UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

WANEISSA FERNANDA ALTEI

Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos

São Carlos
2014

WANEISSA FERNANDA ALTEI

Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientador: Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Versão Corrigida

(Versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Altei, Wanessa Fernanda

Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos / Wanessa Fernanda Altei; orientador Adriano Defini Andricopulo - versão corrigida -- São Carlos, 2014. 159 p.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2014.

1. Câncer. 2. Metástase. 3. Triagem biológica. 4. Migração celular. 5. Wound healing. I. Andricopulo, Adriano Defini, orient. II. Título.

**Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre
confiaram em mim mais do que eu mesma.**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmão, que são a sustentação da minha vida.

À Deus, por me ouvir sempre.

Ao Prof. Dr Adriano Defini Andricopulo, pelas oportunidades e orientação neste trabalho, e por me ensinar que tudo pode ficar melhor contanto que se trabalhe para isso.

Aos meus amigos do Laboratório de Química Medicinal e Computacional, Ana Isabela L. Sales, Ivani Pauli, Karina Matos, Mariana Laureano, Luma Oliveira, Rafaela Ferreira, Renata K. Andricopulo, Simone M. Michelan, Leonardo L. G. Ferreira, Ricardo N. dos Santos, Gustavo Trossini, Gustavo A. Lima, Fernando V. Maluf e Livia Salum pelas horas de discussão, descontração e sufoco.

Aos meus amigos do Laboratório de Síntese, Aplicação, Estrutura e Função de Peptídeos e Proteínas – UNESP Araraquara, Eduardo Lentilha, Graziely F. Cespedes, Edson Crusca, Juliana Avaca, Esteban Lorenzon, Saulo Santesso, Isabele Cavalini, pela amizade criada para a vida inteira.

Aos meus amigos do NuBBE, Hosana M. Debonisi, Luis O. Regasini, Octavio Flausino, Marília Valli, Daniara Fernandes, Meri E. Pinto, Douglas G. Picchi, por me acompanharem desde o começo.

Aos Professores que durante esta jornada contribuíram essencialmente para a minha formação: Eduardo M. Cilli e Vanderlan da Silva Bolzani.

Aos demais amigos, Kamila Favoretti, Lidiane Gonçalves, Luciana Lopes Felipe, Kika Gonçalves, Silma Fabricio, Silvana Paulino, Daniel Durigan, Marco Fernando, Cristina França, Juliana Moraes, Adalberto Picinin, Letícia Béu, sem os quais eu jamais teria tido perseverança e momentos de alegria durante a realização deste trabalho.

Ao Julio, meu amigo, que sempre foi um grande companheiro e é um dos principais responsáveis pela minha coragem para enfrentar os desafios que vinham pela minha frente.

Ao Instituto de Física de São Carlos, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

À FAPESP, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

ALTEI, W. F. **Triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos**. 2014. 156 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Câncer é a denominação para um grupo de doenças devastadoras caracterizadas pelo crescimento e multiplicação descontrolados de células anormais que são capazes de invadir estruturas próximas e se espalhar por diversas regiões do organismo. Trata-se de um grande problema de saúde pública mundial, fazendo milhares de novas vítimas a cada ano. De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), são estimados cerca de 580 mil casos novos da doença no Brasil para 2014. A presente tese de doutorado teve como foco principal a identificação e o desenvolvimento de novas moléculas com atividade anticâncer, através de triagens biológicas de compostos de origem natural e sintética, e do estudo das relações entre a estrutura e atividade (SAR). Triagens *in vitro* de derivados sintéticos do ácido gálico, ácido protocatecuico e guanidínicos, além de uma variedade de produtos naturais, possibilitaram a identificação de agentes inibidores da migração e proliferação de células tumorais metastáticas. Uma série de derivados sintéticos indólicos e espirocicloexadienonas, com potente efeito inibitório da migração celular, teve caracterizada a sua ação frente à proteína tubulina, alvo molecular de compostos importantes como o taxol, a vimblastina e a colchicina. Ensaio de imunofluorescência revelaram a ação dos compostos associada a alterações do citoesqueleto celular. Também foram realizados o planejamento e a síntese de três cadeias peptídicas por meio da metodologia de síntese peptídica em fase sólida. Os resultados da avaliação biológica dos peptídeos indicaram o efeito de inibição na migração e proliferação de células tumorais de mama. Finalmente, estudos de metabolômica de duas linhagens tumorais de mama foram conduzidos através de análises de RMN do material celular cultivado.

Palavras chave: Câncer. Cultivo celular. Ensaio celulares. Síntese peptídica.

ABSTRACT

ALTEI, W. F. **Biological screening, identification and design of new candidates for anticancer agents from natural products and synthetic compounds.** 2014. 156 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2014.

Cancer is a group of devastating diseases characterized by the abnormal growth of defective cells which invade adjacent tissues and eventually disseminate to several locations of the body. It is a major public health problem, affecting thousands of people each year. According to the Brazilian National Institute of Cancer (INCA), approximately 580,000 new cases of cancer are predicted for the year of 2014 in Brazil. The main goal of this PhD thesis was the identification and development of new molecules possessing anticancer activity, through biological screenings of compounds from natural and synthetic sources, as well as the investigation of structure-activity relationships (SAR). *In vitro* screening of synthetic derivatives of gallic acid, protocatechuic acid and guanidines, along with a diverse set of natural products, allowed the identification of inhibitors of cellular migration and metastatic cell proliferation. A series of synthetic indolic derivatives and cyclohexanediones, having potent inhibitory activity in cellular migration, was characterized upon tubulin, an important macromolecular target for compounds such as taxol, vinblastine and colchicine. Immunofluorescence assays revealed that the compounds act by altering the cellular cytoskeleton. The design and synthesis of three polypeptides were also performed through solid phase synthesis. The biological evaluation of the peptides demonstrated their inhibition effects on the migration and proliferation of breast cancer cells. Finally, metabolomic studies of two strains of breast cancer cells were conducted by NMR analyses of cellular cultures.

Keywords: Cancer. Cell culture. Cell assays. Peptide synthesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Processo de desenvolvimento de fármacos, desde a descoberta do composto bioativo até a sua inserção no mercado. Fonte: Elaborada pela autora.	32
Figura 2	Etapas do ciclo celular normal. Fonte: Elaborada pela autora	35
Figura 3	Alterações essenciais responsáveis pelo desenvolvimento do caráter maligno nas células tumorais. Fonte: Adaptada de HANAHAN et al. ¹⁶	36
Figura 4	Principais eventos no processo de metástase. Fonte: Adaptada de FIDLER et al. ³⁷	38
Figura 5	Estrutura de compostos que atuam como agentes inibidores de metástase. Fonte: Adaptada de WONG et al. ³⁶	39
Figura 6	Modelo de intravasão de células tumorais de mama. Fonte: Adaptado de YAMAGUCHI et al. ³⁴	43
Figura 7	Estrutura básica das integrinas.	44
Figura 8	Representação das interações do peptídeo cilengitida no sítio de ligação da integrina $\alpha V\beta 3$. Fonte: Adaptada de XIONG et al. ⁵⁸	45
Figura 9	Moléculas anticancer originadas de produtos naturais. A) Terpenóides com ação em tumor de pâncreas; B) Peptídeos derivados do peptídeo natural Sansalvamida A, com atividade em tumor de pâncreas; C) Triterpenos utilizados para a redução do crescimento de células leucêmicas; D) Compostos originados de fontes naturais, como precursores de fármacos para câncer de mama. Fonte: Adaptada de WANG et al. ⁶⁵	46

Figura 10	Produtos naturais atuantes na divisão celular. Fonte: Elaborada pela autora.	47
Figura 11	A) Placa de 24 poços com as células confluentes representadas com aumento de 400 vezes em microscópio óptico. B) Construção da fenda na monocamada celular, visualizada com aumento de 400 vezes em microscópio óptico. Fonte: Elaborada pela autora.	57
Figura 12	Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes em 0 e 22h após a incubação das células e fórmula para o cálculo da porcentagem de inibição do composto teste. Fonte: Elaborada pela autora.	58
Figura 13	Representação esquemática do sistema empregado para a avaliação quantitativa da inibição de migração celular. Fonte: Elaborada pela autora.	58
Figura 14	Placa metálica desenvolvida para o ensaio wound healing. A placa foi encaixada na parte inferior da placa de ensaio. Fonte: Elaborada pela autora.	70
Figura 15	Contagem automática de células na membrana. À esquerda fotomicrografia da membrana do inserto com as células coradas. À direita a marcação das células, para a contagem automática (software: NIS elements). Fonte: Elaborada pela autora.	71
Figura 16	Estrutura do MTS tetrazolio e seu produto formazan. Fonte: Elaborada pela autora.	71
Figura 17	Curvas representando a variação da absorbância em função do número de células, variando-se o tempo de incubação do experimento. Fonte: Elaborada pela autora.	72
Figura 18	Curvas representando a variação da absorbância em função do número de células, variando-se o tempo de incubação do experimento. Fonte: Elaborada pela autora.	73

Figura 19	Variação da absorbância em função do número de células. Fonte: Elaborada pela autora.	73
Figura 20	Estrutura do ácido gálico (1) e seus derivados ésteres (2-9). Fonte: Elaborada pela autora.	75
Figura 21	Estrutura do ácido protocatecuico (10) e seus derivados ésteres (11-14). Fonte: Elaborada pela autora	76
Figura 22	Relações entre estrutura e atividade para ésteres derivados dos ácidos gálico e protocatecuico. Fonte: Elaborada pela autora.	77
Figura 23	Alcalóides naturais empregados na terapia do câncer. Fonte: Elaborada pela autora.	78
Figura 24	Esqueleto central das guanidinas avaliadas. Fonte: Elaborada pela autora.	79
Figura 25	Relação entre estrutura e atividade observada para os derivados guanidínicos sintéticos a partir dos ensaios wound healing. Fonte: Elaborada pela autora.	82
Figura 26	A) Porcentagem de inibição em ensaio <i>wound healing</i> concentração x resposta para os derivados guanidínicos 18 , 19 e 20 . B) Curva de IC ₅₀ do composto 20 , gerada a partir de ensaio quantitativo de inibição da migração celular em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.	83
Figura 27	A) Porcentagem de inibição em ensaio <i>wound healing</i> concentração x resposta. B) Curva de IC ₅₀ gerada a partir de ensaio quantitativo de migração em câmara de Boyden para o composto enidrina. Fonte: Elaborada pela autora.	88
Figura 28	Estrutura da piplartina e regiões responsáveis pela atividade biológica. Fonte: Elaborada pela autora.	91

Figura 29	A) Porcentagem de inibição da migração celular no ensaio <i>wound healing</i> com a piplartina em diferentes concentrações. B) Curva de IC ₅₀ obtida para a piplartina, em ensaio quantitativo em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.	91
Figura 30	Esqueleto central das espirocicloexadienonas avaliadas. Fonte: Elaborada pela autora.	93
Figura 31	Resultado do ensaio concentração x resposta para os compostos 39 , 40 e 42 , em células MDA-MB-231. Fonte: Elaborada pela autora.	96
Figura 32	Curvas de IC ₅₀ dos compostos 39 e 42 , geradas a partir de ensaios quantitativos de inibição da migração celular em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.	96
Figura 33	Estrutura do análogo 45 . Entre parênteses, a porcentagem de inibição apresentada no ensaio <i>wound healing</i> em concentração única de 1 µM. Fonte: Elaborada pela autora.	97
Figura 34	Gráfico de concentração x resposta do composto 45 . Fonte: Elaborada pela autora.	98
Figura 35	Esqueleto central da série de aza-espiros. Fonte: Elaborada pela autora.	99
Figura 36	Curva de concentração x resposta para o análogo 47 . Fonte: Elaborada pela autora.	101
Figura 37	Relações entre estrutura e atividade observada para os derivados espirocicloexadienonas sintéticos a partir dos ensaios de inibição da migração celular. Fonte: Elaborada pela autora	101
Figura 38	Estrutura dos ligantes que ocupam os três sítios de ligação distintos da tubulina. Fonte: Elaborada pela autora.	104

Figura 39	Estruturas de compostos contendo o núcleo indólico. Fonte: Elaborada pela autora.	105
Figura 40	A) Ensaio de modulação da polimerização de tubulina na presença de diferentes concentrações do composto 49 . (B) Ensaio de modulação da polimerização de tubulina na presença de diferentes concentrações do composto 52 . Fonte: Elaborada pela autora.	106
Figura 41	Inibição da migração celular de células de câncer de mama MDA-MB-231 pelos derivados indólicos 49 , 51 e 52 . (A) Fotomicrografias do ensaio <i>wound healing</i> em 0 e 22 h. (B) Gráfico demonstrando as porcentagens de inibição determinadas. Colchicina a 1 μ M foi utilizada como padrão. Fonte: Elaborada pela autora.	108
Figura 42	Imunofluorescência emitida pela tubulina de células MDA-MB-231, mostrando os efeitos causados pelos derivados indólicos na organização dos microtúbulos. Fonte: Elaborada pela autora.	109
Figura 43	Estrutura geral de uma chalcona. Fonte: Elaborada pela autora.	111
Figura 44	Chalconas planejadas para a realização dos ensaios de inibição da polimerização da tubulina e de inibição da proliferação celular. Fonte: Elaborada pela autora.	111
Figura 45	Inibição da migração celular em células MDA-MB-231 para as chalconas 56 e 57 . (A) Fotomicrografias do ensaio <i>wound healing</i> em 0 e 22 h. (B) Gráfico demonstrando as porcentagens de inibição determinadas. (C) Curvas de IC ₅₀ para as chalconas 56 e 57 , obtidas a partir de ensaio quantitativo em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.	113
Figura 46	3,4,5-trimetoxichalconas ativas na inibição da polimerização de tubulina e inibição da migração celular (56 e 57) e derivados 3,4,5-trimetoxi-hidrazidas (58 e 59). Fonte: Elaborada pela autora.	115
Figura 47	Inibição da migração celular de células MDA-MB-231 pela colchicina e pelos compostos 58 e 59 . A) Fotomicrografias do ensaio <i>wound healing</i> em 0 e 22 h. B) Gráfico demonstrando as porcentagens de inibição determinadas. C) Curvas de IC ₅₀	115

para os análogos **58** e **59**, obtidas a partir de ensaio quantitativo em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora

Figura 48	Peptídeo c(RGDfK). A cadeia lateral da lisina é um ponto para a ligação de diferentes substituintes. Fonte: Elaborada pela autora.	118
Figura 49	Esquema de síntese de peptídeos em fase sólida. Fonte: Elaborada pela autora.	118
Figura 50	Fmoc-lisina com protetor de cadeia lateral alloc, ligada à resina 2 cloro-tritil-cloreto. Fonte: Elaborada pela autora.	119
Figura 51	Perfil cromatográfico do peptídeo RGDfK linear bruto. Fonte: Elaborada pela autora.	120
Figura 52	Espectro de massas do peptídeo linear RGDfK. O pico de 1014 g/mol corresponde ao peptídeo com todas as cadeias laterais protegidas. Fonte: Elaborada pela autora.	120
Figura 53	Perfil cromatográfico do peptídeo c(RGDfK) após reação de ciclização. Fonte: Elaborada pela autora.	121
Figura 54	Espectro de massas do peptídeo c(RGDfK) após reação de ciclização. Fonte: Elaborada pela autora.	122
Figura 55	Espectro de massas do peptídeo cíclico RGDfK, sem o protetor Alloc. Fonte: Elaborada pela autora.	123
Figura 56	Espectro de massas do peptídeo cíclico c[RGDfK], sem os protetores Pbf, da arginina e tBu, do aspartato. Fonte: Elaborada pela autora.	123
Figura 57	Perfil cromatográfico da fração bruta obtida da clivagem em ácido acético diluído. Fonte: Elaborada pela autora.	124
Figura 58	Perfil cromatográfico da fração obtida da clivagem após o tratamento em sepack. Fonte: Elaborada pela autora.	124
Figura 59	Esquema de reação para o acoplamento das cadeias peptídicas. Fonte: Elaborada pela autora.	127
Figura 60	Perfil cromatográfico do peptídeo linear obtido após clivagem com HFIP 20 % em DCM. Fonte: Elaborada pela autora.	128

- Figura 61 Espectro de massas da cadeia RGDfK linear após clivagem com HFIP 20 % em DCM. 128
- Figura 62 Comparação das curvas de IC_{50} dos peptídeos sintéticos $^{13}C^{3,6,13}K^{8,9}L_9$ e $^{13}C^{3,6,13}K^{8,9}L_9$ obtidas dos ensaios de proliferação celular. Fotomicrografias das células MDA-MB-231, MCF-7 e DU-145 estão representadas mostrando as diferenças morfológicas entre as três linhagens. Fonte: Elaborada pela autora. 130
- Figura 63 Expansão do espectro de RMN 1H de células tumorais de mama, de 4,5 a 1.0 ppm. O espectro das células MDA-MB-231 (acima) está comparado com o espectro das células MCF-7 (abaixo). Os números se referem ao assinalamento de 9 metabólitos diferentes. Os seguintes metabólitos estão identificados: lactato (1); treonina (2), alanina (3), acetato (4), acetona (5), creatina (6), colina (7), fosfocolina (8), taurina (9). Fonte: Elaborada pela autora. 132
- Figura 64 Expansão do espectro de RMN 1H de células tumorais de mama, de 3,5 a 1,0 ppm após tratamento com CLA. O espectro das células MDA-MB-231 (vermelho) está comparado ao espectro das células MCF-7 (preto). O sinal da acetona (2,23 ppm) está destacado no espectro. Fonte: Elaborada pela autora. 134
- Figura 65 Via bioquímica resumida para a produção do colesterol e corpos cetônicos. A possível alteração do metabolismo pela presença do CLA e a influência da síntese do colesterol na formação da fosfocolina. 136

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação do ácido gálico (1) e de seus derivados (2-9) em ensaios <i>wound healing</i> (linhagem MDA-MB-231). Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	75
Tabela 2	Avaliação do ácido protocatecuico e de seus derivados em ensaios <i>wound healing</i> (linhagem MDA-MB-231). Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	77
Tabela 3	Esqueleto central dos análogos guanidínicos sintetizados e resultado da avaliação em ensaio <i>wound healing</i> (linhagem MDA-MB-231). Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	79
Tabela 4	Efeito do composto 20 na migração celular da linhagem MDA-MB-231.	83
Tabela 5	Resultados dos ensaios de proliferação celular para os compostos 19 e 20 .	84
Tabela 6	Série de compostos avaliada em ensaio <i>wound healing</i> em concentração única. Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	85
Tabela 7	Efeito da enidrina na migração celular da linhagem MDA-MB-231.	88
Tabela 8	Série de compostos avaliada em ensaio <i>wound healing</i> em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	89
Tabela 9	Efeito da piplartina na migração celular da linhagem MDA-MB-231.	92
Tabela 10	Série de compostos avaliada em ensaio <i>wound healing</i> em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	93
Tabela 11	Efeito dos compostos 39 e 42 na migração celular da linhagem MDA-MB-231.	97
Tabela 12	Série de compostos avaliada em ensaio <i>wound healing</i> em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	99
Tabela 13	Resultados dos ensaios de citotoxicidade para as espirocicloexadienonas.	102

Tabela 14	Derivados indólicos avaliados em ensaios <i>wound healing</i> em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	106
Tabela 15	Chalconas avaliadas em ensaio <i>wound healing</i> em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	112
Tabela 16	Efeitos das chalconas 56 e 57 na migração de células MDA-MB-231.	114
Tabela 17	Efeito dos compostos selecionados na migração celular de células MDA-MB-231.	116
Tabela 18	Avaliação do peptídeo sintético c[RGDfK] e seu análogo linear RGDfK em ensaios <i>wound healing</i> (linhagem MDA-MB-231). Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.	129
Tabela 19	Citotoxicidade dos peptídeos sintéticos nas linhagens celulares tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e de próstata (DU-145).	131
Tabela 20	Quantidade relativa de alguns metabólitos identificados no espectro de RMN de células MDA-MB-231 e MCF-7.	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Soroalbumina bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
CLA	Ácido linoleico conjugado (<i>Conjugated linoleic acid</i>)
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenil-indol
DCM	Diclorometano
DIC	Diisopropilcarbodiimida
DIPEA	<i>N, N</i> - diisopropiletilamina
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
ESI	<i>Eletron spray ionization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fmoc	9-fluorenilmetiloxycarbonila
HBTU	Hexafluorofosfato de O-(Benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônico
HOBt	<i>N</i> - hidroxibenzotriazol
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance (<i>High performance liquid chromatography</i>)
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MEC	Matriz extracelular
MTS	[3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolio]
MTT	[3-(4,5- <u>dimethylthiazol</u> -2-il)-2,5-difeniltetrazolio brometo]
NCE	Nova entidade química (<i>New chemical entity</i>)
NME	Nova entidade molecular (<i>New molecular entity</i>)

NRPL	<i>Natural Products Research Laboratories</i>
NuBBE	Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato salino (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PyBOP	Benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfônio hexafluorofosfato
RGD	Arginina-glicina-aspartato
RNS	Espécie reativa de nitrogênio (<i>Nitrogen reactive species</i>)
ROS	Espécie reativa de oxigênio (<i>Oxygen reactive species</i>)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SFB	Soro fetal bovino
tBu	<i>Terc</i> -butila
TFA	Ácido trifluetoacético
WH	<i>Wound healing</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
1.1	Química medicinal e o desenvolvimento de fármacos	31
1.2	Planejamento de agentes antitumorais	33
1.2.1	Produtos naturais e compostos sintéticos no desenvolvimento de agentes anticancerígenos	34
1.3	Câncer	37
1.3.1	Câncer de mama e de próstata	40
1.3.2	Ensaio celulares na triagem de compostos antimetastáticos	41
1.3.3	A metástase como alvo para novos agentes antitumorais	42
1.3.4	Mecanismo da migração celular	45
1.3.5	Integrinas como alvos para a inibição da migração celular	46
1.4	Metabolômica de células tumorais por RMN	48
2	OBJETIVOS	51
3	MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1	Linhagens de células tumorais	55
3.2	Cultivo das células	55
3.3	Ensaio celular <i>wound healing</i>	56
3.3.1	Preparo das células	56
3.3.2	Incubação dos compostos para avaliação	57
3.4	Ensaio de migração celular em câmara de Boyden	58
3.5	Ensaio de proliferação celular	59
3.6	Estratégia para a seleção de compostos	60
3.7	Compostos submetidos à avaliação biológica	60
3.8	Síntese em fase sólida de peptídeos	61
3.8.1	Síntese da cadeia c(RGDfK)	62
3.8.2	Síntese das cadeias KLLLKLLKLLKLLK-NH ₂ e KKLLLKLLKLLKLLK-NH ₂	63
3.8.3	Técnicas espectrométricas para análise das frações peptídicas	63
3.8.3.1	Análise cromatográfica	63
3.8.3.2	Espectrometria de massas	64
3.9	Microscopia confocal	64
3.10	Suplementação de culturas celulares para análises de RMN	65

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	69
4.1	Padronização de ensaios celulares <i>in vitro</i>	69
4.1.1	Ensaio wound healing	69
4.1.2	Ensaio quantitativo de migração celular (câmara de Boyden)	70
4.1.3	Padronização de ensaio de proliferação celular	71
4.2	Triagens biológicas	74
4.2.1	Ácido gálico, ácido protocatecuico e seus derivados ésteres	74
4.2.2	Derivados guanidínicos sintéticos	78
4.2.3	Séries de produtos naturais e sintéticos	84
4.2.3.1	Enidrina	85
4.2.3.2	Piplartina	89
4.2.4	Séries sintéticas: Espirocicloexadienonas	92
4.2.4.1	Planejamento e avaliação biológica de novos análogos espirocicloexadienonas sintéticos	98
4.2.4.2	Avaliação da citotoxicidade em células tumorais	102
4.3	Avaliação da atividade de agentes perturbadores do citoesqueleto na migração celular	103
4.3.1	Derivados indólicos sintéticos: Avaliação na migração celular e na perturbação dos microtúbulos	104
4.3.2	Efeito de chalconas sintéticas do tipo 3,4,5-trimetoxichalconas na migração celular	110
4.3.3	Efeito de hidrazidas sintéticas na migração celular	114
4.4	Planejamento e síntese de peptídeos para avaliação biológica	117
4.4.1	Planejamento	117
4.4.2	Síntese das cadeias peptídicas	118
4.4.2.1	Síntese peptídica da cadeia c(RGDfK)	119
4.4.2.2	Síntese das cadeias KLLLKLLKLLKLLK-NH ₂ e KKLLLKLLKLLKLLK-NH ₂	125
4.4.2.3	Reação de acoplamento das cadeias peptídicas	126
4.4.2.4	Otimização da síntese de cRGDfK	127
4.4.2.5	Atividade biológica dos peptídeos sintetizados	129
4.5	Estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com células de câncer de mama	131
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	139
6	PRODUÇÃO CIENTÍFICA	143
	REFERÊNCIAS	147

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 Química medicinal e o desenvolvimento de fármacos

A população mundial tem crescido constantemente, bem como a sua expectativa de vida, já acima dos 70 anos em boa parte do planeta. Desta forma, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, diabetes e câncer, entre outras, têm atingido patamares alarmantes, elevando a sua importância entre os maiores desafios modernos na busca por novas alternativas terapêuticas.¹

O processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos envolve diversas etapas que requerem grandes investimentos de longo prazo. Em média, o lançamento de um novo fármaco no mercado demanda de 12 a 15 anos, com custos totais da ordem de 800 milhões a 1 bilhão de dólares.²⁻³ As duas grandes fases envolvidas neste processo são: (i) pré-clínica, ou de descoberta, na qual moléculas com atividade biológica são identificadas, caracterizadas e otimizadas *in vitro* e *in vivo* (modelos experimentais em animais) até a descoberta de novas entidades químicas (NCE, na sigla inglesa para *New Chemical Entity*) com potencial de desenvolvimento clínico; e, (ii) fase clínica, ou de desenvolvimento, na qual as NCEs são investigadas para determinar a sua eficácia e segurança em humanos (Figura 1).^{4,5}

A fase pré-clínica compreende a investigação de proteínas de vias bioquímicas envolvidas em estados de disfunção ou doença e a seleção de moléculas pequenas capazes de modular a biomacromolécula eleita para o projeto de planejamento de um novo candidato a fármaco.⁴⁻⁵ Por outro lado, a fase de desenvolvimento clínico se desdobra em 3 etapas principais: (i) fase clínica I, direcionada à avaliação da segurança, dosagem e tolerabilidade das NCEs em pessoas saudáveis (de 20 a 100 voluntários); (ii) fase clínica II, que envolve a avaliação da eficácia e da segurança das NCEs em indivíduos com a doença alvo; e, (iii) fase clínica III, que é a mais longa, podendo levar até 6 anos e consiste em testes com milhares de pacientes em clínicas e hospitais espalhadas pelo mundo para o estabelecimento da eficácia e do impacto do candidato a novo fármaco no tratamento da doença, bem como para o monitoramento de reações adversas a longo prazo.^{6,3,7} Existe ainda uma quarta fase

(fase clínica IV) que se inicia após a comercialização do novo medicamento, com o objetivo principal de acompanhar a segurança e a eficácia em longo prazo.

Figura 1 - Processo de desenvolvimento de fármacos, desde a descoberta do composto bioativo até a sua inserção no mercado. Fonte: Elaborada pela autora.

O faturamento das maiores companhias farmacêuticas multinacionais ainda está ancorado na descoberta e desenvolvimento de moléculas que vendem mais de um bilhão de dólares/ano (fármacos denominados *blockbusters*). Contudo, nos últimos 15 anos, o número de novos fármacos aprovados tem diminuído ao mesmo tempo em que os custos têm aumentado.^{1,8}

Diante deste cenário, os laboratórios farmacêuticos têm investido cada vez mais em estratégias e métodos modernos de química medicinal. Este paradigma envolve várias interfaces interdisciplinares de ciência e tecnologia, conectando conhecimentos em química, física e biologia, entre outros. A química medicinal tem como característica principal a cooperação científica entre pesquisadores de diferentes especialidades, permitindo, assim, a resolução de problemas complexos.⁹

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC, na sigla inglesa para *International Union of Pure and Applied Chemistry*), a química medicinal tem papel central na identificação, planejamento, desenvolvimento, descoberta e interpretação do modo de ação molecular de compostos biologicamente ativos (NCEs). Também assume grande importância na avaliação de propriedades farmacocinéticas e relativas à toxicidade (ADME/Tox: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade), além de estudos das relações entre a estrutura e atividade (SAR, na sigla inglesa para *structure-activity relationships*).^{2,5} Este panorama evidencia a importância do emprego eficiente de estratégias modernas no desenvolvimento de novas entidades químicas, capazes de passar por todas as exigências necessárias para a obtenção de fármacos eficazes e seguros.

1.2 Planejamento de agentes antitumorais

No passado, a identificação de novos compostos antitumorais bioativos se baseava em triagens ao acaso ou aleatórias (tentativa e erro). Embora notável sucesso tenha sido alcançado em um número expressivo de casos, os avanços científicos e tecnológicos estabeleceram novos métodos para a seleção de compostos com atividade biológica.¹⁰ Neste contexto, o uso de tecnologias avançadas e a evolução do conhecimento tem sido um forte aliado no estabelecimento de estratégias interdisciplinares.⁹

O planejamento de fármacos é uma estratégia muito utilizada para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos. Os compostos-líderes podem ser obtidos de uma ampla variedade de fontes, como a fauna e a flora, ou então a partir de compostos sintéticos.¹¹

Os compostos-líderes são obtidos e otimizados através de estratégias de planejamento em química medicinal, modificação molecular e avaliação biológica. O estabelecimento de relações entre a estrutura e atividade (SAR) é fundamental no processo de otimização molecular.¹² O processo culmina na descoberta de NCEs qualificadas e validadas para o processo de desenvolvimento clínico. Duas das principais abordagens empregadas em química medicinal são: (i) planejamento de

fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, na sigla inglesa para *Structure-based Drug Design*); e, (ii) planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, na sigla inglesa para *Ligand-based Drug Design*).¹³⁻¹⁴

Os estudos de SAR e os estudos das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR, na sigla inglesa para *Quantitative Structure-activity Relationships*) são componentes essenciais no processo de otimização e podem ser incorporados ao processo de planejamento.¹⁴

1.2.1 *Produtos naturais e compostos sintéticos no desenvolvimento de agentes anticancerígenos*

A grande diversidade biológica dos seres vivos levou à descoberta de notáveis estruturas químicas com extraordinários efeitos biológicos. Por essa razão, o interesse em compostos de origem natural permanece elevado, com pesquisas sendo realizadas no mundo todo.

Dados da OMS de 1985 apontaram que aproximadamente 65% da população mundial fez uso de medicamentos derivados da medicina tradicional para as suas necessidades de saúde básica.¹⁵ Somado a isso, cerca de 40% dos 520 novos fármacos, aprovados entre 1983 e 1994, foram produtos naturais ou derivados.⁶ Na Figura 2 estão representados compostos de origem natural que são ativos contra o câncer.

Figura 2 - Moléculas anticancer originadas de produtos naturais. A) Terpenóides com ação em tumor de pâncreas; B) Peptídeos derivados do peptídeo natural Sansalvamida A, com atividade em tumor de pâncreas; C) Triterpenos utilizados para a redução do crescimento de células leucêmicas; D) Compostos originados de fontes naturais, como precursores de fármacos para câncer de mama. Fonte: Adaptada de WANG et al.¹⁶

Os primeiros registros modernos do uso de produtos naturais na pesquisa de fármacos anticâncer são da década de 1960, com o uso da podofilotoxina.¹⁷ Desde então, a natureza tem provado que é uma rica fonte de moléculas bioativas, com exemplos de sucesso como os alcalóides da vinca e o taxol (Figura 3), que atuam no processo de divisão celular, provocando apoptose em células com elevada taxa de crescimento.¹⁸ Entretanto, problemas como farmacocinética, resistência e o custo elevado dos tratamentos disponíveis têm limitado o seu uso a uma população maior e mais diversificada. Estas dificuldades tornam a descoberta de novos agentes, mais eficazes e seguros, de enorme importância para a terapêutica adequada dos portadores de câncer.¹⁹

Figura 3 - Produtos naturais atuantes na divisão celular. Fonte: Elaborada pela autora.

Como exemplo de sucesso, podemos citar os Laboratórios de Pesquisa de Produtos Naturais (NRPL, na sigla inglesa para *Natural Products Research Laboratories*) da Universidade da Carolina do Norte, que por meio do uso de

abordagens modernas de química medicinal, desenvolveram compostos que se encontram em fase clínica de desenvolvimento.²⁰ Por outro lado, novas estruturas de compostos de origem natural e sintética são disponibilizadas a cada dia como parte do arsenal fundamental para o desenvolvimento das novas gerações de compostos-líderes.²¹

1.3 Câncer

O câncer se caracteriza pela multiplicação descontrolada de células do organismo.²²⁻²³ Estas células perdem os mecanismos que regulam o crescimento e a multiplicação, devido normalmente a danos do material genético celular (DNA). Estes danos são causados, dentre outros fatores, por agentes externos, como o fumo, radiação solar, vírus ou alimentação. É uma das principais causas de morte no mundo.

Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), são estimados cerca de 580 mil casos novos da doença no Brasil para 2014, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. O câncer de pele do tipo não melanoma será o mais incidente, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero.²⁴

Os tratamentos disponíveis muitas vezes não demonstram a eficácia desejada, justificando o grande interesse no desenvolvimento de novos agentes anticâncer. Mesmo com várias alternativas no mercado, a complexidade da doença é o grande obstáculo para o seu tratamento.²⁵ O fato de ser uma doença causada por alterações no ciclo celular de células do próprio organismo é um fator que aumenta esta dificuldade.

As etapas do ciclo celular normal estão ilustradas na Figura 4. O ciclo reprodutivo de uma célula se inicia na fase *gap 1* (G1), no qual a célula aumenta de tamanho e se prepara para a replicação do DNA, que ocorre na fase de síntese (S). Na fase *gap 2* (G2) a célula se prepara para a mitose (M). As novas células-filhas imediatamente iniciam um novo ciclo. Alternativamente, as células podem parar de se dividir de maneira temporária ou permanente. Danos que levam à alterações nos mecanismos de crescimento e multiplicação são detectados e reparados pelo próprio

DNA. Em células cancerígenas, os mecanismos de auto-reparação não são eficientes, causando alterações no ciclo celular normal.²⁶ Compostos capazes de regular as fases G₂ e M impedem com que a multiplicação celular se concretize.

Figura 4 – Etapas do ciclo celular normal. Fonte: Elaborada pela autora.

A compreensão dos processos que controlam a proliferação celular e dos mecanismos que conduzem às alterações metabólicas e reguladoras exibidas por células cancerosas é desafiadora. O fenótipo destas células é caracterizado por alterações na expressão de enzimas e transportadores de nutrientes, o que eleva a taxa dos fluxos metabólicos, auxiliando na duplicação mais rápida do seu genoma, proteoma e lipidoma.²⁷ Tal complexidade tem levado pesquisadores a questionar quantas vias de regulação de cada tipo de célula alvo sofrem alterações, como isto varia em diferentes partes do corpo e quais alterações dependem exclusivamente da célula tumoral, sem se relacionar com o microambiente que a circunda.²⁸

Em relação a estas questões, seis alterações essenciais são conhecidas como as responsáveis pelo desenvolvimento do caráter maligno de células tumorais (Figura 5). A descrição destas alterações evidencia a dificuldade encontrada ao se estudar e avaliar o efeito de compostos nas células tumorais, ao mesmo tempo que delinea possíveis alvos de atuação para estudos de química medicinal.²⁸

Figura 5 - Alterações essenciais responsáveis pelo desenvolvimento do caráter maligno nas células tumorais. Fonte: Adaptada de HANAHAN et al.¹⁶

O desenvolvimento destas vias de escape dos processos normais de regulação do crescimento e morte celular permite que as células cancerígenas se dividam continuamente formando uma massa celular denominada tumor ou neoplasma, cuja arquitetura tecidual é menos organizada e estruturada do que a de tecidos normais ao seu redor.²⁹

Os tumores primários podem ser classificados em benignos, quando crescem localizados e sem invasão a tecidos adjacentes, ou malignos, quando as células adquirem a capacidade de migrar para regiões distantes do tumor primário e invadir outros locais do organismo, formando tumores secundários, em um processo denominado metástase.²⁹⁻³⁰

Existem mais de 100 tipos diferentes de câncer, os quais são divididos em categorias de acordo com o tecido do qual a célula tumoral se originou.^{28,11}

O câncer se classifica em: (i) carcinoma, que se origina na pele ou em tecidos que revestem ou cobrem órgãos internos. Engloba os adenocarcinomas, carcinomas basocelulares, carcinomas de células escamosas e carcinomas de células transicionais; (ii) sarcoma, que se origina nos ossos, cartilagens, gordura, músculo, vasos sanguíneos e outros tecidos conjuntivos e de suporte; (iii) leucemia, que se origina em tecidos de formação do sangue, como a medula óssea, provocando a

formação de um grande número de células sanguíneas anormais; (iv) linfoma e mieloma, que se forma a partir das células do sistema imune; e, (v) câncer do sistema nervoso central, que atinge os tecidos cerebrais e a medula espinhal.³¹

O tratamento da maioria dos casos de câncer exige uma combinação de diferentes abordagens, como, por exemplo, cirurgia e quimioterapia. Esta última é baseada na destruição das células neoplásicas, que se dividem mais rapidamente do que a maioria das células normais. Contudo, a semelhança entre as células malignas e sadias do organismo dificulta a distinção do tecido a ser tratado, levando ao surgimento de efeitos indesejados e, principalmente, a toxicidade, um dos maiores problemas das terapias convencionais.³²

1.3.1 *Câncer de mama e de próstata*

Os casos de câncer de mama e de próstata estão entre os maiores desafios para o desenvolvimento de novos agentes antitumorais. Apesar das opções terapêuticas disponíveis no mercado, as estatísticas apontam para uma óbvia necessidade de desenvolver estratégias de tratamento mais eficazes.

O câncer de mama é a maior causa de morbidade e mortalidade entre mulheres no mundo todo.³³ Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados.²⁴ O câncer de próstata é o mais prevalente no sexo masculino e representa a segunda maior causa de mortes em homens. Cerca de 50% dos casos apresentam evidência patológica ou clínica de metástase cerebral³⁴. Com o aumento da expectativa de vida mundial, é esperado que o número de casos novos de câncer de próstata aumente cerca de 60 % até o ano de 2015.²⁴

A metástase é uma característica ordinária, tanto nos tumores de mama quanto nos de próstata, constituindo-se como a principal causa de mortalidade dos doentes. Aproximadamente 30 % dos pacientes com câncer de mama desenvolvem metástase, caso em que a resistência à quimioterapia e à radioterapia se torna mais severa.³⁵

Situação semelhante se verifica em relação ao câncer de próstata. Os tratamentos convencionais, como a cirurgia, radiação, quimioterapia, ou a combinação de radioterapia e quimioterapia, levam a resultados ainda bastante insatisfatórios.³⁶ A relevância destes dois tipos de câncer tem levado ao estabelecimento de uma variedade de estudos envolvendo diversas abordagens. Dentre as estratégias adotadas, destacam-se os estudos *in vitro* com linhagens tumorais na identificação de candidatos a novos agentes antitumorais.

1.3.2 Ensaios celulares na triagem de compostos antimetastáticos

As técnicas que permitem o crescimento celular fora do organismo de origem têm sido extensivamente desenvolvidas ao longo do século XX. Desde a descrição a mais de 50 anos da primeira linhagem celular humana, HeLa, milhares de outras linhagens celulares foram obtidas e têm sido uma valiosa ferramenta para o estudo de diversos tipos de câncer, colaborando enormemente na compreensão do funcionamento de células normais e tumorais.³⁷ Existe uma variedade de ensaios celulares para estudos de novos agentes antitumorais. Variam desde os que medem a sensibilidade das células tumorais à compostos químicos, como, por exemplo, os ensaios de MTT e MTS, até os que investigam a apoptose e outros eventos celulares.³⁸⁻³⁹

Para a realização destes ensaios, são necessárias culturas celulares que reproduzam *in vitro* as características das células *in vivo*. Isto é possível através da obtenção de culturas primárias derivadas diretamente de incisões de tecido normal e cultivado, bem como tecido em suspensão celular após o tratamento enzimático. A partir daí, culturas contínuas são constituídas de um único tipo de célula, que podem se propagar serialmente por um número limitado de divisões celulares. Morfologicamente, as culturas se apresentam na forma de suspensão, como células únicas ou como pequenos grupos livres flutuantes; ou ainda na forma de monocamada, aderidas ao frasco de cultura celular.⁴⁰

Linhagens celulares são empregadas para a investigação da função de moléculas individuais e de processos celulares de invasão e metástase em modelos

animais. De fácil manuseio, rápido crescimento, as linhagens são amplamente utilizadas em pesquisas sobre o câncer, levando a uma ótima padronização de experimentos e elevada reprodutibilidade de resultados.⁴¹ Um exemplo importante da utilização de cultivos celulares é a busca por novos compostos inibidores de metástase. Os ensaios *in vitro*, como o *wound healing* (WH)⁴² e os ensaios celulares de inibição de migração e invasão celular em câmara de Boyden, têm se mostrado versáteis na caracterização de agentes capazes de alterar a mobilidade celular.⁴³⁻⁴⁴

Em estudos que compreendem a migração e a invasão celular, as células devem representar tumores com alta probabilidade de metástase, o que justifica o emprego de linhagens celulares tumorais de câncer de mama e de próstata. Com o aumento significativo do tipo de linhagens nas últimas décadas, foram criados bancos de células para facilitar a aquisição de linhagens com o apropriado controle do acesso a patentes de hibridomas e células geneticamente modificadas.¹ Desta forma, os ensaios em laboratório estão mais acessíveis, visto que o material desejado pode ser adquirido comercialmente.

1.3.3 A metástase como alvo para novos agentes antitumorais

A metástase, processo em que ocorre a disseminação de células cancerígenas de um tumor primário para outros tecidos, é a causa mais frequente de mortalidade em pacientes com câncer.⁴⁵⁻⁴⁶ Avanços nas pesquisas nesta área têm resultado na identificação de vários alvos atrativos, incluindo enzimas, receptores celulares e vias de sinalização.⁴⁷

A metástase tumoral envolve uma série de etapas sequenciais e inter-relacionadas (Figura 6). Cada uma destas etapas pode ser limitante e uma falha pode interromper todo o processo. São três passos críticos: (i) adesão das células tumorais à matriz extracelular (MEC) via receptores de superfície; (ii) degradação dos componentes da matriz por enzimas proteolíticas; e, (iii) migração através dos componentes degradados.⁴⁷⁻⁴⁸

Figura 6 - Principais eventos no processo de metástase. Fonte: Adaptada de FIDLER et al.⁴⁸

Durante o processo de metástase, células tumorais com genética e fenótipo instáveis colonizam órgãos distantes adaptando-se ao seu microambiente. Elas interagem com componentes da MEC, incluindo proteínas, citocinas e fatores de crescimento. Outras interações importantes envolvem a membrana basal, o endotélio dos vasos sanguíneos, componentes do sangue na circulação sanguínea, e o microambiente do local onde se formará o tumor secundário.^{29,49} Trata-se, portanto, de um conjunto de possíveis alvos para a atuação de moduladores.⁵⁰ A Figura 6 ilustra a estrutura de compostos que atuam inibindo o processo de metástase.

Figura 7- Estrutura de compostos que atuam como agentes inibidores de metástase. Fonte: Adaptada de WONG et al. ⁴⁷

Esta série de eventos exige que as células metastáticas adquiram propriedades que as tornem capazes de se adaptar a novos microambientes, e também de subvertê-los de uma forma adequada à sua proliferação e sobrevivência.⁵¹ Neste contexto, a motilidade celular é considerada uma etapa essencial da metástase sendo caracterizada como um alvo molecular atraente para o desenvolvimento de terapias anticâncer.⁵²⁻⁵³

1.3.4 Mecanismo da migração celular

Células invasivas de carcinoma adquirem um fenótipo migratório associado ao aumento da expressão de vários genes relacionados com a motilidade celular. Esta modificação as torna capazes de responder aos estímulos do microambiente que guiam a invasão tumoral.⁴⁵ O processo de migração como um todo inclui: (i) polimerização da actina para a protrusão do invadopódio; (ii) adesão à MEC mediada por integrinas; e, (iii) clivagem da MEC por proteínas de superfície.⁵² Cada uma destas etapas pode ser alvo para o desenvolvimento de novos agentes antimetastáticos.

Células de carcinoma de mama, por exemplo, são células migratórias solitárias com uma morfologia amebóide. Estas células frequentemente são observadas sozinhas se movimentando linearmente em associação com as fibras da MEC. Como algumas das fibras convergem para os vasos sanguíneos, estas funcionam como vias de acesso para as células. A migração celular é mediada por quimioatraentes produzidos por vários tipos celulares e difundidos a partir dos vasos sanguíneos. Células de carcinoma adquirem um fenótipo migratório e degradam a membrana basal que circunda o vaso sanguíneo para alcançar a corrente sanguínea. Essas células migram através da MEC para os vasos sanguíneos. Imagens desse processo demonstram que estas células estendem invadopódios, que são protrusões de seu citoesqueleto que penetram nas barreiras dos vasos (Figura 8).⁴⁵

Figura 8 - Modelo de intravasão de células tumorais de mama. Fonte: Adaptado de YAMAGUCHI et al.⁴⁵

1.3.5 Integrinas como alvos para a inibição da migração celular

As integrinas são receptores da superfície celular com localização transmembrana e estão envolvidas no processo de migração celular, fato que justifica o seu envolvimento nas pesquisas por novos moduladores da metástase.^{54,55-56} Responsáveis pela interação da célula com glicoproteínas da matriz extracelular, as integrinas possuem sua expressão elevada quando a célula modifica o fenótipo e se transforma em célula tumoral, ligando-se diretamente aos componentes da MEC, fornecendo a tração necessária para a motilidade e invasão celular.⁵⁷⁻⁵⁸

Estes receptores podem também regular a proliferação das células através da sinalização química para o seu interior (sinalização *outside-in*), determinando respostas celulares à estímulos como migração, sobrevivência, diferenciação e motilidade.^{47,59,60,61} Além de desempenhar um papel fundamental na adesão e migração celular, também agem como moléculas sinalizadoras mediando a expressão de genes e as mudanças no fenótipo celular.⁴⁷

As integrinas são constituídas pela combinação específica de uma subunidade α e uma β que se associam não covalentemente (Figura 9).⁶² Existem 18 tipos de subunidades α e 8 de β , que formam uma família de 24 glicoproteínas transmembrana.^{62,63-64} A maioria delas possui como sítio de reconhecimento a tríade de aminoácidos arginina-glicina-aspartato (Arg-Gly-Asp, RGD), presente em diversas proteínas da matriz extracelular.⁶⁵⁻⁶⁶

Figura 9 - Estrutura básica das integrinas. Fonte: Elaborada pela autora.

Como muitos tumores se originam no epitélio, as integrinas expressas ($\alpha 6\beta 4$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ e $\alpha 3\beta 1$) normalmente são retidas no tumor. Entretanto, a expressão desses receptores pode sofrer considerável mudança entre as células normais e tumorais, como as dos tipos $\alpha \nu\beta 3$, $\alpha 5\beta 1$ e $\alpha \nu\beta 6$, não detectáveis em células normais do epitélio, mas altamente expressas em células tumorais.⁵⁹ Os tumores de mama e de próstata (tumores sólidos), que frequentemente desenvolvem metástase óssea, são conhecidos pela elevada expressão da integrina $\alpha \nu\beta 3$.⁶⁷

A integrina do tipo $\alpha \nu\beta 3$ tem sido vastamente explorada como alvo terapêutico. A tríade de aminoácidos Arg-Gly-Asp, presente nos ligantes naturais, é reconhecida com alta afinidade pelo sítio de ligação deste receptor.⁶⁸ Esta descoberta culminou no estudo de antagonistas do receptor em questão, dentre os quais destaca-se o peptídeo cilengitida [α (RGDf(NMe)V)], um inibidor da integrina $\alpha \nu\beta 3$ em concentrações subnanomolares e que foi desenvolvido pela Merck (atualmente, encontra-se em fase clínica de estudos).^{54-55,59} A remoção de um resíduo ou a troca da ordem compromete a atividade. Além disso, a ciclização da cadeia contendo a tríade Arg-Gly-Asp resulta em alta afinidade e seletividade, graças à conformação restrita que favorece a conformação bioativa.⁵⁵ A estrutura cristalográfica do peptídeo cilengitida com a integrina $\alpha \nu\beta 3$ está depositada no banco de dados PDB (da sigla inglesa para *Protein Data Bank*) com o código PDB: 1L5G (Figura 10).

Figura 10 - Representação das interações do peptídeo cilengitida no sítio de ligação da integrina $\alpha \nu\beta 3$.
Fonte: Adaptada de XIONG et al.⁶⁹

O valor terapêutico e biológico da ativação das integrinas se apresenta como um campo atrativo de investigação ⁷⁰, o que explica a sua aplicação como alvo para o estudo de agentes antimetastáticos. Nos últimos anos, a síntese direcionada de ligantes para atuação nestes alvos tem aumentado consideravelmente, com destaque para os peptídeos contendo em sua cadeia a tríade Arg-Gly-Asp.

1.4 Metabolômica de células tumorais por RMN

Análises de extratos celulares por meio de espectroscopia de RMN em solução têm sido empregadas com sucesso para o estudo do metabolismo celular ⁷¹. Entretanto, tais estudos têm mostrado várias limitações devido à interferência dos solventes e possíveis modificações na composição celular. Além disso, componentes celulares insolúveis não são detectados, podendo levar à interpretação equivocada dos dados gerados. Já a técnica de análise de células intactas por RMN ultrapassa estes problemas, podendo ser mais rápida e mais confiável, o que tem levado pesquisadores a optarem por esta estratégia para o estudo de metabolômica celular.

Esta técnica pode ser empregada como uma ferramenta para a determinação do perfil metabólico celular, fornecendo informações sobre condições bioquímicas e fisiológicas do sistema em estudo em condições *in vitro* e *in vivo* através da análises dos espectros dos metabólitos.⁷²

Tratando-se da terapia do câncer, a análise do perfil metabólico por RMN configura-se em uma alternativa inovadora que possibilita a identificação de alterações causadas por compostos nas células tumorais. Desta forma, é possível avaliar metabolicamente a resposta de um tumor à terapia em questão, o que pode significar um grande avanço no desenvolvimento de novos tratamentos.

Objetivos

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens de células tumorais

Três linhagens celulares foram utilizadas para a realização dos ensaios biológicos, sendo: duas linhagens de carcinoma de mama humano - MDA-MB-231 (sem receptor de estrógeno) e MCF-7 (com receptor de estrógeno), e uma linhagem de carcinoma de próstata humano - DU-145. As linhagens MDA-MB-231 e MCF-7 foram cultivadas em L-15 (Leibovitz) e DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium* – Cultilab) respectivamente, e a linhagem DU-145 foi cultivada em meio RPMI 1640 (*RoswellPark Memorial Institute*). Os meios de cultura empregados para o cultivo das células foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino (SFB), e durante a realização dos experimentos, as células foram mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C. Para o armazenamento, o material foi congelado mediante redução gradativa da temperatura, e estocado em nitrogênio líquido em SFB estéril (Cultilab) contendo 5% de dimetilsulfóxido (DMSO).

3.2 Cultivo das células

Todas as operações envolvidas no manuseio das células foram efetuadas em condições de assepsia, com material estéril e em câmara de fluxo laminar esterilizada previamente através da limpeza de toda a superfície da área de trabalho com álcool 70% e exposição à luz UV por 15 min.

Anteriormente à realização de cada ensaio celular, as células foram descongeladas e cultivadas na forma de monocamada, aderidas à superfície inferior da garrafa de cultura (BD Falcon™ 75 cm²). O procedimento padrão para o cultivo celular consistiu em (i) descongelamento das células; (ii) sub-cultivo das células.

(i) Descongelamento das células: as células armazenadas em nitrogênio líquido foram descongeladas em banho termostatzado a 37 °C, mediante agitação. Após o completo descongelamento do material, a suspensão celular foi gentilmente transferida para um tubo falcon (BD Falcon™) de 15 mL. Foram adicionados 7 mL de meio de cultura e o material foi centrifugado a 1000 rpm por 10 min, permitindo a formação do *pellet* celular. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* celular foi ressuspensionado em meio de cultura e transferido para uma garrafa de cultura de 75 cm² contendo 10 mL de meio enriquecido com SFB.

(ii) sub-cultivo das células: após o crescimento celular a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂, as garrafas de cultura foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e as células desaderidas da superfície empregando-se a enzima tripsina diluída em PBS na proporção 1:3. Foram adicionados 4 mL de meio de cultura enriquecido com SFB para a inativação da enzima, sendo a suspensão resultante centrifugada e o sobrenadante descartado. O *pellet* foi ressuspensionado em meio de cultura e o material foi transferido para uma nova garrafa ou encaminhado para ensaio celular.

3.3 Ensaio celular *wound healing*

3.3.1 *Preparo das células*

A análise qualitativa da capacidade de inibição da migração celular foi realizada de acordo com o ensaio *wound healing*.⁷³ As células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo 1 mL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB. Após a cultura se tornar confluenta, foi realizada uma lesão na camada unicelular com o auxílio de uma ponteira pressionada contra o assoalho da placa de cultura, formando assim uma fenda na camada de células (Figura 11). A cultura foi lavada três vezes com meio de cultura sem soro para a retirada completa dos resíduos celulares (debris) da fenda formada.

Figura 11–A) Placa de 24 poços com as células confluentes representadas com aumento de 400 vezes em microscópio óptico. B) Construção da fenda na monocamada celular, visualizada com aumento de 400 vezes em microscópio óptico. Fonte: Elaborada pela autora.

3.3.2 Incubação dos compostos para avaliação

Os compostos foram diluídos em 1 mL de meio suplementado com SFB em concentrações variáveis. Estas soluções foram depositadas nos poços da placa de cultura, sendo também utilizados um branco (controle negativo) e um padrão (controle positivo). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. O sistema foi fotografado digitalmente em um microscópio invertido (com aumento de 4 vezes). As imagens fotográficas foram capturadas no início do experimento (tempo zero) e após 22 h da incubação das células a 37 °C em 5% de CO₂. O sistema foi monitorado por 72 h, período de tempo necessário para que ocorresse a migração celular, o que permitiu uma melhor avaliação do fechamento da fenda.

As imagens obtidas no início do experimento e após 22 h foram avaliadas medindo-se a área das fendas com o uso do software de manipulação de imagens Image J e NIS elements™ (NIKON). Após a obtenção das áreas, a porcentagem de inibição exibida pelos compostos foi determinada através da equação apresentada na Figura 12.

Figura 12 - Imagens capturadas em microscópio óptico com aumento de 400 vezes em 0 e 22h após a incubação das células e fórmula para o cálculo da porcentagem de inibição do composto teste. Fonte: Elaborada pela autora.

3.4 Ensaio de migração celular em câmara de Boyden

Para a realização dos ensaios quantitativos de migração celular, foram utilizadas placas de 24 poços (BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers - MIC) e insertos com diâmetro de 6,5 mm e poros de 8 µm. A Figura 13 apresenta um esquema simplificado do sistema empregado.

Figura 13 - Representação esquemática do sistema empregado para a avaliação quantitativa da inibição de migração celular. Fonte: Elaborada pela autora.

Para a avaliação da migração celular, foram adicionadas na parte interna do inserto (compartimento superior) $4,0 \times 10^4$ células/300 µL de meio de cultura (sem

soro fetal bovino) e o composto teste. No compartimento inferior (poço da placa de 24 poços), foram adicionados 700 µL de meio de cultura suplementado com 10% de SFB (utilizado como quimioatraente) e o composto teste. Este sistema foi incubado por 6 h em estufa a 37 °C com 5% de CO₂.

Após o tempo de incubação, o meio contido nos insertos foi retirado juntamente com as células que não migraram para a parte inferior da membrana. Com o auxílio de uma haste de algodão o restante de células na parte superior do inserto foi retirado, e as células que migraram para a porção inferior da membrana foram fixadas em metanol e coradas com solução de azul de toluidina em bórax 1% por 5 min. Após a fixação e a coloração das células, a membrana foi recortada utilizando-se uma lanceta cirúrgica e colocada em uma lâmina para contagem em microscópio.⁷⁴

Valores de IC₅₀ (concentração de composto requerida para inibir em 50% a migração celular em condições padrões de ensaio) foram determinados através de curvas do tipo concentração x resposta, empregando-se de 5 a 7 concentrações distintas dos compostos teste (em duplicata), com o auxílio do programa Sigmaplot 9.0TM, que emprega o método de regressão não linear de melhor ajuste.

3.5 Ensaio de proliferação celular

Os procedimentos de cultivo das células para o ensaio de proliferação celular foram os mesmos descritos para os ensaios celulares de migração.

As células foram plaqueadas a uma densidade de $4,0 \times 10^3$ células/ poço, em placas de 96 poços. Após a adesão celular, concentrações variadas dos compostos teste foram adicionadas. O sistema foi incubado por 24 h, e após esse período, 20 µL do reagente MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxiphenil)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolio] foram adicionados a cada poço. Após 4 h de incubação a placa foi lida em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 490 nm.

3.6 Estratégia para a seleção de compostos

Para a identificação de novas moléculas bioativas, foram realizados inicialmente ensaios de *wound healing* com uma concentração única de 10 μ M de todos os compostos avaliados. Esta concentração única pode variar para mais ou para menos, dependendo da classe química em avaliação. Apenas aqueles com inibição do fechamento da fenda $\geq 50\%$ foram selecionados para os ensaios de *wound healing* concentração x resposta, que permitiram uma avaliação semi-quantitativa, determinando se a molécula prosseguiria para os ensaios quantitativos de migração celular. Os ensaios semi-quantitativos também serviram como ponto de partida para a definição da faixa de concentração utilizada nos ensaios quantitativos para a determinação do valor de IC₅₀.

3.7 Compostos submetidos à avaliação biológica

Para a realização deste trabalho, os compostos utilizados foram obtidos a partir de colaborações estabelecidas entre o LQMC e outros grupos de pesquisa, o que permitiu a triagem de uma variedade de classes químicas diferentes. Os colaboradores responsáveis pela obtenção dos compostos avaliados nesse projeto foram:

- Ácido gálico, ácido protocatecuico e seus derivados ésteres: sintetizados no NuBBE, sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva e do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.
- Derivados guanidínicos sintéticos: sintetizados no NuBBE, sob coordenação da Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani e do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara.
- Série de produtos naturais e sintéticos: fornecidos pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Monica Tallarico Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP – Ribeirão Preto.

- Derivados espirocicloexadienonas sintéticas: sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. Fernando Antonio Santos Coelho, da UNICAMP.
- Derivados indólicos sintéticos: sintetizados pelo grupo do Prof. Dr. Fernando Antonio Santos Coelho, da UNICAMP.
- 3,4,5-trimetoxichalconas e hidrazidas: sintetizadas pelo grupo do Prof. Dr. Rosendo A. Yunes e Prof. Dr. Ricardo J. Nunes, da UFSC.

3.8 Síntese em fase sólida de peptídeos

A síntese dos peptídeos foi realizada no laboratório de Síntese, Estrutura e Função de Peptídeos e Proteínas, do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, sob a supervisão do Prof. Dr. Eduardo Maffud Cilli. A síntese em fase sólida dos peptídeos planejados foi conduzida usando a estratégia 9-fluorenilmetiloxycarbonila (Fmoc)/*tert*-butila (tBu), na qual uma solução 20% de piperidina em dimetilformamida (DMF) é usada nas etapas de desproteção do grupo α -amino. Todo o processo de elongação da cadeia peptídica linear foi efetuado em suporte sólido (resina). Os agentes de acoplamento empregados foram o hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônico (HBTU) / *N*, *N*- diisopropiletilamina (DIPEA) ou *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) / *N*, *N*1- diisopropilcarbodiimida (DIC). Cada ciclo de acoplamento foi feito sob agitação moderada por 2 h. A ligação de cada resíduo, bem como a desproteção da porção α -amino foi monitorada por meio da reação de pequenas alíquotas da resina com ninidrina. Entre cada etapa de acoplamento e desproteção a resina foi lavada diversas vezes com diclorometano (DCM) e DMF. Por fim, o peptídeo foi separado da resina por meio de uma solução de clivagem com agitação moderada durante 2 h.

3.8.1 Síntese da cadeia c(RGDfK)

Para a reação de acoplamento da lisina ao suporte sólido, foi utilizado um excesso de 1,2 equivalentes, o que significa 1,8 equivalentes de aminoácido [$1,5 \text{ mmol}$ (grau de substituição da resina) $\times 1,2 = 1,8$]. A quantidade de aminoácido correspondente a 1,8 equivalentes ($452,50 \times 1,8 = 814,5 \text{ mg}$) foi dissolvida em dimetilformamida (DMF). Posteriormente, 1,0 equivalente de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) foi adicionado, e a mistura foi agitada em shaker durante 5 min. Uma quantidade adicional de DIPEA (1,5 eq) foi acrescentada e a mistura ficou em agitação por mais 30 a 60 min. A estimativa do nível de acoplamento do primeiro resíduo à resina foi feita em espectrofotômetro de forma indireta, mediante a desproteção do grupo Fmoc e leitura da absorbância em comprimento de onda de 290 nm. O valor de Fmoc calculado foi 1,4 mmol/g, o que equivale a 1,4 mmol/g de lisina ligada à resina.

Para as reações de acoplamento dos resíduos de aminoácidos, a massa utilizada correspondeu a um excesso de 2 vezes em relação aos 1,4 mmol de lisina ligados à resina. Dessa forma, 2,28 equivalentes de cada aminoácido dissolvido em DMF, adicionados de 2,28 equivalentes de hexafluorofosfato de *O*-(Benzotriazol-1-il)-1, 1, 3, 3-tetrametilurônico (HBTU) / *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA) foram adicionados em cada ciclo de acoplamento. Após a inserção dos 5 resíduos de aminoácidos, foi obtida uma massa de material correspondente ao peptídeo adicionado da resina. Para a clivagem do peptídeo da resina, o material foi misturado com solução de ácido acético diluído/trifluoroetanol/diclorometano, deixando a mistura sob agitação por um período de 2 h. Posteriormente à reação de clivagem, foi adicionado hexano para que houvesse a formação de uma mistura azeotrópica, sendo possível a retirada do ácido acético da mistura por evaporação.

A ciclização da cadeia foi feita com 0,55 mmol de peptídeo em 0,55 mmol de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidino-fosfônio hexafluorofosfato (PyBOP) e 0,55 mmol de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). Posteriormente, 360 mL de DCM e 40 mL de DMF foram adicionados, e a reação ficou sob agitação durante 4 h.

3.8.2 Síntese das cadeias $KLLKLLKLLKLLK-NH_2$ e $KKLLKLLKLLKLLK-NH_2$

A resina escolhida foi do tipo rink amida, com grau de substituição de 0,6 mmol/g. Para o início da síntese, 660 mg da resina foram pesados, e posteriormente “inchados” em DCM. Para as reações de acoplamento, foram utilizados 0,8 equivalentes de cada aminoácido (excesso de 2 vezes em relação ao grau de substituição da resina, para a quantia pesada) dissolvidos em DMF e 0,8 mmol de N-hidroxibenzotriazol (HOBt) / N, N- diisopropilcarbodiimida (DIC).

3.8.3 Técnicas espectrométricas para análise das frações peptídicas

3.8.3.1 Análise cromatográfica

Para análise das frações obtidas na síntese, foi utilizado um HPLC (*High-Performance Liquid Chromatography*) analítico Shimadzu, com detector UV-VIS, em comprimento de onda de 220 e 254 nm, e eluição de solvente variando de acordo com o método empregado. Foi utilizada uma coluna Kromasil com dimensões de 25 x 0,46 cm, do tipo C₁₈, com partículas de 5 µm e fluxo de 1,0 mL/min.

Para as análises cromatográficas foram utilizadas as seguintes fases móveis:

A: [água miliQ 0,045% /ácido trifluoroacético (TFA)]

B: [acetonitrila grau HPLC/ 0,036% ácido trifluoroacético (TFA)]

3.8.3.2 Espectrometria de massas

As análises dos pesos moleculares dos peptídeos foram realizadas por injeção direta em um aparelho Thermo Scientific LCQ Fleet no modo ESI (“eletrospray ionization”), +25 volts, bomba infusão com velocidade 10 µL/min, Sheath gas N₂ a quatro unidades arbitrárias, localizado no Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química – UNESP Araraquara. A técnica baseia-se em um analisador do tipo quadrupolo que ioniza a amostra utilizando um “eletrospray”. Na interpretação do espectro, utiliza-se a equação abaixo:

$$\frac{M + nH}{n} = \frac{m}{z(1)}$$

3.9 Microscopia confocal

Para o ensaio de imunofluorescência, as células MDA-MB-231 foram cultivadas em lâminas de vidro por 24 h. Após a adesão celular, as células foram incubadas com os compostos teste por 48 h. Ao término deste período de incubação as células foram fixadas com *p*-formaldeído a 4 % em PBS, por 20 min. As células fixadas foram permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1 % por 5 min. Para minimizar a interferência do fundo, as células foram tratadas com albumina de soro bovino (BSA) a 2 % durante 30 min. O anticorpo primário anti- α-tubulina (Sigma Aldrich) foi incubado com as células por 1 h, no escuro. Subsequentemente, as células lavadas foram incubadas por 1 h com o anticorpo Alexa Fluor™ 555 (*against mouse*) na presença de 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). As lâminas foram lavadas em PBS e montadas com Vectashield™ (Vector Laboratories). As análises de microscopia confocal de fluorescência foram realizadas em um equipamento Zeiss 780 invertido, com laser de diodo para 405 nm e laser de hélio-neônio para 555 nm, objetiva 63x /1.4 NA Oil Plan-

Apochromat DICTM. A fluorescência do DAPI foi excitada por laser em comprimento de 358 nm e a emissão foi coletada em 461 nm. A fluorescência do Alexa FluorTM 555 foi excitada por laser em comprimento de 555 nm e a emissão foi coletada em 565 nm. O software ZENTM (Zeiss) foi utilizado para a manipulação das imagens.

3.10 Suplementação de culturas celulares para análises de RMN

Para preparar os meios de cultura suplementados com ácido linoleico conjugado (CLA), foi preparada uma solução estoque de CLA (1 mM) em soro fetal bovino (SFB). Esta solução foi filtrada em filtro 0,22 µm e diluída nos meios de cultura DMEM e L-15 para soluções contendo 50 e 100 µM de CLA. Antes dos experimentos, os meios de cultura foram suplementados com 10% de SFB. Cada linhagem celular, MDA-MB-231 e MCF-7, foi cultivada separadamente em três garrafas de cultura de 75 cm² em uma densidade aproximada de $1,4 \times 10^6$ cels/mL. Após três dias em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, o meio de cultura das garrafas foi trocado pelo meio suplementado com CLA em três diferentes concentrações (0; 50 e 100 µM). Após três dias de exposição ao CLA, as células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspensas em água deuterada e centrifugadas. Os *pellets* das células foram submetidos às análises por RMN. Este procedimento foi aplicado para as três concentrações diferentes de CLA, para as duas linhagens celulares. As análises para investigar o efeito do CLA nas células tumorais foram realizadas em quadruplicata.

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Padronização de ensaios celulares *in vitro*

A obtenção de dados robustos e confiáveis a partir de um ensaio biológico está intimamente relacionada com a execução correta das técnicas envolvidas, com a padronização do ensaio em questão e com a validação dos resultados. Desta forma, durante a execução deste projeto de doutorado, foram realizadas a padronização e a otimização de métodos, que permitiram a obtenção e a validação de resultados reprodutíveis e de alta qualidade.

4.1.1 Ensaio *wound healing*

Para assegurar a reprodutibilidade das análises qualitativas dos ensaios *wound healing*, é necessária a formação de uma monocamada celular confluenta que permita a criação da fenda. Deste modo, foi realizada a padronização do número de células por meio do plaqueamento de diferentes concentrações da suspensão celular, englobando uma faixa entre 1×10^4 e 1×10^5 células por poço, considerando-se o emprego de placas de cultura de 24 poços.

As melhores concentrações encontradas para as linhagens tumorais de mama e de próstata foram, respectivamente:

- Linhagem MDA-MB-231 (carcinoma de mama): $1,0 \times 10^5$ células/poço.
- Linhagem DU-145 (carcinoma de próstata): $5,0 \times 10^4$ células/poço.

Também foi realizada a padronização do campo de visão a ser fotografado nos ensaios, para que este fosse exatamente o mesmo nos tempos 0 e 22 h, permitindo, desta forma, a comparação das imagens obtidas no início e no final do experimento. Para isto, foi confeccionada uma placa autoclavável que se encaixa perfeitamente embaixo da placa de 24 poços. Este acessório, com orifícios redondos alinhados com

a região central de cada poço, permitiu a incidência da luz do microscópio sempre no mesmo ponto (Figura 14).

Figura 14 - Placa metálica desenvolvida para o ensaio *wound healing*. A placa foi encaixada na parte inferior da placa de ensaio. Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.2 Ensaio quantitativo de migração celular (câmara de Boyden)

Os insertos utilizados no ensaio de migração celular são fundamentais para a obtenção de bons resultados. Diferentes tipos de material estão disponíveis comercialmente, possibilitando sua adequação ao modelo experimental em questão.

No caso dos ensaios de migração celular com as células MDA-MB-231, os insertos com membranas transparentes, com quantidade menor de poros em sua superfície, produziram melhores resultados na contagem de células, quando comparados aos insertos com membranas translúcidas. Desta forma, adotou-se como padrão o emprego de membranas transparentes nos ensaios quantitativos.

Para a otimização da análise dos resultados, a contagem de células foi automatizada empregando-se o software NIS elements™, ajustando-se os parâmetros de quantidade de luz incidida e os valores de delimitação de área.

A Figura 15 mostra uma fotomicrografia da membrana do inserto após fixação e coloração das células no ensaio de câmara de Boyden. As células que migraram para a porção inferior do inserto aparecem coradas em roxo (à esquerda). Através do

ajuste correto do software, elas foram destacadas em vermelho e contadas automaticamente.

Figura 15 - Contagem automática de células na membrana. À esquerda fotomicrografia da membrana do inserto com as células coradas. À direita a marcação das células, para a contagem automática (software:NIS elements). Fonte: Elaborada pela autora.

4.1.3 Padronização de ensaio de proliferação celular

Os ensaios de proliferação celular baseiam-se na propriedade do composto tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolio] (MTS) (Figura 16) de ser biorreduzido pelas células viáveis, resultando em um produto colorido chamado formazan, que é solúvel em meio de cultura. A detecção é feita por monitoramento em espectrofotômetro, o que permite a determinação da porcentagem de células viáveis presentes no meio.

Figura 16 - Estrutura do MTS tetrazólio e seu produto formazan. Fonte: Elaborada pela autora.

Para a padronização do número de células a ser utilizado nos ensaios, foi realizado um experimento para a análise da variação da absorbância em função do número de células. Células de tumor de mama MDA-MB-231 e MCF-7 foram adicionadas à uma placa de cultura de 96 poços, abrangendo uma faixa de concentração de $1,0 \times 10^3$ células/mL a $1,0 \times 10^5$ células/mL.

Após o período de adesão celular de 24 h, 20 μ L do reagente MTS foram adicionados e a absorbância foi monitorada em comprimento de onda de 490 nm, em intervalos de 30 min, por um período de 4 h. A semelhança das curvas referentes às medidas nos tempos de 2,5 h e 3 h, mostradas nas Figuras 18 (MDA-MB-231) e 19 (MCF-7), revelou a estabilização da absorbância após este período de tempo. A partir deste resultado, padronizou-se um período de incubação de 3 h para a leitura dos resultados, garantindo deste modo, a biorredução completa do MTS para a avaliação da citotoxicidade dos compostos.

Figura 17 - Curvas representando a variação da absorbância em função do número de células, variando-se o tempo de incubação do experimento. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 18 - Curvas representando a variação da absorbância em função do número de células, variando-se o tempo de incubação do experimento. Fonte: Elaborada pela autora.

O ensaio de proliferação requer um determinado período de tempo para que ocorra o crescimento celular. Desta forma, deve-se garantir que ao final do experimento, a absorbância medida ainda sofra variação em função do número de células vivas, ou seja, a absorbância ainda não deve ter atingido um platô. Portanto, para a obtenção das curvas de absorbância x número de células, a quantidade de células utilizadas deve ser padronizada, para que haja uma relação direta entre estes dois parâmetros.

Observou-se que para as duas linhagens celulares, uma concentração acima de $6,0 \times 10^3$ células /poço não é capaz de alterar o sinal de absorbância (Figura 19). Desta forma, para evitar que a absorbância atingisse o platô, uma concentração de $4,0 \times 10^3$ células/poço foi selecionada para a realização dos experimentos.

Figura 19 - Variação da absorbância em função do número de células. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2 Triagens biológicas

4.2.1 Ácido gálico, ácido protocatecuico e seus derivados ésteres

Os compostos fenólicos englobam vários grupos de metabólitos amplamente distribuídos em uma variedade de frutas e vegetais que fazem parte da dieta humana.⁷⁵ Nos últimos anos, o interesse por esta classe química tem aumentado devido principalmente às propriedades antioxidantes, antiinflamatórias e anticâncer apresentadas por estas moléculas.⁷⁶⁻⁷⁷

O papel dos polifenóis na eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS), os insere na categoria de agentes quimiopreventivos. Esta característica é atribuída a dois aspectos típicos dos anéis benzênicos: acidez e presença de elétrons deslocalizados na estrutura – o que lhes confere a habilidade de transferir elétrons e continuar estáveis.⁷⁸

Estudos a respeito dos efeitos celulares dos derivados fenólicos revelam que esta propriedade é proporcional à taxa de incorporação destes compostos pelas células, o que está diretamente relacionado à sua lipofilicidade. Este aspecto é explorado na síntese de derivados, através da variação do número de hidroxilas ligadas ao anel benzênico, bem como do comprimento das cadeias alquílicas.⁷⁹

O ácido gálico (**1**, ácido 3,4,5-triidroxibenzóico) é um dos principais representantes da classe dos polifenóis. Comumente encontrado em plantas e obtido a partir da hidrólise de taninos⁸⁰, é conhecido por sua capacidade antioxidante e por ser um modulador da carcinogênese. Além disso, possui química simples, sendo facilmente aplicado em reações orgânicas, constituindo portanto, um modelo atraente para estudos de química medicinal. Atualmente, existe uma ampla diversidade de compostos bioativos baseados na estrutura central do ácido gálico.⁷⁸⁻⁷⁹

Nesta tese, uma série de oito ésteres sintetizados a partir do ácido gálico foi avaliada em ensaios *wound healing*. Estes compostos foram sintetizados no NuBBE, em colaboração com a Prof^a. Dr^a. Dulce Helena Siqueira Silva e com o Prof. Dr. Luis Octavio Regasini. O conjunto inclui derivados do ácido gálico que diferem no número de átomos de carbono na cadeia alquílica (Figura 20). Nesta série, foi explorada a

relação entre o $\log P$ das estruturas e a atividade, um aspecto já avaliado em ensaios de atividade antifúngica para análogos do ácido gálico.⁸¹

A realização de ensaios de inibição da migração celular para esta série foi motivada pelos dados disponíveis na literatura, que apontam a atividade antimetastática do ácido gálico em células de adenocarcinoma gástrico.⁸² A linhagem celular MDA-MB-231 foi empregada nos ensaios e os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1.

Figura 20 - Estrutura do ácido gálico (1) e seus derivados ésteres(2-9).Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 1 - Avaliação do ácido gálico (1) e de seus derivados (2-9) em ensaios *wound healing* (linhagem MDA-MB-231). Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	$\log P^*$	Concentração (μM)	% de inibição
1	0,59	50	35
2	0,85	50	0
3	1,22	50	0
4	1,73	50	0
5	2,29	50	0
6	3,30	50	48
7	4,30	50	55
8	5,32	50	50
9	7,34	50	97
Evodiamina	-	10	64

*Valores calculados com o software Molinspiration.

Fonte: Elaborada pela autora.

O ácido gálico (1) apresentou atividade moderada (35 % de inibição a uma concentração de 50 μM) sobre a migração celular, enquanto que os ésteres com

cadeias alquílicas de dois a cinco átomos de carbonos foram inativos (Tabela 1). Os derivados que apresentam de seis a quatorze átomos de carbono na cadeia alquílica apresentaram uma porcentagem de inibição mais acentuada.

Os resultados demonstraram que o aumento do número de carbonos aumenta a atividade inibitória, com destaque para o composto **9**, o qual possui a cadeia alquílica mais extensa da série. A acentuação do caráter apolar provavelmente colabora para a interação das moléculas com a bicamada lipídica, aspecto que facilita a internalização dos compostos pela célula.⁷⁸⁻⁷⁹ A publicação de dados semelhantes que tratam da atividade antioxidante, antimutagênica e de indução de apoptose de ésteres do ácido gálico, auxilia a corroborar esta hipótese.⁸²

Os estudos de compostos fenólicos foram continuados com uma nova série de ésteres, utilizando-se como composto de partida o ácido protocatecuico (**10**).

Estudos realizados em linhagens tumorais de adenocarcinoma gástrico descreveram o ácido gálico como o composto mais potente quanto à inibição da metástase, quando comparado com outros ácidos fenólicos, como o cafeico e o protocatecuico.⁸² Desta forma, nosso interesse foi a avaliação da diferença de atividade entre os ácidos gálico e protocatecuico, bem como da alteração da atividade após a inserção de uma cadeia apolar na estrutura do ácido. O ácido protocatecuico (**10**) e a série sintética de seus derivados ésteres (**11-14**) (Figura 21) foram avaliados em ensaios de inibição da migração celular na linhagem MDA-MB-231. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Figura 21 - Estrutura do ácido protocatecuico (**10**) e seus derivados ésteres(**11-14**).Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 2 - Avaliação do ácido protocatecuico e de seus derivados em ensaios *wound healing* (linhagem MDA-MB-231). Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	clog <i>P</i> *	Concentração (μM)	% de inibição
10	0,88	50	22
11	3,59	50	46
12	4,60	50	67
13	5,60	50	20
14	7,60	50	88
Evodiamina	-	10	64

*Valores calculados com o software Molinspiration.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados demonstram que o ácido protocatecuico apresentou uma porcentagem de inibição menor do que o ácido gálico, o que indica uma contribuição da hidroxila na posição 5' para a atividade. Comparando-se também os outros análogos do ácido protocatecuico com os seus correspondentes da série do ácido gálico, é possível concluir que a hidroxila exerce um efeito positivo na atividade dos análogos ésteres. Esta diferença já foi descrita na literatura para uma linhagem celular de tumor gástrico.⁸² Desta forma, foi possível apontar alguns parâmetros estruturais importantes para a atuação dos derivados ésteres dos ácidos fenólicos sobre a mobilidade celular (Figura 22).

Figura 22 - Relações entre estrutura e atividade para ésteres derivados dos ácidos gálico e protocatecuico. Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados mostraram que a lipofilia é uma propriedade relevante no planejamento de novos análogos bioativos baseados no esqueleto dos ácidos fenólicos. De fato, nas duas séries testadas os ésteres com maior log *P* tiveram uma porcentagem de inibição mais pronunciada do que seus análogos com cadeias mais curtas. A retirada da hidroxila da posição 5' também alterou o efeito dos compostos sobre a migração celular, o que demonstrou o papel central deste grupo para atividade biológica da série investigada.

4.2.2 Derivados guanidínicos sintéticos

Dentre a diversidade química dos compostos obtidos a partir de plantas, os alcalóides têm despertado o interesse de pesquisadores devido às suas propriedades biológicas demonstradas em animais e em seres humanos. O taxol isolado da *Taxus brevifolia*, e a camptotecina e derivados, isolados da *Camptotheca acuminata*, são os exemplos mais famosos de alcalóides utilizados na terapia do câncer (Figura 23).⁸³

Figura 23 - Alcalóides naturais empregados na terapia do câncer. Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre os alcalóides isolados de plantas, os guanidínicos são conhecidos por sua capacidade de indução de apoptose celular e inibição de crescimento em células tumorais.⁸⁴ Em 1995 descobriu-se a atividade citotóxica de alcalóides guanidínicos isolados de fontes naturais, dentre eles a pteroginidina (**18**) (Tabela 3) e pteroginina.^{85,22} Estes resultados serviram como referência para a síntese e avaliação biológica de uma série de dez análogos guanidínicos, sendo que três estão descritos na literatura (**15**, **18** e **19**) e sete são inéditos (Tabela 3).

Partindo-se do esqueleto central guanidínico, os análogos foram planejados variando-se os substituintes R₁ e R₂ (Figura 24). Também foram realizadas substituições bioisostéricas na porção guanidina, com a inserção de um átomo de oxigênio (**21** e **23**) ou enxofre (**22** e **24**) no lugar de um nitrogênio. A série foi avaliada em ensaio *wound healing* em concentração única, utilizando-se a linhagem MDA-MB-231. Três compostos apresentaram propriedade de inibição da migração celular. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Figura 24 - Esqueleto central das guanidinas avaliadas. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 3 - Esqueleto central dos análogos guanidínicos sintetizados e resultado da avaliação em ensaio *wound healing* (linhagem MDA-MB-231). Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (10 µM)
15		0

continua

continuação

16

0

17

0

18

58

19

78

20

73*

21

0

22

0

continua

conclusão

23		0
24		0
Evodiamina		70

* Não foi possível medir a fenda para esse composto a 10 μM , portanto o resultado corresponde à concentração de 5 μM .

Fonte: Elaborada pela autora.

Dos compostos que exibiram atividade sobre a migração celular, o análogo **20**, com substituintes farnesila em R_1 e R_2 , apresentou a maior porcentagem de inibição. Houve diminuição da atividade para o análogo **19**, que apresenta dois grupos geranila e para o composto **18**, que possui grupos prenila em R_1 e R_2 . Além do efeito do tamanho de R_1 e R_2 , foi observado que a substituição bioisostérica de um nitrôgeno do grupo guanidina por oxigênio ou enxofre (**21 a 24**) provocou a perda completa do poder inibitório. Este aspecto é ilustrado na Figura 25.

Figura 25 - Relação entre estrutura e atividade observada para os derivados guanidínicos sintéticos a partir dos ensaios *wound healing*. Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos **18**, **19** e **20** foram avaliados em *wound healing* semi-quantitativo, conforme a Figura 26A, fornecendo informações sobre a faixa de concentração na qual possuem efeito na migração celular. A partir dos resultados obtidos nestes ensaios, o composto **20** foi selecionado para a realização de um ensaio quantitativo de inibição da migração celular em câmara de Boyden. A curva e o valor de IC_{50} para o composto **20** estão representados na Figura 26B e Tabela 4, respectivamente.

Figura 26 - A) Porcentagem de inibição em ensaio *wound healing* concentração x resposta para os derivados guanidínicos **18**, **19** e **20**. B) Curva de IC₅₀ do composto **20**, gerada a partir de ensaio quantitativo de inibição da migração celular em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 4 - Efeito do composto **20** na migração celular da linhagem MDA-MB-231.

Composto	<i>Wound healing</i> ^a (%inibição)	IC ₅₀ (µM) ^b Ensaio de migração
Evodiamina	75 (10 µM)	1 ± 0,5
20	73 (5 µM)	3 ± 1

^aOs valores consistem na média de três ensaios independentes. ^b Os valores consistem na média de dois ensaios independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

O valor de IC₅₀ determinado no ensaio quantitativo mostrou que o composto **20** apresentou atividade sobre migração celular de células MDA-MB-23. O mecanismo pelo qual esta inibição ocorre não foi determinado, no entanto, o composto **18** da série, a pteroginidina, é um inibidor de angiogênese em células endoteliais.³¹ Desta forma, é possível que o análogo **20** atue de forma semelhante à pteroginidina, interferindo em um processo que está indiretamente relaciona do com a migração celular.

Após a avaliação do efeito destes compostos em ensaios de migração celular, foram realizados ensaios de proliferação celular nas duas linhagens de tumor de mama: MCF-7 (menos invasiva) e MDA-MB-231 (invasiva). Os compostos **19** e **20** foram incubados com as células em diversas concentrações para a determinação dos valores de IC₅₀ (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados dos ensaios de proliferação celular para os compostos **19** e **20**.

Proliferação celular ^a		
Composto	IC ₅₀ (μM) MCF 7	IC ₅₀ (μM) MDA-MB-231
19	13 ± 1	10 ± 1
20	20 ± 9	10 ± 2

^aOs valores consistem na média de três ensaios independentes, realizados em triplicata.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de IC₅₀ encontrados nos ensaios de proliferação celular revelaram que a linhagem celular MDA-MB-231 foi mais suscetível ao composto **20**. Considerando-se a atuação deste análogo no processo de migração celular, como descrito anteriormente, era esperado que o seu efeito fosse mais pronunciado em linhagens celulares mais invasivas, como é o caso da linhagem MDA-MB-231.

A partir dos resultados, as guanidinas podem ser consideradas como candidatas ao desenvolvimento de novos análogos na busca de novos agentes antimetastáticos.

4.2.3 Séries de produtos naturais e sintéticos

Durante o desenvolvimento desta tese de doutorado, diversas séries de compostos pertencentes a diferentes classes químicas de produtos naturais e sintéticos foram testados quanto à capacidade de inibição da migração celular. Após a avaliação de mais de 100 compostos, algumas moléculas com propriedades interessantes foram identificadas. Os produtos naturais enidrina (**26**)⁸⁶(Tabela 6) e piplartina (**36**) (Tabela 8), reconhecidos na literatura por apresentarem propriedades anticâncer, mostraram atividade significativa nos ensaios qualitativos e foram submetidos à ensaios quantitativos de migração celular para a determinação dos valores de IC₅₀.

4.2.3.1 Enidrina

Uma série de oito compostos com estruturas químicas diversas, obtida pelo grupo da Prof^a. Dr^a. Monica Pupo, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, foi avaliada em ensaio *wound healing* em linhagem tumoral de mama MDA-MB-231 em concentração única de 10 μ M (Tabela 6). Estes compostos não fazem parte de uma única série química, e foram escolhidos aleatoriamente.

Tabela 6 - Série de compostos avaliada em ensaio *wound healing* em concentração única. Evodiamina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (10 μ M)
25		0
26		89

continua

continuação

27	<chem>CC12CCC3C(C1CC[C@H]2C(=O)O)C[C@H]3C</chem>	0
28	<chem>CC(C)[C@H](O)C(=O)C1=C(C(=O)O)C(=O)C2=C1C(=C(C=C2)O)C(=O)C3=C(C=C(C=C3)O)Cl</chem>	0
29	<chem>CC1=C(C=C2C(=C1)OC(=O)C2)C(=O)C(=O)C3=C(C=C(C=C3)O)O</chem>	50
30	<chem>CC(=O)OC12C(=C(C=C1)OC(=O)C2)C(=O)C(=O)C3=C(C=C(C=C3)O)O</chem>	0
continua		

conclusão

31		0
32		30
Evodiamina		75

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as estruturas avaliadas, o composto **26** (enidrina) apresentou a maior porcentagem de inibição da migração celular (89%). A enidrina é um produto natural que pertence à classe das lactonas sesquiterpênicas, sendo conhecida por suas atividades antiinflamatória, antifúngica e antimicrobiana, além de ser um agente antidiabético e um componente de formulações farmacêuticas.⁸⁷ Além disso, também têm sido atribuídas à este composto propriedades citotóxicas em linhagens tumorais.⁸⁴

Mediante o interessante perfil biológico desta substância, após a triagem inicial em *wound healing* qualitativo, a enidrina foi submetida a um ensaio semi-quantitativo (Figura 27), permitindo a seleção de uma faixa de concentração para a realização do ensaio quantitativo e determinação do valor de IC₅₀ em células MDA-MB-231 (Tabela 7).

Figura 27 - A) Porcentagem de inibição em ensaio *wound healing* concentração x resposta. B) Curva de IC_{50} gerada a partir de ensaio quantitativo de migração em câmara de Boyden para o composto enidrina. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 7 - Efeito da enidrina na migração celular da linhagem MDA-MB-231.

Composto	<i>Wound healing</i> ^a	IC_{50} (µM) ^b
	(% inibição - 10 µM)	Ensaio de migração
Evodiamina	75	1,0 ± 0,1
Enidrina	89	1,0 ± 0,1

^a Os valores são representados como a média de três ensaios independentes. ^b Os valores são representados com a média de dois ensaios independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A enidrina apresentou um valor de IC_{50} da ordem de 1 µM. Este resultado é de grande relevância, visto que trata-se de um produto natural que pode ser utilizado como modelo para o desenvolvimento de novas séries químicas sintéticas, planejadas para inibir a migração celular de células tumorais, visando a geração de fármacos antimetastáticos.

4.2.3.2 Piplartina

Uma segunda série, pertencente ao banco de compostos do NuBBE, foi avaliada em ensaio *wound healing* em concentração única de 10 μ M (Tabela 8).

Tabela 8 - Série de compostos avaliada em ensaio *wound healing* em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (10 μ M)
33		40
34		27
35		0
36		97

continua

conclusão

37

0

Colchicina

80

Fonte: Elaborada pela autora.

Dentre as estruturas avaliadas, o composto **36** (piplartina) apresentou porcentagem de inibição de 97 %. Este composto é isolado de várias espécies de *Piper* (Piperaceae). Dados disponíveis na literatura mostram que a pipartina é citotóxica frente a diversas linhagens de células cancerígenas de forma seletiva, sem reduzir a viabilidade de células normais. Até 2011, nenhum dado positivo referente ao mecanismo de ação da pipartina estava disponível na literatura. O composto também se mostrou efetivo na redução de angiogênese e inibiu a formação de vasos sanguíneos no modelo xenográfico.⁸⁸

Análogos de pipartina foram recentemente sintetizados e avaliados quanto a alteração nos níveis de glutathione e ROS e com relação à viabilidade celular. Foi proposto que o sítio eletrofílico em C20-C21 é crucial para a citotoxicidade. Análogos que não possuem a dupla ligação em C13-C14 mantêm o efeito de elevação dos níveis de ROS, porém reduzem a capacidade de diminuir a viabilidade celular (Figura 28). Isso indica que outros mecanismos independentes de ROS podem contribuir para a indução de apoptose pela pipartina. Adicionalmente, observou-se que os dímeros de pipartina apresentam atividade citotóxica 10 vezes mais potente que suas unidades monoméricas.⁸⁹

Figura 28 - Estrutura da piplartina e regiões responsáveis pela atividade biológica. Fonte: Elaborada pela autora.

Em continuidade às avaliações preliminares do efeito da piplartina na migração celular, foi realizado um ensaio semi-quantitativo (Figura 29), que forneceu a faixa de concentração adequada para a determinação da potência em ensaio quantitativo de migração celular. Nestes ensaios em células MDA-MB-231, a piplartina apresentou um valor de IC_{50} da ordem de 3 μM . Os resultados são apresentados na Figura 29 e na Tabela 9.

Figura 29 - A) Porcentagem de inibição da migração celular no ensaio *wound healing* com a piplartina em diferentes concentrações. B) Curva de IC_{50} obtida para a piplartina, em ensaio quantitativo em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 9 - Efeito da piplartina na migração celular da linhagem MDA-MB-231.

Composto	<i>Wound healing</i> ^a	IC ₅₀ (nM) ^b
	(% inibição - 10 µM)	Ensaio de migração
Colchicina	80	475 ± 106
Piplartina	97	2500 ± 100

^a Os valores são representados como a média de três ensaios independentes. ^b Os valores são representados com a média de dois ensaios independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A piplartina, da mesma forma que a enidrina, é um produto natural que apresenta um perfil biológico extremamente importante. Sua atividade biológica descrita na literatura em conjunto com os dados de inibição da migração celular em células tumorais a classificam como possível modelo para o desenvolvimento de novos agentes anticancerígenos. Novas moléculas baseadas na estrutura da piplartina foram planejadas e estão em fase de avaliação em ensaios *in vitro*.

4.2.4 Séries sintéticas: Espirocicloexadienonas

Uma série de espirocicloexadienonas sintetizada pelo grupo do Prof. Dr. Antonio Coelho, da UNICAMP, foi avaliada quanto à sua capacidade de inibição da migração celular. Todas as estruturas foram sintetizadas conservando-se a porção do anel hexadienona ligado a um segundo anel por um carbono espiro. Esta porção da estrutura, conhecida como espiroexadienona, é reconhecida na literatura por sua atividade fungicida, sendo encontrada em vários produtos naturais biologicamente ativos, como por exemplo o alcalóide anosqualina (atividade purgativa), a neolignana futeonona (anti-inflamatório) e a lignana interiorina A (tratamento de irregularidades do ciclo menstrual).⁹⁰ Os compostos da série avaliada diferem apenas nos grupos substituintes em R₁ e R₂ (Figura 30). Os resultados do ensaio *wound healing* em concentração única estão representados na Tabela 10.

Figura 30 - Esqueleto central das espirocicloexadienonas avaliadas. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 10 - Série de compostos avaliada em ensaio *wound healing* em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (1 μ M)
38		56
39		93

continua

continuação

40

93

41

42

42

99

43

0

continua

conclusão

44		0
Colchicina		82

Fonte: Elaborada pela autora.

Nos ensaios de migração celular realizados, três dos compostos (**39**, **40** e **42**) contendo a porção espiro em sua estrutura mostraram atividade promissora, com inibição > 90 % em ensaios *wound healing* (concentração única de 1 μ M).

Foi observado que os três compostos mais ativos apresentavam como característica comum um anel benzênico em R₁. A substituição deste benzil em R₁ por um anel tiofeno provocou uma redução da atividade, como observado para a molécula **41**. Para os análogos **43** e **44**, cujo substituinte em R₁ foi substituído por uma cadeia alifática, não foi observada nenhuma atividade frente à migração celular.

Os ensaios *wound healing* semi-quantitativos confirmaram a inibição da migração celular em concentrações inferiores a 5 μ M (Figura 31).

Figura 31 - Resultado do ensaio concentração x resposta para os compostos **39**, **40** e **42**, em células MDA-MB-231. Fonte: Elaborada pela autora.

Como pode ser observado na Figura 32 o análogo **42** apresentou maiores porcentagens de inibição em concentrações inferiores a 1 μM. Os análogos **39** e **40** apresentaram um perfil parecido de inibição da migração celular.

As espirocicloexadienonas **39** e **42** foram selecionadas para a realização de ensaio em câmara de Boyden. Esta escolha foi baseada na comparação da atividade biológica em função da mudança do número de hidroxilas no anel benzênico, devido à importância do grupo 3,4,5-trimetoxibenzênio na atividade antitumoral de compostos orgânicos.^{91,92} As curvas e os valores de IC₅₀ estão representados na Figura 32 e Tabela 11, respectivamente.

Figura 32 - Curvas de IC₅₀ dos compostos **39** e **42**, geradas a partir de ensaios quantitativos de inibição da migração celular em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 11 - Efeito dos compostos **39** e **42** na migração celular da linhagem MDA-MB-231.

Composto	<i>Wound healing</i> ^a	IC ₅₀ (nM) ^b
	(%inibição a 1 μ M)	Ensaio de migração
Colchicina	82	475 $\pm$ 106
39	93	794 $\pm$ 1
42	99	190 $\pm$ 1

^aOs valores são representados como a média de dois ensaios independentes, realizados em triplicata. ^b Os valores são representados como a média de dois ensaios independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados comprovaram a elevada potência dos compostos frente à inibição da migração celular, sendo que o análogo **42** mostrou ser quatro vezes mais potente do que o **39**, comprovando que além da importância do anel benzênico em R₁, a presença de três metoxilas também contribuiu para aumentar a inibição da migração celular para estes compostos.

A partir destes resultados, o análogo **45** foi sintetizado, utilizando-se como referência a estrutura do composto **42**. O grupo etoxila foi substituído por uma metoxila em R₂ com o objetivo de avaliar a importância de R₂ para a atividade. Este novo análogo foi avaliado em ensaios *wound healing* em células MDA-MB-231, apresentando porcentagem de inibição semelhante ao análogo **42** (Figura 33).

Figura 33 - Estrutura do análogo **45**. Entre parênteses, a porcentagem de inibição apresentada no ensaio *wound healing* em concentração única de 1 μ M. Fonte: Elaborada pela autora.

Para esta molécula, os ensaios de inibição da migração celular mostraram resultados semelhantes aos do composto **42**. A triagem inicial em concentração única de 1 μM mostrou uma porcentagem de inibição da migração celular $> 90\%$. No ensaio concentração x resposta, o análogo **45** também apresentou um perfil de atividade parecido com o do composto **42** (Figura 34).

Figura 34 - Gráfico de concentração x resposta do composto **45**. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4.1 Planejamento e avaliação biológica de novos análogos espirocicloexadienonas sintéticos

Os resultados apresentados pelos estudos com as espirocicloexadienonas serviram como ponto de partida para a síntese de uma nova série com o padrão estrutural cicloexadienona. Nesta nova série, denominada de aza-espiros, o anel diidrofurano foi substituído por um anel de 5 membros, contendo um grupo nitrona (Figura 35). O ensaio qualitativo *wound healing* revelou uma acentuada atividade sobre a migração celular para o composto **47**. (Tabela 12).

Figura 35 - Esqueleto central da série de aza-espiros. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 12 - Série de compostos avaliada em ensaio *wound healing* em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (10 μ M)
46		58
47		97

continua

conclusão

48

30

Colchicina

78*

*Composto avaliado em concentração de 1 μ M.

Fonte: Elaborada pela autora.

O análogo **47**, que possui um benzeno em R₂, apresentou porcentagem de inibição maior do que 90% a uma concentração de 10 μ M. A atividade sobre a migração celular é pronunciada, porém os compostos foram avaliados a uma concentração 10 vezes maior do que a utilizada para as espirocicloexadienonas anteriormente descritas.

O ensaio semi-quantitativo mostrou que este análogo inibe a migração celular a partir de 2,5 μ M, como ilustrado na Figura 36.

Figura 36 - Curva de concentração x resposta para o análogo **47**. Fonte: Elaborada pela autora.

Os compostos aza-espiros de uma forma geral foram menos ativos do que a primeira série de espirocicloexadienonas, isto indica que a presença do anel diidrofurano afeta de maneira positiva a atividade destes compostos sobre a migração celular. Contudo, compostos contendo o grupo nitrona são descritos na literatura como agentes terapêuticos, principalmente no que diz respeito à sua capacidade antioxidante devido à capacidade de aprisionar radicais livres.^{93,94}

A partir dos resultados descritos, realizou-se a determinação de algumas características importantes para a ação na migração celular da série de espirocicloexadienonas. A Figura 37 representa as relações entre estrutura e atividade elaboradas para as moléculas investigadas.

Figura 37 – Relações entre estrutura e atividade observada para os derivados espirocicloexadienonas sintéticos a partir dos ensaios de inibição da migração celular. Fonte: Elaborada pela autora.

4.2.4.2 Avaliação da citotoxicidade em células tumorais

As espirocicloexadienonas mais potentes foram avaliadas em ensaios de citotoxicidade. Nestes experimentos, foram empregadas três linhagens celulares distintas: (i) MCF-7 (tumor de mama não invasivo); (ii) DU-145 (tumor de próstata invasivo); e (iii) MDA-MB-231 (tumor de mama invasivo). A potência destes compostos, representada como valores de IC₅₀ na Tabela 13 mostrou que as espirocicloexadienonas são altamente citotóxicas para as linhagens celulares em questão.

Tabela 13 - Resultados dos ensaios de citotoxicidade para as espirocicloexadienonas.

Proliferação celular			
Composto	IC₅₀ (μM) MCF 7	IC₅₀ (μM) DU-145	IC₅₀(μM) MDA-MB-231
Doxorrubicina	-	16 ± 3	3 ± 1
38	10 ± 1	8 ± 1	4 ± 1
39	-	11 ± 2	5 ± 1
40	3 ± 1	4 ± 1	3 ± 0,5
42	2,0 ± 0,2	7 ± 1	2,0 ± 0,2
45	-	6 ± 1	2,0 ± 0,2

Fonte: Elaborada pela autora.

A comparação com o padrão doxorrubicina indicou que os compostos avaliados foram citotóxicos. No entanto, são necessários estudos complementares para a determinação do mecanismo pelo qual estes compostos exercem seus efeitos citotóxicos. Novos estudos também são necessários para avaliar se o efeito na migração celular está relacionado ao efeito citotóxico. O padrão estrutural das espirocicloexadienonas é ainda pouco explorado em relação à atividade antitumoral, fato que as coloca com uma classe de substâncias de grande interesse para o desenvolvimento de novos agentes anticâncer.

4.3 Avaliação da atividade de agentes perturbadores do citoesqueleto na migração celular

Os microtúbulos são componentes essenciais do citoesqueleto e têm papel importante em muitas funções celulares como a migração e divisão celular. São estruturas tubulares constituídas de heterodímeros de α e β tubulina, e têm sido considerados como alvo ideal para o tratamento do câncer por causa do seu papel essencial na mitose.⁹⁵⁻¹⁰⁰ Há diversas moléculas pequenas, incluindo os alcalóides, os macrolídeos e os peptídeos, que se ligam na tubulina, e perturbam a dinâmica de montagem dos microtúbulos.¹⁰¹⁻¹⁰² A maioria deles se liga em um dos três sítios de ligação desta proteína: os sítios do taxol, da vinca e da colchicina (Figura 38).¹⁰² A interação de moduladores com cada um dos sítios provoca diferentes alterações na função dos microtúbulos.

Desta forma, pode-se dividir os agentes antitubulina em duas classes: (i) estabilizadores de microtúbulos que impedem a formação do fuso mitótico, incluindo os taxóides (paclitaxel e docetaxel), as epotilonas e os discodermolídeos, e (ii) desestabilizadores de microtúbulos que inibem a polimerização da tubulina, incluindo os alcalóides de vinca (vincristina, vinblastina, vindestina e vinorelbina), colchicina, podofilotoxina e combretastatina A-4.^{19,103-104}

Ligantes do sítio da colchicina, em geral, são estruturalmente mais simples do que os taxanos, as epotilonas e os alcalóides da vinca.¹⁰⁵⁻¹⁰⁶ Embora a colchicina não seja utilizada clinicamente por causa da sua elevada toxicidade, outras moléculas que se ligam nesse sítio têm obtido sucesso na pesquisa por novos agentes antitubulina.¹⁰⁷ Entre os ligantes identificados, a combretastatina A4 e a alocolchicina são menos tóxicos e têm alta afinidade pela tubulina, sendo considerados agentes promissores para a terapia antitumoral.^{17,108}

Figura 38 - Estrutura dos ligantes que ocupam os três sítios de ligação distintos da tubulina. Fonte: Elaborada pela autora.

A função dos microtúbulos na migração celular foi estabelecida quando observou-se a interrupção da motilidade celular de fibroblastos tratados com o desestabilizador de microtúbulos colcemida. Estudos subsequentes revelaram que a despolimerização dos microtúbulos e a alteração na sua dinâmica, demonstrada através de experimentos com o taxol, eram capazes de provocar alterações na motilidade celular.¹⁰⁹

4.3.1 Derivados indólicos sintéticos: Avaliação na migração celular e na perturbação dos microtúbulos

O sistema indólico consiste em um esqueleto aromático heterocíclico encontrado em vários compostos orgânicos, como o aminoácido triptofano (**a**), o

antiinflamatório indometacina (**b**) e o bloqueador beta adrenérgico pindolol (**c**) (Figura 39).

Figura 39 - Estruturas de compostos contendo o núcleo indólico. Fonte: Elaborada pela autora.

Devido à sua grande diversidade estrutural, os indóis tornaram-se um importante foco para síntese e funcionalização de compostos biologicamente ativos.¹¹⁰⁻¹¹¹ O anel indol é considerado como a porção da estrutura responsável pelas propriedades anticâncer de diversos compostos farmacologicamente ativos.¹¹² Indóis derivados de produtos naturais, assim como produtos sintéticos e semi-sintéticos têm sido descritos como agentes bloqueadores da mitose devido à sua atividade inibitória sobre a polimerização de tubulina. Atribui-se esta inibição à interação destas moléculas com o sítio da colchicina. Desta forma, compostos contendo o sistema indol como estrutura central são de especial interesse para o tratamento do câncer.¹¹³

A partir deste perfil biológico, o grupo do Prof. Dr. Antonio Coelho realizou a síntese de uma série de derivados indólicos sintéticos, para a avaliação destes compostos quanto aos seus efeitos sobre a organização dos microtúbulos.

Nesta avaliação foram realizados experimentos com a enzima tubulina e também com células tumorais que apresentam grande poder migratório. A colchicina, um alcalóide que perturba a organização dos microtúbulos, foi utilizada como padrão.¹⁰⁵

Inicialmente os derivados indólicos foram avaliados em ensaios de polimerização da tubulina baseados em fluorescência. Nestes experimentos, realizados pelo aluno de doutorado do LQMC, Ricardo N. dos Santos, quatro derivados que apresentaram inibição sobre a polimerização da tubulina (Figura 40) foram selecionados para os ensaios de migração celular. Para avaliar os efeitos dos derivados indólicos na migração das células MDA-MB-231, os compostos **49**, **51** e **52**

foram submetidos a ensaios *wound healing* em concentração única de 50 μM (Tabela 14).

Figura 40 - (A) Ensaio de modulação da polimerização de tubulina na presença de diferentes concentrações do composto **49**. (B) Ensaio de modulação da polimerização de tubulina na presença de diferentes concentrações do composto **52**. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 14 – Derivados indólicos avaliados em ensaios *wound healing* em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (50 μM)
49		70

Continua

conclusão

50		0
51		0
52		75
Colchicina		74*

*Composto avaliado em concentração de 1µM.

Fonte: Elaborada pela autora.

A análise das fotomicrografias (Figura 41) mostrou que os análogos **49** e **52** apresentaram um perfil de inibição de migração celular similar ao da colchicina, enquanto o derivado **51** não foi capaz de inibir a migração. Estes resultados coincidiram com aqueles obtidos nos ensaios de polimerização da tubulina, demonstrando que a presença de grupos metoxila no substituinte fenil está relacionada com o aumento da atividade.

Figura 41 - Inibição da migração celular de células de câncer de mama MDA-MB-231 pelos derivados indólicos **49**, **51** e **52**. (A) Fotomicrografias do ensaio *wound healing* em 0 e 22 h. (B) Gráfico demonstrando as porcentagens de inibição determinadas. Colchicina a 1 μ M foi utilizada como padrão. Fonte: Elaborada pela autora.

Os efeitos dos compostos **49** e **52** nos ensaios de polimerização de tubulina e de migração celular revelaram que os derivados indólicos provocam alterações nos microtúbulos, o que provavelmente é o fator responsável pela redução da motilidade celular.

Com o propósito de verificar se o alvo de ação dos derivados indólicos era a tubulina, foi realizado um ensaio de imunofluorescência com as células MDA-MB-231, incubadas com os compostos **49** e **52**. Esta técnica permitiu a marcação do núcleo celular e do citoesqueleto, possibilitando a visualização de possíveis alterações morfológicas causadas pelas moléculas em teste. Os experimentos foram realizados em células que não foram incubadas com nenhum dos compostos (células controle); em células incubadas com a colchicina; e finalmente em células incubadas com duas concentrações diferentes de cada um dos derivados indólicos.

As células controle exibiram uma rede de microtúbulos organizados e alinhados, conforme o esperado. Além disso, a morfologia do citoesqueleto apresentou-se alongada, característica da linhagem celular em questão. As células tratadas com a colchicina (em concentrações de 1 e 5 μ M), mostraram um citoesqueleto desorganizado com uma densidade menor de microtúbulos,

caracterizando uma alteração no processo de polimerização dos filamentos de tubulina.

Os derivados indólicos **49** e **52** foram estudados em concentrações de 100, 50 e 10 μM . As imagens de microscopia confocal mostraram claramente as alterações apresentadas pelo citoesqueleto das células expostas a estes compostos (Figura 42).

Figura 42 - Imunofluorescência emitida pela tubulina de células MDA-MB-231, mostrando os efeitos causados pelos derivados indólicos na organização dos microtúbulos. Fonte: Elaborada pela autora.

As imagens revelaram que os derivados **49** e **52** provocaram alterações na organização dos microtúbulos. O derivado **49** causou uma redução da densidade dos microtúbulos de forma semelhante à colchicina. Com relação ao derivado **52**, observou-se um citoesqueleto mais denso, porém com fragmentação dos filamentos

de microtúbulos. Esta diferença ficou mais evidente nas imagens referentes à concentração de 100 μM . A razão desta resposta diferente para cada composto possivelmente está relacionada ao modo como estas moléculas interagem com o sítio da colchicina. Estudos sobre o modo de interação dos derivados indólicos com a tubulina seriam úteis para complementar os resultados reportados nesta tese.

A técnica de imunofluorescência proporcionou uma clara visualização da desorganização dos filamentos de tubulina, permitindo a determinação do alvo molecular dos derivados indólicos testados.

Este resultado demonstra o sucesso da associação da microscopia de fluorescência, dos ensaios celulares e dos testes de polimerização da tubulina, como uma estratégia experimental importante em estudos química medicinal.

4.3.2 Efeito de chalconas sintéticas do tipo 3,4,5-trimetoxichalconas na migração celular

As chalconas constituem uma classe de produtos naturais precursores da síntese de flavonóides e isoflavonóides, definidas estruturalmente pela presença de dois anéis aromáticos ligados por 3 carbonos α , β insaturados em um sistema carbonílico (Figura 43). Por sua química versátil e facilidade de síntese, esses compostos têm se destacado na pesquisa por novos agentes terapêuticos, apresentando uma variedade de atividades biológicas, tais como antibacteriana, anticâncer, antimalárica, tripanocida e anti-inflamatória.¹¹⁴⁻¹¹⁵ Além disso, estudos demonstram a capacidade de chalconas sintéticas de inibir a proliferação celular de várias linhagens tumorais, fato que as torna estruturas atrativas no desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento do câncer ¹¹⁶⁻¹¹⁷.

Figura 43 - Estrutura geral de uma chalcona. Fonte: Elaborada pela autora.

O laboratório de Estrutura e Atividade da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), coordenado pelo Prof. Dr. Rosendo Yunes e pelo Prof. Dr. Ricardo Nunes, tem explorado extensivamente o perfil biológico das chalconas. Desta forma, a partir de resultados de citotoxicidade em células leucêmicas obtidos para o composto **53**, uma série de chalconas com estruturas baseadas em ligantes clássicos do sítio da colchicina foi desenvolvida (Figura 44). Esta série foi testada em ensaios de inibição da polimerização da tubulina e de inibição da proliferação celular.

Figura 44 - Chalconas planejadas para a realização dos ensaios de inibição da polimerização da tubulina e de inibição da proliferação celular. Fonte: Elaborada pela autora.

A partir de uma primeira série planejada, foi observada a influência positiva do substituinte 3,4,5-trimetoxifenila para a inibição da polimerização da tubulina. O composto **56** foi o mais ativo e serviu como modelo para o planejamento de uma nova série de 19 chalconas, dentre as quais o composto **57** foi o mais promissor.

Adicionalmente aos ensaios descritos, as chalconas **53** a **57** foram investigadas quanto à sua habilidade de provocar perturbações nos microtúbulos, morfologia de apoptose e fosforilação da histona H3 (marcador de mitose) em células HeLa. Nestes ensaios, os análogos **56** e **57** foram os mais ativos e por esta razão foram selecionados para a realização de ensaios de inibição da migração celular. Essa

abordagem baseia-se na alteração causada na mobilidade celular por agentes que têm a tubulina como alvo molecular, tendo em vista que a organização dos microtúbulos está envolvida na movimentação das células.¹¹⁸ Adicionalmente, as chalconas **53** a **57** foram avaliadas frente à capacidade de inibição da migração celular (Tabela 15).

Tabela 15 - Chalconas avaliadas em ensaio *wound healing* em concentração única. Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (1 μ M)
53		0
54		0
55		0
56		46
57		54

continua

conclusão

Colchicina

74

Fonte: Elaborada pela autora.

Posteriormente, as chalconas **56** e **57** foram avaliadas em ensaios *wound healing* (Tabela 16) em concentração única em células MDA-MB-231 e DU-145, com porcentagem de inibição semelhante nas duas linhagens. A linhagem MDA-MB-231 foi utilizada para a determinação do valor de IC₅₀ (Figura 45).

Figura 45 - Inibição da migração celular em células MDA-MB-231 para as chalconas **56** e **57**. (A) Fotomicrografias do ensaio *wound healing* em 0 e 22 h. (B) Gráfico demonstrando as porcentagens de inibição determinadas. (C) Curvas de IC₅₀ para as chalconas **56** e **57**, obtidas a partir de ensaio quantitativo em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 16 - Efeitos das chalconas **56** e **57** na migração de células MDA-MB-231.

Composto	<i>Wound healing</i> ^a	IC ₅₀ (nM) ^b
	(% de inibição - 1 μ M)	Ensaio de migração
Colchicina	74	475 $\pm$ 106
56	46	1095 $\pm$ 29
57	54	656 $\pm$ 119

^a Os valores são representados como a média de três ensaios independentes. ^b Os valores são representados como a média de dois ensaios independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

Os resultados revelaram que a chalcona **57** é mais potente do que a chalcona **56**, considerando os dois ensaios realizados, mostrando uma capacidade de inibição da migração celular similar à da colchicina. Comportamento semelhante foi descrito na literatura para a combretastatina A-4, um potente modulador da polimerização de tubulina que inibe a migração celular de células de tumor de bexiga.¹¹⁹⁻¹²⁰ No caso das chalconas estudadas, o mecanismo de migração celular precisa de maiores investigações, contudo, os resultados obtidos são de grande importância para o planejamento de novos análogos, bem como para o estabelecimento de relações entre estrutura e atividade para esta classe de compostos.

4.3.3 Efeito de hidrazidas sintéticas na migração celular

A partir dos resultados obtidos para as chalconas **56** e **57**, foi investigada uma nova série de 24 *N*-benzilideno-3,4,5-trimetoxi-benzo-hidrazidas, análogas à série de 3,4,5-trimetoxichalconas (Figura 46). O esqueleto central das hidrazidas pode ser considerado uma estrutura privilegiada à qual podem ser adicionados substituintes em posições específicas, resultando em estruturas capazes de interagir seletivamente com diferentes alvos biológicos.¹¹⁶

As hidrazidas foram submetidas aos ensaios de inibição da polimerização de tubulina e de citotoxicidade em células leucêmicas. De maneira semelhante às chalconas, o grupo 3,4,5-trimetoxifenila influenciou positivamente a atividade frente

aos alvos testados. Os dois compostos mais ativos da série, **58** e **59**, foram selecionados e avaliados em ensaios de inibição da migração celular.

Figura 46 – 3,4,5-trimetoxichalconas ativas na inibição da polimerização de tubulina e inibição da migração celular (**56** e **57**) e derivados 3,4,5-trimetoxi-hidrazidas (**58** e **59**). Fonte: Elaborada pela autora.

As hidrazidas **58** e **59** foram avaliadas em ensaios *wound healing* em concentração única em células MDA-MB-231 e DU-145, com porcentagem de inibição semelhante nas duas linhagens (Figura 47 e Tabela 17). Os ensaios quantitativos foram feitos com a linhagem MDA-MB-231.

Figura 47 - Inibição da migração celular de células MDA-MB-231 pela colchicina e pelos compostos **58** e **59**. A) Fotomicrografias do ensaio *wound healing* em 0 e 22 h. B) Gráfico demonstrando as porcentagens de inibição determinadas. C) Curvas de IC_{50} para os análogos **58** e **59**, obtidas a partir de ensaio quantitativo em câmara de Boyden. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 17 - Efeito dos compostos selecionados na migração celular de células MDA-MB-231.

Composto	<i>Wound healing</i> ^a (% inibição - 1 μ M)	IC ₅₀ (nM) ^b
		Ensaio de migração quantitativo
Colchicina	70	475 $\pm$ 106
58	60	530 $\pm$ 73
59	80	168 $\pm$ 57

^a Os valores são representados com a média de três ensaios independentes. ^b Os valores são representados com a média de dois ensaios independentes.

Fonte: Elaborada pela autora.

A seguir, foi realizada uma comparação da potência das 3,4,5-trimetoxi-hidrazidas e das chalconas **56** e **57**.

Na primeira etapa foi observada a importância do grupo 3,4,5-trimetoxifenila das chalconas para a inibição da migração celular. A conservação deste substituinte e a inserção de uma porção *N*-acil-hidrazona na estrutura gerou compostos mais potentes do que as chalconas correspondentes. Esses resultados indicaram a importância da porção *N*-acil-hidrazona para a atividade dos compostos.

O mecanismo de atuação desses análogos sobre a migração celular ainda é desconhecido, mas possivelmente está relacionado à capacidade de interação com a tubulina, o que resulta na desorganização dos microtúbulos. A maior potência da hidrazida **59** em relação ao composto **58** e à colchicina, deve-se provavelmente à melhor interação do substituinte naftil com a cavidade de ligação da colchicina.

4.4 Planejamento e síntese de peptídeos para avaliação biológica

4.4.1 Planejamento

Um dos maiores problemas da terapia anticâncer está associado aos efeitos colaterais indesejáveis, normalmente atribuídos às elevadas concentrações e à ausência de seletividade dos fármacos utilizados.¹²¹

Nas últimas décadas, os peptídeos têm sido explorados para a descoberta de novos compostos anticancerígenos.^{122,123} Com maior seletividade e menor toxicidade, as cadeias peptídicas, marcadamente os peptídeos antimicrobianos, têm sido investigadas quanto à sua capacidade de atuar seletivamente em células tumorais. Acredita-se que esta seletividade deva-se à interação entre as cargas positivas dos peptídeos e as membranas de células neoplásicas, que possuem em seu lado externo fosfatidilserina, uma molécula carregada negativamente. Em células sadias, o caráter zwitteriônico da membrana reduz a força destas interações.¹²⁴¹²⁵⁻¹²⁶

Outro aspecto amplamente explorado em relação aos peptídeos é a sua atuação em alvos moleculares específicos. Destaca-se aqui a ação de cadeias peptídicas em integrinas e receptores transmembrana heterodiméricos, que participam ativamente do processo de metástase.^{65,127-128} Dentre os 24 subtipos existentes, a integrina $\alpha V\beta 3$ vem sendo estudada devido à sua elevada expressão em células tumorais. O peptídeo cilengitida [$\alpha(RGDf(NMe)V)$]⁵⁴, atua como um inibidor dessa proteína em concentrações subnanomolares, o que representa um notável avanço no desenvolvimento de novos inibidores da migração celular.¹²⁹

Mediante a inovação que os peptídeos representam como alternativas de tratamento para o câncer, foi planejado neste trabalho um conjugado peptídico contendo duas cadeias com sequências e funções diferentes. Desta forma, foi sintetizada a cadeia pentapeptídica $\alpha(RGDfK)$, um análogo do peptídeo cilengitida, com a expectativa de que este peptídeo atue sobre a integrina $\alpha V\beta 3$, ligada à uma cadeia lítica $KLLKLLKLLKLLK-NH_2$ ⁴¹ (as letras sublinhadas representam D-aminoácidos), agindo de forma seletiva em células tumorais.

A troca do resíduo de valina por uma lisina conferiu ao peptídeo α (RGDfK) a capacidade de ligação a outros compostos (Figura 48). A síntese peptídica em fase sólida foi a metodologia utilizada para a obtenção das duas cadeias.

Figura 48 - Peptídeo α (RGDfK). A cadeia lateral da lisina é um ponto para a ligação de diferentes substituintes. Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2 Síntese das cadeias peptídicas

Os peptídeos foram sintetizados utilizando-se a metodologia de síntese em fase sólida, através da estratégia Fmoc/ terc-butila, que emprega ciclos de acoplamentos sucessivos. A Figura 49 mostra um esquema simplificado do processo.

Figura 49 - Esquema de síntese de peptídeos em fase sólida. Fonte: Elaborada pela autora.

4.4.2.1 Síntese peptídica da cadeia c(RGDfK)

O suporte sólido utilizado para a síntese do peptídeo c(RGDfK) foi a resina 2 cloro-tritil-cloreto, com grau de substituição de 1,5 mmol/g. Para o acoplamento da primeira lisina, 1 g de resina foi pesada e lavada com diclorometano (DCM), o que provocou uma dilatação da resina, facilitando a entrada dos aminoácidos. A lisina utilizada na síntese foi a lisina-alloc, com um protetor de cadeia lateral alloc. Este protetor, por apresentar uma reação de desproteção específica, permitiu que o resíduo de lisina continuasse protegido mesmo quando o peptídeo foi submetido a outras reações de desproteção das cadeias laterais (clivagem ácida) (Figura 50).

Figura 50 - Fmoc-lisina com protetor de cadeia lateral alloc, ligada à resina 2 cloro-tritil-cloreto. Fonte: Elaborada pela autora.

Para a reação de acoplamento da lisina ao suporte sólido, foi utilizado um excesso de 1,2 equivalentes, o que significa 1,8 equivalentes de aminoácido [$1,5 \text{ mmol}$ (grau de substituição da resina) $\times 1,2 = 1,8$]. A estimativa do nível de acoplamento foi de $1,4 \text{ mmol/g}$ de lisina ligada à resina.

Para as reações de acoplamento dos demais resíduos de aminoácidos, a massa utilizada correspondeu a um excesso de 2 vezes em relação aos $1,4 \text{ mmol}$ de lisina ligados à resina. Dessa forma $2,28$ equivalentes de cada aminoácido dissolvidos em DMF foram adicionados em cada ciclo de acoplamento.

Após a inserção dos 5 resíduos de aminoácidos, foi obtida uma massa total de $1,409 \text{ g}$ de material (peptídeo + resina). Metade da massa obtida foi submetida à

clivagem com ácido acético, que promoveu a separação da cadeia peptídica do suporte sólido. A resina cloro-tritil é ácido lábil, dessa forma um ácido fraco é capaz de retirar o peptídeo ligado, sem, no entanto, provocar a desproteção das outras cadeias laterais, que com exceção do grupo alloc, são retiradas com ácido forte.

O peptídeo linear resultante da clivagem foi analisado em HPLC em gradiente exploratório de 5 a 95% de solvente B em 30 min, mostrando um pico em 21,6 min, que possivelmente seria o material de interesse (Figura 51). Adicionalmente, a análise de espectrometria de massas identificou um pico com peso molecular de 1014 g/mol (Figura 52), que correspondeu ao peso teórico calculado para a sequência RGDfK linear (peptídeo linear com os protetores de cadeia lateral). Estes dados comprovaram a eficiência da síntese da cadeia linear.

Figura 51 - Perfil cromatográfico do peptídeo RGDfK linear bruto. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 52 - Espectro de massas do peptídeo linear RGDfK. O pico de 1014 g/mol corresponde ao peptídeo com todas as cadeias laterais protegidas. Fonte: Elaborada pela autora.

Após a finalização da cadeia peptídica linear, o material foi submetido à reação de ciclização com 0,55 mmol de peptídeo em 0,55 mmol de benzotriazol-1-il-oxitripirrolidinofosfônio hexafluorofosfato (PyBOP) e 0,55 mmol de *N,N*-diisopropiletilamina (DIPEA). Posteriormente, 360 mL de DCM e 40 mL de DMF foram adicionados e a reação ficou sob agitação durante 4 h. O acompanhamento desta reação através da análise do perfil cromatográfico do material da reação em gradiente exploratório (5 a 95% de B em 30min), mostrou um pico em 22,6 min (Figura 53), ou seja, um tempo de retenção maior do que o apresentado para o material linear (21,6 min). Este tempo de retenção indicou a eficiência da ciclização da cadeia, visto que a estrutura em sua forma cíclica é menos polar do que a cadeia linear.

Figura 53 - Perfil cromatográfico do peptídeo α (RGDfK) após reação de ciclização. Fonte: Elaborada pela autora.

Após a secagem do material a fração resultante foi submetida à análise de massas no modo ESI positivo. Nesta etapa era esperado um pico de 996,0 g/mol, porém o pico apresentado foi de 1057,83, apresentando uma diferença de 61,0 g/mol (Figura 54). Essa diferença foi atribuída a um grupo acetato ligado ao peptídeo.

Figura 54 - Espectro de massas do peptídeo c(RGDfK) após reação de ciclização. Fonte: Elaborada pela autora.

Para verificar se havia um ponto de ligação para o acetato na molécula, o peptídeo cíclico foi purificado com gradiente exploratório de 50 a 70 % de solvente B em 90 min e submetido a reações de desproteção específicas com posterior análise de massas. Desta forma, seria possível visualizar o grupo acetato se ele estivesse ligado a algum dos protetores de cadeia lateral.

Primeiramente, o protetor alloc foi retirado. Para a clivagem desse grupo foram adicionados 14 μL de $\text{C}_6\text{H}_5\text{SiH}_3$ e 5,77 mg de $\text{Pd}[(\text{C}_6\text{H}_5)_3\text{P}]_4$ a uma alíquota de 34 mg do peptídeo solubilizado em DCM. A mistura ficou sob agitação à temperatura ambiente por 15 min. O espectro de massas do material revelou um pico de 973,61 g/mol (Figura 55), que corresponde à diferença de 84,0 g/mol em relação ao pico do peptídeo protegido. Essa diferença corresponde ao peso molecular do grupo alloc isolado, portanto concluiu-se que o grupo acetato não estava ligado a essa porção da estrutura.

Figura 55 - Espectro de massas do peptídeo cíclico RGDfK, sem o protetor Alloc. Fonte: Elaborada pela autora.

Para a remoção dos protetores das cadeias laterais dos resíduos de arginina (Pbf) e aspartato (tBu), foram adicionados 1 mL de uma solução de clivagem (90% TFA; 5% cresol; 5% água) à 27 mg do peptídeo. O sistema ficou sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. Essa amostra foi submetida à análise de massas, porém foi observado apenas um pico de 749,0 g/mol, referente à saída dos protetores Pbf (P.M.= 254,0 g/mol) e tBu (P.M.= 58,0 g/mol) (Figura 56). Este resultado confirmou que o acetato não estava ligado à estes protetores de cadeia lateral.

Figura 56 - Espectro de massas do peptídeo cíclico c[RGDfK], sem os protetores Pbf, da arginina e tBu, do aspartato. Fonte: Elaborada pela autora.

Após a constatação de que o grupo acetato não encontrava-se ligado aos protetores de cadeias laterais Pbf e tBu, e nem ao protetor alloc, optou-se por realizar

uma nova síntese do peptídeo α [RGDfK] utilizando o mesmo procedimento da síntese anterior com a introdução de algumas modificações.

A síntese foi realizada e após a clivagem com ácido acético diluído. Para evitar o problema da ligação do acetato à molécula, o material (389 mg) (Figura 57) foi submetido a um processo de *cleanup* em cartucho de C_{18} variando-se o gradiente de concentração dos solventes (Figura 58). Esse procedimento permitiu a limpeza do material, o que foi comprovado por análises das frações em HPLC. Contudo, houve perda considerável de material, o que resultou em 150 mg de peptídeo linear bruto.

Figura 57 - Perfil cromatográfico da fração bruta obtida da clivagem em ácido acético diluído. Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 58 - Perfil cromatográfico da fração obtida da clivagem após o tratamento em sepach. Fonte: Elaborada pela autora.

Este material (150 mg) foi submetido à reação de ciclização com o mesmo procedimento descrito para a primeira síntese. A análise do material em HPLC

mostrou que a ciclização foi eficiente, apresentando dois picos com tempo de retenção maior do que o material linear. Após a ciclização, o material resultante (84 mg) foi novamente submetido à tratamento em sepack e analisado por espectrometria de massas. Após este tratamento, a massa de material foi de 36 mg. A análise mostrou um pico de 996,0 g/mol, o que se refere ao peptídeo c[RGDfK]. O peptídeo cíclico foi purificado, porém com baixo rendimento, resultando em 8 mg de peptídeo c[RGDfK] puro.

4.4.2.2 Síntese das cadeias $KLLKLLKLLKLLK-NH_2$ e $KKLLKLLKLLKLLK-NH_2$

Inicialmente o planejamento incluía a síntese de uma cadeia peptídica lítica, $KLLKLLKLLKLLK-NH_2$ ($I^{3,6,13}k^{8,9}K_6L_9$). Esta cadeia, além de ter a função de interagir seletivamente com células tumorais, também contém aminoácidos com configuração D. A presença destes aminoácidos é importante para a estabilidade deste peptídeo, visto que as enzimas que hidrolisam as ligações peptídicas não reconhecem os aminoácidos com configuração diferente da configuração do substrato natural.¹²⁴⁻¹²⁵ Além da sequência e da inserção de D-aminoácidos, com o objetivo de avaliar a influência da carga positiva na atividade lítica do peptídeo, foi sintetizada uma segunda cadeia, contendo uma lisina adicional na extremidade N-terminal, resultando na sequência $K^0I^{3,6,13}k^{8,9}K_6L_9$.

Para a síntese das cadeias líticas a resina escolhida foi a do tipo rink amida, com grau de substituição de 0,6 mmol/g. Para o início da síntese, 660 mg da resina foram pesados, e posteriormente “inchados” em DCM. Para as reações de acoplamento, foram utilizados 0,8 equivalentes de cada aminoácido (excesso de 2 vezes em relação ao grau de substituição da resina, para a quantidade pesada) dissolvidos em DMF e 0,8 mmol de *N*-hidroxibenzotriazol (HOBt) / *N,N*-diisopropilcarbodiimida (DIC).

As cadeias foram sintetizadas e clivadas da resina utilizando-se a metodologia do ácido trifluoroacético. Após a purificação, foram obtidos 20 mg do peptídeo $I^{3,6,13}k^{8,9}K_6L_9$ e 15 mg do peptídeo $K^0I^{3,6,13}k^{8,9}K_6L_9$. Estes peptídeos puros foram submetidos à ensaios de citotoxicidade em células tumorais.

4.4.2.3 Reação de acoplamento das cadeias peptídicas

Após a obtenção das cadeias peptídicas propostas, foi necessário o acoplamento de um linker que tornasse possível a reação entre as duas sequências.

O peptídeo lítico, ainda na resina, foi submetido à uma reação de acoplamento com anidrido succínico. Para que a quantidade de reagentes fosse determinada, realizou-se o cálculo do grau de substituição da resina através da fórmula:

$$G. S. = \frac{0,6 \text{ mmol}}{m(\text{resina}) + m(\text{peptídeo})} \quad (2)$$

Este cálculo resultou em um grau de substituição de 0,22 mmol/g. Isto significa que para cada 1 g de resina + peptídeo, 0,22 mmol do peptídeo estavam presentes efetivamente.

O fator limitante para a reação do peptídeo lítico com o cRGDfK foi a massa de peptídeo cíclico disponível. O cálculo para a reação foi realizado a partir da massa de 8 mg de cRGDfK, o que corresponde a 0,01 mmol do peptídeo, como mostrado na Figura 59.

ETAPA 1: **ETAPA 2:**

Figura 59 - Esquema de reação para o acoplamento das cadeias peptídicas. Fonte: Elaborada pela autora.

A reação da etapa 1 foi feita adicionando-se os reagentes com mistura reacional contendo DCM e DMF sob agitação durante 24 h. A análise de massas mostrou que a ligação do anidrido succínico à cadeia lítica foi eficiente, contudo, a ligação das duas cadeias peptídicas não ocorreu, possivelmente devido à pouca quantidade de peptídeo disponível.

4.4.2.4 Otimização da síntese de cRGDFK

O baixo rendimento da síntese da cadeia cRGDFK foi um fator limitante para a obtenção do conjugado peptídico. Uma terceira síntese do material foi realizada através de uma metodologia alternativa de clivagem, com 20% de hexafluoroisopropanol (HFIP) em DCM.

Nessa metodologia, os solventes foram adicionados e o material ficou sob agitação por 10 min. O material sólido foi separado por centrifugação e o peptídeo ficou solúvel na porção líquida. O procedimento foi repetido por três vezes.

Mediante a análise do perfil cromatográfico e do espectro de massas (Figuras 60 e 61), constatou-se que esta metodologia foi eficiente e dispensou os

procedimentos de *clean up*. Além disso, o rendimento foi satisfatório, visto que da clivagem de 500 mg de resina, obteve-se uma massa de material clivado de 220 mg, o que correspondeu a um rendimento na faixa de 44 %. Este material foi armazenado e futuramente será possível utilizá-lo na reação para a formação de um dímero com a cadeia lítica.

Figura 60 - Perfil cromatográfico do peptídeo linear obtido após clivagem com HFIP 20 % em DCM.
Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 61 - Espectro de massas da cadeia RGDfK linear após clivagem com HFIP 20 % em DCM.

4.4.2.5 Atividade biológica dos peptídeos sintetizados

Embora a síntese do dímero proposto não tenha sido alcançada neste trabalho, os peptídeos foram avaliados quanto à sua atividade biológica isoladamente.

Primeiramente, a cadeia c[RGDfK] foi avaliada em ensaios *wound healing*. Este ensaio foi escolhido pois a linhagem MDA-MB-231 é uma das linhagens que possui elevada expressão de integrina $\alpha V\beta 3$. Esse experimento mostrou que o peptídeo cíclico, comparado com o seu análogo linear, apresentou uma maior porcentagem de inibição da migração celular.

Tabela 18 -Avaliação do peptídeo sintético c[RGDfK] e seu análogo linear RGDfK em ensaios *wound healing* (linhagem MDA-MB-231). Colchicina foi empregada como padrão para efeitos de comparação.

Composto	Estrutura	% de inibição (50 μ M)
RGD cíclico	c[RGDfK]	45
RGD linear	RGDfK	0
Colchicina		64*

*Composto avaliado em concentração de 1 μ M.

Fonte: Elaborada pela autora.

Esta diferença de atividade da cadeia cíclica comparada com a cadeia linear está de acordo com dados da literatura que comprovaram a importância da ciclização da estrutura, o que favorece a conformação ideal para a interação da trinca de aminoácidos RGD com o sítio de ligação na integrina.^{55,130-131} O peptídeo sintético, portanto, pode ter interagido com a integrina, o que causou uma alteração da migração celular. Estes estudos são preliminares, sendo necessários outros tipos de ensaios para comprovar o alvo molecular de atuação do peptídeo.

Concomitantemente aos ensaios de inibição da migração celular envolvendo o peptídeo c[RDGfK], os peptídeos líticos foram avaliados em ensaios de inibição da proliferação celular nas linhagens tumorais MCF-7, MDA-MB-231 e DU-145 (Figura 62 e Tabela 19).

Figura 62 - Comparação das curvas de IC_{50} dos peptídeos sintéticos $[3,6,13]K^{8,9}K_6L_9$ e $K^0[3,6,13]K^{8,9}K_6L_9$ obtidas dos ensaios de proliferação celular. Fotomicrografias das células MDA-MB-231, MCF-7 e DU-145 estão representadas mostrando as diferenças morfológicas entre as três linhagens. Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 19 – Citotoxicidade dos peptídeos sintéticos nas linhagens celulares tumorais de mama (MDA-MB-231 e MCF-7) e de próstata (DU-145).

Peptídeo	Proliferação celular		
	IC ₅₀ (μM) MDA-MB-231	IC ₅₀ (μM) MCF-7	IC ₅₀ (μM) DU-145
I ^{3,6,13} k ^{8,9} K ₆ L ₉	59 ± 1	15 ± 1	20 ± 4
K ⁰ I ^{3,6,13} k ^{8,9} K ₆ L ₉	22 ± 1	12 ± 1	16 ± 3

Fonte: Elaborada pela autora.

Os valores de IC₅₀ determinados revelaram uma atividade semelhante das duas cadeias peptídicas nas linhagens MCF-7 e DU-145, entretanto, na linhagem MDA-MB-231 o peptídeo contendo uma lisina adicional na extremidade N-terminal (K⁰I^{3,6,13}k^{8,9}K₆L₉) apresentou-se mais potente, com o valor de IC₅₀ da ordem de três vezes menor em comparação com o IC₅₀ da cadeia I^{3,6,13}k^{8,9}K₆L₉.

Com os resultados de ensaios de migração celular e proliferação celular, concluiu-se que a obtenção de um dímero peptídico contendo cadeias com funções específicas é uma abordagem interessante para a pesquisa de novos agentes antitumorais.

4.5 Estudos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) com células de câncer de mama

Em uma colaboração estabelecida entre o LQMC e o grupo do Prof. Dr. Luiz Alberto Colnago (Embrapa) foi proposta a identificação em células tumorais intactas, dos metabólitos presentes nas linhagens de células de câncer de mama: MCF-7 e MDA-MB-231.

A técnica utilizada foi a Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Alta Resolução com Giro no Ângulo Mágico (HR-MAS, *High Resolution Magic Angle Spinning*). Este método, comumente empregado na análise de amostras

heterogêneas, reduz os inconvenientes ligados à manipulação da amostra e fornece uma resolução espectral semelhante aquela encontrada nos líquidos.¹³²

Para a obtenção das células, foi estabelecida uma cultura em garrafas de 75 cm². Após o crescimento até a confluência, as garrafas cheias foram tripsinizadas e centrifugadas, e as células foram ressuspensas em água deuterada (D₂O) e submetidas à análise.

As análises espectroscópicas de RMN permitiram a identificação de alguns dos metabólitos presentes nas linhagens celulares analisadas (Figura 63). Para isso, foram feitos experimentos bidimensionais, tais como: COSY (*Correlation spectroscopy*), HSQC (*Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy*) e HMBC (*Heteronuclear multiple bond correlation spectroscopy*), que permitiram o assinalamento dos desvios químicos referentes aos diferentes metabólitos encontrados nas linhagens MDA-MB-231 e MCF-7. Devido à baixa concentração dos metabólitos intracelulares estes dados foram adquiridos em um espectrômetro BRUKER (14,1T), com uma frequência de ressonância para o ¹H de 600 MHz.

Foram identificados 9 metabólitos diferentes nas duas linhagens celulares, porém, o metabólito acetona chamou a atenção por ser atípico nessas linhagens celulares. Este metabólito foi encontrado em maior concentração na linhagem MDA-MB-231.

Figura 63 - Expansão do espectro de RMN ¹H de células tumorais de mama, de 4,5 a 1,0 ppm. O espectro das células MDA-MB-231 (acima) está comparado com o espectro das células MCF-7 (abaixo). Os números se referem ao assinalamento de 9 metabólitos diferentes. Os seguintes metabólitos estão identificados: lactato (1); treonina (2), alanina (3), acetato (4), acetona (5), creatina (6), colina (7), fosfocolina (8), taurina (9). Fonte: Elaborada pela autora.

Tabela 20 - Quantidade relativa de alguns metabólitos identificados no espectro de RMN de células MDA-MB-231 e MCF-7.

Metabólitos	MCF-7	MDA-MB-231
Lactato	1,67 ± 0,3	1,69 ± 0,4
Treonina	2,06 ± 0,1	1,11 ± 0,3
Alanina	0,30 ± 0,04	0,02 ± 0,03
Acetato	0,26 ± 0,02	-----
Acetona	0,08 ± 0,05	1,56 ± 1,05
Creatina	0,45 ± 0,09	0,14 ± 0,01
Colina	0,80 ± 0,1	1,11 ± 0,3
Fosfocolina	5,60 ± 0,4	11,22 ± 1,3
Taurina	0,77 ± 0,1	0,62 ± 0,1

Fonte: Elaborada pela autora.

Após a identificação dos principais metabólitos constituintes das duas linhagens celulares, as células foram suplementadas com o isômero *cis*-9, *trans*-11(*c9*, *t11*) conjugado do ácido linoleico (CLA) por um período de 72 h em estufa de CO₂. Após o tempo de incubação, as células foram tripsinizadas, centrifugadas e ressuspensas em água deuterada para posterior análise em RMN.

O CLA é um termo coletivo para descrever um ou mais isômeros de posição e geométricos do ácido linoleico (ácido *cis*-9, *cis*-12 octadecadienóico).¹³³ Os ácidos linoleicos conjugados compreendem um grupo de isômeros de ácidos graxos insaturados derivados do ácido linoleico e produzidos por biohidrogenação de bactérias em animais ruminantes, apresentando uma variedade de efeitos biológicos. Recentemente, esta classe de compostos tem recebido atenção especial devido aos seus benefícios à saúde humana, incluindo propriedades como antidiabética, antiadipogênica e antiaterogênica, além de efeitos na mineralização óssea e sistema imune. O ácido linoleico também tem sido relacionado à atividade anticarcinogênica. Esta atividade foi originalmente descrita para o CLA isolado de carne moída.¹³⁴⁻¹³⁵

Neste contexto o estudo do efeito deste ácido graxo tem sido extensamente explorado na busca por novos agentes anticâncer.

Os resultados das análises de RMN mostraram um aumento significativo do sinal da acetona em MCF-7 após o tratamento com o CLA. Essa alteração não foi perceptível na linhagem MDA-MB-231, que não apresentou sinal desse metabólito (Figura 64).

Figura 64 - Expansão do espectro de RMN ^1H de células tumorais de mama, de 3,5 a 1,0 ppm após tratamento com CLA. O espectro das células MDA-MB-231 (vermelho) está comparado ao espectro das células MCF-7 (preto). O sinal da acetona (2,23 ppm) está destacado no espectro. Fonte: Elaborada pela autora.

Ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) são potentes inibidores da HMG-CoA redutase, que é uma enzima limitante na biossíntese do colesterol.¹³⁶ A síntese de colesterol está envolvida com vários processos celulares, incluindo a formação da membrana, biossíntese de hormônios e a ativação de proteínas reguladoras de crescimento e oncoproteínas. Além disto, alguns estudos reportam a suplementação de PUFAs em dietas e sugerem que a presença destes ácidos graxos podem inibir o crescimento do câncer de mama. Neste estudo, os autores atribuem este efeito à *downregulation* da enzima HMG-CoA redutase.¹³⁷

A alta atividade da HMG-CoA redutase em tumores mamários de ratos tem sido reportada, quando comparada à tecidos mamários normais. Em adição, esta enzima exibe resistência ao mecanismo de controle por *feedback* em células tumorais. Estas mudanças na atividade da enzima HMG-CoA redutase levam ao aumento da síntese do mevalonato, o qual pode contribuir para o desenvolvimento do fenótipo maligno¹³⁸.

Neste contexto, compostos capazes de inibir a HMG-CoA redutase em células tumorais podem ser efetivos como agentes terapêuticos. O ácido linoleico conjugado, ácido graxo de cadeia longa, pode também inibir a HMG-CoA redutase. Desta forma, o CLA impediria a conversão do HMG-CoA a mevalonato, interferindo na síntese do colesterol (Figura 65). Esta ação pode causar o bloqueio na via de biossíntese do colesterol, resultando assim em acúmulo de acetil-CoA, que pode se converter, após várias etapas, em acetoacetato, podendo ser reduzido para D- β -hidroxibutirato pela ação da enzima β -hidroxibutirato dehidrogenase ou sofrer decarboxilação espontânea, produzindo acetona.

No entanto, para entender a formação da acetona em detrimento do hidroxibutirato, é necessário entender a relação entre o colesterol e os fosfolipídios. Durante a biogênese da membrana, a razão entre estes compostos permanecem relativamente constantes durante todo o tempo, sugerindo que o fluxo metabólico entre lipídios de diferentes espécies é sincronizado, existindo um controle positivo mútuo entre o colesterol e os fosfolipídios.¹³⁹

Assim, a inibição da enzima HMG-CoA redutase pelo CLA causa mudanças na via metabólica para o acúmulo do acetil-CoA, consequentemente reduzindo a síntese do colesterol. Como mencionado anteriormente, estudos têm demonstrado que a inibição da síntese do colesterol tem levado à redução dos níveis de fosfolipídios.¹³⁹ Isto porque se demonstrou que a redução da síntese do colesterol altera a função da enzima citidiltransferase fosfocolina (CCT/CTP), resultando consequentemente também na redução dos níveis de produção da fosfocolina (Figura 65).¹⁴⁰ Esta informação pode explicar os resultados obtidos nas análises da concentração de fosfocolina em ambas as linhagens estudadas.

Os resultados obtidos neste trabalho são consistentes com estes estudos prévios, pois os níveis de fosfocolina sofreram redução nos dois tipos celulares, MCF-7 e MDA-MB-231, após a suplementação com o CLA. E a fosfaditilcolina (via Kennedy) é um ativador alostérico da enzima D- β hidrobutilato dehidrogenase, a qual atua na conversão do acetoacetato para hidroxibutirato. Na ausência ou em baixas

concentrações deste modulador alostérico, a enzima D-β-hidroxibutirato dehidrogenase não atua sobre o acetoacetato e a via bioquímica é direcionada para a produção da acetona. Esta hipótese explica o motivo de as células MCF-7 produzirem acetona em detrimento ao hidroxibutirato, quando tratadas com CLA.

Em resumo, no tratamento das células com CLA pode haver um desvio na via bioquímica para formar acetoacetato, no lugar do colesterol, o qual pode culminar com a formação da acetona. Assim, a alteração na síntese do colesterol tem como alvo a redução da produção dos fosfolipídios (fosfocolina) devido ao controle positivo mútuo entre o colesterol e os fosfolipídios. Neste trabalho, observou-se que em todas as análises realizadas com o controle das células MCF-7, isto é, sem o CLA, a acetona estava presente em baixa concentração, e a fosfocolina em maior concentração. Através da suplementação das células com 100 μM CLA, este perfil metabólico foi alterado. A intensidade do sinal da acetona aumentou, bem como o sinal da fosfocolina diminuiu, confirmando a hipótese de que a redução do colesterol induz à diminuição na formação dos metabólitos envolvidos na síntese da fosfatidilcolina.

Figura 65 - Via bioquímica resumida para a produção do colesterol e corpos cetônicos. A possível alteração do metabolismo pela presença do CLA e a influência da síntese do colesterol na formação da fosfocolina.

Conclusões e perspectivas

5 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nesta tese de doutorado, foram apresentadas as metodologias e os resultados obtidos para a triagem biológica, identificação e planejamento de novos candidatos a agentes anticâncer a partir de produtos naturais e compostos sintéticos.

Diversas estratégias de química medicinal foram empregadas, com destaque para os ensaios biológicos *in vitro*, microscopia de imunofluorescência, planejamento, síntese e avaliação de peptídeos.

As moléculas selecionadas foram testadas em ensaios de citotoxicidade, inibição da migração celular e também foram avaliadas quanto a sua ação sobre o citoesqueleto.

A avaliação destes compostos, que apresentam grande diversidade química, forneceu informações importantes sobre os padrões estruturais relevantes para a inibição da migração de células tumorais metastáticas de câncer de próstata e de mama.

Dentre os resultados obtidos, destaca-se a identificação de compostos sintéticos da classe das espirocicloexadienonas, potentes frente à inibição da migração celular com IC₅₀ menores do que 1µM. Destaca-se também a importância da associação de métodos de fluorescência com os ensaios *in vitro* de inibição da migração celular e de inibição de polimerização de tubulina, o que nos forneceu a possibilidade de confirmação do alvo molecular de uma série sintética de derivados indólicos.

A obtenção de peptídeos por síntese em fase sólida mostrou-se uma ferramenta versátil, permitindo a exploração de diferentes características químicas que podem ser utilizadas durante o processo de síntese. Essa flexibilidade encontra grande utilidade no planejamento de novos peptídeos com atividade anticancerígena.

A análise dos metabólitos de células tumorais intactas por meio de RMN mostrou-se reprodutível e eficiente, podendo ser empregada na avaliação de alterações celulares causadas por diferentes agentes químicos. A observação de um aumento dos níveis de acetona na linhagem celular MCF-7, observada por meio de espectros de RMN nos permitiu avaliar a ação do ácido linoleico nas vias metabólicas da célula, comprovando que esta técnica pode funcionar como uma ferramenta importante no desenvolvimento e busca de novos agentes antitumorais.

Os resultados obtidos contribuem de forma consistente para o avanço nas pesquisas de novos quimioterápicos contra o câncer e abrem excelentes oportunidades para a otimização dos compostos identificados e compreensão do seu mecanismo de ação molecular.

Produção Científica

6 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

No decorrer do doutorado houve a publicação ou submissão de artigos científicos, descritos a seguir:

- **Artigos publicados**

- 1) Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. – Revista European Journal of Medicinal Chemistry
- 2) Processing of high resolution magic angle spinning spectra of breast cancer cells by the filter diagonalization method.

- **Artigos submetidos**

- 1) Mechanism for the anticarcinogenic effect of CLA on MCF-7 breast cancer cells.
Autores: Roberta Manzano Maria, Wanessa Fernanda Altei, Napoleão Fonseca Valadares, Richard Charles Garratt, Tiago Venâncio, Adriano Defini Andricopulo, Luiz Alberto Colnago – Submetido para a revista Carcinogenesis.

- **Artigos em fase de finalização**

- 1) Synthetic indoles derivatives as microtubule destabilizers: synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and mechanism of action. *Autores: Ricardo N. Santos, Daniara C. Fernandes, Wanessa F. Altei, Marília S. Santos, Manoel T. Rodrigues Jr., Fernando Coelho, Adriano D. Andricopulo.*
- 2) N-acylhydrazones derivatives as microtubule destabilizers: synthesis, cytotoxicity, inhibition of cell migration and mechanism of action. *Autores: Livia B. Salum, Alessandra Mascarello, Wanessa F. Altei, Laura L. Vollmer, Hikmat N. Daghestani, André Bortolini Silveira, Rafael Renatino Canevarolo, Carolina P. de Souza Melo, Taisa Regina Stumpf, Paulo César Leal, Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre, Adriano Defini Andricopulo, Billy W. Day, Andreas Vogt, Ricardo José Nunes, Rosendo Augusto Yunes, José Andres Yunes*
- 3) Effects of gallic acid, protocatechuic acid and their ester derivatives on cancer cell migration. *Autores: Wanessa Altei, Maicon S. Petronio, Ana Carolina Nazaré, Luis Octavio Regasini, Dulce H. S. Silva, Adriano Defini Andricopulo.*

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 CSERMELY, P. et al. Structure and dynamics of molecular networks: a novel paradigm of drug discovery: a comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, n. 3, p. 333–408, 2013.
- 2 PATRICK, G. **Instant notes: medicinal chemistry**. Oxford: BIOS Scientific Publishers, 2001.
- 3 MONTANARI, C. A. **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: Editora da USP, 2011.
- 4 GUIDO, R.V.C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 81–98, 2010.
- 5 FERREIRA, L.L.G. **Identificação de novos inibidores da enzima aldolase de *Trypanosoma brucei***. 2013. 164p. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2013.
- 6 SILVERMAN, R.B. **The organic chemistry of drug design and drug action**. San Diego: Elsevier Academic Press, 2004.
- 7 LOMBARDINO, J.G.; LOWE, J.A. The role of the medicinal chemist in drug discovery-then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–62, 2004.
- 8 LAUFER, S.; HOLZGRABE, U.; STEINHILBER, D. Drug discovery: a modern decathlon. **Angewandte Chemie**, v. 52, n. 15, p. 4072–6, 2013.
- 9 SANTOS, R.N.; ANDRICOPULO, A.D. Physics and its interfaces with medicinal chemistry and drug design. **Brazilian Journal of Physics**, v. 43, n. 4, p. 268–280, 2013.
- 10 GALDINO, S. L., PITTA, I.R. Descoberta de fármacos. In: MONTANARI, C.(Org.); **Química medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos**. São Paulo: EDUSP, 2011, p. 7–46.
- 11 PATRICK, G.L. **An introduction to medicinal chemistry**. Oxford: Oxford University Press, 2009.

12 WERMUTH, C.G. **The practice of medicinal chemistry**. London: Academic Press, 2003.

13 GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37–46, 2008.

14 ANDRICOPULO, A.D.; MONTANARI, C.A. Structure-activity relationships for the design of small-molecule inhibitors. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 585–593, 2005.

15 CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670–95, 2013.

16 COSERI, S. Natural products and their analogues as efficient anticancer drugs. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 560–71, 2009.

17 SRIVASTAVA, V. et al. Plant-based anticancer molecules: a chemical and biological profile of some important leads. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 21, p. 5892–5908, 2005.

18 ITOKAWA, H. et al. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. **Journal of Natural Medicine**, v. 62, n. 3, p. 263–280, 2008.

19 WANG, G. et al. Design, synthesis and biological evaluation of millepachine derivatives as a new class of tubulin polymerization inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 21, p. 6844–6854, 2013.

20 LEE, K.H. Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a medicinal chemistry approach. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 3, p. 500–516, 2010.

21 TSOGOEVA, S.B. Recent progress in the development of synthetic hybrids of natural or unnatural bioactive compounds for medicinal chemistry. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 9, p. 773–93, 2010.

22 BAROT, K.P. et al. Novel anticancer agents and targets: recent advances and future perspectives. **Mini Reviews In Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 9, p. 1239–55, 2013.

23 ROSALES-HERNANDEZ, M.C. et al. Molecular modeling applied to anti-cancer drug development. **Anti-Cancer Agents In Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 230–8, 2009.

24 ESTIMATIVA 2014: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 5 mar. 2014.

25 BEGLEY, C.G.; ELLIS, L. M. Raise standards for preclinical cancer research. **Nature**, v. 483, p. 531-533, 2012. doi:10.1038/483531a.

26 BOEHM, J. S. et al. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. **Cell**, v. 129, n. 6, p. 1065–1079, 2007.

27 MAK, L. et al. Anti-cancer drug development: computational strategies to identify and target proteins involved in cancer metabolism. **Current Pharmaceutical Design**, v. 19, n. 4, p. 532–77, 2013.

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

29 WEINBERG, R.A. **Biologia do câncer**. São Paulo: Artmed, 2008.

30 LE DEVEDEC, S. E. et al. Systems microscopy approaches to understand cancer cell migration and metastasis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 19, p. 3219–3240, 2010.

31 WHAT is cancer?. Disponível em:
<<http://www.cancer.gov/cancertopics/cancerlibrary/what-is-cancer>>. Acesso em: 5 mar. 2014.

32 BRANDAO, H. N. et al. Chemistry and pharmacology of antineoplastic chemoterapeutical derivatives from plants. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.

33 DUARTE, R. A. et al. Alkaloids extracted from *Pterogyne nitens* induce apoptosis in malignant breast cell line. **Tumour Biology**, v. 31, n. 5, p. 513–522, 2010.

34 SHEN, K. H. et al. Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 333, n. 1-2, p. 279–291, 2010.

35 PAI, H. C. et al. Moscatilin inhibits migration and metastasis of human breast cancer MDA-MB-231 cells through inhibition of Akt and twist signaling pathway. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 3, p. 347–356, 2013.

36 LIU, K.-C. et al. Gallic acid suppresses the migration and invasion of PC-3 human prostate cancer cells via inhibition of matrix metalloproteinase-2 and -9 signaling pathways. **Oncology Reports**, v. 26, n. 1, p. 177–184, 2011.

37 LANGDON, S.P. **Cancer cell culture: methods and protocols**. Nova Jersey:Humana Press, 2004.

38 ZHAI, X. et al. Discovery of hybrid dual N-acylhydrazone and diaryl urea derivatives as potent antitumor agents: design, synthesis and cytotoxicity evaluation. **Molecules**, v. 18, n. 3, p. 2904–23, 2013.

39 PARMAR, V.S. et al. Anti-invasive activity of alkaloids and polyphenolics *in vitro*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 8, p. 1609–1619, 1997.

40 RUI, C. **Como cultivar células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

41 CREE, I. A; GLAYSHER, S.; HARVEY, A. L. Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue. **Current Opinion In Pharmacology**, v. 10, n. 4, p. 375–9, 2010.

42 YUE, P. Y. K. et al. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 15, n. 4, p. 427–33, 2010.

43 SHAN, D. D. et al. Synthetic analogues of migrastatin that inhibit mammary tumor metastasis in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 10, p. 3772–3776, 2005.

44 ALBINI IWAMOTO, Y. et al. A rapid *in vitro* assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer Research**, v. 47, n. 12, p. 3239–3245, 1987.

45 YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. **Current Opinion Cell Biology**, v. 17, n. 5, p. 559–564, 2005.

46JEVNIKAR, Z. et al. Cathepsin H mediates the processing of talin and regulates migration of prostate cancer cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 4, p. 2201–2209, 2013.

47 WONG, M. S. et al. Molecular targets in the discovery and development of novel antimetastatic agents: current progress and future prospects. **Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology**, v. 40, n. 5, p. 307–19, 2013.

48 FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature Reviews**, v. 3,n.6, p. 1–6, 2003.

49 AHMAD, A.; HART, I.R. Mechanisms of metastasis. **Critical Reviews in Oncology Hematology**, v. 26, n. 3, p. 163–173, 1997.

50 COGHLIN, C.; MURRAY, G.I. Current and emerging concepts in tumour metastasis. **Journal of Pathology**, v. 222, n. 1, p. 1–15, 2010.

51 KHAN, N.; MUKHTAR, H. Cancer and metastasis: prevention and treatment by green tea. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 29, n. 3, p. 435–445, 2010.

52 WOLF, K.et al. Physical limits of cell migration: control by ECM space and nuclear deformation and tuning by proteolysis and traction force. **Journal of Cell Biology**, v. 201, n. 7, p. 1069–84, 2013.

53 GAUL, C.et al.The migrastatin family: discovery of potent cell migration inhibitors by chemical synthesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 36, p. 11326–11337, 2004.

54 MAS-MORUNO, C.; RECHENMACHER, F.; KESSLER, H. Cilengitide: the first anti-angiogenic small molecule drug candidate. design, synthesis and clinical evaluation. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 753–768, 2010.

55 HAUBNER, R.; FINSINGER, D.; KESSLER, H.Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the alpha(V)beta(3) integrin for a new cancer therapy. **Angewandte Chemie**, v. 36, n. 13-14, p. 1375–1389, 1997.

56 TEN HAGEN, T. L. M.et al. The $\alpha V\beta 3/\alpha V\beta 5$ integrin inhibitor cilengitide augments tumor response to melphalan isolated limb perfusion in a sarcoma model. **International Journal of Cancer**, v. 132, n. 11, p. 2694–704, 2013.

57 PLOPPER, G.E. et al. Migration of breast epithelial cells on Laminin-5: differential role of integrins in normal and transformed cell types. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 51, n. 1, p. 57–69, 1998.

58 CHEN, W.et al. Molecular dynamics simulations of forced unbending of integrin alpha(V)beta(3). **Plos Computational Biology**, v. 7, n. 2,e1001086, 2011.

59 DESGROSELLIER, J.S.; CHERESH, D.A. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 1, p. 9–22, 2010.

60 MONDAL, G.; BARUI, S.; CHAUDHURI, A. The relationship between the cyclic-RGDfK ligand and $\alpha V\beta 3$ integrin receptor. **Biomaterials**, v. 34, n. 26, p. 6249–60, 2013.

61 HARBURGER, D.S.; CALDERWOOD, D.A. Integrin signalling at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 122, n. Pt 2, p. 159–63, 2009.

51 GUO, W.J.; GIANCOTTI, F.G. Integrin signalling during tumour progression. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 5, n. 10, p. 816–826, 2004.

62 BRETSCHE, M.et al. Cilengitide affects tumor compartment, vascularization and microenvironment in experimental bone metastases as shown by longitudinal ^{18}F -FDG PET and gene expression analysis. **Journal of Cancer Research And Clinical Oncology**, v. 139, n. 4, p. 573–83, 2013.

63 NEMETH, J. A.et al. Inhibition of alpha v beta 3 integrin reduces angiogenesis, bone turnover, and tumor cell proliferation in experimental prostate cancer bone metastases. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 20, n. 5, p. 413–420, 2003.

64 DEL GATTO, A. et al. Novel and selective alpha(V)beta(3) receptor peptide antagonist: design, synthesis, and biological behavior. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 3416–3420, 2006.

65 SANTULLI, G. et al. Evaluation of the anti-angiogenic properties of the new selective alpha(V)beta(3) integrin antagonist RGDechiHCit. **Journal of Translational Medicine**, v. 9,n.7, p. 10, 2011.

66 KHALILI, P.et al. A. A non-RGD-based integrin binding peptide (ATN-161) blocks breast cancer growth and metastasis in vivo. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 5, n. 9, p. 2271–2280, 2006.

67 DECHANTSREITER, M. A.et al. N-methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective alpha(v)beta(3) integrin antagonists. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 16, p. 3033–3040, 1999.

68 XIONG, J. P. et al. Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha V beta 3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. **Science**, v. 296, n. 5565, p. 151–155, 2002.

69 SHATTIL, S. J.; KIM, C.; GINSBERG, M. H. The final steps of integrin activation: the end game. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 4, p. 288–300, 2010.

71 MERZ, A.L.; SERKOVA, N.J., Use of nuclear magnetic resonance-based metabolomics in detecting drug resistance in cancer, **Biomark Medicine**, v.3, p. 289–306, 2009.

72 WHITEHEAD, T.L.; KIEBER-EMMONS, T. Applying in vitro NMR spectroscopy and ¹H NMR metabolomics to breast cancer characterization and detection. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.47, p. 165–174, 2005.

73 BURK, R.R. A Factor forma transformed cell line that affects all migration. **National Academy of Sciences**, v. 70, n. 2, p. 368–372, 1973.

74 PONCE, M.L. *In vitro* matrigel angiogenesis assays. **Methods in Molecular Medicine**, v.46, p. 205–209, 2001. doi: 10.1385/1-59259-143-4:205

75 GUIMARÃES, R. et al. Characterisation of phenolic compounds in wild fruits from Northeastern Portugal. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3721–3730, 2013.

76 ABUBAKAR, M. B. et al. A review of molecular mechanisms of the anti-leukemic effects of phenolic compounds in honey. **International Journal Molecular Science**, v. 13, n. 11, p. 15054–15073, 2012.

77 GONÇALVES, R. F. et al. Influence of taro (*Colocasia esculenta* L. Shott) growth conditions on the phenolic composition and biological properties. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 3480–3485, 2013.

78 KHALEDI, H. et al. Antioxidant, cytotoxic activities, and structure-activity relationship of gallic acid-based indole derivatives. **Archiv Der Pharmazie**, v. 344, n. 11, p. 703–709, 2011.

79 FIUZA, S. M. et al. Phenolic acid derivatives with potential anticancer properties--a structure-activity relationship study. Part 1: methyl, propyl and octyl esters of caffeic and gallic acids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v.12, n.13, p. 3581–3589, 2004.

80 OU, T.-T.et al. Gallic acid induces G2/M phase cell cycle arrest via regulating 14-3-3 beta release from Cdc25C and Chk2 activation in human bladder transitional carcinoma cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 12, p. 1781–1790, 2010.

81 LEAL, P. C.et al. Relation between lipophilicity of alkyl gallates and antifungal activity against yeasts and filamentous fungi. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 6, p. 1793–1796, 2009.

82 HO, H. H.et al. Anti-metastasis effects of gallic acid on gastric cancer cells involves inhibition of NF-kappa B activity and downregulation of PI3K/AKT/small GTPase signals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 8-9, p. 2508–2516, 2010.

83 PU, X.et al.Camptothecin-producing endophytic fungus *Trichoderma atroviride* LY357: isolation, identification, and fermentation conditions optimization for camptothecin production.**Applied Microbiology and Biotechnology**, v.97, n.21, p.9365-75, 2013.

84 ZHANG, H. Z.et al. Discovery and structure-activity relationships of (2-(arylthio)benzylideneamino) guanidines as a novel series of potent apoptosis inducers. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 7, p. 2852–2858, 2009.

85 BOLZANI V. et al. Bioactive guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 11, p. 1683-1688, 1995.

86 SIRIWAN, D.; NARUSE, T.; TAMURA, H.Effect of epoxides and alpha-methylene-gamma-lactone skeleton of sesquiterpenes from yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves on caspase-dependent apoptosis and NF-kappa B inhibition in human cervical cancer cells. **Fitoterapia**, v. 82, n. 7, p. 1093–1101, 2011.

87 SCHORR, K.; COSTA, F.B. DA Quantitative determination of enhydrin in leaf rinse extracts and in glandular trichomes of *Smallanthus sonchifolius* (Asteraceae) by reversed-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochemical Analysis : pca**, v. 16, n. 3, p. 161–5, 2005.

88 RAJ, L. et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS. **Nature**, v. 475, n. 7355, p. 231–4, 2011.

89 ADAMS, D. J. et al. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 38, p. 15115–20, 2012.

90 PIROVANI, R. V; FERREIRA, B. R. V; COELHO, F. Highly functionalized spirocyclohexadienones from morita-baylis-hillman adducts. **Synlett**, n. 14, p. 2333–2337, 2009. doi: 10.1055/s-0029-1217725.

91 SALUM, L.B. et al. Cytotoxic 3,4,5-trimethoxychalcones as mitotic arresters and cell migration inhibitors. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 501–10, 2013. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.02.037.

92 CHEN, H. et al. Design and synthesis of Cyclopropylamide analogues of Combretastatin-A4 as novel microtubule-stabilizing agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 56, n. 3, p. 685–699, 2013.

93 FLOYD, R.A. et al. Nitrones as therapeutics. **Free radical biology & medicine**, v. 45, n. 10, p. 1361–74, 2008.

94 FLOYD, R.A. et al. Anti-cancer activity of nitrones and observations on mechanism of action. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 11, n. 4, p. 373–9, 2011.

95 DE FORGES, H.; BOUISSOU, A.; PEREZ, F. Interplay between microtubule dynamics and intracellular organization. **International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, v. 44, n. 2, p. 266–74, 2012.

96 BHATTACHARYYA, B. et al. Anti-mitotic activity of colchicine and the structural basis for its interaction with tubulin. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 1, p. 155–83, 2008.

97 MIKSTACKA, R.; STEFAŃSKI, T.; RÓŻAŃSKI, J. Tubulin-interactive stilbene derivatives as anticancer agents. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 18, n. 3, p. 368–97, 2013.

98 SHEN, C. H. et al. Combretastatin A-4 inhibits cell growth and metastasis in bladder cancer cells and retards tumour growth in a murine orthotopic bladder tumour model. **British Journal Pharmacology**, v. 160, p. 2008–2027, 2010. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00861.x.

99 DUCKI, S. Antimitotic chalcones and related compounds as inhibitors of tubulin assembly. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 3, p. 336–47, 2009.

100 LIN, Z.-Y. et al. Anti-cancer mechanisms of clinically acceptable colchicine concentrations on hepatocellular carcinoma. **Life Sciences**, v. 93, n. 8, p. 323–8, 2013.

101 AMOS, L. A What tubulin drugs tell us about microtubule structure and dynamics. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 9, p. 916–26, 2011.

102 DORLÉANS, A. et al. Variations in the colchicine-binding domain provide insight into the structural switch of tubulin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13775–9, 2009.

103 MARZO, I.; NAVAL, J. Antimitotic drugs in cancer chemotherapy: promises and pitfalls. **Biochemical Pharmacology**, v. 86, n. 6, p. 703–710, 2013.

104 EISENLÖFFEL et al. Interference of a novel indolylmaleimide with microtubules induces mitotic arrest and apoptosis in human progenitor and cancer cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 85, n. 6, p. 763–771, 2013.

105 NGUYEN, T. L. et al. A common pharmacophore for a diverse set of colchicine site inhibitors using a structure-based approach. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 19, p. 6107–16, 2005.

106 RAPPL, C. et al. Interaction of 4-aryl coumarin analogues of combretastatins with microtubule network of HBL100 cells and binding to tubulin. **Biochemistry**, v. 45, n. 30, p. 9210–8, 2006.

107 WANG, X.-F. et al. N-Aryl-6-methoxy-1,2,3,4-tetrahydroquinolines: A novel class of antitumor agents targeting the colchicine site on tubulin. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 196–207, 2013. doi: 10.1016/j.ejmech.2013.06.041

108 KUZNETSOVA, N.R. et al. Lipophilic prodrugs of a triazole-containing colchicine analogue in liposomes: Biological effects on human tumor cells. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 39, n. 5, p. 543–552, 2013.

109 KAVERINA, I.; STRAUBE, A. Regulation of cell migration by dynamic microtubules. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 22, n. 9, p. 968–74, 2011.

- 110 HUMPHREY, G.R.; KUETHE, J.T. Practical methodologies for the synthesis of indoles. **Chemical Reviews**, v. 106, p. 2875–2911, 2006. doi:10.1021/cr050527
- 111 XU, B.et al. Multistep one-pot synthesis of enantioenriched polysubstituted cyclopenta[b]indoles. **Angewandte Chemie**, v. 51, n. 4, p. 1059–62, 2012.
- 112 GURKAN-ALP, A. S.et al.Synthesis, anticancer activities and molecular modeling studies of novel indole retinoid derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 346–354, 2012.doi: 10.1016/j.ejmech.2012.10.013.
- 113 BRANCALE, A.; SILVESTRI, R. Indole, a core nucleus for potent inhibitors of tubulin polymerization. **Medicinal Research Reviews**, v. 27, n. 2, p. 209–38, 2007.
- 114 KONG, Y. et al. A boronic acid chalcone analog of combretastatin A-4 as a potent anti-proliferation agent. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 971–977, 2010.
- 115 WINTER, E.et al. Naphthylchalcones induce apoptosis and caspase activation in a leukemia cell line: The relationship between mitochondrial damage, oxidative stress, and cell death. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 8026–8034, 2010.
- 116 SALUM, L. B. **Planejamento de ligantes da tubulina com propriedades antitumorais**.2011. 222p. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos,.2011.
- 117 SHARMA, P. et al. Synthesis and biologic activities of some novel heterocyclic chalcone derivatives. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, n. 8, p. 3969–3983, 2012.
- 118 YANG, H.; GANGULY, A.; CABRAL, F. Inhibition of cell migration and cell division correlates with distinct effects of microtubule inhibiting drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32242–32250, 2010.
- 119 SIEMANN, D. W.; CHAPLIN, D. J.; WALICKE, P. A. A review and update of the current status of the vasculature-disabling agent combretastatin-A4 phosphate (CA4P). **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 2, p. 189–97, 2009.

120 JEDHE, G. S.et al. Correlation of hydrogen-bonding propensity and anticancer profile of tetrazole-tethered combretastatin analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.23, n.16, p. 4680–4684, 2013.

121 GAJSKI, G.; GARAJ-VRHOVAC, V. Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 36, n. 2, p. 697–705, 2013.

122 HUANG, W.et al. Anti-melanoma activity of hybrid peptide P18 and its mechanism of action. **Biotechnology Letters**, v. 32, n. 4, p. 463–469, 2010.

123 HOSKIN, D.W.; RAMAMOORTHY, A. Studies on anticancer activities of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta: biomembranes**, v. 1778, n. 2, p. 357–375, 2008.

124 PAPO, N.; SHAI, Y. New lytic peptides based on the D,L-amphipathic helix motif preferentially kill tumor cells compared to normal cells. **Biochemistry**, v. 42, n. 31, p. 9346–9354, 2003.

125 SCHWEIZER, F. Cationic amphiphilic peptides with cancer-selective toxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 625, n. 1-3, p. 190–194, 2009.

126 PAPO, N.; SHAI, Y. Host defense peptides as new weapons in cancer treatment. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 62, n. 7-8, p. 784–90, 2005.

127 LI, F.et al. Synthesis and evaluation of bivalent, peptidomimetic antagonists of the $\alpha(V)\beta(3)$ integrins. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 22, p. 6577–6580, 2010.

128 MITCHELL, K.et al. Suppression of integrin $\alpha 3 \beta 1$ in breast cancer cells reduces cyclooxygenase-2 gene expression and inhibits tumorigenesis, invasion, and cross-talk to endothelial cells. **Cancer Research**, v. 70, n. 15, p. 6359–6367, 2010.

129 ZHOU, Y.et al. Discovery of small molecule inhibitors of integrin $\alpha v \beta 3$ through structure-based virtual screening. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, n. 22, p. 5878–5882, 2006.

130 PATEL, P. R.et al. Synthesis and cell adhesive properties of linear and cyclic RGD functionalized polynorbornene thin films. **Biomacromolecules**, v. 13, n. 8, p. 2546–53, 2012.

- 131 VERRIER, S. et al. Function of linear and cyclic RGD-containing peptides in osteoprogenitor cells adhesion process. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 585–596, 2002.
- 132 MARIA, R. M. et al. Processing of high resolution magic angle spinning spectra of breast cancer cells by the filter diagonalization method. **Analyst**, v. 137, n. 19, p. 4546–51, 2012.
- 133 PARODI, P.W. Cows' milk fat components as potential anticarcinogenic agents. **Journal of Nutrition**, v. 127, n. 6, p. 1055–1060, 1997.
- 134 AYDIN, R. Conjugated linoleic acid : chemical structure , sources and biological properties. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. v. 29, n.2, p. 189–195, 2005.
- 135 IWASAKI, T. et al. Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. **Peptides**, v. 30, n. 4, p. 660–668, 2009.
- 136 NOTARNICOLA, M. et al. Polyunsaturated fatty acids reduce fatty acid synthase and hydroxy-methyl-glutaryl CoA-reductase gene expression and promote apoptosis in HepG2 cell line. **Lipids in health and disease**, v. 10, p. 10, 2011.
- 137 DUNCAN, R.E. et al. Regulation of HMG-CoA reductase in MCF-7 cells by genistein, EPA, and DHA, alone and in combination with mevastatin. **Cancer letters**, v. 224, n. 2, p. 221–8, 2005.
- 138 SPINK, D.C. et al. Metabolism of equilenin in MCF-7 and MDA-MB-231 human breast cancer cells. **Chemical research in toxicology**, v. 14, n. 5, p. 572–81, 2001.
- 139 NOHTURFFT, A. Coordination of lipid metabolism in membrane biogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 25, p. 539–66, 2009.
- 140 SHIRATORI, Y. et al. Stimulation of CTP:phosphocholine cytidyltransferase by free cholesterol loading of macrophages involves signaling through protein dephosphorylation. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 50, p. 29894–903, 1995.