

FERNANDA RODRIGUES NASCIMENTO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMELANOMA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO DERIVADO SINTÉTICO 1,3-
difênil-2-benzil-1,3-propanodiona**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2018

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

N244s
2018
Nascimento, Fernanda Rodrigues, 1975-
Síntese, caracterização e avaliação da atividade
antimelanoma *in vitro* e *in vivo* do derivado sintético
1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona / Fernanda Rodrigues
Nascimento. – Viçosa, MG, 2018.
xvii, 131 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Texto em inglês e português.

Inclui anexos.

Orientador: Marisa Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Mamas - Câncer. 2. Melanoma - Tratamento.
3. Dibenzoilmetano - Derivados - Síntese. 4. Medicamentos -
Testes. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de
Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação
em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22. ed. 616.99449

FERNANDA RODRIGUES NASCIMENTO

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMELANOMA *IN VITRO E IN VIVO* DO DERIVADO SINTÉTICO 1,3-
difênil-2-benzil-1,3-propanodiona**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 28 novembro de 2018.

Andressa Antunes Prado França

Anésia Aparecida dos Santos

Marcos Rodrigo de Oliveira

Márcio dos Santos Rocha

Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

Ao meu Pai **Fernando** (*in memoriam*);
A minha mãe **Maria**, por estar sempre a meu lado;
E aos meus irmãos **Felix e Fabiano**

AGRADECIMENTOS

A **Universidade Federal de Viçosa (UFV)** por intermédio do **Departamento de Bioquímica**, pela oportunidade de realização deste curso;

Ao programa de **Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada**, pela oportunidade de cursar o doutorado;

Ao **Sistema Único de Saúde (SUS) processo 03497-13**, por acreditar no projeto e financiar essa pesquisa, **FAPEMIG (processo 00622-14)**, **CNPq (processo 443566/2014-3)** e **CAPES (processo 001)**.

A minha orientadora **Professora Doutora Marisa Alves Nogueira Diaz**, pela sua dedicação à Universidade e ao departamento de Bioquímica. Obrigada por compartilhar seu conhecimento e sabedoria.

Aos meus coorientadores **Professores Doutores Anésia dos Santos, Márcio dos Santos Rocha, Gaspar Diaz Muñoz**, de fundamental importância na construção do conhecimento.

Em especial aos professores **Márcio dos Santos Rocha e Anésia Santos**, por disponibilizarem os respectivos laboratórios: Laboratório de Física Biológica e Laboratório de Cultura de células e tecidos do departamento de Física da UFV, para a realização dos experimentos de pinça óptica e cultivo celular.

Ao professor Doutor Tiago António de Oliveira Mendes, pela ajuda e orientação fundamentais na realização dos experimentos com biologia molecular.

Ao professor Doutor Cláudio Lisias Mafra de Siqueira pela disponibilização do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Agentes Infecciosos e Parasitários para realização dos experimentos com biologia molecular.

A professora **Virgínia Ramos Pizziolo** pela disponibilização do biotério do laboratório Biofarmacos

Aos membros da banca examinadora: **Professoras Anésia dos Santos, Andressa França, Professores Márcio dos Santos Rocha e Marcos Rodrigo**

de Oliveira, pela disponibilidade e sugestões que contribuíram muito para o trabalho.

Ao **Jefferson Dias**, técnico do Laboratório Biofármacos por toda ajuda e dedicação durante o experimento com os animais.

Ao **Eduardo Monteiro**, secretário da pós graduação pela ajuda e dedicação em todos os momentos desta caminhada.

Aos colegas **Idelvânia e Leandro** pela ajuda imprescindível no experimento com os animais.

Um agradecimento especial aos colegas de laboratório **Jefferson Viktor Baeta e Marcos Rodrigo de Oliveira** pela ajuda preciosa em todos os momentos desta pesquisa. Sem vocês eu não faria nada

A todos os colegas do laboratório Bionat, **Kamylla, Gislaine, Leandro, Fabio, Júlia e Pollyana**. Nossa equipe é excelente!

CAPÍTULO 4

Avaliação da atividade antimelanoma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e elucidação do mecanismo de ação	64
Introdução.....	65
Material e Métodos.....	71
Resultados e discussão.....	94
Conclusão.....	120
Referências.....	121
Considerações finais.....	127
Anexos.....	128

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Terapêutica do melanoma	8
Tabela 1. Análise tamanho/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017.....	12
Tabela 2. Análise dos linfonodos/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017.....	13
Tabela 3. Análise de Metástase/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017.....	15
Tabela 4. Estadiamento clínico/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017.....	16
Tabela 5. Estadiamento Patológico/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017.....	16

CAPÍTULO 3

New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: cytotoxic effect and direct interaction with DNA	45
Table 1. IC ₅₀ values and selectivity indices (SI) of dacarbazine, DBM, and DPBP.....	55

CAPÍTULO 4

Avaliação da atividade antimelanoma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e elucidação do mecanismo de ação	64
Tabela 1. Mutações comuns e seu papel durante a progressão do melanoma.....	68
Tabela 2. Aplicação da regra de Lipinski para o composto DPBP....	78
Tabela 3. Testes <i>in vitro</i> nas linhagens Melan-A e B16F10.....	83
Tabela 4. Atividade antioxidante nos tumores de camundongo C57BL tratados com o composto DPBP.....	114
Tabela 5. Patologia Linfonodos Sentinelas.....	116

LISTA DE FIGURAS

Introdução Geral	1
Figura 1. Dacarbazina medicamento de escolha para tratamento do melanoma pelo SUS.....	3
Figura 2. Vemurafenib, medicamento lançado em 2011.....	4
Figura 3. Cobimetinib, medicamento lançado em 2016.....	5
CAPÍTULO 1	
Terapêutica do melanoma	8
Figura 1. Critérios ABCDE usados no exame físico.....	10
CAPÍTULO 2	
Síntese e caracterização do composto DPBP	26
Figura 1. 8- $[\alpha, \alpha$ -dimetilalil]-pongamol.....	29
Figura 2. 1,3-difenilpropano-1,3-diona (dibenzoilmetano).....	29
Figura 3. Cromatografia de camada delgada (CCD) da síntese do derivado de dibenzoilmetano P : dibenzoilmetano (DBM); \emptyset : composto alquilado (DPBP).....	33
Figura 4. Cromatograma do composto (DPBP) 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona. Coluna C18 semi-preparativa, fluxo 2 mL, detector UV 254 nm.....	33
Figura 5 A. Perfil do plasma contendo (DPBP) concentração 1,0 mg/g.....	34
Figura 5 B. Perfil do plasma controle.....	34
Figura 6. Estrutura do composto sintetizado 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP).....	35
Figura 7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3).....	36
Figura 8. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) expansão.....	37
Figura 9. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CDCl_3) expansão.....	38
Figura 10. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3).....	39
Figura 11. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) expansão.....	40
Figura 12. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3).....	41
Figura 13. Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) expansão.....	42

CAPÍTULO 3

New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: cytotoxic effect and direct interaction with DNA	45
Figure 1. Chemical structure of dacarbazine, a drug used for the treatment of melanoma.....	48
Figure 2. Chemical structure of dibenzoylmethane (DBM).....	49
Figure 3. Chemical structure of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3 propane-dione (DPBP).....	50
Figure 4. Plots of the percentage of cell death induced by DPBP at different concentrations on B16F10 and melan-A cells. Results are the mean \pm standard deviation of three independent experiments.....	55
Figure 5. Persistence length (A) as a function of DPBP concentration in solution (C_T) (black dots). The red solid line is the fit to the model (discussed in Section 2.8).....	56
Figure 6. Contour length (L) of the same DPBP–DNA complexes as a function of DPBP concentration (C_T).....	57

CAPÍTULO 4

Avaliação da atividade antimelanoma <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> e elucidação do mecanismo de ação	64
Figura 1. IC ₅₀ do composto DPBP.....	96
Figura 2. Indução da apoptose pelo composto em células B16F10. (A) controle sem composto; (B) células tratadas com composto IC ₉₀	97
Figura 3. Visão geral das vias de apoptose.....	99
Figura 4. PCR em tempo real gene para proteína p21.....	100
Figura 5. PCR em tempo real. (A) Apaf; (B) Bax; (C) CDK 1; (D) FasL; (E) TNF; (F) Sirt 1.....	104
Figura 6. Provável mecanismo de ação do composto DPBP.....	105
Figura 7. Detalhe da tricotomia na região dorsal, onde foram injetadas as células para indução do melanoma tumor marcado com a seta vermelha.....	106
Figura 8. Efeito do tratamento com o composto no veículo gel transdermico (GT) e pomada (P) sobre o índice tumoral, nos diferentes grupos experimentais.....	107

Figura 9. Quantificação de VEGF a partir das amostras de soro coletadas dos camundongos tratados e não tratados (pg/mL) nos tratamentos utilizando com veículo gel transdermico (GT) e pomada (P).....	108
Figura 10. Resultados parâmetros sanguíneos, dosagem das transaminases em todos os tratamentos: AST (TGO); ALT (TGP).....	110
Figura 11. Análise sanguínea da creatinina em todos os tratamentos.....	111
Figura 12. Análise sanguínea do ácido úrico gel transdérnico (GT) e pomada (P).....	112
Figura 13. Histologia do Rim, fígado e linfonodos sentinela.....	117

LISTA DE ESQUEMA

CAPÍTULO 3

New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: cytotoxic effect and direct interaction with DNA	45
Scheme 1. Synthesis of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP).....	54

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALT	Alanina Aminotransferase
ARID	Domínio da interação rico em AT
APAF1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
AST	Aspartato Aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
AUS	Ácido úrico sérico
BAX	BCL2-associated X protein
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
CAT	Catalase
CCC	Cromatografia em coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada.
CCP	Cromatografia em camada preparativa.
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4
CDKN2A	Cyclin-dependent kinase 2A
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DBM	1,3-Difenilpropano-1,3-diona
DBPB	1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona
DMSO	Dimetilsulfóxido
ER	Retículo endoplasmático
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
ESI	Electrospray Ionisation
FASL	Fas Ligand
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GST	Glutathione S-transferase
IC50	Concentração inibitória de 50%
IC90	Concentração inibitória de 90%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IS	Índice de seletividade
LP	Linfonodo sentinela
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

MEK	Mitogen-activated protein kinase
MDA	Malondialdeído
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazo-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)
NCE	Nova entidade química
NRAS	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
ODC	Ornitina descarboxilase
OMS	Organização Mundial da Saúde
p21	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1A
PBS	Tampão fosfato salino
PDL1	Programmed death-ligand 1
PDL2	Programmed death-ligand 2
PI3K	Fosfatidilinosítido 3-quinase
PKCA	Protein kinase C alpha
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
QR	Quinona redutase
RAF	Quinase específica para Ser/Thr
RAS	Rat sarcoma viral oncogene
RTQ	Receptor tirosina quinase
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFN	Sulforaphane
SBOC	Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica
SIRT-1	Sirtuin 1
SOD	Superóxido dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TERT	Transcriptase reversa da telomerase
TMS	Tetrametilsilano
TNF	Fator de necrose tumoral
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

RESUMO

NASCIMENTO, Fernanda Rodrigues Nascimento, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, novembro de 2018. **Síntese, caracterização e avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* do derivado sintético 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona.** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Gaspar Diaz Muñoz, Anésia Aparecida dos Santos, Márcio dos Santos Rocha e Sérgio Luis Pinto Da Matta.

O Câncer de pele apresenta-se em dois tipos: O não-melanoma e o melanoma. O primeiro apresenta baixa letalidade e alto índice de cura devido a detecção precoce. Já o segundo tipo, melanoma, apresenta alta mortalidade devido a sua facilidade de metástase. O tratamento do melanoma no Brasil pelo Sistema único de Saúde (SUS) possui como medicamento de escolha a Dacarbazina. É um fármaco pouco específico, podendo atuar em qualquer etapa do ciclo celular e apresenta resposta em apenas 20% dos casos por apenas 5 meses. Além disso a resposta terapêutica completa ocorre apenas em 5% dos casos. Os demais fármacos mais modernos e específicos existentes no mercado são muito caros para serem incorporados pelo SUS e o ganho de sobrevida do paciente não é tão significativo. A busca por novas drogas que sejam mais eficazes e com custo baixo se faz necessário. O dibenzoilmetano (DBM) (1,3-Difenilpropano-1,3-propanodiona) e seus derivados são substâncias que apresentam propriedades antineoplásicas promissoras. O derivado 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP) foi sintetizado, purificado por HPLC e caracterizado por RMN H^1 e RMN C^{13} . Os estudos *in vitro* foram realizados em células das linhagens cancerígena B16F10 e normal melan-A. O IC_{50} do DPBP para B16F10 encontrado foi de 1,97 μM e o índice de seletividade (IS) encontrado foi de 41,94. O tipo de morte celular foi determinado por citometria de fluxo. O tratamento em células B16F10 por 16 horas com o composto DPBP na concentração 63,62 μM induziu a morte celular predominante por apoptose em 84,5% do total de células. A forma como o DPBP desencadeia a apoptose foi avaliada por RTq-PCR e revelou uma inibição de gene P21 e um estímulo dos genes CDK- 1, Aparf-1, Bax, Fas L, TNF- α e SIRT-1, indicando que as vias intrínsecas e extrínsecas são acionadas pelo composto. Além disso um experimento em pinça óptica foi realizado para avaliar a interação do composto com o DNA. Verificou-se que o composto DPBP interage com DNA podendo

levar dano ao mesmo e contribuindo para o acionamento da apoptose intrínseca. Os experimentos *in vivo* foram realizados em camundongos C57BL para avaliar a eficácia do DPBP em tumores induzidos. Foram utilizados dois veículos de uso tópico, pomada (P) e gel transdérmico (GT) contendo as seguintes concentrações de DPBP: 0,5 mg/g; 1,0 mg/g e 2,0 mg/g. As concentrações 1,0 mg/g e 2,0 mg/g apresentaram maior potencial em reduzir o volume tumoral. O GT nas concentrações de 0,5 e 1,0 mg/g apresentaram melhores resultados na redução do VEGF em relação ao veículo pomada. Dos órgãos submetidos a análise histológica somente dos linfonodos sentinela (LS) apresentaram alteração com invasão da cápsula no controle com tumor não tratado. O veículo pomada apresentou capacidade em reduzir a invasão da cápsula do linfonodo, portanto reduzindo a metástase. Os parâmetros bioquímicos analisados no sangue dos animais não apresentaram alterações, exceto as dosagens de ácido úrico que apresentaram redução em todos os tratamentos. O composto estudado DPBP apresentou-se promissor como droga para combater o melanoma de forma eficiente, pois possui um mecanismo multifatorial que envolve alta seletividade por células de melanoma; indicativo de redução da angiogênese, além disso não apresenta toxicidade hepática e renal

ABSTRACT

NASCIMENTO, Fernanda Rodrigues Nascimento, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, november, 2018. **Synthesis, characterization and evaluation of the in vitro and in vivo antimelanoma activity of the synthetic 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione derivative.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisors: Gaspar Diaz Muñoz, Anésia Aparecida dos Santos, Márcio dos Santos Rocha and Sérgio Luis Pinto Da Matta.

Skin cancer has two types: non-melanoma and melanoma. The first one presents low lethality and high cure rates due to early detection. The second type, melanoma, presents high mortality due to its ease of metastasis. The treatment of melanoma in Brazil by the Public Health System has as its drug of choice Dacarbazine. It is a low effective drug, able to act at any stage of the cell cycle and responds in only 20% of cases for only 5 months. In addition, the complete therapeutic response occurs in only 5% of cases. The other more modern and specific drugs available in the market are very expensive to be incorporated by the Public Health System and the survival changes of the patient is not so significant. The search for a new drug that are more effective and with low cost becomes it's necessary. Dibenzoylmethane (DBM) (1,3-Diphenylpropane-1,3-propanedione) and its derivatives are substances with promising antineoplastic properties. The 1,3-Diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione derivative (DPBP) was synthesised, purified by HPLC and characterised by ^1H NMR and ^{13}C NMR. In vitro studies were performed on cells of the carcinogenic B16F10 and normal melan-A lines. The IC₅₀ of the DPBP for B16F10 found was 1.97 μM and the selectivity index (IS) found was 41.94. The type of cell death was determined by flow cytometry. Treatment in B16F10 cells for 16 hours with compound DPBP at 63.62 μM concentration induced predominant cell death by apoptosis in 84.5% of the total cells. The way DPBP triggered apoptosis was assessed by RTq-PCR and revealed a P21 gene inhibition and a stimulation of the CDK-1, Aparf-1, Bax, Fas L, TNF- α and SIRT-1 genes, indicating that the Intrinsic and extrinsic pathways are driven by the compound. In addition, an experiment in optic nippers was performed to evaluate the interaction of the compound with DNA. It has been found that the DPBP compound interacts with DNA and can lead to damage and contribute to the activation of intrinsic apoptosis. In vivo experiments were performed on C57BL

mice to evaluate the efficacy of DPBP in induced tumours. Two topical, ointment (P) and transdermal gel (GT) vehicles containing the following concentrations of DPBP were used: 0.5 mg / g; 1.0 mg / g and 2.0 mg / g. Concentrations 1.0 mg / g and 2.0 mg / g showed greater potential in reducing tumours size. The TG at concentrations of 0.5 and 1.0 mg / g showed better results in the reduction of VEGF relative to the ointment vehicle. From the organs submitted to histological analysis only the sentinel lymph nodes (LS) presented alteration with invasion of the capsule in compararison with untreated tumor. The ointment was able to reduce invasion of the lymph node capsule, thereby reducing metastasis. The biochemical parameters analysed in the animals' blood did not present alterations, except for the uric acid dosages that showed reduction in all the treatments. The studied compound DPBP was promising as a drug to combat melanoma efficiently, as it has a multi factor mechanism that involves high selectivity by melanoma cells; indicative of reduction of angiogenesis, in addition it does not present hepatic and renal toxicity

INTRODUÇÃO GERAL

Câncer é o crescimento desordenado de células que apresentam os mecanismos naturais de apoptose interrompidos e os de proliferação celular estimulados. As modificações genéticas acumuladas são as grandes responsáveis pelo aparecimento das células alteradas que são capazes de modificar o microambiente tecidual, promovendo, por exemplo, angiogênese e formação de enzimas proteolíticas que beneficiam a multiplicação celular ininterrupta. O crescimento é rápido e incontrolável levando a produção de massas sólidas denominadas tumores. Em geral, são agressivos e podem invadir outros órgãos e tecidos e competindo por nutrientes diretamente com as células normais. (CID et al 2012; COTRAN et al., 2004; CHAMMAS et al 2003)

O câncer é um problema de saúde mundial. Em 2017 a Organização mundial de saúde (OMS – World Health Organization – WHO) divulgou novos dados apontando que a cada ano 8,8 milhões de pessoas morrem por câncer no mundo. Mais de 60% destas mortes ocorrem em países em desenvolvimento devido ao serviço precário de diagnóstico e tratamento e a falta de acessibilidade a estes serviços por toda a população.

No Brasil a estimativa do total de novos casos para o biênio 2016-2017 foi de 596.070. Para o biênio 2018-2019 teremos em torno de 2.920 casos novos em homens e 3.340 casos novos em mulheres. As maiores taxas estimadas em homens e mulheres encontram-se na Região Sudeste. Em Minas Gerais estima-se para o biênio 2018-2019 cerca de 190 novos casos para homens e 320 novos casos para mulheres. (BRASIL, 2016).

O câncer de pele apresenta-se em dois tipos: o não-melanoma e o melanoma. O câncer de pele não melanoma representa 30% dos tumores registrados no Brasil. Classifica-se em carcinoma basocelular e carcinoma epidermóide ou espinocelular. Sua mortalidade é baixa, pois apresentam grande percentual de cura devido à detecção precocemente. O câncer de pele tipo melanoma representa apenas 3% das neoplasias da pele e 4% do total de tumores, no entanto sua letalidade é alta devido à facilidade de metástase. (BRASIL, 2016).

O melanoma origina-se a partir dos melanócitos, células responsáveis pela produção de melanina para os queratinócitos vizinhos dando pigmentação

à pele. Apresenta-se em forma de nevo, popularmente conhecido como “pinta” e para o diagnóstico são observados os seguintes parâmetros: presença de assimetria, bordas irregulares, variação de cor em uma mesma lesão, lesões com diâmetro maior que 6 milímetros e a evolução da lesão em curto espaço de tempo observando tamanho, cor, formato relevo. (KUMAR et al., 2015).

O desenvolvimento desta neoplasia ocorre em duas etapas: a primeira apresenta crescimento radial atingindo epiderme e derme superficial. A segunda etapa apresenta um crescimento vertical atingindo camadas mais profundas da derme. A mudança da fase de crescimento radial para a fase de crescimento vertical é o evento principal para a progressão da neoplasia pois ocorre a perda de controle do crescimento dos melanócitos. (KUMAR et al., 2015).

As principais causas do melanoma são a exposição excessiva ao sol e a predisposição genética. Os dois tipos mais comuns de melanoma estão associados à exposição ao sol, afetam peles que são cronicamente expostas ao sol e as que não são. A primeira atinge principalmente cabeça, pescoço e dorso dos membros inferiores. Afeta indivíduos acima dos 55 anos e apresentam uma alta quantidade de mutações genéticas, neurofibromin 1 (NF1), NRAS, BRAF^{V600E}, KIT. Os melanomas em peles pouco expostas ao sol surgem no tronco e regiões adjacentes, afetam indivíduos com menos de 55 anos e apresenta baixo número de mutações genéticas. Nestes casos a mutação BRAF^{V600E} predomina. As mutações mais comuns em melanomas de peles cronicamente expostas ao sol e de peles pouco expostas ao sol afetam vias de sinalização que comandam a proliferação celular (BRAF, NRAS e NF1); o crescimento e metabolismo (PTEN e KIT), identidade celular (AT- interação rica do domínio 2 ARID 2), resistência à apoptose (TP53), controle do ciclo celular (Inibidor A2 ciclinoquinase dependente (CDKN2A), tempo de vida replicativo (Trascriptase reversa da telomerase-TERT) (SHAIN & BASTIAN, 2016).

A doença em estágios iniciais é tratada com a remoção cirúrgica do tumor aliada à retirada dos linfonodos sentinelas. Estes procedimentos eliminam todas as células cancerígenas antes que alcancem a corrente sanguínea e sistema linfático causando metástases. (INADA, 2015) Porém, em estágios mais avançados o tratamento consiste em medicamentos com baixa efetividade e elevado custo em países em desenvolvimento. Além disso, quanto mais

avançado o estágio da doença menores são as chances de sobrevivência dos pacientes mesmo com o tratamento. (OMS, 2017)

Os estudos pré-clínicos *in vitro* para a descoberta de novas drogas são em sua maioria realizados em linhagem de B16 oriundas do melanoma murino. Suas características histológicas parecidas com os melanomas humanos e sua genética bem estudada facilita o estudo de drogas com perfil específico para o combate a tumores cutâneos. (SILVA et al 2013). As diferentes linhagens de B16 foram selecionadas por Fidler, (1973) de acordo com as características de capacidade metastática e resistência às células do sistema imune. A linhagem F10 é a que apresenta melhores aptidões de resistência aos ataques do sistema imune e sendo capaz de causar metástase a partir de injeção subcutânea ou intravenosa em camundongos murinos. (FIDLER, 1973).

A Dacarbazina (Figura 1) é o medicamento de escolha no Sistema Único de Saúde do Brasil (SUS) para o tratamento do melanoma citado no protocolo atualmente vigente, devido, principalmente a seu baixo custo. (PORTARIA 357, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Este é um agente alquilante que se liga ao DNA impedindo a separação das fitas, causando problemas na síntese proteica e de DNA. Entretanto, é um agente pouco específico, pois pode atuar em qualquer fase do ciclo celular e apresenta resposta terapêutica em 20% dos casos por um período de aproximadamente 5 meses e a resposta completa em apenas 5% dos casos (SERRONE et al 2000; LUI et al., 2007).

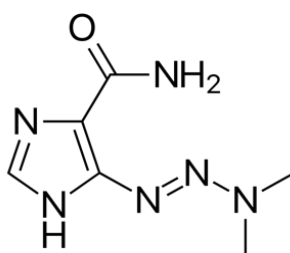


Figura 1 Dacarbazina medicamento de escolha para tratamento do melanoma pelo SUS

Food and Drug Administration (FDA) aprovou, em 2011 a utilização de um novo medicamento para o tratamento do melanoma chamado Vemurafenib (Figura 2). Esta droga atua na proteína BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) modificada da via MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) em pacientes que apresentam mutação no gene que codifica BRAF. Em 90% dos casos a mutação promove a substituição do ácido glutâmico por valina no aminoácido 600 (V600E). Esta mutação ocorre em 50% dos casos de melanoma avançado. Pacientes tratados com o Vemurafenib apresentaram resposta clínica em 70% dos casos, com redução do tumor. No entanto a reincidência do tumor na maioria dos casos, baixando a taxa de sobrevivência livre do tumor após o tratamento para 6 a 7 meses. O desenvolvimento de resistência acontece com frequência no tratamento com este medicamento, pois no momento em que a proteína BRAF diminui sua ação outras proteínas que fazem parte da mesma via aumentam sua atividade para compensar a atividade suprimida de BRAF pelo medicamento. (POSSIK, 2012)

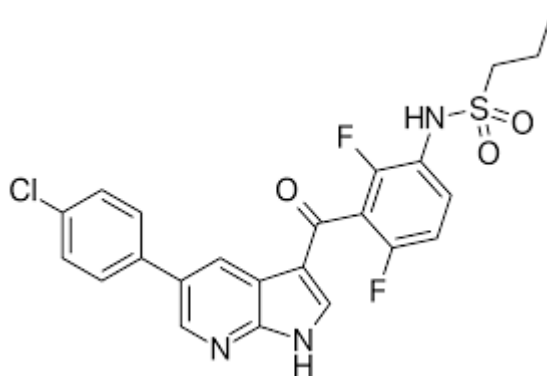


Figura 2 Vemurafenib, medicamento lançado em 2011.

Em 2016 outro medicamento foi aprovado pelo ANVISA para o tratamento do melanoma metastático. Trata-se do Cobimetinib (Figura 3), um inibidor de proteínas MEK (Mitogen-activated protein Kinase) indicado para ser usado em combinação com o Vemurafenib em pacientes com melanoma metastático ou em casos que a cirurgia é contraindicada. Larkin e colaboradores (2014) realizaram um estudo com 495 pacientes com melanoma avançado e sem condições de retirada cirúrgica ou metastático com mutação BRAF V600. Os indivíduos foram divididos em dois grupos: no primeiro receberam a combinação de Vemurafenib e Cobimetinib e no segundo Vemurafenib e um

placebo. A taxa de sobrevida livre de progressão no primeiro grupo foi de 9,9 meses em comparação com o segundo grupo. A resposta completa ao tratamento foi alcançada em 10% dos pacientes do grupo utilizando a combinação, enquanto no grupo controle foram apenas 4%. No entanto, a combinação de drogas aumentou os efeitos adversos. Os custos com estes novos tratamentos são muito elevados, estima-se que o tratamento para 28 dias com o Vemurafenib combinado com o Cobimetinib custe em torno de R\$ **54.000,00** e não estão disponíveis para pacientes que fazem uso do Sistema Único de Saúde (**SUS**).

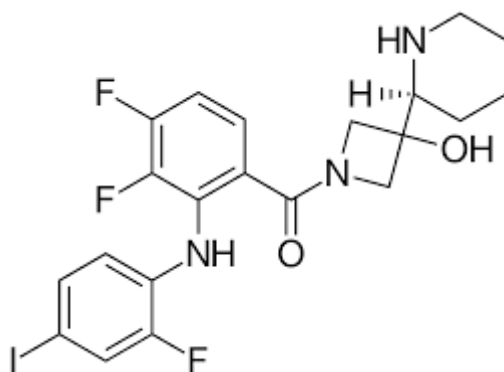


Figura 3 Cobimetinib, medicamento lançado em 2016.

As pesquisas por novas terapias antineoplásicas são constantes, principalmente para o melanoma, onde, a pesquisa de novos medicamentos mais específicos e que dificultem o aparecimento de resistência se faz necessário. Sendo assim o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antineoplásica de um derivado de dibenzoilmetado, frente a linhagem neoplásica de melanoma (B16F10) *in vitro* e *in vivo*, bem como propor mecanismos de ação para para a atividade observada.

REFERÊNCIAS

BRASIL, M. S. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil [Internet]. 2015 [cited 2016 Jan 20]; 11: 122p. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>. Acesso em 07/01/2018

CHAMMAS, Roger et al. Imunologia clínica das neoplasias. **Imunologia Clínica na Prática Médica**, p. 447-460, 2003.

CHEN, Xinhua et al. Histopathology of normal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment. **Melanoma research**, v. 19, n. 6, p. 361, 2009.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Neoplasia. In: Robbins- Pathologic Basis of Disease Philadelphia, W.B. **Saunders Company**, 2004.

DAVIES, Helen et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949, 2002.

JACKSON, Kimberly M. et al. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. **Cancer letters**, v. 178, n. 2, p. 161-165, 2002.

KHOR, Tin Oo et al. Dietary feeding of dibenzoylmethane inhibits prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of the mouse prostate model. **Cancer research**, v. 69, n. 17, p. 7096-7102, 2009.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abbas; ASTER, Jon C. **Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças**. Elsevier Brasil, 2015.

LARKIN, James et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1867-1876, 2014.

LIN, Chuan-Chuan et al. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation, formation of DMBA–DNA adducts in mammary glands, and mammary tumorigenesis in Sencar mice. **Cancer letters**, v. 168, n. 2, p. 125-132, 2001.

NAKANO, KENSUKE et al. Induction of apoptosis by β -diketones in human tumor cells. **Anticancer research**, v. 24, n. 2B, p. 711-718, 2004.

NOGUEIRA, Marisa A. et al. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco**, v. 58, n. 11, p. 1163-1169, 2003.

POSSIK, Patrícia. Inibidores de BRAF na era da terapia-alvo. **Boletim informativo do GBM** – ano XII – nº 56 – janeiro, fevereiro e março, 2012.

SERRONE, L. et al. Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview. **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 19, n. 1, p. 21-34, 2000.

SHAIN, A. Hunter; BASTIAN, Boris C. From melanocytes to melanomas. **nature reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345, 2016.

SILVA, Bárbara V. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Quim. Nova**, v. 32, n. 2, p. 453-462, 2009.

TERAPÊUTICA DO MELANOMA

1.INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de câncer de pele que representa 4% do total de neoplasias no Brasil. Possui alta letalidade devido a sua capacidade de metástase e origina-se a partir de melanócitos que apresentam seus mecanismos de morte celular programada inibidos e os mecanismos de proliferação celular ativados. (CID et al 2012; COTRAN et al., 2004; CHAMMAS et al 2003)

A exposição excessiva ao sol e a pré-disposição genética são as causas mais comuns de mutações genéticas em melanócitos. Sabe-se que a via mais afetada por estas mutações é a MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Em células normais estímulos externos, como fatores de crescimento, se ligam a receptores Tirosina-Quinase (RTQ) que ativam subsequentemente as vias MAPK e PI3 Quinase (PI3K). No meio intracelular o estímulo ativa proteínas das famílias RAS (rat sarcoma viral oncogene) e RAF (quinase específica para Ser/Thr). (SILVA et al, 2009). A ativação da via MAPK acontece pela dimerização na membrana celular das proteínas da família RAF promovida pelas proteínas RAS. Posteriormente uma cascata de sinalização é promovida pela fosforilação de MEK1, MEK2 e ERK, levando estímulos ao núcleo para o gerenciamento da promoção de proliferação e diferenciação celular. (DAVIES, H. et al 2002). Mutações em proteínas da via MAPK encontradas em células de melanoma provocam a ativação constitutiva da via, proporcionando uma independência dos estímulos externos para sua estimulação. Entretanto, a sobrevivência destas células mutantes está ligada a este tipo de ativação, sendo as proteínas mutantes desta via consideradas alvos terapêuticos (POSSIK, 2012).

O melanoma inicia-se como nevo, aparenta-se como uma “pinta” na pele ou uma lesão pigmentada. A suspeita clínica ocorre pela observação a olho nu de algumas características clássicas chamadas de critérios **ABCDE**. A assimetria (**A**); presença de bordas irregulares e mal definidas (**B**); coloração mista (**C**); diâmetro superior a 5 mm (**D**); evolução, quando ocorre sangramentos ou aumento no tamanho (**E**).

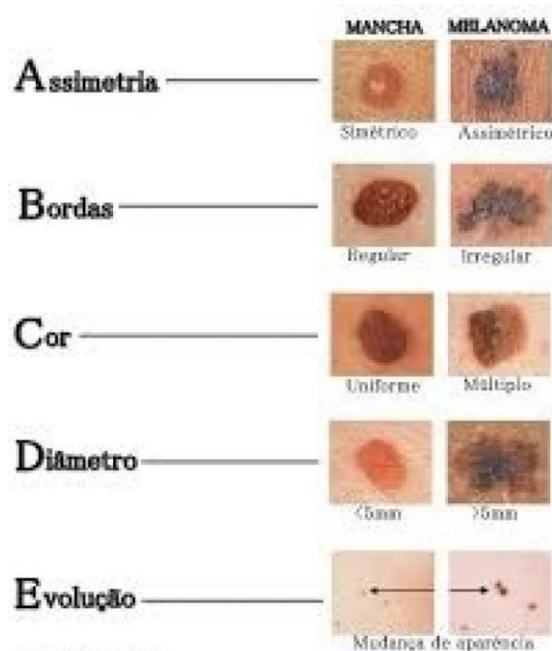


Figura 1. Critérios ABCDE usados no exame físico

Fonte: <http://hojesaopaulo.com.br/imagem/0/10025/artigo-71-alerta-sobre-melanoma-maligno-e-cuidados-com-a-pele.jpg>

A dermatoscopia é usada juntamente com o exame físico e é capaz de medir a distribuição de melanina nos tecidos permitindo a diferenciação de outros tipos de lesão, como o carcinoma basocelular pigmentado e a ceratose seborreica. As características dematoscópicas sugestivas de melanoma são: pigmentação assimétrica, presença de pseudópodes (estrias irregulares ao redor da lesão), véu cinza azulado (área de regressão tumoral) e vascularização atípica. (PORTARIA 357, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

A próxima etapa para a confirmação do diagnóstico de melanoma ocorre com a remoção cirúrgica da lesão com margens de 1 a 2 mm de pele normal e o encaminhamento para o exame histopatológico. A biópsia incisional só deve ser realizada em casos que não permitam a remoção total da lesão. O laudo histopatológico faz a confirmação do diagnóstico e determina o estágio de desenvolvimento. O estadiamento da progressão da neoplasia é decisivo para o prognóstico e tomada de decisão terapêutica. (PORTARIA 357, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O estadiamento segue as regras propostas pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) avaliando três parâmetros principais: (T) tamanho, levando em consideração a profundidade na derme, definido de pT1

a pT4; **(N)** comprometimento de linfonodos regionais, N0-N3 e **(M)** se existe metástase em outros órgãos do corpo, sendo M0 ausência de metástase e M1 presença. Estes critérios definem o estadiamento clínico (cTNM) que considera biópsia da lesão primária e análise clínica ou histopatológica dos linfonodos regionais. O estadiamento clínico patológico é mais detalhado e utiliza as informações obtidas na biópsia da lesão primária (após ressecção e ampliação das bordas da lesão) e microestadiamento, juntamente com a avaliação dos linfonodos regionais (após biópsia dos linfonodos sentinela e/ou linfadenectomia total).

O conhecimento sobre a biologia do melanoma apresentou muitos avanços, especialmente com o surgimento de novas técnicas de análise. A 8ª edição do AJCC, publicada em 2017 propõe melhorias no estadiamento do melanoma, com a criação de novas subcategorias e assim melhorar as decisões terapêuticas a serem tomadas. As tabelas abaixo trazem o estadiamento de acordo com a nova recomendação da 8ª edição da AJCC.

Tabela 1: Análise tamanho/ Estadimento 8ª Edição AJCC-2017

T : Tamanho/profundidade na derme		
pTx	Espessura Tumoral não avaliável	
pT0	Sem evidência de tumor primário	
pTis	Melanoma in situ	
pT1	< 1,0 mm de espessura	pT1a < 0,8 mm sem ulceração
		pT1b 0,8 – 1,0 mm com ou sem ulceração
pT2	> 1,0 -2,0 mm de espessura	pT2a < 1,0 a 2,0 mm sem ulceração
		pT2b > 1,0 – 2,0 mm com ulceração
pT3	> 2,0 – 4,0 mm de espessura	pT3a > 2,0 – 4,0 mm sem ulceração
		pT3b > 2,0 – 4,0 com ulceração
pT4	> 4,0 mm de espessura	pT4a > 4,0 mm sem ulceração
		pT4b > 4,0 mm com ulceração

Fonte: Adaptado GOMES et al, 2017

Tabela 2: Análise dos linfonodos/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017

N: Análise dos linfonodos		
Nx	Linfonodos regionais não avaliados	
N0	Sem evidências de metástases linfonodal	
N1	N1a 1 linfonodo envolvido e ausência de sateitose, metástase em trânsito ou microssatelitose sem envolvimento linfodonal	
	N1b 1 linfonodo envolvido e ausência de salelitose metástase em trânsito ou microssatelitose,	
	N1c Presença de saltelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose sem envolvimento linfonodal	
N2	2 ou 3 linfonodos envolvidos ou 1 linfonodo envolvido em associação satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose	N2a 2 ou 3 linfonodos envolvidos (sentinelas) e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose
		N2b 2 ou 3 linfonodos envolvidos e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou micro ssatelitose.
		N2c 1 linfonodo envolvido (sentinela ou não) em associação a satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose

N3	4 ou mais linfonodos envolvidos ou 2-3 linfonodos envolvidos em associação a satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose	N3a 4 ou mais linfonodos envolvidos (sentinela) e ausência de satelitose, metástase em trânsito ou microssatelitose
		N3b 4 ou mais linfonodos envolvidos ou linfonodos coalescentes e ausência de satelitose em trânsito ou microssatelitose
		N3c Ao menos 2 ou 3 linfonodos envolvidos (ou coalescentes) em associação a saletlitose, metástase em trânsito ou microssatelitose

Fonte: Adaptado GOMES et al, 2017

Legenda:

Satelitose: presença de disseminação até 2 cm do tumor primário / Metástase em trânsito – metástases clinicamente evidente, cutâneas e/ou subcutâneas, a partir de 2,0cm do tumor primário, em direção ou não à primeira cadeia de drenagem linfática. Microssatelitose: metástases microscópicas, cutâneas e/ou subcutâneas, encontradas ao exame anatomopatológico, descontínuas do foco do tumor primário, não podendo haver fibrose ou inflamação separando os focos/SNC – sistema nervoso central / DHL – desidrogenase láctica.

Tabela 3: Análise de Metástase/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017

M: Análise de metástase		
M0	Ausência de metástase a distância	
M1	M1	Presença de metástase a distância
	M1a	0: metástase em pele, partes moles, músculos ou linfonodos não regionais, e níveis séricos de LDH dentro da normalidade
		1: Metástase em pele, partes moles, músculos ou linfonodos não regionais e níveis séricos de LDH elevados
	M1b	0: Metástase em pulmão (com ou sem sítios incluídos em M1a), e níveis séricos de LDH dentro da normalidade
		1: Metástase em pulmão (com ou sem sítios incluídos em M1a) e níveis séricos de LDH elevados
	M1c	0: Metástase para sítios além de M1a e M1b, sem comprometimento do SNC e níveis de LDH dentro da normalidade
		1: Metástase para sítios além de M1a e M1b, sem comprometimento do SNC, e níveis séricos de LDH elevados
	M1d	0: Metástases para o SNC e níveis séricos de LDH dentro da normalidade
		1: Metástase para o SNC e níveis séricos de LDH elevados

Fonte: Adaptado GOMES et al, 2017

Legenda: LDH: Lactato desidrogenase

Tabela 4: Estadiamento clínico/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0
IB	T1b/T2a	N0	M0
IIA	T2b/T3a	N0	M0
IIB	T3b/T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
III	Qualquer	> N1	M0
IV	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: Adaptado GOMES et al, 2017

Tabela 5: Estadiamento Patológico/ Estadiamento 8ª Edição AJCC-2017

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0

IB	T1b/T2a	N0	M0
IIA	T2b/T3a	N0	M0
IIB	T3b/T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0
IIIA	T1a/T1b/T2a	N1a/N2a	M0
IIIB	T0 T1a a T3a T3b/T4a T4b	N2b/N2c/N3b/N3c N2c ou N3 Qualquer N pos N1a a N2c	M0
IIIC	T0 T1a a T3a T3b/T4a T4b	N2b/N2c/N3b/N3c N2c ou N3 Qualquer N pos N1a a N2c	M0
IIID	T4b	N3 (a,b,c)	M0
IV	Qualquer	Qualquer	M1

Fonte: Adaptado GOMES et al, 2017

O tratamento do melanoma localizado, sem sinais de metástase, é realizado por remoção cirúrgica com ampliação das margens para prevenir recidivas no local. Para tumores com mais de 1mm de espessura ou ulceração recomenda-se realizar biópsia dos linfonodos sentinela (**LS**). A análise do LS pode poupar a retirada desnecessária de toda a cadeia de linfonodos regionais que faz a drenagem da região anatômica acometida pelo tumor. A ausência de metástase no LS significa uma probabilidade de mais de 95% de não existir metástase no conjunto de linfonodos regionais a que ele pertence. Na presença de metástase no LS a cadeia de linfonodos deve ser retirada. (PORTARIA 357, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

Pacientes sem metástase no LS, após a cirurgia é acompanhado clinicamente e com exames periódicos. Já o paciente com metástase positiva no LS tem grande probabilidade de apresentar metástase sistêmica. Após o estadiamento da doença recomenda-se a retirada cirúrgica da metástase em órgãos e tecidos atingidos e a terapia medicamentosa sistêmica. Em casos de comprometimento do sistema nervoso central (SNC) a radioterapia associada à terapia sistêmica é utilizada. (PORTARIA 357, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

2. Medicamentos utilizados no tratamento do melanoma

A Dacarbazina é o fármaco disponível para o tratamento do melanoma metastático no Sistema de Saúde Público Brasileiro. O mecanismo de ação não foi desvendado totalmente, mas existem 3 hipóteses: ação como análogo da purina impedindo a síntese de DNA; ação com agente alquilante, impedindo a replicação do DNA; interação com grupos sulfidrilas (SH) levando à inativação do DNA. As hipóteses de ação direta no DNA conferem a esta droga baixa especificidade, pois pode atuar em qualquer fase do ciclo celular, além de atacar células saudáveis causando muitos efeitos adversos ao paciente (BRUTON et al 2012).

Hervieu, e colaboradores (2012) atribuíram a esse medicamento uma atividade imunomoduladora, pois ativa a expressão de ligantes para as células NK e T do sistema imune otimizando a destruição de células tumorais.

A metástase em pacientes com melanoma representa um prognóstico ruim. A sobrevida dos pacientes nesta condição é em média de 6 a 9 meses e

depende de alguns fatores como a localização e o número das metástases, o intervalo entre o diagnóstico primário e o aparecimento das metástases, o nível de LDH (desidrogenase láctica) no sangue. Em Pacientes com metástases no fígado, no sistema nervoso central e que apresentam altos níveis de LDH a sobrevida é de apenas 3 a 4 meses. (GOGAS et al 2007; BARTH et al 1995).

O Sistema Único de Saúde (SUS) inclui também combinações dos medicamentos Dacarbazina, Cisplatina, Vimblastina com Interferon alfa (IFN) ou Interleucina 2 (IL-2). A posologia do tratamento com o medicamento dacarbazina em monoterapia é de 2 a 4,5 mg/kg/dia intravenoso por 10 dias. Considerando um paciente 60 kg de peso corporal, 10 dias de tratamento custa em média **R\$ 2.500,00**. O tratamento com o medicamento Dacarbazina em monoterapia apresenta resposta completa em apenas 5% dos pacientes tratados e 20% aproximadamente com uma resposta clínica com duração de 5 a 6 meses. (SERRONE et al, 2000). As combinações com outros quimioterápicos mostram um aumento na sobrevida dos pacientes. Legha e colaboradores, (1998) analisaram a combinação dos medicamentos dacarbazina com cisplatina, vimblastina, interferon alfa e interleucina – 2 e verificou que 21% alcançaram resposta completa ao tratamento e 43% apresentaram resposta parcial com duração média de 6 meses. O custo de cada ampola do medicamento darcarbazina de 200mg é em torno de R\$ 250,00. Os pacientes em tratamento com o medicamento Darcarbazina podem sofrer com a toxicidade apresentada por esta droga. Entre os efeitos mais comuns está a depressão hematopoiética que apresenta a redução de leucócitos e plaquetas e em alguns casos redução de eritrócitos causando anemia. Tais eventos podem levar a morte, portanto a monitorização constante destes elementos no sangue é necessária. A toxicidade hepática também pode acontecer com necrose de hepatócitos e trombose da veia porta hepática, sendo mais comum em terapias com combinações com outros quimioterápicos. (GOODMAN e GILMAN, 2003).

A sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), 2017 divulgou em sua diretriz para o diagnóstico e tratamento do Melanoma a recomendação para que em todos os pacientes com melanoma metastáticos é necessário a investigação para a mutação genética BRAF e as demais modificações

genéticas (das vias KIT e NRAS) devem ser realizadas quando houver disponibilidade. No entanto na PORTARIA 357, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013 não menciona as mutações genéticas. O tratamento sugerido pela diretriz da SBOC para pacientes com mutação BRAF é a utilização dos medicamentos Vemurafenibe em associação com Cobimatinibe; do medicamento Dabrafenibe em associação com os medicamentos Trametinibe, Nivolumabe, Pembrolizumabe, Ipilimumabe. O medicamento Dacarbazina somente é recomendado em casos de indisponibilidade dos medicamentos acima. (MUNHOZ, et al, 2017)

O medicamento Vemurafenibe foi aprovado para comercialização no Brasil pela ANVISA em 2012. A caixa com 56 comprimidos de 240 mg custa em média **R\$ 9.000,00**. O medicamento Cobimetinibe foi aprovado para comercialização no Brasil em 2016. A caixa com 63 comprimidos de 20 mg custa em média R\$ 18.000,00. O tratamento recomendado preconiza uma dose de 960 mg do medicamento Vemurafenibe a cada 12 horas, portanto 8 comprimidos/dia e 60 mg do medicamento Cobimatinibe a cada 24 horas (3 comprimidos/dia) por 21 dias, com descanso de 7 dias até a progressão ou limites de toxicidade. Para um mês de tratamento são necessárias 4 caixas do medicamento Vemurafenibe e 1 caixa do medicamento Cobimetinibe, totalizando aproximadamente **R\$ 54.000,00** para o tratamento.

O medicamento Vemurafenibe inibi a via da serina-treonina cinase BRAF. Mutações no gene associado a BRAF provoca sua estimulação constitutiva, sem a necessidade de fatores de crescimento. A eficácia maior é sobre a via quinase BRAF600E. Um estudo realizado por Chapman e colaboradores (2011) comparou a eficiência do medicamento Vemurafenibe em relação ao medicamento Dacarbazina em pacientes sem qualquer tratamento prévio e com mutação na via BRAF. Este experimento demonstrou uma redução de 56% no risco de óbito em pacientes que estavam em tratamento com o medicamento Vemurafenibe. Quando se comparou o quesito progressão ou risco de morte, o medicamento Vemurafenibe demonstrou uma redução de 74% quando comparado ao medicamento Dacarbazina.

O desenvolvimento de resistência é sempre um problema em casos de monoterapias que inibem uma via de sinalização celular específica. Para que os

medicamentos inibidores da via BRAF obtenham sucesso a via ERK deve ser inibida quase totalmente, no entanto em células resistentes a via ERK a fosforilação é feita de outra maneira anulando a apoptose celular (POSSIK, 2012). A associação do medicamento Vemurafenibe e Cobimetinibe demonstrou eficácia superior a monoterapia com o medicamento Vemurafenibe. O medicamento Cobimetinibe é um inibidor que bloqueia a via MEK 1/2, por impedir a fosforilação da via ERK 1/2. Portanto a combinação dos dois medicamentos Vemurafenibe e Cobimetinibe provocam a inibição simultânea das vias BRAF e MEK que resultam em um bloqueio mais eficaz destas vias de sinalização, prevenindo a reativação da via MAPK. A eficácia dessa combinação foi demonstrada em um estudo randomizado multicêntrico e duplo-cego de fase III com 495 pacientes com mutação na via BRAF separados aleatoriamente em dois grupos. Um grupo recebeu a combinação dos medicamentos Vemurafenibe e Cobimetinibe e o outro recebeu o medicamento Vemurafenibe associado a um placebo. O grupo que recebeu a combinação em estudo demonstrou uma taxa média de sobrevida livre de progressão de 9,9 meses, enquanto o grupo controle apresentou 6,2 meses de sobrevida. A resposta completa ou parcial foi de 68% no grupo que utilizou a combinação dos medicamentos em estudo comparado ao outro grupo que apresentou 45%. A sobrevida global foi de 81% dentro de 9 meses para os pacientes tratados com os medicamentos Vemurafenibe e Cobimetinibe, enquanto o outro grupo apresentou 73%. (LARKIN, et al 2014).

Os pacientes tratados com a combinação dos medicamentos Vemurafenibe e Cobimetinibe que apresentarem progressão da doença ou toxicidade excessiva devem utilizar a combinação dos medicamentos Dabrafenibe e Trametinibe, segundo a Sociedade Brasileira de Oncologia/2017. A posologia recomendada é: o medicamento Dabrafenibe 150 mg de 12 em 12 horas associado ao trametinibe 2 mg a cada 24 horas. A caixa do medicamento dabrafenibe 75 mg com 120 cápsulas custa em média R\$ 35.000,00 e a caixa do medicamento trametinibe 2 mg com 30 comprimidos custa por volta de R\$ 5.800,00. Portanto um mês com este tratamento custa uma média de **R\$ 57.000,00**. O medicamento Dabrafenibe é um inibidor potente da via RAF cinase, com alcance para a via BRAF selvagem e suas mutações: BRAF V600E;

BRAF V600K e BRAF V600D. As mutações na enzima BRAF podem levar a ativação constitutiva da via MEK/ERK, estimulando a multiplicação das células tumorais, provocando a resistência a medicamentos que inibem somente uma forma desta enzima. O medicamento Trametinibe é um inibidor da via MEK1 e 2, sendo utilizado em conjunto com o medicamento Dabrafenibe causa o bloqueio da via inteira impedindo a sinalização para o estímulo da multiplicação celular (BULA PROFISSIONAL Tanfilar e Mekinist, Novarts). Long e colaboradores (2017) avaliaram a eficácia desta combinação em um estudo de clínico fase III, randomizado e duplo cego. Foram estudados um total de 870 pacientes em 26 países com mutações nas vias BRAF V600E ou BRAF V600K. Os pacientes foram divididos em dois grupos, sendo um tratado com a combinação em estudo e outro com uma combinação medicamento/placebo. O grupo tratado com a combinação dos medicamentos Dabrafenibe e Trametinibe apresentou uma sobrevida livre de recidiva por 3 anos em 58% dos pacientes e o grupo placebo em 39% dos pacientes. A taxa de sobrevida global de 3 anos foi de 86% nos pacientes tratados e 77% nos pacientes que receberam o placebo.

Os medicamentos Nivolumabe e Pembrolizumabe são recomendados em terapia única caso as opções de combinações acima falhem. O medicamento Nivolumabe é um produto biológico indicado para uso em Monoterapia. A posologia utilizada é de 3 mg/kg de peso do paciente a cada 2 semanas. A caixa com uma ampola de 100 mg com 10 mL custa em média R\$ 9.800,00. O custo de um mês de tratamento para um paciente de 60 kg de peso corporal é **R\$ 19.600,00**. Este medicamento trata-se de um anticorpo monoclonal humano que se liga ao receptor de morte celular programada PD-1 e inibi a ligação com PD-L1 e PD-L2. As células tumorais expressam ligantes PD-L1 e PD-L2 que quando se ligam a PD-1 em células T diminuem sua proliferação e a liberação de citocinas, impedindo a reação natural do organismo às células tumorais. Quando PD-1 é bloqueado, as células T são potencializadas e atacam as células tumorais. A eficácia e segurança do medicamento Nivolumabe em monoterapia foi avaliada em um estudo com 440 pacientes divididos em dois grupos. No primeiro grupo foram colocados os pacientes portadores de gene BRAF selvagem e em um segundo grupo

pacientes com mutações na via BRAF. A resposta objetiva ao tratamento foi de 34,6 no grupo com BRAF selvagem com duração média da resposta de 14,8 meses. Já o grupo com BRAF mutante apresentou resposta objetiva ao tratamento de 29,7% com duração média de 11,2 meses (LARKIN et al, 2015).

O medicamento Pembrolizumabe também se trata de um anticorpo monoclonal que bloqueia o receptor PD-1 e impede sua ligação a PD-L1 e PD-L2. Assim o medicamento potencializa a ação das células T contra as células cancerosas. É indicado para uso em monoterapia na posologia de 2 mg/kg de peso corporal. Cada ampola de 4 mL com concentração de 100 mg/mL custa em média R\$ 19.000. O tratamento de um mês e meio (2 aplicações) para um paciente com 60kg custa **R\$ 38.000,00**, pois serão utilizados 1,2 mL de cada ampola por aplicação e a ampola uma vez aberta seu conteúdo não pode ser guardado. A eficácia do medicamento pembrolizumabe foi avaliada em um estudo randomizado com 834 pacientes com mutação na via BRAF V600, recrutados em 16 países, que receberam uma dose do medicamento a cada 2 semanas e 1 dose do medicamento a cada 3 semanas. Após um acompanhamento médio de 7,9 meses as taxas de sobrevida foram de 89,4% e 96,7% para o primeiro e segundo grupos respectivamente (ROBERT et al 2015).

O medicamento Ipilimumabe também é recomendado pela Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica como uma terceira alternativa de medicamento imunobiológico. A posologia recomendada é 3 mg/kg de peso corporal a cada 21 dias. Cada ampola com 200 mg em 40 mL, custa em média **R\$ 98.000,00**. Para um paciente com 60 kg de peso corporal, usará 24 mL em cada aplicação, utilizando uma ampola por vez. O ipilimumabe possui mecanismo de ação diferente dos dois anteriores, trata-se de um inibidor antígeno CTLA-4 (antígeno 4 associado a linfócito T citotóxico) que é um ponto de verificação imune. Assim O medicamento Ipilimumabe bloqueia os sinais inibitórios induzidos por esta via, aumentando o número de células T que reagem ao tumor. No mesmo estudo Robert e colaboradores (2015), também avaliaram a eficácia deste medicamento. Durante os 7,9 meses de acompanhamento a taxa de sobrevida foi de 87.9%. Neste estudo foi avaliado também os efeitos adversos e percebeu-se que nos grupos tratados com o medicamento Pembrolizumabe estes efeitos

foram menores. Neste estudo o acompanhamento prosseguiu por 2 anos e os resultados de sobrevida global foram os seguintes: para o grupo tratado com o medicamento Pembrolizumabe a cada 2 semanas, a sobrevida foi de 55% e para o grupo tratado a cada 3 semanas a sobrevida também foi de 55%. Já para o grupo tratado com o medicamento Ipilimumabe a taxa de sobrevida foi de 43%. (SCHACHTER et al, 2017).

A associação dos medicamentos Ipilimumabe e Nivolumabe foi aprovada pela ANVISA em 2017 para uso como terapia de 1ª linha para o melanoma metastático no Brasil. No entanto não foi contemplada como recomendação da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica em seu manual. A eficácia da combinação desses medicamentos foi avaliada em um estudo randomizado, duplo cego com 945 pacientes com mutação na via BRAF V600. Estes foram divididos em 3 grupos: o primeiro tratado com associação dos medicamentos Ipilimumabe e Nivolumabe; o segundo em monoterapia com o medicamento Nivolumabe e o terceiro em monoterapia com o medicamento Ipilimumabe. Após um acompanhamento mínimo de 36 meses, o primeiro grupo apresentou taxa de sobrevida global de 3 anos em 58% dos pacientes; no segundo grupo 52% dos pacientes e no terceiro grupo 34% dos pacientes. Observamos uma eficiência terapêutica maior quando os fármacos estão combinados. Eventos adversos de grau 3 e 4 foram relatados em 59% dos pacientes do grupo tratado com a associação e 21 e 28%, respectivamente nos grupos 2 e 3. (WOLCHOK et al, 2017).

Para os pacientes que não apresentam mutação na via BRAF, a diretriz para o tratamento do melanoma da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica/2017 recomenda como primeira opção de tratamento a combinação dos medicamentos Nivolumabe ou Pembrolizumabe. Em caso de progressão com toxicidade excessiva utilizar o medicamento Ipilimumabe, ou outro agente imunoterápico que possui mecanismo de ação diferente dos dois primeiros. Em caso ainda de progressão aos imunoterápicos é recomendado a utilização do medicamento Dacarbazina ou o esquema de combinação dos medicamentos: Cisplatina + Vimblastina + Dacarbazina. (MUNHOZ et al, 2017).

O sistema único de saúde (SUS) no Brasil contempla apenas o tratamento do melanoma com Dacarbazina em monoterapia e em combinações

com cisplatina, vimblastina ou interferon alfa. E não menciona as alterações genéticas que este tipo de tumor apresenta. A opção do serviço público de saúde é sempre pelo tratamento de baixo custo, mas neste caso o tratamento mais em conta negligencia a ocorrência de mutações genéticas importantes que possuem impacto direto no sucesso do tratamento e na sobrevivência do paciente. Existe a necessidade do SUS revisar a portaria 357 de 2013 que trata do diagnóstico e tratamento do melanoma para incluir os testes para detectar as mutações genéticas e oferecer tratamento compatível.

O composto em estudo neste trabalho pode se tornar uma boa opção de medicamento a ser oferecido no sistema único de saúde nacional, uma vez que o mecanismo de ação é multifatorial, sendo mais eficiente que o medicamento dacarbazina e sua síntese e produção poderiam gerar um novo medicamento de baixo custo compatível com o orçamento do sistema de saúde brasileiro.

3. REFERÊNCIAS

BARTH, Andreas; WANEK, Leslie A.; MORTON, Donald L. Prognostic factors in 1,521 melanoma patients with distant metastases. **Journal of the American College of Surgeons**, v. 181, n. 3, p. 193-201, 1995.

BRUNTON, Laurence L.; CHABNER, Bruce A.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

BULA PROFISSIONAL TANFILAR E MEKINIST. Disponível em <https://portal.novartis.com.br/UPLOAD/ImgConteudos/3789.pdf>

CHAMMAS, R. et al. *Imunologia clínica das neoplasias*. Universidade de São Paulo, 2003.

CHAPMAN, P. B. et al. Phase III randomized, open-label, multicenter trial (BRIM3) comparing BRAF inhibitor vemurafenib with dacarbazine (DTIC) in patients with V600EBRAF-mutated melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 18_suppl, p. LBA4-LBA4, 2011.

COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Neoplasia. In: **Robbins- Pathologic Basis of Disease** Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2004.

GOGAS, Helen J.; KIRKWOOD, John M.; SONDAK, Vernon K. Chemotherapy for metastatic melanoma: time for a change?. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 109, n. 3, p. 455-464, 2007.

GOMES at al. Estadiamento do Melanoma pela AJCC 8ª edição 2017. Melanoma. Grupo Brasileiro de Melanoma-GBM. Ano XIX, nº 76, Disponível em www.GBM.ORG.BR. 2017.

HERVIEU, Alice et al. Dacarbazine-mediated upregulation of NKG2D ligands on tumor cells activates NK and CD8 T cells and restrains melanoma growth. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 2, p. 499-508, 2013.

LARKIN, James et al. Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 20, p. 1867-1876, 2014.

LARKIN, James et al. Efficacy and safety of nivolumab in patients with BRAF V600 mutant and BRAF wild-type advanced melanoma: a pooled analysis of 4 clinical trials. **JAMA oncology**, v. 1, n. 4, p. 433-440, 2015

LEGHA, Sewa S. et al. Development of a biochemotherapy regimen with concurrent administration of cisplatin, vinblastine, dacarbazine, interferon alfa, and interleukin-2 for patients with metastatic melanoma. **Journal of clinical oncology**, v. 16, n. 5, p. 1752-1759, 1998.

LONG, Georgina V. et al. Adjuvant dabrafenib plus trametinib in stage III BRAF-mutated melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 19, p. 1813-1823, 2017.

MUNHOZ et al. Diretriz Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica para tratamento do Melanoma. Disponível em www.sbec.otg.br.

PORTARIA SAS/MS n 357, de 08 de abril de 2013-Ministério da Saúde. Disponível em: bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2013/prt0357_08_04_2013.html

POSSIK, P.A. Inibidores de BRAF na era da terapia-alvo. Boletim informativo do GBM – ano XII – nº 56 – janeiro, fevereiro e março .2012.

ROBERT, Caroline et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 26, p. 2521-2532, 2015.

SCHACHTER, Jacob et al. Pembrolizumab versus ipilimumab for advanced melanoma: final overall survival results of a multicentre, randomised, open-label phase 3 study (KEYNOTE-006). **The Lancet**, v. 390, n. 10105, p. 1853-1862, 2017.

WOLCHOK, Jedd D. et al. Overall survival with combined nivolumab and ipilimumab in advanced melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 14, p. 1345-1356, 2017.

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO COMPOSTO 1,3-DIFENIL-2-BENZIL-
1,3-PROPANODIONA (DPBP)**

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dibenzoilmetano

Os flavonoides derivados de dibenzoilmetano são raros na natureza e podem ser isolados de algumas espécies pertencentes ao gênero *Lonchocarpus* e *Deguelia* da família Fabaceae tendo sido isolado pela primeira vez na espécie *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC (MAGALHÃES, et al., 1997) com um substituinte no carbono C-8, denominado 8- $[\alpha,\alpha$ -dimetilalil]-pongamol (Figura 1). Este composto apresentou algumas atividades biológicas interessantes como: bactericida (*Bacillus subtilis*), fungicida (*Aspergillus niger*), toxicidade (*Artemia salina* 2,69 $\mu\text{g/mL}$), larvicida (*Aedes aegypti*) e estímulo do receptor IRS1 de insulina em músculos de ratos *in vivo* (NOGUEIRA et al., 1999).

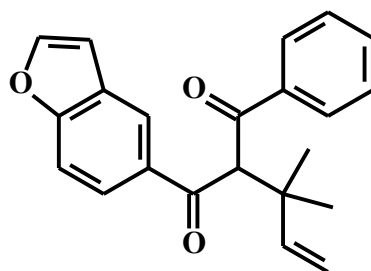


Figura 1 8- $[\alpha,\alpha$ -dimetilalil]-pongamol (derivado de dibenzoilmetano)

Estas características despertaram nosso interesse para obtenção de análogos sintéticos e cetoálcoois a partir do 1,3-difenilpropano-1,3-diona (dibenzoilmetano) (Figura 2) visando buscar outras atividades tais como: fotoprotetores e antineoplásicos. Já que o mesmo é ativo para os cânceres de mama, próstata e intestino. (LIN et al 2001; JAKSON et al 2002; CHEN, 2009).

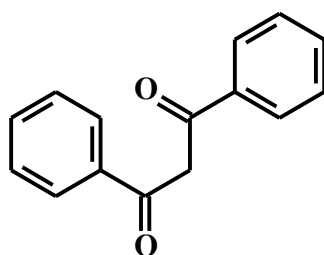


Figura 2 1,3-difenilpropano-1,3-diona (dibenzoilmetano)

Nogueira e colaboradores (2003) sintetizaram um conjunto de derivados do DBM e estudaram suas propriedades antitumorais em 4 linhagens de células neoplásicas a saber: mama, mama resistente, melanoma e pulmão. Dos 19 derivados testados, 8 apresentaram atividade contra as 4 linhagens celulares. Dentre eles o composto 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP) objeto deste estudo, se destacou com promissora atividade antineoplásica contra as linhagens estudadas. Discutiremos neste capítulo a síntese do derivado de dibenzoilmetano a partir do 1,3-difenilpropano-1,3-diona visando a sua utilização como medicamento para tratamento do câncer do tipo melanoma

2. MATERIAL E MÉTODOS

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência foram feitas no aparelho Shimadzu, ultravioleta/visível (UV/VIS), usando-se coluna octadecilsilano (ODS) de 250 x 4,6 mm, fase móvel isocrática 80:20 (H₂O:MeOH) em 50 min, comprimento de onda de detecção 254 nm e fluxo 3,0 mLmin⁻¹

As análises por UPLC-MS/MS sistema LC-MS/MS utilizando o equipamento modelo Agilent 1200 Infinity Series acoplado ao espectrômetro de massas tipo triplo quadrupolo (QqQ), modelo 6430 Agilent Technologies. A separação cromatográfica foi realizada utilizando-se a coluna Zorbax Eclipse Plus C18 (1,8 µm, 2,1 x 50mm) (Agilent) em série com uma coluna guarda Zorbax SB- C18, 1,8 µm (Agilent). A fase móvel consistiu: (A) ácido acético 0,02% em água e (B) ácido acético 0,02% em acetonitrila em um gradiente de tempo/%B de: 0/5; 11/60; 13/95; 17/95; 19/5; 20/5. Fluxo de 0,3 mL/min⁻¹ e temperatura da coluna de 23 °C. No espectrômetro de massas foi utilizada a fonte de ionização ESI (Electrospray Ionisation) com as seguintes condições: temperatura de gás 300 °C, fluxo de nitrogênio de 10 L/minuto, pressão de nebulização de 35 psi e voltagem capilar de 4.000 V.

Os espectros de RMN ¹H e ¹³C, DEPT, foram obtidos em espectrômetros 400 da Bruker no Departamento de Química da UFMG. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl₃), usando-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS).

As placas cromatográficas preparativas (PCP) foram feitas com sílica gel G e sílica gel GF₂₅₄ Merck na proporção de 2:1, sobre suporte de vidro (espessura de 1 mm).

As cromatografias em camada delgada foram feitas em cromatofolhas de alumínio sílica gel G F₂₅₄ 0,2 nm Art. 1.05554 Merck. Reveladores: Lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm.

Todas as cromatografias foram realizadas no Laboratório Química e Bioquímica de Produtos Naturais (Bionat) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

2.1 Síntese do composto 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona

A síntese do derivado de dibenzoilmetano (DBPB) (C₂₂H₂₀O₂) utilizada nesse trabalho foi realizada através de uma reação de alquilação.

2.2 Reação de alquilação

Em um balão de fundo redondo de 100 mL contendo o dibenzoilmetano (1,34 mmol) adicionou-se K₂CO₃ (4,02 mmol) e acetona (20 mL), deixou-se sob agitação por 30 minutos. Após este tempo, adicionou-se lentamente uma solução do brometo de benzila (1,34 mmol), em acetona (10 mL). A mistura reacional foi agitada vigorosamente por 72h e, então, filtrada para remoção dos sólidos em suspensão. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida e o resíduo obtido foi purificado fornecendo o produto alquilado desejado (1,3-difenil-2benzil-1,3-propanodiona). A reação foi acompanhada através de cromatografia de camada delgada (CCD) (VAZ DE ARAUJO et al., 1996).

2.3 Purificação CCP e CLAE

A purificação do composto foi realizada primeiramente por cromatografia em camada preparativa utilizando-se com eluente hexano e acetato de etila (8:2) sendo revelada por lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As amostras impuras foram preparadas diluindo 15 mg do composto em 5 mL de fase móvel (H₂O:MeOH, modo isocrático), sendo detectado em UV a 254 nm. Antes de proceder a cromatografia a fase móvel, solução e a amostras foram filtradas a

vácuo utilizando membrana de 0,22 µm e desaerados por trinta minutos em banho de ultrassom.

2.4 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

As amostras de soro dos camundongos foram previamente preparadas para o UPLC-MS/MS. Uma alíquota de 50 µL foi extraída com 200 µL de acetato de etila/metanol (95:5). A solução foi agitada por 2 minutos em vortex à temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um tubo limpo após a centrifugação de 10.000 G por 3 minutos. A mistura foi evaporada à temperatura ambiente e o resíduo foi reconstituído com 1 mL de metanol, filtrado em filtro 0,22 µm Nylon. O padrão foi preparado na concentração 1 mg/mL, filtrado em filtro 0,22µm Nylon. As amostras foram automaticamente injetadas (5 µl) no sistema LC-MS.

2.5 Formulação transdermica

A formulação transdermica foi obtida incorporando-se o composto nas três concentrações a saber: 0,5; 1,0 e 2,0 mg em uma base transdermica comercial Pentravan® do fabricante Fagron (informações técnicas no anexo I). A formulação de pomada foi obtida com uma base de 50% de vaselina e 50% de lanolina com a incorporação das mesmas concentrações de composto utilizadas na formulação transdérmica. Após a incorporação do ativo, seguindo as boas práticas de fabricação, estes foram acondicionados em potes, previamente higienizados e armazenados na geladeira até o momento de uso

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Síntese e caracterização do composto

A síntese, foi obtida com a alquilação do material de partida com a duração de 72 horas. O rendimento dessa foi em torno de 78%, resultado similar ao conseguido por Nogueira e colaboradores (2003), de 86% e França, (2013) com rendimento de 80%. A figura 1 mostra o composto de partida dibenzoilmetano (P), o composto alquilado (Ø) e a cromatografia de camada delgada (CCD), utilizada para o acompanhamento da síntese.

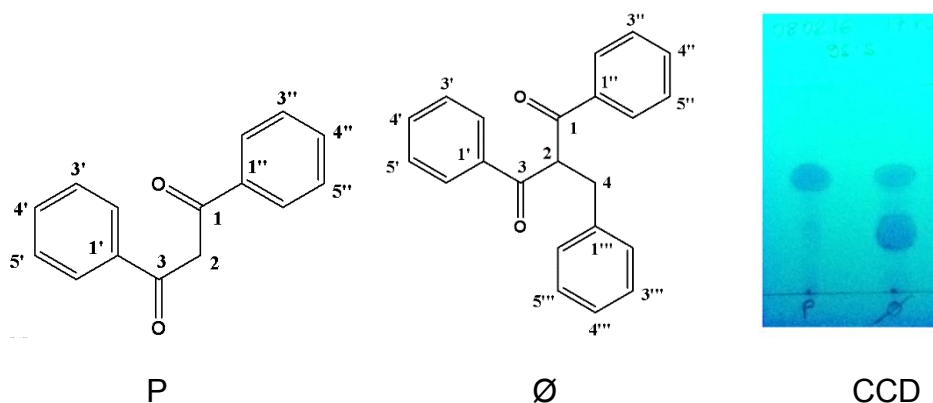


Figura 3. Cromatografia de camada delgada (CCD) da síntese do derivado de dibenzoilmetano **P**: dibenzoilmetano (**DBM**); **Ø**: composto alquilado(**DPBP**).

3.2 Purificação do composto por CLAE

A amostra pré purificada por cromatografia em camada preparativa (CCP) foi novamente purificada por CLAE-preparativo (Figura 2), obtendo-se o composto puro para que se pudesse dar início aos testes *in vitro* e *in vivo*.

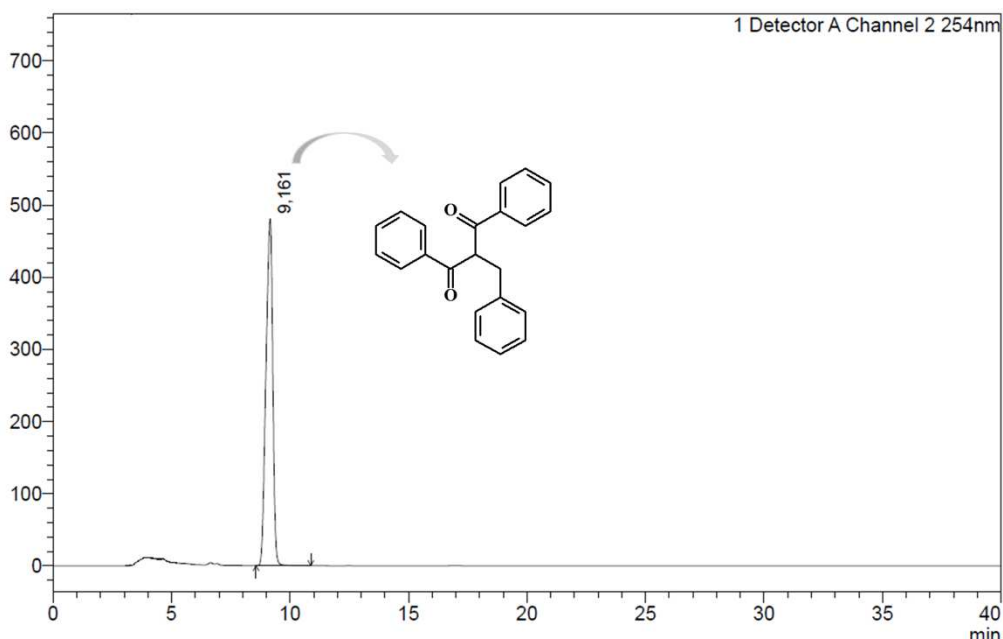


Figura 4 Cromatograma do composto (**DPBP**) 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona. Coluna C18 semi-preparativa, fluxo 2 mL, detector UV 254 nm.

3.3. Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado a espectrometria de massas (UPLC-MS/MS)

Para verificar se o composto DPBP atingiu a circulação sanguínea dos camundongos, no experimento *in vivo*, foram realizadas análises através de LC-MS (Figuras 5 A e B). A análise foi feita com o plasma de um dos animais na concentração de 1,0 mg/g do gel transdérmico. Como a última aplicação tópica foi feita 48 h antes de eutanásia dos animais não foi possível detectar a presença do composto no plasma. A partir desse dado podemos inferir que o tempo de meia vida do composto é inferior a 48 h.

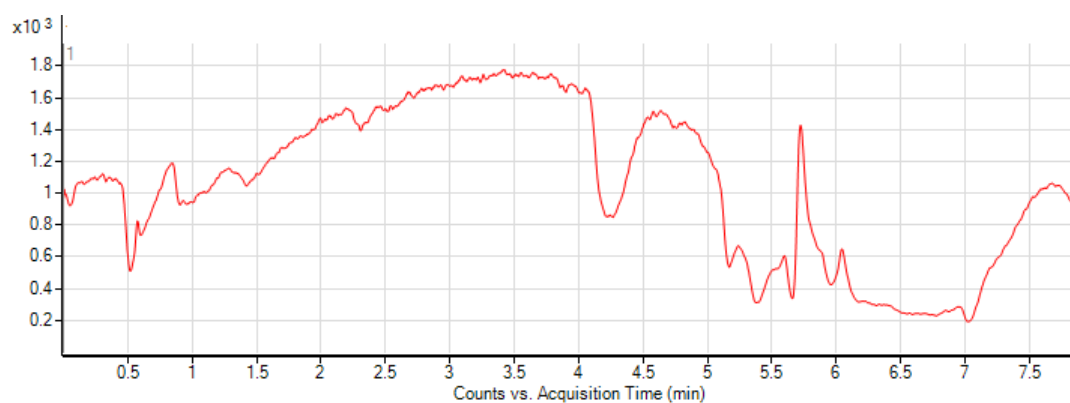


Figura 5 A Perfil do plasma contendo DPBP concentração 1,0 mg/g.

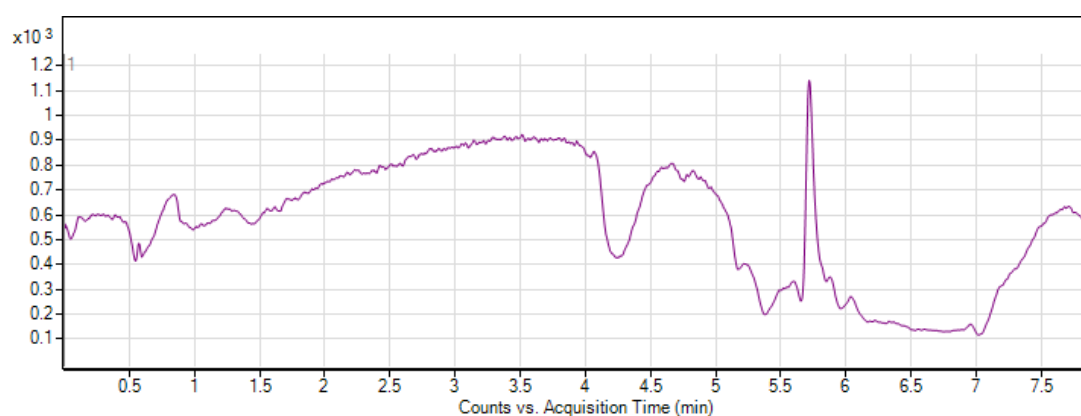


Figura 5 B Perfil do plasma controle

3.4. Identificação do Composto

O composto DPBP foi identificado com base nos espectros de hidrogênio e carbono 13. Nas figuras 7, 8, e 9 pode-se observar o espectro de RMN ^1H em CDCl_3 que mostra sinais referentes a três anéis aromáticos monossustituídos

e absorções características do **CH₂** do grupo benzílico em 3,44 (1H, *dd*, *J* = 14, 7 Hz, **H-4**) e absorções características em 5,43 (1H, *t*, *J* = 7 Hz, **H-2**) 7,88 (4H, *dd*, *J* = 10; 2 Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 7,12-7,56 (11H, *m*, **H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5'', 3''', 4''' e 5'''**),

No espectro de carbono treze (Figuras 10 e 11) os sinais em 139,3 (**C-O, C3 e C1**) referentes as carbonilas, 54,3 (**C-2, C-H**) relativo ao **CH₂** benzílico são característicos do composto.

O espectro de DEPT 135⁰ (Figura 12 e 13) mostram picos referentes a **9** carbonos **C-H** de aromáticos, **1 CH₂** benzílico e ausência de carbono quaternário relativos as duas carbonilas. O que corrobora com a estrutura proposta (Figuras 3).

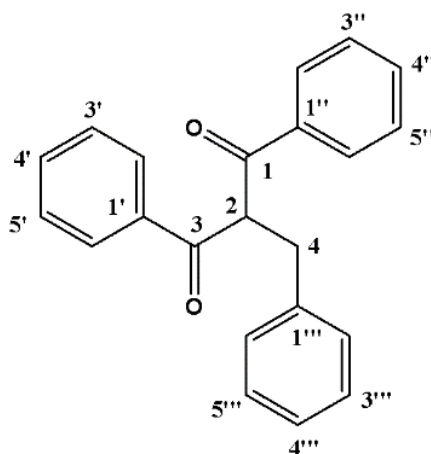


Figura 6 Estrutura do composto 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP).

Aspecto Físico: Sólido amorfo incolor

RMN ¹H δ: 7,88 (4H, *dd*, *J* = 10; 2 Hz, H-2', H-6', H-2'', H-6''), 7,12-7,56 (11H, *m*, H-3', 4', 5', 3'', 4'', 5'', H-2''''-H-6'''), 5,43 (1H, *t*, *J* = 7 Hz, H-2), 3,44 (1H, *dd*, *J* = 14, 7 Hz, H-1''')

RMN ¹³C δ: C-1'-C-1'' (139, 3 C_O), C-2'-C-6'-C-2''-C-6'' (128,9 C-H), C-3'-C-5'-C-3''-C-5'' (128,6 C-H), C-4 (133,5 C-H), C-3-C-1 (195,4 C = O), C-2 (59,0 C-H), C-1''''(135,98), C-2''''-C-6'''' (128,6 C-H), C-3''''-C-5'''' (128,8 C-H) C-4'''' (126,6 C-H).

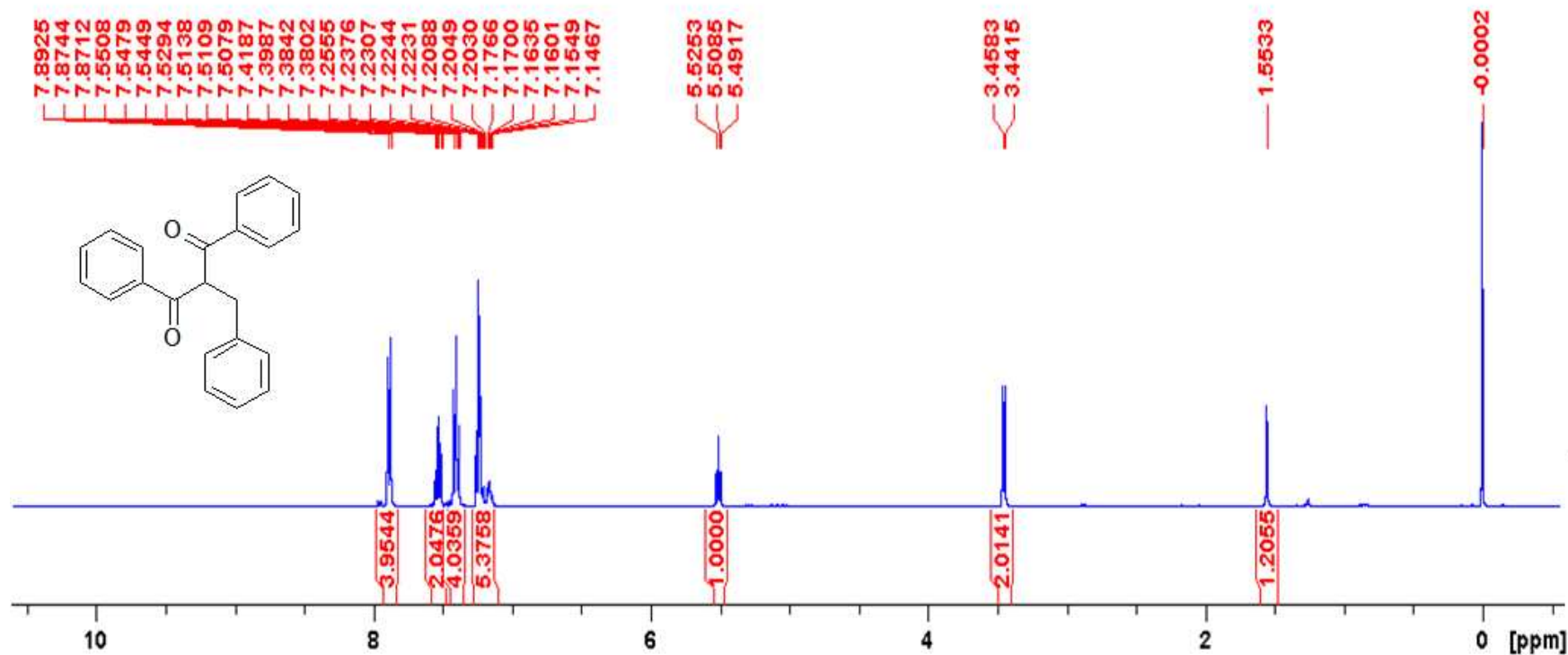


Figura 7 Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃).

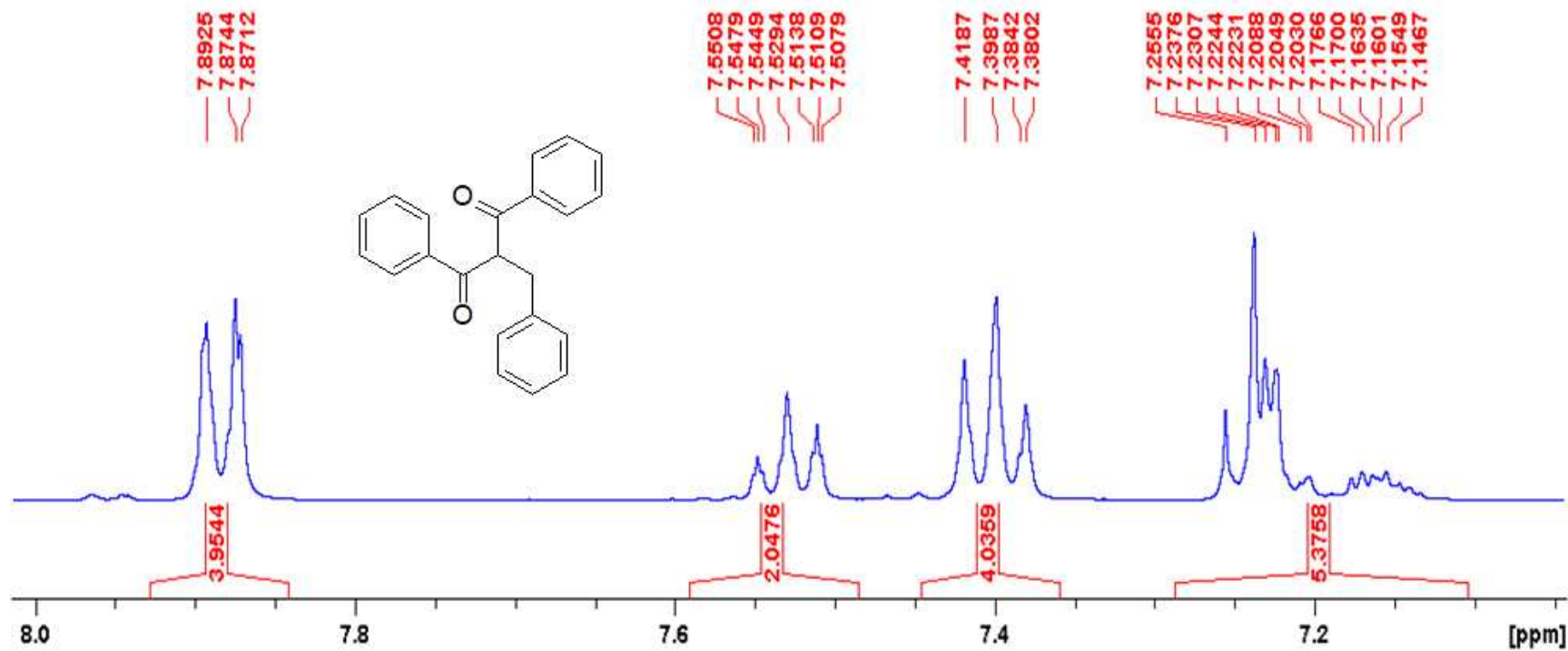


Figura 8 Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) expansão

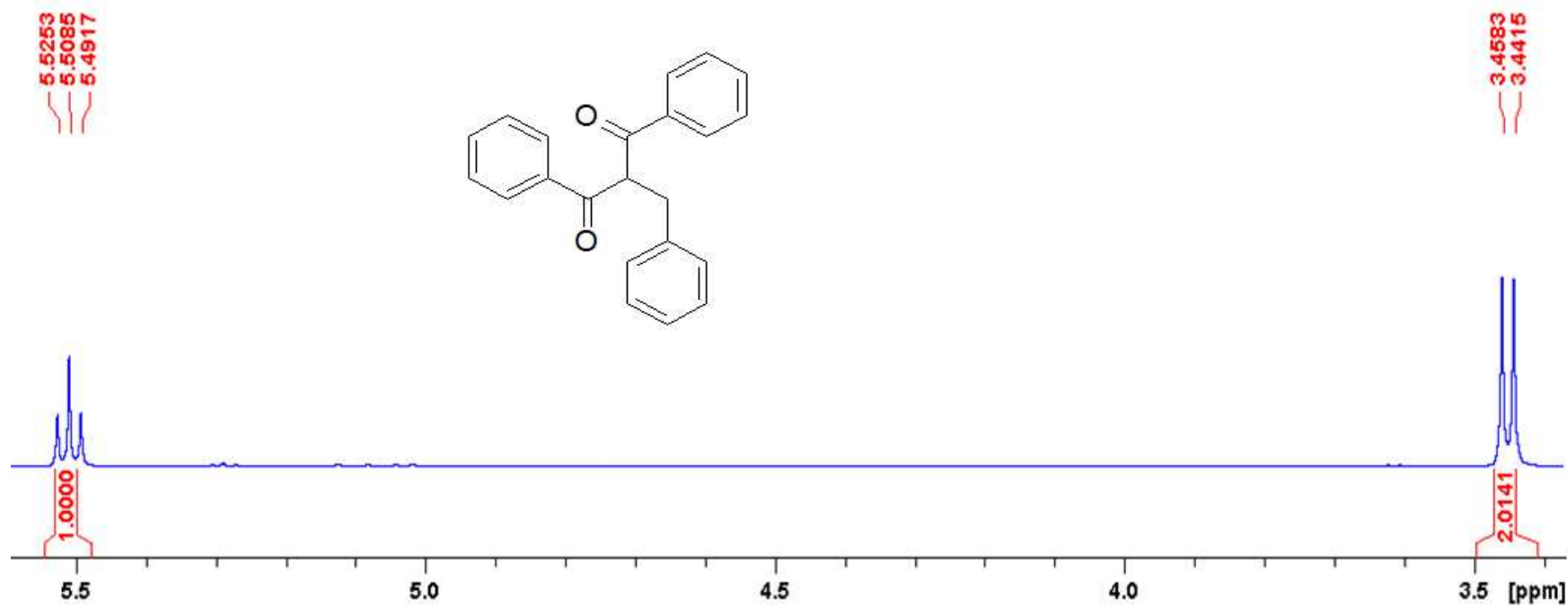


Figura 9 Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) expansão

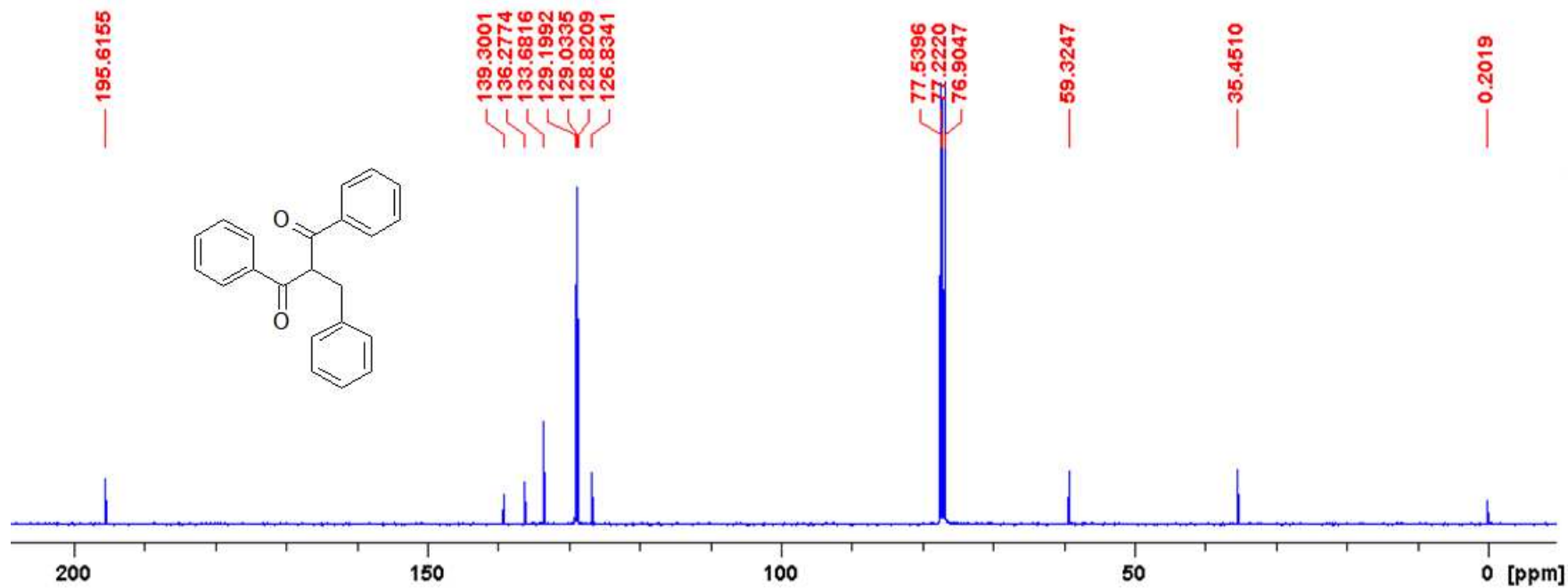


Figura 10 Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3)

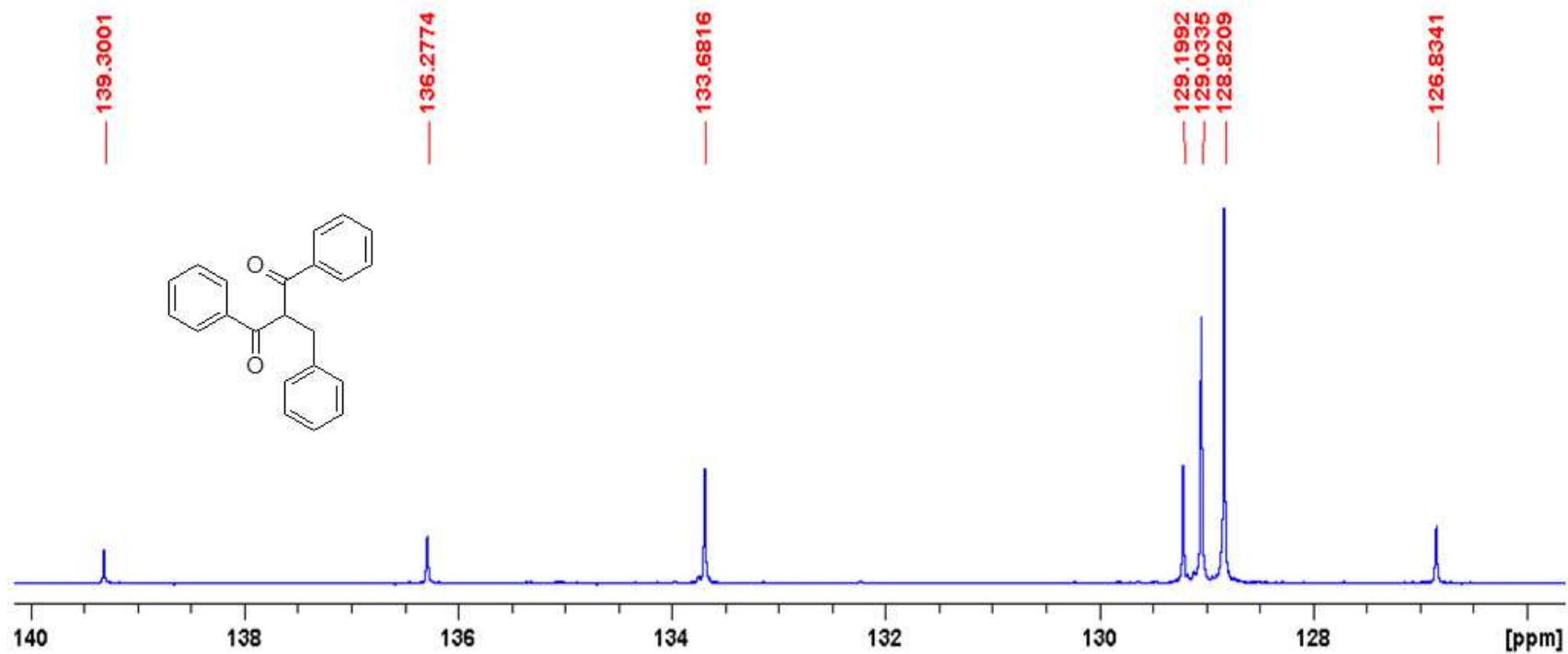


Figura 11 Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) expansão

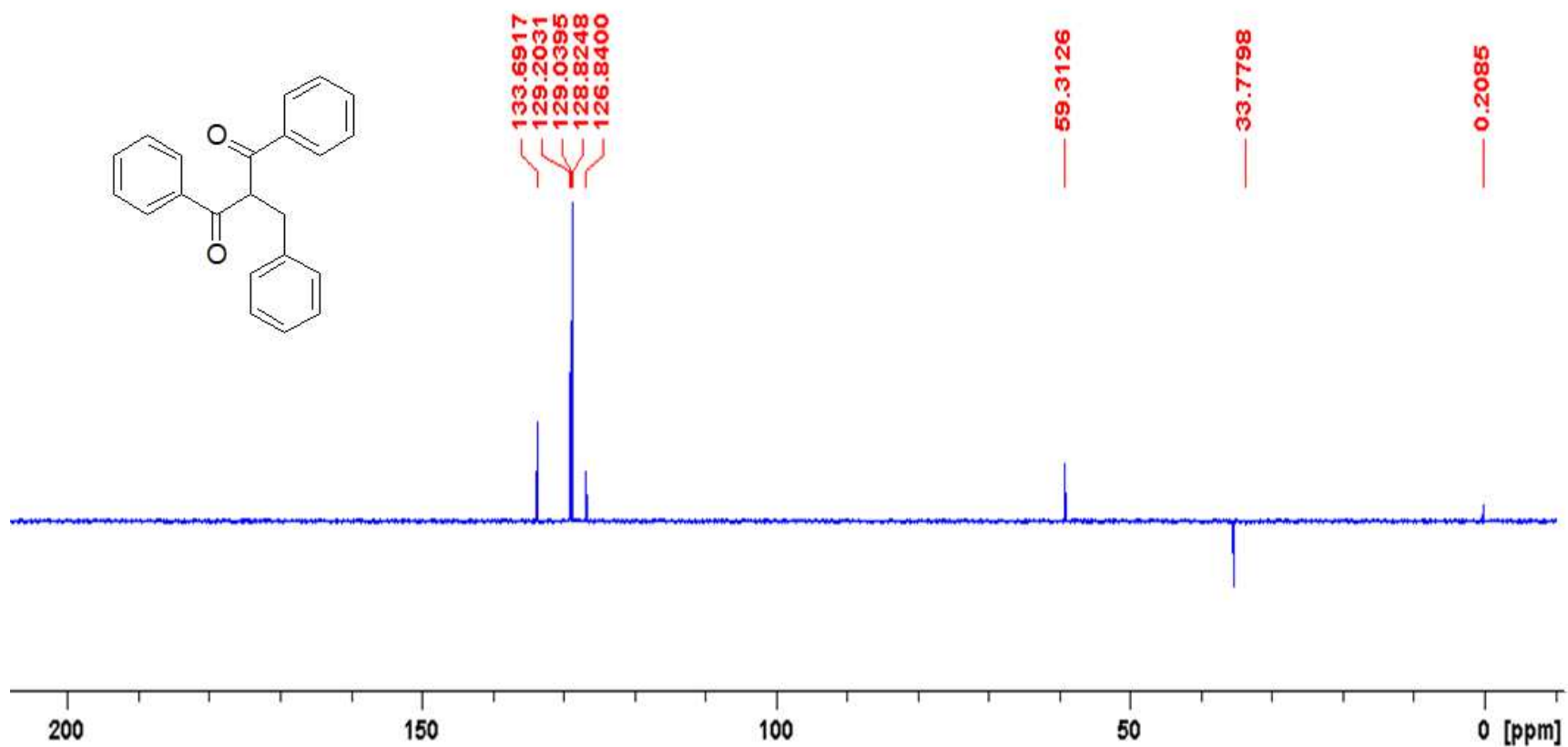


Figura 12 Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3)

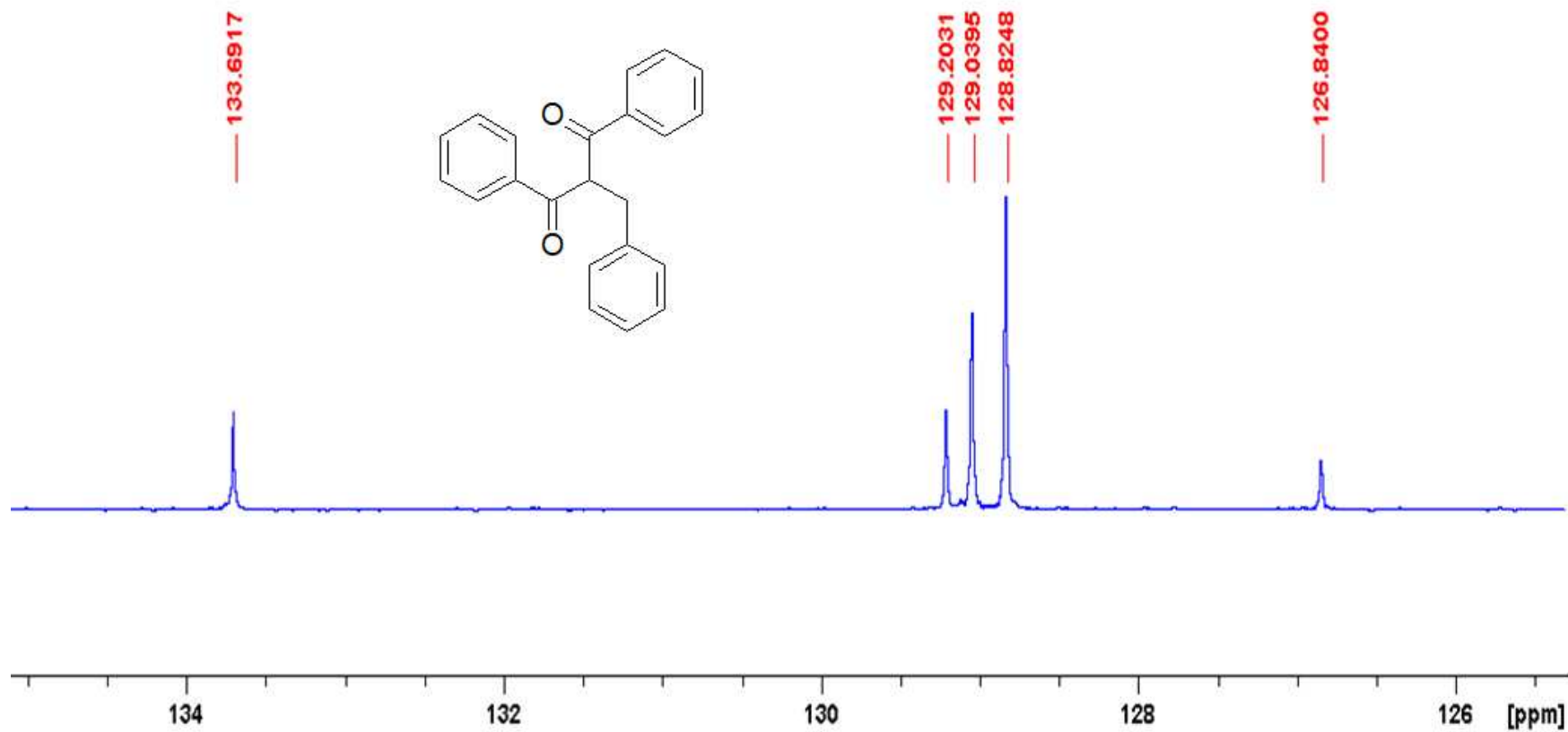


Figura 13 Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl₃) expansão

4. CONCLUSÃO

A síntese do composto DPBP é de fácil realização e não requer aparelhos sofisticados. O controle de qualidade da produção pode ser realizado por HPLC e o rendimento apresenta-se por volta de 78%. O DPBP é um composto que possui produção simples e de baixo custo, sendo o candidato ideal para ser um medicamento de escolha do sistema único de saúde (SUS).

5. REFERENCIAS

CHEN, X. et al. Histopathology of normal skin and melanomas after nanosecond pulsed electric field treatment. *Melanoma. Research*, 19: 361 - 71, 2009.

JACKSON, K. M., DE LEON, M., VERRET, C. R., HARRIS, W. B. Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells. *Cancer Letter*, 178, 161, 2002

LIN, C. et al. Inhibition by dietary dibenzoylmethane of mammary gland proliferation, formation of DMBA \pm DNA adducts in mammary glands, and mammary tumorigenesis in Sencar mice. *Cancer Letter*, 168: 125 - 32, 2001.

NOGUEIRA, M. A., MAGALHÃES, E. G., MAGALHÃES, A. F., BILOTI, D. N., LAVERDE, A., PESSINE, F. B., MARSAIOLI, A. J. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. *Il Farmaco*, 58: 1163-1169, 2003

NOGUEIRA, M. A. et alii 2nd IUPAC Internacional Conference on Biodiversity julho 1999 BH-MG.

VAZ DE ARAUJO, A. C. et alii *Química Nova* 19: 79-81, 1996.

**NEW ANTINEOPLASTIC AGENT BASED ON A DIBENZOYLMETHANE
DERIVATIVE: CYTOTOXIC EFFECT AND DIRECT INTERACTION WITH DNA**

Biophysical Chemistry 239 (2018) 1-6 (<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.009>)

New Antineoplastic Agent Based on a Dibenzoylmethane Derivative: Cytotoxic Effect and Direct Interaction with DNA

Fernanda R. Nascimento^a, Tiago A. Moura^b, Jefferson V. P. B. Baeta^a, Bruno C. Publio^b, Pollyanna M. F. Ferreira^a, Anésia A. Santos^c, Andressa A. P. França^d, Marcio S. Rocha^b, Gaspar Diaz-Muñoz^e, Marisa A. N. Diaz^{a,*}

^aDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

^b Department of Physics, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

^c Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

^d Department of Biology, Universidade Estadual de Minas Gerais, Ubã, Minas Gerais 36500-000, Brazil

^e Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

* Corresponding author. *E-mail address*: marisanogueira@ufv.br (Marisa A. N. Diaz)

Highlights

- 1,3-Diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP), a dibenzoylmethane derivative, is a potential chemotherapeutic agent.
- DPBP had a high selectivity index (SI) of 41.94 for B16F10 melanoma cells over melan-A cells.
- Its mechanism of interaction with DNA was elucidated using optical tweezers.

ABSTRACT

Melanoma accounts for only 4% of all skin cancers but is among the most lethal cutaneous neoplasms. Dacarbazine is the drug of choice for the treatment of melanoma in Brazil through the public health system mainly because of its low cost. However, it is an alkylating agent of low specificity and elicits a therapeutic response in only 20% of cases. Other drugs available for the treatment of melanoma are expensive, and tumor cells commonly develop resistance to these drugs. The fight against melanoma demands novel, more specific drugs that are effective in killing drug-resistant tumor cells. Dibenzoylmethane (DBM) derivatives are promising antitumor agents. In this study, we investigated the cytotoxic effect of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP) on B16F10 melanoma cells as well as its direct interaction with the DNA molecule using optical tweezers. DPBP showed promising results against tumor cells with a high selectivity index (SI) of 41.94. Also, we demonstrated the ability of DPBP to interact directly with the DNA molecule. The fact that DPBP can interact with DNA *in vitro* allows us to hypothesize that such an interaction may also occur *in vivo* and, therefore, that DPBP may be an alternative to treat patients with drug-resistant melanomas. These findings can guide the development of new and more effective drugs.

Keywords: dibenzoylmethane; dibenzoylmethane derivative; melanoma; optical tweezers; DNA.

1. Introduction

Melanoma is a cancer of low incidence but high lethality. It accounts for only 4% of all cancers in Brazil. About six thousand new cases are expected for the biennium 2016–2017, of which 1,500 will probably result in death. The southern region of Brazil has the highest incidence rates of the country, 8.02 and 7.06 cases per 100,000 men and women, respectively. The lowest rates occur in the northern region, 0.20 cases per 100,000 men and 0 cases among women [1].

The main causes of melanoma are genetic predisposition and excessive sun exposure. The use of sunscreen is recommended as a preventive measure. The disease in its initial stages is treated by surgical removal of the tumor and sentinel lymph nodes. This procedure aims to eliminate all cancer cells before they reach the bloodstream and lymphatic vessels and thereby avoid metastasis. For patients with more advanced stages of the disease, treatment consists in the administration of antineoplastic drugs, which have low effectiveness and high cost. In addition, the more advanced the disease, the lower the chances of patient survival, even with treatment.

Drugs that intercalate or interact with DNA have been widely used as chemotherapeutic agents, such as cisplatin, doxorubicin, and dacarbazine. However, despite their therapeutic success, these drugs cause serious side effects, and tumor cells can become resistant to their cytotoxic mechanisms. Dacarbazine (Figure 1) is the most used drug to treat melanoma. This alkylating agent binds to the DNA, preventing DNA strands from separating and disrupting protein and DNA synthesis [2]. Dacarbazine is a non-specific agent, as it can act at any stage of the cell cycle. This drug elicits a therapeutic response in only 20% of cases for approximately five months and a complete response in 5% of cases [3].

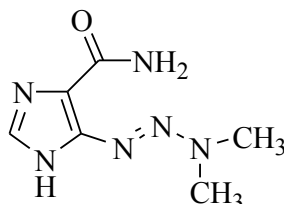


Figure 1. Chemical structure of dacarbazine, a drug used for the treatment of melanoma.

Dibenzoylmethane (DBM, Figure 2) is a β -diketone and natural flavonoid found in families such as Annonaceae, Asteraceae, Menispermaceae, Rosaceae, Salicaceae, and especially Fabaceae (genera *Glycyrrhiza* and *Lonchocarpus*) [4,5]. DBM is widely used in sunscreens as an ultraviolet blocking agent [6]. A variety of biological properties have been attributed to DBM, including anti-inflammatory [7], antimutagenics [8], and anti-estrogenic activities [9]. In addition, DBM exerts many anticancer effects. DBM has been shown to induce apoptosis and cell cycle arrest in human prostate cancer cells [10] and in colon cancer cells [11] and to prevent the formation of DNA-adducts induced by carcinogens, both *in vitro* and *in vivo*, in mammary glands [12] and in the lungs by activation of the Nrf2 detoxification pathway [13].

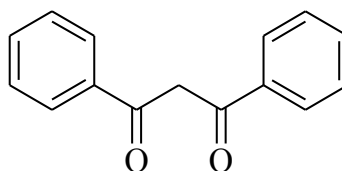


Figure 2. Chemical structure of dibenzoylmethane (DBM).

As an extension of the pioneering work of Nogueira et al. (2003) [5,14] reporting the photoprotective properties and promising results of a series of dibenzoylmethane derivatives against human melanoma cell lines, in the present study, we evaluate the antimelanoma activity of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP, Figure 3) against the B16F10 cell line. DPBP was one of the best exponents of the series; its complete mechanism of action, however, is still unknown. Here we advance the understanding of DPBP's mechanism of action, studying its efficiency at a cellular level as well as at a single-molecule level by optical tweezers analysis, a technique used to tether DNA and measure its mechanical properties. This technique allows the elucidation of the binding modes and the physical chemistry of drug–DNA interactions [15].

In order to evaluate the performance of DPBP as a potential anticancer agent, first, we investigated the cytotoxic effect of DPBP on melanoma cells. DPBP gave promising results against B16F10 cells, showing a high selectivity index (SI) of 41.94. By comparing the effect of DPBP on normal melanocytes with the effects obtained

using other classical chemotherapeutic agents, we concluded that this molecule is a potential chemotherapeutic agent for the treatment of melanoma.

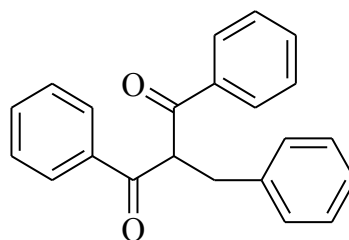


Figure 3. Chemical structure of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP).

Finally, we investigated the direct interaction of DPBP with DNA using optical tweezers. DNA is the therapeutic target of many antineoplastic agents, such as cisplatin and doxorubicin, and it directs the search for new antineoplastics [16]. The fight against melanoma demands new and more specific drugs that are effective in cases of drug resistance.

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals and reagents

Dibenzoylmethane (DBM), benzyl bromide, dimethyl sulfoxide (DMSO), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), deuterated chloroform (CDCl_3), RPMI medium, Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum (FBS), antibiotics (amphotericin B, penicillin, and streptomycin), and λ -DNA molecules were all purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). B16F10 cell lines was purchased from ATCC The Essentials of Life Science Research (Manassas, Virginia) and melan-A was purchased from Leika biosystem. All other chemicals were the highest purity available from local sources.

2.2. Synthesis of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP)

Anhydrous potassium carbonate (0.56 g, 4.0 mmol) and DBM (0.3 g, 1.34 mmol) were suspended in acetone (20 mL) and stirred for 30 min at room temperature. Benzyl bromide (0.16 mL, 1.34 mmol) was added to this mixture and stirred overnight at the same temperature. The mixture was filtered, and the solvent was evaporated.

The crude product was purified by TLC by using 80:20 *n*-hexane/AcOEt as eluent to afford DPBP as a colorless solid in 85% yield. m.p.: 58.3–58.7 °C; $R_f = 0.74$ (80:20 *n*-hexane/AcOEt); IR (ν/cm^{-1}): 3031, 1694, 1664, 999; ^1H NMR: 7.88 (dd, 4H, $J = 8.0$ and 1.3 Hz, H-2' and H-6'), 7.53 (tt, 2H, $J = 7.5$ and 1.2 Hz, H-4'), 7.40 (tt, 4H, $J = 7.9$ and 1.3 Hz, H-3' and H-5'), 7.26–7.20 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'', and H-6''), 7.18–7.15 (m, 1H, H-4''), 5.51 (t, 1H, $J = 6.7$ Hz, H-2), 3.45 (d, 2H, $J = 6.7$ Hz, CH_2Ph); ^{13}C NMR: 195.6 (2 C=O), 139.3, 136.3, 133.7, 129.2, 129.0, 128.8, 126.8, 59.3, 35.4 (CH_2Ph); HRMS: calc. for $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{O}_2$ 314.1307, observed 314.1306.

2.3. Cytotoxicity test

The melan-A and B16F10 cell lines have been established from normal murine melanoblasts and murine melanoma cells, respectively. Melan-A cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (amphotericin B, penicillin, and streptomycin) in 25 cm^2 culture flasks, incubated at 37 °C, 5% CO_2 , and 95% relative humidity. B16F10 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotics (amphotericin B, penicillin, and streptomycin) and maintained under the same conditions as described above.

2.4. Cytotoxic activity measured by the MTT assay

Cells in an exponential growth were plated in triplicate in flat-bottomed 96-well plates, B16F10 cells were plated at 1×10^4 cells/mL; and melan-A cells, at 1×10^5 cells/mL. Each well received 100 μL of culture medium. Plates were incubated for 24 h at 37 °C, 5% CO_2 , and 95% humidity. Different concentrations of dacarbazine and DPBP were prepared in DMSO and then added to the cells. The final concentration stayed between 1–12 μM for dacarbazine and 0.39–25 μM for DPBP, in both cases, the DMSO concentration stayed less than 0.05%. Control wells contained medium without drug. Plates were incubated for 60 h at 37 °C, 5% CO_2 , and 95% humidity. After this period, the MTT assay was performed to determine cell viability. Absorbances were read at 570 nm, and the 50% inhibitory concentration (IC_{50}) for each cell line was calculated.

2.5. Selectivity index

The SI indicates the potential therapeutic use of compounds in clinical trials. In this study, SI corresponds to the ratio of the IC₅₀ for normal cells (melan-A) to the IC₅₀ for neoplastic cells (B16F10).

2.6. Statistical analysis

The IC₅₀ values for tumor cells were analyzed using the GraphPad Prism® 5.0 software, according to the methods indicated in the manual. Statistical differences between experimental groups were evaluated by one-way ANOVA ($p < 0.05$).

2.7. Optical tweezers experiments

The DNA samples consisted of λ -DNA molecules (48,502 base-pairs, $\sim 16.5 \mu\text{m}$ contour length) (New England Biolabs) end-labeled with biotin attached by one end to a streptavidin-coated polystyrene bead of $3 \mu\text{m}$ in diameter (Bangs Labs) and by the other end to a previously prepared streptavidin-coated coverslip. All measurements were performed in phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4 and 140 mM sodium chloride. The DPBP concentration in the sample was varied during the experiments by changing the buffer solution.

The optical tweezers setup was composed of a 1,064 nm ytterbium-doped fiber laser (IPG Photonics) mounted on a Nikon Ti-S inverted microscope with a 100X N.A. 1.4 objective. The DNA molecules were stretched by moving the microscope stage, and consequently the coverslip, under controlled velocity using a piezoelectric device (PINano P-545, Physik Instrument).

We started the experiments with bare DNA molecules ($0.0 \mu\text{M}$ DPBP). First, we randomly chose a bead and tested if there was a DNA attached to it by moving the microscope stage. If the measured contour length agreed with the expected value for λ -DNA ($16\text{--}17 \mu\text{m}$), six more stretching measurements were taken, and the mean values of persistence and contour lengths were obtained. These two mechanical parameters were determined by fitting the experimental force–extension curves, measured in the low-force entropic regime ($F < 3 \text{ pN}$), to the Marko–Siggia worm-like chain (WLC) model [17]. Next, we changed the surrounding buffer solution, introducing DPBP at the chosen concentration. We waited for about 1 h before repeating the stretching experiments in order to reach the chemical equilibrium of the

binding reaction. A new set of six measurements were then taken, and the mean values and standard errors of the mechanical properties at each concentration were calculated. The complete details of these procedures have been previously described [18].

2.8. A model to determine the DPBP–DNA binding parameters

In 2012, a quenched-disorder statistical model was formulated to determine the binding parameters of a ligand–DNA interaction from persistence length [19]. Here, we will briefly expose this approach. The complete details can be found in another study [15].

Essentially, it can be rigorously demonstrated [19] that the effective persistence length (A_E) of a ligand–DNA complex can be expressed as follows:

$$\frac{1}{A_E} = \frac{1}{A_0} + \left(\frac{2}{A_1} - \frac{2}{A_0}\right)x + \left(\frac{1}{A_0} - \frac{2}{A_1} + \frac{1}{A_2}\right)x^2 \quad (1)$$

where A_0 is the persistence length of the bare DNA molecule, A_1 is the local persistence length induced by the ligand upon binding to a site, A_2 is the local persistence length when two bound sites become nearest neighbors, and x is the ratio of the bound site fraction r to its saturation value r_{max} .

The effective persistence length (A_E) can be connected to the binding parameters of the interaction by choosing an appropriate binding isotherm that captures the physical chemistry of the system. In the case of the DPBP–DNA interaction, an appropriate binding isotherm is the Hill model, as this molecule exhibits positive cooperativity upon binding to DNA. The Hill model is the simplest binding isotherm capable of providing an estimation of the cooperativity degree of a binding reaction. It reads

$$r = \frac{r_{max}(K_i C_f)^n}{1 + (K_i C_f)^n} \quad (2)$$

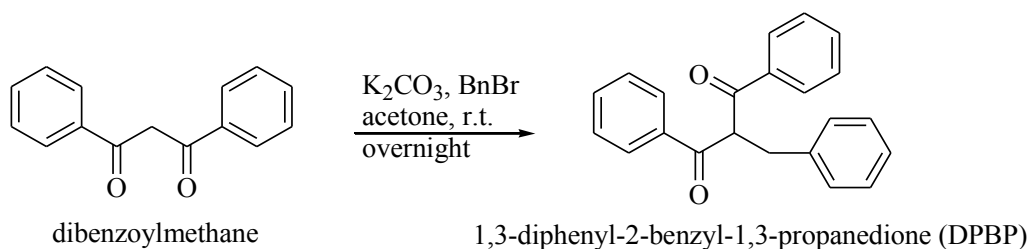
where C_f is the free-ligand (not bound to DNA) concentration; K is the equilibrium association binding constant; and n is the Hill exponent, a parameter generally used to measure the degree of cooperativity of binding reactions.

Equation 2 can be plugged into Equation 1 to fit the experimental data of persistence length. The binding parameters are left as adjustable parameters and can be determined from the fitting process. Complete details of this fitting procedure can be found in a previous work [15].

3. Results and discussion

3.1. Chemistry

1,3-Diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP) was synthesized by the reaction of dibenzoylmethane and benzyl bromide in acetone in the presence of anhydrous potassium carbonate (Scheme 1). DPBP was characterized by IR, ^1H and ^{13}C NMR, and mass spectra. The spectral data of DPBP were in agreement with the described in the literature [5].



Scheme 1. Synthesis of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP).

3.2. Cell cytotoxicity

Data presented in Figure 4 show that DPBP was more effective against B16F10 cells than against melan-A cells. The selectivity indices ($\text{SI} = \text{IC}_{50} \text{ melan-A} / \text{IC}_{50} \text{ B16F10}$) obtained were 41.94 and 1.00 for DPBP and dacarbazine, respectively, which indicates the high selectivity of DPBP for B16F10 tumor cells (detailed data are shown in Table 1).

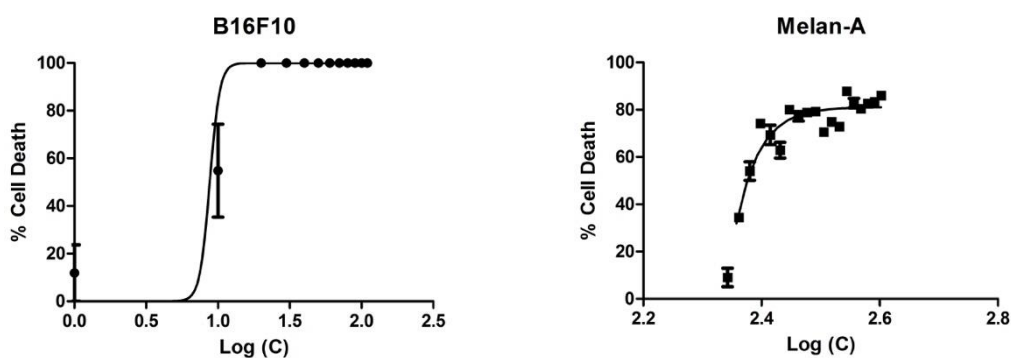


Figure 4. Plots of the percentage of cell death induced by DPBP at different concentrations on B16F10 and melan-A cells. Results are the mean \pm standard deviation of three independent experiments.

Table 1. IC₅₀ values and selectivity indices (SI) of dacarbazine, DBM, and DPBP.

Compound	IC ₅₀ B16F10 ($\mu\text{g/mL}$)	IC ₅₀ melan-A ($\mu\text{g/mL}$)	SI (melan-A/ B16F10)
Dacarbazine*	253.97	253.91	1.00
DBM	11.59	5.68	0.49
DPBP	6.25	262.13	41.94

* Positive control.

The results presented in Figure 4 and Table 1 indicate that DPBP is a promising agent for the treatment of melanoma, as its SI (41.94) is considerably high and its IC₅₀ is considerably low (6.25 $\mu\text{g/mL}$ = 1.97 μM) when compared with the SI (0.49) and IC₅₀ (11.59 $\mu\text{g/mL}$ = 51.7 μM) of DBM. Moreover, cisplatin and doxorubicin, two well-known DNA-intercalating drugs, exhibited IC₅₀ values of approximately 6 μM and SI of 1.0 (data not shown). These results demonstrate that DPBP is a molecule of high efficiency, suggesting that it has a great potential as a chemotherapeutic agent in the treatment of melanoma.

3.3. Optical tweezers experiments

In Figure 5, we show the persistence length A of DPBP–DNA complexes as a function of DPBP concentration in solution (C_T). Black dots represent the experimental data, and the red solid line is the fit to the model, discussed in Section 4.7. Observe that the persistence length presents a non-monotonic behavior: it initially decreases (for $C_T < 40 \mu\text{M}$) from the bare DNA value ($\sim 47 \text{ nm}$) until reaching $\sim 34 \text{ nm}$ and then increases (for $C_T > 40 \mu\text{M}$). The model returned the characteristic binding parameters of the DPBP–DNA interaction: $K = (2.7 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $n = 5.1 \pm 1.5$. The local persistence lengths were also determined: $A_1 = (22 \pm 3) \text{ nm}$, corresponding to the binding of DPBP to a single binding site; and $A_2 = (68 \pm 9) \text{ nm}$, corresponding to two bound molecules becoming nearest neighbors.

In Figure 6, we show the contour length (L) of the same DPBP–DNA complexes as a function of DPBP concentration (C_T). This parameter exhibits a monotonic behavior, increasing from the bare DNA value ($\sim 16.5 \mu\text{m}$) until reaching the saturation value of $\sim 19.1 \mu\text{m}$.

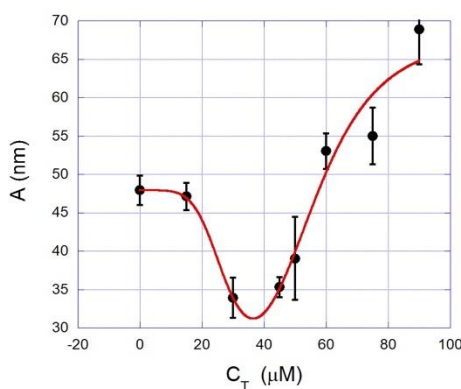


Figure 5. Persistence length (A) as a function of DPBP concentration in solution (C_T) (black dots). The red solid line is the fit to the model (discussed in Section 2.8).

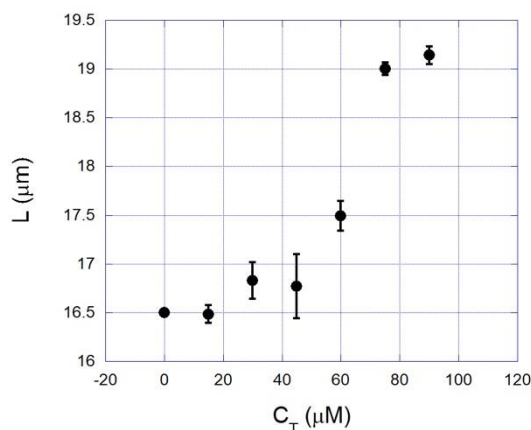


Figure 6. Contour length (L) of the same DPBP–DNA complexes as a function of DPBP concentration (C_T).

DNA is one of the main targets in the discovery of new antineoplastic drugs. Drugs that interact with DNA can prevent transcription and/or replication. A drug can interact with DNA molecules in many ways, such as by intercalation, groove binding, covalent binding, and electrostatic binding [15].

Single-molecule stretching experiments such as those performed using optical and/or magnetic tweezers have become the state of the art in the past years for characterizing interactions between DNA and small molecules. The basic idea of these experiments is to monitor changes in the mechanical properties of DNA induced by the drug upon binding [15,20]. The binding parameters of the interaction can be further deduced from the changes in mechanical properties. By using this type of approach, it is possible to promptly verify if a ligand interacts with DNA and deduce the possible binding mechanisms [15,20].

In Figures 5 and 6, we presented the behavior of the two basic mechanical properties of DNA, persistence and contour lengths, as a function of DPBP concentration. Both properties changed as DPBP concentration increased, indicating that DPBP binds to the double helix and alters the mechanical behavior of the formed complexes. Observe that both mechanical parameters start to change appreciably at a DPBP concentration of about 20 μM . This does not mean that the compound has not interacted with the DNA molecule at lower concentrations. In fact, very low concentrations of DNA ligands usually do not change the mechanical properties of the biopolymer, especially in cooperative binding reactions [15]. Nevertheless, such small concentrations are usually capable to disturb the DNA functions inside cells.

The behavior of persistence length was non-monotonic, suggesting a complex binding mechanism between DPBP and DNA [15]. Note that DPBP has three aromatic rings in its structure (see Figure 3). Antineoplastic drugs are mostly polyaromatic and interact with DNA mainly by two binding mechanisms: groove binding and intercalation [21].

For ligands that interact with the minor groove of the DNA, there is usually a correlation between the resulting persistence length and changes in the minor groove width. A narrowing of the minor groove cavity of the double helix is in general accompanied by a decrease in the bending rigidity of the biopolymer, thus decreasing the effective persistence length [22]. Olsen et al. (2003) [23], for example, observed the narrowing of the minor groove cavity after the interaction of DNA with the ligand distamycin-A, which resulted in a decrease in persistence length. On the other hand, some ligands, such as netropsin, lengthen the minor groove cavity, increasing the effective persistence length [24]. The effect of groove binders on the DNA contour length also depends on the drug. Some molecules, such as diminazene aceturate, increase contour length by unwinding the DNA double helix [25], whereas other molecules, such as Hoechst 33258, decrease the apparent value of this parameter by promoting DNA condensation [26].

Intercalators, on the other hand, are well recognized for increasing DNA contour and persistence lengths upon binding [27,18].

Thus, based on data of Figures 5 and 6, we propose the following mechanism of interaction between DPBP and DNA. For $C_T < 40 \mu\text{M}$, there was a strong decrease in persistence length, whereas contour length had only a slight increase. These observations strongly suggest that DPBP binds to the DNA minor groove at these concentrations. In general, ligands with a molecular weight of less than 1000 g/mol bind to the DNA minor groove floor instead of the major groove, as is the case of DPBP (314.38 g/mol) [28]. At higher concentrations, $C_T > 40 \mu\text{M}$, there was a considerable increase in persistence and contour lengths. This increase in mechanical parameters may be related to structural changes in the double helix as a result of the accommodation of DPBP molecules. Alternatively, there is a possibility of partial intercalation of DPBP molecules into the double helix by insertion of an aromatic ring between DNA base pairs. In any case, the sigmoidal shape of the contour length curve strongly suggests that groove binding is the dominant mechanism and that there is a

relatively high cooperativity between DPBP molecules upon binding, a feature incompatible with simple intercalative binding. Thus, intercalation, if it takes place here, is only a secondary binding mechanism. In fact, strong intercalators such as ethidium bromide and anthracycline antibiotics typically increase DNA contour length by 27–45%. In the present case, DPBP promoted an increase of only 16% in this mechanical parameter, corroborating the conclusions drawn above.

The binding parameters obtained from the model fitting were $K = (2.7 \pm 0.2) \times 10^4 \text{ M}^{-1}$ and $n = 5.1 \pm 1.5$. The value of the equilibrium constant (K) is compatible with the results obtained for some antineoplastic drugs, such as cisplatin [29], under similar experimental conditions (PBS, $[\text{Na}] = 150 \text{ mM}$). Typical intercalating antineoplastic drugs, such as doxorubicin, usually present high binding constants, in the order of 10^5 M^{-1} [18].

The relatively high value found for the Hill exponent ($n = 5.1$) confirms the high positive cooperativity of the present interaction, indicating that DPBP binding increases the affinity of the DNA molecule for subsequent binding, which can result in bound clusters along the double helix, as $n > 1$ [15]. Cisplatin and doxorubicin also exhibit positive cooperativity upon binding to DNA under similar experimental conditions, having Hill exponents of approximately 3.5 [18,28]. This property is important in chemotherapies because it indicates that DPBP has a narrow concentration range between the initial effective dose and the saturation dose when binding to the DNA molecule.

These results suggest that the molecular mechanism of action of DPBP within cells involves interaction with DNA. Upon binding to the biopolymer, DPBP changes the double-helix structure locally, which probably hinders fundamental processes such as transcription and DNA replication.

4. Conclusions

In the present study, we tested the antineoplastic efficiency of a novel dibenzoylmethane derivative, DPBP, on B16F10 melanoma cells. The selectivity results show that DPBP is a promising agent for the treatment of melanoma, as it presents a considerably high SI and a considerably low IC_{50} . In addition, we proposed that its molecular mechanism of action within cells involves binding to DNA. In fact, a direct interaction between DNA and DPBP was verified using optical tweezers. Minor

groove binding was determined as the main binding mode, although the possibility of a second binding mechanism (partial intercalation) could not be discarded. Important binding parameters, such as the equilibrium binding constant and the cooperativity degree, were determined, characterizing the physical chemistry of DPBP–DNA interaction. Thus, we characterized the efficiency of DPBP at a cellular level as well as at a molecular level.

Acknowledgements

We would like to thank FAPEMIG (APQ-00622-14), CNPq (443566/2014-3), and SUS-PPSUS (APQ-03497-13) for grants awarded to M.A.N.D.

References

- [1] INCA Brazilian National Institute of Cancer.
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/>. Accessed in 08/20/2017.
- [2] P. Lui, R. Cashin, M. Machado, M. Hemels, P.K. Corey-Lisle, T.R. Einarson, Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials, *Cancer Treat. Rev.* 33 (2007) 665–680.
- [3] L. Serrone, M. Zeuli, F.M. Segá, F. Cognetti, Dacarbazine-based chemotherapy for metastatic melanoma: thirty-year experience overview, *J. Exp. Clin. Cancer Res: CR*, 19 (2000) 21–34.
- [4] A.F. Magalhães, A.M.A. Tozzi, E.G. Magalhães, I.S. Blanco, M.A. Nogueira, Three Dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus latifolius*, *Phytochemistry* 46 (1997) 1029-1033. DOI: 10.1016/S0031-9422(97)00340-3.
- [5] M.A. Nogueira, E.G. Magalhães, A.F. Magalhães, D.N. Biloti, A. Laverde, F.B. Pessine, A.J. Marsaioli, A novel sunscreen agent having antimelanoma activity, *Il Farmaco* 58 (2003) 1163–1169. DOI: 10.1016/S0014-827X(03)00195-2.
- [6] M.T. Huang, Y.R. Lou, J.G. Xie, W. Ma, Y.P. Lu, P. Yen, B.T. Zhu, H. Newmark, C.T. Ho, Effect of dietary curcumin and dibenzoylmethane on formation of 7,12-dimethylbenz[a]-anthracene-induced mammary tumors and lymphomas/leukemias in Sencar mice, *Carcinogenesis* 19 (1998) 1697–1700.

- [7] J. Hong, M. Bose, J. Ju, J.H. Ryu, X. Chen, S. Sang, Modulation of arachidonic acid metabolism by curcumin and related beta-diketone derivatives: effects on cytosolic phospholipase A(2), cyclooxygenases and 5-lipoxygenase, *Carcinogenesis* 25 (2004) 1671–1679.
- [8] T. Choshi, S. Horimoto, C.Y. Wang, H. Nagase, M. Ichikawa, E. Sugino, Synthesis of DBM derivatives and inhibition of mutagenicity in *Salmonella typhimurium*, *Chem. Pharm. Bull.* 40 (1992) 1047–1049.
- [9] C.C. Lin, Y.L. Tsai, M.T. Huang, Y.P. Lu, C.T. Ho, S.F. Tseng, Inhibition of estradiol-induced mammary proliferation by DBM through the E2-ER-ERE-dependent pathway, *Carcinogenesis* 27 (2006) 131–136. DOI: 10.1093/carcin/bgi199.
- [10] K.M. Jackson, M. DeLeon, C.R. Verret, W.B. Harris, Dibenzoylmethane induces cell cycle deregulation in human prostate cancer cells, *Cancer Lett.* 178 (2002) 161–165. DOI: 10.1016/S0304-3835(01)00844-8.
- [11] A.Y. Plate, D.D. Gallaher, Effects of indole-3-carbinol and phenethyl isothiocyanate on colon carcinogenesis induced by azoxymethane in rats, *Carcinogenesis* 27 (2006) 287–292.
- [12] K. Singletary, C. Macdonald, M. Iovinelli, C. Fisher, M. Wallig, Effect of the h-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene, *Carcinogenesis* 19 (1998) 1039–1043.
- [13] R.K. Thimmulappa, T. Rangasamy, J. Alam, S. Biswal, Dibenzoylmethane activates Nrf2- dependent detoxification pathway and inhibits benzo(a)pyrene induced DNA adducts in lungs, *Med. Chem.* 4 (2008) 473–481. DOI: 10.2174/157340608785700199.
- [14] M.A. Nogueira, Obtenção de compostos que apresentam atividade antineoplásica e de aplicação potencial como filtro solar, BR PI 6583, Patent, 2000.
- [15] M.S. Rocha, Extracting physical chemistry from mechanics: a new approach to investigate DNA interactions with drugs and proteins in single molecule experiments, *Integr. Biol.* 7 (2015) 967–986. DOI: 10.1039/C5IB00127G.

- [16] V.D. Almeida, A. Leitão, L.D.C.B. Reina, C.A. Montanari, C.L. Donnici, M.T.P. Lopes, Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução, *Quim. Nova* 28 (2005) 118–129.
- [17] J.F. Marko, E.D. Siggia, Stretching DNA, *Macromolecules* 28 (1995) 8759–8770.
- [18] E.F. Silva, R.F. Bazoni, E.B. Ramos, M.S. Rocha, Dna-doxorubicin interaction: new insights and peculiarities, *Biopolymers* 107 (2016) e22998. DOI: 10.1002/bip.22998.
- [19] L. Siman, I.S.S. Carrasco, J.K.L. da Silva, M.C. Oliveira, M.S. Rocha, O.N. Mesquita, Quantitative Assessment of the Interplay Between DNA Elasticity and Cooperative Binding of Ligands, *Phys. Rev. Lett.* 109 (2012) 248103. DOI: 10.1103/PhysRevLett.109.248103.
- [20] K.R. Chaurasiya, T. Paramanathan, M.J. McCauley, M.C. Williams, Biophysical characterization of DNA binding from single molecule force measurements, *Phys. Life Rev.* 7 (2010) 299–341. DOI: 10.1016/j.plrev.2010.06.001.
- [21] L. Strekowski, B. Wilson, Noncovalent interactions with DNA: an overview, *Mutat. Res: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 623 (2007) 3–13.
- [22] A. Sischka, K. Toensing, R. Eckel, S.D. Wilking, N. Sewald, R. Ros, D. Anselmetti, Molecular mechanisms and kinetics between DNA and DNA binding ligands, *Biophys. J.* 88 (2005) 404–411.
- [23] G.L. Olsen, E.A. Louie, G.P. Drobny, S.Th. Sigurdsson, Determination of DNA minor groove width in distamycin-DNA complexes by solid-state NMR, *Nucleic Acids Res.* 31 (2003) 5084–5089.
- [24] I. Tessmer, C.G. Baumann, G.M. Skinner, J.E. Molloy, J.G. Hoggett, S.J.B. Tendler, S. Allen, Mode of drug binding to DNA determined by optical tweezers force spectroscopy, *J. Mod. Opt.* 50 (2003) 1627–1636.
- [25] K.E. Reinert, DNA Multimode Interaction with Berenil and Pentamidine; Double Helix Stiffening, Unbending and Bending, *J. Molec. Struct. Dyn.* 17 (1999), 311–331.

- [26] E.F. Silva, E.B. Ramos, M.S. Rocha, DNA Interaction with Hoechst 33258: Stretching Experiments Decouple the Different Binding Modes, *J. Phys. Chem. B*, 117 (2013) 7292–7296. DOI: 10.1021/jp403945e.
- [27] R.F. Bazoni, C.H.M. Lima, E.B. Ramos, M.S. Rocha, Force-dependent persistence length of DNA–intercalator complexes measured in single molecule stretching experiments, *Soft Matter* 11 (2015) 4306–4314. DOI: 10.1039/C5SM00706B.
- [28] D. Goodsell, R.E. Dickerson, Isohelical analysis of DNA groove-binding drugs, *J. Med. Chem.* 29 (1986) 727–733.
- [29] L. Oliveira, M.S. Rocha, Force spectroscopy unravels the role of ionic strength on DNA-cisplatin interaction: Modulating the binding parameters, *Phys. Rev.* 96 (2017) 032408. DOI: 10.1103/PhysRevE.96.032408.

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA IN VITRO E IN VIVO DE UM
DERIVADO DO DIBENZOILMETANO DE USO TÓPICO: ELUCIDAÇÃO DO
MECANISMO DE AÇÃO.**

1. INTRODUÇÃO

O melanoma é um tipo de neoplasia caracterizada por sua alta capacidade de formação de metástase tornando-o muito agressivo. Além disso, este apresenta diversas mutações genéticas significativas que lhe conferem características de resistência à quimioterapia. A mutação mais comum, que ocorre em 50% dos casos é a modificação da sequência aminoacídica da proteína BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1) que atua na via MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). (PALUNCIC et al., 2016; POSSIK, 2012)

A pesquisa por compostos inovadores e eficazes para o combate do melanoma é incessante. Os derivados do dibenzoilmetano (DBM) se destacam por apresentarem propriedades antitumorais, fotoprotetoras e antimicrobianas. Destes o 1,3-Difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP), objeto deste estudo, se destacou com uma atividade antineoplásica promissora contra células de melanoma, câncer de mama, mama resistente e pulmão (NOGUEIRA et. al., 2003). França (2013) investigou o composto DPBP frente as células de melanoma e o sucesso dos resultados obtidos estimulou outras investigações sobre o DPBP neste trabalho com a intenção de testar novas formulações do composto com diferentes concentrações e elucidar o possível mecanismo de ação do mesmo.

1.1 Abordagem *in silico*

A complexidade para a descoberta de um novo **NEC** (Nova entidade química ou New Chemical entities **NCE**) requer a integração de trabalhos na área de química e biologia onde o estudo dessas áreas se coaduna para a construção de um novo fármaco. Para que isso ocorra são necessárias duas fases a saber: a fase I também chamada pré-clínica (descoberta) e a fase II também chamada fase clínica (processamento) (MDL Toxicity database).

A fase pré-clínica necessita de muitas etapas para o seu desenvolvimento tais como abordagem do problema médico, seleção do alvo, síntese do composto estudos *in silico*, ensaios *in vitro*, ensaios *in vivo*, avaliação toxicológica, farmacológica, proteção intelectual estudo de mercado. Até finalmente chegar a fase clínica com todas as suas etapas e posterior lançamento do produto. Por isso a abordagem *in silico* tem sido tão amplamente utilizada para diminuir as chances de erro e maximizar as chances de sucesso do NCE. Neste sentido o estudo da ação terapêutica do

candidato a fármaco deve ser explorado visando conhecer os diversos caminhos que o composto deve percorrer até chegar ao seu alvo, desde a sua administração até atingir a circulação sistêmica por onde será carregado até seu alvo seu alvo. Esse estudo se chama fase farmacocinética. Para o estudo da fase farmacocinética é primordial o conhecimento de parâmetros gerais do processo caracterizados pela absorção (**A**), distribuição (**D**), Metabolismo (**M**) e excreção (**E**) do candidato a fármaco (conhecidos como **ADME**), que compõem os pilares desse processo. Antes que os estudos *in vivo* com fármaco candidato se inicie é necessário a utilização de programas de computador que simulem o comportamento farmacocinético do mesmo para que as chances de sucesso sejam maiores (JÓNSDÓTTIR et al., 2005).

Atualmente muitos esforços têm sido empregados no campo dos estudos *in silico* para estudo dessa propriedade. Dentre esses se destacam os estudos realizados em relação a absorção e permeabilidade (**A**) desenvolvido por Lipinski e colaboradores (1997) conhecido como a “Regra dos cinco” ou (*Rule of five*) que estabeleceu de maneira pioneira que candidatos a fármacos que apresentassem baixa absorção e permeabilidade e por que infringiriam duas das cinco regras estabelecidas que são:

- ✓ Massa molar (MM) < 500
- ✓ Número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) < 15
- ✓ Número de aceptores de hidrogênio (HBA) < 10
- ✓ Coeficiente de partição octanol/água (Log *P*) < 5

A partir então desses resultados novos estudos foram desenvolvidos dentre eles se destaca o de o de área de superfície polar PSA, do inglês *polar surface área*.

1.2 Vias de sinalização celular e melanoma

Os melanócitos não são exclusivos da epiderme. Estão distribuídos também nos folículos pilosos, dando pigmentação aos fios e em outros sítios anatômicos. No olho existe um conjunto de melanócitos na mucosa uveal e em outros tecidos, como a mucosa anogenital. Os melanomas originados de locais fora da pele podem apresentar aspectos clínicos, histopatológicos e genético diferentes dos melanomas cutâneos. Os melanócitos localizados na mucosa uveal, por exemplo, apresentam quantidades menores de mutações e as que mais se destacam são mutações que

ativam a proteína nucleotídeo guanina α q polipeptídeo (GNAQ) ou GNA11, acompanhadas de mutações que inativam BRCA1 (gene supressor de tumor) em conjunto com a proteína 1 (BAP1) ou ainda mutações na subunidade 1 do fator de splicing 3b (SF3B1) (SHAIN & BASTIAN, 2016).

O melanoma in situ, ocorre em áreas cronicamente expostas ao sol e tem sua origem a partir de mutações genéticas acumuladas por um longo período de tempo. As mutações mais comuns neste tipo de melanoma ocorrem na via MAPK, principalmente nos genes que codificam para as proteínas BRAF, NF1 e NRAS. Esta via regula crescimento, multiplicação e senescência. Parece que estas modificações genéticas no melanoma in situ estão relacionadas a evolução da doença para o melanoma invasivo, caracterizando o primeiro passo para a progressão da doença. (SHAIN & BASTIAN, 2016; MCARTHUR et al 2015).

O melanoma invasivo herda as mutações MAPK juntamente com as alterações de TERT adquiridas nos estágios iniciais. No melanoma maligno existe uma predominância da mutação germinativa CDKN2A e também do complexo SWI / SNF que atua na remodelação de cromatina. Na transição do melanoma in situ para o melanoma invasivo outras mutações aparecem, em especial ARID2 e ARID1A. A medida que o melanoma evolui vai acumulando mutações de estágios anteriores. A tabela 1 mostra as mutações relativas a cada estágio do desenvolvimento tumoral (SHAIN & BASTIAN, 2016)

O conhecimento das vias de sinalização alteradas no melanoma impulsionou diversas pesquisas por novas drogas específicas anti-melanoma, que possuíam como alvo as proteínas mutadas e assim novos medicamentos chegaram ao mercado como os inibidores de BRAF (vemurafenib e dabrafenib) e os inibidores de MEK (trametinib e cobimetinib) constituindo novas frentes terapêuticas para o melanoma em metástase. (MCARTHUR et al 2015).

Tabela 1: Mutações comuns e seu papel durante a progressão do melanoma

Via	Gene	Mutação	*Subtipo	**Fase de progressão	Estágio
MAPK	BRAF	V600E	Não-CSD	Naevi	Início
	BRAF	V600K, K601E e G469A, entre outras alterações agrupadas	CSD	Intermediário e lesão MIS	Início
	NRAS	Q61R e Q61K, entre outras mutações comuns que afetam os códons 61 ou 12	CSD	Intermediário e lesão MIS	Início
	NF1	Mutações incapacitantes que ocorrem em todo o gene e deleções	CSD	MIS	Início
Telomerase	TERT	Mutações promotoras que afetam as coordenadas de hg19, 1,295,228 ou 1,295,250, entre mutações próximas, menos comuns	CSD e não CSD	Intermediário e lesão MIS	Progressão

RB	CDKN2A	Deleções e mutações incapacitantes que ocorrem em toda a região de codificação	CSD e não CSD	Melanoma invasivo	Progressão
Remodelação de Cromatina	ARID1A, ARID1B e/ou ARID2	Mutações incapacitantes que ocorrem em toda a proteína	CSD e não CSD	Melanoma invasivo	Progressão
PI3K	PTEN	Mutações incapacitantes que ocorrem em toda a proteína	Não CSD	Melanomas invasivos mais grossos	Progressão avançada
p53	TP53	Mutações incapacitantes que ocorrem em toda a proteína	CSD	Melanomas invasivos mais grossos	Progressão avançada

Legenda: ARID, domínio de interação rico em AT; CDKN2A, inibidor de quinase dependente de ciclina 2A; CSD: dano por exposição crônica ao sol; MIS, melanoma in situ; NF1, neurofibromina 1; TERT, transcriptase reversa da telomerase. * Subtipo refere-se ao subtipo (s) de melanoma predominantemente associado à mutação. **A fase de progressão refere-se à fase de progressão mais precoce em que a mutação ocorre normalmente.

Fonte: (SHAIN & BASTIAN, 2016)

As células de melanoma também expressam o ligante 1 da proteína 1 de morte celular programada (PDL1) e também PDL2 abrindo caminho para o desenvolvimento de fármacos imunobiológicos que potencializam a ação das células T citotóxicas e células natural killer contra as células de melanoma. (PALUCH et al 2018). Esquemas terapêuticos compostos pela combinação de medicamentos inibidores de vias específicas e imunobiológicos melhoram a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes com melanoma metastático.

1.3 Angiogênese e o melanoma

A formação de novos vasos sanguíneos é fundamental para o crescimento de novos tecidos. O gerenciamento da angiogênese a partir da vascularização existente ocorre pelo equilíbrio entre os fatores estimulantes e os que a bloqueiam. Nas neoplasias a angiogênese é essencial para o desenvolvimento do câncer e está diretamente ligada com a metástase. No melanoma a alta capacidade de metástase torna as vias angiogênicas alvos terapêuticos importantes para controle da progressão da doença. (JOUR et al, 2016; HANAHAN; WEINBERG, 2011)

Os fatores envolvidos na angiogênese do melanoma são: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator básico de crescimento de fibroblasto (bFGF); interleucina 8 (IL-8); integrinas; ativador de plasminogênio de Uroquinase; fator de crescimento derivado de plaquetas; angiopoietina; matriz metaloproteinase. O VEGF possui 5 isoformas e as VEGF 165 e VEGF 121 são as que apresentam alta expressão no melanoma e atua juntamente com bFGF como os principais promotores de sua vascularização. (JOUR et al, 2016)

O crescimento do melanoma ocorre em duas fases. A primeira denominada radial e a segunda vertical. (KUMAR et al., 2015). A progressão vertical atinge camadas mais profundas da pele e necessita de intensa atividade angiogênica. A vascularização do tumor está diretamente ligada a sobrevida do paciente. Tumores muito vascularizados apresentam maior incidência de ulceração, que representa um prognóstico ruim. (KASHANI-SABET et al, 2002). Parece existir uma correlação entre a densidade microvascular, a densidade linfovascular, a espessura e diâmetro do tumor com a progressão do melanoma. A profundidade do tumor (índice Breslow de pelo menos 2 mm) está aparentemente relacionado com a densidade de vasos sanguíneos, quando mais intensa a vascularização maior a profundidade alcançada.

De forma similar, a capacidade de formação de metástase se mostra diretamente relacionada a densidade de vasos linfáticos que permite a invasão com maior facilidade. (AUNG et al 2015)

O VEGF e a IL-8 apresentam-se de forma independente quando avaliamos os riscos de recorrência ou de metástase no melanoma. Pesquisas sobre o VEGF como marcador de sobrevida do paciente livre de progressão do tumor não apresenta estudos conclusivos. Por outro lado a IL-8 e seu receptor (CXCR2) estão envolvidos na transição da fase radial para a vertical, ainda estudos têm demonstrados que em casos de melanoma avançado ambos são expressos de forma significativa. Assim, a IL-8 pode ser usada como um indicador de resposta ao tratamento quimioterápico em pacientes com melanoma em estágio IV. Uma vez que, os pacientes que respondem à quimioterapia de forma satisfatória apresentam níveis séricos de IL-8 menores que os pacientes refratários ao tratamento. (SINGH et al 2009)

O presente capítulo teve por objetos a elucidação do tipo de morte celular e o mecanismo envolvido no processo. Bem como, realizar testes *in vivo* para avaliar a eficácia do DPBP.

2. MATERIAL e MÉTODO

2.1 Teste de citotoxicidade

2.1.1 Cultura de células

As linhagens celulares utilizadas foram: Melan-A, estabelecida a partir de melanoblastos normais (BENNETT et al., 1987); B16F10, estabelecida a partir de células de melanoma murino (FIDLER, 1975). Todas as linhagens celulares foram cultivadas em meios completos, ou seja, meios suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (anfotericina B; Penicilina e estreptomicina) em frascos de cultura de 25 cm², de poliestireno, em incubadora à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Todavia, cada tipo foi cultivado de acordo com suas peculiaridades: as células Melan-A foram cultivadas em meio “Roswell Park Memorial Institute” (RPMI) suplementado com 200 nM de Phorbol-12-miristato-13-acetato (PMA), as células TM5 foram cultivadas em meio RPMI completo e a linhagem B16F10 foi cultivada em meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM).

Quando as culturas atingiram a semiconfluência, as células foram tripsinizadas, replaqueadas e mantidas nas condições acima descritas. As culturas

foram periodicamente observadas em microscópio de luz invertido, e alíquotas foram congeladas e descongeladas, de acordo com a necessidade do experimento.

2.1.2. Tripsinização

Após o cultivo celular até a subconfluência, procede-se o descarte do meio de cultura, as células foram lavadas com PBS pH 7,4 e incubadas a 37°C com solução de tripsina a 0,25% e 0,05% de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) até que, sob observação microscópica, foi detectada a dissociação das células entre si, e destas com o substrato. A reação de tripsinização foi interrompida pela adição de 5,0 mL de meio completo contendo 10% de soro fetal bovino. A suspensão celular foi, então, coletada em tubo de centrifuga e centrifugada a 600 G, por 5 minutos, em temperatura ambiente. O meio sobrenadante foi cuidadosamente descartado e as células ressuspendidas em meio completo. Após efetuar a contagem celular, com teste de viabilidade, volumes da suspensão celular foram subcultivadas contendo o número desejado de células.

2.1.3. Contagem de células viáveis

As contagens das células viáveis foram efetuadas em hemocitômetro de Neubauer após o carregamento de ambas as câmaras com a suspensão celular, obtida por meio da tripsinização da cultura celular desejada. Para o cálculo da concentração de células utiliza-se a fórmula:

$$\text{Número de Células/mL} = \text{Número total de Células} \times 10^4 / \text{Número de quadrantes contados}$$

Para a determinação do número de células viáveis foi utilizado o teste de exclusão de corante, que consiste na incubação de uma alíquota de células com solução de Azul de Tripán a 0,1 % (diluição 1:1), por dez minutos a 37 °C. Células híidas excluem o corante. Para o cálculo da percentagem de células viáveis utiliza-se a fórmula:

$$\% \text{ de células viáveis} = \text{Número de células viáveis} \times 100 / \text{Número total de células}$$

2.1.4. Criopreservação e Descongelamento

Quando necessário, alíquotas de células foram congeladas após tripsinização rotineira de culturas semiconfluentes. A interrupção da reação de tripsinização foi realizada com adição de meio completo e lavagem das células por centrifugação a 600 G, por 5 minutos. As células foram, então, ressuspensas em meio suplementado com 40% de soro fetal bovino e contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), e as suspensões celulares acondicionadas em criotubos de até 1,8 mL, que permaneceram no freezer *overnight* e foram posteriormente transferidos para o nitrogênio líquido (-196 °C), onde foram armazenados.

Para o descongelamento, criotubos com células da linhagem celular de interesse foram mantidos a 37 °C, durante 5 minutos. A suspensão celular foi diluída em meio completo em frasco de cultura de 25 cm², mantida a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade por 12 – 18 horas e posteriormente, no dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por um novo meio completo.

2.1.5. Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT

As células foram plaqueadas em placas de 96 poços com fundo chato na concentração de 1×10^3 células/mL para as linhagens de B16F10 e TM5 e na concentração de 1×10^4 células/mL para a linhagem Melan-A. Cada poço recebeu 100 µL de meio e suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade em seus respectivos meios de cultura. Após este período, o meio de cultura foi retirado e foi adicionado meio de cultura completo contendo as concentrações do medicamento Dacarbazina (1.000; 1.500; 2.000; 2.500; 3000; 6000; 9000 e 12.000 µMol/L), e do composto 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DPBP) (0,39 µMol/L a 25 µMol/L) e do composto de partida Dibenzoilmetano (DBM) (0,39 µMol/L a 25 µMol/L) e estas foram incubadas por 60 horas à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Uma vez que os compostos foram diluídos em DMSO e que, a partir destas soluções estoques foram obtidas as soluções nas concentrações descritas acima com concentração final de DMSO não inferior 0,5%. Os controles deste ensaio (100% de células viáveis) foram realizados com meio de cultura contendo 0,5% de DMSO (v/v).

Após este período, o meio contendo as drogas foi retirado, todos os poços foram lavados com PBS e foi adicionado em cada poço 50 µL de uma solução de

MTT (3-{4,5- dimetiltiazol-2-il}-2,5-difeniltetrazólio bromido) a 0,5 mg/mL em meio de cultura completo e estas e estas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por um período de 4 horas. Após este período o MTT foi retirado de todos os poços e em seguida foi adicionado 100 µL de DMSO a cada poço para dissolução dos cristais de formazan. As placas foram submetidas a leitura das absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis em relação ao controle (sem tratamento).

2.1.6. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células (IC50)

O valor da concentração inibitória de 50% das células (IC50) foi calculado utilizando uma regressão não-linear log [Dose] versus Resposta normalizada (porcentagens de células viáveis) determinados pelos programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®.

2.2. Índice de seletividade

A concentração inibitória de 50% das células (IC50) foi obtida para cada linhagem e utilizou para o cálculo do índice de seletividade (IS) do composto. O IS indica a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, e o potencial uso terapêutico deste composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da IC50 do composto sobre a linhagem de células normais (Melan-A) e o valor da IC50 do composto sobre a linhagem de células neoplásicas (B16F10 e TM5), ou seja:

$$IS = \frac{IC50 \text{ melanA}}{IC50 \text{ linhagem neoplásica}}$$

2.3. Citometria de Fluxo

Células B16F10 (1×10^6) foram plaqueadas em placas de petri de 60 x 90 cm. As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa em seus respectivos meios de cultura. Após este período, foi adicionada a concentração equivalente ao IC90 do composto e estes foram incubadas por 16 horas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Em seguida, as células foram tripsinizadas, a interrupção da reação de tripsinização foi realizada com adição de meio completo

e lavagem das células por centrifugação a 600 g por 5 minutos. O precipitado foi ressuspensão em 1 mL de PBS. Ao término dessa etapa, a suspensão de células foi centrifugada a 600 g por 5 minutos e o pellet foi ressuspensão em 1 mL de tampão Hanks. Foi realizada uma contagem das células e ajustou-se a concentração para 10^5 células/mL. Na sequência, foram adicionados 5 μ L de Anexina V-FITC (Isotiocianato de fluoresceína) (ImmunTools). Após 20 minutos de incubação ao abrigo de luz, foram adicionados 5 μ L de iodeto de propídio (PI) e posteriormente foi feita a leitura dos dados em citômetro de fluxo (CYAN – Dako Cytomation), no Núcleo de Microscopia e Microanálise da Universidade Federal de Viçosa. Os resultados foram apresentados em forma de dot-plot dividido em quatro quadrantes. Foram classificadas como células em apoptose inicial aquelas com marcação somente para Anexina-V (AN^+/PI^-), e como células em apoptose tardia, aquelas com dupla marcação de Anexina V e PI (AN^+/PI^+), células em necrose somente marcação para PI (AN^-/PI^+) e células viáveis não apresentam nenhuma marcação

2.4. Abordagem molecular

2.4.1. Extração do RNA total de células B16F10

A linhagem celular B16F10 foi cultivada em meios DMEM suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (anfotericina B; Penicilina e estreptomicina) em placas de cultura de 20 cm², de poliestireno, em incubadora à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. As culturas foram periodicamente observadas em microscópio de luz invertido, até ser atingido a semiconfluência.

As culturas de células subconfluentes, foi então adicionado 1mL de Reagente Tri (Sigma) para cada 10cm² de área superficial, a solução foi então solubilizada e transferida a um tubo e deixado em repouso por 5 minutos. Após esse tempo, foi adicionada 0,4 mL de clorofórmio (Sigma), o tubo, então, foi tampado e agitado rigorosamente por 15 segundos e repouso de 15 minutos e em seguida o tubo foi centrifugado a 12.000 xg, por 15 minutos e 4°C. A fração referente ao RNA total foi coletada. A esta fração foi adicionado 1 mL de 2-propanol (Sigma). A solução foi homogeneizada e deixada em repouso por 10 minutos. Depois, a solução foi centrifugada a 12.000xg, 10 minutos e 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensão com 2mL de etanol (Sigma) 75%, então, vortexado e centrifugado

a 7500xg, 5 minutos, 4°C. O Sobrenadante foi descartado, o tubo foi brevemente seco em cabine de segurança biológica e foi adicionado 50 µL de água RNase free. Toda a bancada e material de trabalho foram tratados com solução RNAPrep (Invitrogen, San Diego, CA, USA) para remoção de RNAses, evitando-se a degradação do RNA total das amostras.

A qualidade do RNA total extraído foi avaliada pela integridade das bandas do RNA ribossômico em gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídeo (SAMBROOK et al., 2001). A pureza e concentração das amostras foram determinadas pela leitura de 1 ul de amostra em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific®), que fornece automaticamente as concentrações de RNA em ng/uL, bem como as razões A260/A280 e A260/A230 indicando assim a qualidade do RNA extraído, nessa etapa buscou-se um resultado na faixa de 1,8 a 2,2 indicando uma ótima qualidade de amostra para utilização em etapas posteriores. Após extração, quantificação e verificação de sua integridade, as amostras de mRNA total foi armazenadas a -80°C até a síntese de cDNA.

2.4.2 Síntese do cDNA para avaliação da expressão gênica por RTq-PCR

A síntese do cDNA foi obtida através da transcrição reversa do mRNA, utilizando o iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), de acordo com as recomendações do fabricante. Detalhadamente, a partir de aproximadamente 2 µg de RNA total extraído das células da linhagem B16F10 realizou-se a síntese de cDNA tendo por molde o mRNA. Para minimizar o viés inerente da técnica de qPCR, algumas etapas foram verificadas. Inicialmente, após a extração do RNA total da amostra a mesma foi purificada com a utilização do Kit RNeasy, Invitrogen®, de acordo com as recomendações descritas no manual do fabricante, foram avaliadas a concentração e a integridade do produto extraído. Para manter a qualidade e a integridade da amostra foi adicionado ao RNA extraído a DNase I (Sigma). A concentração do cDNA sintetizado foi avaliado pela leitura de 1 ul de amostra em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific®), tendo como ideal um resultado na faixa de 1,8 a 2,2 indicando uma ótima concentração de amostra para utilização em etapas posteriores.

2.4.3 Desenho de primers, teste de concentração e eficiência para validação da qPCR

Após a síntese do cDNA foram desenhados X primers utilizados na amplificação do cDNA dos genes alvo. Para tanto utilizamos o aplicativo Primer express 3.0 (<https://products.appliedbiosystems.com>). Todos os primers foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies, IDT (Coralville, Iowa, USA). Foram desenhados X primers para genes que possuem relevância na via de apoptose celular e para três genes candidatos a genes de referência (tabela xx).

Tabela 2: Lista de genes alvo.

Nome	Símbolo	Função	Referências
Actin, beta	Actb	Este gene codifica um membro da família actina de proteínas. As actinas são proteínas altamente conservadas que estão entre as proteínas mais abundantes nas células eucarióticas e estão envolvidas na motilidade, estrutura e integridade das células. A localização, estabilidade e tradução do mRNA transcrito são reguladas através da ligação de múltiplos fatores à sua sequência 3' UTR. Camundongos knockout homocigotos para este gene apresentam letalidade embrionária. Numerosos pseudogenes deste gene foram identificados no genoma do rato [fornecido por RefSeq, setembro de 2015].	Patrinostro, X. et al (2018); Perrin, B. J., & Ervasti, J. M. (2010)
Apoptotic peptidase activating factor 1	Apaf1	Este gene codifica uma proteína citoplasmática que inicia a apoptose. Esta proteína contém um domínio de recrutamento de caspase e um domínio de ATPase. O apoptossoma ativa a Caspase 9 e estimula a cascata de caspases subsequentes que compromete a célula a apoptose.	Yoshida, H. et al. (1998); Hara, H. et al. (2002).
BCL2-associated X protein	Bax	A proteína codificada por este gene pertence à família das proteínas BCL2. Os membros da família BCL2 formam hetero ou homodímeros e agem como reguladores anti- ou pró-apoptóticos que estão envolvidos em uma ampla variedade de atividades celulares. Esta proteína forma um heterodímero com BCL2 e funciona como um ativador apoptótico. Esta proteína é relatada para interagir e aumentar a abertura do canal aniônico dependente de voltagem mitocondrial (VDAC), o que leva à perda do potencial de membrana e à liberação do citocromo c. A expressão deste gene regulada pelo supressor tumoral P53 e demonstrou estar envolvida na	Oltval, Z. N. et al. (1993); Lotem, J., & Sachs, L. (1995)

		apoptose mediada por P53. [Fornecido por RefSeq, julho de 2008]	
B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl2	Este gene codifica um membro da família de proteínas Bcl2. Os membros desta família regulam a morte celular em múltiplos tipos de células e podem ter atividades pró-apoptóticas ou antiapoptóticas. A proteína codificada por este gene inibe a apoptose mediada por mitocôndrias. Esta proteína é uma proteína integrante da membrana mitocondrial externa que funciona como parte da via de sinalização que controla a permeabilidade mitocondrial em resposta a estímulos apoptóticos. Esta proteína também pode desempenhar um papel na sobrevivência e autofagia das células neuronais. Expressão anormal e translocações cromossômicas desse gene estão associadas à progressão do câncer em numerosos tecidos. Splicing alternativo resulta em várias variantes de transcrição. [Fornecido por RefSeq, setembro 2015].	Oltval, Z. N. et al. (1993); Lotem, J., & Sachs, L. (1995)
BH3 interacting domain death agonist	Bid	Este gene codifica um agonista da morte que se heterodimeriza com o agonista BAX ou o antagonista BCL2. A proteína codificada é um membro da família BCL2 de reguladores de morte celular. É um mediador do dano mitocondrial induzido pela caspase-8 (CASP8), onde desencadeia a liberação do citocromo c. Diversas variantes transcritas processadas alternativamente foram encontradas, mas a natureza completa de algumas variantes não foi definida. [Fornecido por RefSeq, julho de 2008]	Wang, K. et al. (1996); Footz, T. K. et al. (1998); Neitemeier, S. et al. (2017)
Cyclin Dependent Kinase 1	CDK1	A proteína codificada por este gene é um membro da família da proteína quinase Ser/Thr. Esta proteína é uma subunidade catalítica do complexo proteína quinase altamente conservado conhecido como fator de promoção da fase M	Malumbres, M. et al. (2009); Lindqvist, A. et al. (2009); Aoki, F. et al. (1992)

		(MPF), que é essencial para as transições de fase G1 / S e G2 / M do ciclo celular eucariótico. Ciclinas mitóticas associam esta proteína de forma estável e funcionam como subunidades reguladoras. A atividade quinase dessa proteína é controlada pelo acúmulo e destruição da ciclina ao longo do ciclo celular. A fosforilação e desfosforilação desta proteína também desempenham importantes papéis reguladores no controle do ciclo celular. Alternativamente, variantes transcritas processadas codificando diferentes isoformas foram encontradas para este gene. [Fornecido por RefSeq, março 2009]	
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	FasI	Este gene é um membro da superfamília do fator de necrose tumoral. A função primária da proteína codificada é a indução de apoptose desencadeada pela ligação à FAS.	Takahashi, T. et al. (1994); Stuart, P. M. et al. (1997)
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	Este gene codifica um membro da família da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase. A proteína codificada foi identificada como uma proteína clandestina baseada em sua capacidade de realizar funções mecanicamente distintas. A proteína codificada foi originalmente identificada como uma enzima glicolítica chave que converte o D-gliceraldeído 3-fosfato (G3P) em fosfato de 3-fosfo-D-glicerol. Estudos subsequentes atribuíram uma variedade de funções adicionais à proteína, incluindo a nitrosilação de proteínas nucleares, a regulação da estabilidade do mRNA e a atuação como um receptor de transferrina na superfície celular do macrófago. Resultados de splicing alternativo em múltiplas variantes de transcrição. Muitos pseudogenes semelhantes a	Raje, C. I. et al. (2007)

		este locus são encontrados em todo o genoma do rato. [Fornecido por RefSeq, janeiro de 2014].	
Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	P21	Este gene codifica um potente inibidor de quinase dependente de ciclina. A proteína codificada funciona como um regulador da progressão do ciclo celular na etapa G1. A expressão deste gene está rigidamente controlada pela proteína supressora de tumor p53, através da qual esta proteína medeia a paragem da fase G1 do ciclo celular dependente de p53 em resposta a uma variedade de estímulos de stress. Esta proteína pode interagir com o antígeno nuclear da célula em proliferação, um fator acessório da DNA polimerase, e desempenhar um papel regulador na replicação do DNA em fase S e no reparo do dano ao DNA. Esta proteína foi relatada como sendo clivada por caspases tipo CASP3, o que leva a uma ativação da quinase dependente de ciclina 2, sendo útil na execução da apoptose após a ativação da caspase. Os ratos que não possuem esse gene têm a capacidade de regenerar tecidos danificados ou ausentes. Resultados de splicing alternativo em múltiplas variantes de transcrição. [Fornecido por RefSeq, setembro 2015].	Bedelbaeva, K. et al. (2010)
P53 induced death domain protein 1	Pidd1	A proteína codificada por este gene contém uma repetição rica em leucina e um domínio de morte. Demonstrou-se que esta proteína interage com outras proteínas do domínio da morte, tais como o Fas (TNFRSF6), associado via domínio de morte (FADD) e proteínas contendo o domínio da morte ativando MAP-quinase (MADD) e, portanto, pode funcionar como uma proteína adaptadora para processos de sinalização relacionados à morte celular. Em camundongos este gene é regulado positivamente pelo supressor de tumor	Telliez, J. B. et al. (2000); Bock, F. J. et al. (2012)

		p53 e induz a apoptose celular em resposta a danos no DNA, o que sugere um papel para este gene como um efetor de apoptose dependente de p53. Resultados de splicing alternativo em múltiplas variantes de transcrição. [Fornecido por RefSeq, agosto 2010]	
BCL2 binding component 3 (Bbc3)	Puma	Este gene codifica um membro da família de proteínas BCL-2. A proteína coopera com proteínas ativadoras diretas para induzir a permeabilização e apoptose da membrana externa mitocondrial. Pode ligar-se a membros da família Bcl-2 anti-apoptóticos para induzir disfunção mitocondrial e ativação de caspases. Por causa de seu papel pró-apoptótico, esse gene é um potencial alvo de drogas para tratamento de câncer e para lesão de tecidos. Resultados de splicing alternativo em múltiplas variantes de transcrição. [fornecido por RefSeq, dez 2011]	Ren, D. et al. (2010); Han, J. W. et al. (2001); Nakano, K., & Vousden, K. H. (2001)
Sirtuin 1	Sirt1	Este gene codifica um membro da família sirtuina de proteínas, caracterizado por sua atividade desacetilase e papel proposto na longevidade. A proteína codificada regula a expressão gênica em uma ampla gama de tipos de células e tecidos através de sua desacetilação dependente de NAD + de histonas, fatores de transcrição e coativadores transcricionais. Resultados de splicing alternativo em múltiplas variantes de transcrição. [fornecido por RefSeq, setembro 2015].	Giblin, W. et al. (2014); Frye, R. A. (1999)
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily	TNFSF10	A proteína codificada por este gene é uma citocina que pertence à família do ligante do fator de necrose tumoral (TNF). Esta proteína induz apoptose em células transformadas e tumorais, mas não parece matar células normais, embora seja expressa significativamente na maior parte dos tecidos normais. Demonstrou-se que a ligação	French, L. E., & Tschopp, J. (1999); Pitti, R. M. et al. (1996); Wiley, S. R. et al. (1995)

y, member 10		desta proteína a seus receptores desencadeia a ativação de MAPK8 / JNK, caspase 8 e caspase 3. Alternativamente, variantes transcritas processadas que codificam diferentes isoformas foram encontradas para este gene. [fornecido por RefSeq, julho de 2010]	
Tubulin, beta 4A class IVA	Tubb4a	Este gene codifica um membro da família da beta tubulina. As tubulinas beta são uma das duas principais famílias de proteínas (tubulinas alfa e beta) que se heterodimerizam e se reúnem para formar microtúbulos. [Fornecido por RefSeq, janeiro 2014]	Hall, J. L. et al. (1983); Lee, M. G. S. et al. (1984); Lohmann, K. et al. (2013)

Tabela 3: Genes alvo e sequência de Primers

Nome	Símbolo	Sequencia direta	Sequencia reversa	GeneBank
Actin, beta	Actb	5'GCCGGGACCTGACAGACTAC3'	5'TGGCCATCTCCTGCTCGAAG3'	NM_007393
Apoptotic peptidase activating factor 1	Apaf1	5'GCTGCTCTTCCCAGCACAAC3'	5'ACAATTGCGGGCCTTTGCAT3'	NM_009684
BCL2-associated X protein	Bax	5'CCAGGATGCGTCCACCAAGA3'	5'TCCGTGTCCACGTCAGCAAT3'	NM_007527
B-cell leukemia/lymphoma 2	Bcl2	5'TGTGCCGTTGTCTCTTCGGT3'	5'CCAGACGAAGTTGCCCTCCA3'	NM_009741
BH3 interacting domain death agonist	Bid	5'GCTCTGGGCTGTCTTCACCA3'	5'TCCACTAGGCTGGGTGGACT3'	NM_007544
Cyclin Dependent Kinase 1	CDK1	5'TGAGCTCAGGCCTCGTGATG3'	5'CAGCCAGCTTTGGTGCACTT3'	NM_007659
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	Fasl	5'CCTCATGACCGCAAGGTCCA3'	5'GTCACACAGCAGCCCAAAGC3'	NM_010177
Glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase	Gapdh	5'AAGGCTGTGGGCAAGGTCAT3'	5'TTCAGTGGGCCCTCAGATGC3'	NM_008084

Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	P21	5'TGTGCCGTTGTCTCTTCGGT3'	5'CCAGACGAAGTTGCCCTCCA3'	NM_007669
P53 induced death domain protein 1	Pidd1	5'ACAGCTGCTGCAAGTGGAGT3'	5'TGGCCACCTTTGAGGACCAG3'	NM_022654
BCL2 binding component 3 (Bbc3)	Puma	5'GCATACTGGACTGCCAGCCT3'	5'TGAGTCCTTCAGCCCTCCCT3'	NM_133234
Sirtuin 1	Sirt1	5'CTTGCGGTGGACTTCCCAGA3'	5'GTGACACAGAGACGGCTGGA3'	NM_019812
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	TNFSF10	5'CTCCTGCAGGCTGTGTCTGT3'	5'AACCTGCAAGCAGGGTCTGT3'	NM_020275
Tubulin, beta 4A class IVA	Tubb4a	5'CCACCACCATGCGGGAAATC3'	5'TCGATGCCGTGCTCATCACT3'	NM_009451

As qRT-PCR foram realizadas no aparelho StepOne (Applied Biosystems) relacionando os valores de C_p , parâmetro que indica o ponto em que a fluorescência aumenta acima do ruído, ou seja, onde a fluorescência atinge níveis aumentados indicando a presença de uma fluorescência maior que a do corante utilizado na normalização de qPCR de DNA dupla fita (Crossing point, ou Cycle threshold). A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método da curva de calibração normalizada visto que as eficiências dos primers não foram comparáveis (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Para detecção da reação utilizou-se o sistema SYBR Green Master Mix (Thermocientific®). Todas as amostras dos experimentos de qPCR foram realizadas em replicatas, em cada placa de reação tendo um controle negativo (Negative Template Control, NTC) para cada alvo estudado além do controle endógeno.

Após a síntese dos primers realizou-se o teste de concentração e eficiência dos mesmos através de qPCR. Para o teste de concentração foram preparadas soluções de primers forward e reverse na concentração de 4 μ M e 10 μ M (soluções estoque), tendo como mix para uma reação 6 μ L de 2X SYBR Green Master Mix (Thermocientific®), 3 μ L de primer F/R nas concentrações de 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 μ M, 2 μ L de água nuclease free (Ambion®) e 1 μ L de cDNA. Para o teste de eficiência utilizou-se as diluições seriadas de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 μ M de cDNA. O R^2 da regressão foi calculado para cada gene para verificar a eficiência das reações. A análise estatística dos resultados foi realizada no aplicativo GraphPad Prism, foram utilizados os testes de ANOVA-way com um nível de confiança de 95% (5% de erro amostral) na comparação dos grupos de células sem estímulo da droga e com o estímulo da droga. O programa para amplificação no teste de concentração e de eficiência foi de 2 passos sendo Holding 95 °C, 10 min.; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 seg.; anelamento e extensão a 60 °C por 1 min. Após amplificação de 40 ciclos realizou-se a desnaturação gradual com vistas a realização da curva de dissociação (curva de melt) utilizando o aumento de 0,3 °C por 1 min partindo de 60 °C até o limite de 95 °C. As curvas de concentração das análises das amostras foram realizadas com 7 pontos de concentração sendo 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 μ M. A expressão dos genes endógenos foi usada para normalizar os dados provenientes do qRT-PCR. Os resultados foram analisados usando ANOVA e os gráficos foram construídos utilizando GraphPad Prism 5.0 program (GraphPad Inc.).

2.5. Abordagem *in silico*

2.5.1 SMILES

Para uma abordagem *in silico*. Inicialmente a estrutura química foi desenhada no programa ChemDraw e assim foi obtido a linha de código SMILE (Simplified Molecular Input Line Entry Specification) da molécula, essa linha de código foi utilizada para a determinação do perfil farmacocinético e toxicológico.

2.5.2 Perfil farmacocinético e toxicológico

Dois algoritmos de predição de Correlação Quantitativa Estrutura-Atividade (QSAR) foram utilizados para traçar um perfil do composto sintético. O primeiro, preditivo para toxicológica modular da plataforma LAZAR *in silico* toxicology (<https://lazar.in-silico.ch/predict>) (Maunz *et al.*, 2013) se baseia na similaridade de estruturas químicas. Já a predição dos parâmetros de absorção, distribuição metabolismo excreção e toxicidade (ADMET) são baseados em similaridade QSAR foram determinados utilizando o algoritmo farmacocinético pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) (Pires *et al.*, 2015)

2.5.3 Determinação da dose para os animais

As doses utilizadas nos animais foram determinadas a partir dos dados da análise do composto *in vitro* e *in silico*. Esses dados foram utilizados em fórmulas para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos e da dose a ser utilizada por quilograma de peso do animal. (STORPIRTIS *et al* 2011). Inicialmente, os parâmetros que apresentaram valores em função logarítmica tiveram seus valores convertidos para as unidades correspondentes.

O tempo de meia vida do medicamento ($T_{1/2}$) pode ser calculado pela fórmula (I):

$$T_{1/2} = \frac{(0,693 \times Vd_{ss})}{CL} \quad (I)$$

A seguir, pôde-se proceder com o cálculo da velocidade de eliminação (K_{el}), com a fórmula (II):

$$K_{el} = \frac{0,693}{T_{1/2}} \quad (II)$$

O cálculo da dose a ser usada, teve a fórmula deduzida utilizando a relação da concentração plasmática máxima (C_{ss}) (III):

$$C_{ss} = \frac{F \times D}{K_{el} \times V_{dss} \times T} \quad (III)$$

Que considera a biodisponibilidade (F) do composto, a dose (D) utilizada, a velocidade de eliminação (K_{el}) e distribuição (V_{dss}) e o tempo (T) entre doses.

Substituindo $T_{1/2}$ de (I) em (II) temos que:

$$K_{el} = 0,693 \times \frac{CL}{(0,693 \times V_{dss})}$$

$$K_{el} = \frac{CL}{V_{dss}}$$

$$Cl = K_{el} \times V_{dss}$$

Substituindo esse valor de CL em (III), temos que:

$$C_{ss} = \frac{F \times D}{Cl \times T}$$

Considerando que a C_{ss} deve ser a concentração alvo, ou seja, o valor de IC_{50} dividido pela fração livre (F_u) no sangue, temos que:

$$\frac{IC_{50}}{F_u} = C_{ss} = \frac{F \times D}{Cl \times T}$$

Para calcular a dose D , temos que:

$$D = \frac{IC50 \times Cl \times T}{Fu \times F}$$

Para formulações transdérmicas, temos que considerar a biodisponibilidade intravenosa, $F = 1$, temos que:

$$D = \frac{IC50 \times Cl \times T}{Fu}$$

Para pomadas, o produto de Fu e F equivale ao coeficiente de permeabilidade (Kp), ou seja:

$$Fu \times F = Kp$$

Logo:

$$D = \frac{IC50 \times Cl \times T}{Kp}$$

2.6. Testes *in vivo*

Camundongos machos da linhagem C57BL/6, de 7-8 semanas de idade pesando em média 20 ± 5 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, foram mantidos em biotério ventilado do laboratório de Biofármacos, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, na Universidade Federal de Viçosa (UFV). Todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais de acrílico translúcido, Alesco^R, de 24 x 37 x 19 cm, forradas com maravalha, em ambiente com condições controladas (22 ± 2 °C, $60 \pm 5\%$ umidade), com ciclo claro/escuro de 12h, separados por grupos. Receberam dieta padrão e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as normas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFV e foram aprovados pelo referido órgão, através do processo nº 59/2015.

Os animais foram mantidos no biotério do laboratório Biofármacos por 1 semana antes do início do experimento para ambientação. Após este período os animais foram separados em 9 grupos de acordo com o peso.

Os animais foram contidos e tricotomizados na região da nuca, para facilitar a inoculação das células e para a aplicação do tratamento tópico no local. Para a indução do tumor, 1×10^5 células da linhagem B16F10 foram inoculadas subcutaneamente no flanco dos camundongos C57BL/6 machos (HAMANO et al., 2003; ZEISBERG et al., 2007). Após o aparecimento do tumor (por volta do 5º dia), os animais começaram a receber o tratamento tópico, realizado durante o período de 21 dias, conforme descrição abaixo. O número de dias de tratamento foi pré-estabelecido por meio de testes prévios em nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). Após o período do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, com posterior incisão dorsal, para excisão do tumor e análise da presença e medição de possíveis focos de metástase e incisão ventral, na linha média, para excisão das amostras de fígado, pulmões, rins e linfonodos sentinela, além da retirada das amostras de sangue por punção cardíaca.

2.6.1 Tratamento

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando como veículo para o composto ativo duas formulações: uma transdérmica comercial PENTRAVAN® (Ficha técnica em anexo), para fins de otimização da penetração na pele (KAKUMANU et al., 2011; TAGNE et al., 2008). A outra formulação foi uma pomada com 50% lanolina e 50% vaselina com a intenção da mesma não chegar aos vasos sanguíneos. Foram utilizados 9 grupos no total, conforme descrição abaixo (n = número de animais por grupo), totalizando 45 animais. Os animais receberam o tratamento tópico por 21 dias, começando após a formação palpável do tumor, de acordo com os grupos listados abaixo.

Grupo Controle (C): animais sem tumor (n = 5)

Grupo Controle Pomada (CP): animais com tumor: veículo pomada (n = 5)

Grupo Pomada 0,5 (P0,5): pomada com composto ativo 0,5 mg/g (n = 5)

Grupo Pomada 1 (P1): pomada com composto ativo 1 mg/g (n = 5)

Grupo Pomada 2 (P2): pomada com composto ativo 2 mg/g (n=5)

Grupo Controle Transdérmico (CT): animais com tumor: veículo transdérmico (n = 5)

Grupo Transdérmico 0,5 (T0,5): base transdérmica com composto ativo 0,5 mg/g (n = 5)

Grupo Transdérmico 1 (T1): base transdérmica com composto ativo 1 mg/g (n = 5)

Grupo Transdérmico 2 (T2): base transdérmico com composto ativo 2 mg/g (n = 5)

O tratamento foi aplicado de forma tópica, em intervalos regulares de 24 horas, no mesmo local onde foi induzido o tumor (região tricotomizada). As concentrações utilizadas nas formulações (pomada e transdérmica) foram: 0,5 mg/g; 1 mg/g e 2 mg/g. A dose utilizada para cada aplicação foi de 80 mg, quantidade suficiente para cobrir toda a área do tumor (região tricotomizada).

2.7 Análise histológica

Os órgãos rim, fígado, linfonodos submandibulares (sentinela) e pele foram retirados, e analisados macroscopicamente em busca de possíveis alterações de rigidez ou coloração das superfícies. Como foram constatadas alterações somente na pele, pela indução do melanoma, fragmentos dos outros órgãos foram encaminhados para o estudo histopatológico. Os fragmentos de tecidos foram fixados isoladamente em solução contendo formaldeído 10% em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,4 por 24 horas. No Laboratório de Histopatologia, do Departamento de Biologia, da Universidade Federal de Viçosa, foram utilizados os procedimentos rotineiros para inclusão em parafina seguindo as seguintes etapas: Desidratação em etanol (70%, 80%, 90%, 100%, sendo neste último três vezes), diafanização (xilol I, II, III), infiltração (parafina histológica I, II, III) e emblocamento. Foram obtidos cortes de 4µm em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut®, Germany). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. A análise foi realizada por meio da microscopia de luz, com microscópio Nikon® Eclipse 200. As principais variáveis investigadas foram: lesões celulares reversíveis (degenerações) e irreversíveis (necrose), infiltração de leucócitos, congestão, extravasamento de sangue e fibrose; de acordo com o protocolo da RES/ANVISA nº 90 (Brasil 2004), além da presença nas células neoplásicas do melanoma. Todas as lâminas foram avaliadas qualitativamente por um mesmo patologista, que recebeu as amostras apenas numeradas.

2.8. Avaliação de parâmetro sanguíneo

As análises sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde/UFV. Após um jejum prévio de oito horas, os camundongos foram eutanasiados e procedeu-se a coleta de sangue.

As amostras de sangue foram centrifugadas a 2400 G por 10 minutos para separação do soro, que foi congelado em microtubos a -20°C . Duas alíquotas das amostras foram separadas.

Na primeira alíquota de soro foram avaliados parâmetros bioquímicos: Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST), Ácido Úrico e Creatinina utilizando-se reagentes do fabricante Bioclin®, e metodologia cinética no aparelho BS2200.

A segunda alíquota foi encaminhada para a determinação do VEGF. As alíquotas usadas para o VEGF foram congeladas a -80°C para posterior análise. Para a determinação do VEGF foi utilizado o método enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) através do kit Human VEGF Elisa Kit invitrogen®. Os testes em todas as amostras foram realizados em triplicata. O kit contém placas de 96 poços previamente sensibilizadas com anticorpo monoclonal e padrão na concentração de 1.500 pg/mL, além de tampões, solução de bloqueio da reação e conjugados cromógenos. Com o padrão fornecido foram diluições para a construção de uma curva-padrão e determinação da concentração das amostras. O kit orienta a realização da reação em etapas e todos os passos devem ser realizados a temperatura ambiente. Inicialmente, adicionou-se 50 μL do tampão de incubação em todos os poços, exceto os poços que foram selecionados para branco. Em seguida foi adicionado 100 μL dos padrões diluídos nos poços selecionados. Nos poços da amostra e dos controles foi adicionado 50 μL de tampão diluidor seguido de 50 μL da amostra. Os poços que foram usados como branco permaneceram vazios. As placas foram tampadas e incubadas por 2 horas. Logo após a solução foi completamente aspirada e os poços lavados 4 vezes com solução de lavagem.

Após a lavagem, foi adicionado 100 μL de solução de conjugado de biotina Hu-VEGF em cada poço, exceto nos poços selecionados para branco. Em seguida, a placa foi novamente coberta e incubada por 1 hora e, após esse tempo, a solução foi completamente aspirada e os poços lavados 4 vezes com solução de lavagem.

Em seguida, foi adicionado 100 µL de solução estreptavidina-HRP em cada poço, exceto nos poços reservados para o branco. A placa, então, foi coberta e incubada por 30 minutos. Em seguida a solução foi completamente aspirada e os poços lavados 4 vezes com solução de lavagem.

Finalmente, foi adicionado 100 µL de cromógeno estabilizado em todos os poços incubando no escuro até a solução ficar azul. A seguir, foi adicionado 100 µL de solução de bloqueio em todos os poços, deste modo a solução mudou de azul para amarelo. A leitura foi realizada do leitor de Elisa Spectramax em 450 nm.

2.9. Determinação do estresse oxidativo

Foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes e concentração dos metabólitos da ação de espécies oxidantes no tumor e fígado dos camundongos. Os órgãos foram coletados após a eutanásia e esses tecidos foram congelados a -80 °C. Para realizar as análises, as amostras foram homogeneizadas em PBS pH 7,4 e a suspensão centrifugada a 12.000 G a 4 °C por 10 minutos. Foi utilizado o sobrenadante para a realização das análises.

Para que as atividades das enzimas e concentração de malondialdeído fossem expressas em unidades da enzima por mg de proteína, foi determinada a concentração da proteína total dos homogenatos segundo Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade da Catalase (CAT) foi determinada pela taxa de queda do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (10 mM) em espectrofotômetro a 240 nm durante 60 s (AEBI, 1984). A atividade da CAT foi expressa em U CAT/mg proteína. A atividade da Superóxido Dismutase (SOD) foi determinada em leitor de Elisa em 570 nm, baseada na capacidade desta enzima em catalisar a reação do ânion superóxido O²⁻ em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogalol (Dieterich et al., 2000, modificado). A atividade da SOD foi expressa em U SOD/mg proteína.

A atividade da Glutathione-S-Transferase (GST) foi mensurada através da formação do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno e estimada pela variação da absorbância em 340 nm por 60 s. A formação do conjugado ocorre espontaneamente no substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) em reação não-enzimática, sendo acelerada pela atividade da enzima GST. Uma unidade (U) de GST equivale à quantidade de enzima que forma 1 mol do conjugado glutathione-2,4-dinitrobenzeno

por minuto. O coeficiente de extinção molar do CDNB $340=9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ foi utilizado para os cálculos (HABIG et al., 1974). A atividade da GST foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1} \cdot \text{g}^{-1}$.

Para determinação dos metabólitos da ação de espécies oxidantes (indicativo da peroxidação lipídica) foi feita a mensuração da concentração de malondialdeído (MDA). Ao sobrenadante, foi adicionado solução TBARS (ácido tricloroacético 15% e 0,375% de ácido tiobarbitúrico, e HCl 0,25 N) em banho-maria por 15 minutos, resfriado, centrifugado a 10.000 G por 10 minutos e o sobrenadante mensurado em espectrofotômetro a 535 nm (BUEGE; AUST, 1978). Os cálculos foram feitos utilizando-se o coeficiente de extinção molar $1,56 \times 10^{-5} \text{ M} \cdot \text{cm}^{-1}$. A concentração do MDA foi expressa em nmol/mg proteína.

2.10. Análise Estatística

A avaliação do efeito do composto sobre os ensaios *in vivo* (parâmetros bioquímicos, pesos dos tecidos e órgãos e atividade antioxidante) foi realizada por meio de análise de variância e de regressão polinomial ao nível de 5% de probabilidade. Para verificar o pressuposto de normalidade dos erros foi aplicado o teste de Lilliefors e quando não houve normalidade, os dados foram transformados. Para verificar a homogeneidade das variâncias dos erros entre os tratamentos, foi aplicado o teste de Bartlett, utilizando-se o software GraphPad Prism ® 5.0. Para escolha do modelo de regressão mais adequado, foi considerada a significância dos coeficientes de regressão, pelo teste t de Student, a magnitude dos coeficientes de determinação, bem como o comportamento das variáveis em estudo.

3. RESULTADOS e DISCUSSÃO

Os parâmetros *in silico* foram utilizados para determinação do perfil de permeabilidade e absorção do composto DPBP, além do perfil farmacocinético e toxicológico. De acordo com a regra de Lipinski o composto não infringe nenhuma das propriedades descritas na tabela 2, apresentando portanto apreciáveis características de permeabilidade e absorção o que de fato foi observado nos experimentos *in vivo*.

Tabela 4: Aplicação da regra de Lipinski para o composto DPBP.

Regra de Lipinski	Composto DPBP
Massa molar (MM) < 500	314,38
Número de doadores de ligação de hidrogênio (HBD) < 5	0
Número de aceptores de hidrogênio (HBA) < 10	2
Coefficiente de partição octanol/água (Log P) < 5	4,78

A plataforma **LAZAR** que prediz a toxicologia e o algoritmo farmacocinético **pkCSM** foram utilizados para fins de cálculo da dose a ser empregada nos animais nos experimentos *in vivo*.

3.1 Testes *in vitro*

Após a realização do teste de citotoxicidade com a utilização de MTT para revelação da placa, foi determinada a concentração inibitória de 50% das células pelos compostos Dacarbazina, DBM e DPBP. O medicamento dacarbazina é o fármaco de escolha para tratamento de melanoma pelo SUS e foi utilizado como padrão. As linhagens celulares estudadas B16F10 e Melan-A apresentaram IC₅₀ para o composto DPBP (Figura 1) de 6,25 µg/mL (1,97 µM) e 262,13 µg/mL (82,62 µM) respectivamente. O índice de seletividade para o DPBP foi de 41,94. Para a dacarbazina estas mesmas linhagens apresentaram IC₅₀ respectivamente de 253,97 µg/mL (79,92 µM) e 253,91 µg/mL (80,03 µM). O DBM, composto de partida para a síntese do DBMB, também foi testado frente as B16F10 e Melan-A e obteve o seguinte desempenho no IC₅₀: 11,59 µg/mL (3,75 µM) e 5,68 µg/mL (1,77 µM), respectivamente. E apresentou índice de seletividade 0,5 (Tabela 5).

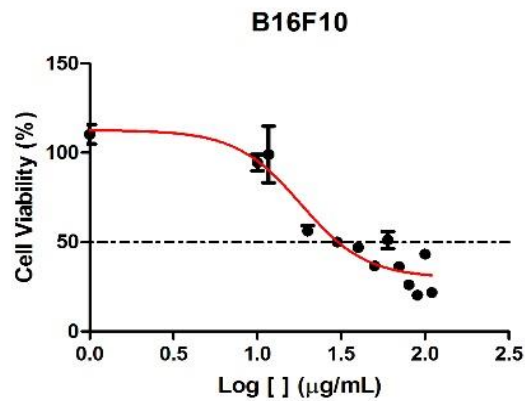


Figura 1 IC₅₀ do composto DPBP

Tabela 5 Testes *in vitro* nas linhagens Melan-A e B16F10.

Composto	IC ₅₀ B16F10 µg/mL	IC ₅₀ Melan-A µg/mL	*IS (Melan-A/B16F10)
Dacarbazina	253,97 (79,92 µM)	253,91 (80,03 µM)	1
DBM	11,59 (3,75 µM)	5,68 (1,77 µM)	0,5
DPBP	6,25 (1,97 µM)	262,13 (82,62 µM)	41,94

*IS: Índice de Seletividade IC₅₀: Concentração inibitória de 50%.

3.1.1 Citometria de fluxo

Para investigar se o composto DPBP induz apoptose e/ou necrose nas células B16F10, foi feito ensaio por citometria de fluxo, os resultados são exibidos na figura 2.

As células para avaliação em citometria de fluxo utilizando Anexina V e iodeto de propídeo foram expostas à concentração de IC₉₀ do composto DPBP por 16 horas e constatou-se a ocorrência de apoptose em 84,5% das células (60,1% apoptose e 24,4% apoptose tardia) na concentração 63,62 µM IC₉₀. O resultado corrobora com os resultados encontrados no trabalho de Oliveira (2017). Neste trabalho foi utilizado um composto também derivado do DBM que apresentou a apoptose como tipo predominante de morte celular.

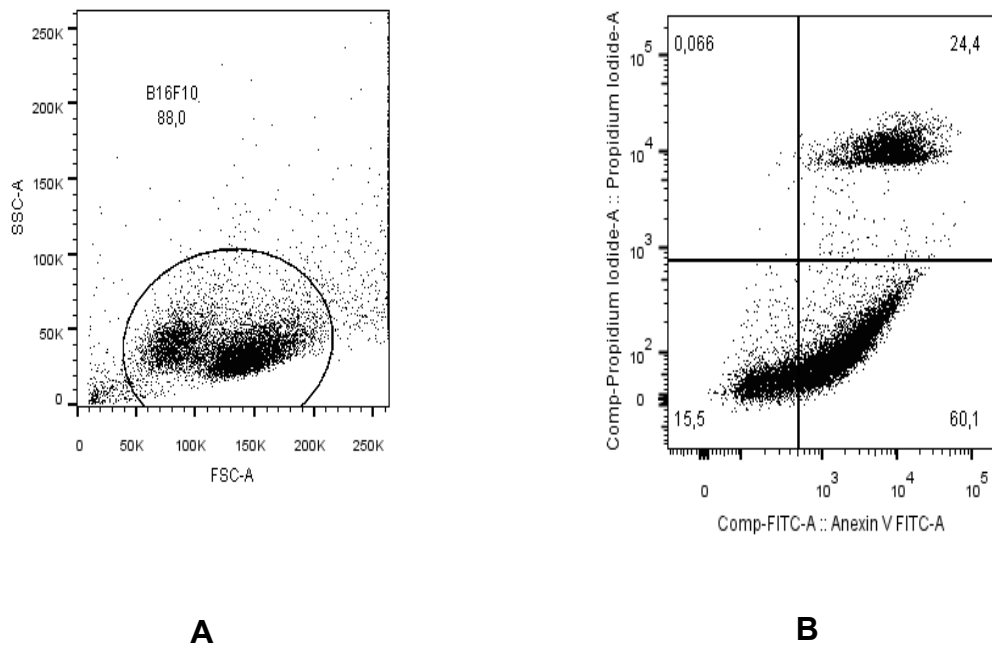


Figura 2 Indução da apoptose pelo composto em células B16F10. **(A)** controle sem composto; **(B)** células tratadas com composto IC₉₀.

3.1.2 Estudo das vias de sinalização

O câncer é uma patologia que ocorre devido a mutações genéticas nas vias de sinalização celular provocando o bloqueio das vias que normalmente levariam a morte celular programada e o estímulo das vias de multiplicação celular. (AMELIO et al 2011). A apoptose acontece por duas vias: a extrínseca e a intrínseca. A via extrínseca tem como gatilho a avaliação de proteínas transmembranas (receptores de membrana) denominados Fas (também chamado de CD95) ou Apo-1 e TNF-R1 (receptor de fator de necrose tumoral) com função similar. O receptor Fas possui um ligante extracelular Fas-L que quando ativado liga-se a Fas formando um complexo proteico que culmina na ativação de pró-caspases 8. (ASHKENAZI, 2008) A via intrínseca envolve fatores pró-mitocondriais sendo desencadeada por fatores intracelulares. A partir do momento que a apoptose é ativada na célula, podendo ser por via intrínseca ou extrínseca, o desfecho ocorre com a permeabilidade das membranas mitocondriais ao citocromo C que passa destas para o citosol ativando Apaf-1 e pró-caspases 9 culminando no processo de apoptose. (WANG et al 2011).

Entender os mecanismos de apoptose e as vias que estão alteradas no câncer são ferramentas úteis para o desenvolvimento de novos fármacos que estimulem a

apoptose de células tumorais. O composto DPBP apresentou-se promissor como indutor de apoptose em células de melanoma e com uma alta seletividade (41,94). Estas características permitem supor que este composto possa apresentar efeitos colaterais reduzidos constituindo melhor qualidade de vida aos pacientes (Figura 2).

Com intuito de avaliar como a apoptose é induzida, foram selecionados genes codificadores de proteínas chave associadas as vias de apoptose, Apaf1 (apoptotic peptidase activating factor 1) e Bax (BCL2-associated X protein), e receptores de membrana envolvidos TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa), FasL e ciclo celular, p21 (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) e CDK1 (cyclin dependent kinase 1).

A metodologia de qRT-PCR em tempo real nos permitiu avaliar como o composto leva a célula tumoral a apoptose. Foi observado por essa técnica que ocorre a inibição de p21 (Figura 3), o estímulo de CDK1, Apaf 1, Bax, FasL, TNF- α e SIRT-1 (Figura 4). Esses genes estão associados a vias de senescência celular e vias intrínseca e extrínseca de apoptose.

A multiplicação celular ou mitose é um processo de renovação celular dos organismos pluricelulares. É chamado de ciclo celular o período do início ao final da divisão de uma célula. O ciclo celular é dividido em etapas: a interfase, dividida em G1; S e G2 antecede a mitose propriamente dita e suas fases: prófase; metáfase; anáfase e telófase. A interfase é a fase de preparação da célula para iniciar a mitose, nesta etapa ocorre a síntese de DNA na fase S, G1 é o intervalo antes da síntese e G2 o intervalo após a síntese que antecede os eventos da mitose. (DE ROBERTIS et al 2017).

A proteína p21 tem papel fundamental na interrupção do ciclo celular em casos de danos ao DNA. Sua expressão é regulada por p53 e interrompe o ciclo celular ligando-se as ciclinas D e E, inibindo as cinases cdk2 e cdk4. É considerada uma proteína supressora de tumores. No entanto existem evidências de que também inibe a apoptose dependente de p53. (GARTEL & TYNER, 2002).

Os resultados encontrados de inibição da expressão da proteína p21 pelo composto DPBP (Figura 4) indicam que este pode ser o mecanismo de indução da apoptose nas células de melanoma. Problemas na indução de p21 dependente de p53, seja por impedimento da transcrição ou clivagem por caspases de p21 ocasionam um aumento na taxa de apoptose mediada por p53. Os resultados são similares aos encontrado por Zhang e colaboradores (1999), que trabalharam com células de câncer de pulmão humano A549 induzindo dano ao DNA por droga e posterior clivagem de p21 por caspase de p21 resultando em um aumento da taxa de apoptose. Outro trabalho conduzido por Kaneuchi e colaboradores (1999), também constataram que mutantes do gene p53 não ativam p21 e conseqüentemente induziam a apoptose celular.

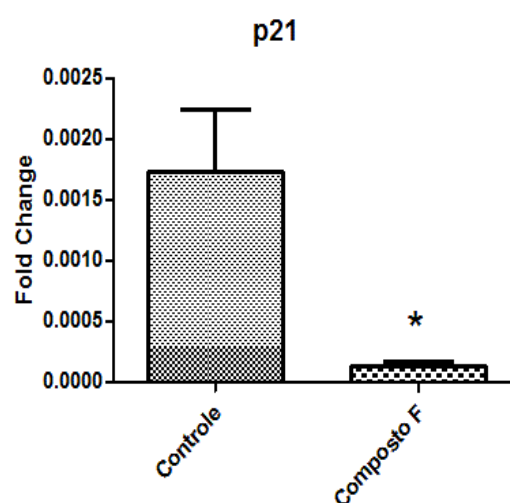


Figura 4 PCR em tempo real gene para proteína p21

Também foi avaliada a expressão diferencial de genes relacionados a indução da apoptose extrínseca e intrínseca. Os resultados mostram que ocorreu um aumento da expressão de FasL (Figura 5 D) das células submetidas ao tratamento com o composto DPBP, este resultado indica a indução de apoptose através da via extrínseca. O aumento na expressão de Apaf-1 e Bax (Figura 5 A e B) pode ocorrer

pela participação dos mesmos nos eventos desencadeados pelo aumento da expressão de FasL (Figura 5 D)

Na via extrínseca de ativação da apoptose, FasL é um ligante extracelular de Fas levando-o a interagir com FADD (fas adaption death domain) liberando pró-caspase 8 e 10 que ativam caspase 8 e 10 e induzem a formação de um dímero. Na sequência ocorre ativação da caspase 3 que desencadeia a apoptose. Paralelamente Bid é liberado na formação do dímero entre caspase 8 e 10 e se liga a receptores na membrana mitocondrial causando a liberação de citocromo C e Smac/diablo. O citocromo C se liga a Apa-1 e ativa de forma direta caspases 9, enquanto a Smac/diablo remove as IAP (proteínas inibidoras de apoptose) ligadas às caspases, liberando as mesmas para desencadear a apoptose. (OUYANG et al 2012; GRIVICICH et al 2007; DEBATIM et al 2004). As proteínas da família Bcl2 estão localizadas na membrana da mitocôndria, do retículo endoplasmático e no envoltório nuclear. Possuem promotores de apoptose representado por Bax, Bad, Bak, Bok e membros anti apoptóticos, como Bcl-2, Bclxl, Balw. Em conjunto administram a permeabilidade da membrana mitocondrial e atuam na liberação do citocromo C da membrana mitocondrial interna. As caspases clivam a proteína estabilizadora de p53 permitindo que migre para o núcleo e também promove a liberação de Bax. A formação do dímero Bax-Bcl-2, estimula a liberação de Apaf-1 (OUYANG et al 2012) que se associa diretamente a pró-caspases 9 e dATP, formando o apoptossomo. Caspases subsequentes são ativadas, culminando na clivagem de substratos específicos, e provoca a apoptose.

O dano ao DNA também pode provocar a liberação de Bax pela membrana nuclear e formar o complexo Bax-Bcl-2 na mitocôndria desencadeando a apoptose intrínseca. Experimentos de molécula única, utilizando a pinça óptica (item 3.3 capítulo 3), demonstram que o composto DPBP possui a capacidade de intercalar a molécula de DNA provocando alteração significativa na mesma. Assim, é plausível supor que o composto possui a capacidade de interagir com a molécula de DNA no núcleo das células submetidas ao tratamento induzindo a apoptose intrínseca. Podendo provocar a apoptose intrínseca. (NASCIMENTO et al, 2018)

As cinases dependentes de ciclina (CDK-1) controlam a fosforilação das proteínas reguladoras do ciclo celular, permitindo a passagem de uma fase para outra. CDK-1 está envolvida na transição da fase S para G2 e também de G2 para mitose, através da formação de heterodímeros CDK-1-Ciclina A e CDK-1-ciclina B.

(DE ROBERTIS et al 2017). Alguns trabalhos demonstram que a inativação de CDK-1 induz a apoptose, como no caso do estudo conduzido por Ongkeko e colaboradores (1995) trabalharam com células com mutações em CDK-1 que a tornava sensível a temperatura e portanto, a inativação de CDK-1 aumentou a apoptose.

Defeitos na regulação de CDK, como a hiperatividade provocam a multiplicação celular exagerada em muitos tipos de tumores. O melanoma metastático expressa altos níveis de CDK1; CDK-2 e CDK-5. Portanto as CDKs podem constituir um alvo terapêutico potencial. (ABDULLAH et al 2011). Algumas moléculas foram propostas para inibir a multiplicação celular do melanoma bloqueando a ação de CDK-1. Parry e colaboradores (2010) conduziram um experimento com o composto SHC 727965 e demonstrou sua capacidade de inibir a proliferação das células tumorais

A proteína desacetilase SIRT-1 possui enumeras funções biológicas e está relacionada a diversos processos biológicos tais como o envelhecimento; a imunidade; neurodegeneração; metabolismo; respostas a estresse; estabilidade do genoma e câncer. (CLARK-KNOWLES et al 2017).

No melanoma a família de proteínas SIRT1 encontram-se expressas de forma diferenciada em relação a expressão encontrada em células normais. As proteínas SIRT-1 e 2 apresentaram-se superexpressas em melanomas humanos (A 375; Skmel-2; WM35; G361; Hs 294T) sua inibição confere diminuição da proliferação celular. (WILKING – BUSCH et al 2018; WILKING et al 2014). A inibição de SIRT-1 nas linhagens de células de melanoma humano G 361; A 375; Hs 294T por Tenovin-1 resultaram em uma diminuição da proliferação celular juntamente com um aumento da expressão de p53, proteína com atividade supressora de tumor, e um incremento downstream da proteína alvo de p53, a proteína p21. (WILKING et al 2014).

A superexpressão de SIRT-1 está envolvida na resistência de tumores a quimioterapia. A desacetilação dos fatores de transcrição dependente de SIRT em células cancerígenas é utilizada para bloquear a morte celular e estimular a proliferação em resposta a drogas antineoplásicas, tornando o tumor resistente. (OLMOS et al 2011)

O aumento na expressão de CDK-1 (Figura 5 C) e na expressão de SIRT-1 (Figura 5 F) nas células expostas ao DPBP demonstra que o composto não afetou estas características das células de melanoma. No entanto, as células tratadas

morrem por apoptose desencadeada por fatores intrínsecos e extrínsecos independentes de CDK-1 e SIRT 1.

O TNF- α apresentou um aumento pouco significativo em relação ao controle neste estudo (Figura 5 E). O TNF- α também é um receptor transmembrana que desencadeia a apoptose extrínseca de forma semelhante a FasL.

O TNF- α está relacionado a invasão, angiogênese, proliferação e migração em tumores. Além de estar associado a inflamação causada pelo câncer. (WU et al 2010). O TNF- α Também está envolvido na indução dependentes da ativação das vias associadas as NF-kB, PKCa e AP-1. Deste o NF-kB é fundamental na indução do tumor. Hsu e colaboradores em 2001, utilizou células JB6 epidérmicas de camundongos demonstrou um aumento de NF-kB dose dependente de TNF- α e esta ativação foi essencial para a transformação das células JB6 em células neoplásicas. Em linhagens tumorais o TNF- α comporta-se como um fator mutagênico para promover proliferação sem induzir diferenciação. (SHISHODIA et al 2004).

A partir dos dados que foram observados estudando-se algumas proteínas associadas as vias de apoptose podemos inferir que o composto DPBP que o provável mecanismo de ação do composto seja a fragmentação do DNA e apoptose (Figura 5).

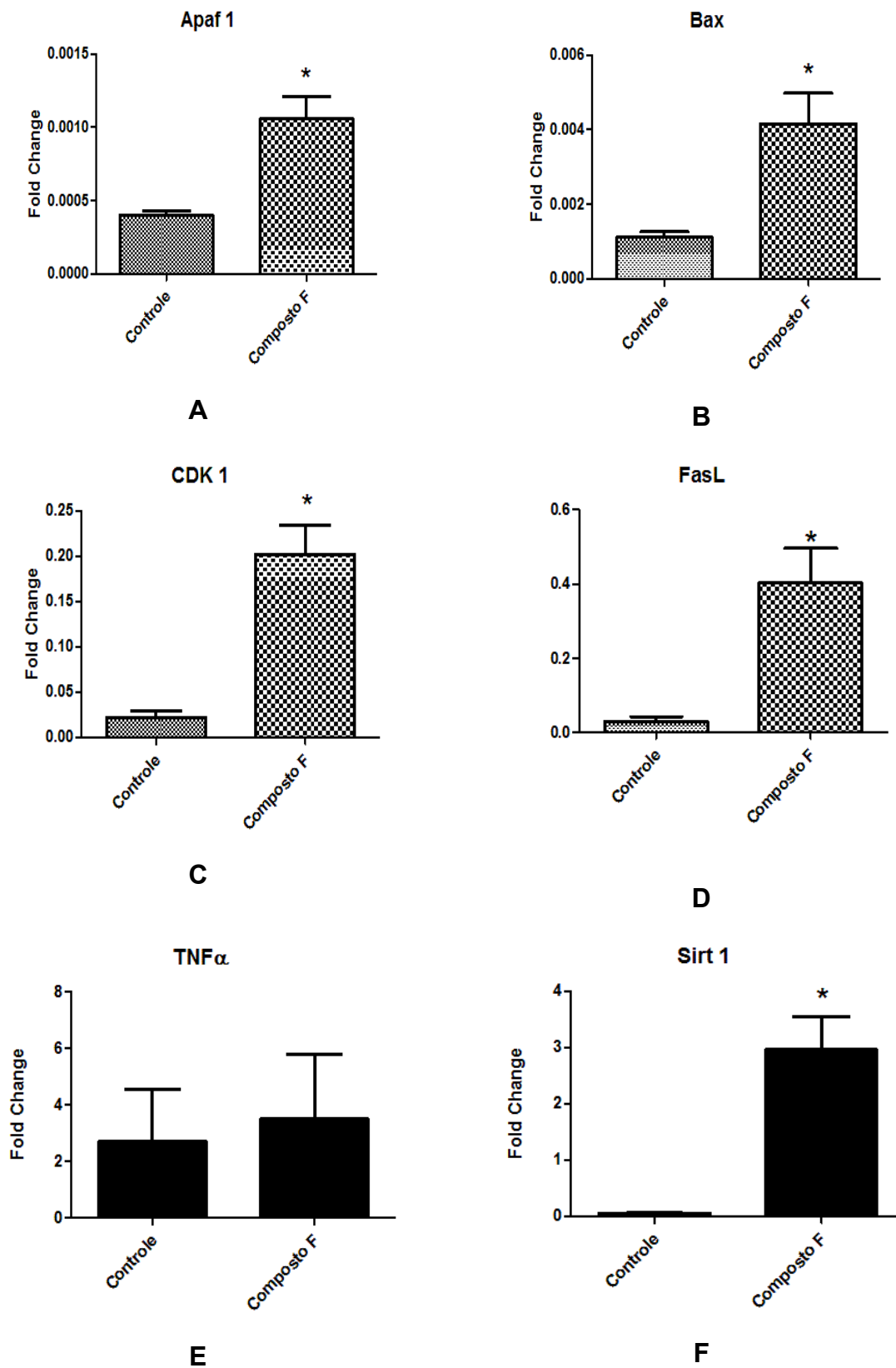


Figura 5 PCR em tempo real. (A) Apaf; (B) Bax; (C) CDK 1; (D) FasL; (E) TNF; (F) Sirt 1

3.2 Testes in Vivo

3.2.1. Cálculo das concentrações utilizadas

Os cálculos para verificar a dose adequada para os testes *in vivo* foram feitos *in silico* utilizando o programa PKCSM associado a formulas de concentração e distribuição farmacocinéticas onde foi possível determinar uma dose equivalente ao IC_{50} que é a concentração necessária para que haja o efeito no animal. O IC_{50} encontrado para o composto foi de 1,04 mg/g de animal. Partindo-se desse dado estipulamos uma dose abaixo e uma dose acima dessa concentração o que nos permitiu trabalhar com três doses possíveis 0,5, 1,0, 2,0 mg, que foram utilizadas na forma de gel transdérmico e pomada sendo o composto aplicado topicamente no dorso dos animais (Figura 7).

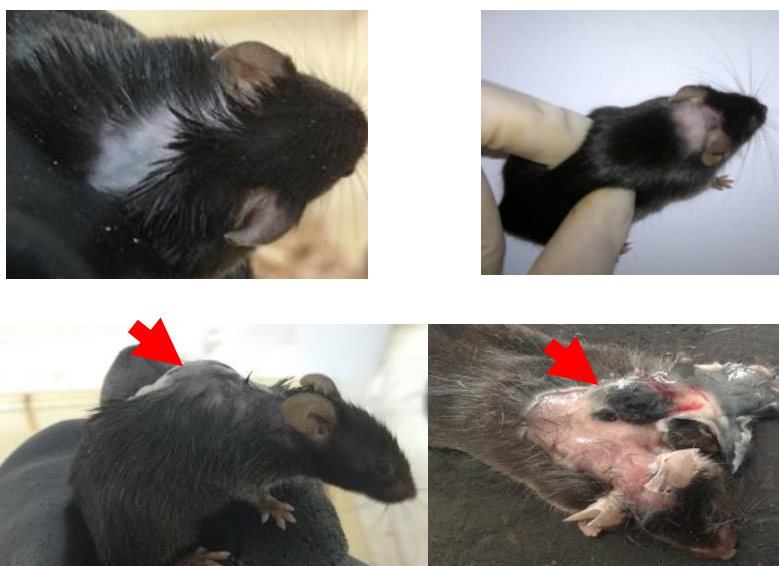


Figura 7 Detalhe da tricotomia na região dorsal, onde foram injetadas as células para indução do melanoma, tumor marcado com a seta vermelha.

Após o período de tratamento dos camundongos, os animais foram eutanasiados e as amostras de fígado, rim, pulmão, linfonodo sentinela e o tumor foram removidos. Os resultados da avaliação do volume tumoral dos animais tratados com gel transdérmico e pomada frente animais não tratados foram avaliados como pode ser observado na figura 8.

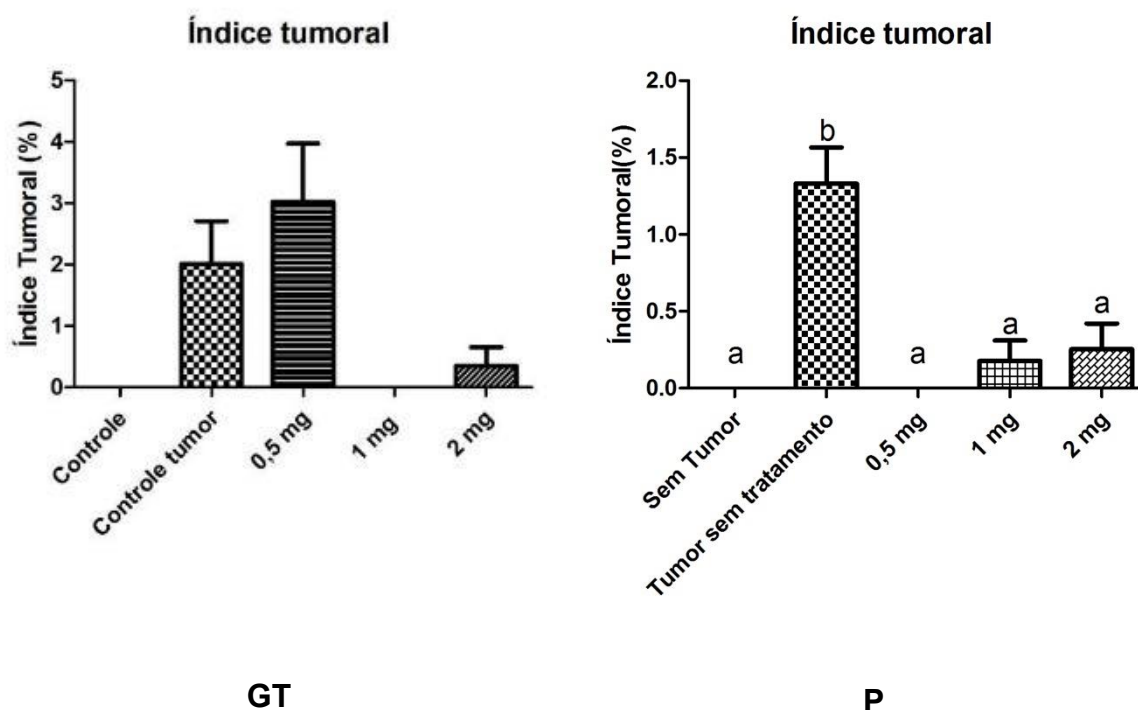


Figura 8 Efeito do tratamento com o composto no veículo gel transdérmico (GT) e pomada (P) sobre o índice tumoral, nos diferentes grupos experimentais.

Das concentrações do composto utilizadas no ensaio *in vivo* (0,5, 1,0 e 2,0 mg/mL) as concentrações 1,0 e 2,0 se mostraram eficazes como agentes quimioterápicos ou quimiopreventivos apresentando, portanto, potencial terapêutico para utilização em formulação tópica. Estes dados são coerentes com os resultados de Khor e colaboradores (2009), indicaram que DBM possui significativa atividade quimiopreventiva, tendo suprimido a progressão de adenocarcinoma de próstata em camundongos C57BL TRAMP (transgênicos para adenocarcinoma de próstata) tratados com este agente. No referido trabalho, os animais receberam dieta suplementada com 1 % de DBM (~ 30 mg de DBM por dia por camundongo) a partir de 8 e 12 semanas de vida. Adicionalmente neste trabalho foi demonstrado que o grupo que começou a receber a dieta suplementada com DBM com 8 semanas de vida chegou a apresentar supressão total do adenocarcinoma.

3.2.2 Avaliação dos parâmetros sanguíneos

3.2.2.1 VEGF

Como citado anteriormente, a angiogênese é de extrema importância para o desenvolvimento da patologia, assim, visando correlacionar a redução do tamanho do tumor com os níveis sorológicos do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi realizada a análise quantitativa desse fator no sangue os animais tratados com o composto nos veículos GT e P e não tratados observando-se a redução deste fator angiogênico principalmente quando se utilizou o veículo GT (Figura 9).

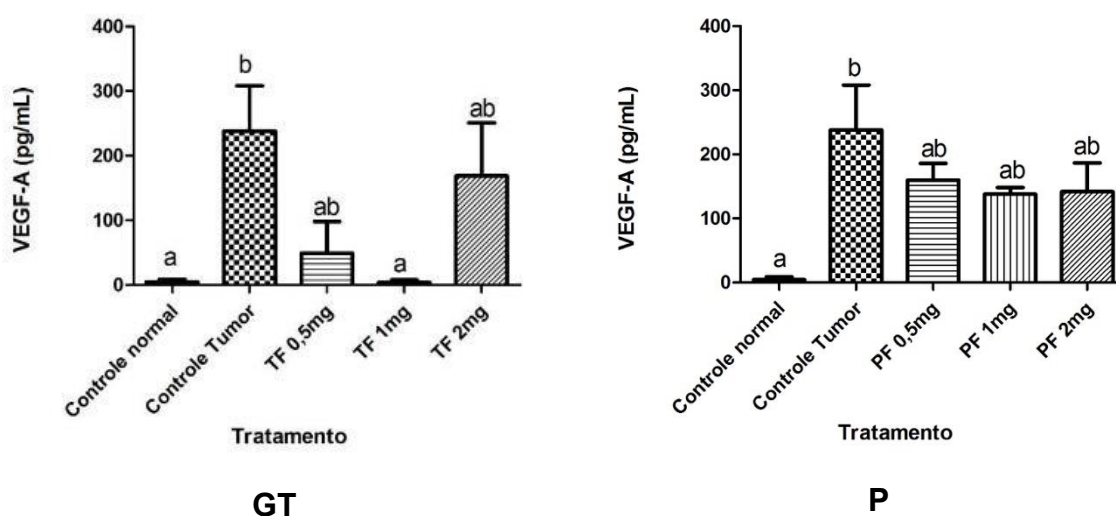


Figura 9 Quantificação de VEGF a partir das amostras de soro coletadas dos camundongos tratados e não tratados (pg/mL) nos tratamentos utilizando com veículo gel transdermico (GT) e pomada (P).

A quantidade média de VEGF dos animais tratados com 1 mg/g do composto usando como veículo GT não apresentou diferença do valor obtido para os animais controle normal, ao passo que o grupo tratado com 0,5 mg/mL apresentou pouca diferença dos animais controle normal. A quantidade de VEGF de ambos os grupos tratados diferiu significativamente dos grupos controle do tumor, caracterizando o efeito do composto quando esse foi incorporado ao GT. Estes dados corroboram os números obtidos para volume tumoral que diminuiu drasticamente em relação controle do tumor, identificando uma possível relação entre a redução do volume tumoral e a redução de VEGF nos animais tratados em relação aos controles para a concentração de 1 mg/g. Para as concentrações 0,5 e mg/g não houve diferença

estatística em relação a diminuição do VEGF embora a concentração de 2mg/g tenha diminuído o volume tumoral.

Para o composto cujo veículo foi a pomada não houve diferença estatística em relação a diminuição da concentração sérica do VEGF entre as concentrações testadas. Entretanto, ocorreu diminuição quando compara-se o mesmo em relação ao grupo controle do tumor. Os resultados observados da redução do volume tumoral e redução dos níveis de VEGF séricos corroboram com os resultados encontrados no trabalho de França (2013). Neste trabalho foi usado somente o veículo gel transdérmico com o DPBP nas dosagens de 1mg/g e 3mg/g, sendo os melhores resultados para a redução do volume tumoral e redução do VEGF no sangue foram encontrados na concentração de 1mg/g.

3.2.2.2 Dosagens bioquímicas

O estudo de drogas inéditas compreende testes de toxicidade sistêmica. O efeito da aplicação local, como irritação, pode ser avaliado visivelmente logo após contato. Para a investigação dos efeitos sistêmicos, além da histopatologia dos órgãos é necessário a avaliação de parâmetros sanguíneos (Figuras 10, 11 e 12).

Um dos órgãos mais afetados em caso de toxicidade de fármacos é o fígado. Neste estudo a análise histopatológica deste órgão não apresentou alterações. O mesmo resultado foi verificado no trabalho de França (2013) com o DPBP, em que uma análise histológica completa foi realizada. Oliveira (2017) realizou um trabalho com um composto derivado do DPBP e a análise histológica do fígado não apresentou alterações.

A análise sérica das enzimas transaminases (AST e ALT) não apresentaram alterações significativas em todos os tratamentos com os diferentes veículos (Figura 8). Resultado similar foi observado por Oliveira (2017) com o composto derivado de DPBP.

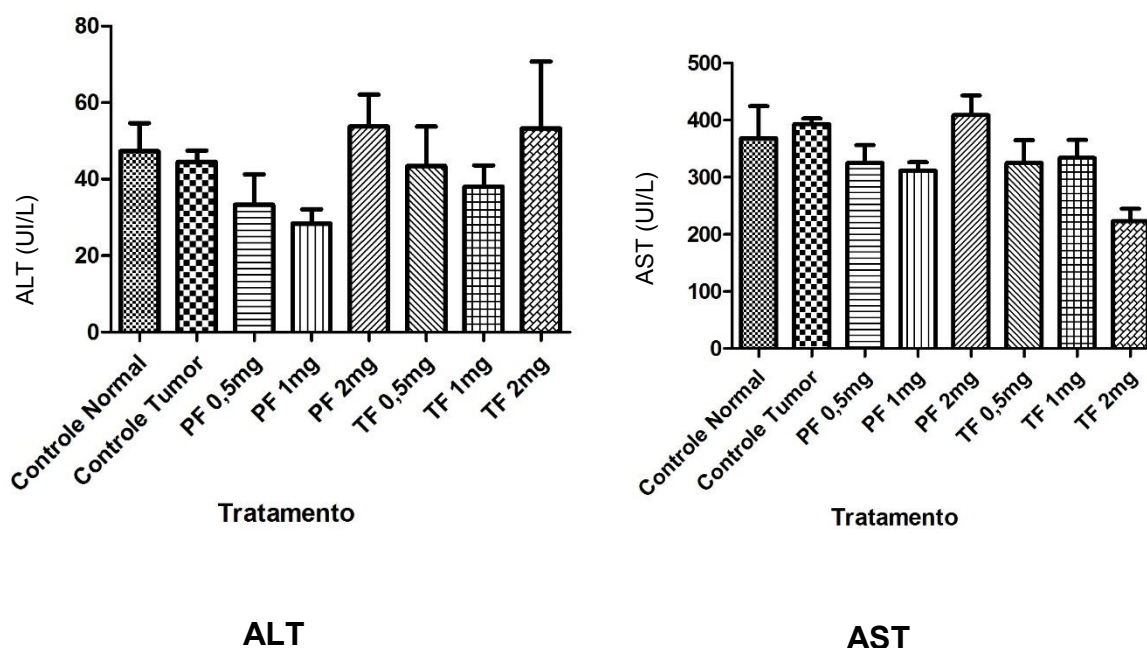


Figura 10 Resultados parâmetros sanguíneos, dosagem das transaminases em todos os tratamentos: AST (TGO); ALT (TGP).

O fígado é o órgão que metaboliza os medicamentos e outros xenobióticos através de reações de biotransformação. O metabolismo de primeira passagem ocorre pela ingestão oral dos fármacos. Estes são enviados primeiro ao fígado pela veia porta e sofrem uma transformação química antes de chegarem a circulação sistêmica e atingirem os órgãos alvo. A administração intravenosa, transdérmica ou subcutânea o fármaco penetra diretamente na circulação sistêmica e chegam ao órgão alvo sem passar pela metabolização de primeira passagem. As reações de transformações químicas no fígado são classificadas em fase I, onde predomina reações de oxidação/redução que possuem a função de tornar os compostos mais solúveis acrescentando ou expondo grupos mais polares, como a hidroxila (-OH); tiol (-SH) e amina (-NH₂). E fase II onde predomina as reações de conjugação, para tornar os fármacos mais hidrofílicos com adição de grupos polares como o ácido glicurônico. (BRUNTON et al 2012; STORPIRTIS et al 2011)

A análise da creatinina sérica (Figura 9) não apresentou variações significativas em todos tratamentos utilizados. O mesmo resultado foi encontrado no trabalho de Oliveira (2017) com um derivado de DPBP. O estudo de França (2013)

avaliou a histologia dos rins dos animais tratados com DPBP e não encontrou alterações.

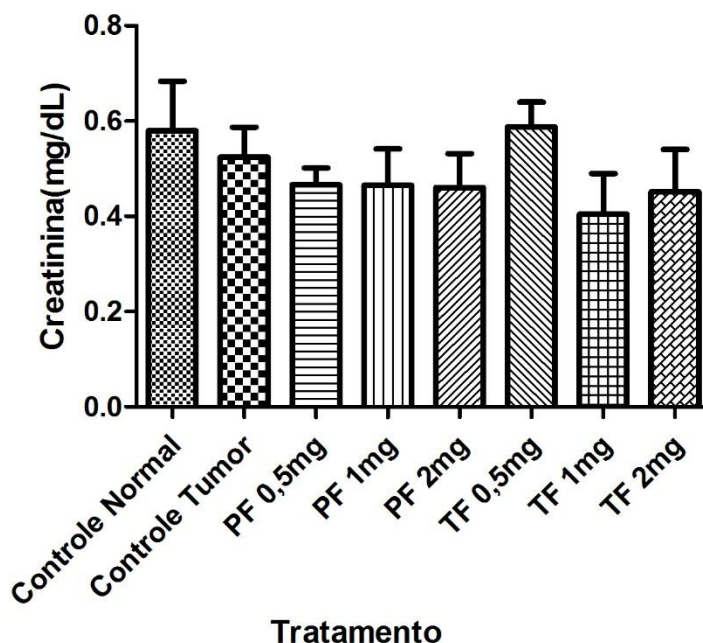


Figura 11 Análise sanguínea da creatinina em todos os tratamentos.

A creatinina é um metabólito derivado da creatina fosfato muscular. É formado em quantidades constantes e excretados em quantidades constantes pelos rins. Problemas que afetem a filtração renal alteram a excreção de creatinina, deixando a mesma acumulada no sangue. (WILLIANSO & SNYDER, 2018)

A excreção de fármacos ocorre principalmente pela via urinária. No entanto, podem existir substâncias que são excretadas pelas fezes, pelo suor, pulmões, leite materno. A homeostase dos líquidos orgânicos é mantida pelo sistema urinário que depura o sangue retirando substâncias tóxicas produzidas pelo metabolismo. A formação da urina está ligada aos seguintes processos: filtração glomerular, secreção e reabsorção (STORPIRTIS et al 2011)

A análise sérica do ácido úrico (Figura 10) não demonstrou alteração significativa entre o controle sem melanoma e o controle com tumor. No entanto, os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando comparados aos controles. No veículo pomada os tratamentos com as concentrações de DPBP 0,5 mg/g; 1,0 mg/g e 2 mg/g apresentaram diferenças estatísticas em relação aos controles. Comparando entre os tratamentos as concentrações 1,0 mg/g e 2,0 mg/g

apresentaram diferenças estatísticas entre si, mas quando incluímos na comparação a concentração de 0,5 mg/g a mesma não diferiu estatisticamente das outras duas. O tratamento com o veículo transdérmico apresentou comportamento parecido quando comparamos as concentrações usadas no tratamento com os controles. No entanto a comparação entre as concentrações usadas não apresentou diferença estatística.

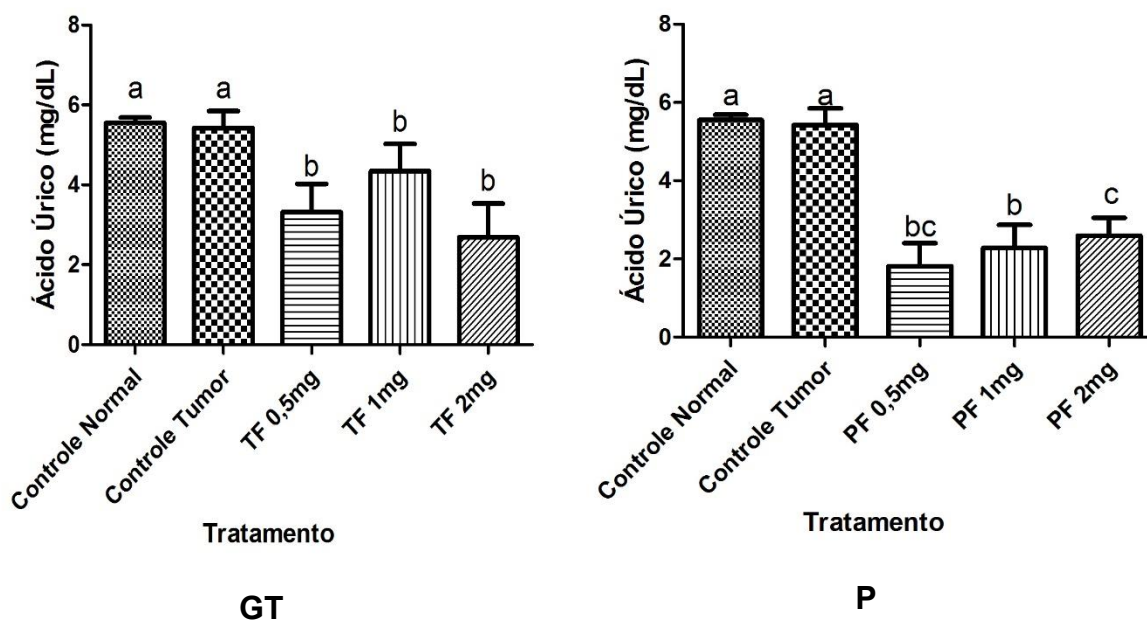


Figura 12 Análise sanguínea do ácido úrico gel transdérmico (**GT**) e pomada (**P**).

Níveis altos de ácido úrico estão associados a um maior risco de desenvolver alguns tipos de câncer como, colorretal; hepatobiliar; pele não melanoma entre outros. (YIU et al 2017) Além disso, existe uma associação entre os níveis de ácido úrico e o índice de mortalidade em pacientes oncológicos. (FINI et al., 2012; SHIN et al., 2012; TANRIVERDI et al., 2014). O ácido úrico é capaz de eliminar espécies reativas de oxigênio (EROs) por possuir propriedades antioxidantes, protege o DNA de danos oxidativos e mantém a homeostase celular.

Neste estudo o DPBP provocou reduções nos níveis séricos de ácido úrico em todos os tratamentos de 34 a 67%. Resultados semelhantes ao encontrado por Oliveira (2017) em sua pesquisa utilizando um derivado oxidado do DPBP. Neste trabalho a redução do ácido úrico em todos os tratamentos ficou entre 48 a 76%. A redução do ácido úrico melhorou o microambiente celular e contribuiu para reduzir a metástase. Pacientes com altos níveis de ácido úrico apresentavam maior propensão

a metástases em câncer de pulmão conferindo uma menor sobrevida ao paciente. (TANRIVERDI et al., 2014).

3.2.3 Estresse oxidativo

Neste estudo foi observado que os tratamentos utilizando o DPBP no veículo pomada apresentou aumento na enzima superóxido dismutase, sendo o acréscimo de 5,28%; 12,6% e 16,8%, respectivamente para as concentrações de 0,5 mg/g; 1,0 mg/g e 2,0 mg/g do composto. No veículo transdérmico o aumento maior ocorreu na concentração 0,5 mg/g, e as demais concentrações apresentaram aumentos de 78% e 48%, respectivamente para as concentrações de 1,0 mg/g e 2 mg/g. Entretanto nos tratamentos com veículo transdérmico ocorreu aumento da atividade de superóxido dismutase em 144% na concentração de 0,5 mg/g, sendo a que a elevação mais se destacou. A concentração de 1,0 mg/g apresentou aumento de 78%, enquanto a concentração de 2,0 mg/g apresentou um aumento de 48%.

A superóxido dismutase é uma enzima importante para as defesas celulares. Seu aumento nas células significa um aumento na produção de radicais livres. Nos tumores ocorre a geração de altas concentrações de radicais livres, que em geral são bem tolerados com ativação de enzimas antioxidantes. (TRACHOOTHAM et al., 2009)

As dosagens das atividades de óxido nítrico nos tumores apresentaram redução em todos os tratamentos, sendo os tratamentos com veículo pomada apresentando as maiores reduções. A concentração 2,0 mg/g apresentou a maior redução, 120,6%, enquanto as demais concentrações apresentaram respectivamente 7,2% e 50,5% de aumento para 0,5 mg/g e 1,0 mg/g de concentração do DPBP. O Veículo transdérmico apresentou também reduções de 3,56%, 31,26% e 22% para as concentrações de 0,5 m/g, 1,0 mg/g e 2,0 mg/g, respectivamente.

Tabela 6: Atividade antioxidante nos tumores de camundongo C57BL tratados com o composto DPBP

Tratamento	Proteínas totais		Superóxido dismutase		Óxido Nítrico		Malondialdeído	
	mg/mL	Desvio padrão	USOD/mg de proteína	Desvio padrão	µM	Desvio padrão	nmol/mg de proteína	Desvio padrão
Controle Normal	37,168	2,226	3,842	0,580	2,566	1,010	289,440	326,975
Controle Tumor	39,249	10,901	4,288	1,062	2,693	1,002	255,875	158,815
Pomada 0,5mg/g	34,331	1,887	4,513	0,348	2,500	0,901	256,857	42,805
Pomada 1,0mg/g	29,724	3,962	4,828	0,814	1,333	0,327	346,450	115,685
Pomada 2,0mg/g	33,878	1,396	5,008	0,537	1,427	0,103	265,057	56,346
Transdémico 0,5mg/g	15,442	2,732	10,453	1,584	2,597	0,525	331,177	54,973
Transdémico 1,0mg/g	14,755	3,269	7,636	3,368	1,851	0,425	271,610	32,038
Transdémico 2,0mg/g	24,416	3,225	6,353	1,315	2,098	0,973	585,490	403,381

O óxido nítrico é uma molécula gasosa sinalizadora no melanoma que está envolvida na produção de radicais livres e em processos imunológicos, apoptose, angiogênese e proliferação celular. Pacientes com melanoma que apresentam níveis elevados de óxido nítrico apresentam prognóstico ruim. (YARLAGADA et al 2017). O composto DPBP apresentou redução do óxido nítrico em todos os tratamentos contribuindo para melhorar o prognóstico do paciente.

As dosagens do malondialdeído apresentaram aumentos em sua atividade para o veículo pomada menores que as elevações encontradas para o veículo transdérmico. Na pomada a redução maior ocorreu na concentração de 1,0 mg/g do DPBP e as demais concentrações apresentaram reduções de 0,38% para 0,5 mg/g e 3,6% para 2,0 mg/g. No veículo transdérmico o maior aumento na atividade da enzima malondialdeído também foi verificado na concentração de 2,0 mg/g, 56,3% e as demais concentrações com aumento de 29,43% para a concentração de 0,5 mg/g e 6,15% para a concentração de 1 mg/g. O malondialdeído é um produto de peroxidação lipídica usado para medir o estresse oxidativo. O aumento encontrado neste trabalho indica que o DPBP não reduziu a peroxidação lipídica.

3.2.4 Análise histológica

Os órgãos submetidos a análise histopatológica não apresentaram alterações que comprometessem sua integridade, exceto os linfonodos sentinela (Tabela 7 e Figura 13). Quando observamos os resultados da histopatologia dos linfonodos sentinela observamos que todas as concentrações dos compostos em pomada não apresentaram invasão, quando comparados aos controles sem tratamento com tumor. No Tratamento com o gel transdérmico observamos 40% dos animais tratados com a concentração de 1 mg/g apresentando invasão discreta, similar ao controle. As demais dosagens das formulações transdérmicas também apresentaram resultados livre de invasão, exceto a dosagem 2mg/g que apresentou apenas um animal com invasão discreta (Tabela 6).

Tabela 7: Patologia Linfonodos Sentinelas

Animal	CT	TD 0,5mg/g	TD 1mg/g	TD 2mg/g	P 0,5mg/g	P 1mg/g	P 2mg/g
1	Discreta	S/invasão	Discreta	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão
2	Discreta	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão
3	Discreta	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão
4	Discreta	S/invasão	Discreta	S/invasão	S/invasão	S/invasão	S/invasão
5	Discreta	S/invasão	S/invasão	Discreta	S/invasão	S/invasão	S/invasão

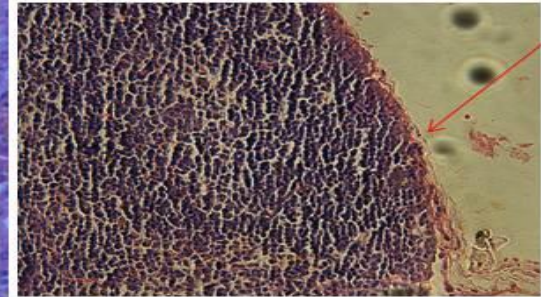
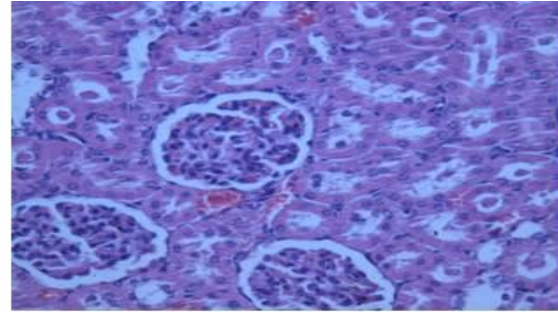
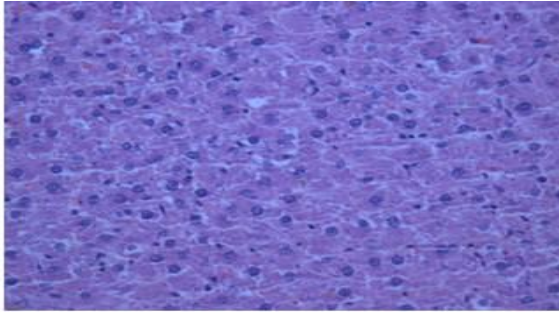
OBS: A classificação foi observada como discreta; moderada e intensa de acordo com a invasão da cápsula dos linfonodos, onde a intensa mostra invasão total da mesma. CT: Controle tumor; TD: gel transdérmico; P: pomada

Figado

Rim

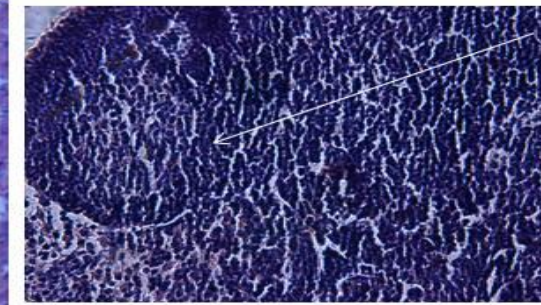
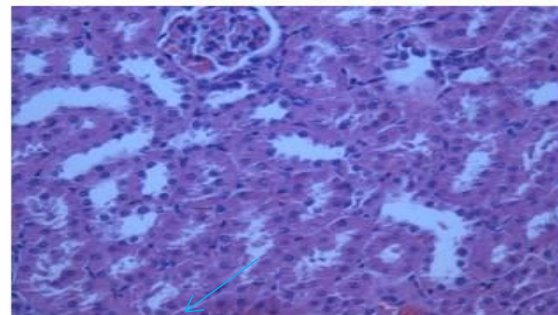
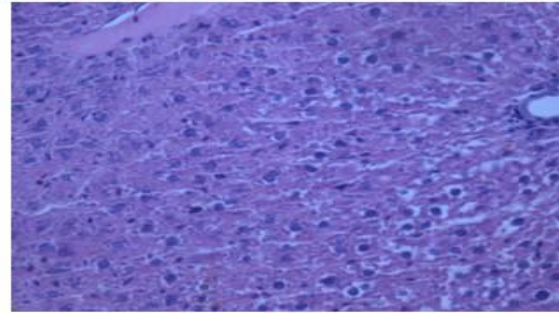
Linfonodo

Controle



Cápsula de
tecido
conjuntivo

Controle
Pomada



Controle
Transdérmico

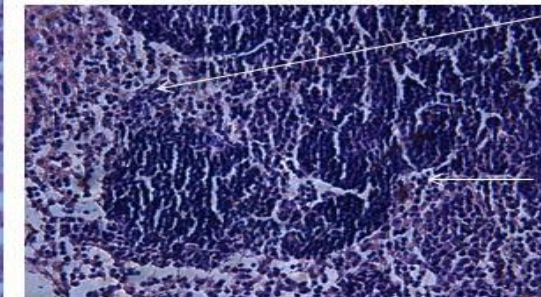
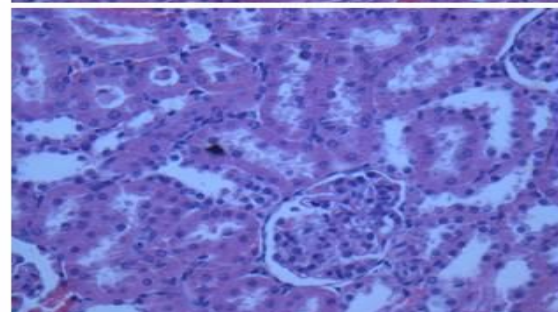
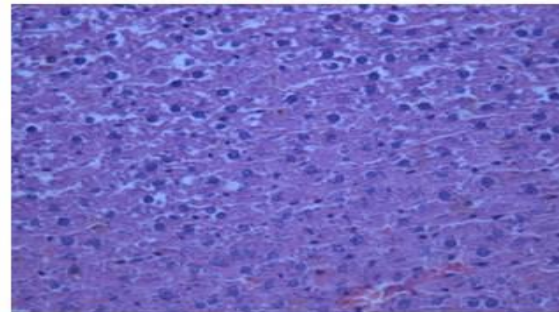


Figura 13 Cortes histopatológicos

Legenda: seta vermelha (Cápsula); seta branca (Controle Pomada): folículos linfoides; seta branca (Controle Transdérmico) região medular e seta azul, região cortical.

Os órgãos submetidos a análise histopatológica não apresentaram alterações que comprometessem sua integridade, exceto os linfonodos sentinela (Tabela 6 e Figura 11). Quando observamos os resultados da histopatologia dos linfonodos sentinela observamos que todas as concentrações dos compostos em pomada não apresentaram invasão, quando comparados aos controles sem tratamento com tumor. No Tratamento com o gel transdérmico observamos 40% dos animais tratados com a concentração de 1 mg/g apresentando invasão discreta, similar ao controle. As demais dosagens das formulações transdérmicas também apresentaram resultados livre de invasão, exceto a dosagem 2mg/g que apresentou apenas um animal com invasão discreta (Tabela 6).

A comparação dos resultados da patologia dos linfonodos sentinela com as dosagens de VEGF e volume tumoral dos grupos tratados demonstra que nos grupos tratados com a pomada em todas as concentrações estudadas não apresentaram invasão na capsula do linfonodo, houve redução da concentração do VEGF sérico e uma grande redução do volume tumoral. Olhando para os resultados do veículo transdérmico, é importante salientar que a concentração de 1mg/g apresentou dois animais com invasão discreta e a concentração de 2mg/g apresentou apenas um animal com invasão discreta, ainda as dosagens de VEGF apresentaram uma grande redução sérica quando comparada ao controle e uma redução significativa do volume do tumor nas concentrações 1 mg/g e 2 mg/g.

Estes resultados demonstram a capacidade do composto em provocar a morte de células tumorais ou impedir sua multiplicação, dificultando a metástase quando o veículo usado foi pomada. Este veículo possui baixa penetrabilidade na derme, ficando restrita nas camadas superficiais e atuam como agentes emolientes e possuem efeito oclusivo (ALLEN et al 2013). Apesar da redução de VEGF ser mediana no veículo pomada quando comparada ao controle com tumor sem tratamento. Portanto, apesar da vascularização ainda existir no tumor, o mesmo foi incapacitado de desenvolver metástase no veículo pomada.

No veículo gel transdérmico, a redução dos valores sanguíneos de VEGF dificultando a formação de novos vasos sanguíneos e de metástase contribuíram para a redução do volume tumoral e para pouca invasão da capsula do linfonodo. Assim, o veículo transdérmico foi capaz de reduzir drasticamente a vascularização do tumor, uma vez que é capaz de atingir as camadas profundas da derme chegando

à corrente sanguínea do animal (ALLEN et al 2013). No entanto, este mecanismo não foi suficiente para impedir a metástase completa quando comparamos com o veículo pomada. Este fato pode ter sido uma consequência da densidade de vasos linfáticos não afetada.

A angiogênese é essencial para a progressão do melanoma, pois é através da formação de uma rede de novos vasos que a metástase é disseminada. A fase de progressão vertical é dependente de uma intensa angiogênese, sendo o VEGF um dos fatores de crescimento que promovem este evento. (JOUR et al, 2016). Pacientes que apresentam tumores intensamente vascularizados apresentam maior incidência de ulceração constituindo um prognóstico ruim. (KASHANI-SABET et al, 2002). Além disso a densidade de novos vasos sanguíneos e linfáticos parece estar relacionada com a espessura do tumor. Tumores muito vascularizados são, em geral, mais profundos e possuem alta capacidade de metástase (AUNG et al 2015). Segundo a diretriz de 2017 da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), o estadiamento do melanoma leva em consideração os seguintes parâmetros clínicos: espessura/profundidade do tumor; análise de linfonodos; análise de metástase em outros sítios anatômicos. O estadiamento classifica a fase do tumor e auxilia na seleção da melhor opção terapêutica para cada caso. Quanto maior a espessura do tumor; a presença de ulceração e o comprometimento de linfonodos mais avançado se encontra o melanoma e pior é o prognóstico para o paciente.

Vários trabalhos analisados em uma revisão sobre angiogênese e alvos para novas terapias realizado por Jour et al 2016 demonstraram que a terapia de inibição da angiogênese como monoterapia não apresentou bons resultados. As terapias que obtiveram maior sucesso, com aumento de sobrevida, foram as terapias combinadas com outros agentes quimioterápicos que possuíam alvos terapêuticos diferentes.

O composto DPBP apresentou resultados combinados de redução da concentração do VEGF e redução da formação de metástase, podendo ser uma alternativa terapêutica mais eficiente para o tratamento do melanoma.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o composto DPBP é eficiente em combater o melanoma. Desencadeia a morte celular por apoptose intrínseca e extrínseca, reduz o volume do tumor nas duas formulações testadas, além de reduzir a metástase. Portanto o composto DPBP constitui-se um forte candidato a futuro fármaco antimelanoma.

5. REFERENCIA

ABDULLAH, C., WANG, X., & BECKER, D. Expression analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinases in advanced melanoma: functional analysis and molecular targeting of cyclin-dependent kinase family members in advanced melanoma. **Cell Cycle**, 10: 977-988. 2011.

ALLEN Jr, L. V., POPOVICH, N. G., & ANSEL, H. C. Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9. Artmed Editora. 2013.

AMELIO, I., MELINO, G., & KNIGHT, R. A. Cell death pathology: cross-talk with autophagy and its clinical implications. **Biochemical and biophysical research communications**, 414: 277-281. 2011.

AOKI, Fugaku et al. A deficiency in the mechanism for p34cdc2 protein kinase activation in mouse embryos arrested at 2-cell stage. **Developmental biology**, v. 154, n. 1, p. 66-72, 1992.

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine & growth factor reviews**, 19: 325-331. 2008.

AUNG, P. P. et al. Microvessel density, lymphovascular density, and lymphovascular invasion in primary cutaneous melanoma—correlation with histopathologic prognosticators and BRAF status. **Human pathology**, 46: 304-312. 2015.

BEDELBAEVA, Khamilia et al. Lack of p21 expression links cell cycle control and appendage regeneration in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5845-5850, 2010.

BOCK, F. J. et al. P53-induced protein with a death domain (PIDD): master of puppets?. **Oncogene**, v. 31, n. 45, p. 4733, 2012.

BRUNTON, L. L., CHABNER, B. A., & KNOLLMANN, B. C. As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12. AMGH Editora. 2012.

CLARK-KNOWLES, Katherine V. et al. Reversible modulation of SIRT1 activity in a mouse strain. **PLoS one**, v. 12, n. 3, p. e0173002, 2017.

DE ROBERTIS, E.M., Hib.J. De Robertis Biologia celular e molecular-16 ed. Guanabara Koogan 2017.

DEBATIN, K. M. Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, 53:153-159. 2004.

FINI, M. A., ELIAS, A., JOHNSON, R. J., WRIGHT, R. M. Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality. **Clinical and translational medicine**, 1: 16, 2012.

FOOTZ, Tim K. et al. The gene for death agonist BID maps to the region of human 22q11. 2 duplicated in cat eye syndrome chromosomes and to mouse chromosome 6. **Genomics**, v. 51, n. 3, p. 472-475, 1998.

FRANÇA, A. A. P. D. Avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* de um derivado de dibenzoilmetano, Tese Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2013.

FRENCH, Lars E.; TSCHOPP, Jürg. The TRAIL to selective tumor death. **Nature medicine**, v. 5, n. 2, p. 146, 1999.

FRYE, Roy A. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 260, n. 1, p. 273-279, 1999.

GARTEL, A. L., & TYNER, A. L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis 1 supported in part by NIH grant R01 DK56283 (to ALT) for the p21 research and Campus Research Board and Illinois Department of Public Health Penny Severns Breast and Cervical Cancer grants (to ALG). 1. **Molecular cancer therapeutics**, 1: 639-649. 2002.

GIBLIN, William; SKINNER, Mary E.; LOMBARD, David B. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 7, p. 271-286, 2014.

GRIVICICH, I., REGNER, A., & ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista brasileira de cancerologia**, 53: 335-343. 2007.

HALL, J. L. et al. Identification of two human beta-tubulin isotypes. **Molecular and cellular biology**, v. 3, n. 5, p. 854-862, 1983.

HANAHAN, D., & WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, 144: 646-674. 2011.

HARA, Hiromitsu et al. The apoptotic protease-activating factor 1-mediated pathway of apoptosis is dispensable for negative selection of thymocytes. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 5, p. 2288-2295, 2002.

HORN, Susanne et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 959-961, 2013.

HSU, Tin-Chen et al. Transformation nonresponsive cells owe their resistance to lack of p65/nuclear factor- κ B activation. **Cancer research**, v. 61, n. 10, p. 4160-4168, 2001.

JOUR, G., IVAN, D., & AUNG, P. P. Angiogenesis in melanoma: an update with a focus on current targeted therapies. *Journal of Clinical Pathology*, 69: 472-483. 2016
KANEUCHI, M., et al. Induction of apoptosis by the p53-273L (Arg \rightarrow Leu) mutant in HSC3 cells without transactivation of p21Waf1/Cip1/Sdi1 and bax. *Molecular carcinogenesis*, 26: 44-52. 1999.

KASHANI-SABET, M., SAGEBIEL, R. W., FERREIRA, C. M., NOSRATI, M., & MILLER III, J. R. Tumor vascularity in the prognostic assessment of primary cutaneous melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 20: 1826-1831. 2002.

KUMAR, V., ABBAS, A., & ASTER, J. C. Robbins & Cotran Patologia-Bases Patológicas das Doenças. Elsevier Brasil. 2015.

LEE, Mary Gwo-Shu; LOOMIS, Cynthia; COWAN, Nicholas J. Sequence of an expressed human β -tubulin gene containing ten Alu family members. **Nucleic acids research**, v. 12, n. 14, p. 5823-5836, 1984.

LINDQVIST, Arne; RODRÍGUEZ-BRAVO, Verónica; MEDEMA, René H. The decision to enter mitosis: feedback and redundancy in the mitotic entry network. **The Journal of cell biology**, v. 185, n. 2, p. 193-202, 2009.

LIPINSKI, C. A., LOMBARDO, F., DOMINY, B. W., & FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 23: 3-25. 1997.

LOHMANN, Katja et al. Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a mutation in the TUBB4 gene. **Annals of neurology**, v. 73, n. 4, p. 537-545, 2013.

LOTEM, Joseph; SACHS, Leo. Regulation of bcl-2, bcl-X \sim L and bax in the Control of Apoptosis by Hematopoietic Cytokines and Dexamethasone. **Cell Growth and Differentiation-Publication American Association for Cancer Research**, v. 6, n. 6, p. 647-654, 1995.

MALUMBRES, Marcos et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. **Nature cell biology**, v. 11, n. 11, p. 1275, 2009.

MANGINI, J., LI, N., & BHAWAN, J. Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. *The American journal of dermatopathology*, 24: 270-281. 2002.

MCARTHUR, G. Dirk Schadendorf, David E. Fisher, Claus Garbe, Jeffrey E. Gershenwald, Jean-Jacques Grob, Allan Halpern, Meenhard Herlyn, Michael A. Marchetti. *Nature reviews disease primers*, 1. 2015.

NAKANO, KENSUKE et al. Induction of apoptosis by β -diketones in human tumor cells. ***Anticancer research***, v. 24, n. 2B, p. 711-718, 2004.

NASCIMENTO, Fernanda R. et al. New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA. ***Biophysical chemistry***, v. 239, p. 1-6, 2018.

NEITEMEIER, S. et al. BID links ferroptosis to mitochondrial cell death pathways. *Redox Biol* 12: 558–570. 2017.

OLIVEIRA, M.R., Avaliação da atividade antimelanoma de formulação transdérmica de um derivado sintético de dibenzoilmetano. Tese Doutorado em Bioquímica Agrícola. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa MG. 2017.

OLMOS, Yolanda; BROSENS, Jan J.; LAM, Eric W.-F. Interplay between SIRT proteins and tumour suppressor transcription factors in chemotherapeutic resistance of cancer. ***Drug Resistance Updates***, v. 14, n. 1, p. 35-44, 2011.

OLTVAL, Zoltán N.; MILLIMAN, Curt L.; KORSMEYER, Stanley J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. ***cell***, v. 74, n. 4, p. 609-619, 1993.

Ongkeko, W., Ferguson, D. J., Harris, A. L., & Norbury, C. (1995). Inactivation of Cdc2 increases the level of apoptosis induced by DNA damage. *Journal of cell science*, 108: 2897-2904.

OUYANG, L., SHI, Z., ZHAO, S., WANG, F. T., ZHOU, T. T., LIU, B., & BAO, J. K. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. ***Cell proliferation***, 45(6), 487-498. 2012.

PALUCH, C., SANTOS, A. M., ANZILOTTI, C., CORNALL, R. J., & DAVIS, S. J. Immune checkpoints as therapeutic targets in autoimmunity. ***Frontiers in Immunology***, 9: 2306. 2018.

PARRY, D., et al. Dinaciclib (SCH 727965), a novel and potent cyclin-dependent kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics*, 1535-7163. 2010.

PATRINOSTRO, Xiaobai et al. Essential nucleotide-and protein-dependent functions of Actb/ β -actin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 31, p. 7973-7978, 2018.

PERRIN, Benjamin J.; ERVASTI, James M. The actin gene family: function follows isoform. **Cytoskeleton**, v. 67, n. 10, p. 630-634, 2010.

PITTI, Robert M. et al. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 22, p. 12687-12690, 1996.

RAJE, Chaaya Iyengar et al. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 5, p. 3252-3261, 2007.

REN, Decheng et al. BID, BIM, and PUMA are essential for activation of the BAX-and BAK-dependent cell death program. **Science**, v. 330, n. 6009, p. 1390-1393, 2010.

SHAIN, A. H., & BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. *Nature reviews Cancer*, 16: 345. 2016.

SHISHODIA, Shishir; AGGARWAL, Bharat B. Nuclear factor- κ B activation mediates cellular transformation, proliferation, invasion angiogenesis and metastasis of cancer. In: **Molecular Targeting and Signal Transduction**. Springer, Boston, MA, 2004. p. 139-173.

SINGH, S., NANNURU, K. C., SADANANDAM, A., VARNEY, M. L., & SINGH, R. K.. CXCR1 and CXCR2 enhances human melanoma tumourigenesis, growth and invasion. **British journal of cancer**, 100: 1638. 2009.

STORPIRTIS, S., GAI, M. N., CAMPOS, D. R. D., & GONÇALVES, J. E. Farmacocinética básica e aplicada. In *farmacocinética básica e aplicada*. 2011.

STUART, P. Michael et al. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. **The Journal of clinical investigation**, v. 99, n. 3, p. 396-402, 1997.

SVAVA ÓSK JÓNSDÓTTIR, FLEMMING STEEN JØRGENSEN AND SØREN BRUNAK. Prediction methods and databases within chemoinformatics: emphasis on drugs and drug candidates. **Bioinformatics**, 21: 2145–2160. 2005.

TAKAHASHI, Tomohiro et al. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. **International immunology**, v. 6, n. 10, p. 1567-1574, 1994.

TELLIEZ, Jean-Baptiste; BEAN, Kevin M.; LIN, Lih-Ling. LRDD, a novel leucine rich repeat and death domain containing protein. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1478, n. 2, p. 280-288, 2000.
The MDL Toxicity database is marketed by MDL Information Systems Ltd., San Lenandro, USA at URL <http://www.mdl.com/>

WANG SY, YU QJ, ZHANG RD, LIU B. Core signaling path-ways of survival/death in autophagy-related cancer networks. *The international journal of biochemistry & cell biology*.43: 1263–1266. 2011.

WANG, Kun et al. BID: a novel BH3 domain-only death agonist. **Genes & development**, v. 10, n. 22, p. 2859-2869, 1996.

WILEY, Steven R. et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. **immunity**, v. 3, n. 6, p. 673-682, 1995.

WILKING-BUSCH, Melissa J. et al. RNA interference-mediated knockdown of SIRT1 and/or SIRT2 in melanoma: Identification of downstream targets by large-scale proteomics analysis. **Journal of proteomics**, v. 170, p. 99-109, 2018.

WILKING, Melissa J. et al. SIRT1 deacetylase is overexpressed in human melanoma and its small molecule inhibition imparts anti-proliferative response via p53 activation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 563, p. 94-100, 2014.

WILLIAMSON, M. A., & SNYDER L. M. Wallach: interpretação de exames laboratoriais .2018.

WU, Ya-di; ZHOU, B. P. TNF- α /NF- κ B/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. **British journal of cancer**, v. 102, n. 4, p. 639, 2010.

Yiu, A., et al. Circulating uric acid levels and subsequent development of cancer in 493,281 individuals: findings from the AMORIS Study. **Oncotarget**, 8: 42332. 2017
YOSHIDA, Hiroki et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. **Cell**, v. 94, n. 6, p. 739-750, 1998.

ZHANG, Y., FUJITA, N., & TSURUO, T. Caspase-mediated cleavage of p21 Waf1/Cip1 converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis. **Oncogene**, 18: 1131. 1999.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O composto estudado DPBP apresentou-se promissor como droga para combater o melanoma de forma eficiente, pois possui um mecanismo multifatorial. As evidências deste estudo que embasam esta afirmação são as seguintes:

- 1) O composto apresentou alta seletividade para células de melanoma, sendo uma droga com efeitos colaterais menores para o paciente.
- 2) O mecanismo de ação envolve provocar apoptose nas células de melanoma por via extrínseca, ligação ao receptor externo de membrana FasL e apoptose por via intrínseca, provocando danos ao DNA por intercalar entre as bases nitrogenadas.
- 3) O DPBP apresentou um potencial em reduzir os níveis de VEGF, indicando uma possível diminuição da angiogênese que pode ter impactado na redução do volume tumoral em conjunto com a apoptose nas células de melanoma e /ou impossibilidade de multiplicação celular.
- 4) O composto estudado também apresentou potencial em redução significativa de metástase para os linfonodos sentinela. Que pode ser consequência da redução de angiogênese em conjunto com a apoptose das células tumorais
- 5) O composto **DPBP** não apresentou toxicidade hepática ou renal.

Portanto podemos considerar o DPBP como candidato a fármaco seletivo; anti-angiogênico; anti-metastático e de baixa toxicidade.

ANEXOS

Certificado CEUA**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 59/2015, intitulado “Avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* de um derivado de dibenzoilmetano”, coordenado pela professora Marisa Alves Nogueira Diaz do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, está de acordo com a Legislação vigente (Lei Nº 11.794, de 08 de outubro de 2008), as Resoluções Normativas editadas pelo CONCEA/MCTI, a DBCA (Diretriz Brasileira de Prática para o Cuidado e a Utilização de Animais para Fins Científicos e Didáticos) e as Diretrizes da Prática de Eutanásia preconizadas pelo CONCEA/MCTI, portanto sendo aprovado por esta Comissão em 17/02/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 59/2015, named “*In vitro* and *in vivo* evaluation of antimelanoma activity of dibenzoylmethane derivative”, is in agreement with the actual Brazilian legislation (Lei Nº 11.794, 2008), Normative Resolutions edited by CONCEA/MCTI, the DBCA (Brazilian Practice Guideline for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes and Teaching) and the Guidelines of Practice the Euthanasia recommended by CONCEA/MCTI therefore being approved by the Committee on February 17, 2016 valid for 12 months.



Prof. Átima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV

Patentes



05/09/2017 870170085935
15.29
0000221705338520

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 019017 0



27/09/2017 870170072580
12.07
0000221705338717

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 020672 8



28/03/2018 870180025305
17.42
28408161800388008

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 006404 5

Artigo

Biophysical Chemistry 239 (2018) 1–6



Contents lists available at ScienceDirect

Biophysical Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biophyschem

New antineoplastic agent based on a dibenzoylmethane derivative: Cytotoxic effect and direct interaction with DNA



Fernanda R. Nascimento^a, Tiago A. Moura^b, Jefferson V.P.B. Baeta^a, Bruno C. Publio^b, Pollyanna M.F. Ferreira^a, Anésia A. Santos^c, Andressa A.P. França^d, Marcio S. Rocha^{b,*}, Gaspar Diaz-Muñoz^e, Marisa A.N. Diaz^{b,*}

^a Department of Biochemistry and Molecular Biology, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

^b Department of Physics, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

^c Department of General Biology, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais 36570-900, Brazil

^d Department of Biology, Universidade Estadual de Minas Gerais, Minas Gerais 36500-000, Brazil

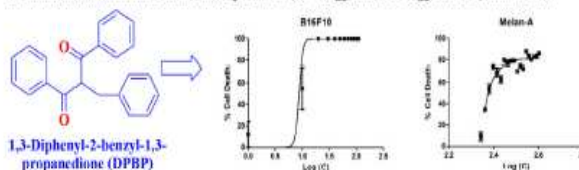
^e Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

HIGHLIGHTS

- 1,3-Diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP), a dibenzoylmethane derivative, is a potential chemotherapeutic agent.
- DPBP had a high selectivity index (SI) of 41.94 for B16F10 melanoma cells over melan-A cells.
- Its mechanism of interaction with DNA was elucidated using optical tweezers.

GRAPHICAL ABSTRACT

Plot of the percentage of cell death obtained for DPBP compound against melan-A and B16F10 lineages in different concentrations. The selectivity indices (SI = IC₅₀ melan-A/IC₅₀ B16F10) was 41.94.



ARTICLE INFO

Keywords:

Dibenzoylmethane
Dibenzoylmethane derivative
Melanoma
Optical tweezers
DNA

ABSTRACT

Melanoma accounts for only 4% of all skin cancers but is among the most lethal cutaneous neoplasms. Dacarbazine is the drug of choice for the treatment of melanoma in Brazil through the public health system mainly because of its low cost. However, it is an alkylating agent of low specificity and elicits a therapeutic response in only 20% of cases. Other drugs available for the treatment of melanoma are expensive, and tumor cells commonly develop resistance to these drugs. The fight against melanoma demands novel, more specific drugs that are effective in killing drug-resistant tumor cells. Dibenzoylmethane (1,3-diphenylpropane-1,3-dione) derivatives are promising antitumor agents. In this study, we investigated the cytotoxic effect of 1,3-diphenyl-2-benzyl-1,3-propanedione (DPBP) on B16F10 melanoma cells as well as its direct interaction with the DNA molecule using optical tweezers. DPBP showed promising results against tumor cells and had a selectivity index of 41.94. Also, we demonstrated the ability of DPBP to interact directly with the DNA molecule. The fact that DPBP can interact with DNA *in vitro* allows us to hypothesize that such an interaction may also occur *in vivo* and, therefore, that DPBP may be an alternative to treat patients with drug-resistant melanomas. These findings can guide the development of new and more effective drugs.

1. Introduction

Melanoma is a cancer of low incidence but high lethality. It

accounts for only 4% of all cancers in Brazil. About six thousand new cases are expected for the biennium 2016–2017, of which 1500 will probably result in death. The southern region of Brazil has the highest

* Corresponding authors.

E-mail addresses: marcio.s.rocha@ufv.br (M.S. Rocha), marisanguera@ufv.br (M.A.N. Diaz).

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2018.04.009>

Received 24 March 2018; Received in revised form 28 April 2018; Accepted 28 April 2018

Available online 03 May 2018

0301-4622/© 2018 Published by Elsevier B.V.