UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

KARIME BITTAR STEVANATTO

Identificação de novos inibidores da migração celular em células de
câncer de mama e próstata.

São Carlos
2008

KARIME BITTAR STEVANATTO

Identificação de novos inibidores da migração celular em células de
câncer de mama e próstata.

Dissertação 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 Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada-
Opção: Física Biomolecular.
Orientador: Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo

São Carlos
2008

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

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação IFSC/USP

Stevanatto, Karime.

Identificação de novos inibidores da migração celular em células de câncer de mama e próstata. / Karime Stevanatto; orientador Adriano D. Andricopulo.-- São Carlos, 2008.

126 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de concentração: Física Aplicada – Opção Biomolecular) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

1. Câncer. 2.Planejamento de Fármacos. 3.Química Medicinal. 4.Inibidores. 5.Testes *in vitro*. I. Título.

**IFSC UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**
Instituto de Física de São Carlos

Caixa Postal 369
13560-970 São Carlos, SP
Av. Trabalhador São-carlense, 400
13566-590 - São Carlos, SP

Fone/Fax: (16) 3373. 9777
www.ifsc.usp.br
svposgrad@ifsc.usp.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Karime Bittar Stevanatto

Dissertação apresentada ao Instituto de Física
de São Carlos da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Mestre em Ciências.
Área de Concentração: Física Aplicada – Opção:
Física Biomolecular.

Aprovada em: 09/12/2008

Comissão Julgadora

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituição: IFSC/USP

Assinatura

Prof. Dr. Eduardo Pagani

Instituição: Cristália/SP

Assinatura

Prof. Dr. Jose Daniel de Figueroa Villar

Instituição: IME/RJ

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação faz parte de um sonho, o de achar a cura para a doença que mais nos afeta atualmente, o câncer. Eu agradeço essa dissertação primeiramente à memória de minha Mãe e à memória de meu Avô, pois sem eles este sonho não teria sido realizado.

Agradeço também ao meu pai e ao meu noivo pelo apoio.

Ao Prof. Dr. Adriano D. Andricopulo pelas oportunidades durante o mestrado, incentivo a minha pesquisa e dedicação.

À Dra. Renata Krogh Andricopulo pela orientação e a acima de tudo pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Dias pela dedicação em sintetizar as moléculas para que este trabalho fosse realizado.

Aos meus amigos Dra. Deise Borchhardt, Ms. Tatiane Baliano, Ms. Lívia Salum, Ms. Matheus Postigo, Ms. Thiago Moda, Dr. Rafael Guido, Ms. Ricardo Nicoluci, MS. Aderson Zottis, por me ajudarem.

Aos Professores, funcionários e colegas do Centro de Biotecnologia Molecular e Estrutural do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo.

Ao Cristália pelo apoio financeiro.

Lista de Abreviaturas

ACS	American Cancer Society
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BPF	Boas Praticas de Fabricação
BRCA1	Breast Cancer gene type 1
BRCA2	Breast Cancer gene type 2
CBME	Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural
CEPID	Centro de Pesquisa, Inovação e Difusão
DEMEM	Dulbecco eagle's modified essential medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DU - 145	Nome da ATCC para a linhagem de câncer de próstata
ER	Receptor de Estógeno
EMEM	Eagle's modified essential medium
FDA	Food and Drug Administration
h	Horas
HTS	High Throughput screening
IC	Concentração de Inibição
IFSC	Instituto de Física de São Carlos
IND	Investigação de um Novo Fármaco
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LBDD	Ligant - based Drug Design

LQMC	Laboratório de Química Medicinal e Computacional
MDA-MB-231	Nome da ATCC para a linhagem de adenocarcinoma mamário
min.	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
NCE	Nova Entidade Química
NDA	Requisição de um novo Fármaco
nM	Nanomolar
PBS	Solução Tampão
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PDB	Protein Data Bank
PSA	Prostate specific antigen
QSAR	Relação Quantitativa entre a estrutura e a atividade
SAR	Relação entre a estrutura e a atividade
SBDD	Structure – based drug design
SFB	Soro Fetal Bovino
Unicamp	Universidade de Campinas
VEGF	Fator de crescimento de vasos endoteliais
VS	Virtual Screening
μ	Micro
%	Símbolo da porcentagem

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estimativas para o ano de 2008 dos tipos de câncer mais incidente na população brasileira.	19
Figura 2	Fotos do ensaio wound healing magnificadas 4 vezes.	36
Figura 3	Representação esquemática do sistema de cultura sobre o inserto.	36
Figura 4	Foto da câmara de Neubauer	38
Figura 5	Morfologia da linhagem celular tipo MDA-MB-231 de câncer de mama.(A) baixa densidade, (B) alta densidade	41
Figura 6	Morfologia da linhagem celular tipo DU-145 de câncer de próstata.(A) baixa densidade, (B) alta densidade	42
Figura 7	Comportamento da linhagem celular MDA-MB-231 em função do tempo na concentração de 2,5% de DMSO	44
Figura 8	Efeito da concentração de 5% de DMSO na linhagem celular MDA-MB-231 em função do tempo.	45
Figura 9	Estrutura molecular da Evodiamina.	45
Figura 10	Teste de <i>wound healing</i> na presença de Evodiamina na concentração de 1 μ M no tempo inicial de 0 h e depois de 22 h.	46
Figura 11	Gráfico do tipo concentração $\times$ resposta empregado para a determinação de IC ₅₀ pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste a partir dos dados coletados experimentalmente na Tabela 4.	48
Figura 12	<i>Hit</i> identificado no ensaio de <i>wound healing</i> frente à linhagem celular MDA-MB-231.	49
Figura 13	Condições das células MDA-MD-231 para o derivado dinitrobenzotiadiazol no teste de wound healing.	54
Figura 14	Estrutura molecular do produto natural migrastatina, isolado de <i>Streptomyces platensis</i>	56

Figura 15	Condições das células MDA-MD-231 para os derivados da migrastatina 42 e 43	60
Figura 16	Condições das células DU-145 para o composto 27	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estimativas para o ano de 2008 em relação ao número de novos casos e localização primária do câncer.	18
Tabela 2	Estimativas no Brasil para o ano 2008, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária do câncer.	21
Tabela 3	Banco de dados de Linhagens celulares.	25
Tabela 4	Resultados do teste de migração celular para diferentes concentrações do composto Evodiamina na linhagem MDA-MB-231.	47
Tabela 5	Resultados do teste de <i>wound healing</i> para os compostos derivados benzotiadiazóis e dinitroquinoxalinona na linhagem MDA-MB-231.	50
Tabela 6	Resultados do teste de <i>wound healing</i> na concentração reduzida de 500 nM na linhagem MDA-MB-231.	54
Tabela 7	Resultados da triagem semi-quantitativa dos compostos selecionados para o teste de migração na linhagem MDA-MB-231.	55
Tabela 8	Resultados do teste de wound healing para uma série de compostos derivados da migrastatina na linhagem MDA-MB-231.	57

Tabela 9	Resultados da triagem semi-quantitativa dos compostos selecionados para o teste de migração na linhagem MDA-MB-231.	61
Tabela 10	Resultados do teste de <i>wound healing</i> com a linhagem DU-145.	62
Tabela 11	Resultados do teste de <i>wound healing</i> com a linhagem DU-145 para os derivados da migrastatina.	63
Tabela 12	Avaliação da potência de inibidores da migração celular na linhagem MDA-MB-231.	64
Tabela 13	Avaliação da potência de inibidores da migração celular.	65

RESUMO

Câncer é a proliferação descontrolada de células anormais do organismo. As células cancerosas podem se transferir para outras partes do corpo onde passam a crescer e substituir o tecido sadio, num processo conhecido como metástase. De um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo em 2007, o câncer foi responsável por 7,6 milhões. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 20% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama. No que diz respeito a valores absolutos, o câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens, representando cerca de 10% do total. As principais formas de tratamento são a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e as terapias-alvo. Os tratamentos quimioterápicos e radioterápicos, principalmente, possuem baixa seletividade em sua ação frente a células malignas e benignas. O presente trabalho de dissertação tem como objetivo o desenvolvimento de testes *in vitro*, como o *wound healing* e o de migração, empregando células de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231) e de câncer de próstata humano (DU-145), além da triagem biológica de compostos químicos visando à identificação de novos candidatos a inibidores do processo de migração celular (metástase). Os protocolos experimentais foram estabelecidos e padronizados com sucesso, fornecendo resultados reprodutíveis, confiáveis e validados. Após extensivas triagens biológicas, duas classes de candidatos a inibidores foram identificadas.

Palavras-chaves: Câncer, Química Medicinal, Planejamento de Fármacos, Inibidores, células, Testes *in vitro*, Anticâncer

ABSTRACT

Cancer is an abnormal proliferation of cells from an organ or tissue. The cancer cells may spread from one organ or part to another non-adjacent organ or part in a process called metastasis. In 2007, cancer was responsible for 7.6 million out of the 58 million deaths occurred in the World. Breast Cancer is the second leading cause of cancer death in the World, and the most frequent in women. Each year, over 20% of the new cases of cancer in women are breast cancer. In absolute values, prostate cancer is the sixth type of cancer more common in the World and the most prevalent in the men, representing about 10% of the total. There are a number of different methods used to treat cancer, including surgery, radiation and chemotherapy. Chemotherapy and radiotherapy treatments show low effectiveness and selectivity towards malignant and benign cells. The objective of the present dissertation work is to develop *in vitro* assays, such as wound healing and cell migration employing MDA-MD-231 breast cancer cells and DU-145 prostate cancer cells, as well as perform biological screening of chemical compounds in order to identify selective inhibitors of tumor metastasis as novel lead candidates for further development. The experimental protocols have been successfully implemented providing reproducible and reliable results. After extensive biological investigations, two inhibitor candidate classes have been identified.

Key words: Cancer, Medicinal Chemistry, Drug Design, Inhibitors, Cells, *In vitro* Assays, Anticancer

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Câncer	15
1.1.1 Estatísticas Mundiais	16
1.1.2 Estatísticas Brasileiras	17
1.2 Câncer de Mama	20
1.2.1 Estatísticas Brasileiras em Câncer de Mama	21
1.3 Câncer de Próstata	22
1.4 Cultura de Células	23
1.4.1 Aquisição de Linhagens Celulares	24
1.5 Quimioterapia do câncer	25
1.6 Descobertas de Novos Fármacos e o Mercado Farmacêutico	27
Química Medicinal e Estratégia de Planejamento de	
1.6.1 Fármacos	27
1.6.2 A Indústria Farmacêutica Nacional	30
1.7 Migração Celular e o Planejamento de Fármacos	31
2 OBJETIVOS	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 Células	33
3.2 Protocolo de Cultivo das Células	33
3.2.1 Procedimento Experimental	34
3.3 Ensaio de Wound Healing	35
3.4 Ensaio de Migração Celular em Câmara de Boyden	36
3.5 Compostos	38
3.5.1 Avaliação da Toxidez Celular do Solvente	38
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1 .Banco de Células	40
4.1.2 Linhagem de Câncer de Mama	41
4.1.3 .Linhagem de Câncer de Próstata	41
4.2 Triagem Biológica de Compostos	42
4.2.1 Teste de Wound Healing	48
4.2.1.1 Linhagem MDA-MB-231	48
4.2.1.2 Linhagem DU-145	61
4.2.2 Testes de Migração Celular	63

4.2.21. Linhagem MDA-MB-231.	63
4.2.2.2 Linhagem DU-145	64
4.2.2 Testes de Migração Celular	63
5. Conclusão e Perspectivas.	67
Referências	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é a proliferação descontrolada de células anormais do organismo. Ao passo que células normais de nosso corpo vivem, se dividem e morrem de forma controlada, as células cancerosas têm um comportamento distinto, e se dividem de forma descontrolada. Além disso, não morrem como as células normais e continuam a se proliferar, produzindo mais células anormais. Essa divisão descontrolada das células é provocada por danos no DNA, o material genético presente em todas as nossas células e que comanda todas as suas atividades, inclusive a divisão celular. Na maioria dos casos, o próprio DNA detecta e conserta seus erros, porém, nas células cancerosas, esse mecanismo de reparo não funciona. Esses defeitos podem ser herdados e estão na origem dos cânceres hereditários, mas na maioria dos casos o DNA se altera por causa da exposição a fatores ambientais, tais como fumo, sol, alguns vírus e alimentação. As células cancerosas geralmente formam tumores, que são massas de células com crescimento anormal. Existem exceções, como as leucemias, em que as células doentes estão presentes no sangue e percorrem o corpo todo.¹

Freqüentemente, as células cancerosas se desprendem do tumor e se transferem para outras partes do corpo, onde passam a crescer desordenadamente e a substituir o tecido sadio, num processo conhecido como metástase. Nem todos os tumores são cancerosos, os chamados tumores benignos não têm capacidade de se espalhar para outras partes do corpo, mas merecem atenção e podem exigir tratamento, dependendo do local onde aparecem. Diferentes tipos de câncer têm comportamentos distintos e exigem tratamentos médicos diferenciados, até em casos de atingirem um mesmo órgão. Por exemplo, há casos de cânceres

de próstata extremamente agressivos e de progressão rápida, e outros menos agressivos, de desenvolvimento lento. Dessa forma, existem tratamentos específicos para cada caso.²

Na fase de desenvolvimento, os tumores conseguem produzir substâncias que dissolvem o tecido ao redor do local onde se originaram, possibilitando o seu crescimento localizado. As células cancerosas conseguem fazer com que as células de crescimento produzam na sua área de crescimento pequenas vasos, que vão ser responsáveis por trazer nutrientes e oxigênio para que as células tumorais possam se desenvolver. Numa fase após o desenvolvimento, as células tumorais conseguem entrar nestes pequenos vasos ao redor do tumor ou em pequenos canalículos (vasos linfáticos) que permeiam todos os tecidos. Seja pelos vasos ou sistema linfático, as células malignas migram de seu local de origem e ao atingir outros órgãos, conseguem invadir o tecido adjacente e iniciar a formação de uma nova colônia de células, que pode afetar órgãos nobres causando a morte do indivíduo.³

As células que formam as metástases são semelhantes às células do tumor original, assim, é importante entender que apesar de crescerem em outro órgão, as células malignas conservam características das células de seus tecidos originais. Por exemplo, células malignas que migram da mama se instalando em ossos não constituem um câncer ósseo (que é uma doença diferente), mas sim um câncer de mama metastático nos ossos. Nesses casos, usa-se um esquema de tratamento para câncer de mama e não para câncer ósseo.⁴

1.1.1 Estatísticas Mundiais

Em 2007, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Os principais tipos de câncer, com maior índice de mortalidade, foram os de pulmão (1,3 milhões), estômago (cerca de 1 milhão), fígado (662 mil), cólon (655 mil) e de mama (502 mil). Do

total de óbitos por câncer ocorridos em 2005, mais de 70% ocorreram em países de renda média ou baixa.⁴ Estima-se que, em 2020, o número de casos novos anuais seja da ordem de 15 milhões, sendo que cerca de 60% desses novos casos ocorrerão em países em desenvolvimento. É também conhecido que pelo menos um terço dos novos casos de câncer que ocorrem anualmente no mundo poderiam ser prevenidos,² com exames preventivos de detecção, mamografia, exame de próstata, entre outros. A profilaxia alimentar, prática regular de exercícios físicos, além de não fumar e beber são fatores que contribuem na prevenção do câncer.^{5,6}

1.1.2 Estatísticas Brasileiras

O câncer é a terceira causa de morte no Brasil e a segunda nos Estados Unidos. A cada ano, 8 milhões de pessoas em todo o planeta recebem o diagnóstico de câncer. De forma geral, uma em cada três mulheres e um em cada dois homens tem, teve ou terá câncer. Quanto mais cedo a doença for detectada e tratada, maiores serão as chances de sobrevivência e cura.⁷

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 indicam 466.730 novos casos de câncer (Tabela 1). Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não melanoma, são os cânceres de próstata e de pulmão, no sexo masculino, e os cânceres de mama e de colo do útero, no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil observado no mundo todo.⁴

Em 2008, são estimados 231.860 novos casos de câncer para o sexo masculino e 234.870 para o sexo feminino. O câncer de pele do tipo não melanoma (115 mil novos casos) será o mais incidente na população brasileira, seguido pelos de próstata (49 mil), mama

feminina (49 mil), pulmão (27 mil), cólon e reto (27 mil), estômago (22 mil) e de colo do útero (19 mil) (Figura 1)⁴.

Tabela 1 - Estimativas para o ano de 2008 em relação ao número de novos casos e localização primária do câncer.

Localização Primária	Estimativa de Novos casos		
	Masculino	Feminino	Total
Próstata	49.530	---	49.530
Mama	---	49.400	49.400
Traquéia, Brônquio e Pulmão	17.810	9.460	27.270
Cólon e Reto	12.490	14.500	26.990
Estômago	14.080	7.720	21.800
Cólon do Útero	---	18.680	18.680
Cavidade Oral	10.380	3.780	14.160
Esôfago	7.900	2.650	10.550
Leucemias	5.220	4.320	9.540
Pele Melanoma	2.950	2.970	5,920
Outras Localizações	55.610	62.270	117.880
Subtotal	175.970	175.750	351.720
Pele Não Melanoma	55.890	59.120	115.010
Todas Neoplasias	231.860	234.870	466.730

Fonte: MS/Instituto Nacional de Câncer – INCA

Figura 1 - Estimativas para o ano de 2008 dos tipos de câncer mais incidentes na população brasileira.

Diante de tal cenário, fica clara a necessidade de investimentos no desenvolvimento de ações abrangentes para o controle e tratamento do câncer, nos diferentes níveis de atuação tais como: promoção da saúde, detecção precoce da doença, assistência médica e social aos pacientes, e principalmente, na pesquisa de novos fármacos que aumentem o arsenal quimioterápico existente, proporcionando novas alternativas terapêuticas às diversas populações.⁴

1.2 Câncer de Mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o mais comum entre as mulheres. A cada ano, cerca de 20% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama. Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (e.g., menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) são bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama.⁸ Além desses fatores, a idade continua sendo um dos mais importantes fatores de risco, com taxas de incidência progressivamente maiores até os 50 anos, quando se tornam mais lentas. Essa mudança no perfil de idade tem sido atribuída à menopausa. Alguns estudos apontam para dois tipos de câncer de mama relacionados com a idade. O primeiro ocorre na pré-menopausa e é caracterizado por ser mais agressivo e do tipo estrógeno receptor (ER) negativo. O segundo tipo ocorre na pós-menopausa e está associado com características indolentes e principalmente por ser ER-positivo. As variações morfológicas também estão relacionadas ao ER, como os carcinomas medulares em ER-negativos, e os carcinomas tubulares e lobulares em ER-positivos.⁸ Em relação aos carcinomas medulares, pode-se dizer ainda que estão associados às mutações no gene BRCA1 e são mais freqüentes em populações de baixo risco, como as mulheres japonesas. Por outro lado, os carcinomas tubulares e lobulares são associados às mutações do gene BRCA2 e são mais comuns em populações de alto risco, como as mulheres dos Estados Unidos.

Apesar de ser considerado um câncer de bom prognóstico, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, provavelmente porque a doença continua sendo diagnosticada em estágios avançados, restringindo as possibilidades de

tratamento adequado e limitando a sobrevida. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%.^{9,10}

1.2.1 Estatísticas Brasileiras em Câncer de Mama

A estimativa no Brasil para o ano de 2008 é de 49.400 novos casos de câncer de mama, com um risco de 51 casos a cada 100 mil mulheres (Tabela 2).⁴

Tabela 2 - Estimativas no Brasil para o ano de 2008, das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária do câncer.⁴

Localização Primária de Neoplasia Maligna	Estimativas dos Casos Novos			
	Estado (como um todo)		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.400	50.71	17.400	76.04
Colo do Útero	18.680	19.18	5.620	24.49
Cólon e Reto	14.500	14.88	5.450	23.80
Traquéia, Brônquio e Pulmão	9.460	9.72	3.070	13.49
Estômago	7.720	7.93	2.380	10.30
Leucemias	4.320	4.44	1.340	5.89
Cavidade Oral	3.780	3.88	1.140	4.83
Pele Melanoma	2.970	3.03	930	3.69
Esôfago	2.650	2.72	620	2.30
Outras Localizações	62.270	63.93	22.530	98.39
Subtotal	175.750	180.43	60.480	264.11
Pele não Melanoma	59.120	60.70	14.140	61.73
Todas as Neoplasias	234.870	241.09	74.620	325.77

1.3 Câncer de Próstata

O câncer de próstata é o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e o mais prevalente em homens em valores absolutos, representando cerca de 10% do total. As taxas de incidência desse tipo de câncer são cerca de seis vezes maiores nos países desenvolvidos, se comparadas com as taxas de países em desenvolvimento. Esse é considerado mundialmente o câncer da terceira idade, uma vez que cerca de três quartos dos casos ocorrem a partir dos 65 anos. A proporção nas taxas de incidência se deve principalmente as regiões em que o rastreamento pelo teste antígeno prostático específico (PSA, do inglês, *prostate-specific antigen*) é mais comum. A mortalidade por câncer de próstata é relativamente baixa, o que reflete, em parte, seu bom prognóstico. As taxas de mortalidade são 2,5 maiores nos países desenvolvidos, se comparadas a outras regiões do mundo, tendo uma razão mortalidade/incidência entre 0,13 na América do Norte e 0,80 na África.¹⁰ A sobrevida média mundial estimada em cinco anos é de 58%. A dieta tem sido apontada em alguns estudos como fator importante na etiologia desse tipo de câncer. Uma alimentação com base em gordura animal, carne vermelha e cálcio tem sido associada ao aumento no risco de desenvolvimento de câncer de próstata. Já uma dieta rica em vegetais, selênio, vitaminas D e E, licopeno e ômega-3 tem sido indicada como fator importante de proteção para o desenvolvimento dessa neoplasia. Alguns estudos apontam a obesidade como fator de risco para a mortalidade por câncer de próstata. Os métodos de rastreamento disponíveis atualmente, como o PSA, não mostraram até o momento sucesso na redução das taxas de mortalidade, tendo pouco efeito na melhoria da qualidade de vida dos pacientes. O número estimado em 2008 de novos casos de câncer de próstata no Brasil é de 49.530, que correspondem a um risco estimado de 52 novos casos por cada 100 mil homens.¹¹

1.4 Cultura de Células

As culturas primárias são derivadas diretamente de incisões de tecido normal e cultivado, tanto como tecido quanto suspensão celular após o tratamento enzimático. Tais culturas são inicialmente heterogêneas, porém, tendem a dominância de fibroblastos, sendo empregadas extensivamente em laboratórios de pesquisa. Apesar de possuírem um período de replicação limitado, a grande vantagem reside no fato de manterem muitas características da célula *in vivo*. Culturas contínuas são constituídas de um único tipo de células, que podem ser propagadas serialmente por um número limitado de divisões celulares.

Morfologicamente, as culturas de células se apresentam na forma de suspensão, como uma célula única ou um pequeno grupo livre flutuante; ou na forma de monocamada, como células aderidas ao frasco de cultura celular. A forma na qual as células se apresentam reflete o tecido da qual são derivadas. Células derivadas do sangue, como leucócitos e linfoma, tendem a crescer em suspensão, ao passo que células derivadas de tecidos sólidos, como pulmão e fígado, geralmente crescem na forma de monocamada. As células são classificadas como endoteliais, epiteliais, neural, fibroblastos e linfoblastos.

O desenvolvimento de meios de cultivo de células de mamíferos vem sendo estudado há mais de 50 anos. No início, foram utilizados fluidos biológicos, principalmente derivados de soro. Na sequência, foi desenvolvido um meio para o crescimento celular denominado de meio mínimo essencial da Eagle (EMEM, do inglês, *Eagle's modified essential medium*), formado por uma combinação de aminoácidos, vitaminas, sais iônicos e soro dializado para promover um crescimento com componentes inespecíficos. Muitas linhagens celulares novas necessitavam de meios mais complexos. Por exemplo, o meio DMEM (do inglês, *Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium*), uma variação do ENEM, contém cerca de 4 vezes mais vitaminas, aminoácidos e glicose. Estes e outros

meios como o RPMI requerem componentes existentes em soros de animais. Dessa forma é extensivamente utilizado o soro fetal bovino.¹²

1.4.1 Aquisição de Linhagens Celulares

Depois da escolha de uma determinada linhagem celular ou de um clone com características específicas, devem ser estocadas amostras congeladas para posterior uso. Com o aumento significativo do número de linhagens estabelecidas nas últimas décadas, foram criados vários bancos de células com o objetivo de facilitar a aquisição dessas linhagens com o apropriado controle do acesso as patentes de hibridomas e células geneticamente modificadas.

Um aspecto importante relacionado ao planejamento de experimentos é o conhecimento das características das células a serem utilizadas. Pode-se para isso fazer uso de informações disponíveis na literatura ou em bancos de células. Atualmente, existem vários sítios na Internet com informações muito úteis para guiar os processos de escolha, aquisição e manuseio de diversas linhagens.

A Tabela 3 apresenta alguns bancos de dados que podem ser consultados para a aquisição de linhagens celulares. Nos sítios destes bancos são encontradas informações importantes para o sucesso do cultivo da linhagem adquirida. Estão disponíveis informações como o meio de cultura ideal, o organismo e o tecido dos quais a linhagem deriva, a morfologia e produtos desta célula.¹²

Tabela 3 - Bancos de dados de linhagens celulares

Nome do Banco de Dados	Sítio na Internet
American Type Culture Collection – ATCC	http://www.atcc.org
Cell Line Data Base – CLDB	http://www.biotech.ist.unige.it/interlab/cldb.html
Common Access to Biological Resources and Information – CABRI	http://www.cabri.org
European Collection of Cell Culture – ECACC	http://www.ecacc.org.uk/
German Collection of Microorganisms and Cell Cultures – DSMZ	http://www.dsmz.de/
Interlab Cell Line Collection – ICLC	http://www.iclc.it
Japanese Collection of Research Bioresources – JCRB	http://www.cellbank.nihs.go.jp/
Japanese Tissue Culture Association – JTCA	http://www.wdcm.riken.go.jp/wdcm/jtca.html
Riken Bioresource Center	http://www.bcr.riken.jp

1.5 Quimioterapia do Câncer

A quimioterapia se caracteriza como o tratamento do câncer por meio do uso de produtos químicos. A quimioterapia moderna teve início durante a Primeira Guerra Mundial, quando se descobriu que certos produtos usados em armas químicas eram tóxicos para células de crescimento rápido, como as células malignas. Nos últimos 50 anos, esta foi uma das áreas mais pesquisadas da medicina, sendo que diversas substâncias foram

descobertas para o tratamento do câncer, sendo administradas por via oral, via intramuscular, e predominantemente, por via intravenosa.¹³

Os quimioterápicos atuam por vários mecanismos de ação, interferindo na maioria dos casos no processo de divisão celular. Entretanto, não são capazes de distinguir entre uma célula maligna e uma benigna, ou seja, possuem baixa seletividade, atacando todas as células que estejam em processo de divisão. Por essa razão é possível entender os efeitos colaterais significativos causados pelos agentes quimioterápicos.⁴ Os efeitos mais frequentes são náuseas e vômitos; queda parcial ou total de pêlos e cabelo (alopécia) em determinadas áreas da pele; comprometimento do sistema imunológico e aumento da susceptibilidade a infecções.⁴

Os tratamentos quimioterápicos podem ser classificados em quatro modalidades principais: (i) quimioterapia neoadjuvante, realizada antes de procedimentos cirúrgicos ou radioterápicos para diminuição do tumor primário, frequente em casos de câncer de mama, pulmão ou bexiga. (ii) quimioterapia adjuvante, realizada após a cirurgia, quando o paciente está aparentemente sem a doença, mas existe alto risco de recidivação (e.g., câncer de mama ou de cólon). (iii) quimioterapia curativa, usada nos casos em que o tratamento quimioterápico se propõe a curar o paciente. Alguns casos de câncer são passíveis de cura com quimioterapia exclusiva, como os linfomas, leucemias, tumores da infância, entre outros. Nestes casos, o tratamento é feito com doses intensivas, a fim de aumentar as chances de cura do paciente. (iv) quimioterapia paliativa, realizada em casos com doença metastática em que os tumores não são passíveis de cura definitiva. Nestes casos a quimioterapia tem a finalidade de diminuir os sintomas da doença, bem como de aumentar a sobrevida do paciente. Geralmente, empregam-se doses menos agressivas dos agentes quimioterápicos.⁴

1.6 Descoberta de Fármacos e o Mercado Farmacêutico

A sobrevivência, desenvolvimento e crescimento contínuo da indústria farmacêutica requerem investimentos significativos em P&D (Pesquisa e Desenvolvimento). Desde a concepção do projeto até a introdução de um único fármaco no mercado farmacêutico, são estimados de 12 a 15 anos em P&D, com investimentos totais da ordem de US\$ 500-880 milhões, podendo alcançar cifras superiores a US\$ 1 bilhão em alguns casos.¹⁴⁻

¹⁷ O processo de descoberta de novas entidades químicas (NCEs, do inglês, *new chemical entities*) candidatas a fármacos é complexo, longo e envolve altos investimentos.¹⁸ Contudo, inovações terapêuticas de sucesso podem gerar retornos financeiros significativos, da ordem de muitos milhões ou até bilhões de dólares por ano. Dentre os fármacos incluídos na categoria *blockbuster* (termo do inglês usado para designar os fármacos com vendas anuais superiores a US\$ 1 bilhão), atualmente estão o hipolipemiante atorvastatina (Lípitor[®], Pfizer) com vendas alcançando os US\$ 12,68 bilhões em 2008,¹⁹ o antitrombótico clopidogrel (Plavix[®], Sanofi Aventis) e o antiulceroso esomeprazol (Nexium[®], AstraZeneca), entre outros.

1.6.1 Química Medicinal e Estratégias de Planejamento de Fármacos

O processo de planejamento racional de candidatos a novos fármacos fundamenta-se no conhecimento prévio do mecanismo fisiológico que leva ao estado de doença e na seleção de um alvo biológico adequado. O alvo macromolecular (e.g., enzima, receptor biológico) pode ter a sua estrutura tridimensional conhecida ou não. O conhecimento da topografia molecular tridimensional do receptor, particularmente da cavidade de interação, permite o planejamento de inibidores enzimáticos ou de agonistas ou antagonistas de receptores, por processos de complementaridade molecular planejada. Neste processo, se planeja um

candidato com propriedades estruturais adequadas ao processo de reconhecimento molecular pelo receptor alvo, reflexo de suas propriedades farmacodinâmicas. É o que se chama de planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor (SBDD, do inglês, *structure-based drug design*). Devido à grande evolução das técnicas de biologia molecular estrutural, como a cristalografia de raios-X, um número considerável de alvos moleculares tem suas estruturas tridimensionais disponíveis no banco de dados de proteínas (PDB, do inglês, *protein data bank*).

Em contraste, o alvo macromolecular do estudo pode não ser conhecido ou não ter sua estrutura tridimensional determinada. Neste caso, o processo de planejamento se inicia pelo estudo das características estruturais de moléculas bioativas conhecidas (i.e., estudos de SAR) ou ainda a partir do ligante endógeno da proteína em estudo. Os estudos podem, então, ser conduzidos através do planejamento de fármacos baseado na estrutura do ligante (LBDD, do inglês, *ligand-based drug design*). Em muitos casos, o uso combinado das duas estratégias pode ser útil, gerando conhecimentos novos através de uma sinergia entre os métodos de planejamento.²⁰⁻²²

Os métodos em quimio- e bionformática estão integrados as técnicas experimentais no processo de planejamento de fármacos, encontrando enorme utilidade nos estudos em química medicinal visando à identificação, seleção e otimização de moléculas bioativas até a descoberta de NCEs candidatas a fármacos. A integração dos métodos computacionais ao trabalho químico e biológico experimental é um requerimento essencial para a geração de novas moléculas bioativas qualificadas, com propriedades múltiplas otimizadas.²¹⁻²³

Nos estágios iniciais do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos, em particular na fase pré-clínica (ou descoberta), as pesquisas se concentram na seleção de alvos macromoleculares com elevado potencial terapêutico e na identificação e

otimização de moléculas pequenas capazes de modular o alvo biológico selecionado. Uma vez identificado um alvo molecular promissor, é fundamental a sua validação, ou seja, é preciso verificar qual é a relevância deste alvo no mecanismo fisiológico da doença em questão.^{20,21,24,25} É necessário investigar as vias bioquímicas envolvidas e estabelecer se a modulação seletiva da proteína alvo, pela ação de moléculas pequenas, é capaz de gerar a resposta esperada no controle da doença ou disfunção em humanos. As moléculas bioativas podem ser obtidas de fontes diversas, como produtos naturais ou síntese orgânica, e devem ter sua propriedade biológica determinada experimentalmente. Neste estágio de pesquisa básica, busca-se identificar moléculas que apresentem propriedades desejadas para um fármaco, predominantemente, potência, afinidade e seletividade, mas que ainda precisam ser otimizadas em relação a outras propriedades. Diversas estratégias de química medicinal podem ser empregadas nos processos de identificação e otimização de moléculas bioativas, como os métodos tradicionais de síntese de moléculas e triagens biológicas e bioquímicas (*in vitro* e *in vivo*). Métodos modernos para a geração e avaliação de moléculas, como a química combinatória, as triagens biológicas automatizadas em larga escala (HTS, do inglês, *high-throughput screening*) e o ensaio virtual (VS, do inglês, *virtual screening*), encontram também grande aplicabilidade. Além disso, os estudos das relações entre a estrutura e atividade (SAR, do inglês, *structure-activity relationships*) e os estudos das relações quantitativas entre a estrutura e atividade (QSAR, do inglês, *quantitative structure-activity relationships*), são componentes essenciais no processo de otimização de moléculas bioativas.^{20,21,24} Idealmente, além dos parâmetros farmacodinâmicos (e.g., potência, seletividade, afinidade), propriedades farmacocinéticas como ADME (Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção) e toxidez, devem ser considerados conjuntamente, para eliminar candidatos inadequados para desenvolvimento clínico, selecionando apenas NCEs altamente qualificadas.^{21,25}

Após a conclusão da fase pré-clínica de pesquisa básica, as NCEs selecionadas são submetidas à aprovação das agências regulatórias (nos Estados Unidos, FDA, *Food and Drug Administration*; no Brasil, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para autorização da realização de testes em seres humanos através da licença para investigação de um novo candidato a fármaco (IND, do inglês, *investigational new drug*). Nas fases clínicas são realizados diversos estudos para determinar a eficácia e a segurança das NCEs para uso clínico. Na fase clínica I são feitos testes de dosagem dos princípios ativos em um grupo de voluntários saudáveis e a avaliação preliminar dos níveis de toxidez, em particular na doença do câncer os testes de fase clínica I são feitos em pacientes voluntários portadores da doença. Na fase clínica II são realizados testes farmacológicos em um número reduzido de pacientes para a avaliação da dosagem, eficácia e segurança da composição. Na fase clínica III são realizados testes em um número significativo de pacientes para avaliação das propriedades farmacocinéticas, além de eficácia e segurança. Na fase clínica IV, é realizado o monitoramento pós-comercialização do novo fármaco^{15,16,17,26}.

Devido à complexidade dos estudos envolvidos nas diversas etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, várias interfaces multidisciplinares são necessárias em química medicinal envolvendo a integração de áreas como a química, biologia, bioquímica, farmacologia, física, bioinformática, entre outras.

1.6.2 A Indústria Farmacêutica Nacional

O setor farmacêutico no Brasil é representado por cerca de 700 estabelecimentos que se dedicam a produção de medicamentos.²⁷ Os laboratórios com capital de origem nacional tem se desenvolvido na última década, respondendo por 45% das vendas e 39% do faturamento bruto do setor, em 2005. O cenário atual é favorável para o crescimento

da indústria farmacêutica nacional através do estabelecimento de programas de P&D de fármacos, envolvendo investimentos significativos e desenvolvimentos de interfaces sólidas e produtivas na tríade governo, universidade e indústria. Com isso, vários projetos de pesquisa estão em andamento em diversas empresas, principalmente em áreas como diabetes, dor, câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, osteoporose, AIDS, doenças tropicais (e.g., Doença de Chagas, esquistossomose, leishmaniose), entre outras.

Atualmente, os fortes investimentos em P&D e o aprimoramento dos produtos farmacêuticos nacionais para atender padrões internacionais de qualidade, são tendências importantes que poderão ter grande relevância em nível mundial futuramente. No Brasil, um exemplo de alta qualidade no setor é a Cristália Produtos Químicos e Farmacêuticos LTDA, um laboratório de capital 100% nacional que investe em P&D de novos fármacos, possuindo certificação de boas práticas de fabricação (BPF) em todas as etapas dos processos de suas unidades. A Cristália apresentou nos últimos anos um crescimento de 20-25%, com vendas totais da ordem de R\$ 430 milhões, contando com produtos exportados para os Estados Unidos, Europa, Oriente Médio e América Latina.²⁷

1.7 Migração Celular e o Planejamento de fármacos

O planejamento de fármacos muitas vezes tem como base um alvo molecular em que as moléculas pequenas devem interagir de forma apropriada para modular a sua atividade com finalidade terapêutica. Os compostos da Tabela 5 que apresentaram boa atividade anticâncer são inibidores da enzima tioredoxina redutase (EC 1.8.1.9),³³ como determinado anteriormente em trabalhos de nosso grupo. Esse fato é muito interessante devido aos resultados obtidos na presente dissertação de mestrado. A tioredoxina redutase modula a liberação do fator de crescimento endotelial, a proliferação celular e a apoptose

(morte celular programada) sendo considerada um bom alvo para o desenvolvimento de novos antitumorais. Estudos realizados com a tioredoxina redutase e o fator de crescimento de vasos endoteliais (VEGF, do inglês, *vascular endothelial growth factor*) em células cancerígenas com elevado poder de migração e invasão, mostraram que a tioredoxina redutase pode regular os níveis de VEGF 25, impedindo que as células cancerígenas se proliferem, migrem e invadam outros tecidos com maior vitalidade.³⁴ A tioredoxina redutase aumenta a regulação da maioria dos tumores, como leucemias, pulmão, renal, mama, próstata e cólon, apresentando elevados níveis de expressão. Talvez essa observação esteja relacionada com a baixa seletividade dos compostos (Tabela 5) frente às duas linhagens celulares estudadas. Em contraste, chama a atenção que os derivados de migrastatina apresentam alta seletividade frente às células MDA-MB-213, caracterizando-se como bons alvos para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos seletivos para o tratamento do câncer de mama. A migrastatina é um produto natural com estrutura química caracterizada por anel macrolactona que tem sido muito explorada no desenvolvimento de inibidores da migração celular e de metástase de tumores de mama.³¹

2 OBJETIVOS

O presente trabalho de dissertação de mestrado tem como objetivos fundamentais o estabelecimento e padronização de protocolos experimentais para o desenvolvimento de testes *in vitro*, como o *wound healing* e o de migração celular, empregando células de adenocarcinoma mamário humano (MDA-MB-231) e de câncer de próstata humano (DU-145), além da realização de intensivas triagens biológicas de compostos visando à identificação de novos candidatos a inibidores do processo de migração celular (metástase).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Células

A linhagem celular MDA-MB-231 de carcinoma de mama humano foi cultivada em meio DMEM (modified Dulbecco's Minimum Medium – Cultilab), contendo soro fetal bovino (Cultilab) a 10%. O meio foi mantido a 37°C em estufa com 5% de CO₂. As células DU-145 de carcinoma de próstata foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, estéril, Cultilab), a 37°C em estufa com 5% de CO₂.

As células cresceram em monocamada, aderidas à superfície da garrafa de cultura (BD FalconTM 75 cm²). As células foram sub-cultivadas a partir de uma suspensão celular obtida por descolamento das células da monocamada, com o uso de tripsina. Todas as operações envolvidas no manuseio das células e meios foram efetuadas em condições de assepsia, com material estéril e em câmara de fluxo laminar.

3.2 Protocolo de Cultivo das Células

O fluxo laminar foi esterilizado previamente, através da limpeza de toda a superfície da área de trabalho com álcool 70% e deixando ligada a luz UV por no mínimo 1h. O meio DMEM foi selecionado em frasco de 110 mL. O SFB foi alicotado em frascos (BD FalconTM) de 50 mL, sendo o excedente congelado. Adicionou-se 10% de SFB ao meio de cultura (11 mL). Utilizou-se garrafas de cultura de 75 cm², sendo levado ao fluxo frascos de 15 mL (BD FalconTM). Para o descongelamento das células (aliquotadas) foi utilizado um banho termostatzado a 37°C.

3.2.1 Procedimento Experimental

Foram colocamos 12 mL de meio (meio + 10% de SFB). As células foram descongeladas utilizando um banho termostatzado com agitação manual e colocadas em tubo Falcon de 15 mL, sendo centrifugadas a 1.000 rpm por 5 min. As células foram ressuspensas gentilmente com meio de cultura fresco em SFB (1 mL) e colocadas em uma garrafa de cultura, mantida em estufa a 37°C por 48 h. Deve-se observar as células durante esse período para ver se estão aderidas, caso contrário, é sinal que estão mortas e o experimento precisa ser refeito. Para o procedimento de descolamento das células aderidas, o meio de cultura foi removido com uma pipeta e as células aderidas foram lavadas com 5 mL de solução tampão PBS (2M NaCl, 2M KCl, 0,2 M Na₂HPO₄, 1M KH₂PO₄). Foram adicionados 5 mL de tripsina 0,025% em PBS e a garrafa foi colocada por 2 min em estufa para viabilizar o processo de desprendimento das células. Adicionou-se 2 mL de meio de cultura com soro (para inativar a tripsina e evitar prejuízos às células), colocando-se 3,5 mL desta cultura em tubos Falcon e centrifugando-se a 1.000 rpm por 5 min. Após, o líquido foi aspirado com o cuidado de não perturbar o *pellet* formado. Ressuspendeu-se em meio de cultura com soro (1 mL) para contagem e utilização nos experimentos de inibição.

A contagem das células foi realizada utilizando-se uma câmara de Neubauer. Para a realização dos experimentos de migração celular, o número de células ideal foi 4x10⁴ células por 500 µL de meio de cultura.

Os compostos foram preparados em soluções estoque na concentração de 1 mM em 2,5% de DMSO. As soluções estoque foram empregadas para gerar as concentrações necessárias para os testes celulares. Todos os compostos foram testados no ensaio *in vitro* wound healing em concentração única de 1 µM. Após a triagem em dose única, os compostos

selecionados foram submetidos a um procedimento de avaliação da atividade em concentrações variadas (500 nM, 250 nM, 125 nM, 62,5 nM e 31,2nM).

O uso desse método permite a seleção da faixa de concentração ideal dos compostos para o teste de migração celular. Nos testes de migração, foram utilizadas concentrações diferentes de cada composto, de acordo com os resultados preliminares do ensaio *wound healing*.

3.3 Ensaio *Wound Healing*

O ensaio de migração celular foi realizado de acordo com o ensaio *wound healing* ou modelo de cicatrização *in vitro*.²⁸ As células foram cultivadas em placas de 12 poços contendo 1 mL de meio de cultura e 10% 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. A cultura foi lavada três vezes com tampão PBS para a retirada completa de resíduos celulares da fenda formada. Foi adicionado meio de cultura experimental (10% SFB), com concentrações variáveis dos compostos em estudo.

O processo foi fotografado digitalmente em um microscópio invertido (magnificado 4X). Imagens fotográficas foram capturadas no início do experimento (tempo de 0 h) e após a incubação das células a 37°C em 5% CO₂ por 22 h. A área das fendas foi medida nas imagens, atribuindo-se 100% no tempo de 0 h. A média das distâncias totais das áreas das fendas foram calculadas e atribuídas em valores percentuais em relação ao controle. Um exemplo de visualização do ensaio *wound healing* pode ser observado na Figura 2.

Figura 2 - Fotos do ensaio *wound healing* magnificadas em 4 vezes.

3.4 Ensaio de Migração Celular em Câmara de Boyden

Foram utilizadas placas de 24 poços (BD BioCoat™ Migration/Invasion Chambers - MIC) com diâmetro de 6,5 mm e 8 μ m de porosidade, para realização dos ensaios de migração celular. A Figura 3 apresenta um esquema simplificado do sistema empregado.

Figura 3 - Representação esquemática do sistema de cultura sobre o inserto.

Foram adicionamos ao inserto 4×10^4 células/500 μ L de meio de cultura (sem soro fetal bovino) e o composto teste (a concentração de cada composto teste variou a cada ensaio). No compartimento inferior (poço), foram adicionados 750 μ L de meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino, mais o composto teste. Experimentos individuais com o composto padrão evodiamina e sem a presença de qualquer composto teste foram realizados para padronização dos ensaios.

Após a montagem do experimento, as placas foram incubadas por 22 h a 37°C em estufa de CO₂. Após, as células que migraram foram coradas e quantificadas. Para tal, a membrana do inserto foi fixada com metanol durante 5 min. Após a fixação, a membrana foi lavada com tampão PBS e as células que não migraram foram retiradas com o auxílio de hastes de algodão (estas células ficam na superfície superior da membrana do inserto). Após a limpeza, a membrana foi corada com solução de azul de toluidina em 1% bórax por 2 min e lavada com água corrente. Após a lavagem, a membrana foi recortada utilizando-se uma lanceta cirúrgica e colocada em câmara de Neubauer para a contagem das células que migraram, conforme mostra a Figura 4.²⁹

Valores de IC₅₀ (concentração de composto requerida para inibir em 50% a migração celular em condições padrões de ensaio) foram determinados através de curvas concentração $\times$ resposta com perfil definido, empregando de 5 a 7 concentrações distintas dos compostos teste (em triplicata). Os dados experimentais foram tratados e coletados, sendo os valores de IC₅₀ determinados através do método de regressão não-linear de melhor ajuste empregando-se o programa SigmaPlot 9.0.

Figura 4 - Foto da Câmara de Neubauer.

3.5 Compostos

Foram estudados vários compostos pertencentes a diversas classes químicas. Após um extensivo processo de triagem biológica *in vitro* inicial, foram identificados alguns compostos bioativos que foram agrupados em duas classes principais.

(i) Derivados de benzotiadiazóis e dinitroquinoxalinonas: os compostos dessa classe foram adquiridos comercialmente ou obtidos por síntese orgânica, conforme descrito anteriormente.³⁰

(ii) Derivados da migrastatina: os compostos dessa classe foram sintetizados no Laboratório de Química Orgânica Sintética do Instituto de Química da UNICAMP, sob a coordenação do Professor Dr. Luis Carlos Dias.³¹

3.5.1 Avaliação da Toxidez Celular do Solvente

Devido à baixa solubilidade dos compostos em água, foi avaliado o perfil das culturas celulares na presença de dimetilsulfóxido (DMSO). O DMSO é um solvente aprótico

e polar muito utilizado em testes celulares, em concentrações geralmente no limite de 5%. No presente trabalho, avaliamos o efeito de concentrações variadas de DMSO (1%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%) em relação à toxidez das células.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Banco de Células

A montagem e a manutenção de bancos de células são fatores essenciais para o desenvolvimento de um trabalho visando à identificação de moléculas bioativas. Portanto, foi de especial importância na criação e desenvolvimento do presente trabalho de dissertação de mestrado, que envolveu em uma primeira etapa o estabelecimento do banco de células. De forma geral, as linhagens celulares devem ser adquiridas de bancos bem conceituados para garantir a sua caracterização e qualidade.

Os bancos de células de nosso laboratório são mantidos em temperaturas controladas, sendo armazenados e mantidos em nitrogênio líquido. Os frascos de amostras devem ser eficientemente etiquetados com as informações necessárias para a correta identificação posterior. Cada frasco armazenado no banco de células deve conter claramente informações como o nome da linhagem congelada, número de passagem, data de congelamento, número de células congeladas, procedência e nome do pesquisador responsável.

Cuidados adicionais são necessários para a manutenção e atualização do banco de dados, principalmente em relação ao controle de entrada e saída de frascos. A correta identificação e manipulação das diferentes linhagens são de fundamental importância. Dessa forma, antes de iniciarmos os experimentos com as novas linhagens em nosso laboratório, as células foram manipuladas, identificadas e armazenadas seguindo rigorosos critérios de qualidade, garantindo o seu uso apropriado nos ensaios que foram realizados posteriormente.¹²

4.1.2 Linhagem de Câncer de Mama

A linhagem celular MDA-MB-231 (Doadas pela Dr. Mari Claide Sogayar da Universidade de São Paulo, do Instituto de Química Departamento de bioquímica), parte do banco de células do Laboratório de Química Medicinal e Computacional do Centro de Biotecnologia Molecular Estrutural do Instituto de Física de São Carlos, é oriunda de um adenocarcinoma derivado da metástase pleural decorrente de neoplasia mamária e não possui receptores de estrógeno em sua superfície celular. De acordo com a *American Type Culture Collection* (ATCC), a linhagem MDA-MB-231 é do tipo aderida com alto poder de migração e invasão (Figura 5).³²

Figura 5 - Morfologia da linhagem celular tipo MDA-MB-231 de câncer de mama. (A) baixa densidade; (B) alta densidade.³²

4.1.3 Linhagem de Câncer de Próstata

A linhagem celular DU-145 (Doadas pela Dr. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo da Universidade Federal de São Carlos, Centro de ciências Biológicas e da saúde,

departamento de ciências fisiológicas), também parte do banco de células de nosso laboratório e que foi empregada em nossos estudos, apresenta alta agressividade e poder invasivo. Esta linhagem é originária da próstata de seres humanos, de um carcinoma derivado da metástase cerebral, do tipo epitelial. Possui propriedade de crescimento característica aderida.³²

Figura 6 - Morfologia da linhagem celular tipo DU-145 de câncer de próstata. (A) baixa densidade; (B) alta densidade³²

4.2 Triagem Biológica de Compostos

Os nossos laboratórios no CBME são uma referência importante na área de triagem de compostos de origem natural e sintética frente a vários alvos biológicos definidos, como as enzimas de parasitas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* e purina nucleosídeo fosforilase de *Schistosoma mansoni*, bem como frente a ensaios padrões com culturas de parasitas e células humanas.

No presente trabalho, vários compostos de classes químicas distintas, apresentando boa diversidade química, foram selecionados para testes de triagem em concentração única no ensaio qualitativo de *wound healing*. É importante mencionar que a

análise qualitativa fornece somente uma idéia inicial sobre a propriedade dos compostos de modular ou não a atividade biológica em estudo. Para isso, um fator muito importante é a determinação de uma concentração inicial padrão para todos os compostos usados nos testes. A concentração estipulada em nossos ensaios foi de 1 μ M, assumindo-se que compostos com valor de IC₅₀ acima desse limite não apresentariam interesse para estudos em ensaios celulares posteriores, de natureza quantitativa.

Antes de iniciarmos os testes de triagem biológica, foi necessário avaliar o efeito do solvente utilizado e determinar um padrão comparativo em relação a um composto de referência.

Todos os compostos testados foram preparados em soluções estoque na concentração de 1 mM em DMSO. É a partir de soluções estoque que são geradas as concentrações, por exemplo de 1 μ M, que são empregadas como concentração única nos ensaios de triagem biológica *in vitro* usando o modelo de *wound healing*. Por isso, foi necessário avaliar com muito cuidado o comportamento das culturas celulares na presença do solvente orgânico. O DMSO é um solvente aprótico e polar muito utilizado em diversos tipos de ensaios biológicos, em concentrações geralmente no limite entre 1 e 10%.

Para a avaliação do efeito do solvente em relação à toxidez das células, foram preparadas soluções com concentrações de DMSO de 1%, 2,5%, 5%, 7,5% e 10%) e estas foram testadas em condições padrões de ensaio. A Figura 7 mostra o gráfico do comportamento da cultura de células MDA-MB-231 na concentração final de DMSO de 2,5%, monitorado por um tempo de até 48 h. Pode ser observado que não houve morte celular nesta concentração, sendo que o mesmo perfil de gráfico foi obtido para a concentração de 1% de DMSO. Na concentração de 5% de DMSO, entretanto, após um período de 4 h observou-se morte celular que aumentou de forma significativa com tempo até um período de 24 h, causando inviabilidade celular. Esse perfil de inviabilidade celular foi também

observado para as concentrações de 7,5 e 10%. Portanto, a concentração final de 2,5% de DMSO foi considerada segura e selecionada para os ensaios biológicos. Em todos os ensaios, um padrão (sem a presença de solvente orgânico) foi utilizado para comparação, garantindo a qualidade dos resultados obtidos.

A linhagem celular DU-145 apresentou perfil muito semelhante em relação a presença de DMSO, sendo que a concentração de 2,5% foi considerada apropriada também para esse caso (por questão de simplificação, os gráficos não são apresentados).

Após definida a concentração de DMSO, realizados a padronização do ensaio celular, uma etapa que é essencial em qualquer tipo de avaliação biológica *in vitro* ou *in vivo*, e até mesmo em ensaios *in silico*. No caso particular de nossos ensaios celulares, foi necessário escolher um composto denominado padrão de referência, para ser como base comparativa na avaliação de novos compostos. Uma forma de escolha apropriada se baseia na identificação de compostos de referência que já tenham sido descritos na literatura.³¹

Figura 7 - Comportamento da linhagem celular MDA-MB-231 em função do tempo na concentração de 2,5% de DMSO.

Figura 8 – Efeito da concentração de 5% de DMSO na linhagem celular MDA-MB-231 em função do tempo.

Foi selecionado como padrão de referência a Evodiamina (Figura 9), composto que havia sido previamente testado na linhagem celular MDA-MB-231 em ensaios similares aos propostos neste trabalho. A evodiamina, disponível comercialmente pela empresa Sigma Aldrich, é um alcalóide de origem natural extraído da planta *Evodia Fructus*.

Figura 9 - Estrutura molecular da Evodiamina.

Para padronização do composto de referência Evodiamina, realizamos ensaios de *wound healing* e de migração celular. Como pode ser observado na Figura 10, a Evodiamina não fechou a fenda na concentração de 1 μM , confirmando resultados anteriores.²⁶

Figura 10. Teste de *wound healing* na presença de Evodiamina na concentração de 1 μM no tempo inicial de 0 h e depois de 22 h.

Nessa etapa do trabalho, aproveitamos a oportunidade para desenvolver um método de avaliação semi-quantitativo, que acabaria sendo bastante útil na seleção das concentrações apropriadas para determinação do fator de potência IC_{50} no teste de migração celular. Nesse método de triagem com o ensaio de *wound healing*, são empregadas 5 concentrações do composto alvo, por exemplo, no caso a Evodiamina nas concentrações de 1000 nM, 500 nM, 250 nM, 125 nM e 62,5 nM. A partir de uma inspeção visual das fendas (similar ao observado na Figura 10) na presença das diferentes concentrações de compostos, que abrangem uma faixa considerável do espectro de concentrações importantes para os nossos estudos, pode-se estimar a faixa apropriada para as variações de concentração no ensaio de migração celular. A vantagem clara desse método de avaliação preliminar é a sua

rapidez e custo baixo em comparação ao ensaio de migração celular, que apresenta custos operacionais e principalmente financeiros bem mais significativos.

Na sequência foi realizado o teste de migração celular, de natureza quantitativa, para a determinação do valor de IC_{50} e posterior comparação com os dados reportados na literatura. A Tabela 4 apresenta os resultados do teste de migração celular com a Evodiamina. Os dados experimentais coletados foram usados na análise de regressão não-linear de melhor ajuste para a determinação de um valor de IC_{50} de 275 ± 24 nM, comparável ao dado da literatura ($IC_{50} = 318$ nM).^{29,31}

A Figura apresenta o gráfico de concentração x resposta com seis pontos referentes a diferentes concentrações do composto alvo, abrangendo uma faixa apropriada de distribuição de % de inibição (entre 20 e 80%).

Tabela 4 – Resultados do teste de migração celular para diferentes concentrações do composto Evodiamina.

Composto	Concentração (nM)	Inibição (%)	Migração (%)
Evodiamina	1000	77	23
	500	60	40
	250	44	56
	125	32	59
	62,5	20	63
	0,0	0	100

Figura 11 - Gráfico do tipo concentração $\times$ resposta empregado para a determinação de IC_{50} pelo método de regressão não-linear de melhor ajuste a partir dos dados coletados experimentalmente na Tabela 4.

4.2.1 Teste de *Wound Healing*

4.2.1.1 Linhagem MDA-MB-231

A triagem biológica de compostos empregando o teste de *wound healing* foi extremamente útil nesse trabalho de dissertação de mestrado. Vários compostos de classes químicas diversas (e.g., derivados de chalconas, hidrazonas, pirazóis, imidazóis e nucleosídeos, entre outros) foram testados em concentração única de 1 μ M no ensaio de *wound healing*. De um total de cerca de 150 compostos testados frente à linhagem MDA-

MB-231, identificamos um derivado benzotiadiazol (5-nitro, 2,1,3-benzotiadiazol, Figura 12) muito interessante como *hit* (termo do inglês usado para designar moléculas bioativas identificadas em ensaios biológicos iniciais).

Figura 12 – *Hit* identificado no ensaio de *wound healing* frente à linhagem celular MDA-MB-231.

A descoberta desse *hit* levou a seleção de uma coleção de 32 derivados de benzotiadiazóis, quinoxalinonas e benzodioxóis (entre outros derivados heterocíclicos sintetizados previamente no grupo do Prof. Adriano D. Andricopulo ou adquiridos comercialmente) para a realização de novos ensaios *in vitro* de *wound healing*. As estruturas dos compostos dessa coleção, bem como os resultados da triagem biológica na concentração única de 1 μ M são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados do teste de *wound healing* para os compostos derivados benzotiadiazóis e dinitroquinoxalinona na linhagem MDA-MB-231.

Código	Estrutura	*Fechamento da Fenda
1		Negativo
2		Negativo
3		Negativo
4		Negativo
5		Negativo
6		Negativo
7		Negativo
8		Negativo
9		Negativo

10		Negativo
11		Positivo
12		Positivo
13		Positivo
14		Positivo
15		Positivo
16		Negativo
17		Positivo
18		Positivo

19

Positivo

20

Negativo

21

Negativo

22

**Tóxico

23

**Tóxico

24

**Tóxico

25

Negativo

26

Negativo

27

Negativo

28

Negativo

29		Negativo
30		Negativo
31		Negativo
32		Negativo

*Compostos testados na concentração de 1 μ M. **Ocorreu morte celular.

Como pode ser observado na Tabela 5, vários compostos apresentaram efeitos promissores no teste de *wound healing*, revelando a importância do processo de triagem como estratégia útil para a identificação de novos *hits* com propriedades anticâncer. A Figura 13 apresenta o resultado do teste de *wound healing* para o composto **16** da nova coleção.

Os resultados apresentados o positivo significa que as células invadiram a fenda e o negativo significa que as células não invadiram a fenda e este resultado se demonstra interessante.

Figura 13 - Condições das células MDA-MD-231 para o derivado dinitrobenzotiadiazol **16** no teste de wound healing.

Os compostos **22**, **23** e **24** apresentaram-se tóxicos para as células na concentração de 1 μ M. Nesses casos, foram feitos novos ensaios de *wound healing* na concentração única de 500 nM. Os resultados são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados do teste de *wound healing* na concentração de 500 nM na linhagem MDA-MB-231.

Código	Concentração (nM)	Fechamento da Fenda
22	500	*Tóxico
23	500	Negativo
24	500	Negativo

*Morte celular.

O composto **22** foi o único que apresentou toxidez elevada na concentração de 500 nM, sendo descartado de quaisquer outras análises. A avaliação semi-quantitativa dos compostos que possuíam propriedades de evitar o fechamento da fenda (Tabelas 5 e 6), levou a seleção final do grupo mais promissor para os testes de migração celular. Os compostos

selecionados foram **4, 7, 8, 21, 23 e 26** (Tabela 5) e os resultados da avaliação *in vitro* no método de *wound healing* são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Resultados da triagem semi-quantitativa dos compostos selecionados para o teste de migração na linhagem MDA-MB-231.

Composto	Concentração (nM)	Inibição (%)
4	500	70
	250	55
	100	50
	10	44
7	500	44
	250	44
	100	42
	10	34
8	500	37
	250	16
	100	10
	10	0
21	500	44
	250	35
	100	33
	10	30
23	500	33
	250	32
	100	32
	10	28
26	500	57
	250	44
	100	42
	10	40

Uma outra classe de compostos obtidos por simplificação molecular da estrutura migrastatina (série de intermediários, Figura 14), foi também avaliada frente às células MDA-MD-231 empregando o ensaio de *wound healing*. Os compostos, sintetizados no Laboratório de Química Orgânica Sintética do Prof. Luiz Carlos Dias da UNICAMP, e os correspondentes resultados da triagem *in vitro* são apresentados na Tabela 8. Dois exemplos são apresentados na Figura 15.

Figura 14 – Estrutura molecular do produto natural migrastatina, isolado de *Streptomyces platensis*.

É importante ressaltar que, em contraste com os compostos estudados anteriormente, que foram identificados através de triagem biológica baseada no ensaio de *wound healing*, essa classe de derivados foi planejada devido às propriedades anticâncer conhecidas da migrastatina e de alguns de seus análogos, especialmente na inibição da metástase em células cancerosas.

Tabela 8 - Resultados do teste de *wound healing* para uma série de compostos derivados da migrastatina na linhagem MDA-MB-231.

Código	Estrutura	Fechamento da Fenda
33		Negativo
34		Positivo
35		Negativo
36		Negativo
37		Positivo
38		Negativo
39		Negativo

40

Negativo

41

Negativo

42

Negativo

43

Negativo

44

Negativo

45

Negativo

46

Negativo

47

Negativo

48

Negativo

49

Negativo

50

Negativo

*Todos os compostos foram testados na concentração de 1 μ M.

Figura 15 - Condições das células MDA-MD-231 para os derivados da migrastatina **42** e **43**.

A avaliação semi-quantitativa dos compostos, de maneira similar a descrita anteriormente, levou a seleção final de dois derivados (**33** e **42**) para os testes de migração celular. Os compostos resultantes da avaliação *in vitro* no método de *wound healing* são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da triagem semi-quantitativa dos compostos selecionados para o teste de migração na linhagem MDA-MB-231.

Composto	Concentração (nM)	Inibição (%)
33	500	71
	250	67
	100	53
	10	30
42	500	62
	250	53
	100	42
	10	20

4.2.1.2 Linhagem DU-145

A Tabela 10 apresenta os resultados do teste de *wound healing* para os compostos da Tabela 5 na concentração única de 1 μ M. A Figura 16 mostra a condição das células neste experimento para o composto **27**.

Figura 16 - Condições das células DU-145 para o composto **27**.

Tabela 10 - Resultados do teste de *wound healing* com a linhagem DU-145.

Código	*Fechamento da Fenda	Código	*Fechamento da Fenda
1	Negativo	2	Negativo
3	Negativo	4	Negativo
5	Negativo	6	Negativo
7	Negativo	8	Negativo
9	Negativo	10	Positivo
11	Negativo	12	Positivo
13	Negativo	14	Positivo
15	Negativo	16	Positivo
17	Positivo	18	Negativo
19	Negativo	20	Negativo
21	Negativo	22	Negativo
23	Negativo	24	Positivo
25	Negativo	26	Negativo
27	**Tóxico	28	**Tóxico
29	Negativo	30	Negativo
31	Positivo	32	Positivo

*Todos os compostos foram testados na concentração de 1 μ M. **Morte celular.

Os compostos **27** e **28** na concentração de 1 μ M foram tóxicos para as células, então novos testes foram realizados diminuindo a concentração para 500 nM. Nessa concentração, os dois compostos não apresentaram toxidez elevada e não permitiram o fechamento da fenda, dando negativo neste teste. Os compostos **4**, **8** e **23** foram selecionados pelo resultado da análise semi-quantitativa para os testes de migração celular, de forma similar a descrita anteriormente.

Os derivados da migrastatina também foram testados frente às células DU-145, seguindo o mesmo procedimento usado anteriormente. A Tabela 11 apresenta os resultados no teste de *wound healing*.

Tabela 11 - Resultados do teste de *wound healing* com a linhagem DU-145 para os derivados da migrastatina.

Código	*Fechamento da Fenda	Código	*Fechamento da Fenda
33	Positivo	34	Positivo
35	Positivo	36	Positivo
37	Positivo	38	Positivo
39	Positivo	40	Positivo
41	Positivo	42	Negativo
43	Negativo	44	Negativo
45	Positivo	46	Positivo
47	Positivo	48	Positivo
49	Positivo	50	Negativo

*Todos os compostos foram testados na concentração de 1 μ M. **Morte celular.

Como pode ser observado na Tabela 11, os derivados da migrastatina não apresentaram bons resultados frente a linhagem DU-145 no teste do *wound healing*, mesmo os compostos **42**, **43**, **44** e **50** identificados como positivo, praticamente fecharam as suas fendas, apresentando baixo poder de inibição. Portanto, todos os compostos dessa classe foram descartados para ensaios futuros com essa linhagem.

4.2.2 Testes de Migração Celular

4.2.2.1 Linhagem MDA-MB-231

Os resultados dos testes de *wound healing* tornaram possível a seleção de compostos para realização dos ensaios de migração celular visando à determinação de valores de IC₅₀, parâmetro quantitativo de extremo valor no estabelecimento da potência desses candidatos a inibidores da migração celular. Para a determinação de valores de IC₅₀ foram

utilizados de 5 a 7 concentrações diferentes dos compostos respeitando o intervalo de inibição entre 15 e 85%. A Tabela 12 apresenta os resultados de IC₅₀ no teste de migração celular.

Tabela 12 - Avaliação da potência de inibidores da migração celular na linhagem MDA-MB-231.

Composto	IC ₅₀ (nM)
4	79 ± 11
7	7 ± 1
21	370 ± 35
26	230 ± 25
33	230 ± 23
42	> 500

Os resultados da Tabela 12 indicam que os compostos apresentam boa potência, com potencial de desenvolvimento, com exceção do composto **42** que possui um valor de IC₅₀ maior do que 500 nM. Esses dados sugerem que estes compostos podem ser candidatos a estudos futuros no estabelecimento de relações quantitativas entre a estrutura e atividade visando a otimização de suas propriedades.

4.2.2.2 Linhagem DU-145

Os resultados do teste de migração celular e determinação de valores de IC são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Avaliação da potência de inibidores da migração celular.

Composto	IC ₅₀ (nM)
8	115 ± 25
23	12 ± 2

Os compostos **8** e **23** apresentam boa inibição da migração celular e podem ser considerados bons candidatos para estudos futuros visando à otimização de suas propriedades.

5 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS

Todos os testes celulares desenvolvidos e conduzidos neste trabalho são robustos e capazes de identificar novos candidatos a inibidores da migração celular. Alguns inibidores com potência na faixa nanomolar foram identificados e devem ser alvos de estudos futuros visando sua otimização em química medicinal.

Os derivados da migrastatina possuem alta seletividade frente à linhagem de câncer de mama, não possuindo atividade frente às células de câncer de próstata. Por outro lado, os compostos da Tabela 5 apresentam atividade frente às duas linhagens estudadas.

Como perspectiva futura, daremos continuidade a este trabalho no projeto de doutorado, onde procuraremos dar ênfase a síntese e avaliação de um número maior de derivados dos compostos mais promissores identificados nessa dissertação de mestrado. Os ensaios de invasão celular, recentemente padronizados em nosso laboratório, serão extremamente importantes na avaliação de novos compostos candidatos a fármacos, já que esse ensaio determina o poder de invasão das células cancerígenas e a capacidade do candidato a inibidor em bloquear este processo de invasão.

REFERÊNCIAS

1. BOEHM, J. S. et al. Integrative genomic approaches identify IKBKE as a breast cancer oncogene. *Cell*, v.129, n.4, p. 1065-79, 2007.
2. GEYER, C. E. et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*, v.355, n.26, p. 2733-43, 2006.
3. FOLKMAN, J. What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent? *The Journal of the National Cancer Institut*, v.82, n.1, p.4-6, 1990.
4. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro:INCA, 2007. *Instituto Nacional de Câncer (INCA)*, 2007. p. 23-96. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/versaofinal.pdf>> . Acesso em: 08/10/2008.
5. PIERCE, J. P. et al. Influence of a diet very high in vegetables, fruit, and fiber and low in at on prognosis following treatment for breast cancer: the Women's Healthy Eating and Living (WHEL) randomized trial. *JAMA: Journal of the American Medical Association*, v. 298, n.3, p. 289-98, 2007.
6. MOSS, S. M. et al. Effect of mammographic screening from age 40 years on breast cancer mortality at 10 years follow-up: a randomized controlled trial. *Lancet*, v.368, n.9552, p. 2053-60, 2006.
7. HOSPITAL AMARAL CARVALHO CAMARGO. Introdução sobre o Câncer. Disponível em: < <http://www.hcanc.org.br/> >. Acesso em: 22/10/2007.
8. FARROW, D. C.; HUNT, W. C.; SAMET, J. M. Geographic variation in the treatment of localized breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, v.326, n.17, p.1097-1101, 1992.
9. BARDIA, A. et al. Recreational physical activity and risk of postmenopausal breast cancer based on hormone receptor status. *Archives of Internal Medicine*, v. 166, n.22, p. 2478-83, 2006.

10. BANDI, P. et al. Cancer facts e figures for Hispanics/Latinos is a periodic population of the American cancer society, *American Cancer Society*, p. 3-36, 2005.
11. STONE KR, et al. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *International Journal of Cancer*, v. 21, n.3, p. 274-281, 1978.
12. RUI, C. *Como cultivar células*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.
ICILIANO MJ, et al. Mutually exclusive genetic signatures of human breast tumor cell lines with a common chromosomal marker. *Cancer Research*, v.39, n.3, p.919-922, 1979.
13. LOHRISCH, C. et al. Impact on survival of time from definitive surgery to initiation of adjuvant chemotherapy for early-stage breast cancer, *Journal of Clinical Oncology*, v. 24, n.30, p.1-7, 2006.
14. LOMBARDINO, J. G.; et al. The role of the Medicinal Chemist in Drug Discovery – Then and Now. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, p. 853-862 , 2004.
15. DiMasi, J. A. et al. The Price of Innovation: New Estimates of Drug Development Cost. *Journal of Health Economics*, v. 22, p. 151-185, 2003.
16. UNITED STATES, Government Accountability Office. New Drug Development. Science, Business, Regulatory, and Intellectual Property Issue Cited as Hampering Drug Development Efforts. Disponível em:
< <http://www.gao.gov/new.items/d0749.pdf>> Acesso em: 22/10/2006.
17. DICKSON, M. et al. Key factors in the rising cost of new drug discovery and development. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 5, p. 417-429 , 2004.
18. BERNDT, E. R. et. al Industry Funding of FDA: Effects of PDUFA on Approval Times and Withdrawal rates. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 4, p. 545-554, 2005.
19. PFIZER. Princípios Básicos da Farmacoeconomia. Disponível em:
<<http://www.pfizer.com.br/pdf/farmacoeconomia.pdf>>. Acesso em: 22/10/2008.
20. GUIDO, R. V. C. ; OLIVA, G. ; ANDRICOPULO, A. D. . Virtual Screening and Its Integration wiith Modern Drug Design Technologies. *Current Medicinal Chemistry*, v. 15, p. 37-46, 2008.

21. ANDRICOPULO, A. D. et. al. Structure-Activity Relationships for the Design of Small-Molecule Inhibitors. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, v.5, p. 585-593, 2005.
22. KUBINIY, H. 3D QSAR in Drug Design: Theory, Methods and Applications v. 1. Kluwer Academic Publishers/Escom, Leiden, 1993.
23. RUSSO, E. Chemistry plans a structural overhaul. *Nature*, v. 419, p. 4-7, 2002.
24. WERMUTH, C. G. The Practice of Medicinal Chemistry. Academic Press, London, 2003
25. BUNIN, A. B. Increasing the Efficiency of Small Molecule Drug Discovery. *Drug Discovery Today*, v.18, p 823-826, 2003.
26. McGee, P. Clinical Trials on the Move. *Drug Discovery*, v. 9, p. 16-22, 2006.
27. FARDELONE, L. C.; BRANCHI, B. A. Mudanças recentes no mercado farmacêutico. *Revista da Fae*, v. 9, n.1, p. 139-152, 2006.
28. 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.
29. PONCE, M. L. In vitro Matrigel angiogenesis assays. In: MURRAY, J.C., ed. *Methods in Molecular Medicine*, v.46, p. 205–209, 2001. ISBN 978-0-89603-698-7.
30. ANDRICOPULO, A. D.et.al. Specific Inhibitors of Plasmodium falciparum Thioredoxin Reductase as Potential Antimalarial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 16, p. 2283-2292, 2006.
31. GAUL, C. et al. The Migrastatin Family:Discovery of Potent Cell Migration Inhibitors by Chemical Synthesis, *The Journal of the American Chemical Society*, v.126, n.36, p.11326-11337, 2004.
32. AMERICAN TYPE CULTURE COLLECTION. Disponível em:
<<http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDetails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=HTB-26&Template=cellBiology>> Acesso em 23/10/2008.

33. WANG, W. et al. Sulforaphane, erucin, and iberin up-regulate thioredoxin reductase 1 expression in human MCF-7 cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n.5, p.1417-1421, 2005.

34. SOKER, S.; et al. Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF₁₆₅ via its exon 7-encoded domain. *Journal Biology Chemistry*, v. 271, n.10, p. 5761-5767, 1996.