estabilização do complexo formado entre o B-DNA e o ligante 49H.....	82
Figura 21- Efeito do composto 49H sobre o DNA e sobre a expressão de proteínas relacionadas ao dano e ao reparo do DNA.....	84
Figura 22- Ação do composto 49H sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular.....	85
Figura 23- Possível mecanismo de ação da atividade antiproliferativa do composto 49H sobre as células HepG.....	95
Figura 24- DHPM-Se diminuem a viabilidade das células de modo tempo e concentração dependentes.....	99
Figura 25- O efeito supressor das DHPMs-Se na formação de colônias em MCF-7.....	99
Figura 26- Quantificação de células viáveis, apoptóticas e necróticas.....	100
Figura 27- Efeito dos compostos 49A e 49H sobre o CT-DNA.....	101
Figura 28- Energia molecular mecânica relacionada a cada ligante complexado com B-DNA calculada pelo método MM-PBSA (A e B). GROMACS calculou a energia livre de solvatação SASA (ΔG_{solv}) relacionada ao complexo ligante-B-DNA (C e D).....	105
Figura 29- Representação das variações de RMSD para os ligantes 49A e 49F (A). Mapa de existência das ligações de hidrogênio previstas em alguns frames durante o tempo de simulação (1000 ps) para os ligantes 49A e 49F (B).....	106
Figura 30- Contribuição de energia por resíduo de B-DNA (PDB ID 5T4W) e ligantes 49A (A) e 49F (C). Representação pelo LigPlot ⁺ das interações previstas entre o complexo B-DNA após simulações de dinâmica molecular para o ligante 49A(B) e ligante 49F (D).....	107
Figura 31- Representação gráfica do complexo formado pelo B-DNA e pelos ligantes 49A e 49F interagindo na fenda menor conforme previsto pelos programas AutoDock tools/ Vina (A) e GROMACS (B).....	108
Figura 32- Possível mecanismo de ação da atividade antiproliferativa dos compostos 49A e 49F sobre as células MCF-7.....	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Estrutura química dos selenoésteres derivados de diidropirimidinonas.....	64
Tabela 2 - Citotoxicidade das DHPMs-Se (49A-H) em diferentes linhagens de células tumorais (HeLa, HepG-2 e MCF-7) e em célula normal (McCoy) tratadas por 72 horas. Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes.....	77
Tabela 3 - Interações simuladas entre complexo B-DNA (PDB ID 5T4W) e o ligante 49H previstas com Auto Dock Vina (docagem molecular) e GROMACS (dinâmica molecular).....	81
Tabela 4 - Valores de IC ₅₀ (µM) e índice de seletividade do Se-DHPM (49A - 49H) em linhagem celulares MCF-7 e McCoy. Resultados expressos como a média de três experimentos independentes.....	98
Tabela 5 - Poses preditas para cada ligante (49A e 49F) complexado com B-DNA (PDB ID 5T4W) calculadas pelo Auto Dock Vina (<i>Docking</i>) e GROMACS (DM- Dinâmica molecular).....	103
Tabela 6 - Energias calculadas relacionadas a cada ligante complexado com B-DNA após aplicação do método MM-PBSA e GROMACS (<i>SASA Free Solvation Energy</i>) e ligações de Hidrogênio previstas por GROMACS.....	103
Tabela 7 - Propriedades dos compostos 49A e 49F indicadas pelo SwissADME.....	109
Tabela 8 - Parâmetros de toxicidade previstos para os compostos 49A e 49F através do ADMETlab.....	110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACS** Sociedade Americana do Câncer (*American Cancer Society*)
- A-172** Linhagem celular de glioblastoma humano
- A-549** Linhagem celular epitelial basal de adenocarcinoma alveolar humano
- AIF** Fator indutor de apoptose (*Apoptosis Inducing Factor*)
- AKt** Proteína cinase B
- APAF-1** Fator ativador de proteases pró-apoptóticas
- Bad** Proteína promotora de morte associada ao Bcl-2
- Bak** *Bcl-2 homologous antagonist/killer*
- Bax** Proteína X associada a Bcl-2
- Bcl-2** Proteína de linfoma de células B 2
- Bcl-xL** Proteína de linfoma de células B extragrande
- BRICS** Bloco econômico formado por Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul
- CDKs** Cinasas dependentes de ciclinas
- CDKIs** Inibidores de CDKs
- CI50** Concentração inibitória de 50% das células
- CI30** Concentração inibitória de 30% das células
- CT-DNA** DNA de timo de vitelo
- DHPMs** Diidropirimidinonas
- DIO** Deiodinases
- DISC** Complexo sinalizador indutor de morte
- DMSO** Dimetilsulfóxido
- DMEM** Meio de cultura Dubecco modificado de Eagle
- E2F** Fator de transcrição
- EDTA** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- GPx** Glutationa peroxidase
- GROMACS** GRONingen MACHine for Chemical Simulations
- Hela** Linhagem celular de adenocarcinoma de cérvix
- HEPES** Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanolsulfônico
- HepG2** Linhagem celular de carcinoma humano hepatocelular
- HIF-1 α** Fator induzido por hipóxia-1 α (*Hypoxia-inducible factor*)
- HIPK2** *Homeodomain-interacting protein kinase 2*

HRT-18 Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
HT-29 Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal humano
IARC *International Agency for Research on Cancer*
IC₅₀ Concentração Inibitória de 50%
IC₃₀ Concentração Inibitória de 30%
IDH Índice de desenvolvimento humano
INCA Instituto Nacional de Câncer
IP Iodeto de propídio
IS Índice de seletividade
JNK Proteína cinase ativada por estresse
kDa quilodalton
MAPK Proteína cinase ativada por mitógeno
MCF-7 Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humana
McCoy Linhagem celular de fibroblastos murino
MTT *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-phenyltetrazolium bromide*
mTOR Alvo de rapamicina em mamíferos
Msr Metioninas sulfóxido redutases
OGC Observatório Global do Câncer
p21 Proteína inibidora de cinase dependente de ciclina 1
p53 Proteína supressora tumoral p53
PARP Poli(ADP-ribose)polimerase
PDK-1 Fosfatidilinositol-3-dependente de cinase-1
PI3K Fosfatidilinositol-3 cinase
PIP2 Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PIP3 3,4,5-trifosfato de fosfatidilinositol
pRb Proteína do retinoblastoma
SUS Sistema Único de Saúde
TNF Fator de necrose tumoral
TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
TRAIL Ligante indutor de apoptose relacionado com TNF
TRIS Tris(hidroximetil)aminometano
TNFR Receptor do fator de necrose tumoral
TP53 Gene da proteína tumoral 53

TrxR Tiorredoxinas redutases

U87MG Linhagem celular de glioblastoma humano

VEGF Fator de crescimento vascular endotelial

WHO Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	20
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 CÂNCER: DADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	20
1.2 CÂNCER DE FÍGADO.....	24
1.3 CÂNCER DE MAMA.....	25
1.4 CÂNCER: ASPECTOS BIOQUÍMICOS.....	27
1.4.1 Ciclo celular e correlações com o câncer.....	31
1.4.2 Morte celular e câncer.....	37
1.5 QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER.....	42
1.5.1 Ação dos fármacos quimioterápicos.....	43
1.5.2 Terapia alvo no combate ao câncer.....	46
1.5.3 Atividade antitumoral das diidropirimidinonas.....	49
1.5.4 Atividade antitumoral de compostos organoselênio.....	54
1.6 APLICAÇÃO DE <i>DOCKING</i> E DINÂMICA MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS COMPOSTOS.....	57
2 OBJETIVOS.....	61
2.1 OBJETIVO GERAL.....	61
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
3 JUSTIFICATIVA.....	62
4 METODOLOGIA.....	64
4.1 SÍNTESE DE DHPMS-SE.....	64
4.2 LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA.....	65
4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR.....	66
4.4 ENSAIO CLONOGÊNICO.....	66
4.5 TIPO DE MORTE CELULAR.....	67
4.6 AVALIAÇÕES <i>IN SILICO</i> DAS INTERAÇÕES ENTRE B-DNA E OS LIGANTES.....	68
4.7 INTERAÇÃO E INTERCALAÇÃO COM O CT-DNA.....	70
4.8 DANOS AO DNA.....	71
4.9 ANÁLISE DO CICLO CELULAR.....	72
4.10 ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO.....	72
4.11 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADMET.....	73
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	74
5 CAPÍTULO 2- NOVOS SELENOÉSTERES DERIVADOS DA DIIDROPIRIMIDINONA COMO POTENCIAIS AGENTES CITOTÓXICOS CONTRA O CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO: DOCKING MOLECULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA.....	75
5.1 INTRODUÇÃO.....	75
5.2 RESULTADOS.....	76
5.2.1 Efeitos de DHPMs sobre a viabilidade celular.....	76
5.2.2 Atividade antiproliferativa em células HepG2.....	78

5.2.3 Tipo de morte celular induzido.....	79
5.2.4 Avaliação <i>in silico</i> das interações entre B-DNA e ligante 49H.....	80
5.2.5 Interações <i>in vitro</i> entre o DNA e o 49H.....	83
5.2.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo.....	84
5.3 DISCUSSÃO.....	86
5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	94
6 CAPÍTULO 3- DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR PREVIRAM INTERAÇÕES ENTRE B-DNA E DIIDROPIRIMIDINONAS DERIVADOS DE SELENOÉSTERES QUE ELUCIDARAM EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA (MCF-7).....	96
6.1 INTRODUÇÃO.....	96
6.2 RESULTADOS.....	98
6.2.1 Citotoxicidade e seletividade dos DHPM-Se.....	98
6.2.2 DHPM-Se mais seletivo reduziu a formação de colônias em MCF-7.....	99
6.2.3 DHPM-Se mais seletivos induziram apoptose e necrose em MCF-7.....	100
6.2.4 DHPM-Se interagiram com CT-DNA e deslocaram agente intercalante.....	101
6.2.5 Estudos <i>in silico</i> previram interações entre DHPM-Se e o B-DNA.....	102
6.2.6 Predição das propriedades ADMET para os compostos 49A e 49F.....	109
6.3 DISCUSSÃO.....	111
6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	119
7 CONCLUSÕES FINAIS.....	121
8 PERSPECTIVAS.....	122
9 REFERÊNCIAS.....	123
ANEXO A – Página de rosto do artigo publicado.....	139
ANEXO B - Comprovante de submissão do segundo artigo.....	140

CAPÍTULO 1- CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER: DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

Embora se tenha a impressão de que o câncer seja uma doença da modernidade, registros indicam que o médico grego Hipócrates (460-370 a.C.) já havia feito anotações a respeito de carcinomas. Antes mesmo de Hipócrates, há relatos da doença em manuscritos antigos (1600 a.C.) e evidências de câncer ósseo em múmias egípcias. O relato mais antigo de câncer de mama também vem do Egito antigo de cerca de 1500 a.C. Curiosamente, em algumas inscrições encontradas, os tumores de superfície eram removidos de modo cirúrgico de maneira semelhante à realizada hoje (SUDHAKAR, 2009).

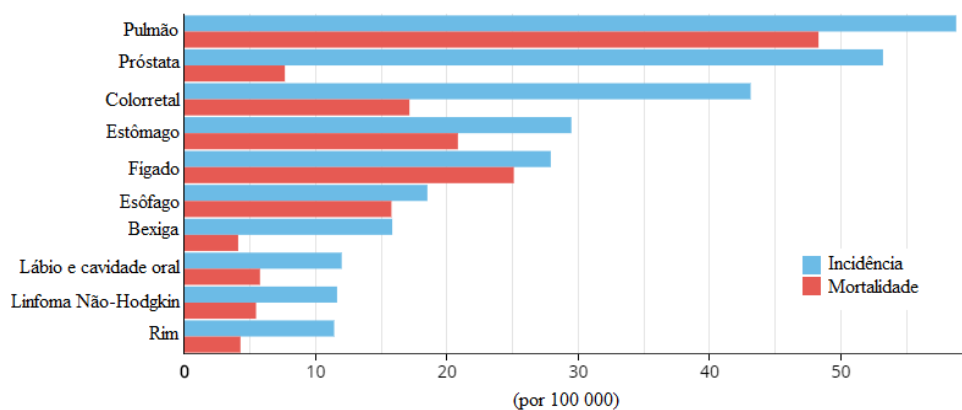
Ao longo do tempo algumas teorias tentaram explicar o surgimento da doença. Hipócrates acreditava que o corpo continha 4 humores (fluidos corporais) e o desequilíbrio desses fluidos resultaria no câncer. Esta teoria foi padrão durante a Idade Média por mais de 1300 anos. Depois no século XVII uma teoria afirmava que os tumores crescem a partir da linfa constantemente expulsa pelo sangue. Já no século XIX, Muller e seu aluno Virchow relataram que o câncer era derivado de células e não de linfa. Adicionalmente, Virchow propôs que a irritação crônica era a causa de câncer. Uma outra proposta que durou entre 1800 até 1920 defendia que o câncer era causado por traumas e uma outra linha de pensamento que vigorou até o século XVIII acreditava que o câncer era contagioso e se espalhava através de parasitas. Por fim, durante a década de 1970, a descoberta de duas famílias de genes os oncogenes e os genes supressores de tumor trouxeram maior entendimento sobre o surgimento do câncer (SUDHAKAR, 2009).

Para a maioria das pessoas a palavra câncer soa como sinônimo de morte diante das estatísticas oficiais apresentadas a cada ano para a doença no Brasil e no mundo. Ademais, o câncer continua sendo um dos principais problemas de saúde pública no mundo todo. A Organização Mundial de Saúde (WHO - *World Health Organization*; 2018a), considera o câncer como a segunda causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões de mortes, apenas em 2018.

Os números mais recentes sobre o câncer em todos os continentes foram organizados pela plataforma Observatório Global do Câncer (OGC). Esta agência utiliza dados de vários

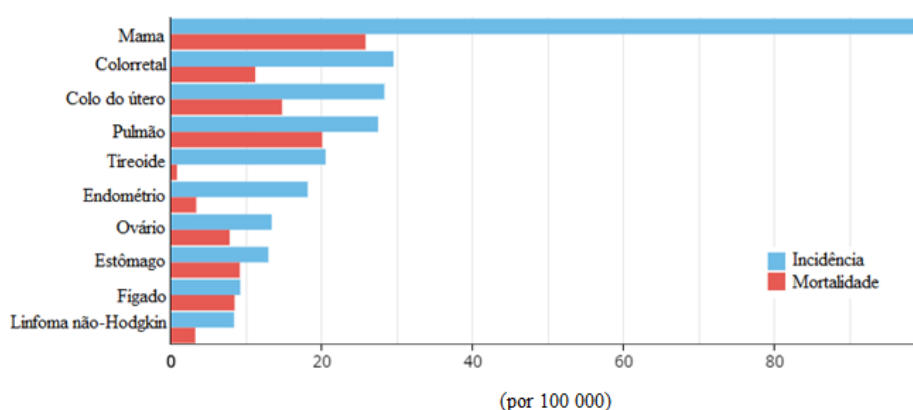
projetos-chave ao redor do mundo. Para 2018, as estimativas da incidência, mortalidade e prevalência para 36 tipos de câncer foram baseadas nas informações de 185 países, considerando sexo e faixa etária. Nas figuras 1 e 2 se encontram representadas as estimativas para incidência e mortalidade para os 10 tipos de câncer mais comuns em homens e mulheres com idade entre 30 a 75 anos publicadas pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*, 2018b).

Figura 1- Taxas mundiais de incidência e da mortalidade estimadas para os 10 tipos mais comuns de câncer e que foram padronizadas para homens entre 30 e 75 anos (exceto câncer de pele não melanoma).



Fonte: Adaptado de IARC (2018b)

Figura 2- Taxas mundiais de incidência e da mortalidade estimadas para os 10 tipos mais comuns de câncer e que foram padronizadas para mulheres entre 30 e 75 anos (exceto câncer de pele não melanoma).



Fonte: Adaptado de IARC (2018b)

No cenário brasileiro, a situação também tem se revelado como crítica, apesar de avanços importantes na área do diagnóstico precoce e nas formas de tratamento. Segundo o Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva (INCA, 2018) ligado ao Ministério da Saúde, existem dois grandes desafios que a saúde pública enfrenta no tocante à prevenção e ao controle dessa doença no país. O primeiro se refere à questão da dimensão geográfica e o segundo as marcantes diferenças regionais que se evidenciam em termos de comportamentos, crenças e atitudes.

De acordo com o relatório do INCA (2019) para o ano de 2020 estimou-se a ocorrência de 449 mil casos novos de câncer, excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 177 mil casos novos). Com relação a esses dados, na figura 3 são apresentados os números de casos para os dez tipos de câncer mais comuns considerando a localização primária. Para os organizadores do relatório, o levantamento desses dados sobre a distribuição dos tipos mais incidentes de câncer, ao longo dos anos, tem sido uma das principais estratégias para estabelecer diretrizes em políticas públicas e, principalmente, para o planejamento de ações de prevenção e controle do câncer.

Figura 3- Estimativa para o ano de 2020 de novos casos de câncer, por localização primária (exceto câncer de pele não melanoma).

Localização Primária	Casos Novos	Localização Primária	Casos Novos
Próstata	65.840	Mama feminina	66.280
Cólon e Reto	20.540	Cólon e Reto	20.470
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	Colo do útero	16.710
Estômago	13.360	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440
Cavidade Oral	11.200	Glândula Tireoide	11.950
Esôfago	8.690	Estômago	7.870
Bexiga	7.590	Ovário	6.650
Laringe	6.470	Corpo do útero	6.540
Leucemias	5.920	Linfoma não-Hodgkin	5.450
Sistema Nervoso Central	5.870	Sistema Nervoso Central	5.230

*Números arredondados para múltiplos de 10. **Fonte:** Adaptado de INCA (2019).

O câncer pode ser entendido como uma doença de causas multifatoriais. Contudo, no surgimento do tumor, vários estudos têm demonstrado uma correlação maior com o estilo de vida do que com fatores genéticos. Além disto, os últimos dados publicados destacaram uma forte correlação direta entre a incidência global do câncer e o índice de desenvolvimento humano (IDH), para ambos os sexos. De fato, 41% dos casos globais estimados de câncer em 2012 ocorreram em países com IDH muito elevado, 28% com IDH elevado, 16% com IDH

médio e 6% em países com baixo IDH. Contudo, estimativas de incidência de câncer relativas ao período compreendido entre 2008 – 2030 nos países com IDH baixo e médio apontaram para um aumento de 100% e 81%, respectivamente (FIDLER; SOERJOMATARAM; BRAY, 2016)

Além do impacto em termos de saúde e qualidade de vida dos pacientes e de suas famílias também deve ser considerado o efeito significativo na economia com relação aos custos associados ao câncer, em todas as etapas do mesmo. Pois, as despesas associadas desde o diagnóstico, tratamento, monitoramento da saúde do paciente e medidas paliativas tem apresentado tendências de aumento a cada ano. Como exemplo desse fato, somente nos Estados Unidos da América cerca de 87,8 bilhões de dólares foram usados para cuidados da saúde relacionados com o câncer (ACS - *American Cancer Society*, 2017).

No Brasil, os investimentos do Ministério da Saúde mais que dobraram os recursos destinados para tratamentos oncológicos ofertados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) em todo o País. Em 2010 foi registrado o investimento que saltou de R\$ 2,2 bilhões para R\$ 4,6 bilhões, em 2017. Somente neste ano, de acordo com um levantamento efetuado pelo SUS, foram realizadas 324.045 cirurgias oncológicas, 3,1 milhões de procedimentos quimioterápicos e 11,2 milhões de sessões de radioterapia que foram oferecidas gratuitamente pelo SUS aos pacientes em tratamento contra o câncer (BRASIL, 2018).

Estudo liderado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC, 2018a) em parceria com as principais instituições de pesquisa do câncer dos países que formam o bloco econômico BRICS formado pelos países Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, demonstrou que a perda da produtividade coletiva atingiu 46,3 bilhões de dólares, em 2012. Este estudo apontou a importância de se atingir um pleno conhecimento do impacto econômico decorrente do câncer em economias emergentes.

Portanto, a redução na incidência do câncer trata-se de uma prioridade em razão do alto custo da doença em termos econômicos. Porém, com maior destaque em termos de perdas sociais associadas aos seus impactos decorrentes de perdas de vidas humanas. Assim, deve-se considerar a urgência dos países estabelecerem estratégias de prevenção, detecção precoce, promoção de educação para diminuição dos riscos ocupacionais e associados aos hábitos como o tabagismo e alcoolismo e, principalmente, a maior oferta de novos tratamentos com fármacos mais acessíveis à população (PEARCE et al., 2018).

1.2 CÂNCER DE FÍGADO

Mundialmente os dados da IARC (*International Agency for Research on Cancer*, 2018b) para 2018 apontaram que o câncer de fígado entre os homens foi o 5º tipo mais comum e o 3º em maior número de mortalidade. Nas mulheres ocupou o 9º lugar em incidência e o 6º lugar em mortalidade. De acordo com o INCA (2018) o número de mortes por hepatocarcinoma em 2018 foi de 10.550, sendo 6.181 homens e 4.369 mulheres. No Brasil, o câncer de fígado não está entre os tipos de maior frequência, contudo a morte por câncer de fígado e vias biliares intra-hepáticas ocupa o 6º lugar nos homens e 8º lugar entre as mulheres.

Entre todos os tipos de lesões malignas no fígado, as metástases hepáticas, lesões secundárias, representam 90% dos casos de câncer hepático. Isto é devido às diversas funções exercidas pelo órgão, como o recebimento de fluxo sanguíneo de todo o corpo para filtragem. Embora tratamentos modernos, como cirurgias e quimioterapias, aumentem a sobrevivência de pacientes com metástases no fígado, a taxa de sobrevivência dos pacientes em cinco anos varia entre 23% e 45% (FERREL; KAKAR, 2011).

O carcinoma hepatocelular (CHC) é responsável por mais de 75% dos cânceres primários de fígado e, portanto, considerado o tipo mais comum. Ele representa uma das causas de morte relacionadas ao câncer que mais crescem nos EUA e continua sendo uma das mais difíceis de gerenciar. As outras formas de neoplasias primárias do fígado, com menor frequência na população incluem: hepatoblastoma, colangiocarcinoma, angiossarcoma e a variante fibrolamelar. Essas neoplasias atingem a população de forma diversa e a evolução desses tumores e o próprio tratamento são diferentes em relação ao CHC (CHUANG; LA VECCHIA; BOFFETA, 2009).

Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento do CHC são a doença hepática crônica e a cirrose, os quais estão associados principalmente com a hepatite e a ingestão excessiva de álcool (BALOGH et al., 2016). Contudo, a incidência de CHC no mundo é bastante heterogênea devido à variável prevalência de fatores de risco. Na África Subsaariana e no leste da Ásia 80% dos casos de CHC são decorrentes da hepatite B e da exposição à aflatoxina, enquanto nos EUA, Europa e Japão a hepatite C é o principal fator de risco (FERLAY, 2018; EL-SERAG, 2012).

A mortalidade relacionada ao carcinoma hepatocelular pode ser evitada atuando nos fatores de risco. Um exemplo disso foi o primeiro programa de vacinação universal em bebês

contra o vírus da hepatite B lançado em 1984 em Taiwan. Três ou quatro doses da vacina contra o vírus da hepatite B foram administradas a todos os bebês a partir da primeira semana de vida. Vinte anos após o lançamento do programa de vacinação a taxa de infecção pelo vírus apresentou uma redução notável de 10% - 17% antes do programa, para 0,7% - 1,7% após o programa. Adicionalmente, a taxa de incidência de CHC em crianças de 6 a 14 anos também caiu de 0,52-0,54 para 0,13-0,20 por 100.000 crianças. Segundo os pesquisadores essa experiência da prevenção do CHC pela imunização contra o vírus da hepatite B pode ser aplicada à prevenção de outros cânceres relacionados à esta infecção viral (CHANG et al., 2016).

Por outro lado, uma vez que a infecção pelo vírus da hepatite C é adquirida, uma terapia antiviral eficaz deve prevenir a progressão da cirrose e, em última análise, inibir o desenvolvimento do CHC. No entanto, se a cirrose for estabelecida, o risco de carcinoma hepatocelular permanece apesar do tratamento antiviral ter sido efetuado (PAPATHEODORIDIS et al., 2015).

Com relação ao CHC, até 2008, não existia uma terapia sistêmica eficaz para os pacientes diagnosticados com carcinoma hepatocelular em estágio avançado ou pacientes que fizeram a transição após outras terapias terem falhado. Atualmente vários compostos foram clinicamente testados ou se encontram em fase de desenvolvimento. Porém, os únicos agentes que comprovadamente melhoraram a sobrevida comparativamente ao placebo são Sorafenibe e Regorafenibe. Por outro lado, o conhecimento dos eventos moleculares que comandam a iniciação e a progressão de tumores pode contribuir de maneira decisiva e, desta forma, permitir a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos direcionados para supressão vias de sinalização envolvidas (BRUIX et al., 2017)

1.3 CÂNCER DE MAMA

As glândulas mamárias são exclusivas dos mamíferos, com a função específica de produzir e secretar o leite para a nutrição do recém-nascido. O desenvolvimento da mama durante a puberdade e após essa fase, ajuda o órgão a se preparar para assumir um estado funcional durante a gravidez e a lactação. De modo surpreendente, esse órgão tem a capacidade de regredir a um estado de repouso após a cessação da lactação e, então, sofrer o mesmo ciclo de expansão e regressão novamente em gestações subsequentes que se dá por uma regulação hormonal rígida, que é fundamental para o funcionamento normal da glândula (HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

O órgão mamário da mulher adulta, em condições normais é formado por tecidos epiteliais e estromais, dispostos de forma ramificada e arborescente. O componente epitelial é formado por células lobulares, ductais e mioepiteliais. As células lobulares se agrupam formando os alvéolos que irão produzir leite no período da amamentação. As células ductais vão se organizar nos ductos que se interconectam aos alvéolos formando os ductos lactíferos progressivamente maiores que se desembocam no mamilo. As células mioepiteliais irão recobrir os alvéolos e os ductos e serão responsáveis pelas contrações que irão conduzir o leite dos alvéolos até o mamilo. No estado fisiológico não lactante o maior volume da mama é formado pelo componente estromal composto por quantidade variável de tecido adiposo e conjuntivo (HASSIOTOU; GEDDES, 2013).

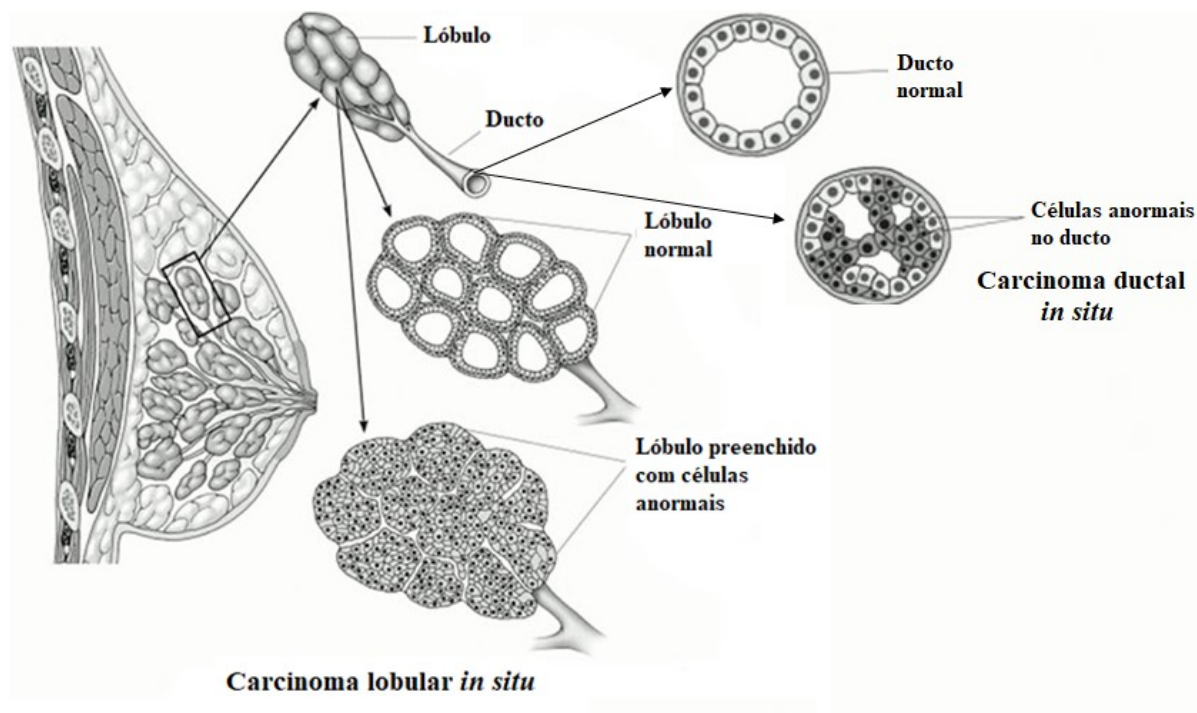
O câncer de mama continua a ser um grande problema de saúde tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Nos EUA a estimativa para 2020 é de 276.480 novos casos de câncer de mama invasivo e cerca de 42.000 mortes estimadas entre as mulheres (ACS, 2020). Para o Brasil a estimativa de novos casos para 2020 é de 66.280 e o número de óbitos pela doença em 2018 foi de 17.572 (INCA, 2019). De acordo com os dados do INCA (2019) o câncer de mama é o mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do de pele não melanoma, respondendo por cerca de 30% dos casos novos a cada ano. Este tipo de câncer também pode acometer os homens, no entanto sua frequência é muito baixa totalizando apenas 1% de todos os casos da doença.

Intensivos estudos realizados ao longo dos últimos anos mostraram que 20-30% casos de câncer de mama recém diagnosticados estão associados com a ocorrência de vários fatores de risco que podem ativamente iniciar ou modificar o processo de transformação neoplásica de células da mama. Todos esses fatores de risco podem ser divididos em dois grupos. O primeiro grupo inclui fatores inerentes tais como idade, sexo, etnia, constituição genética, ocorrência de neoplasias na família e a ocorrência de lesões benignas da mama. O segundo grupo está relacionado fatores condicionados pelo estilo de vida, como dieta, uso de álcool e fumo, entre outros (KAMIŃSKA et al., 2015).

Na maioria dos casos, os carcinomas mamários têm origem no epitélio dos lóbulos e/ou nos ductos da glândula (Figura 4). Em termos clínicos o carcinoma lobular e o ductal podem se apresentar sob a forma *in situ*, no qual o tumor permanece confinado ao tecido mamário. Por outro lado, em estágios avançados a forma invasiva pode atravessar os limites teciduais e disseminar metástases para sítios secundários (ELLIS, 2010). Ademais, as outras formas de manifestação do cancer de mama em mulheres são câncer de mama inflamatório,

câncer de mama triplo-negativo, doença de Paget, tumor filoide e angiosarcoma (ACS, 2019a).

Figura 4- Anatomia simplificada da mama com destaque para os locais onde se forma o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma lobular *in situ*.



Fonte: ACS - American Cancer Society (2019a)

Os medicamentos mais utilizados na quimioterapia para o câncer de mama incluem as antraciclina (doxorubicina e epirrubina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel). Estes podem ser usados em combinações com outros fármacos como fluorouracil (5-FU) e ciclofosfamida para se obter um melhor resultado. Muitos outros medicamentos como agentes de platina (cisplatina ou carboplatina), vinorelbina, capecitabina, doxorubicina lipossomal, gemcitabina, mitoxantrona, paclitaxel ligado à albumina e eribulina também são utilizados, embora com menor frequência (ACS, 2019b).

1.4 CÂNCER: ASPECTOS BIOQUÍMICOS

Embora o câncer compreenda um grupo heterogêneo de doenças, existem características comuns entre as quais pode ser destacado o surgimento de células anormais que crescem além de suas fronteiras naturais. Em processos de formação tumoral existem

várias etapas, nas quais as células inicialmente normais podem atingir progressivamente o estágio neoplásico e, ao longo deste caminho, adquirem capacidades específicas que permitem elas se tornarem tumorigênicas (ALBERTS et al., 2017).

As células tumorais apresentam marcas distintivas quando comparadas com as células saudáveis tanto em termos morfológicos quanto bioquímicos e fisiológicos. Em 2000, Hanahan e Weinberg propuseram seis marcadores para o câncer que, juntos, caracterizam essa transformação que resulta em células malignas. Contudo, na continuidade destes estudos estes autores observaram a necessidade de ampliação do número de marcadores tumorais originalmente propostos. Assim, as dez características principais adquiridas pelas células tumorais propostas por Hanahan e Weinberg (2011) foram a sinalização proliferativa sustentada, a perda de genes supressores de crescimento, a evasão da resposta imune, a capacidade de imortalidade replicativa, a inflamação promovida pelo tumor, a indução da angiogênese, a instabilidade genômica e mutação, a resistência à morte celular e a desregulação do metabolismo energético (Figura 5).

Figura 5- Principais marcadores das células tumorais.



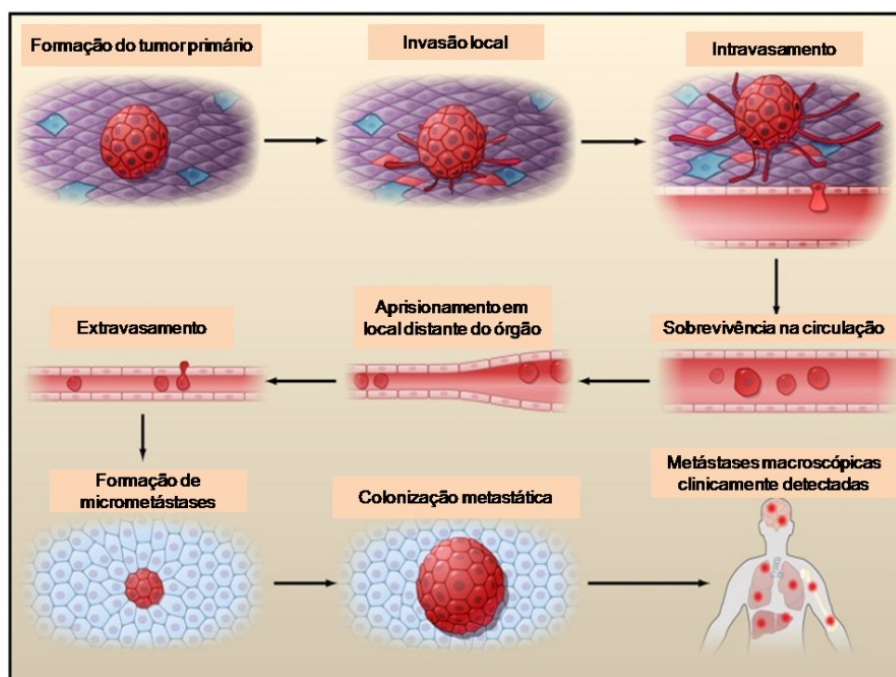
Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2011)

Apesar de significativos avanços no estudo, no diagnóstico e no tratamento do câncer, a grande maioria dos pacientes com doença metastática avançada enfrenta uma doença

terminal que é, com raras exceções, incurável pelos métodos terapêuticos atuais. Cerca de 90% das mortes associadas ao câncer são causadas pela doença metastática, em vez de tumores primários. Diferentemente da quantidade de descobertas que ajudaram a revelar detalhes dos mecanismos envolvidos na formação de tumores primários, os fundamentos biológicos da doença na fase metastática permanecem mal compreendidos (ARTHUR et al., 2017).

Para compreensão das bases celulares e moleculares envolvidas na metástase, a abordagem mais reconhecida é o conceito da cascata de invasão proposta inicialmente por Fidler e adaptada posteriormente (Figura 6) (VALASTYAN; WEINBERG, 2011). Estas etapas são constituídas por: i) invasão local, ii) intravasamento, iii) sobrevivência na circulação, iv) aprisionamento local em órgão distante e extravasamento, v) formação de micrometástase e vi) colonização metastática (PACHMAYR; TREESE; STEIN, 2017).

Figura 6- Cascata dos eventos relacionados com a invasão e metástase em tumores malignos.



Fonte: Adaptado de Valastyan e Weinberg (2011).

Ainda que não haja um consenso entre pesquisadores, considera-se todas as células do tumor tenham capacidade metastática ou que esta competência pode ser restrita a um subgrupo especial de células com potencial de autorrenovação indefinida (células-tronco

tumorais), um conjunto de evidências nos últimos anos tem apoiado esta última hipótese (LOBO et al., 2007).

Dentre as fortes indicações que suportam a hipótese das células-tronco tumorais destacam-se: (1) apenas uma pequena fração da massa tumoral pode regenerar um novo tumor após o transplante em ratos imunodeficientes; (2) essas células têm um padrão distinto de marcadores de superfície e (3) tumores secundários regenerados por essas células incluem população mista de células cancerígenas (DALERBA; CHO; CLARKE, 2007).

A instabilidade genômica é outra característica importante para a manutenção da malignidade tumoral. A integridade genômica das células é frequentemente desafiada por agentes químicos e físicos que podem modificar as bases dos nucleotídeos e modificar ou quebrar as interações açúcar-fosfato no DNA. Os agentes que danificam o DNA podem ser de fontes variadas: endógena (subprodutos reativos de processos como metabolismo ou inflamação), exógena (agentes presentes em alimentos, água ou ar), física, como luz ultravioleta e radiação ionizante, ou substâncias químicas, como espécies reativas de oxigênio (ROS), agentes intercalantes, agentes alquilantes e análogos de bases. Esses agentes podem danificar o DNA de forma direta ou indiretamente, ou ambos. O tipo de dano ao DNA tem um impacto no destino de uma célula, pode determinar morte celular ou causar mutações, o que pode levar a doenças como o câncer (SWIFT; GOLSTEYN, 2014).

A formação de neoplasias malignas por alterações genéticas pode ocorrer devido à ação de pelo menos quatro categorias de genes. A mutação nos proto-oncogenes pode levar ao crescimento celular descontrolado e oncogênese. Enquanto alterações nos genes supressores de tumor levam a perda no controle da divisão celular impedindo que ocorra a parada no ciclo celular. Modificações genéticas em genes reguladores de apoptose podem impedir a morte de células defeituosas e permitir que se multipliquem rapidamente. Por fim, mutações em genes que reparam o DNA impedem que esses danos sejam corrigidos. Isso possibilita o surgimento de novas mutações que vão interferir na capacidade do organismo de reparar danos não letais ocorridos nas outras categorias de genes o que poderá afetar de forma direta a proliferação e sobrevivência celular (KUMAR et al., 2003).

As sucessivas alterações nos genomas de células neoplásicas é o que permite as mesmas a aquisição dos múltiplos marcadores característicos tumorais. Quando presentes, certos genótipos mutantes conferem vantagem seletiva aos subclones de células, possibilitando a superação e eventual dominância local em um ambiente de tecidual. Assim, a progressão tumoral em múltiplos passos pode ser retratada como uma sucessão de expansões

clonais, cada uma das quais é desencadeada pela possibilidade de ter adquirido um genótipo mutante. A manifestação de fenótipos hereditários como por exemplo, a inativação de genes supressores tumor, também podem ser obtidos através de mecanismos como metilação do DNA, assim como através de modificações em histonas (BERDASCO; ESTELLER, 2010).

Além do mais, quebras na fita do DNA, particularmente as quebras de fita dupla, parecem ser formadas mais frequentemente em células cancerígenas do que em células normais. Esta é provavelmente uma consequência da frequente interrupção dos controles normais na replicação do DNA nas células cancerígenas. Por exemplo, é bem comum nestas células a perda da função da p53 o que acaba enfraquecendo o controle que normalmente impediria as células de iniciarem a replicação do DNA quando esse apresentasse defeitos (HALAZONETIS; GORGOULIS; BARTEK, 2008).

1.4.1 Ciclo celular e correlações com o câncer

Sem dúvida uma marca característica das células cancerígenas envolve a capacidade de sustentar a proliferação constante. Em células normais ocorre um controle bem regulado da produção e na liberação de sinais promotores do crescimento que conduzem a progressão no ciclo celular por meio do crescimento e da divisão da célula. Esse ajuste garante a homeostase do número de células mantendo a estrutura e a função tecidual normais. Nas células cancerígenas a desregulação desses sinais ocorre pela ativação de fatores de crescimento que se ligam aos receptores de superfície celular, os quais tipicamente apresentam domínios intracelulares do tipo tirosina cinase. A progressão desses sinais por vias ramificadas regula a progressão do ciclo celular, bem como o crescimento da célula. Além disso, esses sinais podem influenciar outras propriedades biológicas das células, como a sobrevivência celular e o metabolismo energético (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A capacidade de sustentar a sinalização proliferativa nas células cancerígenas pode ocorrer por meio de uma série de formas alternativas. Elas podem produzir por si mesmas ligantes para fator de crescimento, os quais podem responder através da expressão de receptores cognatos, resultando em estimulação proliferativa autócrina. De outro modo, as células cancerígenas podem enviar sinais para estimular as células normais do estroma associado ao tumor, as quais respondem fornecendo vários fatores de crescimento às células cancerígenas. A sinalização do receptor também pode ser desregulada elevando os níveis de proteínas receptoras presentes na superfície da célula cancerígena, tornando-as hiper-responsivas a quantidades limitantes dos ligantes de um fator de crescimento.

Adicionalmente, o mesmo resultado poderá ocorrer através de alterações estruturais nas moléculas receptoras que facilitam o disparo independente de ligante (CHENG et al., 2008).

Em organismos pluricelulares a homeostase celular consiste na manutenção de um equilíbrio entre a perda, a reposição e a reparação de células. Esse processo complexo e intrincado depende de um eficiente controle do ciclo celular cujos dois principais eventos são a intérfase e a mitose. Durante a intérfase a célula realiza a maioria de suas funções metabólicas, incluindo preparação para a divisão da célula. Assim, a interfase serve como ponto de verificação para assegurar que a célula se encontra pronta para entrar em mitose. Em geral as células permanecem a maior parte do tempo em intérfase e essa etapa possui três fases distintas, ou seja, as fases G1, S e G2 (BAYNES; DOMINICZAK, 2015).

Já a mitose consiste em um tipo de divisão celular que ocorre continuamente em células altamente proliferativas como em células embrionárias e em células tumorais. Em condições normais a mitose permite a reposição e cicatrização de tecidos lesionados, além de promover o crescimento corporal durante o desenvolvimento de embriões, de crianças e de jovens. No caso de tumores, a perda dos mecanismos de controle da divisão celular leva a um desequilíbrio no processo mitótico, uma vez que a morte celular fica reduzida e, ao mesmo tempo, poderá ocorrer uma proliferação excessiva de células tumorais (ALBERTS et al., 2017).

Após a mitose, as células-filhas que entram na fase G1 podem percorrer o ciclo completo novamente. Durante esta fase celular ocorre estimulação e crescimento. Por outro lado, a célula pode estacionar temporariamente em uma fase quiescente (fase G0). A fase G0 pode durar dias, semanas ou até anos (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013).

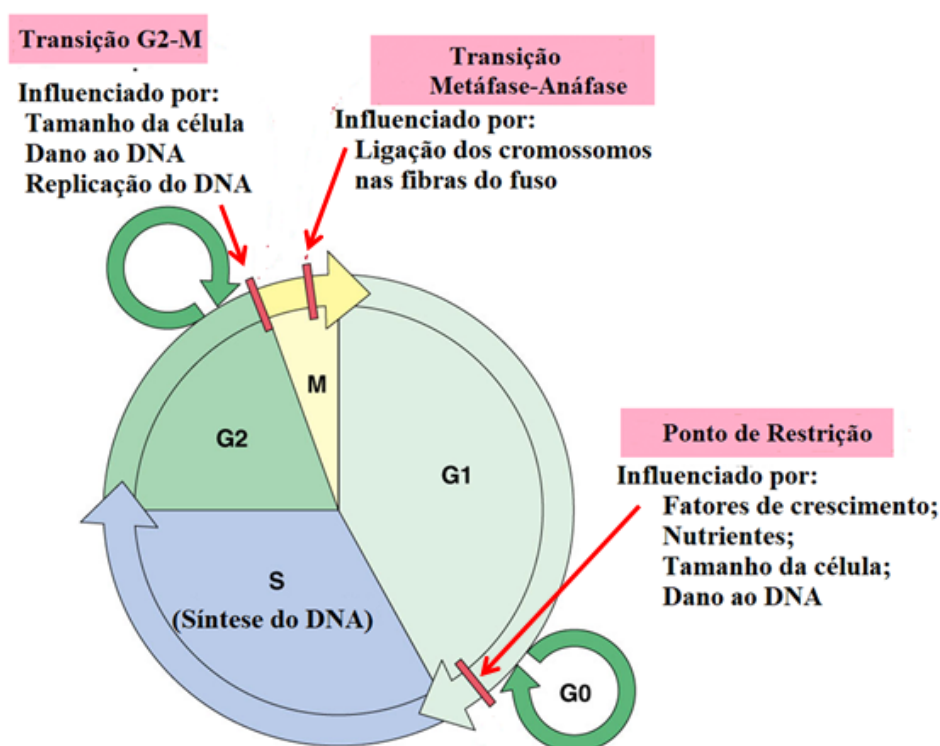
No entanto, durante a fase G1 enquanto a sinalização para o crescimento e divisão celular persistirem, estes devem promover o crescimento celular. Nesta fase mais organelas celulares são produzidas além de haver um aumento na síntese de proteínas. Passado esse ponto a célula entrará na fase S onde ocorre a replicação de DNA. Esta etapa deve ser completada o mais rápido possível, já que os resíduos de nucleotídeos e de desoxirribose bem como os grupamentos fosfato da estrutura do DNA apresentam maior vulnerabilidade a danos durante esta fase em que se encontra desenovelado, ou seja, quando as fitas de DNA se encontram separadas (WEINBERG, 2008).

Embora o genoma humano seja formado por cerca de 3,2 bilhões de pares de bases, a fiel duplicação dos cromossomos em algumas células consome um período muito curto de tempo (entre 8 a 12 horas) e com taxas de mutação normalmente muito baixas a cada ciclo de

divisão celular (TAKEDA; DUTTA, 2005). Assim, para minimizar a ocorrência dessas falhas mutacionais, as células dispõem de mecanismos de proteção e reparo capazes de salvaguardar o DNA contra erros de duplicação e/ou segregação, além de evitar que sejam transferidos para células-filhas. Tal proteção pode ser assegurada através da existência de pontos de controle ou *check points*. Estes abrangem todas as fases o ciclo celular, não permitindo que o mesmo prossiga caso algum erro tenha sido detectado (BARNUM; O'CONNELL, 2014).

São três os pontos de controle ao longo do ciclo celular (Figura 7). O primeiro deles acontece no final da fase G1 e determina se a célula entrará na seguinte (fase S). Em animais, o ponto de verificação em G1 ou ponto de restrição (ponto R), se encontra amplamente controlado por fatores de crescimento. O ponto seguinte de verificação em G2 determina se a célula entrará na fase M e para isso requer a conclusão adequada da síntese de DNA. O terceiro ponto de checagem do ciclo celular ocorre entre a metáfase e a anáfase. Neste ponto ocorre a avaliação da fixação adequada de todos os cromossomos no fuso mitótico que vai garantir a separação equitativa do DNA entre as células-filhas e, conseqüentemente, a estabilidade genética (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

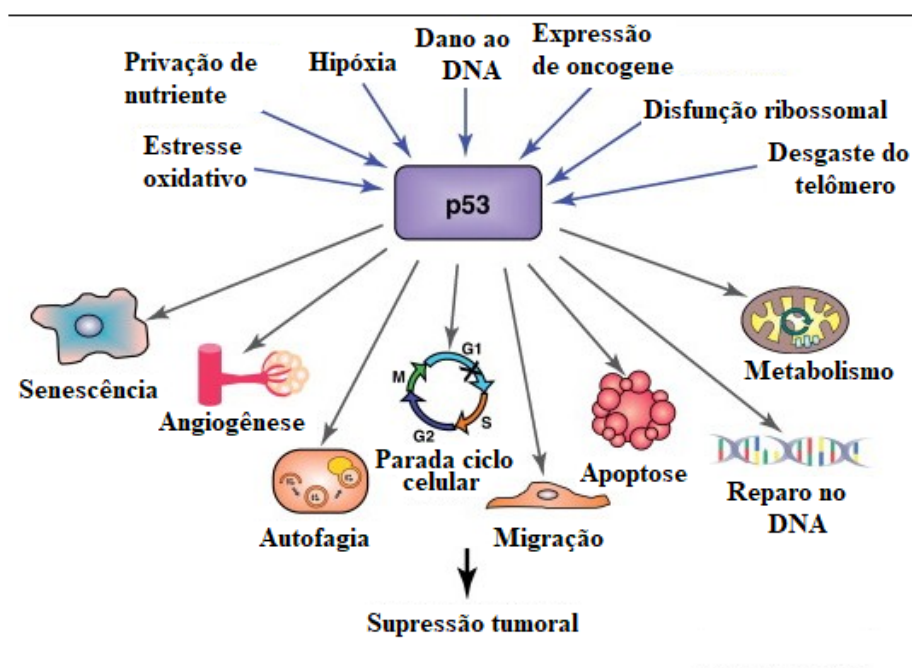
Figura 7- Pontos de restrição no ciclo celular.



Fonte: Adaptado de Hardin e Bertoni (2015)

Inúmeros estudos relacionaram a ocorrência de mutações com a ativação da fosfoproteína denominada p53 (Figura 8). Esta proteína nuclear com 53 kDa possui estrutura tetramérica onde existe um domínio de ligação ao DNA. Neste domínio, quando o resíduo de serina 392 (S³⁹²) for fosforilado ocorre a ativação da função de ligação da p53 ao DNA (MACLAINE; HUPP, 2009). Assim, ao se ligar a determinadas sequências do DNA a p53 pode atuar verificando a integridade do mesmo e, desta forma, no caso de danos serem detectados poderá determinar a parada do ciclo celular durante esta checagem (ALBERTS et al., 2017).

Figura 8- Uma gama de sinais de estresse que pode ativar o p53 e conseqüentemente regular positiva ou negativamente muitos processos celulares que podem contribuir para a supressão do tumor.



Fonte: Adaptado de Bieging e Attardi (2012)

A parada do ciclo celular mediada por p53 permite às células repararem o DNA danificado. Quando o reparo do DNA está completo, as células retornam no ciclo celular normal. Em contraste, quando as células têm sérios danos no DNA, a p53 exerce sua função pró-apoptótica para eliminar as células com elevados danos a este ácido nucleico e, assim, impedir a transferência de DNA danificado para células-filhas. Portanto, p53 tem função de atuar na manutenção da integridade genômica (OZAKI; NAKAGAWARA, 2011).

Contudo, estudos tem mostrado que a ação da p53 não constitui um mecanismo isolado, mas depende do envolvimento de outras proteínas para seu bom funcionamento. Por exemplo, a HIPK2 (*Homeodomain-interacting protein kinase 2*) é uma serina/treonina cinase nuclear que atua como co-repressora para fatores de transcrição (RINALDO et al., 2007). A HIPK2 contribui para a ativação apoptótica da p53 induzindo a fosforilação de serina 46 (Ser⁴⁶) e também a acetilação da lisina 382 (Lys³⁸²) (PUCA et al., 2009). A HIPK2 inibe o crescimento tumoral através de múltiplos mecanismos que incluem a promoção de apoptose, inibição da angiogênese, invasão tumoral e metástase pela regulação de vários genes e moléculas sinalizadoras como p53, JNK, Wnt e VEGF (FENG et al., 2017). Por outro lado, uma linha de evidências aponta que o fator induzido por hipóxia HIF-1 α pode prejudicar a atividade da p53 por meio da inibição da HIPK2 (NARDINOCCHI; PUCA; D'ORAZI, 2011).

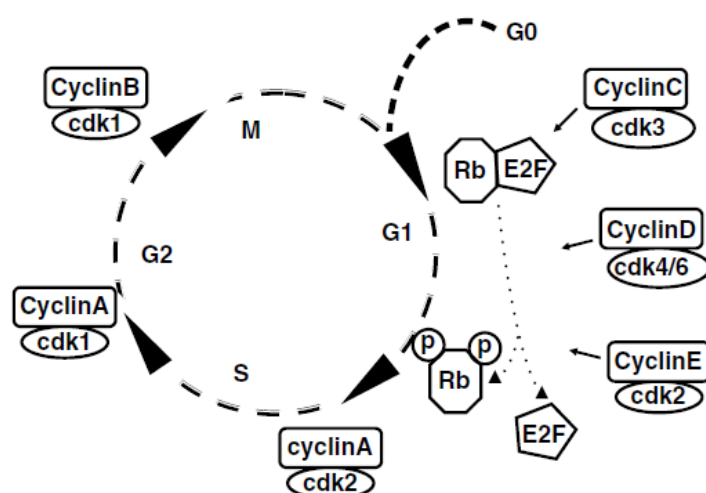
Além disto, a proteína supressora tumoral p53 atua em outro importante ponto de controle do ciclo celular na passagem G1/S. Quando funcionalmente ativa a p53 faz a transativação de genes alvo que podem induzir a parada do ciclo celular e/ou apoptose, ações essas dependentes da extensão e do tipo de danos no DNA (LACROIX; TOILLON; LECLERCQ, 2006). Nesse caso, p53 estimula a transcrição de p21, o qual atua inibindo a atividade de cinases dependentes de ciclinas (CDKs – *Cyclin Dependent Kinases*) e promovendo o bloqueio do ciclo celular em G1 (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

Danos no DNA podem ser o resultado de um processo replicativo inadequado, o que também pode acontecer na ausência de lesão externa. Diferentes são os tipos de dano que o DNA pode sofrer como quebra de fita simples, quebra de fita dupla, ligações cruzadas entre proteína-DNA e outras modificações em bases (KOBAYASHI et al., 2008). Portanto, distintos marcadores de dano podem ser avaliados nessas situações. Um exemplo destes é fosforilação que ocorre na Serina 139 (Ser¹³⁹) da histona H2AX nas proximidades onde aconteceram as quebras de fita dupla. Nesse caso, ao ser fosforilada esta histona passa a ser conhecida como γ H2AX (HUANG et al., 2006).

Em relação ao controle da progressão do ciclo celular, duas classes de proteínas desempenham funções imprescindíveis, pois as cinases dependentes de ciclinas e as ciclinas atuam de maneira regulatória (Figura 9). Os complexos formados por pares específicos de CDK-ciclina orquestram o avanço em diferentes fases do ciclo de crescimento (GIACINTI; GIORDANO, 2006). Ademais, os complexos CDK-ciclina estão especificamente envolvidos na fosforilação de um conjunto distinto de proteínas alvo.

Na figura 9 pode-se verificar a sequência de eventos sincronizados iniciados quando as células estão na fase G1 até a mitose nos quais entram em cena determinados complexos CDK-ciclina responsáveis pela continuidade do processo. De fato, vários fatores de crescimento demonstraram estimular os níveis de ciclina D incluindo o fator de crescimento epitelial, fator de crescimento insulínico I e II e vários hormônios (HOLNTHONER, et al. 2002). Uma vez ativada, a ciclina D liga-se a CDKs 4 e 6 e desencadeiam a fosforilação de Rb levando a subsequente liberação de fatores de transcrição E2F. A ativação de fatores E2F é um evento essencial para promover a progressão da fase G1 para a fase S, devido à sua capacidade de transcrever uma bateria de genes, incluindo ciclina E. A Ativação de CDK2-ciclina E, no final do período da fase G1, mantém o estado hiperfosforilado de Rb, anulando sua repressão transcricional. Funções adicionais de CDK2-ciclina E envolvem a duplicação do centrosomo e biossíntese de histonas as quais irão contribuir para a progressão do ciclo celular para a fase S (GEISEN; MOROY, 2002). A subsequente expressão da ciclina A e da ciclina B determinam a transição de S para G2 e, em seguida, de G2 para fase M, respectivamente. Inibidores de CDKs (CDKIs) sequestram CDKs e bloqueiam sua atividade cinase. Os inibidores p15, p16 e p17 agem especificamente na atividade cinase da ciclina D, enquanto p21, p27 e p57 atuam em todos os outros complexos CDK-ciclina (GIACINTI; GIORDANO, 2006).

Figura 9- Maquinário de Rb e ciclo celular.



Representação das formas não fosforilada (Rb) e fosforilada (Rb-p) da proteína retinoblastoma (Rb). Em G0 e no início do G1, a Rb se associa fisicamente com o fator de transcrição E2F e bloqueia seu domínio de

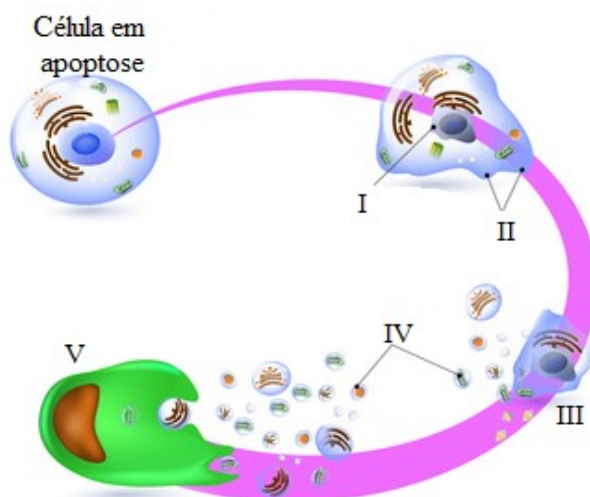
transativação. No final de G1, Rb-p libera E2F, permitindo a expressão de genes que codificam produtos necessários para a progressão da fase S. **Fonte:** Giacinti e Giordano (2006)

Estudos demonstraram que menores níveis de CDK2 determinaram a parada do ciclo na fase G1 seguida de morte celular por apoptose (GOGVADZE; ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010). No caso de células tumorais quando houve o aumento da ativação do complexo CDK2-Ciclina A, foi observada a progressão do ciclo celular que culminou em mitose e crescimento tumoral (BERTHET; KALDIS, 2007).

1.4.2 Morte celular e câncer

A apoptose foi o primeiro tipo de morte celular programada a ser descrito. Ela atua como uma força oposta à mitose e à proliferação sendo essencial para a morfogênese embrionária e para o controle diário da homeostase tecidual em todo organismo multicelular adulto (STRASSER; O'CONNOR; DIXIT, 2000). Estudos intensivos das últimas décadas forneceram uma compreensão das mudanças morfológicas durante a apoptose tais como, alterações que incluem formação de bolhas (*blebbings*) na membrana, encolhimento celular, fragmentação nuclear, condensação da cromatina e fragmentação do DNA cromossômico (Figura 10). Além disso, ocorrem alterações que afetam a membrana, o núcleo, o citoplasma e as mitocôndrias (BURGESS, 2013).

Figura 10- Eventos característicos da célula em apoptose.



(I) Condensação do núcleo; (II) Formação das “bolhas” na membrana; (III) Divisão do citoplasma e fragmentos do núcleo dentro de corpos apoptóticos; (IV) Corpos apoptóticos; (V) Fagocitose. **Fonte:** Extraído de <https://www.tebu-bio.com/blog/tag/apoptosis/>.

Adicionalmente, durante a apoptose as células continuam a encolher, como se fossem pequenas embalagens facilitando remoção das mesmas por macrófagos. Essas células fagocíticas são responsáveis por remover as células apoptóticas dos tecidos de uma forma limpa e ajustada de modo que evita muitos dos problemas associados com morte celular necrótica. A fim de promover sua fagocitose por macrófagos, as células apoptóticas frequentemente sofrem mudanças na membrana plasmática que disparam a resposta do macrófago. Entre estas mudanças está a translocação de fosfatidilserina posicionada no interior para a superfície externa da membrana plasmática (HASSAN et al., 2014).

Pesquisas robustas nas últimas décadas demonstraram que a apoptose serve como uma barreira natural ao desenvolvimento do câncer. Estas investigações realizadas aumentaram a compreensão do circuito de sinalização que governa o programa apoptótico. Além de fornecerem evidências suficientes para demonstrar como este tipo de morte celular programada pode ser desencadeada em resposta a vários estressores fisiológicos que desafiam as células cancerígenas. Estas ameaças à sobrevivência tumoral ocorrem durante o curso da tumorigênese e podem decorrer de terapias anticâncer. No entanto, outras pesquisas revelaram como a apoptose pode ser atenuada naqueles tumores que conseguem progredir para estados de malignidade de alto grau relacionados com a resistência à quimioterapia (ADAMS; CORY, 2007).

As vias extrínseca e intrínseca representam os dois principais processos apoptóticos melhor estudados. A via extrínseca pode ser mediada por um subgrupo de receptores do fator de necrose tumoral (TNFR - *Tumor Necrosis Factor Receptor*) uma superfamília que inclui TNFR, Fas (*apoptosis antigen 1*) e TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*). A ativação destes chamados receptores de morte pode levar ao recrutamento e ativação de caspases iniciadoras, como as caspases 8 e 10. Este processo envolve a formação e ativação de complexos como a sinalização do complexo indutor de morte (DISC - *Death-Inducing Signaling Complex*). Isso conduz à ativação de uma caspase efetora, tipicamente a caspase 3. Uma vez ativada a caspase 3, por sua vez, será responsável pela clivagem de alguns dos chamados substratos da via de sinalização de morte celular (DUPREZ et al., 2009).

Outro mecanismo que envolve caspases e que resulta na morte celular por apoptose é a clivagem da PARP-1 (poli (ADP-ribose) polimerase-1) pela caspase 3. A PARP-1 é uma proteína nuclear que participa em diversas funções fisiológicas e patológicas envolvidas na sobrevivência da célula em situações associadas com várias formas de morte celular

(CHAITANYA, STEVEN, BABU, 2010). Inicialmente, esta proteína foi identificada como uma enzima que desempenha funções centrais no reparo do DNA danificado. Assim, a PARP-1 pode participar no processo de reparação de excisão de base, reparo de base de fita simples e contribuir para a reparo de base de fita dupla (AUDEBERT, SALLES, CALSOU, 2004).

A PARP-1 torna-se ativada após a detecção de dano ao DNA e após a sua ligação em áreas onde houver dano de fita. Esta ligação ao DNA ocorre através da região denominada como domínio de ligação “dedo de zinco” presente na PARP-1. Após a ligação ao DNA alterado, a PARP-1 aumenta sua atividade catalítica e usa NAD^+ para criar polímeros de poli (ADPribose) (PAR) e os transfere para proteínas aceptoras incluindo a própria PARP (PLUMMER, 2011).

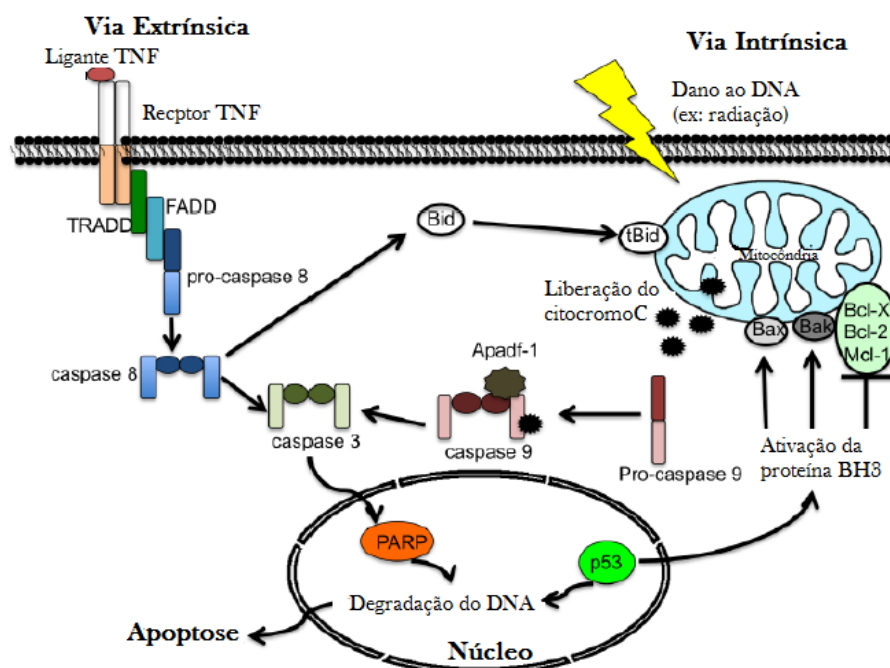
Quando a extensão do dano ao DNA for pequena ocorre a reparação com a sobrevivência das células e os níveis celulares de NAD^+ são restaurados através da reciclagem de nicotinamida com consumo de duas moléculas de ATP. Contudo, quando a extensão do dano for maior e o sistema de reparo não for eficiente em reparar a lesão pode haver uma ativação desproporcional de PARP-1 (BARITAUD et al., 2010). Essa superativação de PARP-1 pode induzir uma drástica redução dos níveis intracelulares de NAD^+ e ATP, resultando em disfunção celular e pode levar a morte da célula por necrose ou apoptose (SODHI; SINGH; JAGGI, 2010).

Várias proteínas com relevante importância para o processo de apoptose já foram descritas, como aquelas da família Bcl-2 (Bid, Bax, Bcl-2 e Bcl-xL) e da família das caspases (caspase-3, caspase-8, caspase-9). Na categoria pró-apoptótica, a proteína Bid é um membro da família Bcl-2 que pode ser clivada por caspase-8 e caspase-2 após a sinalização do receptor de morte, que resulta em sua ativação e translocação mitocondrial (GUO et al., 2002). O processamento da Bid resulta em sua translocação para as mitocôndrias, onde causa a liberação de citocromo c através da oligomerização da Bax e da Bak, membros da família pró-apoptótica Bcl-2 (KORSMEYER et al., 2000).

A via celular intrínseca se encontra amplamente regulada pelas mitocôndrias (Figura 11). A forma de indução de apoptose mais amplamente estudada na via intrínseca pode ser iniciada através do estresse mediado pela liberação de citocromo c da mitocôndria. Esta liberação resulta na formação do apoptossomo. O apoptossomo pode então ativar uma caspase iniciadora, tipicamente a caspase 9, que leva à ativação do executor de caspase 3, uma resposta comum verificada na via extrínseca (NIKOLETOPOULOU et al., 2013).

Além do mencionado acima, a ativação da via mitocondrial também pode ocorrer após a ativação da via extrínseca. Foi demonstrado que isso ocorre por intermédio da caspase 8 por clivagem da Bid em sua forma ativada tBid. Este exemplo relativamente simples de conversa cruzada entre vias apoptóticas e, aparentemente distintas, serve para ilustrar as inter-relações complexas que são comumente observadas nos diferentes processos envolvidos na regulação da morte celular (BRUNELLE; LETAI, 2009).

Figura 11- Vias extrínseca e intrínseca de apoptose.



Fator de ativação das proteases pró-apoptóticas 1 (Apaf-1); Proteína destruidora do antagonista homólogo de Bcl-2 (Bak); Bax Proteína X associada a Bcl-2 (Bax); Linfoma de células B 2 (Bcl-2); Linfoma de células B extra grande (Bcl-XL); Domínio com homologia Bcl-2 (BH3); Agonista de morte de domínio de interação BH3 (Bid); Fator de necrose tumoral (TNF), Domínio associado à morte – Fas (FADD); Leucemia de células mielóides 1 (Mcl-1); Receptor do fator de necrose tumoral-associado ao domínio de morte (TRADD); Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP). **Fonte:** Extraído de Yuan; Filippova e Duerksen-Hughes (2012).

Além da apoptose, a autofagia é um mecanismo associado com a regulação de morte celular envolvido na eliminação de células neoplásicas. Durante a autofagia, o material citoplasmático e organelas são sequestrados dentro de vesículas de dupla membrana, chamados de autofagossomos, que a seguir são levados aos lisossomos para serem degradados e reciclados. A autofagia se dá em decorrência de situações que expõem as células ao estresse, que pode ocorrer por hipóxia, radiação, ação de produtos químicos ou privação nutricional. Muitos agentes utilizados no tratamento do câncer, tais como o trióxido de arsênio,

tamoxifeno e rapamicina, são indutores de autofagia. A ativação desse mecanismo de morte celular depende de fatores referentes à célula e a duração dos sinais de estresse. Alguns autores consideram que a autofagia produz uma forma de morte celular chamada de morte celular autofágica ou morte celular programada tipo II (HWANG ; BAEK, 2010). Alterações na maquinaria autofágica podem levar a diversas condições patológicas, tais como neurodegeneração, envelhecimento e câncer (CHOI; RYTER; LEVINE., 2013)

Outra forma de morte celular muito comum é a necrose. Este termo está associado tradicionalmente a morte celular acidental. A necrose ocorre em resposta a insultos nocivos como danos físicos, hipóxia, hipertermia, privação de nutriente e lesão química. Entre aquelas primeiras mudanças morfológicas decorrentes da necrose destacam-se o inchaço do citoplasma e de organelas. Essas mudanças são a expressão da perda de permeabilidade seletiva da membrana citoplasmática. Estes eventos resultam em dissolução das organelas, vazamento do conteúdo da célula para o espaço extracelular e, finalmente o desaparecimento da membrana plasmática. A necrose afeta áreas de tecido ou grupos de células adjacentes e desencadeia uma reação inflamatória nos tecidos viáveis próximos em resposta aos detritos celulares (HAANEN; VERMES, 1995).

Embora chamada de morte celular acidental, recentemente, estudos indicam que algumas formas de necrose envolvem ativamente vias de sinalização definidas que contribuem para a morte celular, como no caso de apoptose, considerando esta morte celular uma forma “regulada” (VANLANGENAKKER et al., 2012). A morte celular necrótica não é o resultado de uma cascata de sinalização bem descrita, mas é a consequência de extensa interferência entre vários eventos bioquímicos e moleculares em diferentes níveis celulares. Dados recentes indicam que a serina / treonina quinase RIP1, que contém um domínio de morte, pode atuar como um iniciador central (GALLUZZI et al., 2017). Adicionalmente, estudos têm mostrado que a necrose programada pode ser estimulada pelos mesmos ligantes de morte que ativam a apoptose tais como o fator de necrose tumoral (TNF), ligante-Fas (FasL) e TRAIL (TNF-relacionada com ligante de indução de apoptose) (VANLANGENAKKER et al., 2012).

Células que morrem por via necrótica iniciam cascatas de sinalização pró-inflamatórias ao liberar ativamente citocinas inflamatórias após o extravasamento de seu conteúdo. A necrose ocorre em processos fisiológicos e fisiopatológicos e é capaz de matar células tumorais que desenvolveram estratégias para evitar a apoptose. Assim, o

conhecimento detalhado da necrose pode ser explorado em estratégias terapêuticas (GALLUZZI et al., 2017).

1.5 QUIMIOTERAPIA NO CÂNCER

Os procedimentos terapêuticos para pacientes com câncer ainda permanecem em grande parte empíricos e variam entre os centros de pesquisa. A escolha do tratamento depende de uma variedade de fatores individuais, onde podem ser incluídas as características patológicas e moleculares específicas do câncer, sua localização, extensão da doença e o estado de saúde do paciente. O objetivo final da quimioterapia consiste em destruir todas as células cancerígenas e, ao mesmo tempo, infligir danos mínimos no tecido normal. Isso pode ser alcançado de várias maneiras, seja diretamente ou indiretamente, privando as células cancerígenas dos sinais necessários para a proliferação celular ou estimulando a resposta do sistema imunológico (LUQMANI, 2005).

O primeiro registro de um composto com ação quimioterápica foi relatado para um tipo de mostarda nitrogenada contra um linfoma. Este agente serviu de modelo para uma longa série de agentes mais eficazes (agentes alquilantes) que levariam mais rapidamente a morte das células cancerígenas devido aos danos causados em seu DNA. Não muito tempo depois da descoberta da mostarda nitrogenada, Sidney Farber em 1948 demonstrou que a aminopterina produziu remissões em crianças com leucemia aguda. Em 1956 o metotrexato foi usado pela primeira vez como tratamento de um câncer metastático raro chamado de coriocarcinoma. Nos anos seguintes o uso dos quimioterápicos se intensificou alcançando significativo sucesso no tratamento de muitas pessoas com câncer (DEVITA; CHU, 2008).

Outro exemplo que pode ser mencionado se refere ao uso da cisplatina nos anos 70 para tratar câncer testicular, de ovário e de pulmão de células não pequenas. Em 1978 a cisplatina foi aprovada pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*) após ter sido atenuada a nefrotoxicidade do fármaco (FENNELL et al., 2016). Ela tem sido empregada para o tratamento de vários cânceres humanos, incluindo câncer de bexiga, cabeça e pescoço, pulmão, ovário e testicular. A cisplatina é ativada assim que entra na célula. No citoplasma, os átomos de cloreto da cisplatina são deslocados por moléculas de água. Este produto hidrolisado é um eletrófilo potente que pode reagir com qualquer nucleófilo, incluindo os grupos sulfidrila nas proteínas e átomos doadores de nitrogênio nos ácidos nucleicos. A cisplatina se liga ao centro reativo N7 nos resíduos de purina e, como tal, pode causar danos

ao DNA em células tumorais, bloqueando a divisão celular e resultando em apoptose (DASARI; TCHOUNWOU, 2014).

Na linha dos compostos naturais de plantas com potencial antineoplásico tem destaque o paclitaxel (denominado posteriormente como Taxol®) encontrado no extrato da casca do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*). O isolamento e a identificação do composto foram realizados pelos Drs. Wall e Wani e publicados em 1971. Ainda assim, foram necessários alguns anos para despertar o interesse para o mecanismo de ação do paclitaxel como antitumoral por parte da pesquisa farmacológica do câncer, ou mesmo para as empresas farmacêuticas. O laboratório do Dr. Horwitz investigou e verificou que o paclitaxel não só possuía potentes propriedades citotóxicas capazes de inibir o crescimento de células cancerígenas do colo do útero humano (HeLa) em concentrações nanomolares, mas também causava parada das células na fase M do ciclo celular, sem interrupção da fase de síntese. Nas décadas seguintes, investigações do paclitaxel como agente anticâncer ainda continuaram sendo conduzidas (WANI; HORWITZ, 2014).

1.5.1 Ação dos fármacos quimioterápicos

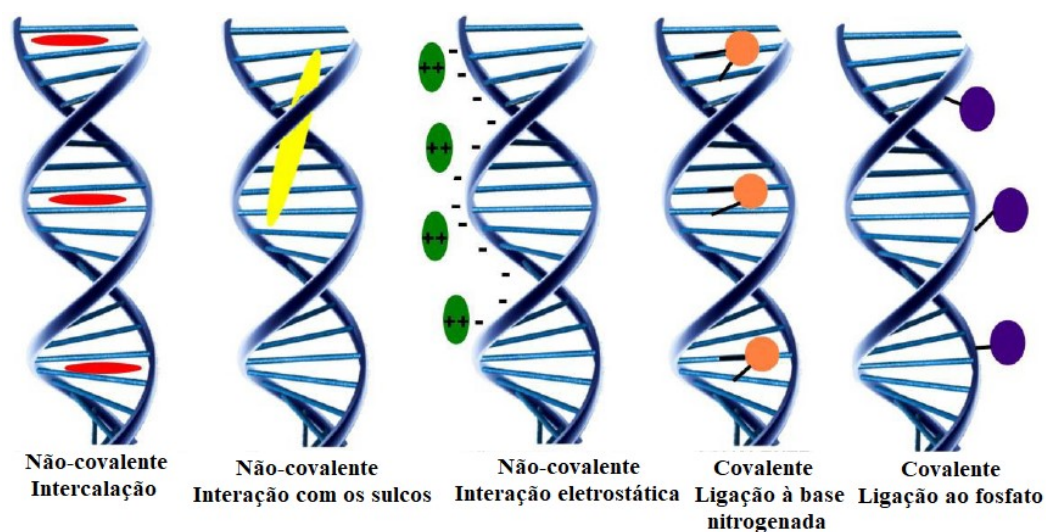
Considerando-se o câncer como consequência da divisão celular descontrolada, grandes esforços têm sido dedicados ao desenvolvimento de fármacos que atuem inibindo a mitose, interrompendo assim a divisão de células malignas transformadas. Com base em seu mecanismo de ação, os fármacos antitumorais, que visam o ciclo celular, em geral, podem ser divididos em três formas básicas de agir, ou seja, os fármacos que podem bloquear a síntese de DNA; causar danos ao DNA e interromper os processos mitóticos (JIANG, et al. 2006).

A replicação do DNA, a transcrição e a síntese de proteínas são os principais passos no crescimento e divisão celular. Sendo o DNA o portador da informação genética, bem como desempenhando papel central para tumorigênese e patogênese, ele se torna um alvo importante para o desenvolvimento de medicamentos. Há sempre um desafio para o fármaco alcançar a máxima afinidade de ligação específica com o DNA. Além disso, espera-se que quimioterápico não afete negativamente a atividade das células normais (CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013).

Nas últimas três décadas, grandes avanços e esforços tem sido direcionados para as interações ligante-DNA. O estudo das interações ligante-DNA é importante para uma compreensão completa dos processos de replicação e transcrição. Tais processos são alvos atraentes para projetos de medicamentos anticâncer e antibióticos. Uma grande parcela destes

quimioterápicos usados atualmente são ligantes ou derivados de ligantes que interagem com o DNA (ERDEM; OZSOZ, 2002). Devido a complexa estrutura do DNA os compostos podem interagir com o ácido nucléico por diferentes formas (Figura 12). Pode haver ligação covalente direta do complexo ao DNA por suas bases nitrogenadas ou pelo grupo fosfato; ou de forma não-covalente através de interações eletrostáticas, interações hidrofóbicas no sulco menor do DNA, ou através da intercalação (BOER; CANALS; COLL, 2009).

Figura 12- Representações esquemática das diferentes formas de interação com a molécula de DNA.



Fonte: Barra e Netto, 2015

De fato, os agentes antineoplásicos mais eficazes têm como alvo o DNA e são conhecidos por produzir uma taxa de sobrevivência significativa em pacientes com câncer. Ademais, quando usados em combinação com outros fármacos que apresentem diferentes mecanismos de ação, são obtidos resultados mais ainda promissores. Além do DNA, o RNA, algumas enzimas e outras proteínas constituem importantes alvos terapêuticos estudados durante o desenvolvimento de novos agentes anticâncer (PAUL; BHATTACHARYA, 2012).

Os agentes alquilantes, como a cisplatina, são capazes de interagir quimicamente com o DNA e não são ativos somente no processo de divisão celular. Quando se ligam a molécula de DNA alteram sua estrutura e interferem em sua função de modo que ela não possa ser replicada e/ou transcrita, levando conseqüentemente à interrupção da divisão celular (RABIK; DOLAN, 2007). Como esses agentes danificam o DNA, eles podem afetar as células da medula óssea que produzem novas células sanguíneas o que, não em casos raros, pode levar à leucemia. O risco de leucemia por agentes alquilantes apresenta efeitos dose-dependentes.

Portanto, menores riscos decorrem do tratamento com doses menores. Porém, estes riscos aumentam à medida que a concentração usada do medicamento for mais elevada (ACS, 2016a).

Outra classe de quimioterápicos são os agentes antimetabólicos. Eles interferem na síntese de DNA e RNA, substituindo os blocos normais de construção e, portanto, são restritos à fase S do ciclo celular. Eles são comumente usados para tratar leucemias, câncer de mama, ovário e trato intestinal, bem como outros tipos de câncer. Como exemplos de antimetabólicos utilizados clinicamente no tratamento do câncer, pode-se citar o metotrexato, um análogo do ácido fólico e o 5-Fluorouracil um antagonista das pirimidinas (ALMEIDA, et al., 2005).

Os antibióticos antitumorais não são como os antibióticos convencionais usados para tratar infecções. Eles agem modificando o DNA nuclear das células cancerígenas evitando que elas cresçam e se multipliquem. Como exemplo desta classe de quimioterápicos as antraciclinas são antibióticos antitumorais que interferem nas enzimas envolvidas na cópia do DNA durante o ciclo celular (ACS, 2016a). Destaca-se também nesse grupo a doxorubicina que atua intercalando-se ao DNA e esse processo causa a inibição da atividade da topoisomerase II. Tal inibição pode levar à parada no processo de replicação além de causar disfunção mitocondrial reduzindo a atividade dos complexos I e IV e, conseqüentemente, aumentando o estresse oxidativo (TACAR; SRIAMORNSAK; DASS, 2013).

As topoisomerasas são enzimas responsáveis por diminuir a tensão gerada pelas supertorções que ocorrem durante a duplicação do DNA. Essas enzimas possuem grande importância fisiológica, sendo necessárias durante os processos de replicação, transcrição, recombinação e remodelação da cromatina (CHAMPOUX, 2001). Devido a sua notável relevância os inibidores da topoisomerase tem sido usado para tratar certas leucemias, bem como câncer de pulmão, ovário, gastrointestinal, entre outros. Os inibidores de topoisomerasas são agrupados de acordo com o tipo de enzima que afetam. Os inibidores da topoisomerase I incluem topotecano e irinotecano. Entre os inibidores da topoisomerase II destacam-se etoposídeo, teniposide e mitoxantrona e a doxorubicina. Porém, os inibidores da topoisomerase II podem aumentar o risco de leucemia mielogênica aguda entre dois a três anos após a administração do medicamento (ACS, 2016a).

Os inibidores mitóticos representam outra categoria de quimioterápicos. Esses agentes apresentam mecanismo de ação capaz de impedir que a divisão celular ocorra de forma correta e a célula divida-se em duas células filhas. Estes podem agir em todas as fases do

ciclo, ao impedir a ação de enzimas que são necessárias na divisão celular. Como exemplos deste tipo de inibidores mitóticos podem ser mencionados os alcalóides vincristina e vimblastina, derivados da planta vinca (*Catharanthus roseus*). Estes se ligam aos microtúbulos impedindo a formação do fuso mitótico. Já os inibidores mitóticos constituídos por alcalóides derivados de taxanos, paclitaxel e docetaxel se ligam à subunidade da tubulina, resultando na formação de feixes de microtúbulos estáveis e não funcionais impedindo a finalização da mitose (BRANDÃO et al., 2010).

Atualmente, existem mais de cinquenta medicamentos quimioterápicos aprovados para uso clínico que se encontram disponíveis no mercado para o tratamento do câncer. No entanto, esses medicamentos possuem efeitos colaterais que dependem do tipo de fármaco usado e da duração do tratamento. Esses efeitos podem variar entre moderados como náuseas, vômito, perda de apetite e queda de cabelo, até aqueles mais graves decorrente da toxicidade dos fármacos para órgãos como rins, coração, pulmão e sistema nervoso podendo eventualmente causar o óbito do paciente (NURGALI; JAGOE; ABALO, 2018).

Assim, grandes esforços têm sido realizados por parte de pesquisadores na identificação de alvos terapêuticos alternativos. Estes estudos esperavam avaliar novos compostos e seus derivados de forma a tornar possível a descoberta e desenvolvimento de novos compostos anticâncer mais seletivos de maneira a reduzir os efeitos indesejáveis (RAEZ; LILENBAUM, 2004).

1.5.2 Terapia alvo no combate ao câncer

A quimioterapia convencional geralmente atua em qualquer célula que se divida rapidamente. Embora isso possa ter efeitos desejados nas células tumorais, estes fármacos podem apresentar um amplo espectro de ação contra células tumorais e contra células normais. Por esta razão, podem causar efeitos colaterais indesejáveis no sistema gastrointestinal, medula óssea, tegumento e outros sistemas.

Por outro lado, a terapia-alvo ideal fornece uma abordagem mais direcionada, onde se espera que quimioterápico atue de forma seletiva sobre as células tumorais principalmente no microambiente tumoral. Portanto, nesta abordagem os alvos moleculares são bem estabelecidos ao invés de uma abordagem mais ampla, de tal maneira a poupar os tecidos normais e minimizar os efeitos adversos (WESTIN; SOOD; COLEMAN, 2018).

Nas últimas duas décadas, a descoberta de oncogenes e genes supressores de tumores e a conclusão do sequenciamento do genoma humano promoveram alguns avanços importantes na elucidação dos mecanismos moleculares que levam ao câncer. Posteriormente, essas informações biológicas e genéticas emergentes levaram rapidamente à introdução de um grande número de novas terapias direcionadas contra o câncer (YAN; ROSEN; ARTEAGA, 2011). Assim, considerando esta abordagem o tamoxifeno foi o primeiro fármaco usado na terapia-alvo para o câncer na década de 1970. Este fármaco se liga ao receptor de estrogênio (ER), impede que o estrogênio se ligue ao ER e, desse modo, interfere na capacidade de o estrogênio estimular o crescimento de células cancerígenas, fornecendo assim uma opção de tratamento para pacientes com câncer de mama ER-positivo (YANG et al., 2013).

Os alvos moleculares são tipicamente membros das vias envolvidas na tumorigênese, como aquelas que sustentam o crescimento, a proliferação, a metástase e a angiogênese (WESTIN; SOOD; COLEMAN, 2018). Por exemplo, quando a área tumoral excede alguns milímetros de diâmetro, a hipóxia e a demanda de nutrientes irão acionar um estímulo angiogênico que vai permitir a progressão tumoral (HICKLIN; ELLIS, 2005). Desde que o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular) foi descoberto como um regulador crítico de crescimento dos vasos sanguíneos na década de 1980, este fator tem sido apontado como um provável alvo importante para controlar a neovascularização do tumor. Um exemplo utilizado na clínica se refere ao Bevacizumabe, este anticorpo monoclonal anti-VEGF-A humanizado foi aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA) dos EUA (CRAWFORD; FERRARA, 2009). Efeitos aditivos ou sinérgicos do Bevacizumabe com as convencionais quimioterapias ou radioterapias têm sido avaliados em uma variedade de modelos tumorais em distintas linhas de terapias. Na aplicação de protocolos em pacientes com câncer gástrico, ao efetuar-se a combinação de Bevacizumab com quimioterapia foi observada uma melhora significativa na sobrevida livre de progressão tumoral e resposta global (OHTSU et al., 2005).

Os sucessos e falhas de bloqueio de VEGF são consideradas altamente dependentes do tipo de tumor e, além disso, estudos mostraram que a exposição crônica de células tumorais aos inibidores de VEGF pode ser compensada por outras vias que aumentaram a expressão de diferentes fatores, aumento da migração e invasão de células tumorais, e potencial metastático *in vivo* (FAN et al., 2011). Embora as terapias anti-VEGF sejam geralmente bem toleradas, existem relatos de toxicidades graves. Complicações tromboembólicas venosas assim como hipertensão estavam entre os efeitos adversos mais frequentes (WIDAKOWICH et al., 2007).

Por outro lado, o ciclo celular é outra via que vem sendo estudada na terapia anticâncer. Neste caso a atividade de cinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6) pode ser alvo de agentes específicos uma vez que estão relacionadas com a fosforilação da proteína retinoblastoma (Rb). A Rb é um regulador do ponto de verificação G1/S da intérfase. Quando Rb não está fosforilado, se liga e reprime o fator de transcrição E2F, mas quando está fosforilado por CDK4 e CDK6, é liberado e a replicação do DNA é ativada (BAKER; REDDY, 2012). Ensaios clínicos estão em andamento com inibidores da CDK4/6 como palbociclibe, ribociclibe e abemaciclib (FINN; ALESHIN; SLAMON, 2016).

Outro alvo terapêutico em avaliação através de estudos de seus inibidores se refere ao fator indutor de hipóxia (HIF-1 α). Trata-se de um fator que ativa a transcrição de genes necessários para contornar ambientes hipóxicos característicos de tumores sólidos. A subunidade HIF-1 α foi avaliada como um alvo promissor para novas terapêuticas contra o câncer. De fato, investigações clínicas têm demonstrado que níveis aumentados de HIF-1 α estão relacionados com progressão agressiva do câncer e mau prognóstico para o paciente. Ademais, recentes descobertas relativas aos níveis celulares e moleculares apontam perspectivas do uso de inibidores da via de HIF-1 α para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento antineoplásico (AKANJI; ROTIMI; ADEYEM, 2019).

A digoxina, em particular, foi identificada como um inibidor potente do HIF-1 α . Esta inibe a tradução de HIF-1 α usando mecanismo independente de mTOR e também exibe a atividade antitumoral (MASOUD; LI, 2015). O PX-478 é outro inibidor de HIF-1 α avaliado em ensaios clínicos de fase I em pacientes com câncer metastático avançado. Ele mostrou atividade antitumoral em modelos de xenoenxerto tumoral, que se correlacionam com a expressão de HIF-1 α (BAN; UTO; NAKAMURA, 2011).

De igual modo, ensaios clínicos com inibidores das polimerases poli (ADP-ribose) (PARPs) vem sendo conduzidos em recentes abordagens no combate ao câncer. O papel das proteínas PARP no reparo do DNA é de particular interesse, tendo em vista o fato de que certos tumores podem depender do reparo do DNA mediado pela PARP para sua sobrevivência além de serem sensíveis à inibição desta enzima (MORALES et al., 2014). Além de desempenhar um papel importante no reparo do DNA, PARP-1 está envolvida em outros processos biológicos, como remodelação da cromatina, regulação da transcrição, resposta à hipóxia, angiogênese, transição epitelial-mesenquimal e metástase do câncer. Muitos desses processos estão relacionados à tumorigênese e progressão tumoral, podem informar e esclarecer os mecanismos de ação dos inibidores de PARP (RODRIGUEZ et al.,

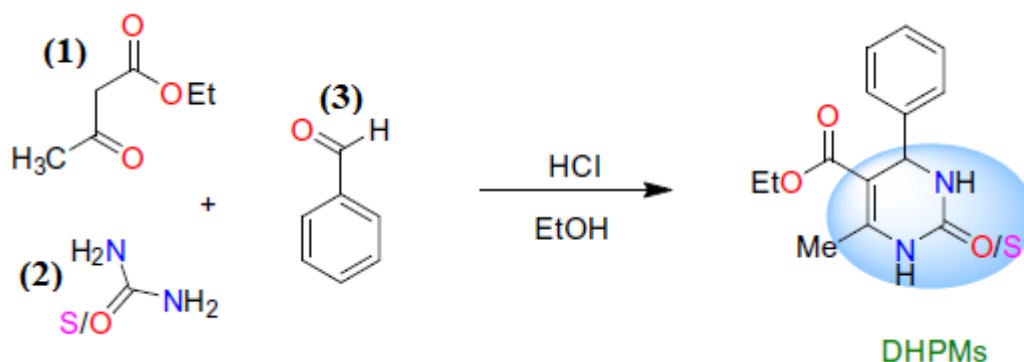
2015). Dentre os inibidores da PARP Olaparibe, Niraparibe e Rucaparibe passaram por ensaios clínicos recentes e foram aprovados pelo governo norte-americano através da FDA e pela Agência Europeia de Medicamentos para tratamento de câncer de ovário (FRANZESE et al., 2019).

Os exemplos citados acima são uma pálida amostra de como as pesquisas envolvendo a descoberta e a aplicação da terapia alvo tem avançado nos últimos anos. A dificuldade de uma aplicação mais generalizada de quimioterápicos reside no fato de que as diferentes neoplasias possuem distintas alterações genéticas que ajudam no crescimento e/ou na metástase tumoral. Mesmo entre pacientes com o mesmo tipo de câncer, as células cancerígenas podem apresentar diferentes alterações genéticas as quais são responsáveis pelas respostas diferenciadas frente ao mesmo tratamento (ACS, 2016b).

1.5.3 Atividade antitumoral das diidropirimidinonas

A síntese das diidropirimidinonas (DHPMs) foi primeiramente descrita por Pietro Biginelli, um químico italiano, que em 1893 realizou a síntese desta classe de compostos através de uma reação multicomponente entre um aldeído aromático, um composto dicarbonílico e uréia (Figura 13). As DHPMs vêm ganhando cada vez mais importância devido às suas propriedades biológicas e farmacológicas com inúmeras atividades descritas tais como atividades antiviral, antibacteriana, antitumoral, analgésica, cardiovascular, anti-inflamatória, inibidor de agregação de plaquetas sanguíneas além de atividade anti-hipertensiva, entre outras (KAUR et al., 2017).

Figura 13- Síntese das DHPMs por Pietro Biginelli



Condensação tricomponente que envolve um composto 1,3-dicarbonilado (1), uma ureia (2) e um aldeído (3),
Fonte: Adaptado de KAPPE (2000).

Além das muitas propriedades biológicas desses compostos, as DHPMs têm sua importância puramente química, pelo fato de que a sua síntese multicomponente leva a obtenção de moléculas complexas e com ampla variedade estrutural quando os três componentes principais da reação apresentam variações na composição básica (KAPPE, 2000).

Mayer e colaboradores (1999) sintetizaram a primeira pequena molécula permeável à célula contendo o núcleo DHPM, o monastrol. Esta molécula apresenta função inibitória sobre a proteína cinesina Eg5 (Figura 14) e foi isolada em uma busca baseada no fenótipo para descobrir compostos capazes de bloquear a mitose. Em seu mecanismo de ação o monastrol causa um aprisionamento das células em mitose. Assim, as células passam a apresentar fuso monoastral (em forma de estrela). Este fuso compreende um arranjo radial dos microtúbulos circundados por um anel de cromossomos.

Figura 14 - Estrutura da cinesina Eg5.



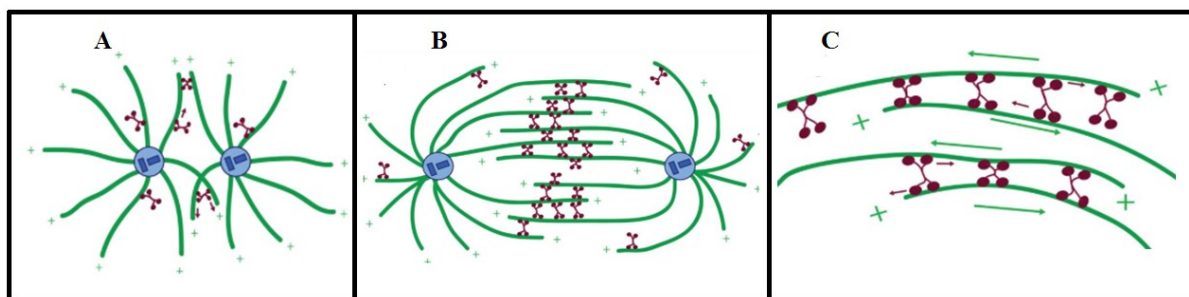
Estrutura da Eg5 humana fosforilada visualizada com o programa UCSF Chimera (*Protein Data Bank* PDB código 1II6), onde o ligante adenosina-5'- difosfato (ADP) se encontra destacado em verde (TURNER et al., 2001).

A atividade da Eg5, que ocorre durante a formação do fuso bipolar, se torna essencial para a correta separação das cromátides irmãs (Figura 15). Estudos demonstraram que a Eg5 pode estar altamente expressa em determinados tipos de tumor. Por outro lado, quando houver

a inibição desta proteína pode ocorrer uma significativa parada no ciclo celular e, conseqüentemente, a supressão da proliferação celular (HAYASHI et al., 2008).

A inibição desta proteína previne a separação dos centríolos, resultando na formação de um fuso monoastral e na ativação do ponto de checagem do fuso mitótico, causando parada da divisão celular em metáfase devido à manutenção da atividade de CDK2/ciclina B (WEIL et al., 2002). A ativação do *checkpoint* da mitose então, leva a ocorrência de uma mitose prolongada e a subsequente morte das células por apoptose em certas linhagens tumorais (MAYER et al., 1999).

Figura 15 – Atividade da cinesina Eg5 no fuso mitótico.



A proteína Eg5 (vermelha) auxilia na organização dos microtúbulos (verde) para formar o fuso mitótico. (A) No início da mitose, os centríolos duplicados (azul) se separam e sofrem nucleação formando dois microtúbulos astrais. A Eg5 transloca-se então para as extremidades positivas dos microtúbulos e promove a bipolaridade. (B) Na metáfase, forma-se um fuso bipolar estável. A Eg5 motora provavelmente provê integridade estrutural e também pode permitir o deslizamento de microtúbulos em direção aos centríolos, contribuindo para o estabelecimento do fluxo em direção aos polos. (C) Imagem ilustrativa evidenciando o deslocamento da cinesina Eg5 em direção às extremidades positivas dos microtúbulos antiparalelos. **Fonte:** Valentine, Fordyce e Block (2006).

Desde a descoberta dessas evidências pesquisadores começaram a observar a Eg5 como um interessante alvo terapêutico. Hayashi e colaboradores (2008) demonstraram em seu trabalho que oligonucleotídeos antisense contra Eg5 foram responsáveis pela redução do crescimento de tumores em modelos xenografts. Em células onde a Eg5 é altamente expressa, como na crise blástica da leucemia mieloide crônica e em células do câncer de próstata, o uso de oligonucleotídeos antisense contra Eg5 levou a inibição desta proteína causando uma significativa parada no ciclo celular e uma supressão da proliferação celular (CARTER et al., 2006).

Além da Eg5, mais recentemente Duan e colaboradores (2015) propuseram pela primeira vez que a proteína centrina seja um outro alvo de ação do monastrol. As centrininas são proteínas pequenas (20 kDa) ligadas ao cálcio e que pertencem à superfamília “*EF-hand*”.

A centrina desde então foi considerada como uma proteína onipresente associada com centríolos, centrossomos e fuso do polo mitótico em células de diversas linhagens evolutivas, incluindo algas, plantas superiores, invertebrados, e células de mamíferos (PAOLETTI et al., 1996).

Dentre os inibidores da cinesina um composto que apresentou maior avanços em termos de ensaios clínicos foi o Ispinesibe (GlaxoSmithKline & Cytokinetics). Este ainda está sendo avaliado em vários estudos de fase clínica I e de fase II. Embora seja muito cedo para tirar conclusões sobre a atividade clínica já está ficando claro que a toxicidade desse agente não é muito diferente daquela de muitos quimioterápicos existentes resultando em neutropenia e leucopenia decorrentes de mielossupressão (EL-KHOUEIRY et al., 2006). Talvez esses efeitos sejam comuns aos demais inibidores da cinesina, decorrente da baixa seletividade que implica na inibição da cinesina em células normais (EL-KHOUEIRY et al., 2006).

Desde a descoberta do monastrol pesquisadores têm concentrado esforços na síntese de novos compostos derivados desta molécula protótipo. Tais pesquisas visam encontrar resultados mais promissores no que diz respeito à atividade tumoral dos mesmos. Guido e colaboradores (2015) sintetizaram e avaliaram trinta e sete derivados das DHPMs. Estes autores selecionaram entre os resultados com duas linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) cinco compostos os quais apresentaram melhor atividade citotóxica. Dentre estes compostos, dois inibiram a atividade da cinesina Eg5 de forma mais pronunciada, sendo mais eficazes que o monastrol, utilizado como controle positivo dos experimentos realizados.

Em um estudo realizado por Abnous e colegas (2013) avaliaram-se o efeito citotóxico e a inibição da Eg5 através de ensaios empregando seis novos análogos do monastrol sobre a linhagem celular de carcinoma de cérvix humano (Hela). Os resultados indicaram que um dos análogos foi mais tóxico que o dimetilenasteron usado como controle. Além disso quatro análogos mostraram forte inibição da proteína Eg5, superando novamente o resultado obtido com o Dimetilenasteron. No entanto nenhum dos análogos superou a inibição da proteína promovida pelo taxol usado como fármaco referência.

Outra pesquisa avaliou vinte e seis compostos derivados das DHPMs. Após a realização dos ensaios os autores concluíram que quatro compostos foram eficientes na captura de radicais livres como o ânion superóxido. Dentre os dezesseis que apresentaram atividade antiproliferativa, dois foram mais eficientes que o monastrol e outros dois mais

potentes que a doxorubicina (quimioterápico de referência na clínica médica) contra linhagens celulares de câncer de próstata e de ovário (SILVA et al., 2012).

Treptow e colegas (2015) descreveram pela primeira vez a síntese de 3,4-diidropirimidinonas combinadas com ácidos graxos usando a reação multicomponente de Biginelli. A atividade antiproliferativa desses compostos foi testada em duas linhagens celulares de glioma humano (U-138- MG) e glioblastoma de rato (C6). Os resultados sugeriram que as moléculas derivadas dos ácidos palmítico e oleico, mostraram melhor efeito no modelo de estudo comparativamente ao quimioterápico padrão (Temozolomida) e demonstraram grande faixa de segurança para células da cultura organotípica (*ex vivo*) de hipocampo de ratos. Os autores apontaram o aumento da lipofilicidade dos compostos híbridos DHPM-ácidos graxos como uma abordagem promissora na busca da superação da resistência induzida pela quimioterapia.

Seguindo esta mesma linha, um estudo mais recente de Oliveira e colaboradores (2018) comparou a atividade antitumoral *in vitro* de uma série de novos análogos do monastrol combinados com ácidos graxos de cadeia longa contra células de glioblastoma de rato (C6). As atividades antitumorais *in vitro* foram investigadas em termos da viabilidade celular e de proliferação celular. Notavelmente, todos os análogos testados foram ativos contra células de glioblastoma em ratos. Entretanto, uma atividade superior foi observada nos análogos DHPM-ácidos graxos derivados do ácido palmítico e do ácido esteárico. Estes compostos híbridos foram as moléculas mais eficientes em termos de citotoxicidade, uma vez que a concentração dos compostos para inibir 50% das células foi aproximadamente treze vezes menor que a do monastrol.

Os relatos de estudos citados acima representam alguns dos muitos exemplos de grupos de pesquisas envolvidos em atividades rotineiras e contínuas de busca por novos derivados de DHPMs capazes de modular vias de sinalização conhecidas ou revelar novos alvos moleculares.

Portanto, a síntese de híbridos e fármacos multifuncionais tem ganhado recentemente muita atenção e se baseia no emprego combinando de partes de dois farmacóforos que passam a integrar uma única molécula. Como principal objetivo dessas sínteses buscou-se criar uma nova entidade química capaz de modular processos biológicos, por meio de uma atividade completamente nova ou de múltiplas atividades combinadas (MUREGI; ISHIIH, 2010).

1.5.4 Atividade antitumoral de compostos organoselênio

O selênio (Se) é um micronutriente essencial com funções fisiológicas importantes como na manutenção do equilíbrio redox, na desintoxicação e na citoproteção. Essas atividades essenciais dependem da incorporação do selênio em selenoproteínas. Estas enzimas, por sua vez, disponibilizam o selênio para que este possa exercer seus papéis biológicos. Desta maneira, tais selenoproteínas atuam minimizando os efeitos de citotoxicidade não específica (PAPP et al., 2007). O selênio existe em várias formas químicas inorgânicas e orgânicas. As propriedades biológicas e os efeitos na saúde de cada uma das espécies químicas de selênio podem ser bem diferentes (FERNANDES; GANDIN, 2015).

A exposição humana ao selênio em suas várias formas químicas pode ocorrer através de alimentos, água e ar, sendo a dieta a principal fonte de exposição humana a este elemento. Os alimentos contêm principalmente espécies orgânicas de selênio. Enquanto que na água potável e no ar o selênio pode ser encontrado principalmente em suas formas inorgânicas (FAN; VINCETI, 2015).

Além disto, ainda em termos de importância bioquímica do selênio, deve ser destacada sua presença na formação de selenoproteínas onde este elemento tem a capacidade de reagir com oxigênio e com grupos tióis para promover uma série de processos homeostáticos fundamentais em células e tecidos. Como exemplo, podem ser mencionadas as oxidorreduções que apresentam um resíduo de selenocisteína. Em mamíferos são reconhecidas como selenoproteínas cinco membros da glutathione peroxidase (GPx), todas as três tioredoxinas redutases (TrxR), todas as três deiodinases (DIO) e uma das metioninas sulfóxido redutases (Msr) (GLADYSHEV, 2012).

As mais de vinte selenoproteínas identificadas no genoma humano desempenham importantes funções bioquímicas que incluem a regulação do metabolismo do cálcio celular, do estresse do receptor de resposta a estrogênio, do metabolismo do iodo e dos hormônios da tireoide, do controle da homeostase da glicose e da secreção de insulina, dentre muitas outras (BRIGELIUS-FLOHÉ; FLOHÉ, 2017).

Alguns compostos de selênio foram denominados como “GPx-like” por apresentarem atividade antioxidante através da qual mimetizam a função da enzima glutathione peroxidase (GPx). Dentre os grupos de compostos com reconhecida atividade GPx-like destacam-se as selenilamidas cíclicas; os disselenetos de diarila e ainda os selenetos de arila ou alquila (BHABAK; MUGESH, 2010). Enquanto que àquelas pertencentes aos grupos das selenilamidas cíclicas e dos disselenetos de diarila foram atribuídas várias atividades

biológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral. Tais atividades foram atribuídas à sua capacidade de mimetizar a enzima GPx ou por outros mecanismos de ação (ORIAN; TOPPO, 2014; ALMEIDA et al., 2018).

Estudos têm revelado que compostos à base de selênio apresentam eficácia quimioterápica antitumoral e sinérgica quando combinados com fármaco antineoplásico padrão. Ghosh e colaboradores (2015) relataram que um composto de organoselênio baseado em naftalimida foi capaz de proteger eficazmente a toxicidade pulmonar induzida pelo quimioterápico padrão ciclofosfamida em um modelo de camundongo com tumor. Segundo os autores do estudo, o tratamento com o organoselênio resultou em atividades melhoradas das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e no pré-tratamento os resultados foram ainda melhores. Esses resultados revelaram que a inativação de espécies reativas de oxigênio mediada por essas enzimas antioxidantes foi estimulada pelo composto e como consequência, protegeu os pneumócitos do dano oxidativo.

Entre os compostos de selênio GPx-like sintéticos, o ebselen merece destaque devido as inúmeras propriedades biológicas já descritas para esse composto como atividade antioxidante; anti-inflamatória; antitrombótica; agente detoxificante, citoprotetivo e anti-aterosclerótico (AZAD; RAGHUVIR; TOMAR, 2014). O ebselen mostrou reduzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias nas células de glioma, além de impedir a resistência destas células à morte por apoptose induzida por TNF- α . Adicionalmente, o ebselen conseguiu bloquear o potencial invasivo das células de glioblastoma (TEWARI et al., 2009).

Vários mecanismos foram sugeridos para explicar os efeitos antitumorais observados após tratamento com compostos derivados de selênio. Dentre eles devem ser incluídas as defesas antioxidantes (selenoenzimas); morte celular programada; reparo ao DNA; reforço ao sistema imunológico; regulação da proliferação celular e da invasão tumoral. É bem possível que o selênio possa reduzir a tumorigênese não apenas através de um único mecanismo de ação, mas sim por meio de ações múltiplas (ZENG; COMBS, 2008).

Depois que estudos epidemiológicos relatados na China e nos EUA propuseram que a suplementação dietética com selênio teria reduzido a incidência de câncer de pulmão, esôfago e próstata iniciou-se uma busca intensa e bem-sucedida de novos compostos inorgânicos e orgânicos contendo selênio como agente protetor para os tecidos normais (potencial quimiopreventivo), ou como agente antiproliferativo e citotóxico contra o câncer (DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ et al., 2016).

Dentre as novas sínteses de compostos de selênio os selenoésteres têm recebido atenção especial por exibirem atividade antineoplásica. Estes agentes citotóxicos e antiproliferativos atuam como indutores de apoptose, como antioxidantes ou até mesmo como moduladores de cinases (DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ et al., 2014).

Levando em consideração que a resistência múltipla a fármacos representa a principal causa de falha na quimioterapia para o tratamento do câncer, Gajdacs e colaboradores (2017) avaliaram a ação de dez selenoésteres em linhagem celular de adenocarcinoma do cólon humano. Os resultados mostraram que três derivados foram mais potentes em inibir a bomba de efluxo ABCB1 do que o Verapamil, o fármaco de referência. Um dos análogos mostrou ser 4 vezes mais potente que o Verapamil, empregando uma concentração 10 vezes menor. Adicionalmente, os derivados avaliados exerceram uma atividade citotóxica eficiente e seletiva. Quatro derivados desencadearam eventos apoptóticos entre 64 e 72% das células da linhagem tumoral analisada.

Corroborando com esses achados, uma pesquisa mais recente conduzida por Spengler et al. (2019) analisou alguns organosselênios contra um subtipo multirresistente de células de linfoma-T de camundongo que superexpressam o transportador ABCB1. Entre os compostos mais promissores esses autores destacaram três selenoésteres contendo grupo cetona os quais apresentaram sinergismo com os fármacos topotecano, vincristina, doxorubicina e ciclofosfamida mesmo em concentrações bem baixas dos selenoésteres.

Em outro estudo, uma série de 31 novos selenoésteres foi sintetizada e sua atividade citotóxica foi avaliada contra uma linhagem celular de câncer de próstata (PC-3). Os compostos mais ativos também foram testados contra três linhagens tumorais (MCF-7, A-549 e HT-29) e uma linhagem não-tumoral de próstata (RWPE-1). Treze compostos demonstraram atividade significativa em relação a todas as células tumorais investigadas, e alguns deles foram ainda mais citotóxicos que os fármacos etoposide e cisplatina, usados como referência no estudo. Adicionalmente, a atividade moduladora do balanço redox dos compostos foi avaliada e quatro análogos foram selecionados como ponto de partida para a concepção de agentes antitumorais otimizados (DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ et al., 2014).

1.6 APLICAÇÃO DE *DOCKING* E DINÂMICA MOLECULAR NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS COMPOSTOS

A conclusão do projeto do genoma humano resultou em um número crescente de novos alvos terapêuticos para a descoberta de novos fármacos. Ao mesmo tempo, técnicas de purificação de proteínas de alta produtividade, cristalografia e espectroscopia de ressonância magnética nuclear foram desenvolvidas e contribuíram para aquisição de muitos detalhes estruturais de proteínas, de ácidos nucleicos e de complexos macromolécula-ligante. Esses avanços permitiram que, na atualidade, as estratégias computacionais permeiem todos os aspectos da descoberta de medicamentos. Entre os exemplos de simulações *in silico* destacam-se as técnicas de triagem virtual (JORGENSEN, 2004), a predição de posições de *docking* de ligante em uma determinada molécula (TROTT; OLSON, 2010) e a simulação de dinâmica molecular que permite calcular as trajetórias de deslocamento de um ligante em regiões de um receptor (ABRAHAM et al., 2015).

Comparada com os procedimentos tradicionais como a triagem experimental de alto rendimento, na triagem virtual existe uma abordagem para a descoberta de medicamentos mais direta e racional e tem a vantagem de ser uma triagem econômica e eficaz. Esta triagem pode ser dividida em métodos de simulação baseados na estrutura e no ligante (BAILEY; BROWN, 2001).

Para realização dessas simulações emprega-se a estrutura 3D de macromoléculas que pode ser adquirida em bases de dados como a *Protein Data Bank* (RCSB-PDB; <https://www.rcsb.org/>) e na UniProtKB (<https://www.uniprot.org/>). Enquanto que a estrutura de novos ligantes precisa ser construída a partir de programas apropriados como por exemplo o MarvinSketch (ChemAxon Ltd.).

Por outro lado, nos casos onde pouca ou nenhuma informação estrutural encontra-se disponível para os alvos, podem ser utilizados os métodos baseados em ligantes, tais como modelação de farmacóforo e métodos de estudo da relação estrutura-atividade quantitativa. Quanto ao desenho de fármacos baseado em estrutura, o *docking* ou ancoragem molecular representa o método mais comum que tem sido amplamente utilizado desde o início dos anos 80 (KUNTZ et al., 1982).

Na moderna descoberta de compostos, o estudo teórico preditivo das formas de encaixe (*docking*) envolvendo macromolécula-ligante desempenha um papel importante na previsão da orientação do ligante quando ele está ligado ao DNA, a um receptor de proteína ou à uma

proteína ou enzima alvo. Tais interações podem ser estudadas em termos de ligações de hidrogênio e das energias de ligação envolvidas. Estas interações podem ocorrer devido às interações eletrostáticas; às interações de van der Waals; às interações hidrofóbicas e principalmente devido às ligações de hidrogênio que desempenham papéis importantes na manutenção do complexo ligante-molécula alvo (TROTT; OLSON, 2010).

Em simulações computacionais ou ensaios *in silico*, um algoritmo emprega a soma de todas essas interações de maneira a predizer um escore ou pontuação para as posições do ligante nas cavidades de uma macromolécula (DNA ou proteínas), que representa a potencialidade de ligação (TROTT; OLSON, 2010).

Nas simulações computacionais de *docking* molecular mais simples pode-se empregar a macromolécula como um corpo rígido e estudar o ligante flexível dentro de um espaço rotacional ou translacional tridimensional no qual o ligante pode adotar diferentes posições e se encaixar no sítio de ligação. Estes ensaios computacionais podem representar o passo inicial no design de um composto líder (*lead compound*) durante o desenvolvimento de um novo fármaco (ALBERG; SCHREIBER, 1993).

Por outro lado, as simulações de dinâmica molecular são abordagens computacionais baseadas nas equações de movimento de Newton e princípios da mecânica estatística que relacionam os movimentos e as trajetórias ou distribuições de átomos e moléculas nas três dimensões do espaço. As equações de movimentos podem ser resolvidas numericamente para um sistema de interação entre átomos a fim de extrair numerosas propriedades químicas e biofísicas dos dados atômicos. A principal característica desta técnica *in silico* se refere à possibilidade de predizer algumas condições que podem ser observadas experimentalmente através de ensaios realizados *in vitro* e *in vivo* (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

Nas simulações da dinâmica molecular as estruturas são tratadas como uma coleção de átomos que pode ser descrita por forças newtonianas, ou seja, são tratadas como uma coleção de partículas mantidas unidas por forças harmônicas ou elásticas. Um conjunto completo dos potenciais de interação entre as partículas pode ser referido como “campo de força” (BROOKS; KARPLUS; PETTIT, 1988). O campo de força empírico, entendido como uma função de energia potencial, permite que a energia potencial total do sistema seja calculada a partir da estrutura tridimensional deste sistema. A energia potencial total do sistema representa a soma de vários termos de energia, incluindo os termos para átomos ligados (comprimentos e ângulos de ligação, ângulos diedros) e os termos para átomos não ligados (forças de van der Waals e eletrostáticas) (VAN GUNSTEREN; BERENDSEN, 1990).

Vários pesquisadores, envolvidos com a síntese de novos compostos, têm utilizado ensaios preliminares de *docking* e de dinâmica molecular de maneira a prever os resultados experimentais. Isto pode contribuir efetivamente para um melhor entendimento das interações químicas envolvidas nos mecanismos moleculares de ação relacionados aos efeitos observados. Ademais, ensaios *in silico* otimizam e podem economizar tempo e recursos concentrando a atenção na estrutura química dos compostos. Simulações computacionais podem fornecer previsões de interações moleculares mais significativas em termos de vias de sinalização bioquímicas contendo alvos de interesse.

Como exemplo deste tipo de aplicação de ensaios *in silico*, Kaur e colaboradores (2010) avaliaram a capacidade do monastrol em inibir a proteína pteridina redutase de leishmania. Os ensaios de *docking* molecular revelaram que o monastrol se encaixou adequadamente na cavidade do sítio ativo da enzima realizando interações com os resíduos desta região através de ligações de hidrogênio. Em seguida, os ensaios *in vitro* e *in vivo* confirmaram o efeito inibitório predito através de simulação computacional, os resultados indicaram uma redução da carga parasitária frente ao tratamento com o composto. Enquanto o ensaio bioquímico de cinética enzimática permitiu avaliar experimentalmente a redução da atividade catalítica desta oxidoreductase na presença do monastrol.

Não somente a interação entre ligante-proteína pode ser analisada e compreendida com uso do *docking*, mas também interações com pequenas sequências de DNA de dupla fita depositadas em bancos de dados. Em estudo investigando a atividade biológica de novos compostos derivados de sulfonil-hidrazidas, como no caso das pesquisas realizadas por Murtaza e colaboradores (2016). Estes autores relataram que os ensaios de ligação ao DNA, obtidos a partir das medidas de espectroscopia de absorção eletrônica e de viscosidade, não estavam totalmente alinhados com os resultados dos estudos de *docking*. Contudo, os autores demonstraram através do *docking* que houve ligação no sulco menor e intercalação entre as bases do DNA. Assim, os modos de ligação dos compostos preditos *in silico* foram parcialmente confirmados após análise experimental.

Assim, os relatos dessas pesquisas revelaram a amplitude e abrangência da aplicação das ferramentas computacionais na avaliação de novos compostos com atividades biológicas de interesse. Nesse sentido, os programas de *docking* molecular utilizados apresentam capacidade de prever o modo de interação entre os ligantes selecionados e a macromolécula-alvo, além de prever relações entre estrutura-atividade a partir das melhores conformações calculadas *in silico* (STEFFEN et al., 2010). Tais previsões podem ser complementadas com

as previsões obtidas através de simulações de dinâmica molecular onde podem ser calculadas as energias e trajetórias que caracterizam as interações entre os compostos ligantes e as macromoléculas de interesse (LEMKUL, 2019).

Com maior poder computacional decorrente de esforços continuados para o desenvolvimento mais eficaz dos códigos de simulação e de algoritmos mais rápidos, o futuro das abordagens *in silico* mostra-se promissor. Simulações de dinâmica molecular permitem o estudo do comportamento de um sistema ao longo de um determinado período de tempo. Ademais, a aplicação de algoritmos mais fidedignos e eficazes nos ensaios de dinâmica molecular pode desempenhar um papel cada vez mais importante para a compreensão das relações de estrutura-função de alvos farmacológicos e no desenvolvimento de novas terapias (NAIR; MINERS, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* e *in silico* o potencial antitumoral de novos selenoésteres derivados de diidropirimidinonas (DHPM-Se) investigando os possíveis mecanismos moleculares de ação.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Utilizando os novos compostos selenoésteres derivados de diidropirimidinonas (DHPM-Se) avaliar:

- ✓ A citotoxicidade dos DHPM-Se sobre linhagens celulares tumorais (HepG2, Hela, MCF-7) e a seletividade dos mesmos frente a linhagem celular não tumoral (McCoy);
- ✓ O potencial antiproliferativo *in vitro* de alguns DHPM-Se;
- ✓ A aplicação de ferramentas computacionais de *docking* e dinâmica molecular para predizer interações moleculares entre alguns DHPM-Se selecionados e o DNA;
- ✓ A capacidade de interação e de intercalação com o DNA de timo de vitelo (CT-DNA) de alguns DHPM-Se;
- ✓ A fragmentação do DNA *in vitro* por alguns DHPM-Se;
- ✓ A indução do tipo de morte celular (apoptose ou necrose) ocasionada por alguns DHPM-Se;
- ✓ O efeito sobre o ciclo celular de alguns DHPM-Se;
- ✓ A expressão de proteínas envolvidas com o dano ou o reparo do DNA, na parada do ciclo celular e na morte celular induzida em células expostas a alguns DHPM-Se.

3 JUSTIFICATIVA

Segundo os dados da Organização Mundial da Saúde para o Brasil em 2018, o número de pessoas que morreram de câncer foi de aproximadamente 244 mil e a estimativa de 560 mil novos casos. De acordo com os dados do INCA em 2018 o câncer de localização primária que mais levou homens a óbito foi o de traqueia, brônquios e pulmões. Embora o câncer de fígado não esteja entre os dez tipos de maior incidência em homens, em termos de mortalidade ele ocupa a 6ª posição. Ainda segundo o INCA (2020), o câncer de mama continua ocupando o 1º lugar em mortalidade entre as mulheres (17.572) e o câncer de fígado e vias biliares intra-hepáticas está em 8º lugar.

No tratamento do câncer, além da intervenção cirúrgica e radiação, a quimioterapia é uma maneira eficaz de promover cura a um grande número de pacientes. No entanto, tem sido reconhecido que a eficácia de fármacos antitumorais varia significativamente entre os diferentes pacientes. A fim de garantir um melhor tratamento se torna imprescindível compreender os mecanismos moleculares ligados à doença e, em especial, conhecer as respostas celulares aos fármacos usados no tratamento (CERVENAK et al., 2006).

A principal causa do fracasso da quimioterapia é a resistência das células tumorais em relação a compostos anticancerígenos. Essa importante forma de resistência, conhecida como resistência múltipla a fármacos, é causada pelo aumento expressão das proteínas transportadoras do grupo ABC (BREIER et al., 2013). Dessa forma, o tratamento convencional permanece insatisfatório para diminuir o ônus global gerado pelo câncer. A cada ano a síntese de novas moléculas tem sido realizada por pesquisadores de diferentes partes do mundo, a fim de que efeitos adversos sejam minimizados e que se encontrem fármacos mais eficientes do que aqueles usados atualmente.

O crescente conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na divisão da célula, no dano e reparo ao DNA, na manutenção ou perturbação dos microtúbulos, na indução de apoptose, entre outros, tem melhor elucidado a problemática do câncer aumentando consequentemente a chance de encontrar um tratamento mais assertivo para esta doença temível (KUSMINSKY et al., 2015).

Nesse cenário, a versatilidade das diidropirimidinonas já revelou compostos com atividade anti-inflamatória, antibacteriana, anti-hipertensiva, antioxidante e antitumoral (SANDHU, 2012). De igual modo, aos compostos do tipo organoselênio (selenilamidas cíclicas, os disselenetos de diarila, e selenetos de arila ou alquila) foram atribuídas várias

atividades biológicas, como atividade antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, além de funções relacionadas pela capacidade de mimetizar a enzima GPx ou por outros mecanismos de ação (ORIAN; TOPPO, 2014).

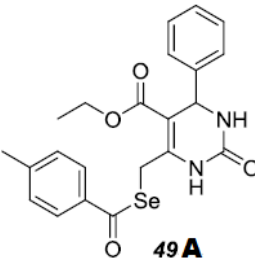
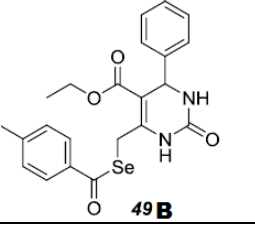
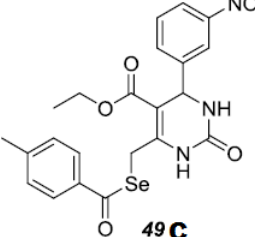
O grupo de pesquisa do Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio (UFSC – CFM) tem sintetizado compostos a partir das diidropirimidinonas, dentre esses compostos, produziram recentemente uma série de selenoésteres derivados de diidropirimidinonas. Alguns compostos desta série apresentaram resultados interessantes demonstrando propriedades biológicas que indicaram esses como compostos líderes com um potencial no tratamento da doença de Alzheimer. Com base nessas informações, o presente trabalho investigou, pela primeira vez, de forma comparativa a ação citotóxica e antiproliferativa desta série de novos compostos híbridos de organoselênio e diidropirimidinonas. Adicionalmente, através de estudos *in vitro*, ensaios moleculares e aplicação de *docking* e dinâmica molecular buscou-se elucidar alguns dos mecanismos de ação envolvidos para selecionar possíveis compostos líderes promissores para uso como antitumorais.

4 METODOLOGIA

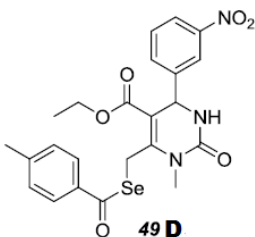
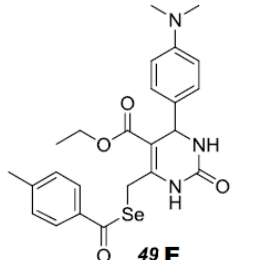
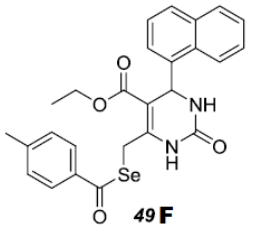
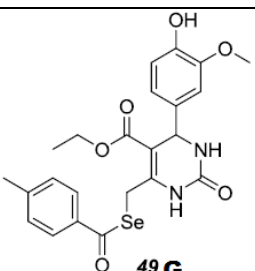
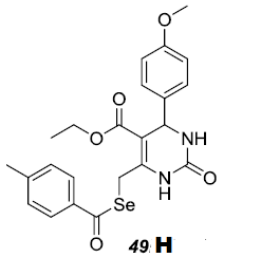
4.1 SÍNTESE DE DHPMS-Se

A síntese dos compostos híbridos DHPMs-Se (49A–H) foi realizada empregando-se a via de dois passos (*two-step pathway*) conforme descrito previamente por Barbosa et al. (2016). O primeiro intermediário (6-clorometil-DHPMs) foi obtido através da reação entre três componentes proposta por Biginelli (1893). Na sequência, após reações entre cada intermediário e o selenocarboxilato, formaram-se os compostos híbridos DHPMs-Se (49A–H) (Tabela 1).

Tabela 1- Estrutura química dos selenoésteres derivados de diidropirimidinonas.

COMPOSTO	NOME DO COMPOSTO
 <p>49 A</p>	Etil4-(fenil)-6-((4- metilselenobenzoato)metil) -2-oxo- 1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato
 <p>49 B</p>	Etil4-(fenil-4-metil)-6-((4- metilselenobenzoato)metil) -2-oxo- 1,2,3,4- tetraidropirimidina-5-carboxilato
 <p>49 C</p>	Etil4-(fenil-3-nitro)-6-((4- metilselenobenzoato)metil) -2-oxo- 1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato

Continuação

 <p>49 D</p>	Etil4-(fenil-3-nitro)-6-((4- metilselenobenzoato) metil)-1-metil -2-oxo-1, 2,3,4-tetraidropirimidina-5- carboxilato
 <p>49 E</p>	Etil4-(fenil-4-dimetilamino)-6-((4- metilselenobenzoato) metil)-2-oxo- 1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato
 <p>49 F</p>	Etil4-(1-naftil)-6-((4-metilselenobenzoato) metil)-2-oxo-1,2,3,4-tetraidropirimidina- 5-carboxilato
 <p>49 G</p>	Etil4-(fenil-3-metóxi-4-hidróxi)-6-((4- metilselenobenzoato) metil)-2-oxo- 1,2,3,4-tetraidropirimidina-5-carboxilato
 <p>49 H</p>	Etil4-(fenil-4-metóxi)-6-((4- metilselenobenzoato) metil)-2-oxo- 1,2,3,4- tetraidropirimidina-5-carboxilato

4.2. LINHAGENS CELULARES E CONDIÇÕES DE CULTURA

As seguintes linhagens tumorais, HeLa (carcinoma de cérvix humano), HepG2 (hepatocarcinoma humano) e MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano) e linhagem não tumoral McCoy B (fibroblastos de *Mus musculus*) foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro. Estas linhagens foram selecionadas em função da prevalência destes tipos de câncer na população (INCA, 2019).

As linhagens celulares foram mantidas no meio de cultivo DMEM. Adicionalmente, os meios foram suplementados com FBS (10%), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL). As placas foram depositadas em incubadora de CO₂ (5%) mantidas com temperatura (37°C) e com umidade constante (95%).

4.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

A citotoxicidade dos compostos híbridos DHPM-Se (49A-H) foi avaliada através do ensaio MTT usando diferentes linhagens de células tumorais e uma linhagem não tumoral. Inicialmente, a mesma quantidade de células (1×10^4 células / mL) foi transferida para placas de 96 poços. Após a confluência, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com os DHPM-Se preparado em diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100; ou 1000 µM). As células ficaram expostas em três diferentes tempos (24, 48 e 72 h). O controle negativo recebeu meio de cultura contendo uma quantidade equivalente de veículo (DMSO 1%). Os controles positivos foram realizados usando monastrol e 5-Fluorouracil nas mesmas concentrações das DHPM-Se. Depois de lavadas com solução salina tamponada de fosfato (PBS), todas as células receberam solução de MTT (100 µL; 0,5 mg / mL) e foram incubadas por 2 horas em um ambiente controlado.

Finalmente, os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO (PA) (100 µl) e, então, foram efetuadas leituras das amostras a 550 nm em leitora SpectraMax PARADIGMA® (MOSMANN, 1983). A concentração inibitória para 50% (CI₅₀) das células de cada composto foi determinada através do programa GraphPad Prisma 5.0 (San Diego, USA). Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração analisada empregando no mínimo três ensaios independentes. Nos demais ensaios usando as linhagens celulares foi utilizada uma concentração subtóxica (CI₃₀) dos compostos mais citotóxicos e mais seletivos. O índice de seletividade foi calculado dividindo o valor da CI₅₀ para a linhagem não tumoral pelo valor da CI₅₀ para a linhagem tumoral.

4.4 ENSAIO CLONOGÊNICO

O potencial efeito antiproliferativo das DHPM-Se foi realizado usando somente os compostos mais citotóxicos para a linhagem tumoral (HepG2 e MCF-7) e os mais seletivos para a linhagem não tumoral (McCoy). Neste caso, para a linhagem HepG2 os compostos analisados foram 49A, 49E e 49H. Já para a linhagem MCF-7 os compostos selecionados

foram o 49A e 49F. O potencial antiproliferativo foi avaliado pelo ensaio da formação de colônias de acordo Franken et al. (2006), com modificações. Resumidamente, as células (HepG2 e MCF-7) foram semeadas (500 células/poço; placas de 6 poços), incubadas por 24 h e após esse tempo, foram expostas por 72 horas a concentração da CI_{30} dos compostos selecionados para cada linhagem. Finalmente, as células foram lavadas com PBS para retirada dos compostos e meio de cultura foi adicionado. Durante dez dias (HepG2) e 15 dias (MCF-7) consecutivos, foi observada a recuperação das células e a formação das colônias, trocando periodicamente o meio de cultura. Ao final do tratamento, o meio foi removido e cada poço foi lavado usando PBS. Então, as células foram fixadas com uma solução de metanol (10 %), cada poço foi corado com cristal violeta (0,5%) e o excesso do corante removido com água destilada. As placas foram mantidas abertas para secarem à temperatura ambiente. Nos ensaios com a linhagem HepG2, foi adicionado em cada poço ácido acético (P.A.) (1,0 mL/poço) para solubilizar todo o cristal violeta impregnado em torno das colônias. Finalmente, foram realizadas as leituras da absorbância (590 nm) das amostras solubilizadas de cada tratamento que serviu indiretamente como a porcentagem de colônias formadas. A intensidade da coloração do controle foi considerada como apresentando 100 % de formação de colônias. Contudo, para o ensaio com a linhagem MCF-7 as placas foram fotografadas e usando o programa Image J (versão 1.46) foi feita a contagem manual das colônias. Para ambas as linhagens, os experimentos foram feitos em triplicata empregando três ensaios independentes.

4.5 TIPO DE MORTE CELULAR

O tipo de morte celular induzido pelo tratamento com os compostos mais seletivos foi quantificado por meio da incorporação dos agentes intercalantes iodeto de propídio (IP) e laranja acridina (LA) de acordo com McGahon et al. (1995), com pequenas modificações. As células (HepG2 e MCF-7) foram semeadas em placas de 6-poços (2×10^5 células/poço) até atingirem a confluência por 24h. Em seguida, o meio foi retirado e novo meio foi adicionado na presença dos compostos mais seletivos (49A, 49F e 49H) usando a CI_{30} (2,0 mL/poço) durante 72h de exposição. Após esse tempo as células foram tripsinizadas por 6 minutos, centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos) e ressuspensas em PBS. Alíquotas das amostras foram incubadas com iodeto de propídio (100 μ g/mL) e laranja de acridina (100 μ g/mL) (6 μ L; 1:1 v/v) e, em seguida, depositadas em uma lâmina de microscopia cobertas com lamínula

para a leitura no microscópio de fluorescência Olympus BX4®. As porcentagens de células viáveis, apoptóticas e necróticas foram determinadas usando as imagens digitais de 300 células/lâmina as quais foram processadas através do programa Image J (versão 1.46). O seguinte critério de identificação foi considerado após a sobreposição das imagens obtidas em microscopia: (a) células viáveis emitiram fluorescência verde; (b) células apoptóticas emitiram na região do amarelo ou laranja; e (c) células em necrose emitiram fluorescência na região do laranja escuro ou vermelho. Este ensaio foi realizado em triplicata empregando três experimentos independentes.

4.6 AVALIAÇÕES *IN SILICO* DAS INTERAÇÕES ENTRE B-DNA E OS LIGANTES

As simulações *in silico* podem ser empregadas na predição de interações moleculares entre macromolécula-alvo e ligantes. No presente trabalho, foram avaliadas interações entre DNA e os compostos híbridos DHPM-Se aqui considerados como pequenas moléculas ligantes. Os compostos 49A, 49F e 49H foram selecionados para as simulações por terem apresentado os melhores resultados *in vitro*. Nestas avaliações, inicialmente foi utilizado o programa MarvinSketch 17.15 (ChemAxon) para desenhar a estrutura 3D dos ligantes onde o selênio foi substituído pelo enxofre. Isto foi necessário em razão do GROMACS (*Groningen Machine for Chemical Simulations*) (ABRAHAM et al., 2015) não apresentar dados para átomos de selênio (GFELLER; MICHIELIN; ZOETE, 2013). Então, os arquivos contendo a conformação dos ligantes com menor energia em pH 7,4 (MarvinSketch; campo de força Dreiding) foram minimizados com o programa OPENBABEL usando Gasteiger para atribuir cargas parciais e o campo de força GAFF (*General Amber Force Field*) para estabelecer a geometria molecular apropriada.

Por outro lado, foi usado como *template* os dados cristalográficos de B-DNA (PDB ID 5T4W) previamente depositados no *Protein Data Bank* (PDB) por Sbirikova-Dimitrova e Shivachev (2017). O programa AutoDock Tools (FORLI et al., 2016) foi aplicado para remover moléculas de água e de ligantes co-precipitados no *template*. Finalmente, as simulações de ancoragem molecular foram realizadas com B-DNA isolado e os ligantes (49A, 49F e 49H) minimizados aplicando o algoritmo do AutoDock Vina, utilizando parâmetros *default* e considerando molécula do ligante como sendo flexível (TROTT; OLSON, 2010). Ao término das simulações, o programa LigPlot⁺ 2.1 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) foi

usado para visualizar as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas previstas entre a macromolécula e os ligantes.

Preliminarmente às simulações de dinâmica molecular (DM), foi empregado o programa ACPYPE (SOUSA DA SILVA; VRANKEN, 2012) usando AmberTools (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2012) para gerar os arquivos de entrada correspondentes aos parâmetros de topologia dos ligantes (ligações, ângulos e diedros conformacionais) dos ligantes compatíveis com o campo de força AMBER99bsc1 (HORNAK et al., 2006) usando GROMACS (ABRAHAM et al., 2015). Neste caso, utilizou-se a pose de cada um dos ligantes que apresentou a menor energia de ligação e o menor RMSD (*Root Mean Square Deviation*) calculados pelo AutoDock Vina, considerando o valor de *cutoff* de RMSD recomendado ($<2 \text{ \AA}$), garantindo a qualidade da simulação (TROTT; OLSON, 2010).

Portanto, o pacote GROMACS versão 2018.4 (van DER SPOEL et al., 2005) permitiu realizar a minimização da energia e as simulações de DM correspondente a 1.000 ps. O passo de frame/quadro adotado e o tempo de integração para simulação foram 2 ps e 2 fs, respectivamente. O complexo foi solvatado em um espaço de busca (grid) cúbico empregando o modelo TIP3P, para a água (JORGENSEN et al., 1983). A adição de contra-íons neutralizou o sistema. Assim, após a minimização da energia potencial, foram efetuadas corridas para estabelecer o equilíbrio sob condições constantes em termos do número de partículas, volume e pressão (NVP) e em termos de temperatura (NPT) ($T = 300 \text{ K}$; $P = 1 \text{ bar}$; 1000 ps). Em seguida, foi efetuada a execução da DM de posição que ocorreu sob as mesmas condições do NPT, de acordo com o protocolo estabelecido pelo Dr. Lemkul (LEMKUL, 2019), com poucas modificações.

O programa *Visual Molecular Dynamics* (VMD) (HUMPHREY; DALKE; SCHULTEN, 1996) para LINUXAMD64, versão 1.9.4a12 de 2017 foi utilizado para análise de dados de dinâmica molecular aplicando protocolo publicado por outro grupo (HSIN et al., 2008). Adicionalmente, as representações 2D obtidas com o LigPlot + 2.1 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011) mostraram frames/quadros contendo ligações hidrogênio e interações hidrofóbicas previstas entre resíduos de DNA e átomos dos ligantes. Enquanto que o programa UCSF Chimera foi empregado para a visualização dos átomos envolvidos no frame/quadro selecionado (PETTERSEN et al., 2004).

Além disto, o programa "readHBmap.py" (Python 2) mostrou frames/quadros que apresentaram ligações de hidrogênio durante o tempo de simulação realizado no GROMACS, e calculou a taxa de ocupação das ligações de hidrogênio (LEMKUL; ALLEN; BEVAN,

2010). Em seguida, foram visualizados os átomos envolvidos nas interações intermoleculares mais importantes aplicando o LigPlot⁺ 2.1 (LASKOWSKI; SWINDELLS, 2011).

Através do GROMACS foram efetuados os cálculos de todas as trajetórias empregando o algoritmo Verlet que foi aplicado à dinâmica molecular baseada na pesquisa de frames vizinhos (*neighbor search*), mantendo as condições de contorno periódicas no limite de até 1,2 nm (12 Å) (LEMKUL, 2019). O GROMACS também calculou os valores das energias relacionadas às interações ligadas e não ligadas (eletrostática e van der Waals) na formação do complexo B-DNA e os ligantes. Finalmente, os arquivos de trajetórias foram submetidos para que fossem realizados cálculos adicionais usando o método da área de superfície de Poisson-Boltzmann da Mecânica Molecular (*Molecular Mechanics Poisson-Boltzmann Surface Area* - MM-PBSA), aplicando o modelo de solvente explícito e parâmetros padrão (KUMARI; KUMAR, 2014).

4.7 INTERAÇÃO E INTERCALAÇÃO COM O CT-DNA

A interação entre os DHPM-Se e o CT-DNA (DNA de timo de vitelo) foi mensurada por espectrofotometria de varredura UV-Vis (230 nm a 800 nm) (espectrofotômetro HITACHI U-2910®) (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Utilizou-se a concentração fixa de 150 µM do CT-DNA, enquanto os compostos foram analisados em concentrações crescentes (50, 150 e 250 µM) em conjunto e separadamente ao CT-DNA. A solução estoque do CT-DNA foi feita com tampão TRIS-HCl 10 mM e EDTA 1 mM (pH 7,5). Depois, o CT-DNA foi diluído em 10% de tampão HEPES 10 mM (pH 7) e 74% de água ultrapura em uma cubeta de quartzo, procedendo-se a varredura para obtenção da curva padrão do CT-DNA (150 µM). Após, realizou-se a varredura do CT-DNA, diluído em 10% de tampão HEPES, água ultrapura e os compostos em concentrações crescentes. Por fim, efetuou-se a varredura da solução contendo os compostos em concentrações crescentes previamente diluídos em 10% de tampão HEPES, 16% de PBS e água ultrapura. Para a análise da interação ou da não interação dos compostos com o CT-DNA, os espectros das amostras contendo apenas os compostos foram subtraídos dos espectros do CT-DNA associado ao composto e comparados com os espectros obtidos do CT-DNA separadamente. Assim, foram determinadas as mudanças na absorbância das amostras, bem como o deslocamento do comprimento de onda de absorbância máxima (BALDINI et al., 2003). Estes ensaios foram realizados em triplicatas para três experimentos independentes.

O ensaio de intercalação foi realizado com compostos e CT-DNA tendo sido baseado na intercalação e no deslocamento do iodeto de propídeo (IP) que foram verificados através de medidas de fluorescência de acordo com o protocolo adaptado de Silveira e colaboradores (2008). Primeiramente, foi determinada a curva de saturação do CT-DNA com IP para conhecer a concentração para o ensaio. Nesse caso a concentração de CT-DNA que melhor ficou saturada com a solução de IP (300 μM) foi a de 150 μM preparada em um tampão fosfato (50 mM) contendo NaCl (0,1 M) (pH 7,4). A fluorescência foi medida em um leitor SpectraMaxParadigma®. Os comprimentos de onda de excitação e emissão foram de 492 nm e 620 nm, respectivamente. Para esse ensaio, foram combinados CT-DNA (150 μM) e IP (300 μM) com concentrações crescentes dos compostos (0-350 μM) preparado com tampão HEPES (10%) e PBS (16%) e solubilizado em água ultrapura. A solução do fármaco antitumoral doxorubicina (0-350 μM), foi usada como controle positivo por ser frequentemente empregado como padrão para intercalação. O conjunto CT-DNA / IP incubado com o composto foi mantido durante 10 min em temperatura ambiente antes das medições de fluorescência. Além disso, as leituras de fluorescência realizadas apenas com o conjunto CT-DNA / IP foram subtraídas dos espectros de CT-DNA associados à exposição a cada composto. Estes ensaios foram realizados em triplicatas para três experimentos independentes.

4.8 DANOS AO DNA

O ensaio cometa foi utilizado para avaliar a fragmentação do DNA (SINGH et al., 1988). Para este ensaio, as células HepG2 ($2,5 \times 10^4$ células/poço) foram semeadas em placas contendo 24-poços. Após o período de 24h para ocorrer a confluência, os poços com células receberam meio contendo o composto 49H (4,7 μM ; 500 μL) e ficaram expostas durante 72 h. Após o tratamento, as amostras foram lavadas com 500 μL de PBS, tripsinizadas por 6 minutos, centrifugadas (1500 rpm, 10 minutos) e ressuspensas em 50 μL de PBS. A seguir, as amostras foram homogeneizadas em agarose de baixo ponto de fusão (0,75%), depositando as células sobre uma lâmina pré-revestida com agarose (1,5%) e deixadas para solidificar a 4°C por 5 min. Em seguida, cada amostra foi submersa em uma solução de lise gelada (Tris 10 mM; NaCl 2,5 M; DMSO 10%; EDMS 100 mM e EDTA 100 mM e Triton X-100 a 1%) (pH 10) e foi mantida sob refrigeração por 2 dias. No passo seguinte, todas as lâminas foram então submetidas a eletroforese horizontal em condições padrão (25 V; 300 mA; 8°C; 20 min)

em tampão alcalino (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM) (pH 13). Em seguida, cada lâmina foi mantida dentro de uma solução neutralizante (Tris-HCl 0,4 M) (pH 7,4) e deixadas secar. Finalmente, as lâminas foram coradas com iodeto propídio (20 µg / mL) e visualizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX4®. Após obtenção das imagens digitais, a contagem dos núcleos pertencentes às categorias de fragmentação foi realizada empregando o programa Image J (versão 1.46). Cada amostra foi avaliada em triplicatas provenientes de ao menos três experimentos independentes.

4.9 ANÁLISE DO CICLO CELULAR

A distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular foi medida usando iodeto de propídio (IP) por citometria de fluxo através do kit Immunostep® contendo a solução IP / RNase (Salamanca, Espanha). As células HepG2 (2×10^5 células/poço) foram incubadas (24 h) e sincronizadas com nocodazol (30 ng / mL), por 16 h. Depois, as células foram tratadas com 49H (4,7 µM; 72 h). Em seguida, foram lavadas com PBS e fixadas por 12 h em etanol gelado (70%) e mantidas a -20 °C. As células fixadas em etanol foram lavadas com PBS contendo BSA (2%). Posteriormente, foi adicionada a solução PI / RNase (15 min; 25 °C) e as leituras foram realizadas usando o citômetro FACSCanto II (BD Biosciences) e os histogramas gerados (Flowing Software 2.5) expressando resultados em termos de porcentagem da distribuição de DNA em cada fase do ciclo celular (NUNEZ, 2001). Estes ensaios foram realizados em triplicadas em dois experimentos independentes.

4.10 ENSAIOS DE IMUNODETECÇÃO

As células HepG2 foram tratadas com uma concentração correspondente à IC₃₀ (4,7 µM), por 48 h. Em seguida foram lavadas com PBS e lisadas em tampão RIPA (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; NP40 1%; Na-desoxicolato 0,25%; fluoreto de fenilmetilsulfonil 1 mM) (pH 7,4) suplementado com coquetéis inibidores de protease (1%) e inibidores de fosfatase (3%). A concentração de proteínas presentes em cada amostra foi determinada pelo método de Bradford usando um kit para determinação (BioRad). Posteriormente, as amostras foram desnaturadas em tampão Laemmli contendo Tris-Cl (60 mM); dodecilsulfato de sódio (2%); glicerol (10%); β-mercaptoetanol (5%) e azul de bromofenol (0,01%) (pH 6,8). A mesma quantidade dos homogenatos celulares (30 µg) foi submetida à eletroforese em géis de

poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida, o gel foi sobreposto a uma membrana de nitrocelulose, realizando-se então o processo de eletrotransferência a 100 V por aproximadamente 2 horas, utilizando-se o tampão de transferência gelado (TRIS 54 mM, 45% glicina, 20% Metanol P.A., pH 8,3). Após a corrida, a membrana foi imersa em uma solução de bloqueio contendo leite em pó (50 mg/mL) e tampão TTBS (TRIS 198 mM, NaCl 137 mM e 0,01% Tween 20, pH 7,6) por 1 hora em agitador orbital. A membrana de nitrocelulose foi lavada com TTBS por 10 minutos e incubada com anticorpo primário overnight a 4°C, de acordo com a diluição indicada pelo fabricante. Os anticorpos primários utilizados foram: policlonais de coelho anti-ciclina A (sc-596), anti-PARP (sc-7150), Anti- γ H2AX (Ser 139; sc-101696), anti-HIF-1 α (H-206; sc-10790), anti-pRB (Ser 807-811; cs-9308), anti- β -actina (sc-7210) e anti-Cdk2 (sc-163). Enquanto que os anticorpos policlonais de camundongo foram: anti-p53 (sc-6243) e anti-BAX (sc-7480). Os anticorpos secundários conjugados à peroxidase da Merck Millipore utilizados foram: policlonal anti-coelho (AP132P) ou policlonal anti-camundongo (AP181P). A proteína β -actina foi usada para normalizar a carga de proteína. A imunodeteção foi realizada usando o kit de detecção de quimioluminescência ampliada (*Enhanced ChemiLuminescence* - ECL) Westar Nova 2.0 (Cyanagen, Bolonha, Itália). Os *Western blots* foram quantificados por densitometria usando o programa Image J (versão 1.46).

4.11 PREDIÇÃO DE PROPRIEDADES ADMET

Para a previsão dos perfis de absorção, de distribuição, de metabolismo, de excreção e de toxicidade (ADMET) dos compostos 49A e 49F foram gerados inicialmente os SMILES (*Simplified Molecular-Input Line-Entry System*). Os SMILES dos compostos foram submetidos a duas plataformas gratuitas de bioinformática SwissADME (DAINA; MICHELIN; ZOETE, 2017) e ADMETlab (DONG et al., 2018). As duas plataformas possuem um vasto banco de dados de estruturas depositadas de moléculas já conhecidas. Assim, através de comparações entre as estruturas de moléculas depositadas e de novas moléculas em avaliação foi possível efetuar cálculos para obter suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas, semelhança a fármacos, toxicidade, dentre outros parâmetros.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados representados como média \pm desvio padrão (DP). A significância estatística foi medida usando a análise de variância (ANOVA de uma via), seguida pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. O teste t de Student foi aplicado nas análises que só compararam dois tratamentos (controle e 49H). Os valores foram processados no programa GraphPad Prism 5.0 (San Diego, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 CAPÍTULO 2- NOVOS SELENOÉSTERES DERIVADOS DE DIIDROPIRIMIDINONA COMO POTENCIAIS AGENTES CITOTÓXICOS CONTRA O CARCINOMA HEPATOCELULAR HUMANO: DOCKING MOLECULAR E FRAGMENTAÇÃO DE DNA

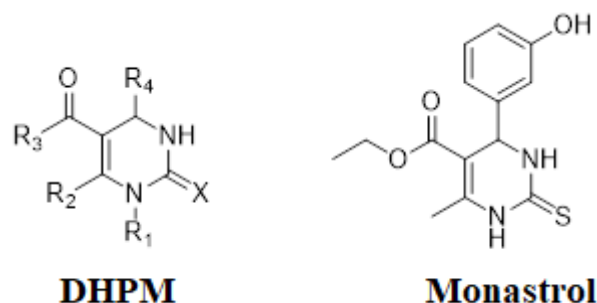
5.1 INTRODUÇÃO

O câncer resulta de uma série de eventos moleculares que fundamentalmente modifica as propriedades das células normais. Nas células cancerígenas, existem alterações no controle normal dos sistemas que previnem o crescimento celular e a invasão de outros tecidos (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Apesar de avanços em recentes anos com relação à diagnóstico precoce e eficácia de tratamentos, a Organização Mundial da Saúde ressaltou que o câncer foi responsável por cerca de 9,6 milhões de mortes em 2018. Além disto, mundialmente, tem sido observado um aumento significativo nos custos econômicos associados ao câncer. Como exemplo desse fato, somente nos Estados Unidos da América cerca de 87,8 bilhões de dólares foram usados para cuidados da saúde relacionados com o câncer (ACS - *American Cancer Society*, 2017).

Apesar dos novos métodos de tratamentos para o câncer, tais como a imunoterapia e terapia com moléculas alvo, a quimioterapia convencional permanece como a forma de tratamento mais amplamente empregada no mundo. Embora a quimioterapia apresente custos menores comparativamente à abordagem da imunoterapia, existem alguns pontos negativos decorrentes da baixa seletividade e da indução de resistência de células tumorais causadas pela quimioterapia (ALFAROUK et al., 2015). Para superar estas dificuldades, um grande esforço foi realizado por parte de pesquisadores e da indústria farmacêutica nas décadas recentes que permitiu a descoberta de novas moléculas com propriedades quimioprotetivas e quimioterapêuticas (DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ et al., 2014).

Neste cenário, alguns compostos derivados de dihidropirimidinonas (DHPMs) tem ganhado mais importância. De fato, as propriedades biológicas e farmacológicas das DHPMs foram confirmadas (KAUR et al., 2017; FATIMA et al., 2015). Como um exemplo destes avanços destaca-se a do monastrol (Figura 16), uma molécula permeável que previne a formação normal do fuso bipolar em células de mamíferos e desse modo, ocasiona a parada no ciclo celular (MAYER et al., 1999).

Figura 16- Comparação entre as estruturas químicas da diidropirimidinona e do monastrol.



Da mesma forma, em vários estudos onde foram empregadas diversas linhagens tumorais também foram observados efeitos de compostos de selênio que determinaram a parada do ciclo celular. Além disto, estes compostos foram capazes de afetar as vias de sinalização para morte celular envolvidas. No entanto, tais mecanismos dependem da estrutura dos compostos derivados do selênio bem como o fenótipo celular (MARTINS et al., 2015). O selênio (Se) é um oligoelemento essencial para mamíferos, que tem papel importante nos processos celulares, incluindo a modulação do balanço redox quando incorporado em alguns resíduos de selenocisteína como na glutathiona peroxidase e tioredoxina redutase, por exemplo (BROWN; ARTHUR, 2001).

Diidropirimidinonas e organoselênio apresentaram atividades biológicas independentes e sinérgicas. Barbosa et al. (2016) avaliaram diferentes atividades biológicas de selenoésteres derivados de DHPM entre as quais destacaram a inibição da peroxidação lipídica, quelação de ferro e inibição da enzima colinesterase. Esses autores atribuíram o maior perfil de atividade à presença de ambos os grupos. De fato, o núcleo DHPM do composto aumentou sinergicamente a atividade da fração selenoéster. O objetivo deste trabalho foi investigar, pela primeira vez, esses compostos híbridos em relação à sua potencial atividade antitumoral contra a linhagem de carcinoma hepatocelular humano (HepG2).

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Efeitos de DHPMs sobre a viabilidade celular

A citotoxicidade dos compostos sintetizados foi avaliada utilizando o ensaio MTT (Tabela 2) aplicado em três linhagens celulares tumorais (HeLa, HepG-2 e MCF-7) e uma linhagem celular não tumoral (McCoy). Ficou evidente a partir dos resultados obtidos que a maioria dos compostos híbridos avaliados neste ensaio promoveu uma diminuição

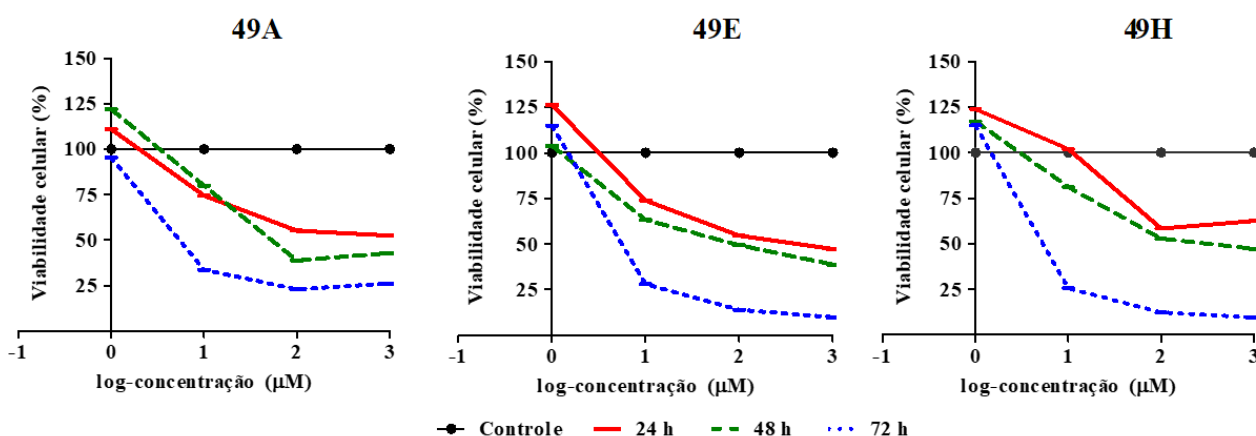
significativa na viabilidade em todas as linhagens celulares avaliadas de uma maneira dependente da concentração. Após o ensaio de 72 h, os compostos 49A, 49E e 49H foram os mais citotóxicos para a linhagem celular HepG2 e com os melhores índices de seletividade para a linhagem não tumoral com valores iguais a 4,24; 3,66 e 4,38; respectivamente.

Tabela 2- Citotoxicidade das DHPMs-Se (49A-H) em diferentes linhagens de células tumorais (HeLa, HepG-2 e MCF-7) e em célula normal (McCoy) tratadas por 72 horas. Os resultados são expressos como a média de três experimentos independentes.

Composto	IC ₅₀ (µM)				Índice de Seletividade (IS)		
	HeLa	HepG2	MCF-7	McCoy	HeLa	HepG2	MCF-7
49A	9,92	7,42	11,03	31,60	3,20	4,26	2,80
49B	3,90	9,56	29,60	23,04	5,91	2,41	0,77
49C	43,40	8,94	81,20	26,80	0,62	3,20	0,33
49D	7,70	11,50	69,00	17,40	2,26	1,51	0,25
49E	13,10	8,32	18,80	30,56	2,33	3,67	1,60
49F	> 100	7,60	7,25	18,07	---	2,46	2,50
49G	36,01	95,90	69,30	121,15	3,36	1,20	1,74
49H	26,20	7,78	48,84	34,11	1,30	4,30	0,70
Monastrol	176,90	173,00	59,10	26,80	0,15	0,15	0,45
5-FU	7,00	23,60	33,00	15,70	2,24	0,66	0,47

Inicialmente, os ensaios de viabilidade celular foram realizados em tempos diferentes (24, 48 e 72 horas), aplicando concentrações crescentes (0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 μM). Conforme apresentado na figura 17, a toxicidade dos compostos foi tempo dependente. O tempo de 72 horas foi escolhido por apresentar melhor reprodutibilidade nas diferentes repetições dos ensaios.

Figura 17- DHPM-Se reduziu a viabilidade celular de modo dose e tempo dependentes nas células HepG2.

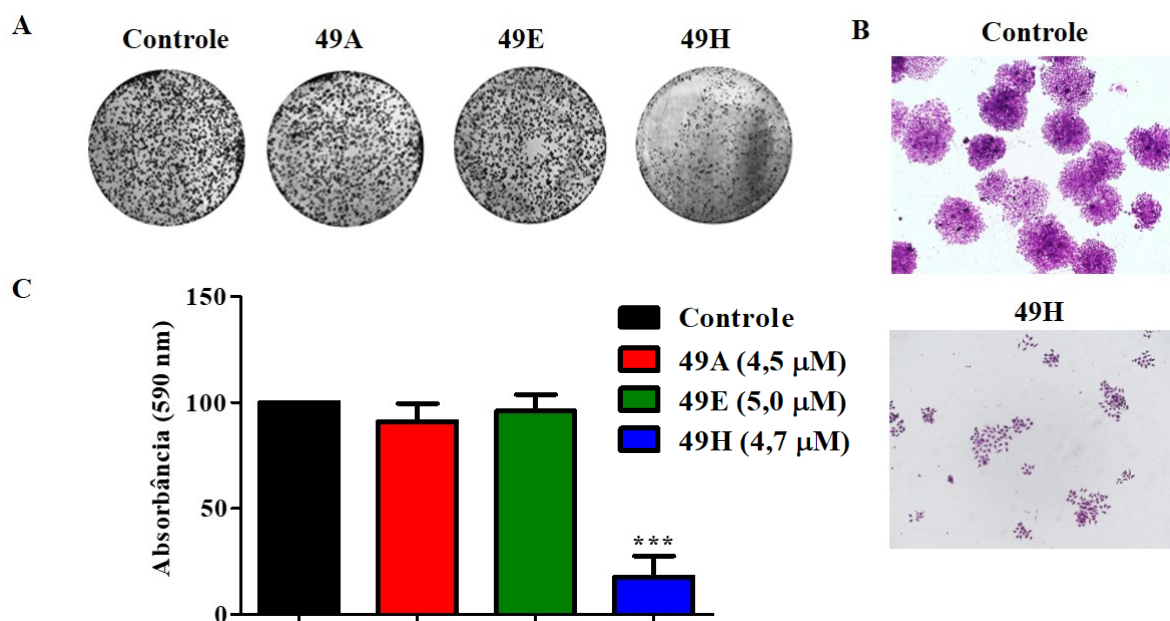


Curvas de resposta da viabilidade de células HepG2 tratadas com DHPM-Se (49A, 49E e 49H) em diferentes concentrações (0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 μM) por 24, 48 e 72 h, conforme determinado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os dados representam valores da média de três experimentos independentes.

5.2.2 Atividade antiproliferativa em células HepG2

O potencial antiproliferativo dos compostos híbridos (49A, 49E e 49H) foi determinada pelo ensaio de formação de colônias após dez dias de remoção dos tratamentos do meio de cultura (Figura 18). Quando comparado ao grupo controle (DMSO 1%), apenas o composto 49H mostrou efeito antiproliferativo. A impregnação com o corante cristal violeta apresenta correlação direta com a densidade celular nas colônias formadas. Assim, aquelas colônias com maior número de células irão apresentar maior área coberta pelo corante. Em termos quantitativos, as leituras espectrofotométricas do corante removido das colônias tratadas com 49H revelaram uma redução de 5,5 vezes, comparativamente ao controle. Portanto, com base nos resultados do ensaio clonogênico, os demais ensaios *in vitro* subsequentes foram realizados avaliando apenas o composto 49H para a linhagem com HepG2.

Figura 18- O efeito supressor das DHPMs-Se na formação de colônias de HepG2.

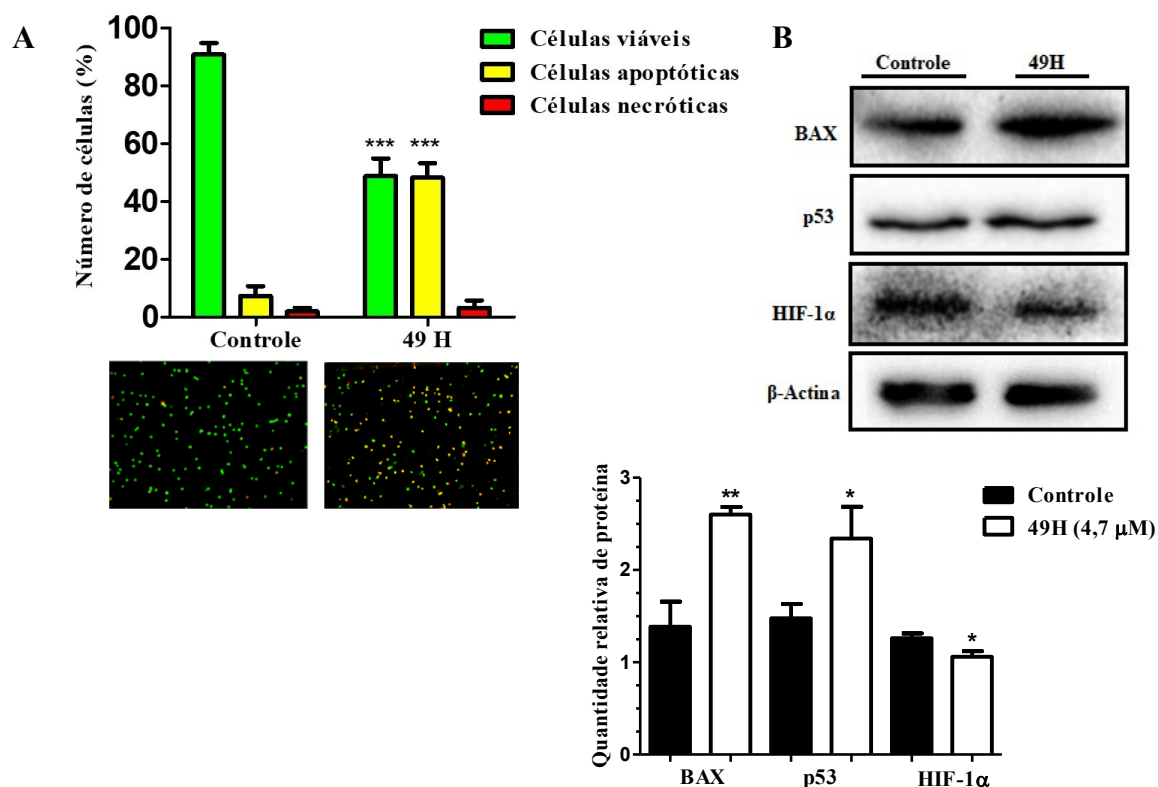


(A) Imagens representativas das colônias formadas nas placas dos diferentes tratamentos. (B) Imagens de microscopia (40X) destacando a densidade celular das colônias e dos agregados de células HepG2. (C) Análise da formação de colônias através da absorbância do corante cristal violeta removido das placas com os diferentes tratamentos das células HepG2. (Os dados foram representados como Média \pm D.P. de três experimentos independentes. *** $p < 0,001$. Teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

5.2.3 Tipo de morte celular induzido

Como apresentado na figura 19, o tratamento com 49H causou uma redução de 46% no número de células viáveis, comparativamente ao controle. Ao analisar o tipo de morte induzida por esse composto, a proporção de morte por necrose não diferiu significativamente do controle. Enquanto que o tratamento com 49H elevou em seis vezes a frequência de apoptose ($p < 0,001$), relativamente ao controle. Este resultado alinha-se com aqueles obtidos através de imunodeteção onde foram analisadas algumas proteínas envolvidas em vias de sinalização para apoptose. Os dados obtidos mostraram que o tratamento com 49H aumentou os níveis das proteínas pró-apoptóticas p53 e Bax (80% e 60%, respectivamente) quando comparados com o grupo controle. Em contraste, o tratamento com 49H reduziu o nível de HIF-1 α (16%) em comparação ao controle.

Figura 19- Caracterização do tipo de morte celular induzida pelo tratamento com 49H e expressão de proteínas relacionadas com a apoptose.



(A) Quantificação de células viáveis, apoptóticas e necróticas. Indução de morte celular após tratamento de HepG2 com 49H (4,7 μM) por 72 h. (Os dados foram representados como Média ± D.P. de três experimentos independentes. *** p < 0,001, teste t de Student). (B) As células HepG2 tratadas ou não com 49H (4,7 μM) por 48 h, foram coletadas para análise de imunodeteção das proteínas BAX e p53 relacionadas com a morte celular e HIF-1α (Média ± D.P. n= 3; * p < 0,05; teste t de Student).

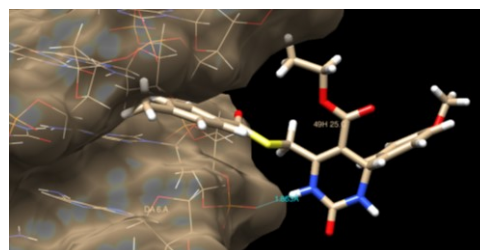
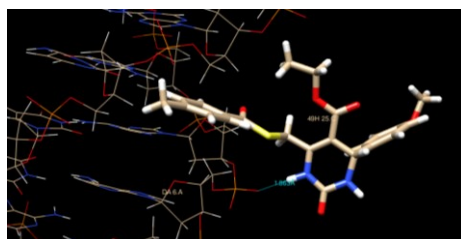
5.2.4 Avaliação *in silico* das interações entre B-DNA e ligante 49H

Os resultados das simulações de ancoragem molecular realizadas com o complexo DNA-49H mostraram as poses com o ligante 49H. Estas poses apresentaram valores similares entre si para a energia de afinidade de ligação e pequenas variações nos valores de RMSD que foram inferiores a 2 Å, conforme mostrado na tabela 3. Contudo, o melhor resultado foi obtido para o ligante 49H na pose 1 pois apresentou a menor energia de afinidade de ligação (-7,60532 kJ / mol) e RMSD (0,0000 Å). Além disso, essa pose apresentou um número expressivo de ligações de hidrogênio (3,293) previsto por uma função do AutoDock Vina.

Tabela 3- Interações simuladas entre complexo B-DNA (PDB ID 5T4W) e o ligante 49H previstas com Auto Dock Vina (docagem molecular) e GROMACS (dinâmica molecular).

Ligante (pose)	Simulação de <i>docking</i> molecular com AutoDock Vina				Simulação de dinâmica molecular com GROMACS (Frame 780 ps)		
	Energia de afinidade de ligação (kJ/mol)		Contribuição hidrofóbica	Ligação de hidrogênio	RMSD (Å)	Ligação de Hidrogênio	Interações hidrofóbicas
	Vina	Score only					
49H (1)	-31,798	-31,820	1,224	3,293	0,000	Resíduo dA6 (Cadeia A)	Resíduo dG4; dA5; dA6 (Cadeia A); dC21; dA22; dC23 (Cadeia B)
49H (2)	-30,961	-30,496	1,528	2,998	2,045	-	-
49H (3)	-30,543	-29,787	0,065	1,535	1,537	-	-

Ligação de Hidrogênio prevista o átomo de oxigênio do grupo fosfato do resíduo dA6 e o átomo de nitrogênio do 49H

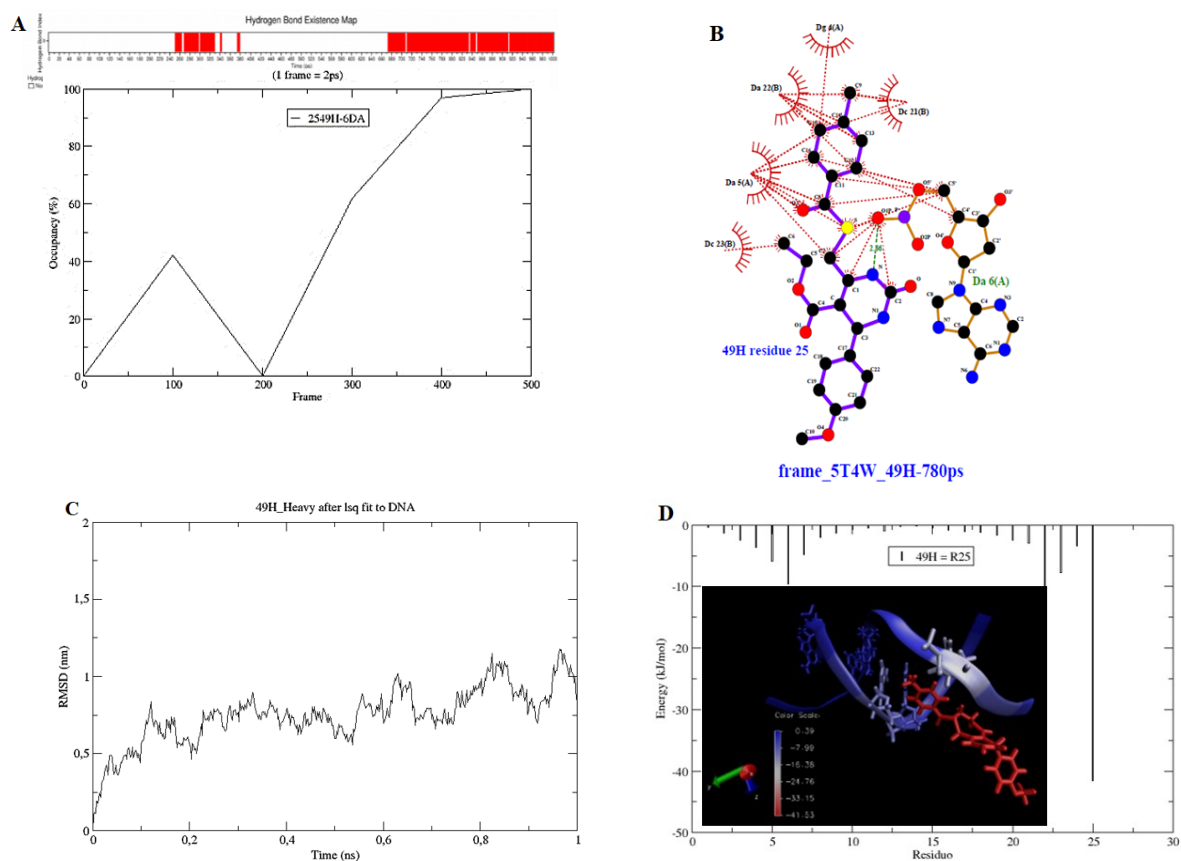


Após as simulações de DM, foi selecionado o frame posicionado a 780 ps para realizar análises adicionais. A escolha se deu com base nesta região do mapa de existência de ligações hidrogênio, que possuía a maior taxa de ocupação, considerando o tempo referente à metade da simulação (Figura 20A). Foi verificada uma ligação de hidrogênio entre o átomo de oxigênio no grupo fosfato do nucleotídeo dA6 e o ligante 49H, bem como algumas interações hidrofóbicas entre esse ligante e nucleotídeos de ambas as hélices do DNA (dG4; dA5; dA6; dC21; dA22; dC23) (Tabela 3). Tanto a ligação de hidrogênio quanto as interações

hidrofóbicas mantiveram o ligante parcialmente inserido no sulco menor do DNA (mais detalhes nas imagens exibidas na Tabela 3). De fato, as visualizações de dados de trajetórias usando VMD também revelaram o ligante 49H parcialmente posicionado no sulco menor do DNA. Portanto, a ligação de hidrogênio formada e as contribuições adicionais de suas interações hidrofóbicas mantiveram o ligante em sua posição (figura 20B). Provavelmente, ambos os tipos de interação contribuíram para a pequena variação na progressão de RMSD observada para o ligante 49H (figura 20C).

Conforme esperado, entre os resíduos de nucleotídeos, o resíduo dA6 apresentou o menor valor de Energia Mecânica Molecular ($-17,210 \pm 0,222$ kJ / mol) associada com Energia Polar ($8,890 \pm 0,355$ kJ / mol) e Energia não polar ($-1,315 \pm 0,014$ kJ / mol). Essas energias contribuíram para a Energia total ($-9,626 \pm 0,184$ kJ / mol) relacionada a esse nucleotídeo. Enquanto que o valor de Energia Mecânica Molecular do ligante 49H foi o mais baixo do complexo ($-66,313 \pm 0,364$ kJ / mol), com Energia Polar ($30,498 \pm 0,317$ kJ / mol), Energia não Polar ($-5,732 \pm 0,029$ kJ / mol) e Energia de contribuição Total ($-41,533 \pm 0,254$ kJ / mol) (figura 20D).

Figura 20 – Análise prevista pela dinâmica molecular dos fatores envolvidos para estabilização do complexo formado entre o B-DNA e o ligante 49H.



(A) Mapa de existência das ligações H, que tiveram maior ocupação ao longo do tempo de simulação. (B) GROMACS previu ligações de H (linha verde tracejada) e interações hidrofóbicas (linhas vermelhas) entre 49H e nucleotídeos de DNA (no quadro de 780 ps). (C) Progressão de RMSD para o ligante 49H durante o tempo de simulação. (D) Contribuição individual dos nucleotídeos (resíduos 1-24) e do ligante 49H (resíduo 25; vermelho) para a energia total do complexo.

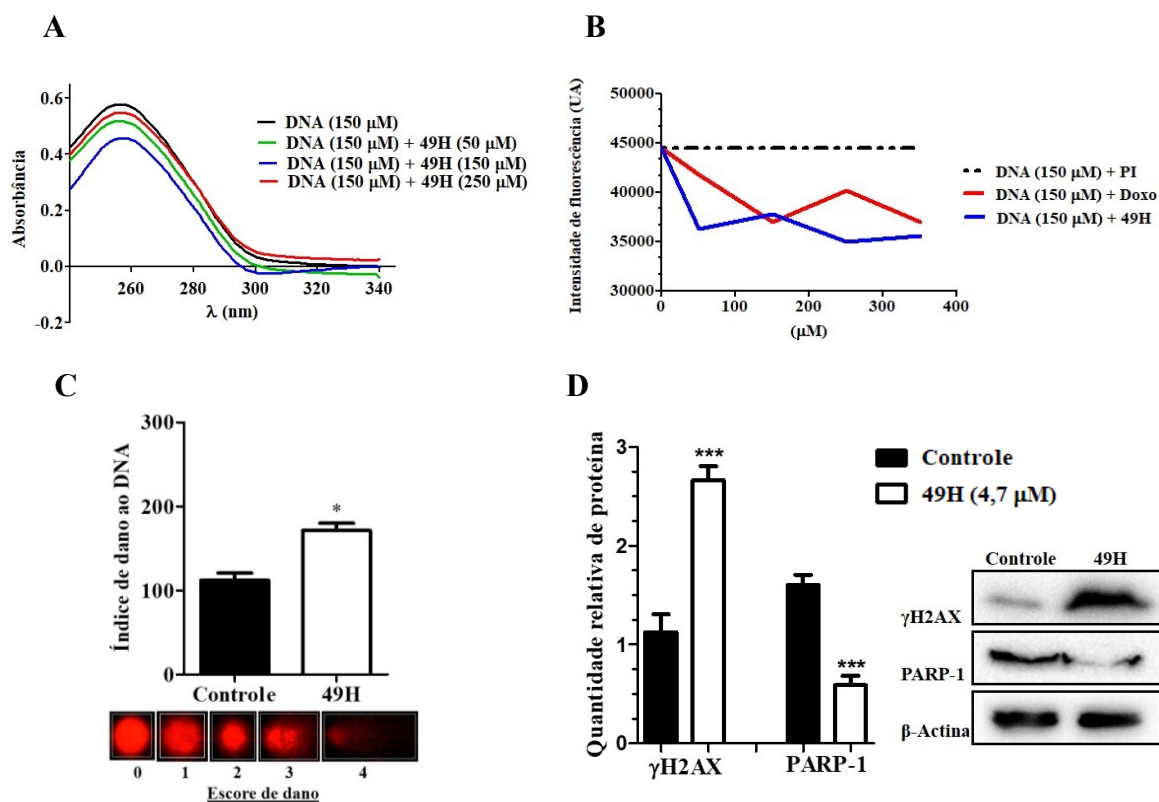
Os cálculos usando MM-PBSA a partir dos resultados obtidos com o GROMACS demonstraram que a Energia de van der Waals ($-90,269 \pm 0,455$ kJ/mol) representou a maior contribuição para a Energia Total ($-110,986 \pm 1,295$ kJ/mol) do complexo.

5.2.5 Interações *in vitro* entre o DNA e o 49H

Com base nos resultados teóricos da simulação, investigou-se duas formas de interação *in vitro* usando CT-DNA. Ao serem comparados os valores para o DNA isolado, a figura 21A mostra que as três concentrações (50, 150 e 250 μ M) do composto 49H promoveram alterações na absorbância da molécula, que foi mais pronunciada na concentração de 150 μ M. A análise dos espectros mostrou efeito hipocrômico relacionado a alterações conformacionais do DNA, provavelmente causadas pelo este composto híbrido 49H ligado não covalentemente. Estudos de intercalação adicionais feitos com CT-DNA forneceram mais evidências de mecanismos moleculares por trás da atividade antiproliferativa *in vitro* de 49H. A figura 21B mostra a experiência realizada usando CT-DNA e iodeto de propídio (IP). Durante estes ensaios, 49H provavelmente causou o deslocamento do IP e reduziu a fluorescência do mesmo. O controle positivo foi realizado usando a doxorubicina, um intercalante clássico.

O ensaio cometa é um método simples de avaliar danos no DNA. Após exposição realizada com o composto 49H na concentração de IC_{30} (4,7 μ M; 72 h), este promoveu danos ao DNA das células HepG2 (Figura 21C). A exposição ao composto resultou em maior frequência de classes com dano mais elevado, resultando em um índice 50% maior do que o verificado para o controle negativo ($p < 0,05$). Corroborando com esse resultado, houve um aumento na fosforilação de H2AX (γ H2AX) (153%) após o tratamento com o 49H. Quando fosforilada esta proteína fornece um forte indicativo da ocorrência de danos no DNA. Por outro lado, houve uma redução na expressão de PARP-1 (66%), proteína que está relacionada com o reparo de danos à molécula de DNA (Figura 21D).

Figura 21 - Efeito do composto 49H sobre o DNA e sobre a expressão de proteínas relacionadas ao dano e ao reparo do DNA.



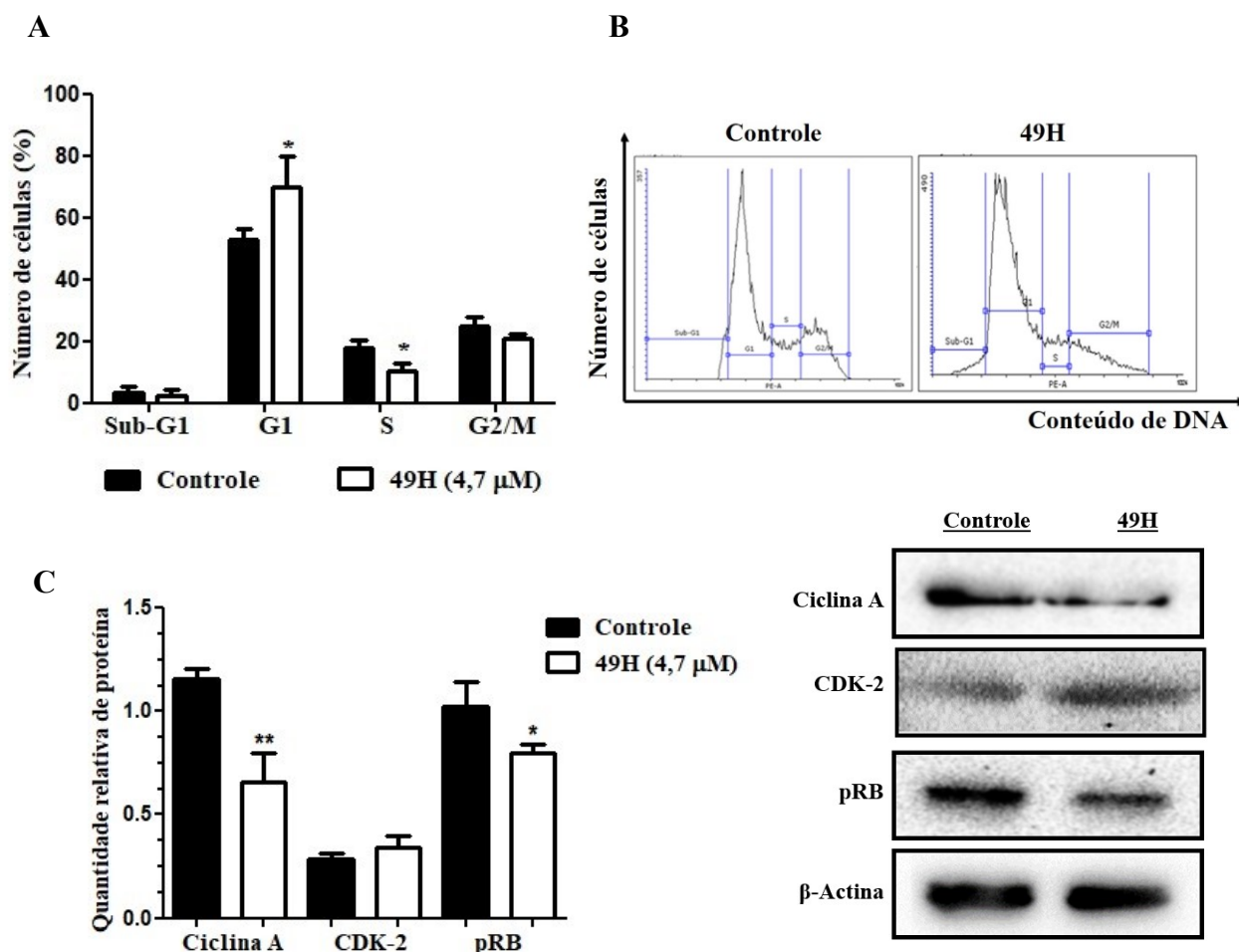
(A) Efeito hipocrômico e de (B) intercalação resultante após tratamento *in vitro* usando CT-DNA (150 mM) saturado com iodeto de propídio (300 μ M) e depois exposto a concentrações crescentes de 49H (50 ou 150 ou 250 μ M). Doxorubicina foi o controle positivo. (C) O índice de dano ao DNA foi determinado pelo ensaio cometa usando células HepG2 tratadas com 49H (72 h, IC₃₀ = 4,7 μ M). Os escores de fragmentação do DNA são mostrados na caixa abaixo do gráfico. (Os dados foram representados como Média \pm D.P. de três experimentos independentes. * $p < 0,05$. Teste t de Student). (D) As células HepG2 tratadas ou não com 49H (4,7 μ M) por 48 h, foram coletadas para análise de imunodeteccção das proteínas envolvidas na quebra e reparo do DNA, incluindo γ H2AX e PARP-1 (Dados expressos em Média \pm D.P. n = 3; *** $p < 0,001$; teste t de Student).

5.2.6 Análise do ciclo celular por citometria de fluxo

A análise do ciclo celular por citometria de fluxo foi baseada no conteúdo de DNA determinado através da intercalação do iodeto de propídio ao DNA das células HepG2, após 72 horas de tratamento com o composto 49H (4,7 μ M). Uma distribuição do percentual de células nas diferentes fases do ciclo celular de HepG2 após o tratamento encontra-se apresentada na figura 22A-B. Comparativamente ao grupo controle, o tratamento com o composto 49H elevou o número de células na fase G1 em mais de 20%. O aumento na fase G1 foi acompanhado por uma redução de cerca de 40% na frequência de células na fase S em comparação com o controle. Além disso, proteínas envolvidas na progressão e no controle do

ciclo celular, como ciclina A e pRB, foram avaliadas por imunodeteção. Os resultados revelaram a diminuição da expressão das mesmas (46% e 21%, respectivamente) após o tratamento com 49H por 48 horas (Figura 22C).

Figura 22 – Ação do composto 49H sobre a expressão de proteínas relacionadas ao ciclo celular.



Análise da citometria de fluxo da distribuição de DNA ao longo do ciclo celular. (A) A porcentagem das células em cada fase do ciclo e o (B) gráfico da quantidade de DNA em cada fase do ciclo celular foi obtido e calculado pelo Flowing Software 2.5. Os resultados são as médias de dois experimentos independentes e várias análises de FACS de cada uma (Os dados foram representados como Média \pm D.P. * $p < 0,05$. Teste t de Student). (C) As células HepG2 tratadas ou não com 49H (4,7 μM) por 48 h, foram coletadas para análise de imunodeteção das proteínas envolvidas na progressão e controle do ciclo celular, incluindo ciclina A, CDK-2 e pRB, (Dados expressos em Média \pm D.P. $n = 3$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; este t de Student).

5.3 DISCUSSÃO

A análise prévia da citotoxicidade dos compostos que foi realizada pelo ensaio do MTT permitiu selecionar os novos compostos híbridos (DHPMs-Se) (49 A, 49E e 49H) que apresentaram maior toxicidade para a linhagem HepG2 e melhor seletividade para células não tumorais, entre os quais destacamos o 49H. Os DHPMs-Se sintetizados apresentam uma grande similaridade estrutural com o monastrol e, por esse motivo, este foi usado como um padrão de composto contendo um núcleo de diidropirimidinona. O fármaco 5-fluorouracil (5-FU) foi usado como controle de um quimioterápico clássico. Como observado na tabela 2, a maioria dos compostos mostrou toxicidade mais elevada do que a molécula de monastrol para as diferentes linhagens de células tumorais demonstrado pelos menores valores da CI_{50} . No entanto, quando se pensa em um composto com potencial antitumoral, este deve não ser apenas citotóxico, mas também possuir certa seletividade para células não tumorais. Nesse sentido, compostos com um índice de seletividade maior que 2 são os mais promissores para prosseguir nos demais ensaios (BADISA et al., 2009).

Dos oito compostos testados contra HepG2, três apresentaram índice de seletividade acima de 3 para os fibroblastos (McCoy). Em contraste, nem o monastrol e nem o 5-FU mostraram seletividade para célula não tumoral. Desde a sua síntese, estudos tem comparado a atividade do monastrol com análogos obtidos por mudanças estruturais desse composto. Por exemplo, Soumyanarayanan et al. (2012) demonstraram que alguns compostos análogos ao monastrol apresentaram maior citotoxicidade para HepG2 do que a molécula original. Estes autores apontaram que o posicionamento de átomos doadores ou receptores de ligações de hidrogênio no anel fenil teve função crucial nos resultados obtidos.

Diferentemente do monastrol, que possui enxofre em sua estrutura, os DHPMs avaliados neste estudo possuem um grupo selenoéster. De fato, essa diferença poderia ter contribuído significativamente para aumentar a toxicidade dos compostos. Já foi pontuado que a adição de grupamentos redox em um fármaco, como o selênio, promove a otimização do seu efeito antitumoral (CRUZ et al., 2016). Os compostos 49A, 49E e 49H apresentaram valores mais baixos de IC_{50} do que o fármaco de referência (5-Fluorouracil) para a linhagem celular tumoral HepG2 e além disso, demonstraram seletividade para células McCoy. Reforçando esse resultado, Clement e colaboradores (2000) demonstraram em um estudo *in vivo* que células normais não foram sensíveis à ação citotóxica e antiproliferativa do selênio, enquanto que células tumorais apresentam certos defeitos em suas vias de sinalização,

auxiliando a ação do selênio na inibição do crescimento tumoral. Devido aos melhores valores de seletividade, apenas 49A, 49E e 49H foram escolhidos para investigar a atividade antiproliferativa usando a linhagem celular HepG2.

Uma das características marcantes das células cancerígenas se trata de sua ilimitada e elevada capacidade proliferativa, que pode subsequentemente levar à invasão e metástase nos tecidos saudáveis. Assim, um novo composto antitumoral deve possuir capacidade antiproliferativa e boa seletividade para ser o mais promissor candidato para atuar sobre células-alvo cancerígenas. Ficou evidente que os compostos 49A e 49E foram apenas citotóxicos uma vez que, a retirada desses compostos do meio de cultura, permitiu a recuperação da capacidade proliferativa em níveis similares aos do controle com a presença de inúmeras colônias formadas por centenas de células. Diferentemente, o efeito antiproliferativo foi mantido mesmo após a retirada de 49H do meio de cultura. Quando se observa a imagem do poço onde as células foram tratadas com 49H pode-se perceber uma grande quantidade de pequenos pontos, que a princípio pareciam colônias (Figura 18). Contudo, quando esses poços foram observados em microscopia ficou evidente que a maioria desses pequenos pontos não se tratava de colônias bem estruturadas como aquelas formadas no controle e nos compostos 49A e 49E, mas sim de aglomerados celulares formados por menos de 50 células.

Estruturalmente, os três compostos apresentam apenas uma diferença entre eles, ou seja, o tipo de substituinte no grupo fenil. Dessa forma, considerou-se que o tipo de substituição que eles possuem foi capaz de influenciar a diferença observada em sua atividade. O composto 49A não possui nenhum grupo substituinte, enquanto os compostos 49E e 49H têm substituintes para grupos doadores de elétrons (dimetilamino e metóxi, respectivamente). Assim, pode-se inferir que o grupo metóxi doador de elétrons presente no grupo fenil tenha contribuído para a atividade antiproliferativa observada para o composto 49H quando comparado aos compostos 49A e 49E. Com base no resultado da atividade antiproliferativa, apenas 49H foi selecionado para realizar os outros ensaios através de métodos *in silico*, *in vitro* e moleculares.

Diferentes compostos podem levar a formas variadas de morte celular, sendo a apoptose e necrose consideradas como as mais comuns. Quando ocorre apoptose, a membrana celular permanece intacta, após formarem os corpos apoptóticos os quais eventualmente podem ser fagocitados. Ao contrário do que ocorre na morte por necrose, a apoptose não induz uma reação inflamatória (HAANEN; VERMES, 1995). Portanto, espera-se descobrir

novos compostos capazes de induzir preferencialmente morte celular por apoptose, de maneira a promover a inibição do crescimento de tumores malignos. Investigações recentes demonstraram o potencial dos compostos de selênio na quimioterapia para o câncer através da indução de apoptose. No entanto, os mecanismos precisos pelos quais a apoptose pode ser induzida por estes compostos ainda permanecem pouco entendidos evidenciando a necessidade de estudos adicionais (SINHA; EL-BAYOUMY, 2004).

Assim, tornou-se clara a importância de identificar algum alvo molecular específico que ao interagir com o selênio este seja capaz de inibir a carcinogênese. Suzuki et al. (2010) avaliaram a atividade de compostos de organosselênio (Se-metilselenocisteína e selenometionina) contra linhagens celulares de carcinoma humano. Seus resultados demonstraram que a apoptose induzida por selênio em células de carcinoma, ocorreu por meio de um processo dependente de caspase que envolveu mecanismos complexos. A ativação da via apoptótica intrínseca e a indução do estresse no retículo endoplasmático desempenharam um papel importante e simultâneo. Enquanto que a ativação da p53 na indução de morte por apoptose mostrou papel funcional apenas para a selenometionina (BENCHIMOL, 2001). A selenometionina, um composto empregado na quimioprevenção, exerce um papel inibitório sobre o crescimento de células tumorais de uma maneira dependente da p53 (GOEL et al., 2006).

No presente estudo, o tratamento de células HepG2 com 49H elevou consideravelmente a frequência de células em apoptose em relação ao controle. A indução de apoptose pode estar relacionada à ativação da p53, pois esta proteína desencadeia a transcrição e a ativação de proteínas pró-apoptóticas, promovendo a inibição de proteínas antiapoptóticas e causando a perda do potencial de membrana mitocondrial (HASSAN et al., 2014). A análise da imunodeteção revelou que o tratamento com o 49H aumentou a expressão da proteína p53. Além disso, o tratamento aumentou o nível da proteína BAX, evidenciando o possível envolvimento de apoptose pela via intrínseca. Estudos mostraram interações cruzadas importantes entre p53 e HIF-1 α . Uma linha de evidência aponta que o HIF-1 α pode prejudicar a atividade da p53, regulando a interação proteica entre a p53 e a HIPK2 (NARDINOCCHI; PUCA; D'ORAZI, 2011). Os resultados mostraram que o composto 49H causou uma redução na expressão de HIF-1 α o que pode ter contribuído para o aumento da expressão da p53 em células HepG2 expostas ao 49H por 48 horas.

As simulações de DM podem prever interações biológicas moleculares entre macromoléculas e compostos em nível atômico em escalas de tempo de femtossegundos a

milissegundos (SALOMON-FERRER; CASE; WALKER, 2012). Devido à ausência de uma técnica experimental que forneça de forma precisa os dados (coordenadas espaciais e energias envolvidas) que possam ser coletados em escala atômica temporal (DREHER et al., 2013), foram aplicadas simulações curtas para prever trajetórias e energias adotando um intervalo de tempo razoável (TROTT; OLSON, 2010).

Além disso, deve-se ressaltar que os resultados do GROMACS apresentaram precisão em uma escala de tempo, que seria inacessível de outra forma. Assim, o GROMACS previu com sucesso algumas propriedades geométricas e energias do complexo formado pelo B-DNA e pelo ligante 49H. As simulações de DM realizadas forneceram oportunidades para serem verificadas uma variedade de interações moleculares por meio de estudos *in silico*. Tais estudos se aplicam perfeitamente no processo de desenvolvimento/design de medicamentos através de ferramentas computacionais (WONG; MCCAMMON, 2003). Este pacote de programas apresenta forte propensão para ampliar a compreensão dos mecanismos moleculares por trás dos efeitos observados por meio de ensaios *in vitro* (ADCOCK; MCCAMMON, 2006). A estabilidade do complexo macromolécula-ligante prevista usando cálculos efetuados com GROMACS / MM-PBSA pode ter sido devida à Energia de Ligação Total favorável e devida às variações de energia livre de solvatação (ΔG_{solv}) associada à Área de Superfície Acessível ao Solvente (SASA) também favorável. O processo de solvatação requer um gasto de energia para romper as ligações formadas entre as moléculas do soluto e do solvente o que poderia explicar em parte o valor relativamente alto de ΔG_{solv} calculado para o complexo. É importante ressaltar que além da predição de ligação de hidrogênio foi formada com o grupo fosfato presente no esqueleto de DNA no resíduo de nucleotídeo dA6, foram observadas ligações com o solvente. Certamente, esse achado destacou a importância da hidratação neste sítio. Estudos anteriores usando DM com estruturas de DNA mostraram que os grupos fosfato são os principais locais de hidratação onde ocorrem eventos na escala de tempo de femtossegundos (SZYC; YANG; ELSAESSER., 2010).

Adicionalmente, foram observadas variações nos valores da energia de ligação que ocorreram principalmente no final das simulações. As causas dessas variações podem ser parcialmente devidas à geometria do ângulo da ligação de hidrogênio, que mostrou ser menos favorável em alguns momentos. No entanto, essas variações ocorreram independentemente da distância da ligação de hidrogênio, que permaneceu inalterada no momento da simulação. Finalmente, é importante destacar que a substituição do selênio pelo enxofre provavelmente

não comprometeu os resultados devido às interações ocorridas entre outros átomos, na molécula de 49H.

Fármacos e outros compostos bioativos podem interagir com o DNA o que pode resultar em danos tais como quebras de fita simples, quebras de fita dupla e / ou podem ser formados aductos volumosos e gerar mutações, deleções e inserções de nucleotídeos. Essas formas variadas de danos ao DNA requerem respostas através de diferentes mecanismos de reparo e vias de sinalização (O'CONNOR, 2015).

Por outro lado, quando uma molécula pequena se liga ao DNA através de intercalação entre pares de bases, isto pode causar alongamento e desenrolamento nas hélices do DNA. Essas modificações estruturais podem alterar as propriedades espectrais do DNA, como no caso do hipercromismo. No entanto, o hipercromismo indica uma ligação não covalente do composto à molécula capaz de causar apenas alterações conformacionais (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). No presente estudo, o ensaio de interação demonstrou que o composto 49H causou efeito hipocrômico no CT-DNA. Wang e colegas (2012) estudaram um derivado de diidropirimidinona e observaram que, na presença de concentrações crescentes de CT-DNA, houve aumento do efeito hipocrômico confirmado por diferentes métodos de análise. Assim, estes pesquisadores concluíram que seu composto foi capaz de intercalar com o CT-DNA.

Embora o ensaio de intercalação com 49H tenha mostrado diminuição da fluorescência do IP, dados obtidos por dicroísmo circular não confirmaram a intercalação completa (dados não mostrados). Além disso, os resultados de ensaios moleculares *in vitro* mostraram a capacidade do composto 49H de interagir e provavelmente as alterações conformacionais causadas nas hélices do CT-DNA seja resultado da interação do composto no sulco menor da molécula.

Conquanto os ensaios moleculares não tenham indicado uma interação mais intensa com o DNA, o ensaio cometa revelou que a exposição das células HepG2 ao composto 49H (4,7 μM) promoveu um índice de dano significativo (Figura 21C). Marques et al. (2017) demonstraram danos no DNA em células HepG2 após 3 horas de tratamento com monastrol (100 μM). Enquanto que o composto 49H foi capaz de gerar danos no DNA, mesmo em uma concentração 21 vezes menor comparativamente às concentrações utilizadas por esses autores.

Ademais, diferentes tipos de danos no DNA causados por agentes genotóxicos podem causar rupturas de fita dupla na molécula. Esse insulto leva à fosforilação da histona H2AX, quando esta proteína passa a ser denominada como γH2AX (SEDELNIKOVA et al., 2011).

Corroborando os resultados obtidos através do ensaio do cometa, a expressão de γ H2AX foi 2,3 vezes maior nas células HepG2 tratadas com 49H em comparação com o controle (Figura 21D).

O dano na fita do DNA pode ativar a PARP (Poly [ADP-ribose] polimerase), uma enzima de reparo nuclear. O domínio N-terminal da PARP se liga à fita de DNA que foi danificada e usa o NAD + para sintetizar poli (ADP-ribose) e proteínas envolvidas no metabolismo e reparo do DNA, como a DNA polimerase. Por outro lado, a fragmentação no DNA ativa as vias de sinalização de morte celular, como a via de ativação da caspase-3 e, conseqüentemente, determina a clivagem da proteína PARP, levando à morte celular por apoptose (KIM et al., 2000). A imunodeteção de proteínas não revelou a clivagem de PARP nas células HepG2 expostas ao composto 49H. No entanto, a redução do nível desta proteína na presença do composto pode ser indicativo do processo de clivagem da mesma por caspases. De fato, a atividade reparadora da PARP consome muito ATP afetando seus níveis intracelulares. Assim, dependendo do tipo e da extensão do dano gerado ao DNA, a célula interrompe o reparo para manter um estoque mínimo necessário de ATP e, desta forma, consegue executar sua morte por apoptose. A redução dos níveis de PARP-1 observada no presente trabalho poderia estar relacionada com este fato.

Muitos medicamentos anticâncer têm como alvo o DNA, uma vez que a replicação do DNA representa uma fase muito relevante que antecede a divisão celular. O elevado índice de danos gerado pelo tratamento de pacientes com câncer usando agentes genotóxicos acionará os pontos de verificação do ciclo celular, o que poderá levar à parada do ciclo e morte celular (HELLEDAY et al., 2008).

Sabe-se que o monastrol tem sua atividade baseada na inibição reversível e específica da motilidade da cinesina mitótica Eg5 por meio da inibição alostérica da hidrólise de ATP, ao causar alteração conformacional e impedir a hidrólise do novo ATP. Sem a energia necessária para conduzir os centrossomas para os polos opostos, o fuso mitótico não é formado e a célula permanece retida na fase G2 / M do ciclo celular e pode ser conduzida para apoptose (CHIN; HERBST, 2006).

Nos últimos anos, foi relatado o uso de compostos de organosselênio com capacidade citotóxica e antiproliferativa em vários modelos de câncer, sugerindo que compostos contendo selênio poderiam ser usados como fármacos anticâncer (SINHA; EL-BAYOUMY, 2004). Barbosa et al. (2018) avaliaram a capacidade anticâncer de derivados de selenouréias de diidropirimidinonas em células MCF-7. Eles observaram que o tratamento de 72h com um

dos análogos gerados promoveu um aumento de 15% das células no sub G1 e reduziu significativamente a porcentagem de células na fase S quando comparadas às células não tratadas.

Diferentemente do relatado para o monastrol, o 49H causou a parada de células na fase G1 e a redução do número de células na fase S, como demonstrado na figura 22A. Ainda não foi totalmente elucidado como os membros da família RB (proteína retinoblastoma) agem para controlar o ciclo celular. No entanto, é certo que a interação entre a RB e o fator de transcrição E2F desempenha um papel central na progressão do ciclo celular e na replicação do DNA através do controle de importantes genes dependentes do E2F do ciclo celular (MACALUSO et al., 2005). A ação repressiva da RB sobre o E2F será reduzida quando a RB estiver no estado hiperfosforilada (MULLER; HELIN, 2000).

Como apresentado anteriormente, os resultados de *western blot* revelaram uma redução de 21% nos níveis de RB fosforilada (Figura 22B) que possivelmente promoveu a parada da fase em G1. A manutenção do estado fosforilado de RB ao longo do ciclo celular depende da combinação de CDKs (cinases dependentes de ciclina) e ciclinas para formar o complexo ciclina-CDK (VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003). No início da fase S, a ciclina A é expressa e associa-se ao CDK-2. Pensa-se que o complexo ciclina-CDK desempenha um papel no início da síntese de DNA (HARTWELL; KASTAN, 1994).

Um organosselênio derivado da combretastatina foi utilizado na sensibilização de células tumorais (MCF-7 e MDA-MB-231) à morte celular induzida pela Ciclofosfamida. Os autores observaram que o tratamento com o composto isolado ou em combinação com Ciclofosfamida conseguiu induzir a morte celular principalmente por apoptose. A hipótese considerada se baseou na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), seguida por regulação negativa do sistema de defesa antioxidante nas células tumorais que foi decorrente do tratamento com o composto. Adicionalmente, a exposição das células tumorais ao composto combinado com a Ciclofosfamida também causou danos ao DNA, elevou os níveis de p53 e Bax, regulou negativamente Bcl-2, causou clivagem na PARP e determinou parada no ciclo celular na fase ouG2/M associado com a baixa expressão do complexo de ciclina B1-Cdk2 (CHAKRABORTY et al., 2016).

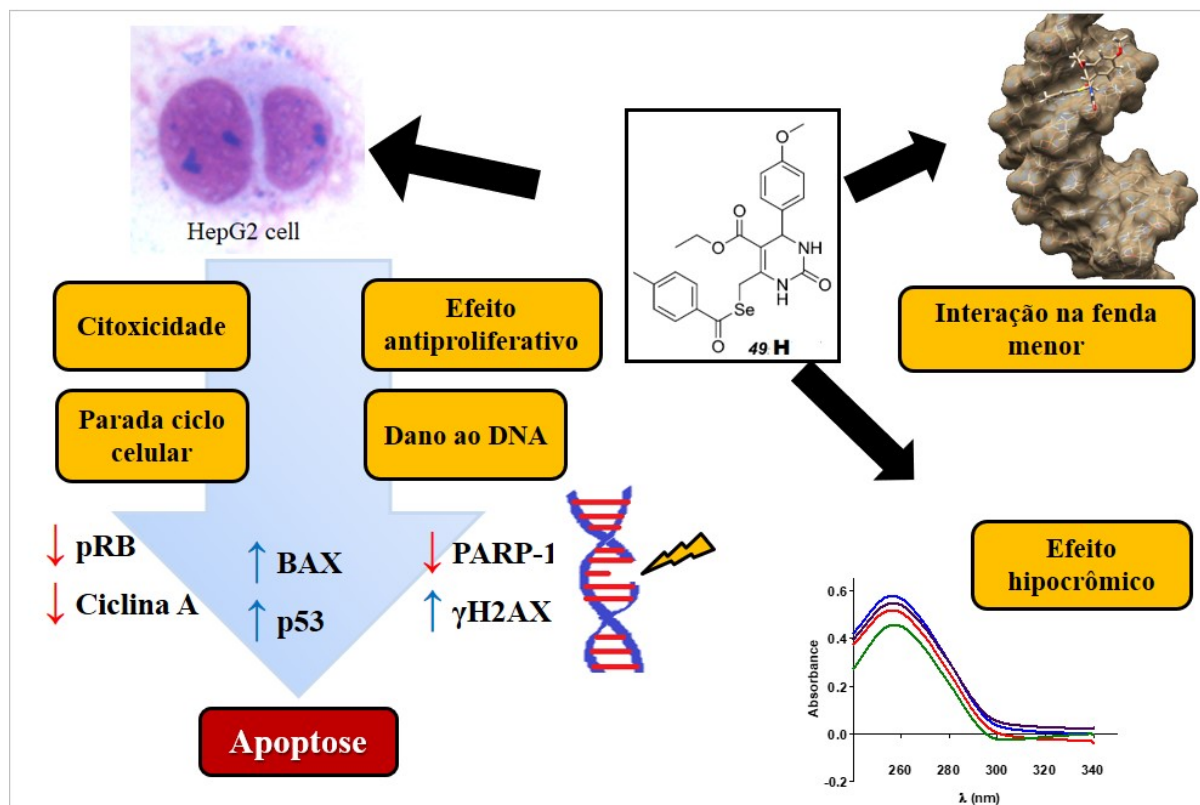
Em outro estudo Marques e colaboradores (2017) avaliaram o efeito do monastrol frente a uma linhagem tumoral (MCF-7) e uma não tumoral (HB4a) de mama humana. Os autores pontuaram que o composto não foi capaz de induzir a morte celular por apoptose em

nenhuma das linhagens analisadas. No entanto, a análise da expressão gênica medindo os níveis de RNAm de genes do ciclo celular, revelou que o tratamento das células MCF-7 por monastrol aumentou em cinco vezes os níveis de RNAm do gene CDKN1A. Esta proteína é um inibidor de CDKs relacionado à parada do ciclo celular em resposta a estímulo de estresse. Nos resultados apresentados nesta tese, não houve diferença na expressão de CDK-2. No entanto, o tratamento das células HepG2 com 49H reduziu o nível de ciclina A em 43% em comparação ao controle. Este resultado explica parcialmente a menor fosforilação de RB observada nas células expostas ao 49H.

5.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Diferentes compostos híbridos derivados de diidropirimidinonas e organosselênio tiveram seus efeitos biológicos relatados por inúmeros pesquisadores. Esta pesquisa avaliou e demonstrou o potencial citotóxico e antiproliferativo desses dois grupos de compostos através de uma série de compostos híbridos (DHPMs-Se) derivados de selenoésteres e de dihidropirimidinona. Portanto, os resultados aqui apresentados indicam para as DHPMs-Se citotoxicidade superior à do monastrol. Além disso, em geral, os compostos híbridos 49A, 49E e 49H foram os que apresentaram maior seletividade para células não tumorais comparativamente ao monastrol. Entre esses três compostos, apenas 49H mostrou atividade antiproliferativa para células HepG2. Em relação ao tipo de morte celular induzida, esse composto promoveu a maior porcentagem de morte por apoptose, apoiada pela expressão aumentada das proteínas pró-apoptóticas p53 e BAX. Além disso, a expressão de HIF-1 α diminuiu após o tratamento com 49H. Esses resultados alinharam-se às simulações de DM, que previram claramente interações entre o DNA-49H que ocorreram durante um tempo suficiente para causar alguma interferência no arranjo estrutural do DNA. Tal evidência poderia explicar, parcialmente, a ocorrência de danos ao DNA os quais foram observados *in vitro*. Os ensaios moleculares com CT-DNA sugerem que 49H poderia promover alterações conformacionais na molécula de DNA (efeito hipocrômico) que foram capazes de causar o deslocamento do agente intercalante presente na macromolécula. De fato, o composto híbrido 49H causou fragmentação de DNA evidenciada pelo ensaio do cometa e apoiada pelo aumento de γ H2AX e expressão reduzida de PARP-1. Finalmente, 49H causou alteração na progressão do ciclo celular, aumentando a frequência das células na fase G1. A parada do ciclo no G1 pode ter sido resultado da menor fosforilação de RB bem como dos menores níveis de ciclina A. Todo o conjunto dos resultados apresentados para o composto 49H revelou seu potencial promissor para ser empregado como composto líder no desenvolvimento de novos fármacos a serem aplicados no tratamento de hepatocarcinoma. As conclusões deste estudo com HepG2 e DHPM-Se estão esquematizadas na figura 23 como possível mecanismo de ação para o composto 49H.

Figura 23 – Possível mecanismo de ação da atividade antiproliferativa do composto 49H sobre as células HepG2.



6 CAPÍTULO 3- DOCKING E DINÂMICA MOLECULAR PREVIRAM INTERAÇÕES ENTRE B-DNA E DIIDROPIRIMIDINONAS DERIVADOS DE SELENOÉSTERES QUE ELUCIDARAM EFEITOS ANTIPROLIFERATIVOS EM CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA (MCF-7)

6.1 INTRODUÇÃO

Globalmente, o câncer de mama tem a maior incidência e índice de mortalidade que afeta mulheres entre 30 e 74 anos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde por meio de relatórios do *Global Cancer Observatory* (WHO, 2018b). Adicionalmente, evidências indicam que a idade parece contribuir na incidência do tumor. Em mulheres com até 25 anos o surgimento é muito baixo (menos de 10 casos por 100.000 mulheres) e acima dos 45 a incidência aumenta até 100 vezes (HULKKA; MOORMAN, 2001). No Brasil, as estatísticas previstas pelo Instituto Nacional do Câncer apontam um expressivo aumento de 66.000 novos casos para o ano de 2020 (INCA, 2019). Uma quantidade significativa de dados tem revelado que o câncer de mama é uma doença multifatorial e sua progressão está profundamente relacionada aos contaminantes ambientais e estilo de vida pouco saudável. Potencialmente, esses fatores podem desencadear mutações genéticas críticas, as quais podem iniciar e conduzir as células cancerígenas à proliferação descontrolada (HAMER; WARNER, 2017).

Os protocolos de tratamento padronizados para câncer de mama incluem cirurgia, radioterapia, terapia hormonal e quimioterapia. No entanto, a quimioterapia continua sendo a mais utilizada em muitos países, incluindo o Brasil (CECILIO et al., 2015). O desenvolvimento de novos medicamentos antitumorais conta com os esforços contínuos de pesquisadores e da indústria farmacêutica. Todo esse esforço tem sido realizado com o objetivo de encontrar novos compostos líderes provenientes do isolamento de substâncias naturais ou obtidos por vias de síntese química.

Nesse cenário, as diidropirimidinonas (DHPMs) surgem como candidatas promissoras na arena de uma nova classe de compostos sintéticos com potencial antitumoral (KAUR et al., 2017). Além das propriedades biológicas já relatadas às DHPMs, sua síntese química multicomponente pode formar compostos diversificados e complexos quando são adicionadas variações de substituintes ao núcleo dos três reagentes (KAPPE, 2000).

Por outro lado, as células neoplásicas malignas diferem fisiologicamente das células normais para garantir a manutenção da tumorigênese. Hanahan e Weinberg apontaram marcadores para o câncer que juntos caracterizam transformações específicas dentro das células malignas (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Assim, para a obtenção de novos

quimioterápicos, os pesquisadores aproveitam essas diferenças durante o desenvolvimento de um fármaco com perfil de maior seletividade e eficiência. Nesse sentido, os alvos moleculares podem ser proteínas-chave superexpressas no ambiente do tumor, especialmente aquelas pertencentes a vias de sinalização que suportam a proliferação tumoral (CHANG et al., 2003). Além disso, compostos desenhados podem interagir e causar diferentes tipos de danos na molécula de DNA, uma vez que as células tumorais apresentam deficiências no mecanismo de reparo do DNA (CHEUNG-ONG; GIAEVER; NISLOW, 2013).

Ferramentas computacionais, como *docking* e dinâmica molecular, têm sido muito úteis para prever as interações entre moléculas-alvo e compostos líderes. Esses estudos teóricos *in silico* podem ser efetuados antes mesmo de realizar experimentos baseados em células mantidas *in vitro* ou ensaios moleculares (PINZI; RASTELLI, 2019). As previsões computacionais podem calcular a energia de ligação relacionada às interações entre o ligante e macromoléculas chave, especialmente proteínas ou sequência de DNA (CLARK et al., 2016; USMAN; AHMAD, 2017). Além disso, as previsões computacionais economizam tempo e reduzem os custos relacionados aos ensaios de triagem, especialmente durante as avaliações iniciais de várias séries de compostos sintetizados (DOMAN; 2002). Adicionalmente, estudos têm mostrado que as previsões *in silico* corroboram com os resultados da pesquisa experimental e enriquecem a interpretação dos dados coletados (KAUR; SUNDAR; SINGH, 2010).

Recentemente, o grupo de pesquisa do LABIOEX avaliou o potencial antiproliferativo de uma nova série de selenouréia pirimidínica contra a linhagem tumoral de adenocarcinoma de mama humana (MCF-7), que apresentou resultados promissores (BARBOSA et al., 2018). Nosso grupo de pesquisa tem avaliado rotineiramente a capacidade antiproliferativa e antitumoral de compostos naturais ou sintetizados. Portanto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial anticâncer *in vitro* de selenoésteres derivados da diidropirimidinona (DHPM-Se) investigando alguns mecanismos por trás das interações moleculares DHPM-Se com DNA observado *in vitro* e previsto *in silico*.

6.2 RESULTADOS

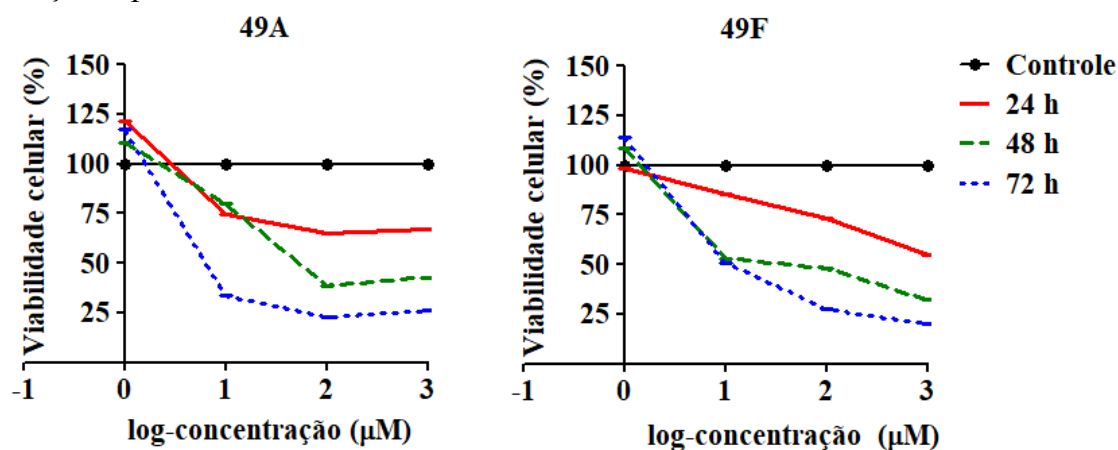
6.2.1 Citotoxicidade e seletividade dos DHPM-Se

A avaliação do potencial citotóxicos dos compostos pode ser observado na tabela 4. Utilizou-se o fármaco antitumoral 5-Fluorouracil (5-Fu) como controle positivo. Dentre os DHPM-Se analisados contra a linhagem tumoral (MCF-7), os compostos 49A e 49F foram mais citotóxicos e os que apresentaram os melhores índices de seletividade frente a linhagem não tumoral (McCoy). Por outro lado, o 5-Fu apresentou valores de IC₅₀ maiores que os dois compostos e não mostrou seletividade para a linhagem tumoral. Adicionalmente, vale ressaltar que os compostos 49A e 49F causaram redução da viabilidade das células MCF-7 de modo tempo e concentração dependentes como demonstrado na figura 24. Com base nos resultados obtidos através do MTT foi selecionado o tempo de 72 horas para os demais ensaios *in vitro* devido a maior reprodutibilidade e consistência dos resultados nesse tempo de exposição. Ademais, optou-se pelo uso de concentração subtóxica (IC₃₀) dos compostos 49A e 49F nos demais ensaios *in vitro*, devido ao fato destes compostos serem os mais seletivos.

Tabela 4 - Valores de IC₅₀ (µM) e índice de seletividade dos DHPM-Se (49A - 49H) em linhagem celulares MCF-7 e McCoy. Resultados expressos como a média de três experimentos independentes.

Composto	IC ₅₀ (µM)		Índice de Seletividade (IS)
	MCF-7	McCoy	MCF-7
49A	11,30	31,60	2,80
49B	25,40	17,80	0,70
49C	86,70	25,20	0,29
49D	73,95	13,40	0,18
49E	22,46	36,55	1,62
49F	5,46	18,07	3,30
49G	64,70	111,60	1,72
49H	50,85	38,70	0,76
5-FU	58,60	15,7	0,26

Figura 24- DHPM-Se reduzem a viabilidade das células MCF-7 de modo tempo e concentração dependentes.

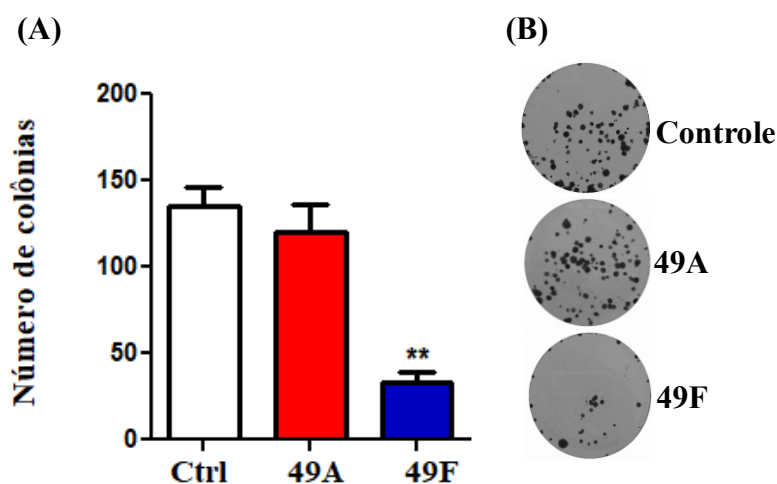


Curvas de resposta da viabilidade de células MCF-7 tratadas com DHPM-Se (49A e 49F) em diferentes concentrações (0,1; 1,0; 10; 100 e 1000 µM) por 24, 48 e 72 h, conforme determinado pelo ensaio colorimétrico do MTT. Os dados representam valores da média de três experimentos independentes.

6.2.2 DHPM-Se mais seletivo reduziu a formação de colônias em MCF-7

O ensaio colônia permitiu inferir sobre a capacidade antiproliferativa dos compostos testados. Ficou evidente, como apresentado na figura 25 que após a retirada do tratamento, o composto 49F demonstrou capacidade antiproliferativa reduzindo em mais de 300% o número de colônias formadas comparado ao controle. Por outro lado, as células tratadas com 49A recuperaram a capacidade proliferativa após a retirada do composto e não diferiram estatisticamente do número de colônias formadas pelas células no grupo controle. A exposição das células ao composto 49F não apenas reduziu numericamente a quantidade de colônias, mas também houve uma redução na quantidade de colônias maiores formadas

Figura 25 - O efeito supressor das DHPMs-Se na formação de colônias em células MCF-7.

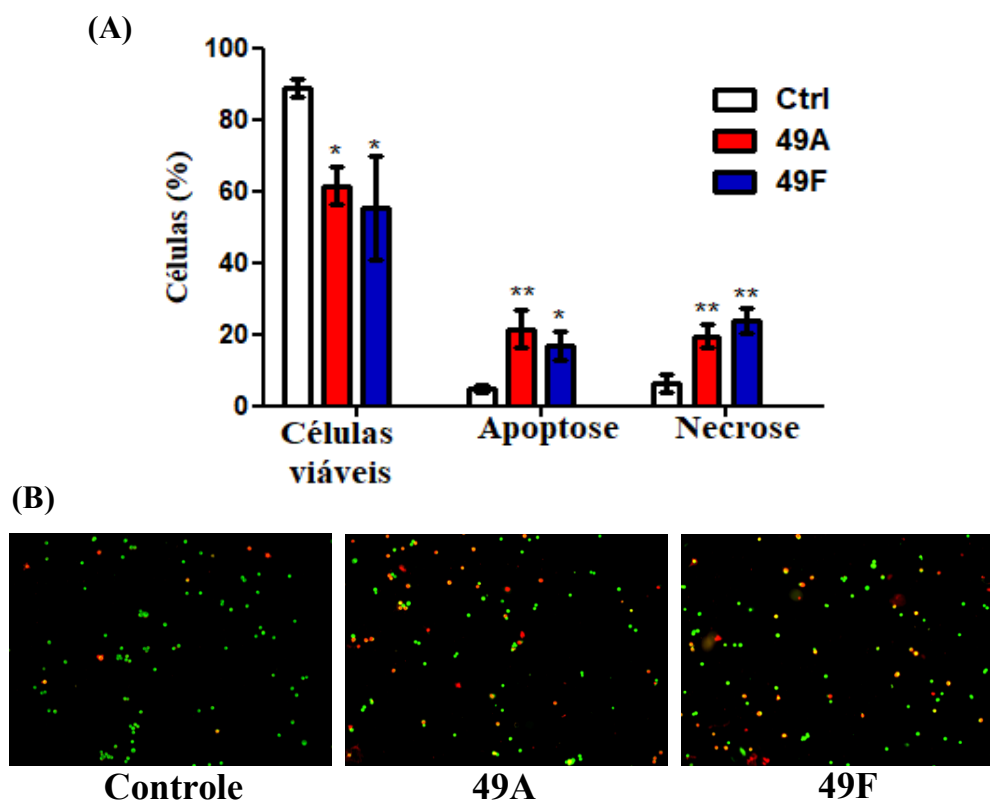


(A) Representação gráfica do número de colônias das células MCF-7 tratadas com 49A (7,0 μ M) e 49F (3,5 μ M) por 72 h. Os poços controles receberam meio de cultura acrescido de DMSO (1%) por 72 h. (B) Imagens representativas das colônias formadas nas placas dos diferentes tratamentos. (Os dados foram representados como Média \pm D.P. de três experimentos independentes. ** p < 0,01. Teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

6.2.3 DHPM-Se mais seletivos induziram apoptose e necrose em MCF-7

Com base nos resultados da formação de colônias no ensaio seguinte buscou-se compreender o tipo de morte que os compostos 49A e 49F causaram nas células MCF-7 após 72 de exposição usando a IC₃₀. O ensaio sobre o tipo de morte celular usando iodeto de propídeo e laranja de acridina permite diferenciar a quantidade de células viáveis, apoptóticas ou necróticas presentes em uma cultura celular após um determinado tratamento. Conforme observado na figura 26, os compostos 49A e 49F reduziram a proporção de células viáveis e induziram os dois tipos de morte celular. Comparado ao controle o composto 49A elevou a frequência de células em apoptose em 450% e o composto 49F em 350%. Contudo, ambos compostos aumentaram também de modo significativo a frequência de necrose. O composto 49A elevou em mais 3 vezes a frequência de células necróticas e o 49F em 3,5 vezes mais se comparado ao tratamento controle.

Figura 26- Quantificação de células viáveis, apoptóticas e necróticas.



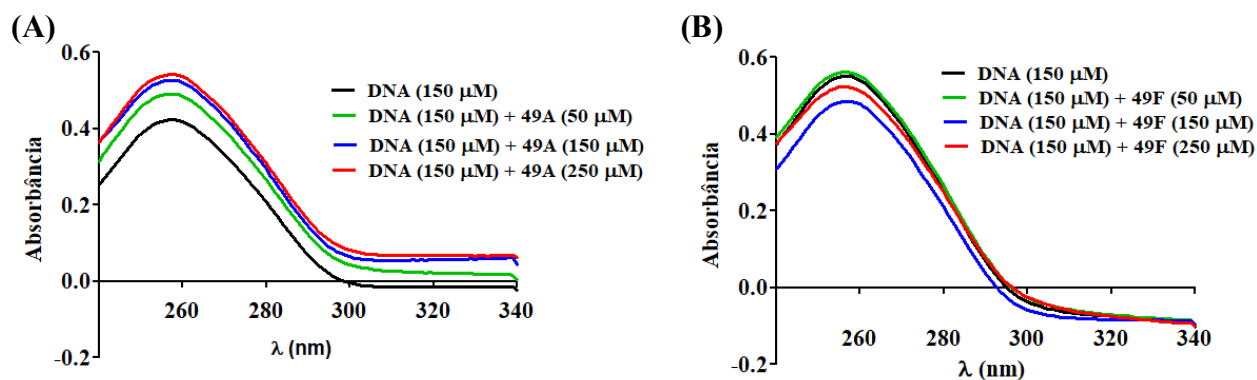
(A) Porcentagem do tipo de morte celular em células MCF-7 após tratamento com 49A (7,0 μM) e 49F (3,5 μM) por 72 h. Os poços controles receberam meio de cultura acrescido de DMSO (1%) por 72 h. (Os dados foram representados como Média \pm D.P. de três experimentos independentes. ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$. Teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni).

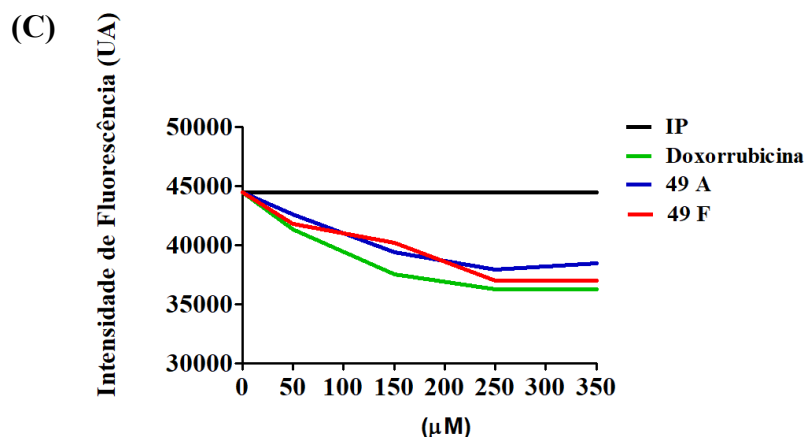
6.2.4 DHPM-Se interagiram com CT-DNA e descolaram agente intercalante

Avaliou-se a capacidade dos compostos mais seletivos (49A e 49F) de interagirem com a molécula de CT-DNA através de dois ensaios diferentes. Primeiramente, o ensaio de interação analisado por espectrofotometria de varredura revelou um perfil de absorvância diferenciado para o CT-DNA na ausência ou na presença dos compostos. As alterações observadas de acordo com as diferentes concentrações dos compostos sugerem interações que promoveram mudanças conformacionais na molécula de CT-DNA. Conforme observado na figura 27A o perfil de absorvância do CT-DNA na presença do composto 49A indica efeito hipercrômico mais acentuado na maior concentração do composto (250 μM). Por outro lado, alterações na absorvância do DNA apontam um efeito hipocrômico para o composto 49F (figura 27B) evidenciado na concentração intermediária do composto (150 μM).

No segundo ensaio avaliou-se a capacidade dos compostos em deslocar o agente intercalante iodeto de propídeo no CT-DNA. Além dos compostos 49A e 49F usou-se a doxorrubicina com controle positivo para o ensaio. O iodeto de propídeo ao intercalar no CT-DNA tem a sua fluorescência aumentada. Porém quando ele é descolado por algum outro composto competidor há uma queda da intensidade de fluorescência. Como demonstrado na figura 27C, tanto os dois DHPM-Se quanto a doxorrubicina reduziram a intensidade de fluorescência após um período de incubação com o CT-DNA e o iodeto de propídeo. Ademais, a perda da fluorescência foi mais destacada nas maiores concentrações dos compostos.

Figura 27- Efeito dos compostos 49A e 49H sobre o CT-DNA.





Perfil de absorção do CT-DNA na ausência ou na presença dos compostos 49A (A) e 49F (B) em diferentes concentrações. (C) Ensaio de intercalação usando CT-DNA (150 mM) saturado com iodeto de propídio (300 µM) e posteriormente exposto a concentrações crescentes de 49A e 49F (50 ou 150 ou 250 ou 350 µM). Doxorubicina foi usada como controle positivo.

6.2.5 Estudos *in silico* previram interações entre DHPM-Se e o B-DNA

Após os ensaios moleculares com CT-DNA foram realizados estudos envolvendo *docking* e dinâmica molecular para auxiliar na elucidação de possíveis mecanismos moleculares envolvidos. Adicionalmente, foi possível prever e identificar alguns dos átomos dos resíduos de nucleotídeos e dos ligantes envolvidos nas ligações de hidrogênio, nas interações com o solvente e nas interações hidrofóbicas calculadas.

Durante o processo das simulações de *docking* molecular foram geradas poses com valores similares entre si para a energia de afinidade de ligação e pequenas variações nos valores de RMSD para cada complexo. Os dados contidos na tabela 5 são referentes a pose 1 que apresentou a menor energia de afinidade de ligação calculada para cada ligante. A energia de afinidade de ligação do ligante 49F (-34,727 kJ/mol) foi mais favorável quando comparada à do ligante 49A (-30,961 kJ/mol) que foi um pouco maior. As coordenadas destes ligantes nas poses 1 foram utilizadas na dinâmica molecular. Além disso, as interações hidrofóbicas e as ligações de hidrogênio foram previstas para cada ligante, sendo a ocorrência destas ligações em maior quantidade entre o complexo B-DNA-49A.

Tabela 5 - Poses previstas para cada ligante (49A e 49F) complexado com B-DNA (PDB ID 5T4W) calculadas pelo Auto Dock Vina (*Docking* molecular) e GROMACS (DM - Dinâmica molecular).

Ligante Pose 1	Energia de afinidade (kJ/mol)		Interações hidrofóbicas	Ligações de Hidrogênio	RMSD	Resíduos envolvidos nas ligações de H previstas		
						Docking	DM	
	Vina	<i>Score only</i>				AutoDock tools/ Vina	GROMACS	
49A	-30,961	-30,999	2,422	3,059	0,000	DG4	DC 23	DG24
49F	-34,727	-34,894	2,526	1,458	0,000	DG4	DG4	

A dinâmica molecular previu as principais energias envolvidas que auxiliam na estabilidade entre o ligante e o B-DNA. Conforme indicado na tabela 6 foi possível verificar que para o composto 49F foram obtidos valores de energias mais favoráveis para a manutenção do sistema comparativamente aos valores calculados para o 49A. Adicionalmente, o GROMACS calculou para cada ligação de hidrogênio prevista a taxa de ocupação das mesmas durante o tempo de simulação. Embora as simulações tenham previsto um maior número de ligações de hidrogênio para o ligante 49A estas apresentaram uma taxa de ocupação muito pequena comparativamente àquela prevista entre o resíduo de nucleotídeo DA6 e o ligante 49F.

Tabela 6 - Energias calculadas relacionadas a cada ligante complexado com B-DNA após aplicação do método MM-PBSA e GROMACS (SASA *Free Solvation Energy*) e ligações de Hidrogênio previstas por GROMACS.

Complexo	Média ± Erro padrão (kJ / mol)	
Ligante-B-DNA	49A	49F
van der Waals	-123,098 ± 0,503	-174,096 ± 0,718

Continuação

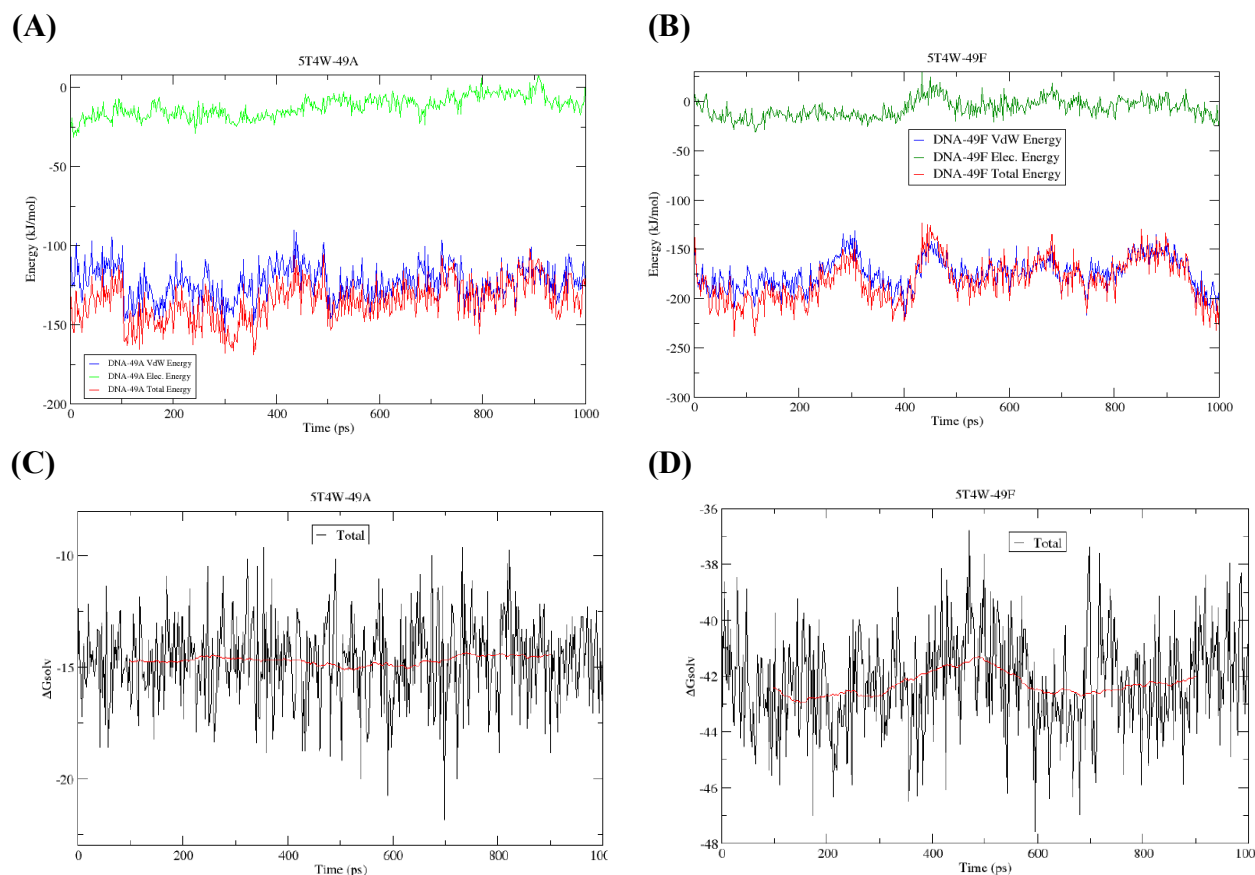
	Eletrostática	-12,252 ± 0,303	-7,467 ± 0,433
Energias	Solvatação Polar	16,310 ± 0,51	19,181 ± 0,793
Calculadas	Solvatação Apolar SASA	-12,996 ± 0,049	-12,574 ± 0,050
	Energia de ligação	-132,004 ± 0,574	-174,959 ± 0,790
	Energia livre de solvatação SASA ^{GROMACS} (ΔG_{solv})	-14,878 ± 1,597	-43,443 ± 2,193

Ligações de H previstas entre as moléculas (átomos envolvidos)

Ligantes	Doador	Aceptor	Taxa de ocupação das ligações de H (%)
49A	49A - (HN1)	DA5 - (O4')	4,8
	49A - (HN1)	DG4 - (O3')	0,6
	49A - (HN)	DG24 - (O1P)	5,0
	49A - (HN)	DC23 - (O3')	0,4
49F	49F (H1)	DA6 - (O4')	0,2
	49F (H1)	DA6 - (O1P)	0,2
	DG4 (H21)	49F - (O2)	90,0

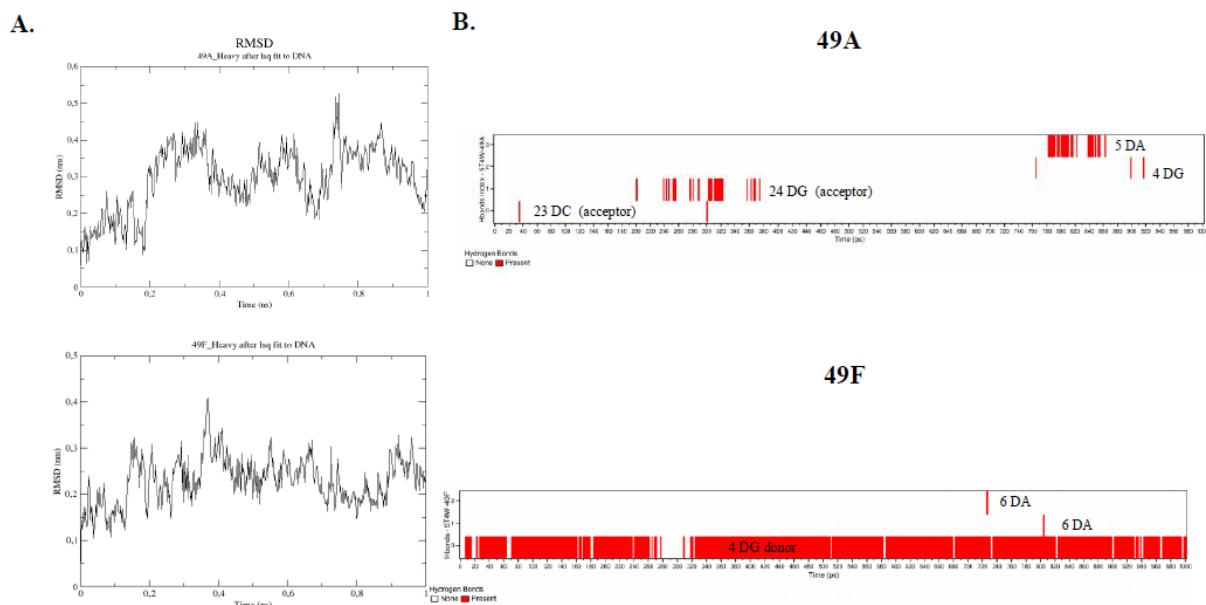
Além disso, a estabilidade entre cada ligante complexado com B-DNA foi confirmada através dos valores da energia mecânica molecular e da energia livre de solvatação SASA previstas para 49A (Figura 28 A e C) e 49F (Figura 28 B e D), respectivamente. Como demonstrado pelos gráficos, os valores mais energeticamente favoráveis ao sistema foram obtidos para o complexo formado entre o B-DNA e o ligante 49F reforçando a melhor afinidade obtida para este ligante nos ensaios preliminares de *docking*.

Figura 28- Energia molecular mecânica relacionada a cada ligante complexado com B-DNA calculada pelo método MM-PBSA (A e B). GROMACS calculou a energia livre de solvatação SASA (ΔG_{solv}) relacionada ao complexo ligante-B-DNA (C e D).



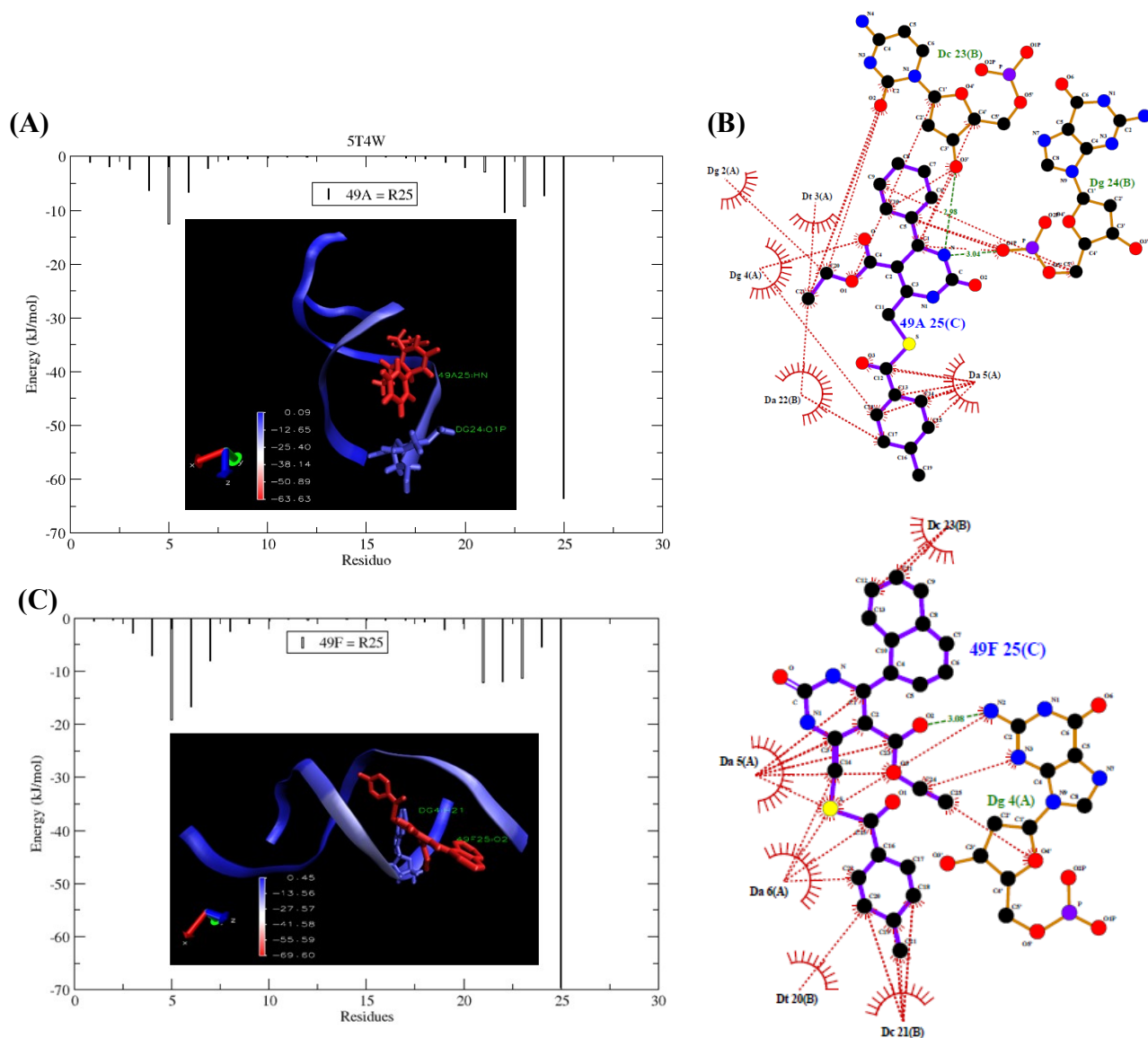
Os cálculos realizados pelo GROMACS mostraram pequenas variações do RMSD (*Root Mean Square Deviation*) para os ligantes durante o tempo de simulação. Como observado na figura 29A essas variações são o reflexo das ligações de hidrogênio que se formam entre o complexo B-DNA e os ligantes durante a simulação. A presença destas ligações e a taxa de ocupação das mesmas durante a realização da dinâmica molecular possibilitou a geração de mapas de existência como os que estão representados na figura 29B.

Figura 29 - (A) Representação das variações de RMSD para os ligantes 49A e 49F. (B) Mapa de existência das ligações de hidrogênio previstas em alguns frames durante o tempo de simulação (1000 ps) para os ligantes 49A e 49F.



A figura 30 demonstra que durante a formação do complexo foi possível estabelecer a contribuição energética de cada resíduo do B-DNA e para cada ligante individualmente. Para o ligante 49A (figura 30 A) foi predito um valor de energia de contribuição um pouco menos favorável quando comparado ao 49F (figura 30 C). As menores energias coincidiram com o resíduo do B-DNA que estabeleceu a ligação de hidrogênio com maior taxa de ocupação com o ligante 49F (figura 30 C e D). Além das ligações de hidrogênio, as interações hidrofóbicas previstas e visualizadas com o LigPlot⁺ contribuíram em conjunto na estabilização do complexo B-DNA-ligante 49A (figura 30 B) e do complexo B-DNA-ligante 49F (figura 30 D).

Figura 30 - Contribuição de energia por resíduo de B-DNA (PDB ID 5T4W) e ligantes 49A (A) e 49F (C). Representação pelo LigPlot⁺ das interações previstas entre o complexo B-DNA após simulações de dinâmica molecular para o ligante 49A (B) e ligante 49F (D).



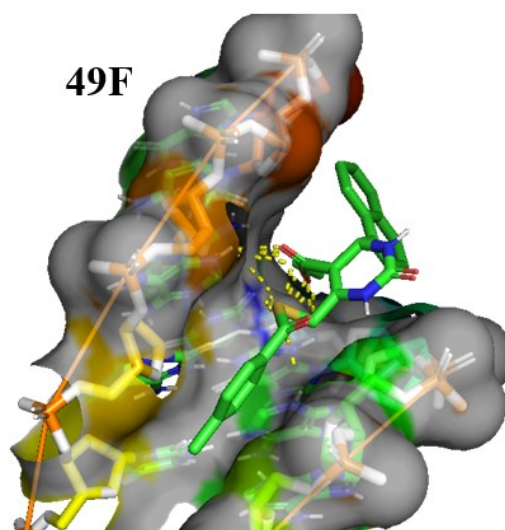
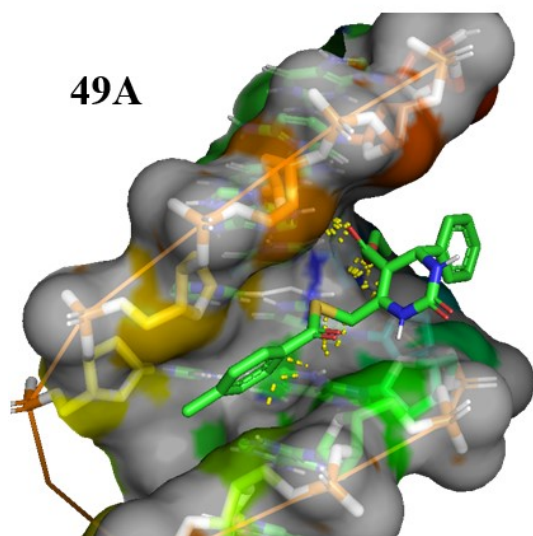
Ligações de hidrogênio destacadas pelas linhas tracejadas verdes e interações hidrofóbicas indicadas pelas linhas tracejadas vermelhas. As moléculas do solvente foram removidas para facilitar a visualização.

Por fim, as simulações de *docking* (figura 31 A) e de dinâmica molecular (figura 31 B) previram que ambos os compostos poderiam interagir com o B-DNA (5T4W) como ligantes de fenda menor. Embora tenha sido previsto o mesmo tipo de interação com o DNA para os dois ligantes, é provável que a condição mais energeticamente favorável e a maior taxa de

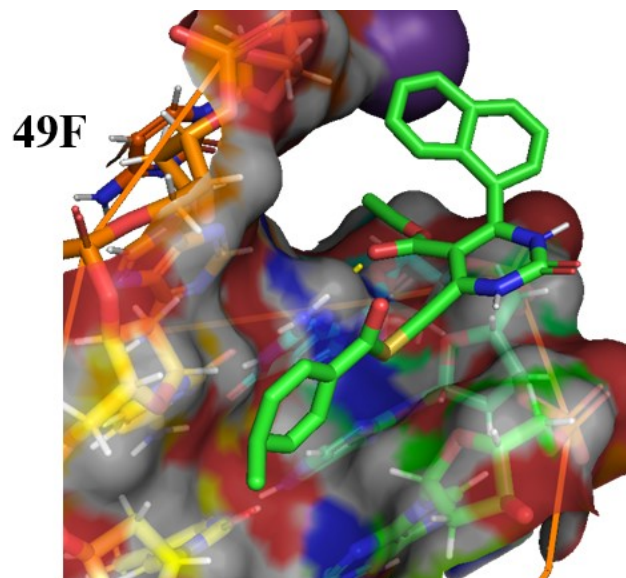
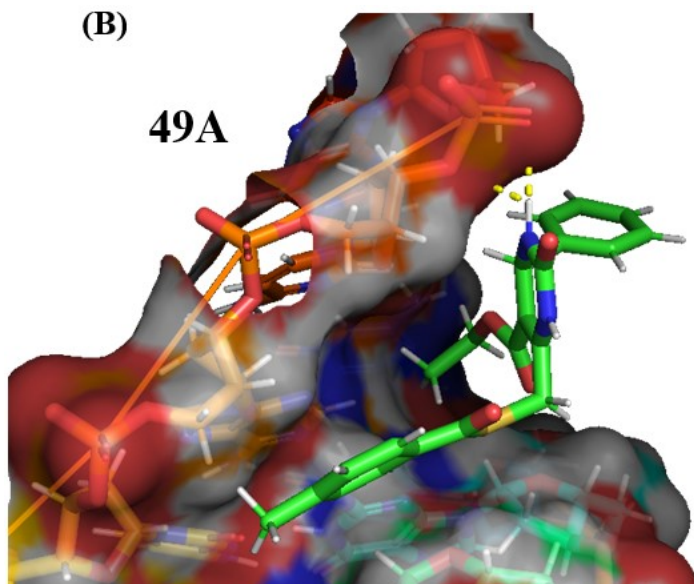
ocupação da ligação de hidrogênio possa conferir ao 49F uma interação mais duradoura e mais estável enquanto estiver na fenda menor.

Figura 31 - Representação gráfica do complexo formado pelo B-DNA e pelos ligantes 49A ou 49F interagindo na fenda menor conforme previsto pelos programas AutoDock tools/ Vina (A) e GROMACS (B).

(A)



(B)



6.2.6 Predição das propriedades ADMET para os compostos 49A e 49F

Após as análises *in vitro* e *in silico* para os dois compostos foram efetuadas avaliações empregando softwares para determinar algumas das propriedades destes compostos que os qualificam como futuro fármacos. Para tanto, foram utilizadas duas plataformas de bioinformática a SwissADME que avaliou os perfis de absorção, de distribuição, de metabolismo e de excreção (ADME) e a ADMETlab por meio da qual foi possível obter valores referentes à toxicidade dos compostos. As propriedades dos compostos indicadas por estas plataformas são apresentadas nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7 - Propriedades dos compostos 49A e 49F indicadas pelo SwissADME.

Propriedades físico-químicas		
	49A	49F
Peso molecular (PM)	460,40 g/mol	507,44 g/mol
Nº de ligações rotacionáveis (LR)	7	8
Nº de aceptores para ligação de H	4	4
Nº de doadores para ligação de H	3	2
Refratividade molar (RM)	120,23	135,32
TPSA ¹	95,50 Å ²	98,33 Å ²
Lipofilicidade		
Log $P_{o/w}$ (iLOGP)	0,00	0,00
Log $P_{o/w}$ (XLOGP3)	2,79	4,47
Log $P_{o/w}$ (WLOGP)	1,85	3,20
Log $P_{o/w}$ (MLOGP)	2,33	2,92
Log $P_{o/w}$ (SILICOS-IT)	0,99	3,73
Consenso Log $P_{o/w}$	1,59	2,86
Farmacocinética		
Absorção GI ²	Elevada	Elevada
Permeabilidade BHE ³	Não	Não
Substrato P-gp ⁴	Sim	Sim
Inibidor CYP1A2	Não	Não
Inibidor CYP2C19	Não	Não
Inibidor CYP2C9	Não	Sim
Inibidor CYP2D6	Não	Não
Inibidor CYP3A4	Sim	Sim
Semelhança a fármaco		
Lipinski	Sim; 0 violação	Sim; 1 violação: PM>500
Ghose	Sim	Não; 2 violações: PM>480, RM>130
Veber	Sim	Sim

Continuação

Egan	Sim	Sim
Muegge	Sim	Sim
Pontuação de biodisponibilidade	0,56	0,56

Química medicinal

Alerta PAINS ⁵	0 alerta	0 alerta
Alerta Brenk	1 alerta: metal pesado	1 alerta: metal pesado
Propriedade de composto líder	Não; 1 violação: PM>350	Não; 3 violações: PM>350, LR>7, XLOGP3>3.5
Acessibilidade sintética	4,68	4,79

Nota: ¹ - Área de superfície polar total; ² - Gastrointestinal; ³ - Barreira hematoencefálica; ⁴ - Glicoproteína-P; ⁵ - Compostos de interferência do ensaio Pan.

Tabela 8- Parâmetros de toxicidade previstos para os compostos 49A e 49F através do ADMETlab.

		Toxicidade			
		49A		49F	
		Categoria	Probabilidade	Categoria	Probabilidade
Ames		0	0,184	0	0,238
Sensibilização da pele	da	0	0,259	0	0,236
DILI ¹		1	0,712	1	0,716
FDAMDD ²		0	0,436	0	0,342

Nota: ¹- Dano no fígado induzido por fármaco (*Drug Induced Liver Injury*); ² - Dose diária máxima recomendada (*FDA Maximum Recommended Daily Dose*).

6.3 DISCUSSÃO

O ensaio do MTT revelou que dos oito DHPM-Se estudados, metade deles (49A, 49B, 49E e 49F) foi mais citotóxica para as células de adenocarcinoma mamário humano (MCF-7) que o fármaco de referência o 5-Fu. Com relação a linhagem não tumoral de fibroblastos, somente os compostos 49A e 49F apresentaram um índice de seletividade maior que 2, sendo que o 5-Fu não apresentou seletividade (Tabela 4). Ademais, ficou evidente que os dois compostos mais seletivos reduziram a viabilidade celular de MCF-7 de modo tempo e concentração dependentes (Figura 24). Contudo, ficou estabelecido o tempo de 72 h para os demais ensaios com MCF-7 por melhor reprodutibilidade dos resultados usando esse tempo de exposição aos compostos.

Segundo Badisa e colaboradores (2009) compostos promissores para candidatos a fármacos devem apresentar índice de seletividade maior que 2. Desse modo, os demais ensaios foram realizados somente com os compostos 49A e 49F.

Um composto antitumoral não deve apenas reduzir a viabilidade das células cancerígenas, mas também deverá interferir na capacidade replicativa das células levando a redução da área do tumor. A grande versatilidade química das DHPMs em formar diferentes compostos torna possível a confirmação de inúmeros efeitos biológicos já descritos para essa classe de compostos (FÁTIMA et al., 2015). Isto representa uma vantagem em termos de desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. De fato, há pouco anos, Kaur e colaboradores (2017) relataram em uma revisão a capacidade anticâncer reconhecida das DHPM por inibirem o crescimento tumoral em linhagens de cólon, de mama, de leucemia e de glioma. Corroborando com esses achados, os resultados da presente pesquisa demonstraram a atividade antiproliferativa dos compostos testados. Contudo o ensaio colônia demonstrou que somente o composto 49F foi capaz de reduzir a formação de colônias quando comparado ao controle (Figura 25). Esta redução não somente em termos de quantidade total de colônias, mas também na diminuição da área de colônias. De acordo com Santos e colaboradores (2020), a determinação das áreas individuais das colônias permite classificar as colônias por tamanho e, desse modo, permite a diferenciação entre os dois efeitos principais dos compostos nas células (efeito citotóxico ou antiproliferativo) e também possibilita o cálculo do índice clonogênico. Para esses pesquisadores, a contagem das colônias e as medidas da área total estão fortemente correlacionadas ao índice clonogênico, que seria o modo mais sensível em diferenciar as pequenas variações nas condições de tratamento.

Em células normais ocorre um controle cuidadoso da produção e na liberação de sinais promotores do crescimento que conduzem a progressão no ciclo celular por meio do crescimento e da divisão da célula. Porém, nas células cancerígenas esse controle fino do ciclo celular é perdido, caracterizando a proliferação crônica sustentada (HANAHAN; WEINBERG, 2011). O composto 49F difere estruturalmente do 49A por possuir um grupo funcional naftil ligado ao núcleo de diidropirimidinona. Pode-se inferir que essa diferença estrutural entre esses dois compostos tenha refletido no potencial antiproliferativo diferenciado apresentado pelo composto 49F. Barbosa e colaboradores (BARBOSA et al., 2018) testaram uma série de novas selenouréias pirimidínicas e verificaram que o composto contendo o grupo naftil foi o mais promissor da série e causou parada do ciclo celular aumentando o número de células MCF-7 em Sub-G1. Possivelmente a redução no número de colônias tenha sido uma consequência de interferência do composto 49F sobre o ciclo celular.

O ensaio para diferenciar o tipo de morte, apresentado na figura 26, demonstrou que ambos compostos induziram nas células MCF-7 morte por apoptose e também por necrose. Compostos antitumorais reconhecidamente provocam morte celular preferencialmente através de apoptose. Cabe destacar que os compostos 49A e 49F foram capazes de suplantar alguns dos mecanismos moleculares que as células tumorais apresentam para suprimir a apoptose (LOPEZ; TAIT, 2015). Se por um lado a apoptose é considerada um tipo de morte limpa, a necrose, por outro lado, gera resposta inflamatória que poderia afetar células vizinhas saudáveis em torno de uma massa tumoral (BELIZÁRIO; VIEIRA-CORDEIRO; ENNS, 2015). Embora não tenha havido diferença estatística entre os dois compostos em relação aos tipos de morte analisados, dados da literatura apontam que o naftaleno e seus intermediários podem causar maior toxicidade para determinados tipos de células em cultura (KAPUCI et al., 2014).

Os antitumorais podem atuar em diferentes alvos moleculares para levarem as células cancerígenas a morte. Um desses alvos é o próprio DNA das células tumorais. Diferentes formas de interação entre compostos antitumorais com o DNA da célula podem sinalizar para parada do ciclo celular e induzir morte celular por apoptose (SAMADDER; BELAN; KREJCI, 2016). De fato, interações foram observadas após a exposição de CT-DNA aos compostos DHPM-Se que promoveram alterações diferenciadas no perfil de absorbância do CT-DNA na presença dos compostos. A análise do espectro de absorção UV-Vis revelou um perfil hiperacrômico na presença do 49A e um efeito hipocrômico sobre o CT-DNA na presença do 49F (Figura 27 A e 27 B). Estudos sugerem que o hiperacromismo é mais

indicativo da ocorrência de ligações não covalentes de um determinado composto ao DNA e que sejam capazes de causar apenas alterações conformacionais. Por outro lado, o perfil hipocrômico gerado pela interação de certos compostos com o CT-DNA sugerem a intercalação entre os pares de bases da macromolécula (SIRAJUDDIN; ALI; BADSHAH, 2013). Vale ressaltar que o composto 49F possui o grupo funcional naftil em sua estrutura e de fato, trabalhos demonstram que o naftaleno e seus derivados podem intercalar na molécula de DNA por meio de interação com a guanina, seguido das demais bases nitrogenadas (CHO et al., 2013).

O outro ensaio molecular com o CT-DNA foi o de intercalação utilizando o iodeto de propídeo. Neste ensaio a adição de um composto que se liga ao CT-DNA poderá resultar em uma diminuição na fluorescência devido ao deslocamento do intercalador ligado. O percentual da diminuição da fluorescência está diretamente relacionado à extensão da ligação (TSE; BOGER, 2004). Neste caso, a adição dos compostos 49A e 49F causou a diminuição na fluorescência do iodeto de propídeo (IP) possivelmente pelo deslocamento deste intercalante fluorescente (figura 27 C). Tal deslocamento certamente resultou de interações de cada DHPM-Se com o CT-DNA. Provavelmente, estes compostos atuaram como competidores com o IP o que ocasionou a perda da interação deste com o CT-DNA e, conseqüentemente, causou a diminuição da fluorescência mensurada. Como controle positivo de intercalação foi utilizado a doxorubicina, um fármaco antitumoral com capacidade intercalante reconhecida (CHEN et al., 2012) que forneceu uma base de comparação para os resultados obtidos com os dois compostos.

Compostos e pequenas moléculas podem interagir com o DNA sem necessariamente causar a clivagem da macromolécula. De fato, foram relatados tipos de interações que podem ocorrer tais como interações eletrostáticas, ligação covalente, ligação nos sulcos e intercalação (ERDEM; OZSOZ, 2002). Tais interações podem resultar em alterações na estabilidade termodinâmica, capazes de promover mudanças nas propriedades funcionais do DNA (GRAVES; VELEA, 2000). Portanto, seria razoável supor que as interações dos compostos observadas nos ensaios moleculares com o CT-DNA e preditas *in silico* poderiam causar algum tipo de distorção na molécula suficiente para desestabilizar a interação entre IP e o CT-DNA.

Neste sentido, estudos computacionais permitem prever os tipos de interações moleculares entre macromoléculas e pequenos ligantes (LEMKUL, 2019). Por esta razão, têm recebido grande aceitação nos últimos anos por parte de pesquisadores. Esses ensaios podem

apresentar vantagens quando aplicados de maneira preliminar aos demais tipos de ensaios. Assim, importantes informações podem ser reveladas quando os estudos *in silico* forem aplicados na forma de *screening* inicial para a pré-seleção de compostos de uma série de síntese com maior potencial de tornar-se um novo fármaco.

Por outro lado, no caso do presente trabalho, as simulações foram realizadas *a posteriori* utilizando o template de B-DNA (PDB 5T4W). Durante a realização do *docking* molecular várias poses foram obtidas. Porém, na pose 1 foram previstas as energias de afinidade de ligação mais favoráveis para a estabilidade do complexo para ambos os compostos conforme demonstrado na tabela 5. Contudo, entre os dois compostos a melhor energia de ligação foi indicada para o 49F. Através dos estudos de *docking* e de dinâmica molecular foram previstas ligações de hidrogênio entre o complexo B-DNA-ligante.

Com relação aos tipos de energias envolvidas no complexo (Tabela 6), para o ligante 49F a maior contribuição para a energia de ligação molecular mecânica veio da energia de van Der Waals (-174,096 kJ/mol). Esta contribuição também ocorreu para o 49A porém com maior valor (-123,098 kJ/mol).

Ademais, para este ligante, a energia livre de solvatação SASA (-43,443 kJ/mol) mostrou que para haver a sua solvatação no ambiente aquoso na caixa de simulação obtida (modelo de água TIP3P) seria necessário fornecer mais energia para descontinuar o complexo formado entre o B-DNA- 49F comparativamente à necessária para solvatar o ligante 49A (-14,878 kJ/mol). A energia livre de solvatação SASA (Área de Superfície Acessível ao Solvente) pode ser entendida como a energia necessária para mover uma molécula de um ambiente polar (aquoso) para um ambiente não polar como no caso da região das bases apolares do DNA. Essa energia tem impactos diretos na predição da estrutura secundária de macromoléculas como as proteínas (MOMEN-ROKNABADI et al., 2008) e ácidos nucleicos (CONNOLLY, 1983). Adicionalmente, o GROMACS calculou a contribuição energética de cada resíduo do B-DNA e de cada ligante envolvido no complexo. Como esperado a melhor energia do complexo se deu na região onde os ligantes estabelecem as interações com o B-DNA.

O algoritmo do Vina previu uma ligação entre o B-DNA-49A enquanto o GROMACS predisse quatro ligações de hidrogênio entre as bases DA5; DG4; DG24 ou DC23 todas com taxas de ocupação muito pequenas (4,8; 0,6; 5,0 e 0,4 %, respectivamente). Enquanto que para o complexo B-DNA-49F tanto o *docking* quanto a dinâmica indicaram uma ligação de hidrogênio entre o ligante 49F (átomo O2; acceptor de hidrogênio) e a base DG4 (cadeia A)

(átomo H21; doador de hidrogênio) e outras duas ligações de hidrogênio com ocupação insignificante com o resíduo de nucleotídeo DA6. Embora as simulações tenham apontado apenas uma ligação de hidrogênio para o 49F, a taxa de ocupação prevista para esta ligação foi elevada (90%) durante o intervalo tempo da simulação (Tabela 6).

Na busca pelo modo de ligação correto de um ligante a um receptor, estudos de *docking* molecular são frequentemente definidos como precisos quando o cálculo de RMSD apresenta um valor inferior a 2,0 Å (GOTO et al., 2008). Ao observar os gráficos de RMSD (Figura 29) pode-se perceber que eles refletiram em grande medida a estabilidade das ligações de hidrogênio durante o tempo da simulação. As menores variações nos valores de RMSD foram determinadas para o ligante 49F que apresentou maior taxa de ocupação das ligações de hidrogênio do que as previstas para o ligante 49A.

Observando-se as imagens 2D geradas pelo LigPlot⁺ (Figura 30 B e 30 D) foi possível confirmar os átomos envolvidos nas interações intermoleculares mais importantes como as interações hidrofóbicas. Embora sejam consideradas fracas, quando em conjunto as interações hidrofóbicas cooperam na estabilização do complexo e podem contribuir para potencializar o efeito do ligante. Para o complexo formado pelo ligante 49A foram previstas cinco interações para o frame de 315 ps (cadeia A: DG2, DT3, DG4 e DA5; cadeia B: DA22). De igual modo cinco interações hidrofóbicas foram calculadas para complexo formado pelo ligante 49F no frame de 730 ps (cadeia A: DA5 e DA6; cadeia B: DT20, DC21 e DC23). Além do mais, a maior contribuição individual por resíduo no complexo formado ocorreu para os ligantes 49A e 49F quando comparadas com as energias de contribuição dos resíduos de nucleotídeos reforçando a condição favorável de interação entre os ligantes e os nucleotídeos do B-DNA.

Alguns agentes antineoplásicos interagem com os pares de bases nitrogenadas de modo reversivo por meio de contatos de van der Waals, interações eletrostáticas e, sobretudo, ligação hidrogênio. Estas interações podem causar alteração conformacional tipo iso-hélicas onde os ligantes são classificados como moléculas ligantes na fenda menor do B-DNA (NEIDLE, 2001).

Conforme apresentado na figura 31, tanto o AutoDock tools/ Vina quanto as simulações com o GROMACS previram que os ligantes podem interagir com B-DNA atuando como ligantes de fenda menor. Este fato reforça o resultado do ensaio de intercalação com o CT-DNA. Pode-se supor que, ao ligar-se no sulco menor os compostos poderiam promover distorções na molécula de DNA que seriam suficientes para desestabilizar a interação do iodeto de propídeo reduzindo a fluorescência. Além disso, as previsões

calculadas pelo *docking* e pela dinâmica molecular durante o tempo de simulação indicaram uma interação mais estável e mais energeticamente favorável entre o B-DNA e o ligante 49F.

Muitos trabalhos têm se valido do uso de *docking* e da dinâmica molecular para elucidar resultados de ensaios *in vitro* e moleculares. Em um estudo que avaliou a inibição da proteína Eg5 por análogos do monastrol, a análise dos resultados do *docking* revelou que a formação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas foram as principais responsáveis pelo efeito inibitório desses compostos observado *in vitro* (ABNOUS et al., 2013).

No caso do presente trabalho, pode-se claramente perceber que os resultados obtidos *in silico* ajudaram esclarecer parcialmente os mecanismos moleculares associados com a capacidade antiproliferativa para célula MCF-7 confirmada apenas para o composto 49F.

A seleção dos melhores compostos de uma série de síntese pode contar com a contribuição de algoritmos e programas para o cálculo de parâmetros importantes em termos farmacológicos que caracterizam a qualidade e o potencial desses compostos como futuros fármacos. Portanto, os perfis de absorção, de distribuição, de metabolismo e de excreção (ADME) são imprescindíveis para avaliar um candidato a fármaco. Desse modo, os compostos 49A e 49F foram submetidos a duas plataformas de bioinformática SwissADME (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017) e ADMETlab (DONG et al., 2018). Estas plataformas reúnem um extenso banco de dados sobre as características físico-químicas, propriedades farmacocinéticas e toxicidade de moléculas já usadas como fármacos na clínica médica e comparam com a estrutura química das novas moléculas candidatas.

O SwissADME adota 5 critérios (Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge), cada um com regras próprias, que servem para indicar se um composto apresenta semelhança com fármacos em relação a biodisponibilidade oral. Conforme mostrado na tabela 7 o SwissADME não indicou nenhuma violação no quesito “druglikeness” (semelhante a fármaco) para o 49A dentre os 5 critérios disponíveis. Enquanto o 49F apresentou uma violação dentre as 5 regras de Lipinski (peso molecular superior a 500) e segundo os critérios de Ghose não seria um composto com “semelhança com fármacos” pois apresentou duas violações (peso molecular superior a 500 e refratividade molar superior a 130). Contudo não ser aprovado nas regras de Ghose não exclui o 49F de se tornar um fármaco, uma vez que a Doxorubicina seria reprovada em todos os 5 critérios como um composto candidato a fármaco. Adicionalmente, na categoria química medicinal, para o composto 49A foi indicada uma violação (peso molecular superior a 350) e para o 49F três violações (peso molecular superior a 350, ligações rotacionáveis superior a 7 e XLOGP3 superior a 3,5).

Em relação às propriedades farmacocinéticas, os dois compostos podem servir como substrato para glicoproteína-P (Pg-P), o que indica a chance de serem bombeados para fora da célula e assim, reduzir o efeito intracelular desses compostos. A Pg-P é uma das mais importantes proteínas envolvidas com a resistência múltipla a fármacos (MDR – *Multi Drug Resistance*), um dos mecanismos responsáveis pela ação pouco eficiente de alguns quimioterápicos (BURGER; NOOTER, 2004).

Adicionalmente, os dois compostos poderiam causar inibição da CYP3A4, uma das isoformas mais importantes dentre as enzimas da família do citocromo P450. Esta isoforma é a mais abundante em fígado adulto, sendo responsável por metabolizar mais de 50% dos fármacos usados. Alguns agentes quimioterápicos usados clinicamente no tratamento do câncer servem como substratos para CYP3A4 (HARMSSEN, et al. 2007). Aparentemente a capacidade de inibir a CYP3A4 representaria um aspecto negativo para compostos 49A e 49F. Contudo, com certa frequência, a CYP3A4 facilita a depuração sistêmica de quimioterápicos, ocasionando às vezes a redução da eficiência ou mesmo a falha do tratamento. Em alguns casos, substratos para a CYP3A4 também servem como indutores transcricionais de seu gene, resultando em aumento da atividade e, portanto, aumentando a depuração do fármaco indutor (ZHOU, 2008). Assim os compostos poderiam fazer parte de um coquetel anticâncer onde por atuarem inibindo a CYP3A4 evitariam a metabolização dos quimioterápicos prolongando a ação dos mesmos. O SwissADME ainda previu que o 49F poderia causar a inibição de uma outra isoforma do citocromo P450 (CYP2C9).

Usando a base de dados do ADMETlab foi possível verificar a toxicidade potencial dos compostos. Dentre os indicadores usados para avaliar a toxicidade, somente na categoria DILI (dano no fígado induzido por fármaco) os dois compostos apresentaram algum risco. Este tipo de dano é um dos grandes problemas mais comuns para a segurança de um fármaco, levando até mesmo a retirada de alguns deles do mercado (TEMPLE; HIMMEL, 2002).

Embora não seja uma característica muito desejada para os dois DHPM-Se em estudo, vale lembrar que vários fármacos como anestésicos, anti-inflamatórios não esteroidais, medicamentos antimicrobianos e até mesmo algumas plantas de uso medicinal causam reconhecidamente danos hepáticos. Adicionalmente, danos hepáticos são dependentes da dose utilizada e do tempo de tratamento e em muitos casos havendo a interrupção do tratamento a injúria será revertida (DAVID; HAMILTON, 2010).

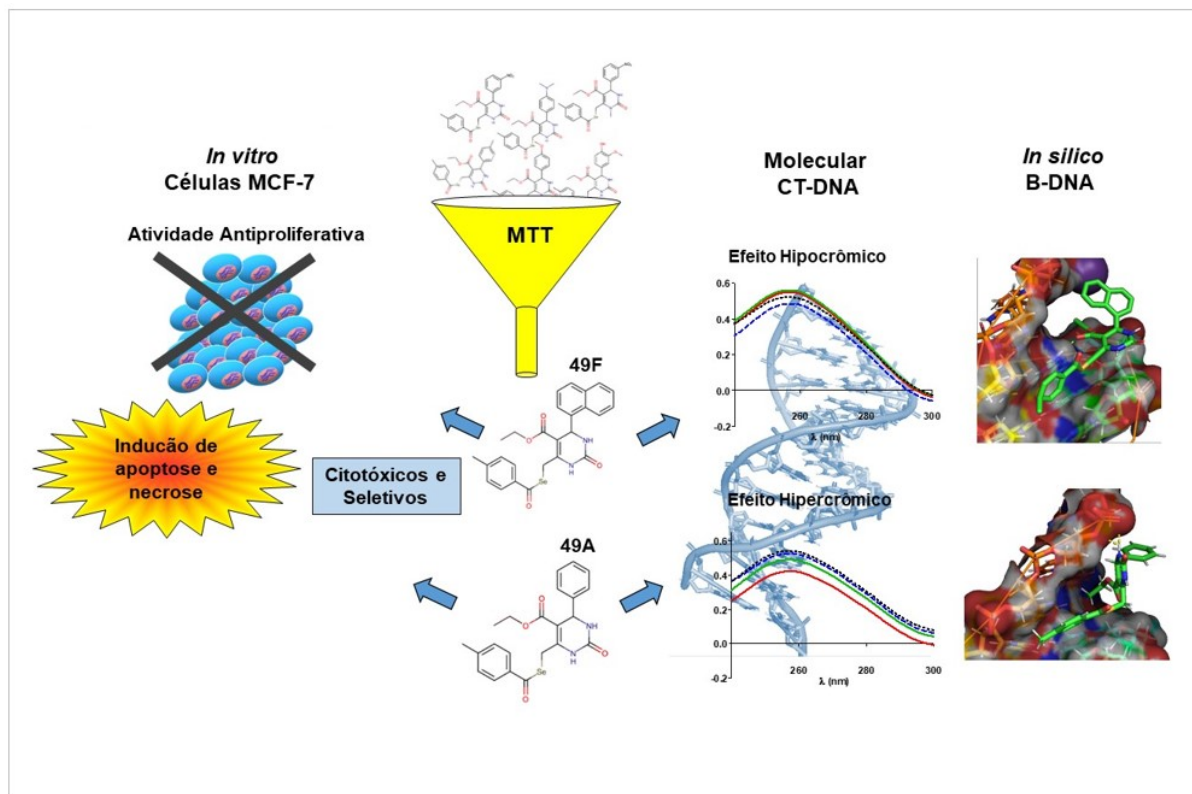
Por outro lado, quando os *SMILES (Simplified Molecular-Input Line-Entry System)* do monastrol foram submetidos ao ADMETlab observaram-se predições para hepatotoxicidade

humana e também para dano no fígado induzido por fármaco (DILI). Porém, em pesquisa realizada *in vivo* com ratos (Wistar), Torres e colaboradores (2014) avaliaram propriedades farmacocinéticas e toxicológica aguda de um composto análogo do monastrol denominado como LaSOM 65 que recebeu um grupo NO₂ no lugar do grupo hidroxil original do monastrol. Os autores relataram que nas diferentes doses testadas seja por administração oral ou intraperitoneal nenhuma diferença estatística foi encontrada para análise de soro, de peso corporal e de peso do órgão, indicando ausência de efeitos toxicológicos agudos quando comparado ao controle.

6.4 CONCLUSÕES PARCIAIS

Após a análise dos resultados obtidos pode-se concluir que os compostos 49A e 49F foram citotóxicos e seletivos, reduzindo a viabilidade das células MCF-7 de modo tempo e dose dependentes. Ambos os compostos provocaram morte celular por meio de apoptose e necrose na mesma proporção. Somente o composto 49F apresentou capacidade antiproliferativa reduzindo o número de colônias mesmo após a retirada do composto. Os ensaios moleculares indicaram que ambos compostos interagem com CT-DNA causando distorção na molécula evidenciado pelo deslocamento do iodeto de propídio e pelos efeitos hipercrômico e hipocrômico causados pelo 49A e pelo 49F, respectivamente. Os ensaios *in silico*, usando uma sequência cristalográfica de B-DNA (PDB 5T4W), previram que os compostos podem realizar ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas com o DNA. Essas ligações possivelmente poderiam manter os compostos interagindo no sulco menor sem fazer intercalação. A dinâmica molecular previu ligações mais estáveis e condições mais energeticamente favoráveis entre o B-DNA e o ligante 49F o que poderia ter contribuído na capacidade antiproliferativa apenas observada para este composto. O perfil ADMET apontou parâmetros farmacológicos interessantes associados à estrutura 49F e também algumas penalidades para o composto. Por fim, o conjunto desses resultados demonstrou o maior potencial do 49F para melhor desempenho como composto líder no desenvolvimento de fármacos para o tratamento do adenocarcinoma de mama, principalmente após submetido a novas otimizações. As conclusões deste estudo com MCF-7 e DHPM-Se estão esquematizadas na figura 32 como possível mecanismo de ação para os compostos 49A e 49F.

Figura 32 – Possível mecanismo de ação da atividade antiproliferativa dos compostos 49A e 49F sobre as células MCF-7.



7 CONCLUSÕES FINAIS

Os estudos *in vitro* para HepG2 e *in silico* confirmaram o potencial citotóxico e antiproliferativo do 49H uma vez que:

- Reduziu a formação de colônias;
- Interagiu com o DNA possivelmente na fenda menor, causou efeito hipocrômico e no tratamento das células fragmentou o DNA;
- Causou parada no ciclo celular;
- Ativou a apoptose.

Os estudos *in vitro* para MCF-7 e *in silico* confirmaram o potencial citotóxico e antiproliferativo do 49F uma vez que:

- Reduziu a formação de colônias;
- Interagiu com o DNA possivelmente na fenda menor e causou efeito hipocrômico;
- Ativou morte celular por apoptose e necrose.

8 PERSPECTIVAS

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- Investigar a interferência do composto 49F sobre o ciclo celular de células MCF-7.
- Avaliar em células MCF-7 tratadas com 49F a expressão de proteínas relacionadas com a apoptose, com o dano e reparo ao DNA e com o controle do ciclo celular.
- Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na via de sinalização da PI3K-Akt para as duas linhagens tumorais (HepG2 e MCF-7) tratadas com os compostos 49F e 49H.
- Realizar estudos de *docking* e dinâmica molecular dos compostos 49H e 49F com a proteína Akt e os compostos 49H e 49F e do composto 49F com a proteína RB.
- Investigar a interferência do composto 49F sobre o ciclo celular de células MCF-7.
- Avaliar em células MCF-7 tratadas com 49F a expressão de proteínas relacionadas com a apoptose, com o dano e reparo ao DNA e com o controle do ciclo celular.
- Avaliar a atividade antitumoral dos compostos 49H e 49F *in vivo* usando o modelo de tumor ascítico de Ehrlich em camundongos isogênicos Balb/c.
- Averiguar nos ensaios *in vivo* se a toxicidade hepática prevista pelo ADMET para os compostos poderá ser confirmada.

9 REFERÊNCIAS

- ABNOUS, K. et al. Synthesis and molecular modeling of six novel monastrol analogues: evaluation of cytotoxicity and kinesin inhibitory activity against HeLa cell line. **DARU J. Pharm. Sci.**, v. 21, n. 1, p. 70-78, 2013.
- ABRAHAM, M. J. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. **SoftwareX.**, v. 1, n. 2, p. 19-25, 2015.
- ACS-AMERICAN CANCER SOCIETY. (a) **About Breast Cancer**, 2019. Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/understanding-a-breast-cancer-diagnosis/types-of-breast-cancer.html>. Acesso em: 11 nov. 2020.
- ACS-AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Action Network: The Costs of Cancer**, 2017. Disponível em <https://www.fightcancer.org/policy-resources/costs-cancer>. Acesso em: 30 out. 2019.
- ACS-AMERICAN CANCER SOCIETY. (b) **Chemotherapy for Breast Cancer**, 2019. Disponível em <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/treatment/chemotherapy-for-breast-cancer.html>. Acesso em: 25 jun. 2019.
- ACS-AMERICAN CANCER SOCIETY. (a) **How Chemotherapy Drugs Work**, 2016. Disponível em <http://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/chemotherapy/how-chemotherapy-drugs-work.html>. Acesso em: 27 mar. 2019.
- ACS-AMERICAN CANCER SOCIETY. (b) **What Is Targeted Cancer Therapy?**, 2016. Disponível em <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/targeted-therapy/what-is.html>. Acesso em: 30 maio 2019.
- ACS-AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts and Figures**. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2020.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy, **Oncogene**, v. 26, n. 9, p. 1324–1337, 2007.
- ADCOCK, S. A.; MCCAMMON, J. A. molecular dynamics: survey of methods for simulating the activity of proteins. **Chem. Rev.**, v. 106, n. 5, 1589-1615, 2006.
- AKANJI, M. A.; ROTIMI, D.; ADEYEM, O. S. Hypoxia-inducible factors as an alternative source of treatment strategy for cancer. **Oxid. Med. Cell. Longev.**, v. 2019, p. 1-11, 2019.
- ALBERG, D. G.; SCHREIBER, S. L. Structure-based design of a cyclophilin–calcineurin bridging ligand. **Science**, v. 262, p. 248–250, 1993.
- ALBERTS, B., et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALFAROUK, K.O. et al. Resistance to cancer chemotherapy: failure in drug response from ADME to P-gp. **Cancer Cell Int.**, 15, p. 35-48, 2015.

ALMEIDA, G. M. et al. Novel selenylated imidazo[1,2-a]pyridines for breast cancer chemotherapy: Inhibition of cell proliferation by Akt-mediated regulation, DNA cleavage and apoptosis. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 503, p. 129-1297, 2018.

ALMEIDA, V. L. 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, p. 118-129, 2005.

ARTHUR, W. et al. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017.

AUDEBERT, M.; SALLES. B.; CALSOU, P. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 55117-55126, 2004.

AZAD, G. K.; RAGHUVIR, S.; TOMAR, R. S. Ebselen, a promising antioxidant drug: mechanisms of action and targets of biological pathways. **Mol. Biol. Rep.**, v. 41, n. 8, p. 4865-4879, 2014.

BADISA, R.B. et al. Selective cytotoxic activities of two novel synthetic drugs on human breast carcinoma MCF-7 cells. **Anticancer Res.**, v. 29, n. 8, p. 2993–2996, 2009.

BAILEY, D.; BROWN, D. High-throughput chemistry and structure-based design: survival of the smartest. **Drug. Discov. Today**, v. 6, n. 2, p. 57–59, 2001.

BALDINI, M. et al. Cu(II) complexes with heterocyclic substituted thiosemicarbazones: The case of 5-formyluracil. Synthesis, characterization, X-ray structures, DNA interaction studies, and biological activity. **Inorg. Chem.**, v. 42, n. 6, p. 2049–2055, 2003.

BALOGH, J. et al. Hepatocellular carcinoma: a review. **J. Hepatocell. Carcinoma**, v. 3, p. 41-53, 2016.

BAKER, S. J.; REDDY, E. P. CDK4: A key player in the cell cycle, development, and cancer. **Genes Cancer**, v. 3, p. 658–669, 2012.

BAN, H. S.; UTO, Y.; NAKAMURA, H. Hypoxia-inducible factor inhibitors: a survey of recent patented compounds (2004 - 2010). **Expert. Opin. Ther. Pat.**, v. 21, p. 131-146, 2011.

BARBOSA, F.A.R. et al. Design, synthesis and evaluation of selenodihydropyrimidinones as potential multi-targeted therapeutics for Alzheimer's disease. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 24, p. 5762–5770, 2016.

BARBOSA, F.A.R. et al. Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 155, p. 503-515, 2018.

BARITAUD, M. et al. Histone H2AX: The missing link in AIF-mediated caspase-independent programmed necrosis. **Cell Cycle**, v. 16, p. 3166-3173, 2010.

BARNUM, K. J.; O'CONNELL M. J. Cell Cycle Regulation by Checkpoints. **Methods. Mol. Biol.**, v. 1170, p. 29–40, 2014.

- BARRA, C. V.; NETTO, A. V. G. Interações entre Complexos Antitumorais e o DNA e suas Ferramentas de Análise: um Enfoque nos metalointercaladores. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, n. 6, 1998-2016, 2015.
- BAYNES, J. W.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BELIZÁRIO, J.; VIEIRA-CORDEIRO, L.; ENNS, S. Necroptotic cell death signaling and execution pathway: Lessons from knockout mice. **Mediat. Inflamm.**, v. 2015, p. 1-15, 2015.
- BENCHIMOL, S. p53-dependent pathways of apoptosis. **Cell Death Differ.**, v. 8, n. 11, p. 1049-1051, 2001.
- BERDASCO, M.; ESTELLER, M. Aberrant epigenetic landscape in cancer: How cellular identity goes awry. **Dev. Cell**, v. 19, p. 698–711, 2010.
- BERTHET, C.; KALDIS, P. Cell-specific responses to loss of cyclin-dependent kinases. **Oncogene**, v. 26, p. 4469-4477, 2007.
- BHABAK, K. P.; MUGESH, G. Functional mimics of glutathione peroxidase: bioinspired synthetic antioxidants. **Acc. Chem. Res.**, v. 43, n. 11, p. 1408–19, 2010.
- BIEGING, K. T.; ATTARDI, L. D. Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression. **Trends in Cell Biol.**, v. 22, n. 2, p. 97-106, 2012.
- BIGINELLI, P.. **Gazz. Chim. Ital.**, v. 23, 360-416, 1893.
- BOER, D. R.; CANALS, A.; COLL, M. DNA-binding drugs caught in action: the latest 3D pictures of drug-DNA complexes. **Dalton Trans.**, v. 21, n. 3, p. 399-414, 2009.
- BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://saude.gov.br/noticias/agencia-saude/45315-saude-libera-r-27-7-milhoes-para-ampliar-assistencia-na-paraiba>. Acesso em: 10 abr. 2019.
- BREIER, A. et al. New Insight into P-Glycoprotein as a Drug Target. **Anti-Cancer Agents Med. Chem.**, v. 159, n. 13, p. 159-170, 2013.
- BRIGELIUS-FLOHÉ, R; FLOHÉ, L. Selenium and redox signaling. **Arc. Bioch. Bioph.**, v. 617, p. 48-59, 2017.
- BROOKS, C. L.; KARPLUS, M.; PETTIT, B. M. **Proteins: A theoretical perspective of dynamics structure and thermodynamics, advances in chemical physics**. New York: John Wiley & Sons, 1988.
- BROWN, K.; ARTHUR, J.; Selenium, selenoproteins and human health: a review. **Public Health Nutr.**, 4, p. 593-599, 2001.

BRUIX, J. et al. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. **Lancet**, v. 389, p. 56–66, 2017.

BRUNELLE, J. K.; LETAI, A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. **J. Cell Sci.**, v. 15, n. 122, p. 437–441, 2009.

BURGER, H.; NOOTER, K. (2004). Pharmacokinetic resistance to imatinib mesylate: role of the ABC drug pumps ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) in the oral bioavailability of imatinib. **Cell Cycle**, v. 3, p. 1502–1505, 2004.

BURGESS, D. J. Apoptosis: Refined and lethal. **Nat. Rev. Cancer**, v. 13, p. 79–89, 2013.

CARTER, B. Z. et al. Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: overcoming imatinib resistance. **Cell cycle**, v. 5, n. 19, p. 2223–2229, 2006.

CECILIO, A. P. et al. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. **Breast Cancer**, v. 7, p. 43–49, 2015.

CERVENAK, J. et al. The role of the human ABCG2 multidrug transporter and its variants in cancer therapy and toxicology. **Cancer Letters**, v. 234, n. 1, p. 62–72, 2006.

CHAITANYA, G. V.; STEVEN, A. J.; BABU, P. P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Commun. Signal.**, v. 8, p. 1-11, 2010.

CHAKRABORTY, P. et al. Sensitization of cancer cells to cyclophosphamide therapy by an organoselenium compound through ROS-mediated apoptosis. **Biomed. Pharmacother.**, v. 84, p. 1992–1999, 2016.

CHAMPOUX, J. J. DNA Topoisomerases: Structure, function, and mechanism. **Ann. Rev. Bioch.**, v. 70, p. 369-413, 2001.

CHANG, F. et al. Involvement of PI3K/Akt pathway in cell cycle progression, apoptosis, and neoplastic transformation: a target for cancer chemotherapy. **Leukemia**, v. 17, n. 3, 590–603, 2003.

CHANG, M.H. et al. Long-term effects of hepatitis b immunization of infants in preventing liver cancer. Taiwan hepatoma study group. **Gastroenterology**, v. 151, n. 3, p. 472-480, 2016.

CHEN, N. et al. Probing the Dynamics of doxorubicin-DNA intercalation during the initial activation of apoptosis by fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM). **Plos One**, 7, n. 9, 44947-44954, 2012.

CHENG, N. et al. Transforming growth factor-beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. **Mol. Cancer Res.**, v. 6, p. 1521–1533, 2008.

CHEUNG-ONG, K.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. DNA-Damaging Agents in Cancer Chemotherapy: Serendipity and Chemical Biology. **Chem. & Biol.**, v. 20, n. 5, p. 648–659, 2013.

CHIN, G.M.; HERBST, R. Induction of apoptosis by monastrol, an inhibitor of the mitotic kinesin EG5, is independent of the spindle checkpoint. **Mol. Cancer Ther.**, v. 5, p. 2580-2591, 2006.

CHO, Y. et al. (2013). Noncovalent interactions of DNA bases with naphthalene and graphene. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 9, n. 4, 2090-2096, 2013.

CHOI, A.M.; RYTER, S.W.; LEVINE, B. Autophagy in human health and disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 368, p. 651–62, 2013.

CHUANG, S.C.; LA VECCHIA C.; BOFFETA, P. Liver cancer: descriptive epidemiology and risk factors other than HBV and HCV infection. **Cancer Letters**, v. 286, n. 1, p. 9-14, 2009.

CLARK, A. J. et al. Prediction of protein–ligand binding poses via a combination of induced fit docking and metadynamics simulations. **J. Chem. Theory Comput.**, v. 12, p. 2990–2998, 2016.

CLEMENT, I.P.; THOMPSON, H.J.; GANTHER, H.E. Selenium modulation of cell proliferation and cell cycle biomarkers in normal and premalignant cells of the rat mammary gland. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 9, n. 1, p. 49–54, 2000.

CONNOLLY, M. L. Solvent-accessible surfaces of proteins and nucleic-acids. **Science**, v. 221, n. 4612, p. 709-713, 1983.

CRAWFORD, Y.; FERRARA, N. VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. **Cell Tissue Res.**, v. 335, p. 261–269, 2009.

CRUZ, E.H.G. et al. Synthesis and antitumor activity of selenium-containing quinone-based triazoles possessing two redox centres, and their mechanistic insights. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 122, p. 1–16, 2016.

DAINA, A.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Sci. Rep.**, v. 7, p. 42717-42730, 2017.

DALERBA, P.; CHO, R. W.; CLARKE, M. F. Cancer stem cells: models and concepts. **Annu. Rev. Med.**, v. 58, p. 267–84, 2007.

DASARI, S.; TCHOUNWOU, P.B. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 740, p. 364-378, 2014.

DAVID, S.; HAMILTON, J. P. Drug-induced liver injury. **US Gastroenterol. Hepatol. Rev.**, v. 6, p. 73–80, 2010.

DEVITA, V.T.; CHU, E. A History of cancer chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 68, p. 8643-8653, 2008.

DOMAN, T. N. Molecular docking and high-throughput screening for novel inhibitors of protein tyrosine phosphatase-1B. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2213–2221, 2002.

DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E. et al. Identification of selenocompounds with promising properties to reverse cancer multidrug resistance. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 26, n. 12, p. 2821-2824, 2016.

DOMÍNGUEZ-ÁLVAREZ, E. et al. Synthesis and antiproliferative activity of novel selenoesters derivatives. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 73, p. 153-166, 2014.

DONG, J. et al. ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. **J. Cheminform.**, v. 10, n. 29, p. 1-11, 2018.

DUAN, L. et al. Centrin: Another target of monastrol, an inhibitor of mitotic spindle. **Mol. Biom. Spectr.**, v. 137, p. 1086–1091, 2015.

DUPREZ, L. et al. Major cell death pathways at a glance. **Microbes Infect.**, v. 11, n. 13 p. 1050–1062, 2009.

DREHER, M. et al. Interactive Molecular Dynamics: Scaling up to Large Systems. **Procedia Comput. Sci.**, v. 18, p. 20-29, 2013.

EL-KHOUEIRY, A. B., et al. A randomized phase II non-comparative study of Ispinesib given weekly or every three weeks in metastatic colorectal cancer. **In: A California Cancer Consortium Study (CCC-P)**, 2006, EUA. ASCO Meeting Abstracts, 2006. p. 3595.

ELLIS, I. Intraductal proliferative lesions of the breast: morphology, associated risk and molecular biology. **Mod. Pathol.**, v. 23, p. 1-7, 2010.

EL-SERAG, H. B. Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 142, p. 1264-1273, 2012.

ERDEM, A.; OZSOZ, M. Electrochemical DNA Biosensors Based on DNA-Drug Interactions. **Electroanalysis**, v. 14, n. 14, 965–974, 2002.

FAN, F. et al. Chronic exposure of colorectal cancer cells to bevacizumab promotes compensatory pathways that mediate tumour cell migration. **Br. J. Cancer**, v. 104, p. 1270–1277, 2011.

FAN, A.; VINCETI, M. Selenium and its compounds. **In: HARBISON, R.D.; BOURGEOIS, M. M.; JOHNSON, G. T. (Ed). Hamilton & Hardy's industrial toxicology. 6^a ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2015.**

FATIMA, A. et al. A mini-review on Biginelli adducts with notable pharmacological properties. **J. Adv. Res.**, 6, p. 363–373, 2015.

FENG, Y. et al. Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2): a promising target for anti-cancer therapies. **Oncotarget**, v. 8, p. 20452–20461, 2017.

FENNELL, A. A. D., et al. Cisplatin in the modern era: The backbone of first-line chemotherapy for non-small cell lung cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v. 44, p. 42–50, 2016.

- FERLAY, J. et al. Global Cancer Observatory: Cancer Today. International Agency for Research on Cancer, Lyon 2018. Available from: <https://gco.iarc.fr/today> (accessed: 18.09.2018).
- FERNANDES, A. P.; GANDIN, V. Selenium compounds as therapeutic agents in cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1850, n. 8, p. 1642–1660, 2015.
- FERREL, L. D.; KAKAR, S. **Liver Pathology**. 1. ed. Nova Iorque: Demos Medical, 2011. 506 p.
- FIDLER, M. M.; SOERJOMATARAM, I.; BRAY, F. A global view on cancer incidence and national levels of the human development index. **Int. J. Cancer.**, v. 139, n. 11, p. 2436–2446, 2016.
- FINN, R. S.; ALESHIN, A.; SLAMON, D. J. Targeting the cyclin-dependent kinases (CDK) 4/6 in estrogen receptor-positive breast cancers. **Breast Cancer Res.**, v. 18, p. 17-27, 2016.
- FORLI, S. et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. **Nat. Protoc.**, v. 11, n. 5, p. 905-919, 2016.
- FRANKEN, N.A.P. et al. Clonogenic assay of cells *in vitro*. **Nat. Protoc.**, v. 1, p. 2315-2319, 2006.
- FRANZESE, E. et al. PARP inhibitors in ovarian cancer. **Cancer Treat. Rev.**, v. 73, p. 1-9, 2019.
- GAJDÁCS, M. et al. Selenoesters and selenoanhydrides as novel multidrug resistance reversing agents: A confirmation study in a colon cancer MDR cell line. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 27, n. 4, p. 797-802, 2017.
- GALLUZZI, L. et al. Necroptosis: mechanisms and relevance to disease. **Annu. Rev. Pathol.**, v. 12, p. 103–130, 2017.
- GFELLER, D.; MICHELIN, O.; ZOETE, V. SwissSidechain: a molecular and structural database of non-natural sidechains. **Nucleic Acids Res.**, v. 41, p. 327–332, 2013.
- GEISEN, C.; MOROY, T. The oncogenic activity of cyclin E is not confined to Cdk2 activation alone but relies on several other, distinct functions of the protein. **J. Biol. Chem.**, v.277, n. 42, p. 39909-39918, 2002.
- GHOSH, P. et al. Attenuation of cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Swiss albino mice by naphthalimide-based organoselenium compound 2-(5-selenocyanatopentyl)-benzo[de] isoquinoline 1,3-dione. **Pharm. Biol.**, v. 53, n. 4, p. 524–532, 2015.
- GIACINTI, C.; GIORDANO, A. RB and cell cycle progression. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5220-5227, 2006.
- GLADYSHEV, V. N. In: HATFIELD, D. L.; BERRY, M. J.; GLADYSHEV, V. N. (Ed). **Selenium- its molecular biology and role in human health**. Nova Iorque: Springer, 2012. 109-123 p.

- GOEL, A. et al. Selenomethionine induces p53 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells. **Cancer Biol. Ther.**, v. 5, n. 5, p. 529-535, 2006.
- GOGVADZE, V.; ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. . The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells. **Mol. Asp. Med.**, v. 31, p. 60-74, 2010.
- GOTO, J.; KATAOKA, R.; MUTA, H.; HIRAYAMA, N. ASEDock-docking based on alpha spheres and excluded volumes. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 48, n. 3, p. 583-90, 2008.
- GRAVES, D.; VELEA, L. Intercalative Binding of Small Molecules to Nucleic Acids. **Curr. Org. Chem.**, v. 4, p. 915-929, 2000.
- GUIDO, B. C., et al. Impact of kinesin Eg5 inhibition by 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives on various breast cancer cell features. **BMC Cancer**, v. 15, n. 283, p. 1-15, 2015.
- GUO, Y. et al. Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 13430–13437, 2002.
- HAANEN, C.; VERMESC, I. Apoptosis and inflammation. **Mediat. Inflamm.**, v. 4, p. 5-15, 1995.
- HALAZONETIS, T. D.; GORGOULIS, V.G.; BARTEK, J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. **Science**, v. 319, p.1352–1355, 2008.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646–674, 2011.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p. 57-70, 2000.
- HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends Cell Biol.**, v. 23, n. 7, p. 345-356, 2013.
- HARDIN, J.; BERTONI, G. **Becker's world of the cell**. 9th ed. Boston: Pearson Copyright, 2015.
- HAMER, J.; WARNER, E. Lifestyle modifications for patients with breast cancer to improve prognosis and optimize overall health. **Can. Med. Assoc. J.**, v. 21, n. 189, p. 268-274, 2017.
- HARMSSEN, S. et al. The role of nuclear receptors in pharmacokinetic drug-drug interactions in oncology. **Cancer Treat. Rev.**, v. 33, n. 4, p. 369–380, 2007.
- HARTWELL, L.H.; KASTAN, M.B. Cell cycle and cancer. **Science**, v. 266, p. 1821-1828, 1994.
- HASSAN, M. et al. Apoptosis and Molecular Targeting Therapy in Cancer. **BioMed Res. Int.**, v. 2014, p. 1- 23, 2014.
- HASSIOTOU, F.; GEDDES, D. Anatomy of the human mammary gland: Current status of knowledge. **Clin Anat.**, v. 26, n. 1, p. 29-48, 2013.

- HAYASHI, N. et al. Effects of Eg5 knockdown on human prostate cancer xenograft growth and chemosensitivity. **The Prostate**, v. 68, n. 12, p. 1283–95, 2008.
- HELLEDAY, T. et al. DNA repair pathways as targets for cancer therapy. **Nat. Rev. Cancer**, v. 8, p. 193-204, 2008.
- HICKLIN, D. J.; ELLIS, L. M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, p. 1011-27, 2005.
- HOLNTHONER, W. et al. Fibroblast growth factor-2 induces Lef/Tcf dependent transcription in human endothelial cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 48, p. 45847-45853, 2002.
- HORNAK, V. et al. Comparison of multiple AMBER force fields and development of improved protein backbone parameters. **Proteins**, v. 65, n. 3, 712-725, 2006.
- HUANG, X. et al. Constitutive histone H2AX phosphorylation on Ser-139 in cells untreated by genotoxic agents is cell-cycle phase specific and attenuated by scavenging reactive oxygen oxygen species. **Int. J. Oncol.**, v. 29, p. 495-501, 2006.
- HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 38, p. 103-113, 2001.
- HUMPHREY, W.; DALKE, A.; SCHULTEN K. VMD – Visual Molecular Dynamics. **J. Mol. Graph.**, 14, p. 33-38, 1996.
- HWANG, M. S., BAEK, W. K. Glucosamine induces autophagic cell death through the stimulation of ER stress in human glioma cancer cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 399, n. 1, p. 111-116, 2010.
- IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (a) \$46 billion in productivity lost to cancer in major emerging economies. Press release n° 255. Disponível em https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/07/pr255_E.pdf. Acesso em Set. 2019.
- IARC- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. (b) World Cancer Report 2018: Press release n° 263. Disponível em https://www.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/09/pr263_E.pdf. Acesso em Jul. 2019.
- INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Rio de Janeiro: INCA, 2019.
- INCA- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. ABC DO CÂNCER: Abordagens Básicas para o Controle do Câncer. 4ª ed. Rio de Janeiro: INCA, 2018. 111 p.
- JIANG, N. et al. Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 6, n. 8, p. 885-95, 2006.
- JORGENSEN, W.L. et al. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. **J. Chem. Phys.**, v. 79, n. 2, 926-935, 1983.

JORGENSEN, W. L. The many roles of computation in drug discovery. **Science**, v. 303, n. 5665, p. 1813–1818, 2004.

KAMIŃSKA, M. et al. Breast cancer risk factors. **Menopause Rev.**, v. 14, n. 3, p. 196-202, 2015.

KAPPE, C. O. Recent Advances in the Biginelli Dihydropyrimidine Synthesis. New Tricks from an Old Dog. **Acc. Chem. Res.**, v. 33, p. 879-888, 2000.

KAPUCI, M. et al. Determination of cytotoxic and genotoxic effects of naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol on human lymphocyte culture. **Toxicol. Ind. Health**, v. 30, n. 1, p. 82–89, 2014.

KAUR, J.; SUNDAR, S.; SINGH, N.; Molecular docking, structure–activity relationship and biological evaluation of the anticancer drug monastrol as a pteridine reductase inhibitor in a clinical isolate of *Leishmania donovani*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 1742–1748, 2010.

KAUR, R. et al. Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: a review. **Eur. J. Med. Chem.**, v.132, p. 108-134, 2017.

KIM, J.W. et al. DNA-binding activity of the N-terminal cleavage product of poly (ADP-ribose) polymerase is required for UV mediated apoptosis. **J. Cell Sci.**, v. 113, p. 955-961, 2000.

KOBAYASHI, J. et al. Current topics in DNA double-strand break repair. **J. Radiat. Res.**, v. 49, p. 93-103, 2008.

KORSMEYER, S. J. et al. Pro-apoptotic cascade activates BID, which oligomerizes BAK or BAX into pores that result in the release of cytochrome c. **Cell. Death. Differ.**, v. 7, n. 12, p. 1166-1173, 2000.

KUMAR, V. et al. **Pathology basis of disease**. 7ed. China: WB Saunders, 2003, 1552p.

KUMARI, R.; KUMAR, R. g mmpbsa--a GROMACS tool for high-throughput MM-PBSA calculations. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 54, p. 1951-1962, 2014.

KUNTZ, I. D., et al. A geometric approach to macromolecule-ligand interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 16, n. 2, p. 269–288, 1982.

KUSMINSKY, R. E. et al. Can we cure breast cancer? **Am. J. of Surgery**, v. 210, p. 790-792, 2015.

LACROIX, M.; TOILLON, R. A.; LECLERCQ, G. p53 and breast cancer, an update. **Endocr. Relat. Cancer**, v.13, n. 2, p. 293-325, 2006.

LASKOWSKI, R.A.; SWINDELLS, M.B. LigPlot⁺: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 51, n. 10, 2778-2786, 2011.

LEMKUL, J.A.; ALLEN, W.J.; BEVAN, D. R. Practical Considerations for Building GROMOS-Compatible Small-Molecule Topologies. **J. Chem. Inf. Model.**, v. 50, n. 12, p. 2221-2235, 2010.

LEMKUL, J. A. From Proteins to Perturbed Hamiltonians: A Suite of Tutorials for the GROMACS-2018 Molecular Simulation Package [Article v1.0]. **Liv. J. Comput. Mol. Sci.**, v. 1, n. 1, p. 5068-5121, 2019.

LOBO, N. A. et al. The biology of cancer stem cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.**, v. 23, p. 675–99, 2007.

LOPEZ, J.; TAIT, S. W. G. Mitochondrial apoptosis: Killing cancer using the enemy within. **Br. J. Cancer**, v. 112, p. 957–962, 2015.

LUQMANI, Y. A. Mechanisms of drug resistance in cancer chemotherapy. **Med. Princ. Pract.**, v. 14, p. 35–48, 2005.

MCGAHON, A. J. et al. The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro. **Meth. Cell Biol.**, v. 46, 153-185, 1995.

MACLAINE, N. J.; HUPP, T. R. The regulation of p53 by phosphorylation: a model for how distinct signals integrate into the p53 pathway. **Aging**, v. 1, p. 490-502, 2009.

MACALUSO, M. et al. Modulation of cell cycle components by epigenetic and genetic events. **Semin. Oncol.**, v. 32, p. 452–457, 2005.

MARQUES, L.A. et al. Comparison of the Effects of Monastrol and Oxomonastrol on Human Hepatoma Cell Line HepG2/C3A. **Anticancer Res.**, v. 37, p. 1197-1204, 2017.

MARTINS, I.L. et al. Selenium-containing chrysin and quercetin derivatives: attractive scaffolds for cancer therapy. **J. Med. Chem.**, v. 58, p. 4250-4265, 2015.

MASOUD, G. N.; LI, W. “HIF-1 α pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy,” **Acta Pharm. Sin. B**, vol. 5, p. 378–389, 2015.

MAYER, T. 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.

MOMEN-ROKNABADI, A. et al. Impact of residue accessible surface area on the prediction of protein secondary structures. **BMC Bioinformatics**, v. 9 n. 1, p. 357-368, 2008.

MORALES, J. C. et al. Review of Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) Mechanisms of Action and Rationale for Targeting in Cancer and Other Diseases. **Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.**, v. 24, p. 15–28, 2014.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, 55-63, 1983.

MULLER, H.; HELIN, K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1470, 1-12, 2000.

MUREGI, F. W.; ISHIIH, A. Next-generation antimalarial drugs: hybrid molecules as a new strategy in drug design. **Drug Dev. Res.**, v. 71, p. 20-32, 2010.

MURTAZA, S. et al. Synthesis, biological investigation, calf thymus DNA binding and docking studies of the sulfonyl hydrazides and their derivatives. **J. Mol. Struct.**, v. 1107, p. 99-108, 2016.

NAIR, P. C.; MINERS, J. O. Molecular dynamics simulations: from structure function relationships to drug discovery. **In Silico Pharmacol.**, v. 2, n. 4, p. 1-4, 2014.

NARDINOCCHI, L.; PUCA, R.; D'ORAZI, G. HIF-1 alpha antagonizes p53-mediated apoptosis by triggering HIPK2 degradation. **Aging**, v. 3, n. 1, p. 33-43, 2011.

NEIDLE, S. DNA minor-groove recognition by small molecules. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, n. 3, p. 291-309, 2001.

NIKOLETOPOULOU, V. et al. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1833, n. 12, p. 3448-3459, 2013.

NUNEZ R. DNA measurement and cell cycle analysis by flow cytometry. **Curr Issues Mol Biol.**, v. 3, n. 3, p. 67-70, 2001.

NURGALI, K.; JAGOE, R. T.; ABALO, R. Editorial: adverse effects of cancer chemotherapy: anything new to improve tolerance and reduce sequelae? **Front. Pharmacol.**, v. 9, p. 245, 2018.

O'CONNOR, M.J. Targeting the DNA damage response in cancer. **Mol. Cell**, v. 60, p. 547-560, 2015.

OHTSU, A. et al. Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, p. 3968-3976, 2011.

OLIVEIRA, F. S. et al. Synthesis and antitumoral activity of novel analogues monastrol-fatty acids against glioma cells. **Med. Chem. Commun.**, v. 9, p. 1282-1288, 2018.

ORIAN, L.; TOPPO, S. Organochalcogen peroxidase mimetics as potential drugs: a long story of a promise still unfulfilled. **Free Radical Bio. Med.**, v. 66, p. 65-74, 2014.

OZAKI, T.; NAKAGAWARA, A. Role of p53 in Cell Death and Human Cancers. **Cancers**, v. 3, p. 994-1013, 2011.

PACHMAYR, E.; TREESE, C.; STEIN, U. Underlying Mechanisms for Distant Metastasis - Molecular Biology. **Visc. Med.**, v. 33, n. 1, p. 11-20, 2017.

PAOLETTI, A., et al. Most of centrin in animal cells is not centrosome-associated and centrosomal centrin is confined to the distal lumen of centrioles. **J. Cell Sci.**, v. 109, p. 3089-3102, 1996.

- PAPATHEODORIDIS, G.V. et al. Risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B: assessment and modification with current antiviral therapy. **J. Hepatol.**, v. 62, n. 4, p. 956-67, 2015.
- PAPP, L. V. et al. From selenium to selenoproteins: Synthesis, identity, and their role in human health. **Antioxid. Redox Signal**, v. 9, n. 7, p. 775–806, 2007.
- PAUL, A.; BHATTACHARYA, S. Chemistry and biology of DNA-binding small molecules. **Current. Sci.**, v. 102, p. 212-231, 2012.
- PEARCE, A. et al. Productivity losses due to premature mortality from cancer in Brazil, Russia, India, China, and South Africa (BRICS): a population-based comparison. **Cancer Epidemiol.**, v. 53, p. 27-34, 2018.
- PETTERSEN, E.F. et al. UCSF Chimera: a visualization system for exploratory research and analysis. **J. Comput. Chem.**, v. 25, p. 1605-1612, 2004.
- PINZI, L.; RASTELLI, G. Molecular docking shifting paradigms in drug discovery. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, n. 18, 4331-4353, 2019.
- PLUMMER, R. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: a new direction for BRCA and triple-negative breast cancer? **Breast Cancer Res.**, v. 13, p. 218-223 2011.
- PUCA, R. et al. HIPK2 modulates p53 activity towards pro-apoptotic transcription. **Mol. Cancer**, v. 8, p. 1-14, 2009.
- RABIK, C. A.; DOLAN, M. E. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. **Cancer Treat. Rev.**, v. 33, n. 1, p. 9–23, 2007.
- RAEZ, L. E.; LILENBAUM, R. Chemotherapy for advanced non-small-cell lung cancer. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.**, v. 2, n. 3, p. 173-178, 2004.
- RINALDO, C. et al. HIPK2: a multitasking partner for transcription factors in DNA damage response and development. **Biochem. Cell. Biol.**, v. 85, p. 411-418, 2007.
- RODRIGUEZ, M. I. et al. Deciphering the insights of poly (ADP-ribosylation) in tumor progression. **Med. Res. Rev.**, v. 35, p. 678–97, 2015.
- SALOMON-FERRER, R.; CASE, D.A.; WALKER, R.C. An overview of the Amber biomolecular simulation package. **WIREs Comput. Mol. Sci.**, v. 3, n. 2, p. 198-210, 2012.
- SAMADDER, R. P.; BELAN, A. O.; KREJCI, L. Cancer TARGETases: DSB repair as a pharmacological target. **Pharmacol. Ther.**, v. 161, p. 111–131, 2016.
- SANDHU, J. S. Past, present and future of the Biginelli reaction: a critical perspective. **Arkivoc**, v. 2012, n.1, p. 66-133, 2012.
- SANTOS, A. F. et al. Schiefer counter: An alternative method for clonogenic assay evaluation. **J. Pharmacol. Toxicol. Methods**, v. 106, p. 1-7, 2020.

SEDELNIKOVA, O. A. et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. **Mutat. Res.**, v. 704, p. 152-159, 2011.

SBIRKOVA-DIMITROVA, H.I.; SHIVACHEV, B. Crystal structure of the DNA sequence d(CGTGAATTCACG)₂ with DAPI. **Acta Crystallogr. F. Struct. Biol. Commun.**, v. 73, p. 500-504, 2017.

SILVA, D. L. A. et al. Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 20, n. 8, p. 2645–2650, 2012.

SILVEIRA, V.C. et al. Double-strand DNA cleavage induced by oxindole-Schiff base copper(II) complexes with potential antitumor activity. **J. Inorg. Biochem.**, v. 102, p. 1090-1103, 2008.

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell Res.**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SINHA, R.; EL-BAYOUMY, K. Apoptosis is a critical cellular event in cancer chemoprevention and chemotherapy by selenium compounds. **Curr. Cancer Drug Targets**, v. 4, p. 13-28, 2004.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry; **J. Photoch. Photobio. B**, v. 124, p. 1-19, 2013.

SODHI, R. K.; SINGH, N.; JAGGI, A. S. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) and its therapeutic implications. **Vascul. Pharmacol.**, v. 53, p. 77-87, 2010.

SOUMYANARAYANAN, U. et al. Monastrol mimic Biginelli dihydropyrimidinone derivatives: synthesis, cytotoxicity screening against HepG2 and HeLa cell lines and molecular modeling study. **Org. Med. Chem. Lett.**, v. 2, p. 1-11, 2012.

SOUSA DA SILVA, A.W.; VRANKEN, W.F. ACPYPE - AnteChamber PYthon Parser interface. **BMC Res. Notes**, v. 5, 1-8, 2012.

SPENGLER, G. et al. Organoselenium compounds as novel adjuvants of chemotherapy drugs-a promising approach to fight cancer drug resistance. **Molecules**, v. 24, n. 2, p. 336-351, 2019.

STEFFEN, C. et al. TmoleX--a graphical user interface for turbomole. **J. Comp. Chem.**, v. 31, n. 16, p. 2967–2970, 2010.

STRASSER, A.; O'CONNOR, L.; DIXIT, V. M. Apoptosis signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 69, p. 217-245, 2000.

SUDHAKAR, A. History of cancer, ancient and modern treatment methods. **J. Cancer Sci. Ther.**, v.1, n. 2, p. 1–4, 2009.

SUZUKI, M. et al. Differential apoptotic response of human cancer cells to organoselenium compounds. **Cancer Chemother. Pharmacol.**, v. 66, p. 475–484, 2010.

SZYC, L.; YANG, M.; ELSAESSER, T. Ultrafast Energy Exchange via Water-Phosphate Interactions in Hydrated DNA. **J. Phys. Chem. B.**, v. 114, p. 7951-7957, 2010.

SWIFT, L. H.; GOLSTEYN, R. M. Genotoxic Anti-Cancer Agents and Their Relationship to DNA Damage, Mitosis, and Checkpoint Adaptation in Proliferating Cancer Cells. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 15, p. 3403-3431, 2014.

TACAR, O.; SRIAMORNSAK, P.; DASS, C. R. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 65, n. 2, p. 157-170, 2013.

TAKEDA, D. Y.; DUTTA, A. DNA replication and progression through S phase. **Oncogene**, v. 24, n.17, p. 2827-43, 2005.

TEMPLE, R. J.; HIMMEL, M. H. Safety of newly approved drugs: implications for prescribing. **JAMA**, v. 287, n. 17, p. 2273–2275, 2002.

TEWARI, R., et al. Ebselen abrogates TNF-alpha induced pro-inflammatory response in glioblastoma. **Mol. Oncol.**, v. 3, n. 1, p. 77–83, 2009.

TORRES, B. G. S. et al. Pre-clinical pharmacokinetics and acute toxicological evaluation of a monastrol derivative anticancer candidate LaSOM 65 in rats. **Xenobiotica**, v. 44, n. 3, p. 254–263, 2014.

TREPTOW, T. G. M. et al. Novel hybrid DHPM-fatty acids: Synthesis and activity against glioma cell growth in vitro. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 95, p. 552-562, 2015.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading. **J. Comput. Chem.**, v. 31, p. 455-461, 2010.

TSE, W. C.; BOGER, D. L. A Fluorescent intercalator displacement assay for establishing DNA binding selectivity and affinity. **Acc. Chem. Res.**, v. 37, n. 1, p. 61-69, 2004.

TURNER, J. et al. Crystal Structure of the Mitotic Spindle Kinesin Eg5 Reveals a Novel Conformation of the Neck-linker. **J. of Biol. Chem.**, v. 276, n. 27, p. 25496–25502, 2001.

VALASTYAN, S.; WEINBERG, R. A. Tumor Metastasis: Molecular Insights and Evolving Paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011.

VALENTINE, M. T.; FORDYCE, P. M.; BLOCK, S. M. Eg5 steps it up! **Cell Div.**, v. 1, p. 31-39, 2006.

van DER SPOEL, D. et al. GROMACS: Fast, Flexible, and Free. **J. Comput. Chem.**, v. 26, n. 16, 1701-1718, 2005.

VAN GUNSTEREN, W. F.; BERENDSEN, H. J. C. Computer simulation of molecular dynamics: methodology, applications and perspectives in chemistry angew. **Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 29, p. 992–1023, 1990.

VANLANGENAKKER, N. et al. Many stimuli pull the necrotic trigger, an overview. **Cell Death Differ.**, v. 19, p. 75–86, 2012.

VERMEULEN, K.; VAN BOCKSTAELE, D. R.; BERNEMAN, Z. N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif.**, v. 36, p.131-149, 2003.

WANG, G. et al. Specific binding of a dihydropyrimidinone derivative with DNA: spectroscopic, calorimetric and modeling investigations. **J. Lumin.**, v. 132, 1656–1662, 2012.

WANI, M.C.; HORWITZ, S.B. Nature as a Remarkable Chemist: A personal story of the discovery and development of Taxol®. **Anti-Cancer Drug.**, v. 25, p. 482–487, 2014.

WEIL, D. et al. Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. **BioTechniques**, v. 33, n. 6, p. 1244–8, 2002.

WEINBERG, R. A. **A Biologia do Câncer**. Porto Alegre: Artmed, 2008. 846p.

WESTIN, S. N.; SOOD, A. K.; COLEMAN, R. L. Targeted therapy and molecular genetics. **In: DI SAIA, P. J.; MANNEL, R. S.; MUTCH, D. G.; CREASMAN, W. T.; McMEEKIN, D. S. (Ed.) Clinical Gynecologic Oncology**. 9. ed. Philadelphia: Elsevier. 2018. 470-492 p.

WIDAKOWICH, C. et al. Review: side effects of approved molecular targeted therapies in solid cancers. **Oncologist**, v. 12, p. 1443–1455, 2007.

WONG, C.F.; MCCAMMON. J.A. Protein Flexibility and Computer-aided Drug Design. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 43, p. 31-45, 2003.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (a) **Cancer: key facts**, 2018. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 10 abr. 2019.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (b) Global Cancer Observatory: **Data visualization tools for exploring the global cancer burden in 2018**. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. Acesso em: 8 out. 2020.

YAN, L; ROSEN, N; ARTEAGA, C. Targeted cancer therapies. **Chin. J. Cancer**, v. 30, p. 1–4, 2011.

YANG, G. et al. Toxicity and adverse effects of Tamoxifen and other anti-estrogen drugs. **Pharmacol. Ther.**, v. 139, n. 3, p. 392-404, 2013.

YUAN, C. H.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Modulation of apoptotic pathways by human papillomaviruses (HPV): mechanisms and implications for therapy. **Viruses**, v. 4, n. 12, p. 3831-3850, 2012.

ZENG, H.; COMBS, G. F. Selenium as an anticancer nutrient: roles in cell proliferation and tumor cell invasion. **J. Nutr. Biochem.**, v. 19, p. 1–7, 2008.

ZHOU, S. F. Drugs behave as substrates, inhibitors and inducers of human cytochrome P450 3A4. **Cur. Drug Metab.**, v. 9, p. 310–322, 2008.

ANEXO A – Página de rosto do artigo publicado

Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net*Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2020, 20, 00-00

1

RESEARCH ARTICLE

Novel Dihydropyrimidinone-Derived Selenoesters as Potential Cytotoxic Agents to Human Hepatocellular Carcinoma: Molecular Docking and DNA FragmentationJean C. Benassi¹, Flavio A.R. Barbosa², Valdelúcia M.A.S. Grinevicius¹, Fabiana Ourique¹, Daniela Coelho¹, Karina B. Felipe³, Antônio L. Braga², Danilo W. Filho⁴ and Rozangela C. Pedrosa^{1,*}¹Department of Biochemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ²Department of Chemistry, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil; ³Department of Clinical Analysis, Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil; ⁴Department of Ecology and Zoology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil**Abstract: Background and Objective:** Evidence point out promising anticancer activities of Dihydropyrimidinones (DHPM) and organoselenium compounds. This study aimed to evaluate the cytotoxic and antiproliferative potential of DHPM-derived selenoesters (Se-DHPM), as well as their molecular mechanisms of action.**Methods:** Se-DHPM cytotoxicity was evaluated against cancer lines (HeLa, HepG2, and MCF-7) and normal cells (McCoy). HepG2 clonogenic assay allowed verifying antiproliferative effects. The propidium iodide/orange acridine fluorescence readings showed the type of cell death induced after treatments (72h). Molecular simulations with B-DNA and 49H showed docked positions (AutoDock Vina) and trajectories/energies (GROMACS). *In vitro* molecular interactions used CT-DNA and 49H applying UV-Vis absorbance and fluorescence. Comet assay evaluated DNA fragmentation of HepG2 cells. Flow cytometry analysis verified HepG2 cell cycle effects. Levels of proteins (β -actin, p53, BAX, HIF-1 α , γ H2AX, PARP-1, cyclin A, CDK-2, and pRB) were quantified by immunoblotting.**Results:** Among Se-DHPM, 49H was selectively cytotoxic to HepG2 cells, reduced cell proliferation, and increased BAX (80%), and p53 (66%) causing apoptosis. Molecular assays revealed 49H inserted in the CT-DNA molecule causing the hypochromic effect. Docking simulations showed H-bonds and hydrophobic interactions, which kept the ligand partially inserted into the DNA minor groove. 49H increased the DNA damage (1.5 fold) and γ H2AX level (153%). Besides, treatments reduced PARP-1 (60%) and reduced pRB phosphorylation (21%) as well as decreased cyclin A (46%) arresting cell cycle at the G1 phase.

ARTICLE HISTORY

Received: January 17, 2020
Revised: April 18, 2020
Accepted: May 24, 2020DOI:
10.2174/1871520620666200728124640

Anexo B - Comprovante de submissão do segundo artigo

Assunto:Journal of Biomolecular Structure & Dynamics - Manuscript ID TBSD-2020-2703 has been submitted online

Data:23.11.2020 12:07

De:Journal of Biomolecular Structure & Dynamics <onbehalfof@manuscriptcentral.com>

Para:rozangela.pedrosa@ufsc.br

Responder para:TBSD-peerreview@journals.tandf.co.uk

23-Nov-2020

Dear Dr Curi Pedrosa:

Your manuscript entitled "Docking and molecular dynamics predicted B-DNA and dihydropyrimidinone selenoesters interactions elucidating antiproliferative effects on breast adenocarcinoma cells" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in Journal of Biomolecular Structure & Dynamics.

Your manuscript ID is TBSD-2020-2703.

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/jbsd> and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/jbsd>.

Thank you for submitting your manuscript to Journal of Biomolecular Structure & Dynamics.

Sincerely,

Journal of Biomolecular Structure & Dynamics Editorial Office

--

Profa. Titular. Rozangela Curi Pedrosa

Laboratório de de Bioquímica Experimental e Biologia Computacional-LABIOEX

Departamento de Bioquímica

Full professor Rozangela Curi Pedrosa

Laboratory of Experimental Biochemistry and Computacional Biology-LABIOEX

Department of Biochemistry

UFSC - Florianópolis - Campus Universitário Trindade

CEP.: 88040-970 - SC - Brasil

Fone.: +55 (48) 3721 5048

<https://labioex.wordpress.com/>