

JEFFERSON VIKTOR DE PAULA BARROS BAETA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO*, *IN SILICO* E *IN VIVO* DO 2-ALIL-1,3-DIFENIL-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
2019

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

T

B142s
2019 Baeta, Jefferson Viktor de Paula Barros, 1991-
Síntese e avaliação da atividade antimelanoma *in vitro*, *in silico* e *in vivo* do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona / Jefferson Viktor de Paula Barros Baeta. – Viçosa, MG, 2019.
xv, 122 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Maria Alves Nogueira Diaz.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Melanoma. 2. Dibenzoilmetano. 3. Linhagem celular tumoral. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

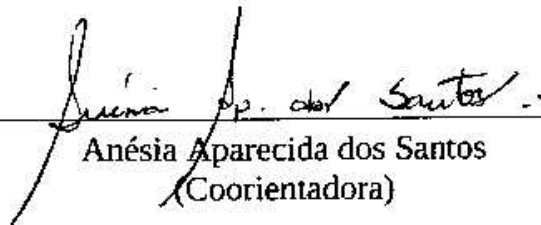
CDD 22. ed. 616.99477

JEFFERSON VIKTOR DE PAULA BARROS BAËTA

SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO*, *IN SILICO* E *IN VIVO* DO 2-ALIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA

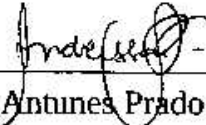
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

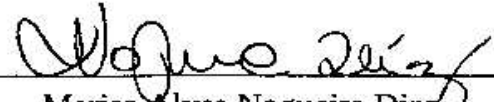
APROVADA: 28 de fevereiro de 2019.


Anésia Aparecida dos Santos
(Coorientadora)


Gaspar Díaz Muñoz
(Coorientador)


Antônio Jacinto Demuner


Andressa Antunes Prado de França


Marisa Alves Nogueira Diaz
(Orientadora)

Dedico a todos que perderam o sono, me ouvindo chorar, e, com carinho, otimismo e amizade me fizeram crescer, impulsionando a minha jornada até aqui. E, agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito. (Chico Xavier)

“...A man can only stumble for so long before he either falls or stands up straight.” Brandon Sanderson (The Well of Ascension)

***“Nunca se esqueça de quem você é, porque é certo que o mundo não se lembrará. Faça disso sua força. Assim, não poderá ser nunca a sua fraqueza. Arme-se com esta lembrança, e ela nunca poderá ser usada para magoá-lo”
Tyrion Lannister (As Crônicas de Gelo e Fogo - A guerra dos tronos).***

AGRADECIMENTOS

A DEUS pelo sentido da vida 5'→3' e por tantas graças concedidas durante o Doutorado;

Aos meus pais por meu genoma e pelo apoio e incentivo. Muito obrigado por sempre estarem comigo neste caminho e por me ensinarem todas as vezes que errei.

Agradeço ao meu irmão, Ygor, pela ajuda durante todo esse tempo. Muito obrigado também por ser meu confidente e melhor amigo.

Agradeço principalmente à minha avó Ivonise, que me ensinou dizer: “ah certo!” naqueles momentos que não valia a pena discutir e perder meu tempo.

Obrigado, a todos colegas da Bioquímica, Física e Biologia, pelos momentos felizes, piadas, companheirismo e principalmente pela ajuda durante todos esses anos.

Obrigado Marisa, Virginia e a todos do laboratório BioNat por me ensinarem as técnicas químicas que realizei para fazer este trabalho.

Obrigado a Anésia e a todas do laboratório de culturas de células que me acolheram e me guiaram nesse mundo que é a cultura de células.

A todos meus amigos pelo apoio, carinho e paciência.

A todos que me fizeram seguir em frente e perseguir o que eu queria que direta ou indiretamente, contribuíssem para que o presente trabalho se tornasse realidade. Em especial àqueles que souberam compreender os altos e baixos dessa convivência.

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).

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
1. Vias de administração de Medicamentos	2
2. Objetivo	3
3. Organização da tese	3
4. Referências Bibliográficas	4
CAPÍTULO 1 - SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA <i>IN VITRO</i> DO DERIVADO DE DIBENZOILMETANO 2-ALIL-1,3-DIFENIL- 1,3-PROPANODIONA	6
1. Introdução	6
2. Metodologia	10
2.1. Instrumentação	10
2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	10
2.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	10
2.1.3. Temperatura de Fusão	11
2.1.4. Cromatografia de camada delgada (CCD)	11
2.2. Síntese e purificação do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	12
2.2.1. 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	12
2.3. Ensaio de caracterização de atividade biológica	13
2.3.1. Cultura de células	13
2.3.1.1. Tripsinização	13
2.3.1.2. Contagem de células viáveis	14
2.3.1.3. Criopreservação e Descongelamento	14
2.3.2. Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT	15
2.3.2.1. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células	15
2.3.2.2. Índice de seletividade	16
2.3.3. Citometria de Fluxo	16
2.3.4. Extração do RNA total de células B16F10	17

2.3.4.1 Síntese do cDNA para avaliação da expressão gênica por RT-PCR	18
2.3.4.2. Desenho de primers, teste de concentração e eficiência para validação da qPCR	19
3. Resultados e discussão	21
3.1. Química	21
3.1.1. Síntese do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	21
3.1.2 Rendimento da Reação	24
3.1.3 Caracterização do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	24
3.2. Atividade biológica	28
3.2.1. Ensaios de citotoxicidade <i>in vitro</i> e índice de seletividade	28
3.2.2. Avaliação de morte celular	32
3.2.3. Avaliação da via de morte celular por apoptose causada pelo composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	34
3.2.3.1 Vias de Sinalização Celular	40
4. Conclusões	44
5. Referências Bibliográficas	44
CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE DERIVADOS DE DIBENZOILMETANO E SUA POTENCIAL AÇÃO USANDO METODOLOGIAS <i>IN VITRO</i> E <i>IN SILICO</i>	50
1. Introdução	50
2. Metodologia	52
2.1. Instrumentação	52
2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	52
2.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	52
2.1.4. Cromatografia de camada delgada (CCD)	53
2.2. Síntese e purificação dos derivados de 1,3-Difenilpropano-1,3-diona	53
2.2.1. 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP)	54
2.2.2. 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP)	54
2.2.3. 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH)	54
2.3. Ensaios de caracterização de atividade biológica	55
2.3.1. Cultura de células	55
2.3.1.1. Tripsinização	55
2.3.1.2. Contagem de células viáveis	56
2.3.1.3. Criopreservação e Descongelamento	56
2.3.2. Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT	57

2.3.2.1. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células	58
2.3.2.2. Índice de seletividade	58
2.4. Perfil farmacocinético e toxicológico	58
3. Resultados	59
3.1. Química	59
3.1.1. Síntese e caracterização dos derivados de DBM	59
3.2. Atividade biológica	69
3.2.1. Ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> e índice de seletividade	69
3.3. Perfil farmacocinético e toxicológico	71
4. Conclusão	76
5. Referências Bibliográficas	76
CAPÍTULO 3 - CÁLCULO DAS DOSES <i>IN SILICO</i> DO COMPOSTO 2- ALIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA (DAP) PARA EXPERIMENTOS <i>IN</i> <i>VIVO</i>	80
1. Introdução	80
2. Metodologia	81
2.1. Determinação da dose para os animais	81
3. Resultados	83
3.1. Determinação da dose para os animais	83
4. Referências Bibliográficas	84
CAPÍTULO 4 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA <i>IN VIVO</i> DO 2-ALIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA (DAP)	85
1. Introdução	85
2. Metodologia	87
2.1. Teste <i>in vivo</i>	87
2.2. Tratamento	88
2.3. Análise histológica	89
2.4. Avaliação de parâmetros sanguíneos	90
2.5. Estresse Oxidativo	91
2.6. Análise Estatística	92
3. Resultados	92
3.1. Análise histológica	95
3.2. Avaliação de parâmetros sanguíneos	98
3.3. Avaliação do estresse oxidativos no fígado	103

4. Conclusão	105
5. Referências Bibliográficas	105
CONCLUSÃO GERAL	109
ANEXOS	111
Lista de Genes Alvos	112
Patentes	120
Artigo	121
Certificado CEUA	122

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Genes alvo e sequência de primers	20
Tabela 2 - Concentrações letais do composto 2-aliil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	29
Tabela 3 - Concentrações letais do Dacarbazina	30
Tabela 4 - IC ₅₀ para as linhagens celulares e Índice de seletividade	31
Tabela 5 - Regressão Linear dos primers testados.	35

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - IC ₅₀ para as linhagens celulares e Índice de seletividade.	69
Tabela 2 – Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) por pkCSM análise de similaridade.	73
Tabela 3 – Predição das propriedades toxicológicas por pkCSM e LAZAR análise de similaridade.	75

CAPÍTULO 3

Tabela 1 – Valores obtidos da predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) por pkCSM análise de similaridade, as fórmulas farmacocinéticas previamente determinadas e os dados obtidos nos experimentos <i>in vivo</i> .	84
--	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Estrutura química da Dacarbazina	8
Figura 2 - Estrutura química do 1,3-difenilpropano-1,3-diona (DBM)	8
Figura 3 - Estrutura química do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	9
Figura 4 - Cromatograma da mistura de reacional após 60 horas.	22
Figura 5 - Cromatograma do Composto enviado para o RMN com uma pequena impureza.	23
Figura 6 - Cromatograma do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona puro.	23
Figura 7 - Estrutura do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona, com carbonos indicados.	24
Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona.	25
Figura 9 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona.	26
Figura 10 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona.	27
Figura 11 - Taxa de mortalidade celular em função do logaritmo da concentração do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona nas Linhagens tumorais B16F10 e Tm5 e na linhagem normal Melan-A.	29
Figura 12 - Divisão dos quadrantes da Citometria de Fluxo.	33
Figura 13 - Citometria de Fluxo da linhagem B16F10: (A) Células sem tratamento, Controle; (B) Células após 16h de contato com IC_{90} do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona.	34
Figura 14 – Expressão relativa dos genes alvos Apaf1, Bax, Bcl2, Bid, CDK1, Fasl, p21, Pidd1 de cultura de células B16F10 divididas em dois grupos amostra não tratadas (controle) e amostras tratada (por 4 horas com IC_{50}) do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método da curva padrão relativa de calibração normalizada.	36
Figura 15 – Expressão relativa dos genes alvos Puma, Sirt 1, TNSF10 de cultura de células B16F10 divididas em dois grupos amostra não tratadas (controle) e amostras tratada (por 4 horas com IC_{50}) do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método da curva padrão relativa de calibração normalizada.	37
Figura 16 – Expressão relativa dos genes alvos Apaf1, Bax, Bcl2, Bid, CDK1, Fasl, p21, Pidd1 e Puma de cultura de células B16F10 tratadas (por 4 horas com IC_{50}) do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método de $\Delta\Delta\text{Ct}$.	38
Figura 17 – Via de sinalização de apoptose de <i>Mus musculus</i> (camundongo).	41
Figura 18 – Via de sinalização de p53 de <i>Mus musculus</i> (camundongo).	42
Figura 19 – Via de senescência celular de <i>Mus musculus</i> (camundongo).	43
CAPÍTULO 2	
Figura 1 - 1,3-Difenilpropano-1,3-diona (DBM).	50

Figura 2 - Análogo X mais potente contra linhagens de células câncer de ovário (1A9) e Câncer de osso (HOS).	51
Figura 3 – Estruturas químicas dos compostos 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP), 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP) e 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).	59
Figura 4 - Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP).	60
Figura 5 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP).	61
Figura 6 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl ₃) do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP).	62
Figura 7 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP).	63
Figura 8 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP).	64
Figura 9 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl ₃) do 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP).	65
Figura 10 - Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do e 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).	66
Figura 11 - Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃)-CCD do 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).	67
Figura 12 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl ₃) do 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).	68
CAPÍTULO 4	
Figura 1 – Detalhe da região tricotomizada	93
Figura 2 – Detalhes do aparecimento de manchas escuras na região tricotomizada, após o 5º dia de indução tumoral.	93
Figura 3 – Foto retirada do mesmo animal no dia da eutanásia, tumor marcado com a seta vermelha.	93
Figura 4 – Massa média corporal.	94
Figura 5 – Massa média dos fígados.	94
Figura 6 – Massa média dos tumores.	95
Figura 7 – Histologia dos grupos G1 (Controle sem a inoculação de células), G2 (Gel transdérmico sem composto ativo); G3 (Pomada sem composto ativo).	97
Figura 8 – Histologia dos grupos G2 (Gel transdérmico sem composto ativo); G4 (Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g); G5 (Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g).	98
Figura 9 – Dosagem de Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST).	99
Figura 10 – Dosagem de Creatinina.	100
Figura 11 – Dosagem de Ácido úrico.	101
Figura 12 – Dosagem de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).	103
Figura 13 – Parâmetros de estresse oxidativos: proteínas totais, Superóxido dismutase (SOD), Óxido Nítrico (ON), Malondialdeído (MDA).	104

RESUMO

BAETA, Jefferson Viktor de Paula Barros, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2019. **Síntese e avaliação da atividade antimelanoma *in vitro*, *in silico* e *in vivo* do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona** Orientadora: Marisa Alves Nogueira Diaz. Coorientadores: Anésia Aparecida Santos, Gaspar Diaz Muñoz, Marcio Santos Rocha e Virginia Ramos Pizziolo.

Neoplasias melanocíticas podem ser lesões benignas denominadas nevo melanocítico, ou malignas denominadas melanomas, e todas estas se originam de células chamadas melanócitos. O melanoma pode aparecer em qualquer parte do corpo, na pele ou mucosas, na forma de manchas, pintas ou sinais. O câncer de pele do tipo melanoma é muito agressivo devido ao seu elevado potencial de produzir metástase e apresenta alta letalidade, constituindo a primeira causa de morte por doenças de pele. A Dacarbazina é o medicamento de escolha no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento do melanoma, devido, principalmente, a seu baixo custo, porém este medicamento possui pouca seletividade para as células tumorais. Compostos derivados de β -dicetonas têm se destacado por apresentarem características interessantes, entre elas a atividade antitumoral. Este trabalho buscou determinar a atividade de um derivado de dibenzoilmetano, o composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP) em ensaios *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Em ensaios *in vitro* o composto apresentou IC_{50} frente a células tumorais ($IC_{50B16F10} = 26,17 \pm 1,11 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50Tm5} = 44,40 \pm 6,88 \mu\text{g/mL}$) menores que o medicamento Dacarbazina ($IC_{50B16F10} = 258,51 \pm 44,09 \mu\text{g/mL}$). Os índices de seletividade do composto ($IS_{B16F10} = 7,917$; $IS_{Tm5} = 4,667$) foram superiores ao valor mínimo para ser considerado significativo em ensaios de novas drogas. A citometria de fluxo e os ensaios moleculares indicaram que o composto causa a apoptose celular atuando em receptores Fas e nas vias relacionadas com as caspases 3, 8 e 9, estimulando os promotores de apoptose Apaf1, Bax, Bid, Fasl, Pidd1 e Puma e inibindo a expressão relativa de Bcl2, um inibidor de apoptose, além de interferir no ciclo celular por alterar a expressão dos genes p21 e CDK1. Os ensaios ADMET, *in silico*, para esse composto demonstraram que ele apresenta alta absorção intestinal e tem uma boa distribuição, porém ele apresenta baixa solubilidade em água, é substrato para as principais proteínas do metabolismo (CYP) e de resistência (P-gp) a drogas e não apresenta capacidade

carcinogênica. Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados dois veículos de entrega do composto, formulação com pomada e com gel transdérmico. A concentração aplicada nos camundongos foi determinada com base nos resultados do ensaio ADMET. Foram coletados e analisados sangue, fígado, rim e linfonodo. Afim de se determinar se o composto apresenta ação hepatotóxica como predito *in silico*, foram realizadas avaliação histopatológica do tecido, de marcadores de dano celular (ALT e AST), além de marcadores de estresse oxidativos e foi observado que o composto não apresentou hepatotoxicidade. O DAP também não alterou as características histológicas ou bioquímicas (creatinina) dos rins. As análises histológicas do linfonodo revelaram que o composto aparenta ser capaz de reduzir a migração de células tumorais para este tecido. Tal resultado corroborado pela sua capacidade de reduzir os níveis de VEGF, um dos principais fatores responsáveis pela angiogênese e conseqüentemente a metástase de tumores. Finalmente, de acordo com os dados observados para o composto DAP podemos concluir que o mesmo apresenta atividade antitumoral para o câncer do tipo melanoma.

ABSTRACT

BAETA, Jefferson Viktor de Paula Barros, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2019. **Synthesis and evaluation of *in vitro*, *in silico* and *in vivo* anti-melanoma activity of the 2-allyl-1,3-diphenyl-1,3-propanedione.** Adviser: Marisa Alves Nogueira Diaz. Co-advisers: Anésia Aparecida Santos, Gaspar Diaz Muñoz, Marcio Santos Rocha and Virginia Ramos Pizziolo.

Melanocytic neoplasms may be benign lesions called melanocytic nevus, or malignancies, called melanomas, and all these originate from melanocytes. Melanoma can appear anywhere on the body, on the skin or mucous membranes, in the form of spots or signs. Melanoma skin cancer is very aggressive due to its high potential to metastasis and presents high lethality, being the first cause of death due to skin diseases. Dacarbazine is the drug of choice in the *Sistema Único de saúde* (SUS) for the treatment of melanoma, mainly due to its low cost, but this drug has little selectivity for tumor cells. Compounds derived from β -diketones have been distinguished by their interesting characteristics, including antitumor activity. This work aimed to determine the activity of a dibenzoylmethane derivative, the 2-allyl-1,3-diphenyl-1,3-propanedione (DAP) compound in *in vitro*, *in silico* and *in vivo* assays. In *in vitro* assays, the compound had IC_{50} against tumor cells ($IC_{50B16F10} = 26.17 \pm 1.11 \mu\text{g/mL}$, $IC_{50Tm5} = 44.40 \pm 6.88 \mu\text{g/mL}$) lower than the Dacarbazine ($IC_{50B16F10} = 258.51 \pm 44.09 \mu\text{g/mL}$). The selectivity index of DAP ($IS_{B16F10} = 7,917$; $IS_{Tm5} = 4,667$) were higher than the minimum value to be considered significant in new drug trials. Flow cytometry and molecular assays indicated that the compound causes cellular apoptosis. DAP acts on Fas receptors and on caspase-related pathways 3, 8 and 9, stimulating the apoptosis promoters Apaf1, Bax, Bid, Fasl, Pidd1 and Puma and inhibiting the relative expression of Bcl2, an inhibitor of apoptosis, besides interfering in the cell cycle by altering the expression of the p21 and CDK1 genes. The ADMET, *in silico* assays, for this compound demonstrated that it has high intestinal absorption and has a good distribution, but it has low solubility in water, it is a substrate for the main proteins of metabolism (CYP) and resistance (P-gp) to drugs and it does not present carcinogenic capacity. For the *in vivo* assays, two delivery vehicles of the compound were used. The concentration applied to the mice was determined based on the results of the ADMET assay. Blood, liver,

kidney and lymph node were collected and analyzed. Histopathological evaluation of the liver tissue, cell damage markers (ALT and AST), and oxidative stress markers were performed to determine if the compound had hepatotoxic action as predicted in silico, and it was observed that the compound did not present it. DAP also did not alter the histological or biochemical (creatinine) characteristics of the kidneys. Histological analyzes of the lymph node revealed that the compound appears to be able to reduce the migration of tumor cells into this tissue. This result is corroborated by its ability to reduce VEGF levels, one of the major factors responsible for angiogenesis and consequent tumor metastasis. Finally, according to the observed data for the compound DAP we can conclude that it has antitumor activity for cancer of the melanoma type.

INTRODUÇÃO GERAL

Neoplasias melanocíticas podem ser lesões benignas, denominadas nevo melanocítico, ou malignas, denominadas melanomas. Todas essas neoplasias se originam de células derivadas da crista neural, que são os melanócitos. Durante o desenvolvimento, colonizam a pele, o olho e, em menor grau, uma ampla gama de outros tecidos em todo o corpo (MORT, 2015). Os melanócitos em todos estes locais podem originar o câncer de pele conhecido como melanoma (BASTIAN, 2014). O melanoma pode aparecer em qualquer parte do corpo, na pele ou mucosas, na forma de manchas, pintas ou sinais. Nos indivíduos de pele negra ele é mais comum nas áreas claras, como palmas das mãos e plantas dos pés (INCA, 2010). Os tipos mais comuns de melanoma em caucasianos são encontrados na pele exposta ao sol. Esses melanomas cutâneos podem ser categorizados de forma ampla por suas origens da pele que é ou não cronicamente danificada pelo sol (MALDONADO et al., 2003; CURTIN et al., 2005; VIROS et al., 2008; LONG, et al., 2011).

A escolha do câncer de pele do tipo melanoma ocorreu devido aos seguintes fatores: 1) agressividade do tumor, devido ao seu elevado potencial de produzir metástase; 2) a alta letalidade observada (COTRAN et al., 2004); 3) falta de opções de tratamentos e 4) alta taxa de resistência a drogas (MDR) (LA PORTA, 2007).

O melanoma constitui a primeira causa de morte por doenças de pele, é um dos tipos de câncer humano mais agressivo e resistente ao tratamento, com sua incidência aumentada radicalmente em todo o mundo durante as últimas décadas. No Brasil, estima-se que mais de 4.000 novos casos sejam diagnosticados todos os anos (CARVALHO et al., 2004). Para o biênio 2018-2019 a estimativa é de termos 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. Somente em Minas Gerais estima-se para o mesmo biênio 190 novos casos para homens e 320 novos casos para mulheres (INCA, 2019).

O tratamento do melanoma tem como medicamento de escolha no Sistema Único de Saúde (SUS) a Dacarbazina, devido, principalmente, a seu baixo custo. Este medicamento apresenta Índice de Seletividade = 1,0 o que significa que ele

é pouco seletivo para as células tumorais e atua em qualquer fase do ciclo celular, apresentando uma resposta terapêutica muito baixa (apenas 20% dos casos por um período de aproximadamente cinco meses e a resposta completa em 5% dos casos), sendo assim classificado como um agente pouco específico para o tratamento desse câncer (ATKINS et al., 1999; FAGHFURI et al., 2015). A partir de 2011 várias drogas anti-melanoma foram aprovadas pelo FDA (Food and Drugs Administration), incluindo os medicamentos Vermurafenib com alvo na mutação de BRAFV600E; e Ipilimumab, um anticorpo monoclonal antiCTLA-4; e Interferon peguilhado α -2b (PEG-IFN), correntemente utilizado como adjuvante no tratamento de melanoma no estágio III (EGGERMONT et al., 2008). Porém, esses medicamentos são caros e dificilmente um usuário do SUS terá acesso a eles. Apesar dessa evolução no tratamento do melanoma, uma complexa rede de vias alternativas de sinalização celular promove resistência aos novos tratamentos, desta forma se faz necessária a busca por substâncias mais eficazes (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Nesse contexto o nosso composto se apresenta uma alternativa viável e de baixo custo no tratamento do melanoma.

1. Vias de administração de Medicamentos

A busca incessante por novas vias mais eficientes de distribuição de medicamentos para os sítios tumorais constitui um dos desafios encontrados pelas pesquisas da área.

Atualmente, a pele tem sido alvo de estudos e análises cada vez mais detalhadas, em busca de alternativas à utilização de drogas sistêmicas injetáveis (BAROLI, 2010; CEVC e VIERL, 2010; PROW et al., 2011; SEVERINO et al., 2013).

A pele atua como barreira física primária frente a penetração de agentes externos químicos e biológicos e, também, a perda de água pelo organismo, graças a composição de seu estrato córneo. Além disso, a pele atua, ainda, minimizando os efeitos da radiação ultravioleta e infravermelha (BAROLI, 2010; SEVERINO et al., 2013).

As vantagens da aplicação local (tópica) ou transdérmicas de medicamentos sobre os métodos tradicionais orais ou intravenosos permeiam a

prevenção do metabolismo de primeira passagem e minimização de dor até a possível liberação prolongada e controlada da droga, além do importante fato de constituir uma via de terapia mais aceitável para o paciente e amenizar ampla gama de efeitos colaterais das demais vias de administração medicamentosa (HEARNDEN et al. 2009). Contudo, as drogas que conseguem sobrepujar a barreira do estrato córneo ainda precisarão debelar adicionais barreiras celulares e moleculares, que consistem, principalmente, do sistema imunológico e dos sistemas enzimáticos metabólicos (SEVERINO et al., 2013).

2. Objetivo

Síntese e avaliação da atividade antimelanoma *in vitro*, *in silico* e *in vivo* do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona e estudo do seu mecanismo de ação.

3. Organização da tese

Nesta tese, cada capítulo está organizado como uma proposta de artigo independente do anterior.

No primeiro capítulo será apresentado os dados experimentais da síntese do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona e as análises *in vitro* realizadas nesta tese, ou seja, serão apresentados os resultados relativos a: citotoxicidade frente a linhagens tumorais e normais, avaliação da morte celular causada e análise moleculares para determinação das vias de sinalização envolvidas no tipo de morte celular induzido.

O segundo capítulo apresenta a síntese e caracterização de outros compostos também derivados e o próprio DBM, assim como, ensaios *in vitro* de citotoxicidade frente a linhagens tumorais e normais e ensaios *in silico* realizadas nos programas LAZAR e pkCSM destes compostos. Neste capítulo apesar de serem apresentados novos compostos sintéticos, o objetivo desta tese permanece o mesmo, ou seja, a avaliação da atividade antimelanoma *in vitro*, *in silico* e *in vivo* do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. Estes outros compostos foram descritos nas teses de doutorado de França (2013), Nascimento (2018) e de Oliveira (2017), bem como no artigo de Nascimento e colaboradores de 2018.

No terceiro capítulo será apresentado o cálculo da estimativa da dose a ser usadas em experimentos animais, este cálculo foi realizado com fórmulas clássicas de farmacocinética e os dados obtidos a partir dos ensaios *in silico* realizadas nos programas pkCSM do composto 2-*alil*-1,3-difenil-1,3-propanodiona.

No último capítulo, será apresentado os dados *in vivo* obtidos com os experimentos em camundongos. Utilizando duas formulações com o composto ativo os animais receberam o tratamento tópico todos os dias ao longo de 21 dias. Após este período os animais foram eutanasiados e as amostras de fígado, rim, pulmão, linfonodo sentinela e o tumor foram removidos e avaliados.

4. Referências Bibliográficas

- ATKINS, Michael B. et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. **Journal of clinical oncology**, v. 17, n. 7, p. 2105-2105, 1999.
- BASTIAN, Boris C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 239-271, 2014.
- CARVALHO, Charles André et al. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. **Anais brasileiros de dermatologia. Vol. 79, n. 1 (jan./fev. 2004), p. 53-60**, 2004.
- CEVC, Gregor; VIERL, Ulrich. Nanotechnology and the transdermal route: A state of the art review and critical appraisal. **Journal of controlled release**, v. 141, n. 3, p. 277-299, 2010.
- COTRAN, Ramzi S. et al. Robbins pathologic basis of disease. 1999.
- CURTIN, John A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2135-2147, 2005.
- DE OLIVEIRA, Marcos Rodrigo. **Avaliação da atividade antimelanoma de formulação transdérmica de um derivado sintético de dibenzoilmetano**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- EGGERMONT, Alexander MM et al. Adjuvant therapy with pegylated interferon alfa-2b versus observation alone in resected stage III melanoma: final results of EORTC 18991, a randomised phase III trial. **The Lancet**, v. 372, n. 9633, p. 117-126, 2008.
- FAGHFURI, Elnaz et al. Nivolumab and pembrolizumab as immune-modulating monoclonal antibodies targeting the PD-1 receptor to treat melanoma. **Expert review of anticancer therapy**, v. 15, n. 9, p. 981-993, 2015.
- FRANÇA, Andressa Antunes Prado de. **Avaliação da atividade antimelanoma in vitro e in vivo de um derivado de dibenzoilmetano**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- HEARNDEN, Vanessa et al. Diffusion studies of nanometer polymersomes across tissue engineered human oral mucosa. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 7, p. 1718-1728, 2009.

- Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: **Incidência de câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 18 de janeiro de 2019.
- LA PORTA, Caterina AM. Drug resistance in melanoma: new perspectives. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 4, p. 387-391, 2007.
- LONG, Georgina V. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 10, p. 1239-1246, 2011.
- MALDONADO, Janet L. et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 24, p. 1878-1890, 2003.
- MORT, Richard L.; JACKSON, Ian J.; PATTON, E. Elizabeth. The melanocyte lineage in development and disease. **Development**, v. 142, n. 4, p. 620-632, 2015.
- 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.
- NASCIMENTO, Fernanda Rodrigues. **Avaliação da atividade antineoplásica in vitro de um derivado de dibenzoilmetano**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- PROW, Tarl W. et al. Nanoparticles and microparticles for skin drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 63, n. 6, p. 470-491, 2011.
- SEVERINO, P. et al. Nanoemulsions and nanoparticles for non-melanoma skin cancer: effects of lipid materials. **Clinical and Translational Oncology**, v. 15, n. 6, p. 417-424, 2013.
- VIROS, Amaya et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. **PLoS medicine**, v. 5, n. 6, p. e120, 2008.

CAPÍTULO 1**SÍNTESE E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VITRO* DO
DERIVADO DE DIBENZOILMETANO 2-ALIL-1,3-DIFENIL-1,3-
PROPANODIONA****1. Introdução**

Os melanócitos são células derivadas da crista neural que, durante o desenvolvimento embrionário, colonizam a pele, os olhos e, em menor grau, uma ampla gama de outros tecidos em todo o corpo. As neoplasias melanocíticas, originadas por estas células, podem ser lesões benignas (nevus melanocíticos) ou malignas (melanomas). Cada melanócito pode dar origem a um tipo de melanoma fenotipicamente diferente do outro e, por causa desta variabilidade, o melanoma é considerado uma das formas mais mortais e metastáticas de câncer (BASTIAN, 2014; MORT et al., 2015; SHAIN & BASTIAN, 2016).

Em uma pessoa o risco de desenvolver este câncer depende de fatores diversos, tais como idade, o tipo de pele, o tipo de cabelo, a cor dos olhos, o número de pintas, a predisposição genética e exposição a fatores de risco, incluindo algumas condições referentes ao estilo de vida e, portanto, potencialmente evitáveis, tal como a exposição excessiva ao sol (INCA 2017, CANCER RESEARCH UK, 2017). Segundo o Cancer Research UK (2017), cerca de 86% (90% do sexo masculino e 82% do sexo feminino) de todos os casos de melanoma no Reino Unido estão ligados ao estilo de vida e a exposição à radiação ultravioleta (UV) de fontes variadas, por exemplo, de camas de bronzamento ao sol. A utilização de proteção contra a radiação UV, como o uso de chapéus, guarda-sóis, óculos escuros e filtros solares com fator de proteção 15 ou superior, é tida como principal método de prevenção (VIGITEL, 2010).

Em estágios iniciais é um câncer tratável, sendo recomendada a remoção cirúrgica do tumor e dos linfonodos sentinelas e, após a remoção, a biopsia dos tecidos removidos deve ser realizada. Este procedimento, normalmente, elimina as células cancerígenas antes que alcancem a corrente sanguínea e sistema linfático, diminuindo a possibilidade de causar metástases. Porém, em estágios mais avançados o tratamento consiste em medicamentos que variam de acordo

com o tamanho e estadiamento do tumor, mas estes apresentam baixa efetividade e custo elevado. Além disso, quanto mais avançado o estágio da doença, menores são as chances de sobrevivência dos pacientes, mesmo com o tratamento (INCA 2017, CANCER RESEARCH UK, 2017).

Os melanomas cutâneos podem ser classificados, de maneira geral, por suas origens da pele, sendo ou não causados por danificação crônica pelo sol (DCS e não DCS, respectivamente) estes diferem em seu local anatômico de origem, grau de exposição cumulativa a radiação UV, idade do hospedeiro, carga e tipos de mutação (MALDONADO et al., 2003; CURTIN et al., 2005; VIROS et al., 2008; LONG et al., 2011).

Diversas mutações são encontradas em melanomas totalmente desenvolvidos, exigindo constantes pesquisas por novas terapias antineoplásicas. Entre as mutações mais recorrentes estão as que afetam genes nas vias de sinalização chaves que regulam proliferação (BRAF, ARN e NF1), crescimento e metabolismo (PTEN e KIT), identidade celular (domínio 2 de interação rico em AT [ARID2]), resistência à apoptose (TP53), controle do ciclo celular (inibidor 2A ciclina-dependente de quinase [CDKN2A], que codifica p16INK4A e p14ARF) e a expectativa de vida replicativa (telomerase transcriptase reversa [TERT]) (HODIS et al., 2012; KRAUTHAMMER et al., 2012; HUANG et al., 2013; HORN et al., 2013). Ainda que a presença de certas mutações patogênicas em estágios iniciais e a associação entre lesões precursoras e tipos específicos de melanoma forneçam pistas essenciais para determinar a ordem na qual as mutações tendem a se acumular, pouco se sabe sobre a ordem exata destas. Tal fenômeno, tende a dificultar o tratamento, exigindo o surgimento de novos medicamentos, mais específicos, e que dificultem o aparecimento de resistência ao tratamento (SHAIN & BASTIAN 2016).

No Brasil, a Dacarbazina (Figura 1) é o medicamento de escolha no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento do melanoma, devido, principalmente, a seu baixo custo. Este medicamento é um agente alquilante que se liga ao DNA impedindo a separação das fitas, causando problemas na síntese proteica e na replicação de DNA. A Dacarbazina atua em qualquer fase do ciclo celular e apresenta uma resposta terapêutica muito baixa (apenas 20% dos casos por um período de aproximadamente 5 meses e a resposta completa em

5% dos casos), sendo, assim, classificado como um agente pouco específico (SERRONE et al., 2000; LUI et al., 2007).

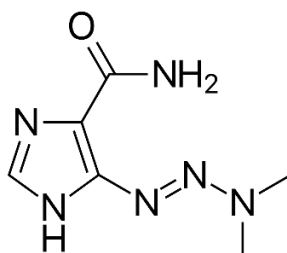


Figura 1 - Estrutura química da Dacarbazina.

O dibenzoilmetano (DBM) (1,3-difenilpropano-1,3-diona) (Figura 2) e seus derivados, são pequenas β -dicetonas, fontes promissoras de novas substâncias antitumorais (NOGUEIRA et al., 2003; NAKANO et al., 2004; KHOR et al., 2009). Os dibenzoilmetanos são considerados um subgrupo na classe dos flavonoides e não são encontrados com facilidade na natureza, podendo, porém, ser isolados do gênero *Lonchocarpus*, isolado pela primeira vez na espécie *Lonchocarpus latifolius* (Wild) DC (MAGALHÃES et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2003). As principais propriedades do DBM e seus derivados descritas na literatura são: propriedades fotoprotetoras e propriedades antineoplásicas no combate aos cânceres de mama, próstata e intestino (LIN et al., 2001; JAKSON et al., 2002; CHEN, 2009).

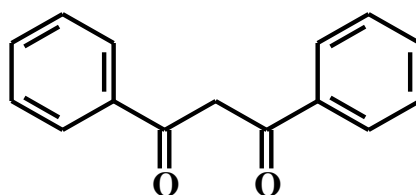


Figura 2 - Estrutura química do 1,3-difenilpropano-1,3-diona (DBM).

Nogueira e colaboradores (2003) sintetizaram um conjunto de derivados do DBM e estudaram suas propriedades antitumorais em 4 linhagens de células neoplásicas: mama, mama resistente, melanoma e pulmão. Dos 22 derivados sintetizados, 8 apresentaram atividade contra as 4 linhagens celulares. Dentre os 8 compostos ativos, o 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (Figura 3), objeto

deste estudo, se mostrou um potencial como agente antitumoral. No entanto, seu mecanismo de ação ainda é desconhecido.

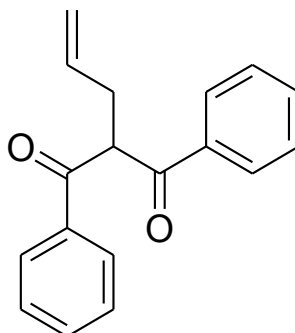


Figura 3 - Estrutura química do composto 2-aliil-1,3-difenil-1,3-propanodiona.

Segundo Sellers & Fisher (1999), para um tratamento ser bem-sucedido, em doenças humanas, é necessário que a droga apresente um índice terapêutico adequado, de modo que os efeitos específicos do tratamento ajam sobre as células-alvo e não ocorram efeitos clinicamente significativos sobre o hospedeiro. Para o tratamento de câncer, o objetivo terapêutico é desencadear um tipo de morte celular em que os mecanismos responsáveis possam ser mensurados e relacionados a eficácia do tratamento. A descoberta de distintas vias relacionadas à morte celular elevou o interesse em conectar tais caminhos à fisiopatologia do câncer (GALLUZI et al., 2012). Assim, as pesquisas sobre neoplasias se expandiu para incorporar não apenas lesões que causam crescimento desregulado, mas também aquelas que levam à morte celular ineficiente.

Existem três formas principais de morte celular: apoptose, autofagia e necrose, estas formas são distinguíveis pelas diferenças morfológicas e metabólicas (TAN et al., 2009; BIALIK et al., 2010; OUYANG et al., 2012). A apoptose como objetivo terapêutico oferece vantagens em relação aos mecanismos de morte não apoptóticos, pois em vias que levam a necrose, por exemplo, podem levar a ativação de respostas inflamatórias elevando a agressividade do tumor (FISCHER & SCHULZE-OSTHOFF, 2005; ELMORE, 2007; PROSKURYAKOV & GABAI, 2010; MILLIMOUNO et al., 2014; BREDHOLT et al., 2015). A apoptose ocorre prioritariamente quando o dano ao DNA é irreparável e pode ocorrer por duas principais vias de sinalização: via

extrínseca e via intrínseca (EUM & LEE, 2011). A via extrínseca, ou via por receptor de morte celular, se inicia com a interação do receptor Fas ou TRAILR (ou suas famílias) na membrana com seu respectivo ligante (FasL ou TNSF10) que está no meio extracelular. Após esta interação, forma-se o complexo Fas/FasL ou TNSF10/ TRAIL, que são capazes então de recrutar FADD e pró-caspases 8, resultando em um complexo de sinalização de morte induzida. Conseqüentemente, caspases 8 são ativadas que levam a ativação de caspases 3, estas são as penúltimas proteínas para a execução da morte celular por apoptose. (Figura 17). Já a via intrínseca, ou via mitocôndrial, induz morte celular por apoptose como o próprio nome já diz, com enzimas mitocondriais, o estímulo para o início desta via pode ser por sinalização intracelular ou estímulos extracelulares. A via intrínseca é caracterizada pela liberação do citocromo c no citosol. O citocromo c, então, recruta proteínas Apaf1 e pró-caspases 9, que resultam na ativação das cascada de caspases 9/3 e culminam na morte celular por apoptose (Figura 17) (OUYANG et al., 2012).

Este estudo buscou sintetizar e avaliar a atividade citotóxica do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona, um derivado do DBM, em diferentes linhagens neoplásicas de melanoma (B16F10 e Tm5).

2. Metodologia

2.1. Instrumentação

2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização do composto foi realizada por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT foram obtidos em espectrômetro Mercury 400. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3), usando-se como referência interna tetrametilsilano (TMS) para espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

2.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com o objetivo de acompanhamento da síntese e de purificação do

composto foi realizada a técnica de Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) semi-preparativa usando um sistema HPLC-SHIMADZU, coluna Shim-pack PREP-ODS(H) Kit com detecção por ultravioleta (UV-Vis). Dois sistemas cromatográficos foram utilizados: o primeiro composto de coluna octadecilsilano de 25 cm de altura e 4,6 mm de diâmetro interno, com partículas de 5 µm, para o acompanhamento da síntese da reação, com razão de fluxo de 1 mL/min e alça de injeção de 20 µL e o segundo composto de coluna octadecilsilano de 25 cm de altura e 20 mm de diâmetro interno e partículas com tamanho de 15µm com razão de fluxo de 3 mL/min e alça de injeção de 5 mL para a purificação, ambos mantidos a temperatura ambiente. A fase móvel escolhida foi a mistura água ultrapura MilliQ e metanol Merck grau HPLC (20:80 V/V). As substâncias eluídas foram detectadas no espectro do ultravioleta à 254 nm.

A análise da mistura reacional durante a reação foi preparada diluindo 30 mg do composto em 100 ml de fase móvel, 10 ml desta solução foi diluída para 100 ml utilizando o eluente, obtendo-se, assim, uma concentração final de 30 µg/ml. E a amostra para a purificação foi preparada diluindo 100 mg do composto em 10 ml de fase móvel, obtendo-se, assim, uma concentração final de 10 mg/ml.

Antes de proceder a cromatografia, a fase móvel, a solução e as amostras foram filtradas a vácuo utilizando membrana de 0,22µm e desaeradas por trinta minutos em banho de ultrassom. As amostras foram preparadas em triplicata e cada uma foi cromatografada em quadruplicata. A amostra é considerada pura somente se um único pico aparecer no cromatograma.

2.1.3. Temperatura de Fusão

A temperatura de fusão foi determinada com auxílio do equipamento modelo MQAPF-301-Microquímica Ltda.

2.1.4. Cromatografia de camada delgada (CCD)

As CCD foram feitas em cromatofolhas de alumínio sílicagel G F₂₅₄ 0,2 nm Art. 1.05554 Merck e revelada com Lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 356 nm. Todas as cromatografias foram realizadas no Laboratório Química

e Bioquímica de Produtos Naturais (Bionat) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV.

2.2. Síntese e purificação do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

Realizou-se a síntese de acordo com a patente PI0006583-8, no Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais da Universidade Federal de Viçosa. De maneira geral, a síntese ocorreu da seguinte forma: Em um balão de fundo redondo (100 mL) foram adicionados carbonato de potássio (3,0 equiv.) e DBM (1,0 equiv.) e foram suspensos em acetona (20 mL) e agitados durante 30 minutos à temperatura ambiente. A esta mistura foi adicionada o reagente de alquilação brometo de alila (1,0 equiv.) e a mistura foi agitada por 60 horas e monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Em seguida a mistura foi filtrada, o solvente evaporado e o produto purificado por cromatografia de alta eficiência (CLAE). As frações eluídas foram enviadas para a análise por ressonância magnética nuclear (RMN).

2.2.1. 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

Sólido amorfo amarelado 166,8 mg (72,2%); Temperatura de fusão: 64.9 - 65.7 °C; Rf: 0.55 (n-hexano/acetato de etila 8:2 v/v); IR (KBr): 1694.8, 1670.2, 1007.7, 962.2 cm^{-1} ; RMN de ^1H (400 MHz; CDCl_3): 7,91 (4H, d, $J = 7,4$; Hz, H-2', H-2'', H-2' e H-6'), 7,40 (dd, 4H, H-3', H-5', H-3'', H-5''), 7,52 (dd, 2H, H-4', H-4''), 5,73-5,82 (m, 1H, H-5), 5,26 (t, 1H, $J = 10,7$ Hz, H-2), 5,08 (dd, 1H, $J = 17,0$ Hz, 1,4 Hz, H6b), 4,97 (d, 1H, $J = 10$ Hz, H6a); 2,85 (2H, t, $J = 6,8$, H-4); RMN de ^{13}C (100 MHz; CDCl_3): δ 195,7 (C-1 e C3), 136,2 (C1' e C1''), 135,2 (C5), 133,7 (C4' e C4''), 129,1 (C2', C6', C2'' e C6''), 128,7 (C3', C5', C3'' e C5''), 117,4 (C6), 56,7 (C2), 33,7 (C4).

2.3. Ensaios de caracterização de atividade biológica

2.3.1. Cultura de células

Foram utilizadas linhagens celulares: Melan-A, estabelecida a partir de melanoblastos normais (BENNETT et al., 1987); B16F10, estabelecida a partir de células de melanoma murino (FIDLER, 1975) e células Tm5, uma linhagem desenvolvida a partir da Melan-A por privação da adesão da mesma a uma matriz extracelular (OBA-SHINJO et al., 2006). 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 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.

2.3.1.1. Tripsinização

Culturas de células subconfluentes, após o descarte do meio de cultura, foram lavadas com PBS 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. 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 ressuspensas em

meio completo. Após efetuar a contagem celular, com teste de viabilidade, volumes da suspensão celular foram subcultivadas contendo o número desejado de células.

2.3.1.2. 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:

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

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 porcentagem de células viáveis utiliza-se a fórmula:

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

2.3.1.3. 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, ressuspendidas 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 e mantidas por 24 horas em incubadora à 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade relativa. Decorrido este período foi realizada a troca de meio de cultura.

2.3.2. Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT

As células foram plaqueadas, em placas de 96 poços, na concentração de 1x 10³ células/mL para as linhagens de B16F10 e Tm5 e na concentração de 1x 10⁴ células/mL para a linhagem Melan-A. Cada poço recebeu 100 µL de meio completo e suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade em seus respectivos meios de cultura. Após este período, foram adicionadas as concentrações diferentes do medicamento Dacarbazina (Eurofarma) e do composto 2-alil-1,3-difenil-1.3-propanodiona às células e estas foram incubadas por 60 horas à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. O composto foi diluído em DMSO e foram feitas concentrações entre 12,5 µg/mL e 400 µg/mL e em cada poço a concentração de DMSO não ultrapassou 0,5%. Os controles deste ensaio (100% de células viáveis) foram realizados com meio de cultura completo 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 (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) a 0,5 mg/mL e as placas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 4 horas. Após este período o MTT foi retirado de todos os poços e em seguida foi adicionado 100 µL de DMSO. As 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).

2.3.2.1. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células

O valor da concentração inibitória de 50% das células (IC₅₀) foi calculado utilizando uma regressão não-linear: logaritmo da concentração da dose versus

a resposta normalizada (porcentagens de células viáveis) determinados pelos programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®.

2.3.2.2. Índice de seletividade

A concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi calculada para cada linhagem e serviu 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 razão entre o valor da IC_{50} do composto sobre a linhagem de células normais (Melan-A) e o valor da IC_{50} do composto sobre a linhagem de células neoplásicas (B16F10 e Tm5), ou seja:

$$IS = \frac{IC50_{Melan-A}}{IC50_{linhagem\ neoplásica}}$$

2.3.3. Citometria de Fluxo

Células B16F10 (1×10^6) foram plaqueadas em frascos para cultura celular de 25 cm² em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os frascos foram incubados por 24 horas à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. Após este período, foi adicionado uma concentração equivalente ao IC_{90} do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona para esta linhagem de células e as células foram, então, incubadas por 16 horas à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, sendo posteriormente tripsinizadas. A interrupção da reação de tripsinização destas foi realizada com adição de meio completo e a lavagem das células por centrifugação a 600 G, por 5 minutos. O pellet foi ressuspensão em 1 mL de PBS. Após esta 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 realizado uma contagem das células e a concentração foi ajustada para 1×10^5 células/mL. Na sequência, foi adicionado 5 µL de Anexina V-FITC (ImunnoTools). Após 20 minutos de incubação, ao abrigo de luz, foram adicionados 5µL de iodeto de propídio (PI) e posteriormente os dados foram adquiridos 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-), 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 aquelas que não apresentaram nenhuma marcação.

2.3.4. Extração do RNA total de células B16F10

A linhagem celular B16F10 foi cultivada em meio DMEM suplementado 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 foram separadas em dois grupos de forma randômica o primeiro grupo não recebeu o estímulo do composto 2-alil-1,3-difenil-1.3-propanodiona (controle) e o segundo foi exposto ao estímulo do composto 2-alil-1,3-difenil-1.3-propanodiona por 4 horas em uma concentração equivalente ao IC₅₀.

As culturas de células subconfluentes, adicionou-se 1 mL de Reagente Tri (Sigma) para cada 10 cm² de área superficial, a solução foi então solubilizada e transferida a um tubo e deixado em repouso por 5 minutos. Após esse tempo, foi adicionado 0,4 mL de clorofórmio (Sigma), o tubo, então, foi tampado e agitado rigorosamente por 15 segundos e repouso de 15 minutos, em seguida o tubo foi centrifugado a 12.000 G, 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 12.000 G, 10 minutos e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuscitado com 2 mL de etanol (Sigma) 75%, então, vortexado e centrifugado a 7500 G, 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 livre de RNase. Toda a bancada e material de trabalho (lupas, pinças, placas, etc) foram tratados com solução RNAZap (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 µl de amostra em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (ThermoScientific®), que fornece automaticamente as concentrações de RNA em ng/µL, 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 foram armazenadas a -80 °C até a síntese de cDNA.

2.3.4.1 Síntese do cDNA para avaliação da expressão gênica por RT-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 µl 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.

2.3.4.2. Desenho de primers, teste de concentração e eficiência para validação da qRTPCR

Após a síntese do cDNA foram desenhados 14 primers utilizados na amplificação do cDNA dos genes alvo (Tabela 1).

Para tanto utilizamos o aplicativo GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>). Todos os primers foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies, IDT (Coralville, Iowa, USA). Foram desenhados 11 primers para genes que possuem relevância na via de apoptose celular (*Apoptotic peptidase activating factor 1*; *BCL2-associated X protein*; *B-cell leukemia/lymphoma 2*; *BH3 interacting domain death agonist*; *Cyclin Dependent Kinase 1*; *Fas ligand (TNF superfamily, member 6)*; *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*; *P53 induced death domain protein 1*; *BCL2 binding component 3 (Bbc3)*; *Sirtuin 1*; e *Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10*) e para três genes candidatos a genes de referência (*Actina beta*; *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*; e *Tubulin, beta 4A class IVA*).

As reações de qRTPCR foram realizadas no aparelho StepOne (Applied Biosystems) relacionando os valores de Ct, 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 qRTPCR de DNA dupla fita (Crossing point, ou Cycle threshold). A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método da curva padrão relativa 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 qRTPCR foram realizadas em triplicatas de amostras e duplicatas técnicas, em cada placa de reação tendo um controle negativo (Negative Template Control, NTC) para cada alvo estudado além do controle endógeno.

Tabela 1 - Genes alvo e sequência de primers.

Nome	Símbolo	Sequência direta	Sequência 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

Após a síntese dos primers realizou-se o teste de concentração e eficiência dos mesmos através de qRT-PCR. Para o teste de concentração foram preparadas soluções de primers forward e reverse na concentração de 4 μM e 10 μM (soluções estoque), tendo como mix para uma reação 6 μL de 2X SYBR Green Master Mix (Thermocientific®), 3 μL de primer F/R nas concentrações de 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 μM , 2 μL de água nuclease free (Ambion®) e 1 μL 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 μM 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 minutos; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 15 segundos; anelamento e extensão a 60 °C por 1 minuto. 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 minuto 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 em triplicata biológica e duplicatas técnicas sendo 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 e 1,5625 μM . 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.).

3. Resultados e discussão

3.1. Química

3.1.1. Síntese do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

A síntese procedeu-se de acordo com a patente PI0006583-8. Após cada etapa de síntese e purificação foram coletadas amostras para o acompanhamento de pureza por análise em CLAE. Na figura 4 está

representado o cromatograma da mistura reacional após 60 horas de reação, onde pode ser observada uma mistura entre os compostos de partida (tempo de retenção 15,962 e 5,239 minutos) e o composto sintetizado (tempo de retenção 6,786 minutos).

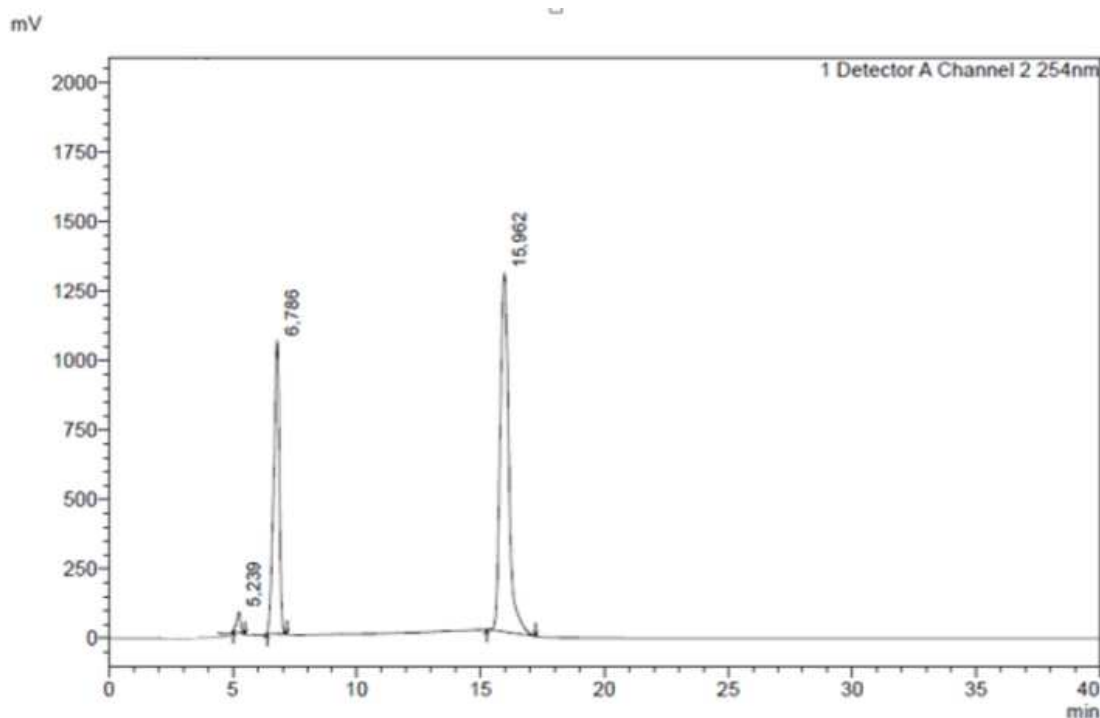


Figura 4 - Cromatograma da mistura de reacional após 60 horas. Condições de análise: coluna ODS de 4,6 x 250 mm, tamanho da partícula de 5 μ m, fase móvel: MeOH/H₂O 80:20 isocrático, volume de injeção: 20 μ L, comprimento de onda de detecção: 254 nm e fluxo 1 mL/min.

Na figura 5 está o cromatograma da fração provinda da CCD relativa ao composto, sendo tal amostra enviada para análises de caracterização por RMN, apresentando uma leve impureza (Seta preta, 5). O fator de retenção em CCD foi calculado sendo $R_f = 0,55$ (n-hexano: acetato de etila, 8:2). Após a confirmação que o primeiro pico que é o composto alvo, este foi coletado e analisado novamente por CLAE (figura 6), onde o novo cromatograma apresentou-se sem impurezas, comprovando que o composto estava puro. O composto puro foi, então, utilizado na realização das análises citotóxicas e da citometria de fluxo.

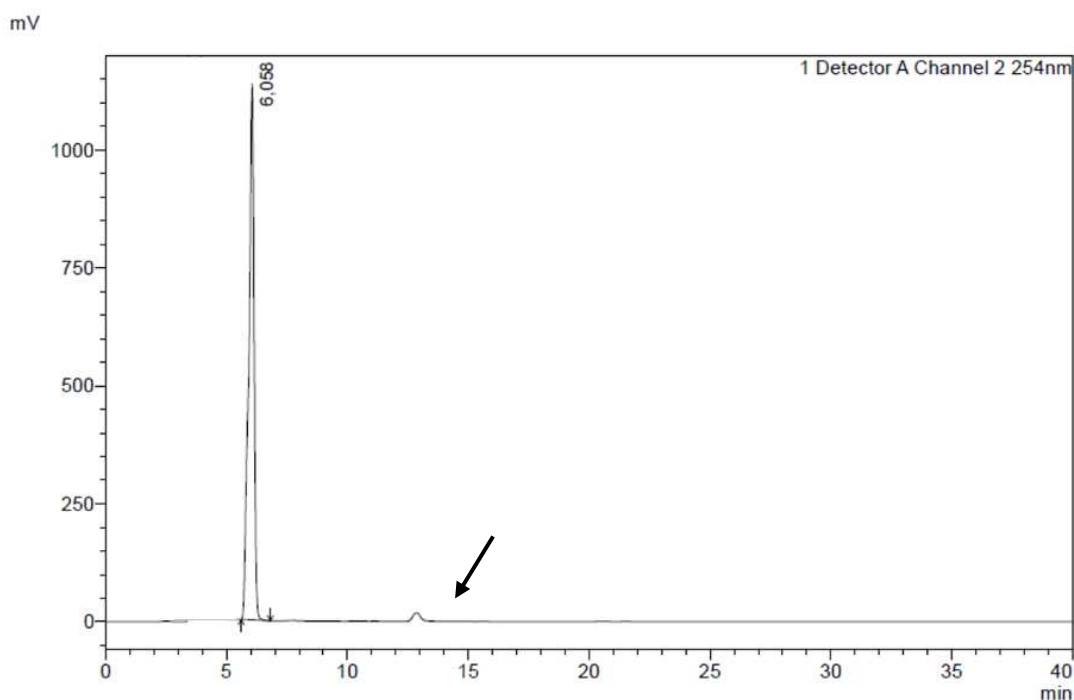


Figura 5 - Cromatograma do Composto enviado para o RMN com uma pequena impureza.

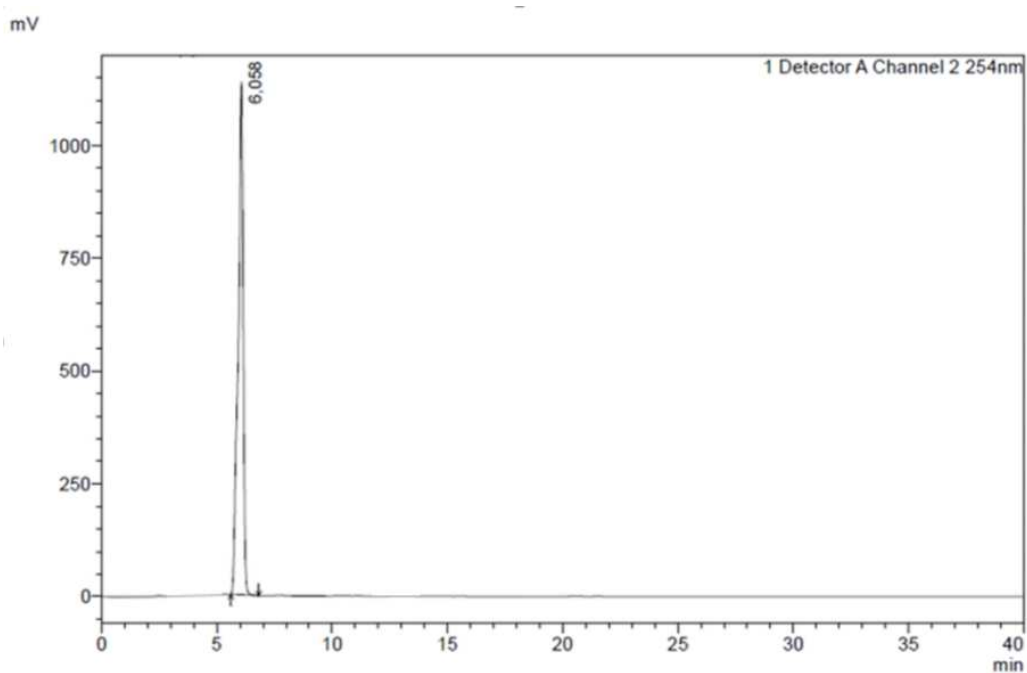


Figura 6 - Cromatograma do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona puro. Condições de análise: coluna ODS de 20 x 250 mm, tamanho da partícula de 15 μ m, fase móvel: MeOH/H₂O 80:20 isocrático, volume de injeção: 20 μ L, comprimento de onda de detecção: 254 nm e fluxo 5 mL/minuto.

3.1.2 Rendimento da Reação

O rendimento da reação foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{rendimento (\%)} = \frac{\text{Número de mols do Produto final}}{\text{Número de mols esperado do Produto final}} \times 100$$

Partido inicialmente de 200 mg (0,8929 mmol esperado do produto final) do reagente de partida DBM e obtendo 166,8 mg (0,6310 mmol do produto final) de produto final, temos que o rendimento da reação foi de 72,2%, sabendo-se que a equivalência molar entre o reagente de partida e o produto final é 1 para 1.

3.1.3 Caracterização do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

O composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona foi identificado com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

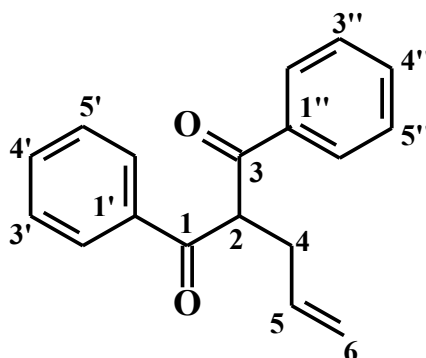


Figura 7 – Estrutura do 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona, com carbonos indicados.

Nas figuras 8, 9, 10 estão representados os resultados obtidos experimentalmente do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona nos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectro de DEPT. Estes resultados estão de acordo com os resultados descritos na literatura (NOGUEIRA et al., 2003).

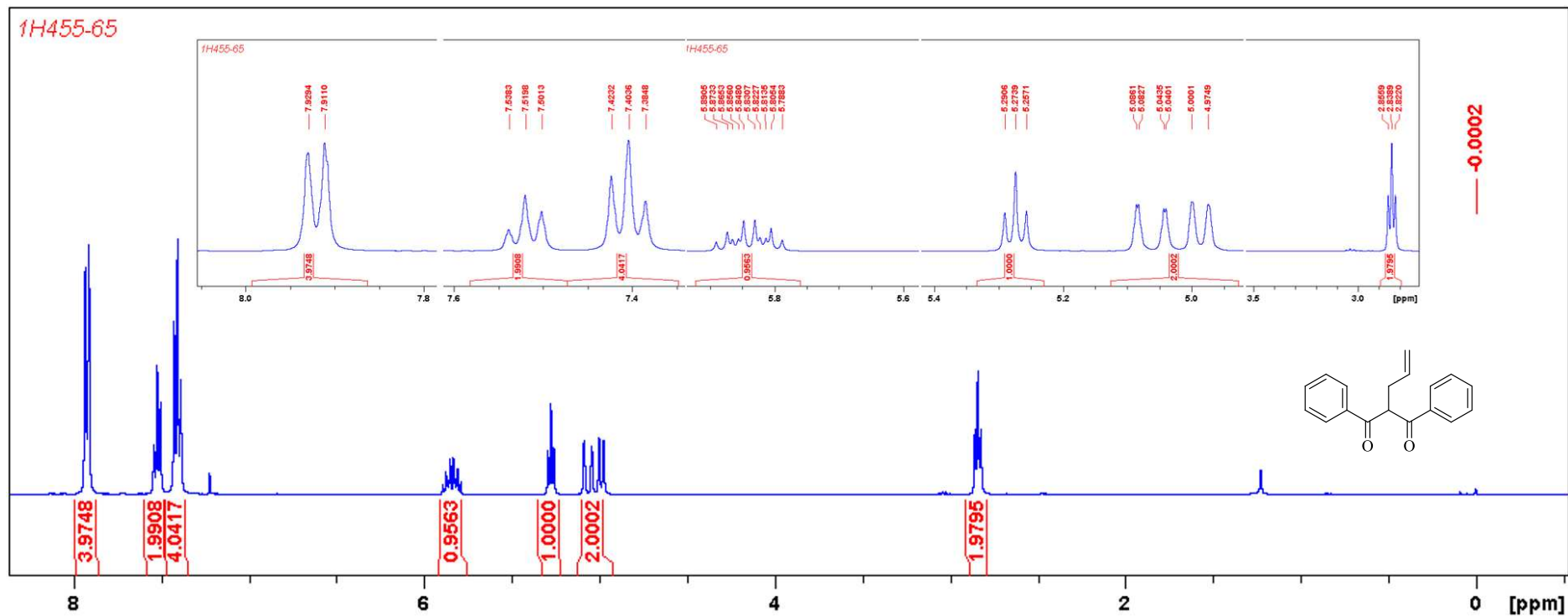


Figura 8 - Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do 2-ailil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. Com ampliação dos picos.

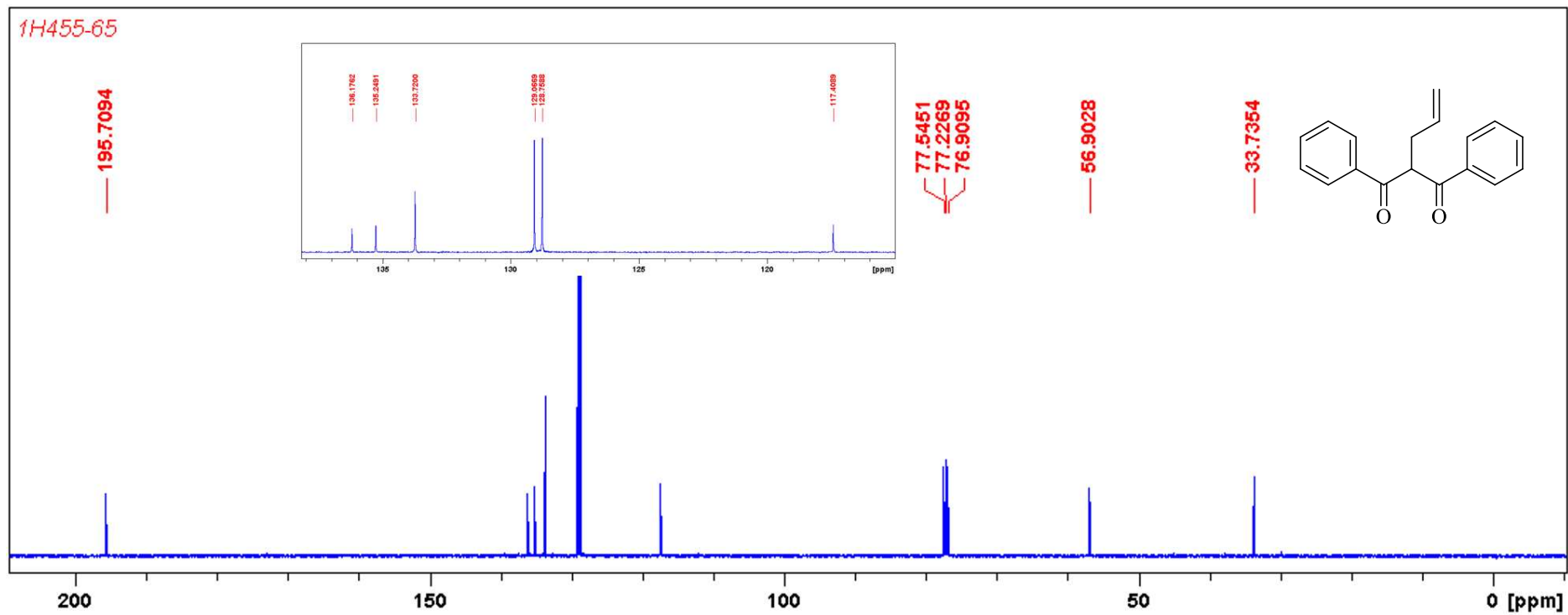


Figura 9 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-álil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. Com ampliação dos picos.

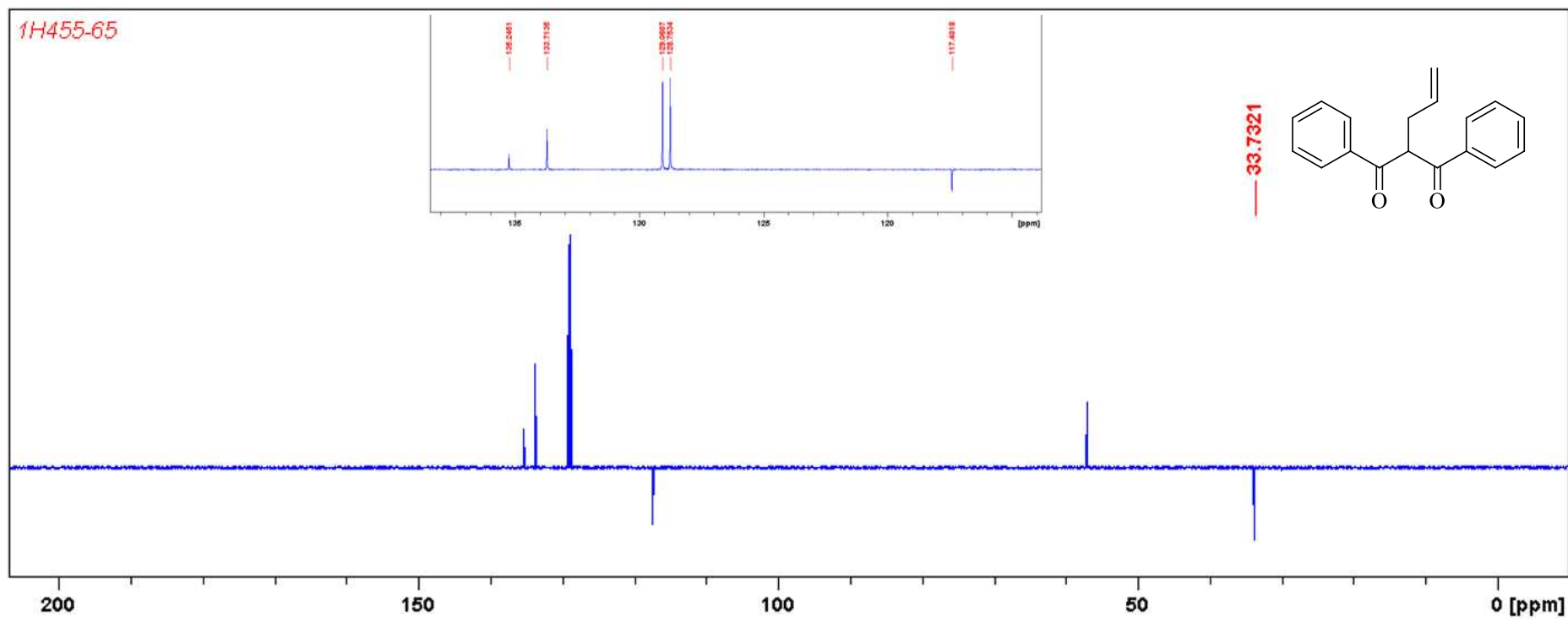


Figura 10 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) do 2-aliil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. Com ampliação dos picos.

3.2. Atividade biológica

3.2.1. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* e índice de seletividade

O teste de avaliação citotóxica foi realizado com as linhagens tumorais B16F10 e Tm5 e a linhagem normal Melan-A. Está representada na figura 11 a taxa de mortalidade celular em função da concentração do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona para as linhagens celulares e, na tabela 2, as concentrações correspondentes as porcentagens de morte celular correspondentes a 50% (IC₅₀) da população total de células. O valor de IC₅₀ foi calculado utilizando uma regressão não linear, log (da concentração do composto em µg/mL) x resposta normalizada. Nesta mesma tabela está representado também o valor do coeficiente de determinação (R²). Foi possível calcular também os valores de concentrações equivalentes as porcentagens de morte celular correspondentes a 10% (IC₁₀) e 90% (IC₉₀) da população total de células (Tabela 2), utilizando a equação da reta, abaixo.

$$Y = \frac{100}{1 + 10^{(\text{LogEC50}-X) * \text{HillSlope}}}$$

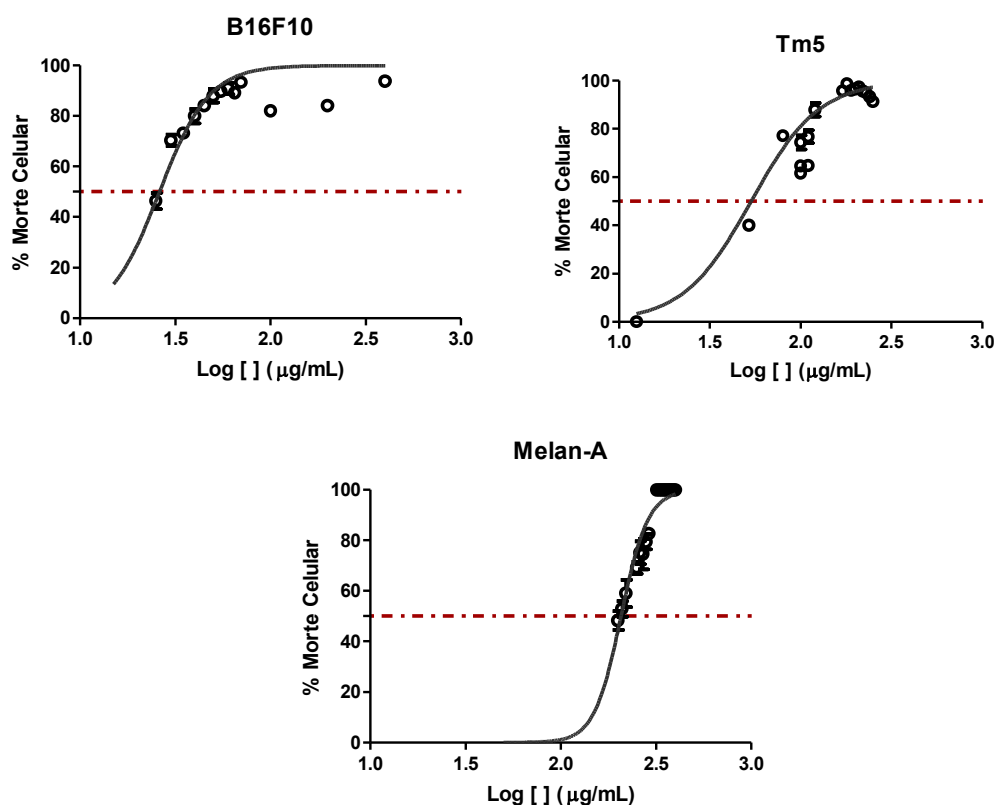


Figura 11 - Taxa de mortalidade celular em função do logaritmo da concentração do composto 2-ailil-1,3-difenil-1,3-propanodiona nas Linhagens tumorais B16F10 e Tm5 e na linhagem normal Melan-A.

Tabela 2 - Concentrações letais do composto 2-ailil-1,3-difenil-1,3-propanodiona.

Tipo celular	Melan-A	B16F10	Tm5
Log IC ₅₀	2,316	1,418	1,728
IC ₅₀ (µg/mL)	207,2 ± 3,5	26,17 ± 1,11	53,47 ± 4,86
IC ₅₀ (µM)	783,9 ± 13,1	99,01 ± 4,20	202,29 ± 18,39
R ²	0,9131	0,9021	0,9320
HillSlope	6,141	3,332	2,324
IC ₁₀ (µg/mL)	144,75	13,54	20,77
IC ₉₀ (µg/mL)	296,07	50,63	137,60

Na tabela 2, percebe-se que a linhagem Tm5 (IC₅₀ = 53,47 ± 4,86 µg/mL) é a mais resistente frente ao composto em relação a linhagem B16F10 (IC₅₀ = 26,17±1,11 µg/mL). Esta resistência pode estar relacionada ao fato de a linhagem Tm5 ser uma linhagem desenvolvida a partir da Melan-A e apresentar

algumas semelhanças com a linhagem de origem (OBA-SHINJO et al., 2006). Quanto a dosagem, ambas as linhagens tumorais apresentam IC₅₀ com valores menores que o valor do IC₁₀ da Melan-A (144,75 µg/mL). Essa informação é bastante relevante por indicar que pode ser administrada uma concentração maior que a IC₅₀ das células tumorais sem que a população de células normais seja afetada de maneira drástica, isso porque ambos valores de concentração do IC₉₀ de B16F10 e IC₉₀ de Tm5 equivalem a uma concentração menor que o IC₁₀ da Melan-A, ou seja, a concentração que mata 90% da população das células tumorais tem sua ação citotóxica em menos de 10% das células normais.

Com intuito de comparar a atividade do composto sintetizado com um quimioterápico já utilizado no mercado os mesmos ensaios acima descritos foram realizados com a Dacarbazina (Tabela 3). A Dacarbazina é um antineoplásico clássico utilizado para o tratamento do câncer do tipo melanoma. O valor do IC₅₀ para a linhagem Tm5 calculado não pode ser considerado pois segundo o programa, a regressão utilizada foi determinada como “ambígua”, ou seja, apesar do R² ser elevado os parâmetros determinados pela regressão podem não representar bem a realidade destes.

Tabela 3 - Concentrações letais do Dacarbazina.

Tipo celular	Melan-A	B16F10	Tm5
LogIC ₅₀	0,1318	0,1519	~0,7652
IC ₅₀ (µg/mL)	246,85 ± 9,66	258,51 ± 44,09	~1060,83
IC ₅₀ (µM)	1,355 ± 0,053	1,419 ± 0,242	~5,823
R ²	0,9778	0,8600	~0,8762

A partir dos dados obtidos pelas duas análises é possível comparar os índices de seletividade (IS) do composto sintetizado e do quimioterápico comercial (Tabela 4). Segundo os dados apresentados na tabela 4, é possível observar que o composto apresenta menor IC₅₀ e maior Índice de Seletividade (IS) que o medicamento, indicando que o composto seria efetivo em concentrações menores para se obter o mesmo efeito do que o medicamento de referência.

Tabela 4 - IC₅₀ para as linhagens celulares e Índice de seletividade.

	Drogas	
	2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona	Dacarbazina
IC ₅₀ Melan-A (µg/mL)	207,2 ± 3,5	246,85 ± 9,66
IC ₅₀ B16F10(µg/mL)	26,17 ± 1,11	258,51 ± 44,09
IC ₅₀ Tm5(µg/mL)	44,40 ± 6,88	X
IS (Melan-A/ B16)	7,917	0,9549
IS (Melan-A/ Tm5)	4,667	X

No entanto, mesmo com o baixo IC₅₀ para as células normais, o IS do composto de modo geral é muito maior do que o do medicamento. Para a linhagem B16F10 o IS é mais de 8 vezes maior que o do medicamento Dacarbazina. O Valor de IS é um parâmetro que reflete a quantidade de composto que é ativo contra a linhagem neoplásica, mas não é tóxico para a célula normal. Durante a pesquisa de novas drogas é tido como significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 em ensaios in vivo, ou seja, o composto investigado deve ser duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais (SUFFNESS & PEZZUTO 1990). Por esse motivo o composto sintetizado apresenta um valor de IS significativo, indicando que este novo composto apresenta melhor especificidade e grande potencial terapêutico para este tipo de câncer.

As propriedades farmacológicas das β-dicetonas (entre eles o DBM e seus derivados), como fotoproteção, atividades anti-inflamatória, antitumoral e antiviral, já foram relatadas na literatura. Entretanto, tem-se destacado o potencial terapêutico para o tratamento de câncer para o DBM e seus derivados (CHOSI et al., 1992; JACKSON et al., 2002; MABJEESH et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003; NAKANO et al., 2004; da LIMA NETO et al., 2006). Jackson e colaboradores (2002) demonstraram que o DBM apresenta potencial antitumoral frente a três linhagens de células de câncer de próstata (LNCaP, DU145 e PC-3) com IC₅₀ entre 25 e 100 µg/mL, além de ter sido demonstrado, ainda, que este composto apresenta ação citostática, sendo capaz de inibir o ciclo celular em G1. Em outro trabalho, Nakano e colaboradores (2004) testaram diferentes β-dicetonas comumente encontradas em plantas, assim como o DBM, frente a linhagens de fibroblasto normal de gengiva humana (HGF) e células de

carcinoma escamoso oral (HSC-2) e obteve o IC_{50} , para o DBM, igual a 82,8 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem normal (HGF) e 22,5 $\mu\text{g/mL}$ para a linhagem tumoral (HSC-2) e um $IS = 3,7$. Os baixos valores de IC_{50} , encontrados anteriormente e neste trabalho, reforçam a necessidade e a importância do estudo de β -dicetonas e seus derivados frente a linhagens tumorais.

O composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona foi sintetizado pela primeira vez por Nogueira e colaboradores, em 2003. O grupo sintetizou 22 derivados de DBM e testou sua ação sobre 4 linhagens de células tumorais humanas: MCF7 (câncer de mama), NCI ADR (câncer de mama multirresistente), NCI460 (câncer de pulmão) e UACC62 (melanoma). Este grupo realizou uma triagem dos compostos sintetizados em 4 concentrações distintas (0,25, 2,5, 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) para determinar a taxa de inibição do crescimento celular, onde apenas 8 dos 22 compostos sintetizados apresentaram atividade antitumoral. A faixa de IC_{50} determinada pelos pesquisadores ficou entre 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens celulares testadas. A faixa encontrada está próxima ao do IC_{50} calculado para Tm5 e superior ao calculado para a linhagem B16F10, no presente trabalho. Todos os valores encontrados de IC e IS indicam que o composto tem grande potencial antitumoral.

3.2.2. Avaliação de morte celular

Detectar apoptose e necrose por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio (AN/PI) se baseia em dois pontos: primeiro, na ligação entre Anexina V-FITC e fosfatidilserina na membrana, de células iniciando o processo apoptótico e, segundo, na ligação do iodeto de propídio (PI) ao DNA em células em processo final da apoptose ou necrose (VERMES et al., 1995; GALLUZI et al., 2012). O gráfico desta análise apresenta 4 quadrantes e cada um apresenta um tipo de marcação (Figura 12): no quadrante I não ocorre a marcação dos eventos, ou seja: neste caso, a marcação por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio é negativa (AN-/PI-); no quadrante II, ocorre a marcação apenas por Iodeto de Propídio (AN-/PI+); no quadrante III há a marcação por apenas Anexina V-FITC (AN+/PI-); por fim, no quadrante IV as marcações por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio são positivas (AN+/PI+).

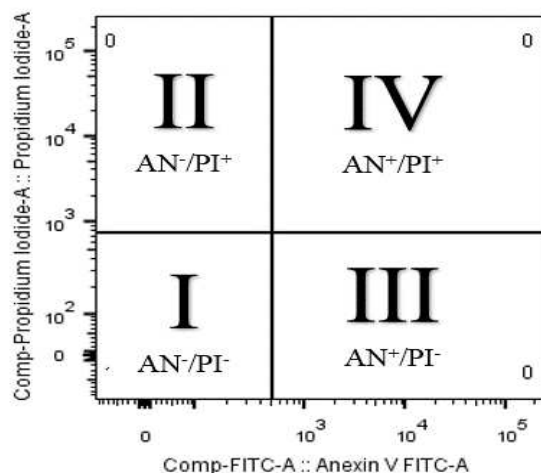


Figura 12 - Divisão dos quadrantes da Citometria de Fluxo.

Na figura 13 estão representados os resultados obtidos do ensaio de citometria de fluxo com a linhagem B16F10, na parte A está o grupo controle, ou seja, células que não receberam o tratamento com o composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona, como esperado 100% das células estão vivas (AN-/PI-).

Na Figura 13 B está representado o resultado da citometria de fluxo para as células que foram expostas a uma concentração igual ao IC₉₀ calculado do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (50,63 µg/mL) por 16h. Este grupo de células, após o tempo de exposição, apresentou 90,1% de todas as células mortas (AN+/PI- e AN+/PI+), indicando que os valores calculados de IC calculados pela regressão linear a partir dos dados obtidos pelo ensaio de MTT estão de acordo com o observado neste ensaio. Ainda, pode-se inferir que o tipo de morte celular causado por este composto é apoptose e não morte celular causada por necrose, uma vez que, segundo alguns autores, a ausência ou a baixa de marcação AN-/PI+ indica que o composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona ativa vias apoptóticas e não vias associadas a necrose celular (VERMES et al.,1995; GALLUZI et al., 2012). No câncer, o objetivo terapêutico é desencadear a morte celular seletiva, logo, mecanismos e vias responsáveis por tal tipo de morte celular são importantes na determinação da eficácia de tratamentos específicos (SELLERS e FISHER, 1999). A morte celular por apoptose representa uma via especialmente eficiente como alvo de tratamentos, para tumores como o melanoma, pois esta, ao contrário da morte celular por

necrose, não causa um aumento da agressividade do tumor devido, por exemplo, a superexpressão de vias inflamatórias. Medicamentos que buscam vias apoptóticas normalmente estão associados à indução da remissão do tumor e apresentam melhores resultados que medicamentos que têm como alvo outras vias de morte celular (FISCHER e SCHULZE-OSTHOFF, 2005; PROSKURYAKOV e GABAI, 2010), demonstrando que composto sintetizado apresenta potencial para ensaios *in vivo*.

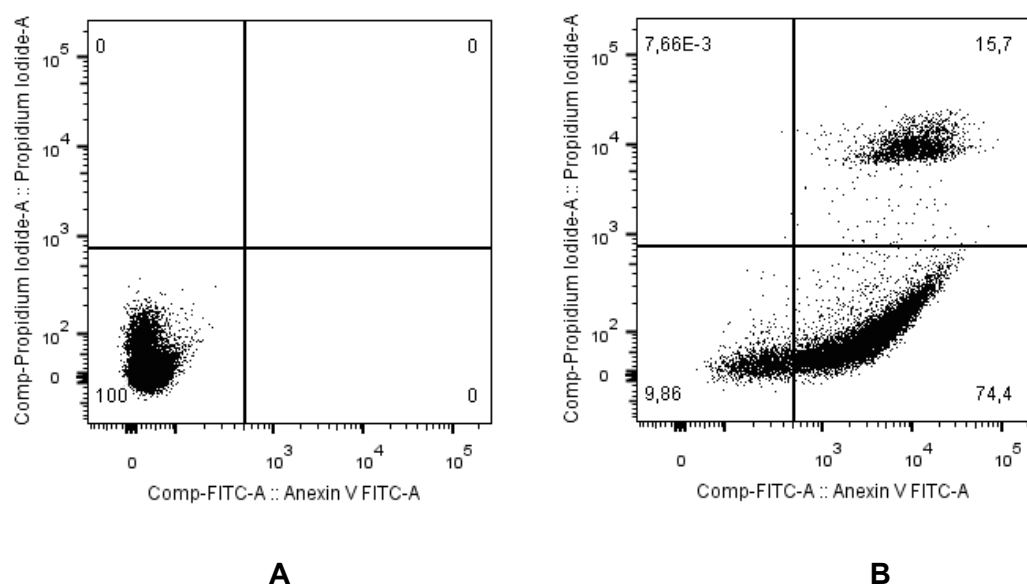


Figura 13 - Citometria de Fluxo da linhagem B16F10: (A) Células sem tratamento, Controle; (B) Células após 16h de contato com IC₉₀ do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona.

3.2.3. Avaliação da via de morte celular por apoptose causada pelo composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona

As sequências de nucleotídeos utilizadas para desenhar os primers foram obtidas no banco de dados GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabela 1), tendo como molde sequências de RNA mensageiro (mRNA) dos respectivos genes analisados. Para desenhar os oligonucleotídeos para o qRT-PCR, utilizou-se o programa específico para tal finalidade, o GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design (<https://www.genscript.com/tools/real-time-pcr-tagman-primer-design-tool>); neste programa, as condições de anelamento, temperatura de dissociação, porcentagem de grupos CG são verificadas. Após obter os pares

de oligonucleotídeos, eles foram submetidos a uma ferramenta contida no banco de dados NCBI, chamada Blast, onde foi possível verificar a similaridade de anelamento com o gene alvo e com outros genes. Desta forma, para as reações de qRT-PCR foram utilizados os oligonucleotídeos descritos na tabela 1.

A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método da curva padrão relativa de calibração normalizada visto que as eficiências dos primers não foram comparáveis (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para tanto inicialmente foi determinado as regressões lineares correspondentes a cada gene. Os valores dos coeficientes angulares (A) e lineares (B) assim como o coeficiente de determinação (R^2) foram determinados para cada gene e estão representados na tabela 5 e figuras 14, 15 e 16.

Tabela 5 - Regressão Linear dos primers testados.

Genes	Coefficiente angular (A)	Coefficiente linear (B)	R^2
Actb	-1,794 ± 0,1207	23,82 ± 0,2633	0,9779
Apaf1	-1,462 ± 0,1083	27,50 ± 0,2364	0,9733
Bax	-1,952 ± 0,1002	25,03 ± 0,2017	0,9896
Bcl2	-1,830 ± 0,1847	30,02 ± 0,4259	0,9608
Bid	-1,345 ± 0,1544	26,59 ± 0,3110	0,962
CDK1	-6,473 ± 1,129	40,98 ± 2,274	0,9163
Fasl	-1,840 ± 0,2281	35,18 ± 0,5258	0,9421
Gapdh	-2,231 ± 0,1482	21,78 ± 0,3253	0,9827
P21	-1,417 ± 0,2079	23,09 ± 0,4563	0,9208
Pidd1	-2,437 ± 0,3337	32,69 ± 0,7280	0,9467
Puma	-2,318 ± 0,5368	33,14 ± 1,165	0,9032
Sirt1	-1,292 ± 0,1540	31,06 ± 0,3359	0,9337
TNFSF10	-2,795 ± 0,3369	37,45 ± 0,7637	0,9582
Tubb4a	-2,413 ± 0,2201	37,02 ± 0,5010	0,9678

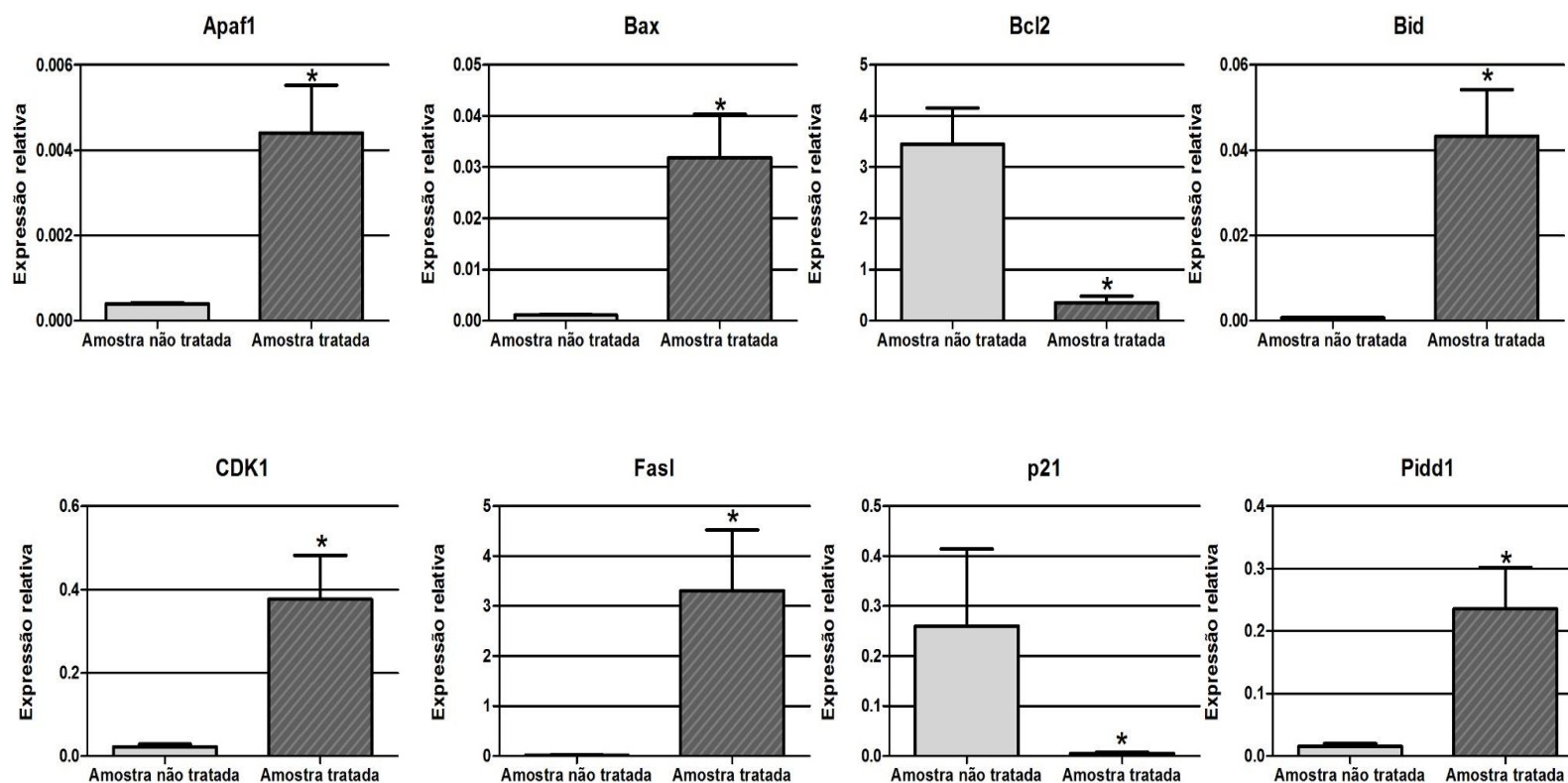


Figura 14 – Expressão relativa dos genes alvos Apaf1, Bax, Bcl2, Bid, CDK1, Fasl, p21, Pidd1 de cultura de células B16F10 divididas em dois grupos amostra não tratadas (controle) e amostras tratada (por 4 horas com IC₅₀) do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona. A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método da curva padrão relativa de calibração normalizada. O experimento foi realizado em duplicatas técnicas e triplicatas biológicas.

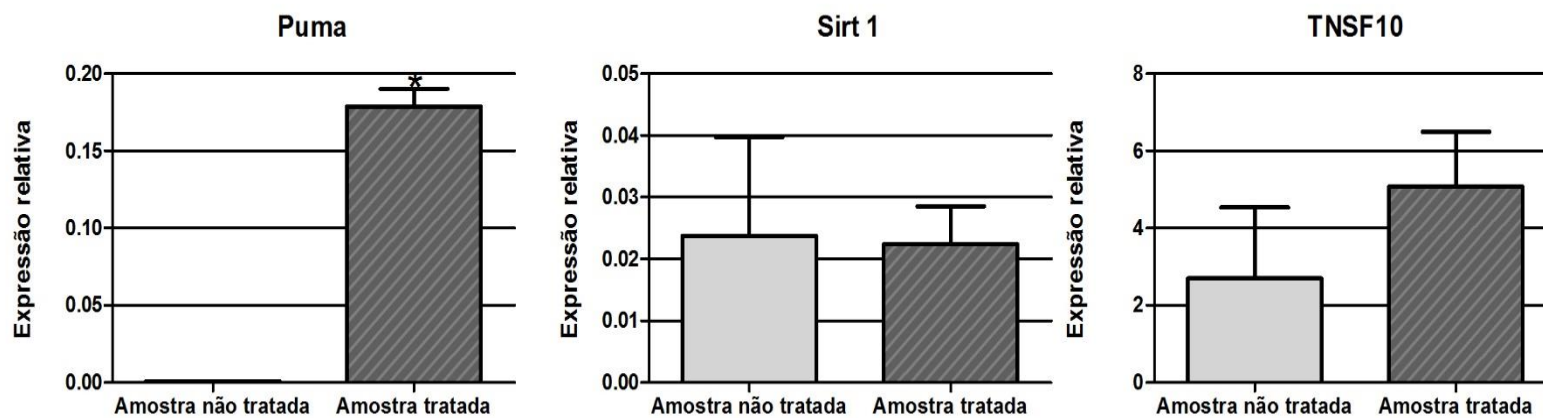


Figura 15 – Expressão relativa dos genes alvos Puma, Sirt 1, TNSF10 de cultura de células B16F10 divididas em dois grupos amostra não tratadas (controle) e amostras tratada (por 4 horas com IC_{50}) do composto 2-*alil*-1,3-difenil-1,3-propanodiona. A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método da curva padrão relativa de calibração normalizada. O experimento foi realizado em duplicatas técnicas e triplicatas biológicas.

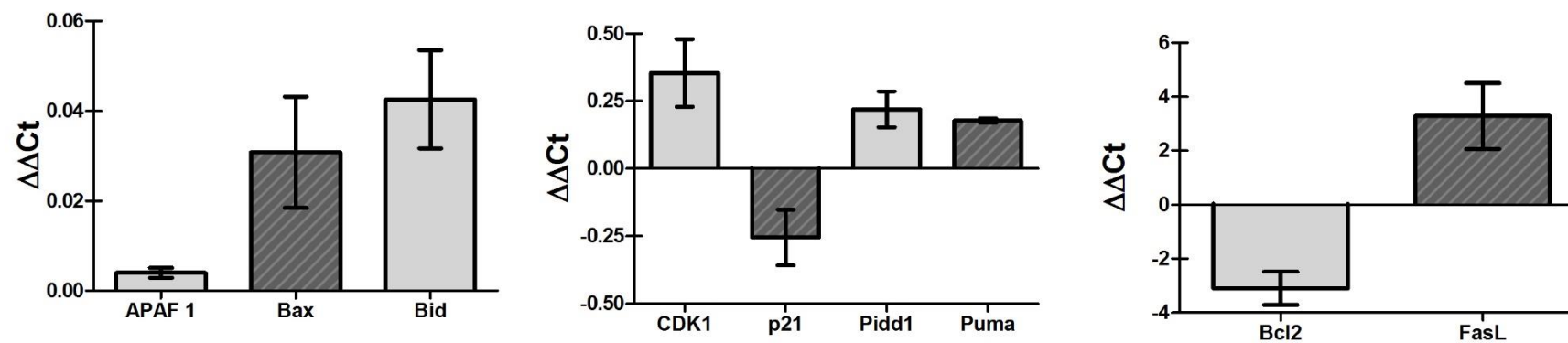


Figura 16 – Expressão relativa dos genes alvos Apaf1, Bax, Bcl2, Bid, CDK1, FasL, p21, Pidd1 e Puma de cultura de células B16F10 tratadas (por 4 horas com IC_{50}) do composto 2-allyl-1,3-difenil-1,3-propanodiona. A quantificação relativa da expressão foi determinada pelo método de $\Delta\Delta Ct$. O experimento foi realizado em duplicatas técnicas e triplicatas biológicas.

A expressão relativa de cada gene foi determinada com a média das razões entre o gene alvo e cada gene referência, as expressões normalizadas do grupo não tratado foi comparada com o grupo que recebeu o tratamento por 4h. Como pode-se observar a expressão relativa dos genes promotores de apoptose Apaf1, Bax, Bid, Fasl, Pidd1 e Puma aumentou, e aliado a este resultado ocorreu a diminuição da expressão relativa de Bcl2, um inibidor de apoptose (Figuras 14, 15 e 16), tais resultados indicam que o composto apresenta atividade apoptótica vias de apoptose compostas por Caspases 3, 8 e 9, ou seja, este composto é capaz de induzir a morte celular tanto por vias intrínsecas quanto extrínsecas de apoptose (Figuras 17 e 18). O DBM, estruturalmente semelhante ao composto, como foi demonstrado *in vitro* por Nakano e colaboradores (2004), induziu apoptose pelas mesmas vias de caspases. A ação do DBM nestas vias de células neoplásicas pode ser atribuída a alguns fatores, como, por exemplo, a inibição de fatores inflamatórios (ANAND et al., 2011) e a ação quelante de íons metálicos (MABJEESH et al., 2003; BAUM & NG, 2004; da LIMA NETO et al., 2006). Segundo Mabweesh e colaboradores (2003) e Baum & NG (2004), o DBM em sua forma enol atua em enzimas que possuem metais em seus sítios ativos ou sequestram, por exemplo, íons ferro do meio intracelular de modo a aumentar os níveis de HIF-1 α (Hipoxia Inductive Factor, subunity alpha), em algumas células, levando as mesmas à morte celular por apoptose.

As alterações observadas no presente trabalho em CDK1 (estímulo) e P21 (inibição) (Figura 16), são indicadores de que o composto também age no ciclo celular (Figuras 18 e 19). A participação da CDK1 tanto na divisão celular quanto na morte celular por apoptose foi proposta e também relatada em processos apoptóticos específicos (SHI et al., 1994; VINCENT et al., 1997; SHEN et al., 1998). Em algumas condições específicas o aumento da atividade de CDK1 pode ser associado a várias condições apoptóticas (PATEL et al., 1998; ZHAI et al., 2002), porém a CDK1 só é pró-apoptótica em células específicas, por exemplo em neurônios pós-mitóticos, em fibroblastos privados de soro e timócitos imaturos, a apoptose prossegue sem a ativação de CDK1. Uma condição para que a ativação de CDK1 favoreça a apoptose é quando ocorre um dano nos microtúbulos por agentes farmacológicos ativando um ponto de checagem da montagem do fuso mitótico, bloqueando a degradação dependente de proteassoma de securina e ciclina B1, resultando na ativação deste gene e

como consequência parando a mitose, posteriormente a célula, geralmente, apresenta uma resposta apoptótica (TOPHAM e TAYLOR, 2013, ZHOU et al., 2014). A inibição de p21 também se apresenta muito importante para alguns processos apoptóticos segundo diversos autores (SEOANE et al., 2004; MULLAN et al., 2006; WU et al., 2009; SORIA e GOTTIFREDI, 2010; JUNG et al., 2010; BITOMSKY et al., 2013; MENG, et al., 2013). Por último as expressões de Sirt1 e TNSF10 (Figura 15) não sofreram alteração significativa na expressão relativa, indicando que o composto não atua nas vias de longevidade celular e na via de apoptose ativada por receptor TRAIL (Figuras 17 e 19).

3.2.3.1 Vias de Sinalização Celular

A seguir (Figuras 17, 18, 19) estão representadas as vias de sinalização de apoptose, via da p53 e via de senescência celular de *Mus musculus* (camundongo). Todas as imagens a seguir foram retiradas da plataforma KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (<https://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>). Estão marcados de vermelhos, azul ou verde os genes que apresentaram a expressão relativa reduzida, aumentada ou não alterada na presença do composto, respectivamente.

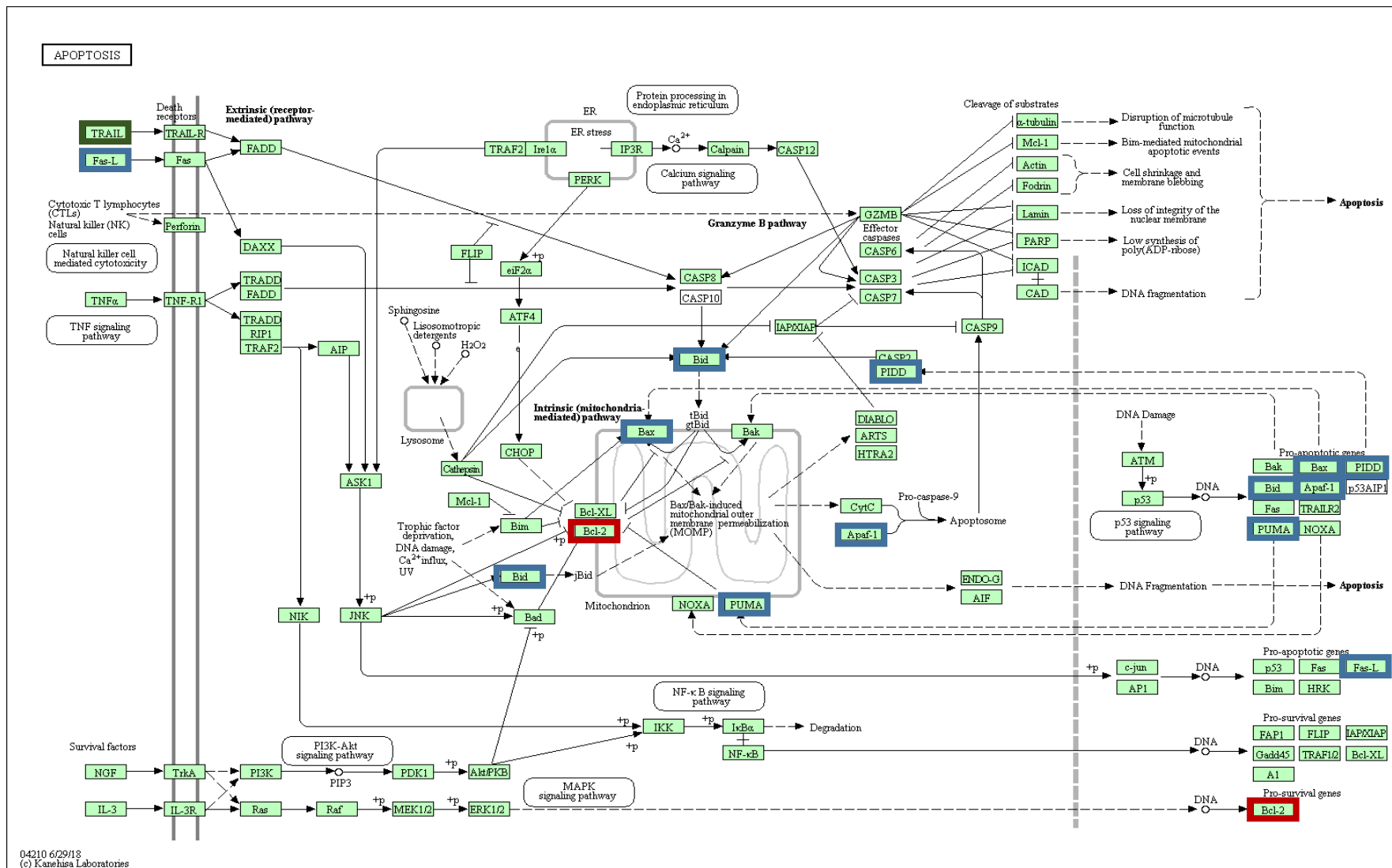


Figura 17 – Via de sinalização de apoptose de *Mus musculus* (camundongo).

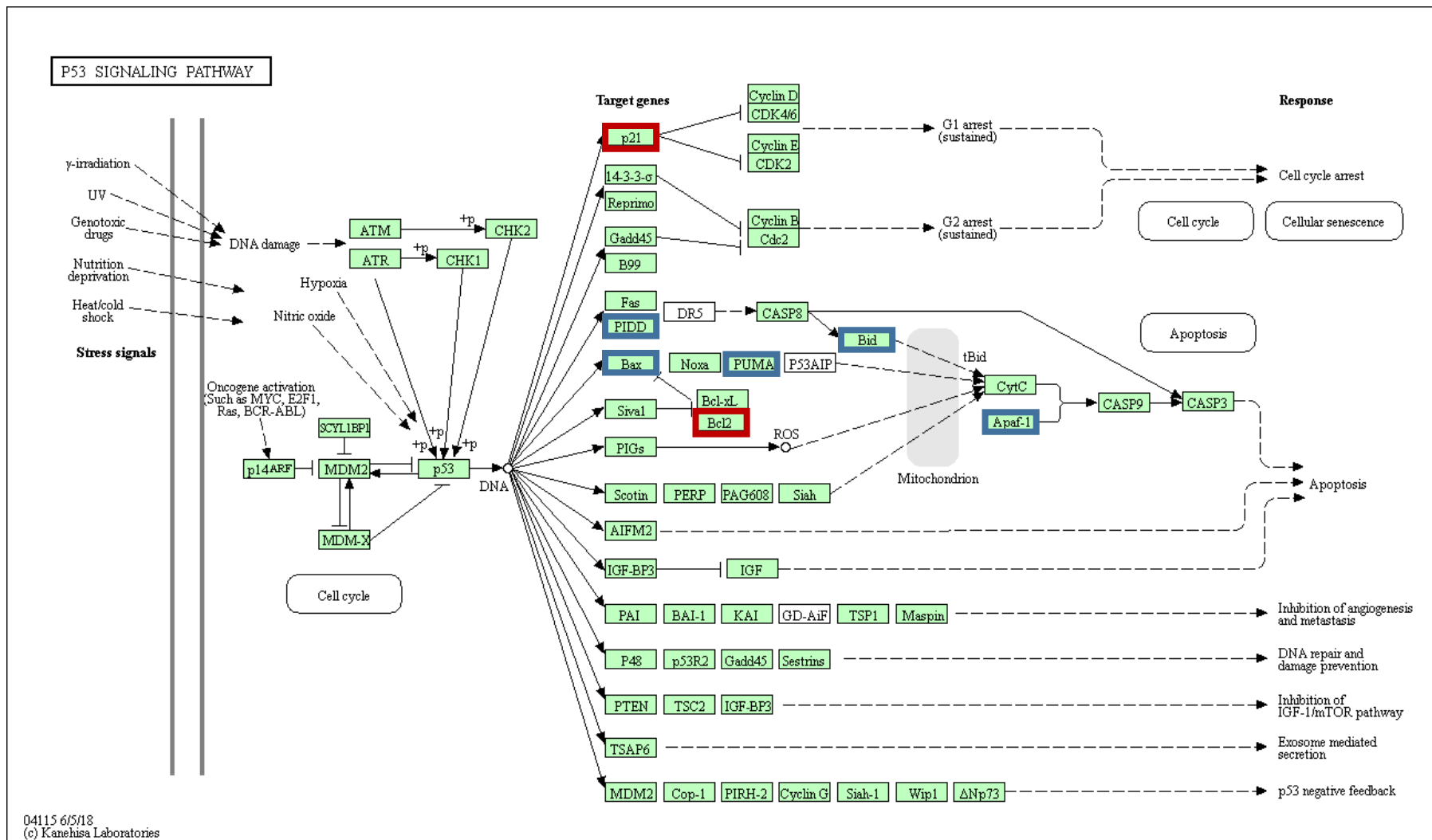


Figura 18 – Via de sinalização de p53 de *Mus musculus* (camundongo).

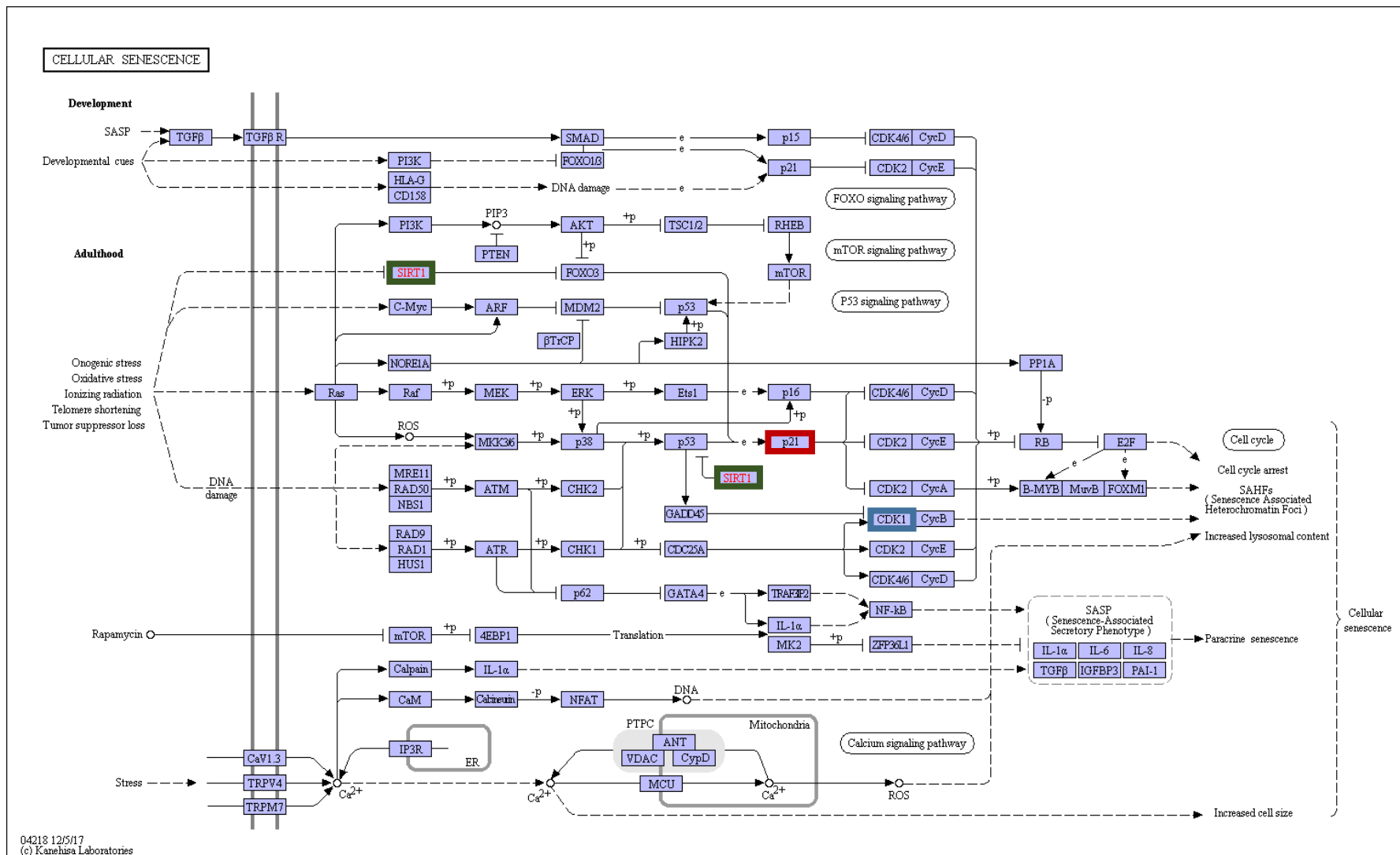


Figura 19 – Via de senescência celular de *Mus musculus* (camundongo).

4. Conclusão

Foi possível sintetizar e caracterizar o composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona com sucesso. Este apresentou IC_{50} frente a células tumorais ($IC_{50}^{B16F10} = 26,17 \pm 1,11 \mu\text{g/mL}$; $IC_{50Tm5} = 44,40 \pm 6,88 \mu\text{g/mL}$) menores que o medicamento Dacarbazina ($IC_{50}^{B16F10} = 258,51 \pm 44,09 \mu\text{g/mL}$), ou seja, o composto se demonstrou mais eficiente que a Dacarbazina nas condições testadas. Os índices de seletividade dele ($IS_{B16F10} = 7,917$; $IS_{Tm5} = 4,667$) foram superiores ao valor mínimo para ser considerado significativo ($IS = 2,0$) em ensaios de novas drogas e maior que o IS da Dacarbazina ($IS = 0,9549$). A citometria de fluxo indicou que o composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona ativa vias de apoptose e ensaios moleculares reforçam esta hipótese mostrando que ele tem sua ação em receptores Fas e nas vias relacionadas às caspases 3, 8 e 9 (vias intrínseca e extrínseca de apoptose) por elevar a expressão dos produtos gênicos indutores de apoptose Apaf1, Bax, Bid, Fasl, Pidd1 e Puma e inibindo a expressão relativa de Bcl2, um inibidor de apoptose, além de interferir no ciclo celular através da regulação diferencial nos genes p21 e CDK1.

5. Referências Bibliográficas

- ANAND, Preetha et al. Suppression of pro-inflammatory and proliferative pathways by diferuloylmethane (curcumin) and its analogues dibenzoylmethane, dibenzoylpropane, and dibenzylideneacetone: role of Michael acceptors and Michael donors. **Biochemical pharmacology**, v. 82, n. 12, p. 1901, 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.
- BASTIAN, Boris C. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 9, p. 239-271, 2014.
- BAUM, Larry; NG, Alex. Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models. **Journal of Alzheimer's disease**, v. 6, n. 4, p. 367-377, 2004.
- 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.
- BENNETT, Dorothy C.; COOPER, Philip J.; HART, Ian R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **International journal of cancer**, v. 39, n. 3, p. 414-418, 1987.

- BIALIK, Shani et al. Systems biology analysis of programmed cell death. **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 10, p. 556-564, 2010.
- BITOMSKY, Nadja et al. Autophosphorylation and Pin1 binding coordinate DNA damage-induced HIPK2 activation and cell death. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 45, p. E4203-E4212, 2013.
- BOCK, F. J. et al. P53-induced protein with a death domain (PIDD): master of puppets?. **Oncogene**, v. 31, n. 45, p. 4733, 2012.
- BREDHOLT, Geir et al. Tumor necrosis is an important hallmark of aggressive endometrial cancer and associates with hypoxia, angiogenesis and inflammation responses. **Oncotarget**, v. 6, n. 37, p. 39676, 2015.
- Cancer Research UK, <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/melanoma>, Acessado em 05/2017.
- 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.
- CHOSHI, Tominari et al. Synthesis of dibenzoylmethane derivatives and inhibition of mutagenicity in Salmonella typhimurium. **Chemical and pharmaceutical bulletin**, v. 40, n. 4, p. 1047-1049, 1992.
- CURTIN, John A. et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 20, p. 2135-2147, 2005.
- DA LIMA NETO, Quirino A. et al. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 345-357, 2006.
- ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- EUM, Ki-Hwan; LEE, Michael. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 348, n. 1-2, p. 61-68, 2011.
- FIDLER, Isaiah J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer research**, v. 35, n. 1, p. 218-224, 1975.
- FISCHER, U.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Apoptosis-based therapies and drug targets. **Cell death and differentiation**, v. 12, n. S1, p. 942, 2005.
- 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.
- 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.
- GALLUZZI, Lorenzo et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell death and differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107, 2012.
- GIBLIN, William; SKINNER, Mary E.; LOMBARD, David B. Sirtuins: guardians of mammalian healthspan. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 7, p. 271-286, 2014.
- HALL, J. L. et al. Identification of two human beta-tubulin isotypes. **Molecular and cellular biology**, v. 3, n. 5, p. 854-862, 1983.

- HAN, Jia-wen et al. Expression of *bbc3*, a pro-apoptotic BH3-only gene, is regulated by diverse cell death and survival signals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 20, p. 11318-11323, 2001.
- 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.
- HODIS, Eran et al. A landscape of driver mutations in melanoma. **Cell**, v. 150, n. 2, p. 251-263, 2012.
- HORN, Susanne et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 959-961, 2013.
- HUANG, Franklin W. et al. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. **Science**, v. 339, n. 6122, p. 957-959, 2013.
- Instituto nacional do câncer (INCA), http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma, Acessado em 05/2017
- 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.
- JUNG, Yong-Sam; QIAN, Yingjuan; CHEN, Xinbin. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. **Cellular signalling**, v. 22, n. 7, p. 1003-1012, 2010.
- 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.
- KRAUTHAMMER, Michael et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. **Nature genetics**, v. 44, n. 9, p. 1006, 2012.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- LONG, Georgina V. et al. Prognostic and clinicopathologic associations of oncogenic BRAF in metastatic melanoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 10, p. 1239-1246, 2011.
- LOTEM, Joseph; SACHS, Leo. Regulation of bcl-2, bcl-X^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.
- LUI, Philip et al. Treatments for metastatic melanoma: synthesis of evidence from randomized trials. **Cancer treatment reviews**, v. 33, n. 8, p. 665-680, 2007.
- MABJEESH, Nicola J. et al. Dibenzoylmethane, a natural dietary compound, induces HIF-1 α and increases expression of VEGF. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 303, n. 1, p. 279-286, 2003.

- MAGALHÃES, A. F., Tozzi, A. M. A., Magalhães, E. G., Blanco, I. S., & Nogueira, M. A. (1997). Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. **Phytochemistry**, 46(6), 1029-1033.
- MALDONADO, Janet L. et al. Determinants of BRAF mutations in primary melanomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 95, n. 24, p. 1878-1890, 2003.
- MALUMBRES, Marcos et al. Cyclin-dependent kinases: a family portrait. **Nature cell biology**, v. 11, n. 11, p. 1275, 2009.
- MENG, Xiao-Ming; CHUNG, Arthur CK; LAN, Hui Y. Role of the TGF- β /BMP-7/Smad pathways in renal diseases. **Clinical science**, v. 124, n. 4, p. 243-254, 2013.
- MILLIMOUNO, Faya M. et al. Targeting apoptosis pathways in cancer and perspectives with natural compounds from mother nature. **Cancer prevention research**, v. 7, n. 11, p. 1081-1107, 2014.
- MORT, Richard L.; JACKSON, Ian J.; PATTON, E. Elizabeth. The melanocyte lineage in development and disease. **Development**, v. 142, n. 4, p. 620-632, 2015.
- MULLAN, P. B.; QUINN, J. E.; HARKIN, D. P. The role of BRCA1 in transcriptional regulation and cell cycle control. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5854, 2006.
- NAKANO, Katsunori; VOUSDEN, Karen H. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. **Molecular cell**, v. 7, n. 3, p. 683-694, 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.
- NEITEMEIER, Sandra et al. BID links ferroptosis to mitochondrial cell death pathways. **Redox biology**, v. 12, p. 558-570, 2017.
- NOGUEIRA, Marisa A. et al. A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **II Farmaco**, v. 58, n. 11, p. 1163-1169, 2003.
- OBA-SHINJO, Sueli M. et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 231-241, 2006.
- 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.
- OUYANG, L. et al. Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis. **Cell proliferation**, v. 45, n. 6, p. 487-498, 2012.
- PATEL, Vyomesh et al. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, suppresses the growth of head and neck squamous cell carcinomas by inducing apoptosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 102, n. 9, p. 1674-1681, 1998.
- 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.
- PROSKURYAKOV, Sergey Y.; GABAI, Vladimir L. Mechanisms of tumor cell necrosis. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 1, p. 56-68, 2010.

- 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.
- SELLERS, William R.; FISHER, David E. Apoptosis and cancer drug targeting. **The Journal of clinical investigation**, v. 104, n. 12, p. 1655-1661, 1999.
- SEOANE, Joan et al. Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation. **Cell**, v. 117, n. 2, p. 211-223, 2004.
- 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.
- SHEN, Shing Chuan et al. Taxol-induced p34cdc2 kinase activation and apoptosis inhibited by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in human breast MCF-7 carcinoma cells. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 9, n. 1, p. 23-29, 1998.
- SHI, Lianfa et al. Premature p34cdc2 activation required for apoptosis. **Science**, v. 263, n. 5150, p. 1143-1145, 1994.
- SORIA, Gastón; GOTTIFREDI, Vanesa. PCNA-coupled p21 degradation after DNA damage: The exception that confirms the rule?. **DNA repair**, v. 9, n. 4, p. 358-364, 2010.
- 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.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity. **Academic Press, London**, p. 71-133, 1990.
- TAKAHASHI, Tomohiro et al. Human Fas ligand: gene structure, chromosomal location and species specificity. **International immunology**, v. 6, n. 10, p. 1567-1574, 1994.
- TAN, Mei Lan et al. Programmed cell death pathways and current antitumor targets. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 7, p. 1547-1560, 2009.
- 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.
- TOPHAM, Caroline H.; TAYLOR, Stephen S. Mitosis and apoptosis: how is the balance set?. **Current opinion in cell biology**, v. 25, n. 6, p. 780-785, 2013.
- VERMES, István et al. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V. **Journal of immunological methods**, v. 184, n. 1, p. 39-51, 1995.
- VIGITEL 2010. (2010). Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico: estimativas sobre frequência e distribuição sócio-demográfica de fatores de risco e proteção para doenças crônicas nas capitais de 26 estados brasileiros e no Distrito Federal.
- VINCENT, Inez et al. Aberrant expression of mitotic cdc2/cyclin B1 kinase in degenerating neurons of Alzheimer's disease brain. **Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 10, p. 3588-3598, 1997.

- VIROS, Amaya et al. Improving melanoma classification by integrating genetic and morphologic features. **PLoS medicine**, v. 5, n. 6, p. e120, 2008.
- 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.
- WU, Zhenlong; ZHENG, Shunsheng; YU, Qiang. The E2F family and the role of E2F1 in apoptosis. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 41, n. 12, p. 2389-2397, 2009.
- YOSHIDA, Hiroki et al. Apaf1 is required for mitochondrial pathways of apoptosis and brain development. **Cell**, v. 94, n. 6, p. 739-750, 1998.
- ZHAI, Suoping et al. Flavopiridol, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, in clinical development. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 36, n. 5, p. 905-911, 2002.
- ZHOU, Lingli et al. CDK1 switches mitotic arrest to apoptosis by phosphorylating Bcl-2/Bax family proteins during treatment with microtubule interfering agents. **Cell biology international**, v. 38, n. 6, p. 737-746, 2014.
- ZHOU, Lingli et al. Tanshinone IIA, an isolated compound from *Salvia miltiorrhiza* Bunge, induces apoptosis in HeLa cells through mitotic arrest. **Life sciences**, v. 83, n. 11-12, p. 394-403, 2008.

CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA DE DERIVADOS DE
DIBENZOILMETANO E SUA POTENCIAL AÇÃO USANDO
METODOLOGIAS *IN VITRO* E *IN SILICO*****1. Introdução**

Compostos derivados de β -dicetonas têm se destacado por apresentarem características interessantes, entre elas a possibilidade de sua utilização como agentes de extração de metais, síntese de compostos luminescentes (CHENG et al., 2011), apresentam atividades biológicas anti-inflamatória, antiviral, antibacteriana e antitumoral, além de serem encontrados na natureza ou produzidos por síntese orgânica (MAGALHÃES et al., 1997; ZHANG, 2003; NOGUEIRA et al., 2003; SINGH et al., 2013; ALMELAH et al., 2016; CHINTHALA et al., 2017; PETTINARI et al., 2017). A atividade antitumoral das β -dicetonas é promissora tanto na forma livre como complexada com metais como Cu e Pt (NOGUEIRA et al., 2003; WILSON, 2012; NASCIMENTO et al., 2018).

O dibenzoilmetano (DBM), ou 1,3- Difenilpropano-1,3-diona (Figura 1), é um tipo de β -dicetona e suas atividades antitumorais e fotoprotetoras vêm sendo exploradas em diversos estudos (SINGLETERY et al., 1998; NOGUEIRA et al., 2003; NAKANO et al., 2004; KHOR et al., 2009).

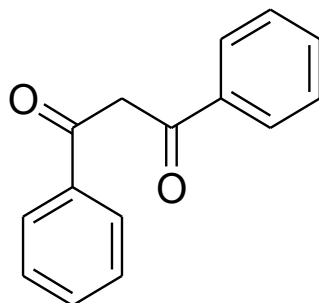


Figura 1 - 1,3-Difenilpropano-1,3-diona (DBM).

Na natureza, os dibenzoilmetanos (DBM) são encontrados em famílias como Annonacea, Asteracea, Menispermaceae, Rosaceae, Salicaceae e,

especialmente, Fabaceae (gênero *Glycyrrhiza* e *Lonchocarpus*) (MAGALHÃES et al., 1997; NOGUEIRA et al., 2003; MAGALHÃES et al., 2007).

Em ensaios *in vitro*, destacam-se os experimentos de Ishida e colaboradores (2002) que sintetizaram 26 β -dicetonas dentre elas o composto X (figura 2), um derivado de DBM altamente eletrofílico, foi o análogo mais potente contra várias linhas celulares, incluindo HOS (câncer de osso) e 1A9 (câncer da mama) e sua atividade pode estar relacionada à sua interação com o DNA. Nos experimentos de Jackson e colaboradores (2002) com células de câncer de próstata, o DBM pareceu inibir o crescimento celular de uma forma dose-dependente e adicionalmente observou-se suspensão na fase G₁ pela indução de proteínas inibitórias do ciclo celular. Nakano e colaboradores (2004) relacionaram β -dicetonas, inclusive o dibenzoilmetano (DBM), à inibição de tumores por meio da indução de mecanismos apoptóticos, com a ativação das caspases 3, 8 e 9.

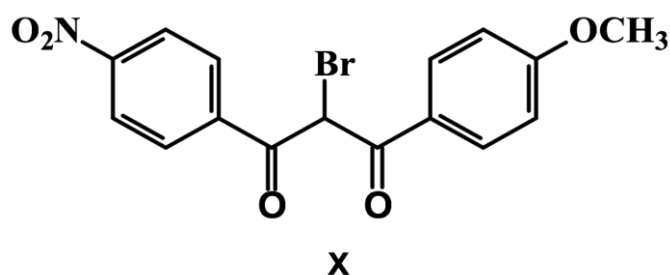


Figura 2 - Análogo X mais potente contra linhagens de células câncer de ovário (1A9) e Câncer de osso (HOS).

Em experimentos *in vivo*, diversos autores tem relatado que a suplementação da alimentação com DBM é capaz de inibir o desenvolvimento de tumores mamários (SINGLETARY et al., 1998; LIN et al., 2001), em tumor do colo retal em animais ApcMin/+ (SHEN et al., 2007), em câncer de cólon (CHEUNG et al., 2009) e próstata em camundongos TRAMP (transgênicos para câncer de próstata) (KHOR et al., 2009).

Quanto a toxicidade, o grupo de Wang (1991) demonstrou que o DBM é capaz de inibir a mutagenicidade induzida por metilnitrosourea, benzo[a]pireno, aflatoxina e 2-nitrofluoreno na bactéria *Salmonella typhimurium*. Os autores sugerem que o DBM pode inibir a mutagenicidade e ligação de carcinógenos

químicos a ácidos nucleicos, provavelmente por capturar eletrófilos carcinogênicos.

Quanto a farmacocinética foi demonstrada por Lin e colaboradores (2011) que o DBM comporta-se como farmacocinética linear em ratos machos com as doses testadas (10 – 250 mg/kg). Nesse estudo, o DBM pareceu ser igualmente distribuído entre o plasma e sangue de ratos e o clearance do sistema sanguíneo do DBM encontrado sugere que possui um lento clearance hepático em ratos Sprague-Dawley. Finalmente, esse estudo demonstrou também que devido a lipofilicidade da molécula e seu pKa a via oral de administração apresenta uma limitação na administração desse composto.

Este estudo teve como escopo sintetizar e avaliar a atividade citotóxica *in vivo* em diferentes linhagens neoplásicas de melanoma (B16F10 e Tm5) e investigar o potencial farmacocinético e toxicológico usando métodos *in silico*.

2. Metodologia

2.1. Instrumentação

2.1.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A caracterização do composto foi realizada por espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H , ^{13}C e DEPT. Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT foram obtidos em espectrômetro Mercury 400. O solvente utilizado foi clorofórmio deuterado (CDCl_3), usando-se como referência interna tetrametilsilano (TMS) para espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

2.1.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Com o objetivo de purificação do composto foi realizada a técnica de Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE) semi-preparativa usando um sistema HPLC-SHIMADZU, coluna Shim-pack PREP-ODS(H) Kit com detecção por ultravioleta (UV-Vis). O sistema cromatográfico utilizado foi: composto de coluna octadecilsilano de 25 cm de altura e 20 mm de diâmetro interno e partículas com tamanho de 15 μm com razão de fluxo de 3 mL/min e alça de injeção de 5 mL.

mantido a temperatura ambiente. A fase móvel escolhida foi a mistura água ultrapura MilliQ e metanol Merck grau HPLC (20:80 V/V). As substâncias eluídas foram detectadas no espectro do ultravioleta à 254 nm.

A amostra para a purificação foi preparada diluindo 100 mg do composto em 10 ml de fase móvel, obtendo-se, assim, uma concentração final de 10 mg/ml.

Antes de proceder a cromatografia, a fase móvel e as amostras foram filtradas a vácuo utilizando membrana de 0,22µm e desaeradas por trinta minutos em banho de ultrassom. As amostras foram preparadas em triplicata e cada uma foi cromatografada em quadruplicata. A amostra é considerada pura somente se um único pico aparecer no cromatograma.

2.1.4. Cromatografia de camada delgada (CCD)

As CCD foram feitas em cromatofolhas de alumínio sílicagel G F₂₅₄ 0,2 nm Art. 1.05554 Merck e revelada com Lâmpada de UV nos comprimentos de onda 254 e 356 nm.

2.2. Síntese e purificação dos derivados de 1,3-Difenilpropano-1,3-diona

Realizou-se a síntese de acordo com a patente PI0006583-8, no Laboratório de Química e Bioquímica de Produtos Naturais (BioNat) da Universidade Federal de Viçosa.

Em um balão de fundo redondo (100 ml) foram adicionados carbonato de potássio (3,0 equiv.) e DBM (1,0 equiv.) e foram suspensos em acetona (20 ml) e agitados durante 30 minutos à temperatura ambiente. A esta mistura foi adicionada o reagente de alquilação correspondente. Para a síntese de 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP) adicionou-se brometo de alila (1,0 equiv.) e a mistura foi agitada por 60 horas e monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD). Para a síntese de 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP) adicionou-se lentamente uma solução do brometo de benzila (1,0 equiv.) e a mistura reacional foi agitada vigorosamente por 72h e monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD).

A redução do composto 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH) foi realizada em um balão de fundo redondo (25 mL) contendo a

substância alquilada, 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona - DBP (4 equiv.) e metanol (3 mL), adicionou-se NaBH₄ (1,0 equiv.) a -10 °C. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (CCD).

Em seguida as misturas foram filtradas, os solventes foram evaporados e os produtos foram purificados por cromatografia de alta eficiência (CLAE). As frações eluídas foram enviadas para a análise por ressonância magnética nuclear.

2.2.1. 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP)

Sólido amorfo amarelado (72,2%); Rf: 0.55 (n-hexano/acetato de etila 8:2 v/v); IR (KBr): 1694.8, 1670.2, 1007.7, 962.2 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): 7,91 (4H, d, J = 7,4; Hz, H-2', H-2'', H-2' e H-6'), 7,40 (dd, 4H, H-3', H-5', H-3'', H-5''), 7,52 (dd, 2H, H-4', H-4''), 5,73-5,82 (m, 1H, H-5), 5,26 (t, 1H, J = 10,7 Hz, H-2), 5,08 (dd, 1H, J = 17,0 Hz, 1,4 Hz, H6b), 4,97 (d, 1H, J = 10 Hz, H6a); 2,85 (2H, t, J = 6,8, H-4); RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): δ 195,7 (C-1 e C3), 136,2 (C1' e C1''), 135,2 (C5), 133,7 (C4' e C4''), 129,1 (C2', C6', C2'' e C6''), 128,7 (C3', C5', C3'' e C5''), 117,4 (C6), 56,7 (C2), 33,7 (C4).

2.2.2. 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP)

Sólido incolor (85%); Rf: 0.74 (n-hexano/acetato de etila 8:2 v/v); IR (KBr): 3031, 1694, 1664, 999 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): 7.88 (dd, 4H, J = 8.0 e 1.3 Hz, H-2' e H-6'), 7.53 (tt, 2H, J = 7.5 e 1.2 Hz, H-4'), 7.40 (tt, 4H, J = 7.9 e 1.3 Hz, H-3' e H-5'), 7.26–7.20 (m, 4H, H-2'', H-3'', H-5'' e 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, CH₂Ph); RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): δ 195.6 (2 C=O), 139.3, 136.3, 133.7, 129.2, 129.0, 128.8, 126.8, 59.3, 35.4 (CH₂Ph).

2.2.3. 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH)

Sólido amorfo branco (42%); Rf: 0.77 (diclorometano); IR (KBr): 1694.8, 1670.2, 1007.7, 962.2 cm⁻¹; RMN de ¹H (400 MHz; CDCl₃): 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'''), 4,9 (1H t J 6,3 H-3), 4.1 (1H, m, H-2), 3,4 (1H, d, J 6,7, O-H), 3,04 (1H, dd, J 10,1 e 6,4, Hb) e 2,88 (1H, dd, J 10,1 e 4,7, Ha); RMN de ¹³C (100 MHz; CDCl₃): δ 142,8 (C-1'-C-1''), 128,9 (C-2'-C-6'-C-2''-C-6''), 128,6 (C-3'-C-5'-C-3''-C-5''), 133,5 (C-4'), 75,6 (C-3-C-1), 54,7 (C-2), 36,7 (C-4), 135,98 (C-1'''), 128,6 (C-2'''-C-6'''), 128,8 (C-3'''-C-5'''), 126,6 (C-4''').

2.3. Ensaios de caracterização de atividade biológica

2.3.1. Cultura de células

Foram utilizadas linhagens celulares: Melan-A, estabelecida a partir de melanoblastos normais (BENNETT et al., 1987); B16F10, estabelecida a partir de células de melanoma murino (FIDLER, 1975) e células Tm5, uma linhagem desenvolvida a partir da Melan-A por privação da adesão da mesma a uma matriz extracelular (OBA-SHINJO et al., 2006). 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.

2.3.1.1. Tripsinização

Culturas de células subconfluentes, após o descarte do meio de cultura, foram lavadas com PBS 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. 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 ressuspensas em meio completo. Após efetuar a contagem celular, com teste de viabilidade, volumes da suspensão celular foram subcultivadas contendo o número desejado de células.

2.3.1.2. 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:

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

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 porcentagem de células viáveis utiliza-se a fórmula:

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

2.3.1.3. 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 e no dia seguinte o meio foi trocado por um novo meio completo.

2.3.2. Atividade citotóxica medida pelo ensaio do MTT

As células foram plaqueadas, em placas de 96 poços, 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 completo e suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 horas à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade em seus respectivos meios de cultura. Após este período, foram adicionadas as concentrações diferentes dos compostos às células e estas foram incubadas por 60 horas à 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. O composto foi diluído em DMSO e foram feitas concentrações entre 12,5 µg/ml e 400 µg/ml e em cada poço a concentração de DMSO não ultrapassou 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 (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]) a 0,5 mg/ml e as placas foram novamente incubadas nas condições descritas acima por 4 horas. Após este período o MTT foi retirado de todos os poços e em seguida foi adicionado 100 µL de DMSO. As 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).

2.3.2.1. Cálculo da concentração inibitória de 50% das células

O valor da concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi calculado utilizando uma regressão não-linear: logaritmo da concentração da dose versus a resposta normalizada (porcentagens de células viáveis) determinados pelos programas GraphPad Prism® 5.0 e Microsoft Office Excel 2013®.

2.3.2.2. Índice de seletividade

A concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi calculada para cada linhagem e serviu 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 IC_{50} do composto sobre a linhagem de células normais (Melan-A) e o valor da IC_{50} do composto sobre a linhagem de células neoplásicas (B16F10 e Tm5), ou seja:

$$IS = \frac{IC50_{Melan-A}}{IC50_{linhagem\ neoplásica}}$$

2.4. Perfil farmacocinético e toxicológico

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.

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) foram determinados utilizando o algoritmo farmacocinético pkCSM (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>) (PIRES et al., 2015).

3. Resultados

3.1. Química

3.1.1. Síntese e caracterização dos derivados de DBM

Três derivados de DBM foram sintetizados sendo eles: 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP), 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP) e 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH) (Figura 3).

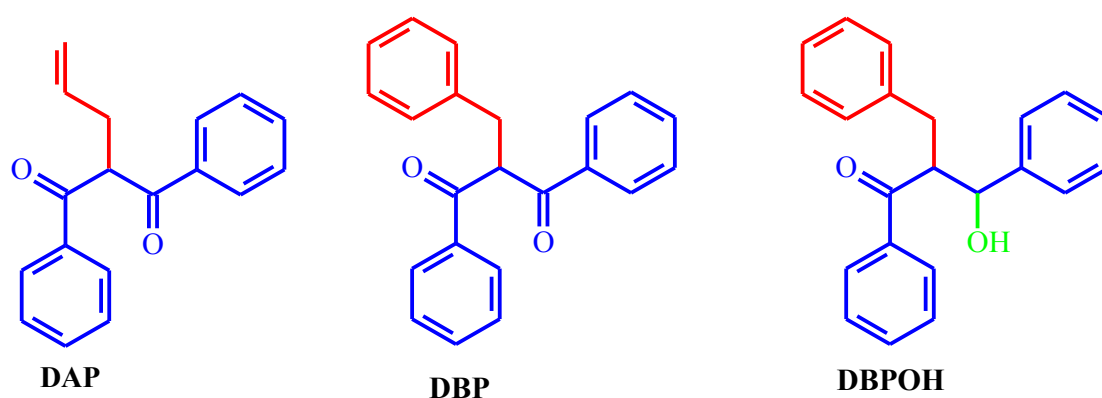


Figura 3 – Estruturas químicas dos compostos 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP), 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP) e 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).

Os compostos derivados de DBM foram identificados com base nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C . Nas figuras 4, 5, 6 estão representados os resultados obtidos experimentalmente do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP) nos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectro de DEPT. Nas figuras 7, 8, 9 estão representados os resultados obtidos experimentalmente do composto 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP) nos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectro de DEPT. Nas figuras 10, 11, 12 estão representados os resultados obtidos experimentalmente do composto e 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH) nos espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e espectro de DEPT. Estes resultados estão de acordo com os resultados descritos na literatura por Nogueira e colaboradores (2003), de Oliveira (2017) e Nascimento e colaboradores (2018).

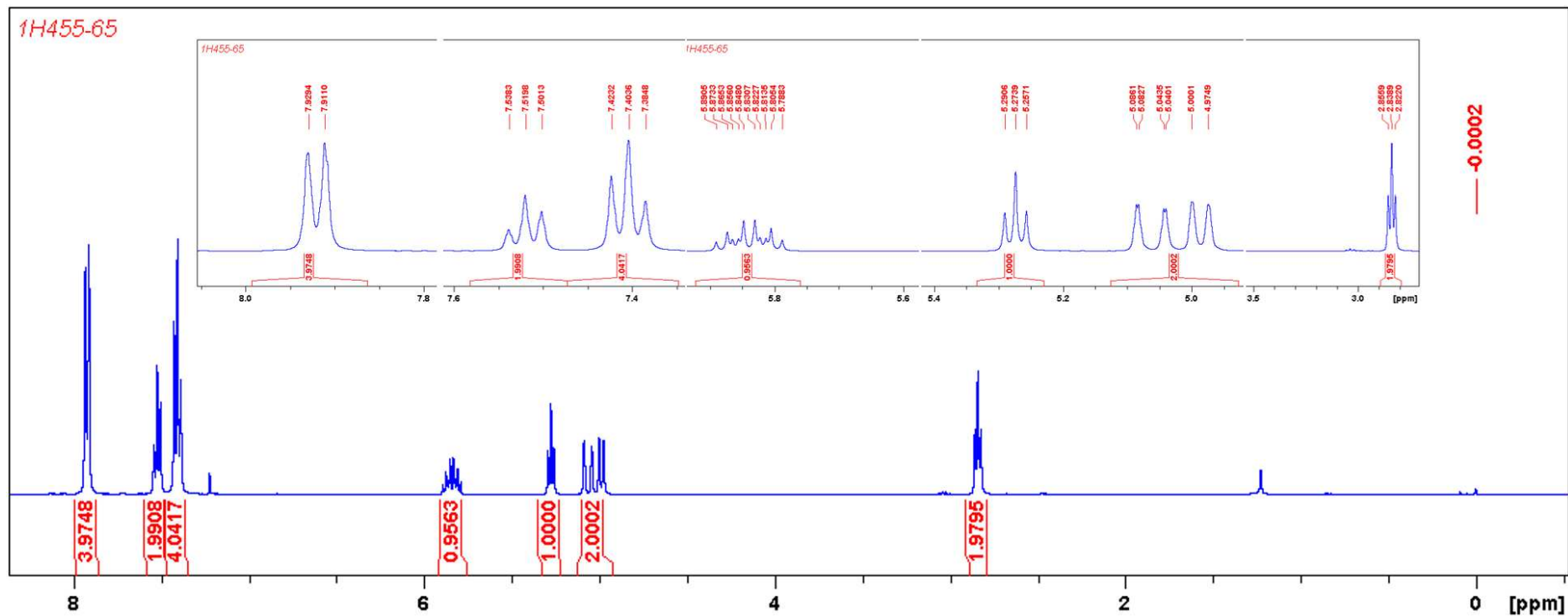


Figura 4 - Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 2-ailil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP). Com ampliação dos picos.

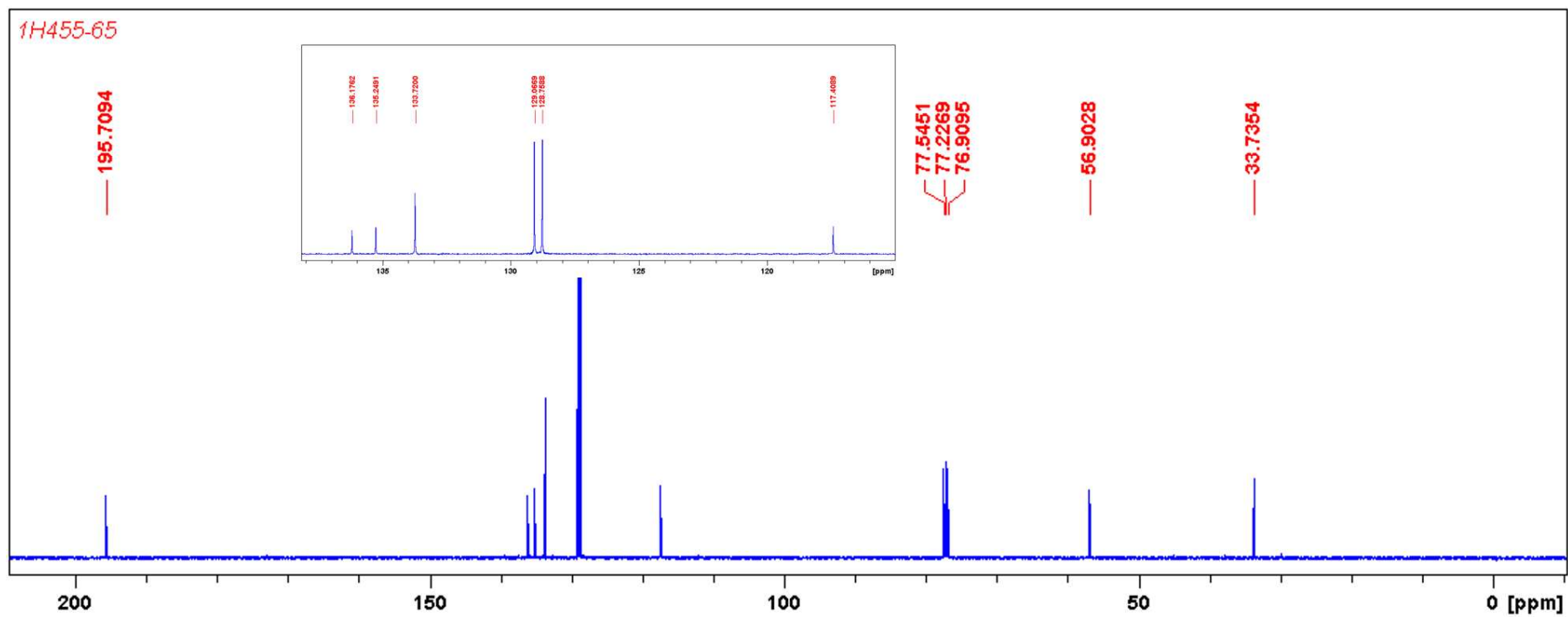


Figura 5 - Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do 2-álil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP). Com ampliação dos picos.

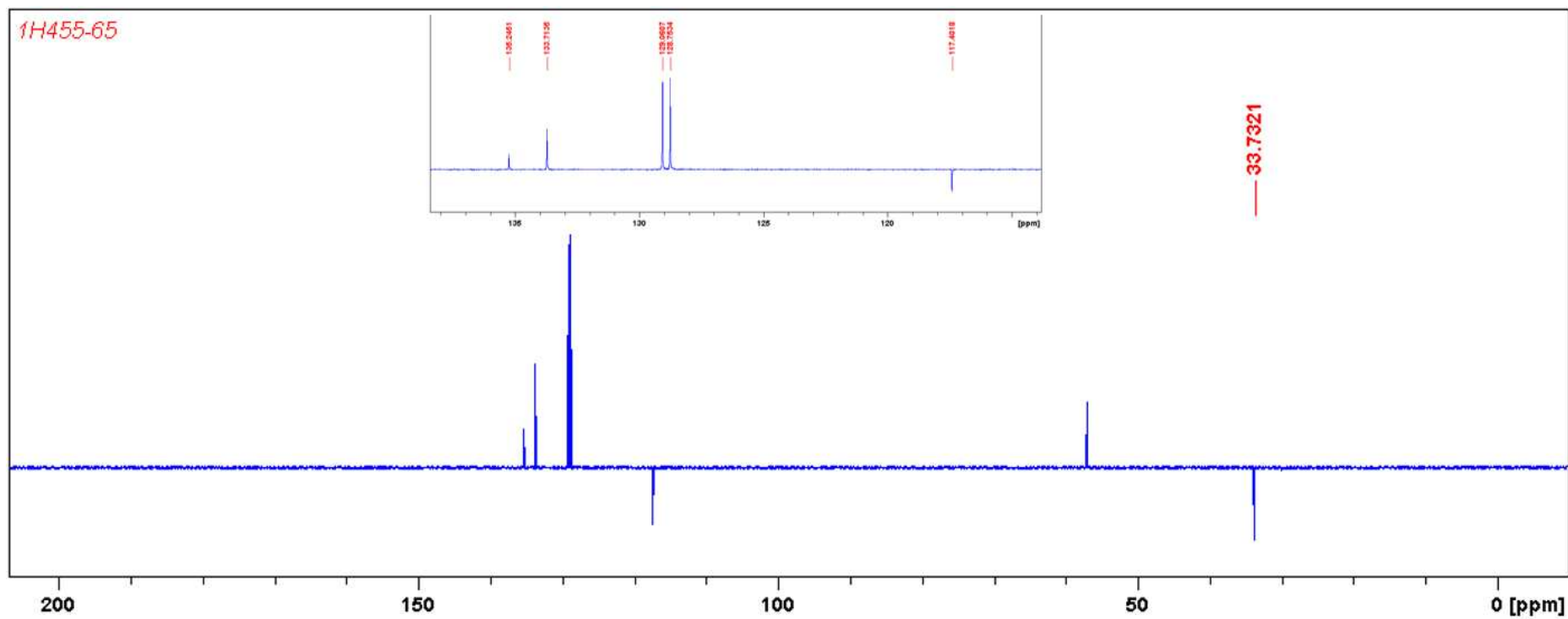


Figura 6 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) do 2-aliil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP). Com ampliação dos picos.

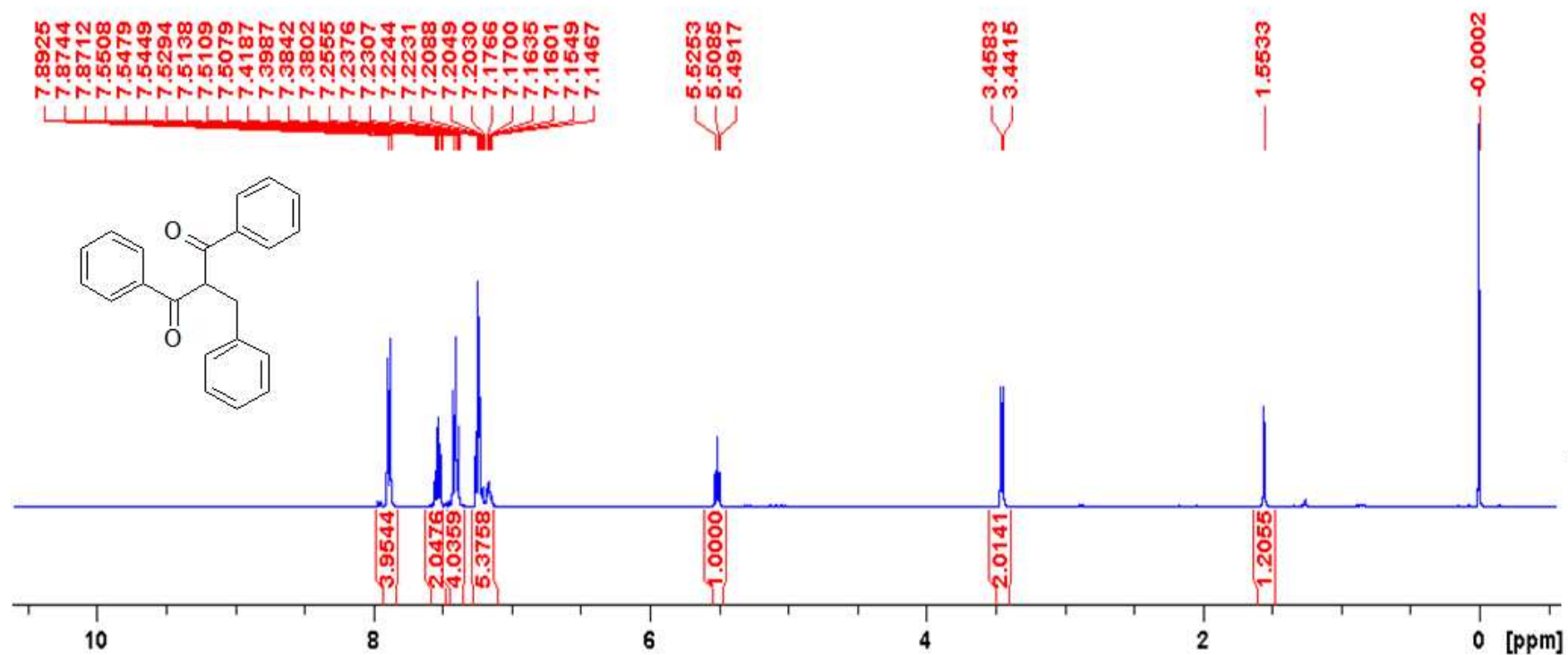


Figura 7 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP).

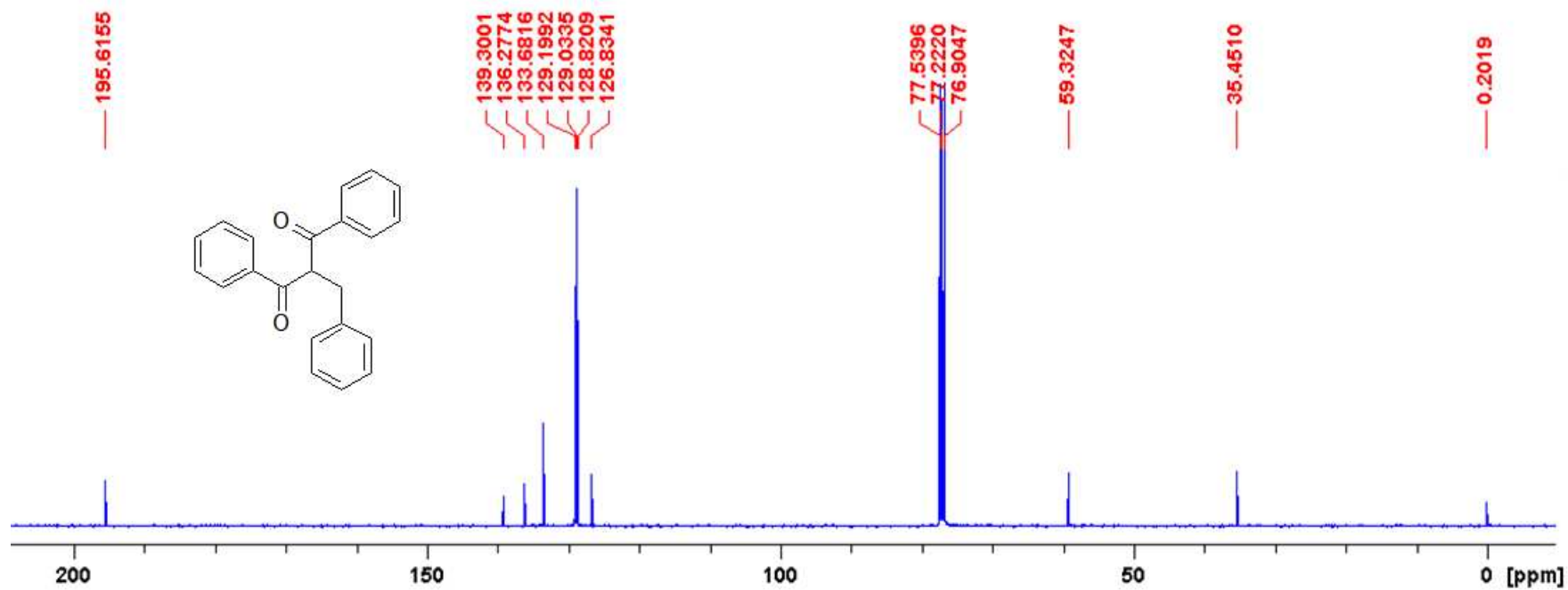


Figura 8 - Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP).

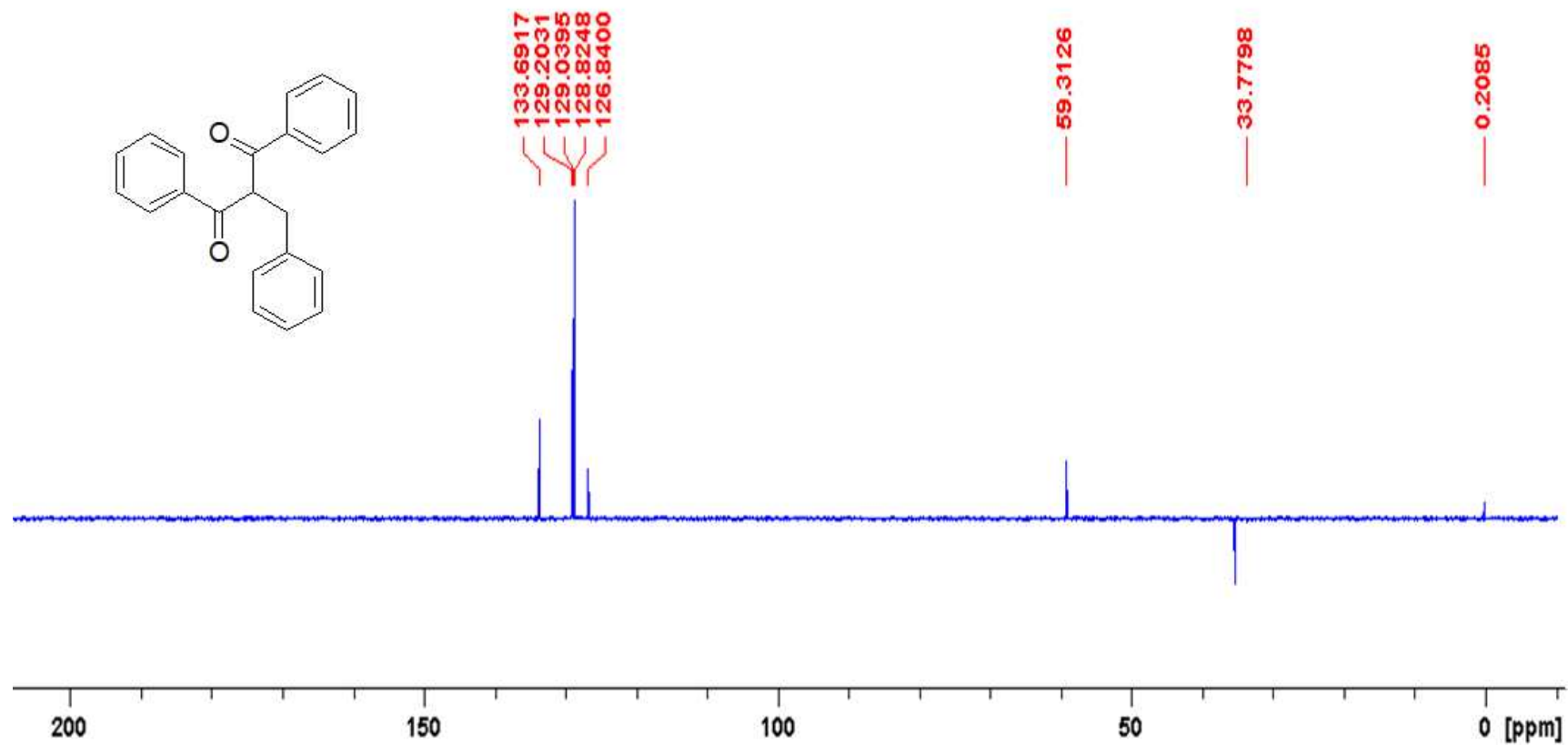


Figura 9 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl_3) do 1,3-difenil-2-benzil-1,3-propanodiona (DBP).

DBMOH D2O

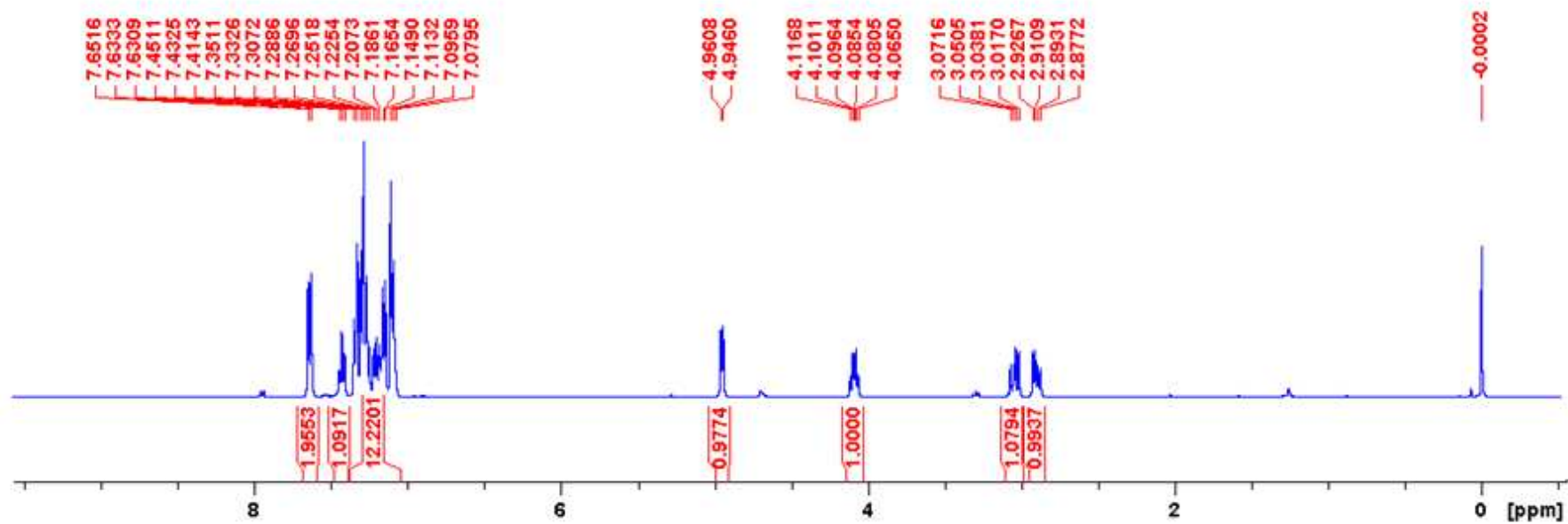


Figura 10 - Espectro de RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃) do e 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).

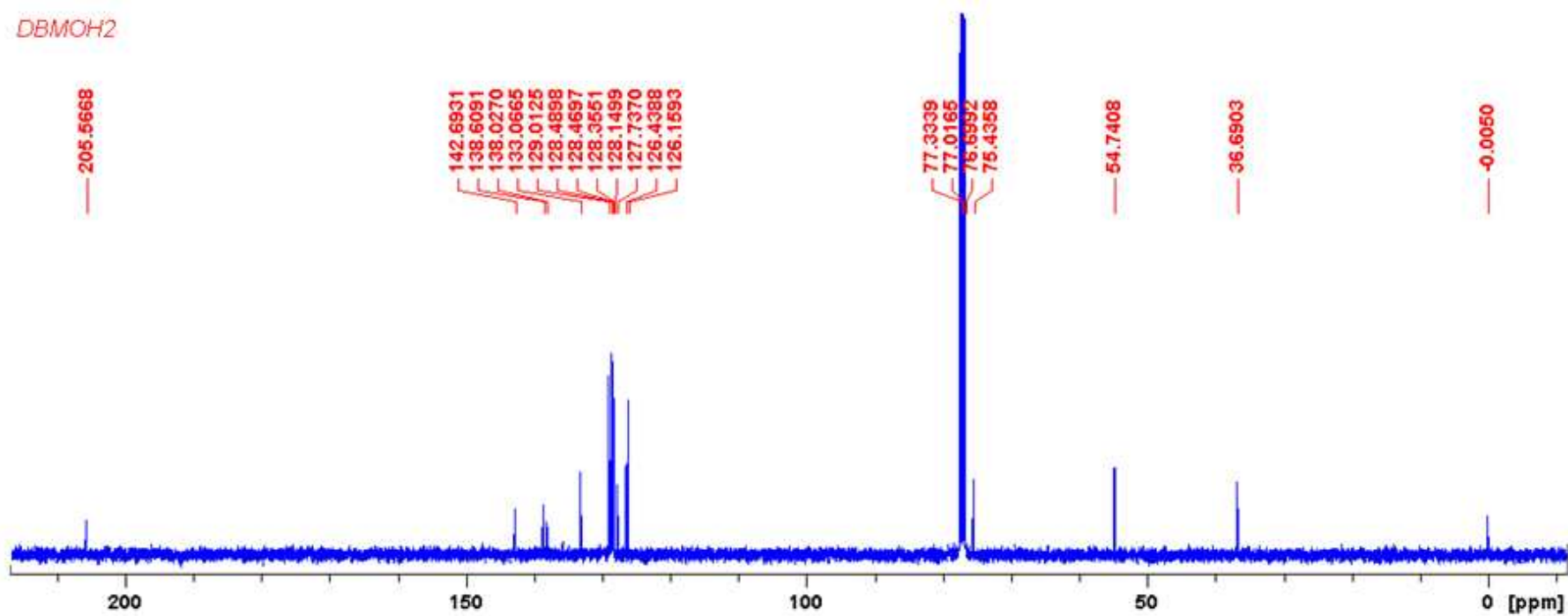


Figura 11 - Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃)-CCD do 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).

DBMOH2

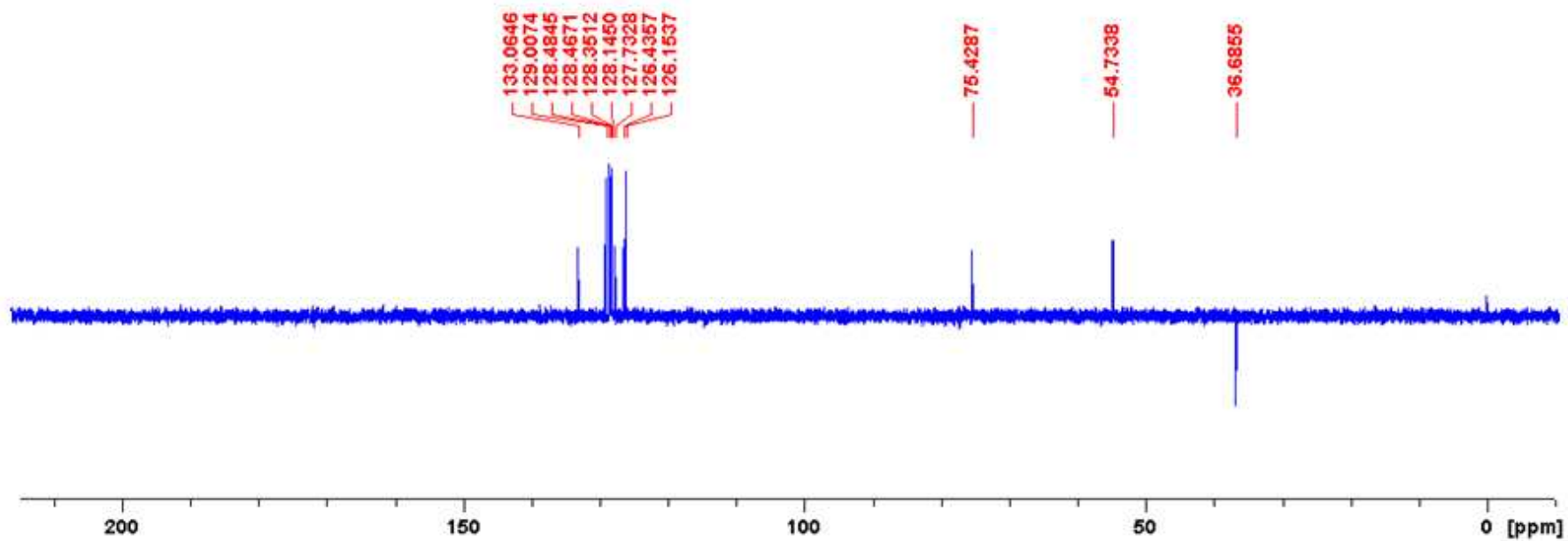


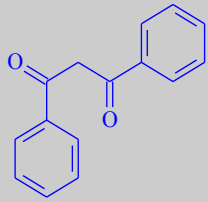
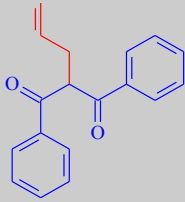
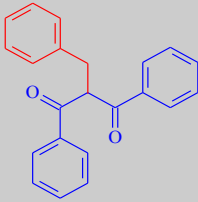
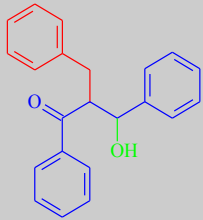
Figura 12 - Espectro de DEPT (100 MHz, CDCl₃) do 1,3-difenil-2-benzil-3-hidroxi-1-propanona (DBPOH).

3.2. Atividade biológica

3.2.1. Ensaios de citotoxicidade *in vitro* e índice de seletividade

A avaliação da atividade citotóxica do DBM e seus derivados (DAP, DBP e DBPOH), foi realizada com as linhagens tumorais B16F10 e Tm5 e a linhagem normal Melan-A. Na tabela 1, a seguir, o valor das concentrações correspondentes as porcentagens de morte celular correspondentes a 50% (IC₅₀) da população total de células foi calculado utilizando uma regressão não linear, log (da concentração do composto em µg/mL) x resposta normalizada. A partir dos IC₅₀ calculados foi possível comparar os índices de seletividade (IS) dos compostos (Tabela 1).

Tabela 1 - IC₅₀ para as linhagens celulares e Índice de seletividade.

Compostos				
	DBM	DAP	DBP	DBPOH
				
IC ₅₀ MelanA (µg/mL)	0,01674 ± 0,10358	207,2 ± 3,5	248,9 ± 9,0	11,25 ± 0,87
IC ₅₀ B16F10 (µg/mL)	0,007811 ± 0,068478	26,17 ± 1,11	6,53 ± 3,72	4,99 ± 0,609
IC ₅₀ Tm5 (µg/mL)	0,007642 ± 0,006286	44,40 ± 6,88	Não apresentou atividade	4,291 ± 0,505
IS (MelanA/ B16F10)	2,138	7,917	38,116	2,255
IS (MelanA/ Tm5)	2,185	4,667	Não apresentou	2,622

Na tabela 1 é possível observar que todas as modificações realizadas no DBM geraram um aumento nos valores de todos os IC_{50} , porém os índices de seletividade IS também aumentaram. Comparando-se os derivados de DBM, o que apresentou IC_{50} mais baixo para as linhagens tumorais foi o DBPOH ($IC_{50}B16F10 = 4,99 \pm 0,609 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{50}Tm5 = 4,291 \pm 0,505 \mu\text{g/mL}$), porém a maior seletividade para B16F10 se encontra no derivado DBP ($ISB16F10 = 38,116$) e para a linhagem Tm5 o composto DAP ($ISTm5 = 4,667$). O composto DBP não apresentou atividade citotóxica para a linhagem Tm5, porém uma redução deste derivado permitiu que a citotoxicidade contra esse tipo de célula voltasse a existir. Os valores do IC_{50} do composto DPBOH ($IC_{50}melan-A = 11,25 \pm 0,87 \mu\text{g/mL}$ e $ICB16F10 = 4,99 \pm 0,609 \mu\text{g/mL}$) foram semelhantes aos encontrados por Oliveira (2017) que foram $10,504 \mu\text{g/mL}$ para melan-A e $3,679 \mu\text{g/mL}$ para B16F10. O grupo de pesquisa de Nascimento (2018) encontrou valores de IC_{50} para as linhagens celulares comparáveis aos obtidos nesse trabalho.

Para novas drogas um valor de IS superior a 2,0 em ensaios *in vivo* é desejável para o interesse farmacêutico, ou seja, o composto investigado deve ser duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas do que em células normais (SUFFNESS e PEZZUTO 1990). Por esse motivo, tanto o DBM quanto os seus derivados apresentam um valor de IS significativo, indicando que este novo composto apresenta potencial terapêutico para este tipo de câncer. O potencial terapêutico para o tratamento de câncer para as β -dicetonas (entre eles o DBM e seus derivados) já foi relatado na literatura (CHOSI et al., 1992; JACKSON et al., 2002; MABJEESH et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2003; NAKANO et al., 2004; da LIMA NETO et al., 2006). Jackson e colaboradores (2002) demonstraram que o DBM apresenta potencial antitumoral frente a três linhagens de células de câncer de próstata (LNCaP, DU145 e PC-3) com IC_{50} entre 25 e $100 \mu\text{g/mL}$, além de ter sido demonstrado, ainda, que este composto apresenta ação citostática, sendo capaz de inibir o ciclo celular em G1. Em outro trabalho, Nakano e colaboradores (2004) testaram diferentes β -dicetonas comumente encontradas em plantas, entre elas o DBM, frente a linhagens de fibroblasto normal de gengiva humana (HGF) e células de carcinoma escamoso oral (HSC-2) e obteve o IC_{50} , para o DBM, igual a $82,8 \mu\text{g/mL}$ para a linhagem normal (HGF) e $22,5 \mu\text{g/mL}$ para a linhagem tumoral (HSC-2) e um $IS = 3,7$.

Nogueira e colaboradores (2003), identificou 8 derivados de DBM que apresentaram atividade antitumoral frente 4 linhagens de células tumorais: MCF7 (câncer de mama), NCI ADR (câncer de mama multirresistente), NCI460 (câncer de pulmão) e UACC62 (melanoma), encontrando IC_{50s} na faixa entre 25 e 250 µg/mL. Os baixos IC_{50s}, encontrados anteriormente e, neste trabalho, reforçam a necessidade e a importância do estudo de β-dicetonas e seus derivados frente a linhagens tumorais.

3.3. Perfil farmacocinético e toxicológico

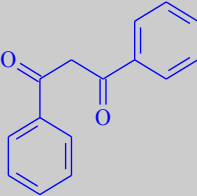
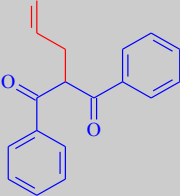
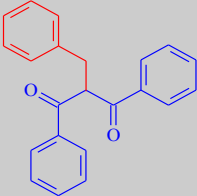
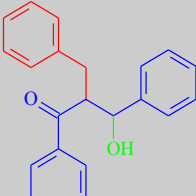
Os perfis farmacocinéticos dos compostos foram obtidos utilizando o programa de predição *in silico* pkCSM e estão apresentados na tabela 2. Pode ser observado que as modificações diminuíram a solubilidade dos derivados em água, como esperado, pois as modificações estruturais aumentaram a lipofilicidade. Em relação a absorção intestinal todos são bem absorvidos pelos tecidos, pois apresentam permeabilidade para células Caco-2 maior que 10×10^{-6} cm/s e absorção maior que 90% em todos os compostos (YEE, 1997; CHATURVEDI et al., 2001; CASTILLO-GARIT et al., 2008; MATOS, 2016).

A glicoproteína-P (P-gp) está relacionada ao gene de multirresistência à fármacos (MDR1) responsável pelo efluxo de fármacos e xenobióticos em células de tecidos normais e em barreiras hemato-teciduals (SCHINKEL, 1999; POLLI et al., 2001). Dos compostos, os derivados de DBM, apresentados todos são substratos de P-gp porém somente o DAP não apresenta capacidade de inibir sua ação, sendo assim o único afetado pela mesma. Muitas células apicais do trato gastro intestinal apresentam P-gp (DOPPENSCHMITT et al., 1999; AZEREDO et al., 2009), logo, espera-se que o composto DAP apesar de ser difundido para dentro das células, possa ser bombeado para fora destas na presença de P-gp. Adicionalmente a P-gp, os genes CYP, dos diversos citocromos P450, são responsáveis pelo metabolismo de fármacos que são seus substratos, de acordo com nossa análise *in silico* todos os compostos são substrato de pelo menos uma CYP, indicando que esses fármacos precisam de uma dose maior para atingir a dose efetiva. Ainda na tabela 2, podemos inferir que, todos os compostos apresentam elevados volumes de distribuição e fração livre indicando que a maior parte do composto após entrar na corrente sanguínea

estará disponível para ter sua ação terapêutica, principalmente porque a ação conjunta de P-gp e CYP são a principal barreira a drogas do intestino (CUMMINS, 2002). Todos esses dados apresentados levam a crer que a administração oral desses compostos não será recomendada como ocorreu no trabalho de Lin e colaboradores (2011).

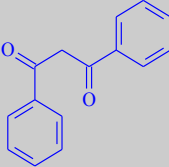
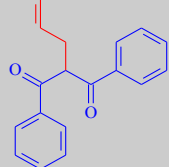
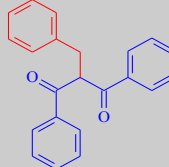
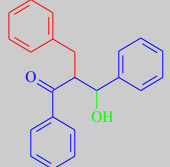
Os resultados preditos de toxicologia pelo pkCSM e o algoritmo LAZAR estão presentes na tabela 3 e estes resultados nos mostram que o DBPOH tem potencial ação tóxica tanto no teste de AMES quanto hepatotoxicidade, porém nos estudos de Oliveira (2017) este composto em camundongos mostrou possuir efeito hepatoprotetor e não hepatotóxico. Para toxicidade as modificações estruturais reduziram as doses tóxicas e não alteraram o efeito carcinogênico, ou seja, as doses crônicas e agudas são maiores nos derivados de DBM e todos os compostos tanto o DBM quanto seus derivados não possuem ação carcinogênica como esperado segundo os trabalhos de Wang e colaboradores (1991).

Tabela 2 – Predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) por pkCSM análise de similaridade.

Compostos						
		DBM	DAP	DBP	DBPOH	
						
Propriedade	Nome do modelo	Valor	Valor	Valor	Valor	Unidade
Absorção	Solubilidade em água	307,610	10,046	0,565	1,151	Numérico (µmol/L)
Absorção	Permeabilidade Caco2	65,917	32,584	62,951	60,814	Numérico (Papp em 10 ⁻⁶ cm/s)
Absorção	Absorção Intestinal (humano)	95,222	95,685	98,055	95,395	Numérico (%Absorvido)
Absorção	Permeabilidade na Pele	-2,058	-2,305	-2,623	-2,702	Numérico (log Kp)
Absorção	Substrato Glicoproteína-P	Não	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor Glicoproteína-PI	Não	Não	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Absorção	Inibidor Glicoproteína-P II	Não	Não	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)

Distribuição	VDss (humano)	1,914	4,395	1,585	1,570	Numérico (L/kg)
Distribuição	Fração Livre (humano)	0,036	0,075	0,081	0,082	Numérico (Fu)
Distribuição	Permeabilidade BBB	0,252	0,022	-0,05	-0,086	Numérico (log BB)
Distribuição	Permeabilidade CNS	-1,356	-1,448	-1,127	-1,396	Numérico (log PS)
Metabolismo	Substrato CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Substrato CYP3A4	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP1A2	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP2C19	Sim	Sim	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP2C9	Não	Não	Sim	Sim	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Metabolismo	Inibidor CYP3A4	Não	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)
Excreção	Clearance Total	1,455	1,791	1,469	1,524	Numérico (ml/min/kg)
Excreção	Substrato Renal OCT2	Sim	Não	Não	Não	Categórico (Sim/Não)

Tabela 3 – Predição das propriedades toxicológicas por pkCSM e LAZAR análise de similaridade.

Modelo	Unidade	Compostos							
		DBM		DAP		DBP		DBPOH	
						pkCSM	LAZAR	pkCSM	LAZAR
Toxicidade AMES	Categórico (Sim/Não)	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Sim	Sim
Hepatotoxicidade	Categórico (Sim/Não)	Não	n,a	Sim	n,a	Sim	n,a	Sim	n,a
Inibidor hERG I	Categórico (Sim/Não)	Não	n,a	Não	n,a	Não	n,a	Não	n,a
Toxicidade aguda oral para ratos (LD50)	Numérico (mol/kg)	1,850	n,a	2,029	n,a	2,669	n,a	2,708	n,a
Toxicidade crônica oral para ratos (LOAEL)	Numérico (mg/kg/dia)	179,47	n,a	229,09	n,a	202,77	n,a	204,64	n,a
Carcinogênese (Ratos)	Categórico (Sim/Não)	n,a,	Não	n,a,	Não	n,a,	Não	n,a,	Não
Carcinogênese (Roedores)	Categórico (Sim/Não)	n,a,	Não	n,a,	Não	n,a,	Não	n,a,	Não
Carcinogênese (Camundongos)	Categórico (Sim/Não)	n,a	Não	n,a	Não	n,a	Não	n,a	Não
Dose máxima tolerada (humano)	Numérico (mg/kg/dia)	5,24	4,96	3,78	6,93	2,71	3,87	2,75	3,17

n.a.: não analisado

4. Conclusão

Os derivados de DBM têm se mostrado muito promissores no combate a neoplasias. Este trabalho buscou integrar resultados obtidos *in vitro* com predições *in silico*. Quanto ao potencial antimelanoma o DAP foi o que apresentou o melhor índice de seletividade, levando em consideração que demonstrou ação nas duas linhagens tumorais (IS para B16F10 = 7,917 e IS para Tm5 = 4,667). Os ensaios ADME para esse composto demonstraram que ele apresenta alta absorção intestinal e tem uma boa distribuição, porém ele tem baixa solubilidade em água e é substrato para as principais proteínas do metabolismo (CYP) e de resistência (P-gp) a drogas. Para toxicologia este composto não apresentou capacidade carcinogênica, mas apresentou apenas a capacidade de ser hepatotóxico, porém experimentos *in vivo* devem ser realizados para confirmar essa predição. Já o DBP que apresentou seletividade apenas para a linhagem B16F10 (IS = 38,116) tem melhor distribuição corporal que o DAP, pois apesar de ser substrato de P-gp também possui a capacidade de agir como inibidor dessa proteína, porém quanto a toxicidade AMES ambos os programas usados discordaram nas suas predições, mas assim como todos os outros compostos não apresentou capacidade carcinogênica. Já o DBM e o DBPOH apresentaram índices de seletividade próximos, mas quanto a absorção do DBPOH se mostrou mais eficiente; porém, apresentou toxicidade pelo modelo AMES ao contrário do composto DBM. Mudanças estruturais podem levar a melhora da eficácia de tratamentos ou não, por esse motivo o estudo de novos derivados de DBM deve ser realizado *in vitro* e *in silico* de forma a nortear a escolha de estratégias mais eficientes nos estudos pré-clínicos.

5. Referências Bibliográficas

- ALMELAH, Eman et al. Dibenzoyl-methane derivatives as a potential and exciting new therapy for the treatment of childhood bone cancer. **Anticancer research**, v. 36, n. 11, p. 6043-6050, 2016.
- AZEREDO, Francine J.; UCHÔA, F. T.; COSTA, T. D. Papel da glicoproteína-P na farmacocinética e nas interações medicamentosas. **Rev Bras Farm**, v. 90, n. 4, p. 321-326, 2009.

- BENNETT, Dorothy C.; COOPER, Philip J.; HART, Ian R. A line of non-tumorigenic mouse melanocytes, syngeneic with the B16 melanoma and requiring a tumour promoter for growth. **International journal of cancer**, v. 39, n. 3, p. 414-418, 1987.
- CASTILLO-GARIT, Juan A. et al. Estimation of ADME properties in drug discovery: predicting Caco-2 cell permeability using atom-based stochastic and non-stochastic linear indices. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 97, n. 5, p. 1946-1976, 2008.
- CHATURVEDI, Pravin R.; DECKER, Caroline J.; ODINECS, Aleksandrs. Prediction of pharmacokinetic properties using experimental approaches during early drug discovery. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 5, n. 4, p. 452-463, 2001.
- CHENG, Guo et al. Synthesis, Characterization and Luminescence Properties of Novel β -Diketone and Eu () Ternary Complex. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, v. 31, n. 9, p. 2346-2349, 2011.
- CHEUNG, Ka Lung et al. Differential in vivo mechanism of chemoprevention of tumor formation in azoxymethane/dextran sodium sulfate mice by PEITC and DBM. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 5, p. 880-885, 2009.
- CUMMINS, Carolyn L.; JACOBSEN, Wolfgang; BENET, Leslie Z. Unmasking the dynamic interplay between intestinal P-glycoprotein and CYP3A4. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 300, n. 3, p. 1036-1045, 2002.
- DA LIMA NETO, Quirino A. et al. Estudo da relação estrutura-atividade quantitativa de dibenzoilmetanos α -substituídos quanto à atividade anticâncer da mama (linhagem celular MCF7). **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 52, n. 4, p. 345-357, 2006.
- DE OLIVEIRA, Marcos Rodrigo. **Avaliação da atividade antimelanoma de formulação transdérmica de um derivado sintético de dibenzoilmetano**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- DOPPENSCHMITT, Stephan et al. Role of P-glycoprotein-mediated secretion in absorptive drug permeability: An approach using passive membrane permeability and affinity to P-glycoprotein. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 88, n. 10, p. 1067-1072, 1999.
- FIDLER, Isaiah J. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. **Cancer research**, v. 35, n. 1, p. 218-224, 1975.
- ISHIDA, Junko et al. Antitumor agents. Part 214: synthesis and evaluation of curcumin analogues as cytotoxic agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 10, n. 11, p. 3481-3487, 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.
- 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.
- 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.
- LIN, Wen et al. Pharmacokinetics of dietary cancer chemopreventive compound dibenzoylmethane in rats and the impact of nanoemulsion and genetic knockout of Nrf2 on its disposition. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 32, n. 2, p. 65-75, 2011.

- LIN, Wen et al. Pharmacokinetics of dietary cancer chemopreventive compound dibenzoylmethane in rats and the impact of nanoemulsion and genetic knockout of Nrf2 on its disposition. **Biopharmaceutics & drug disposition**, v. 32, n. 2, p. 65-75, 2011.
- MABJEESH, Nicola J. et al. Dibenzoylmethane, a natural dietary compound, induces HIF-1 α and increases expression of VEGF. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 303, n. 1, p. 279-286, 2003.
- MAGALHÃES, A. F., NOGUEIRA, M. A. et al. (1997). Three dibenzoylmethane derivatives from Lonchocarpus species. **Phytochemistry**, 46: 1029 - 1033.
- MAGALHÃES, Aderbal F. et al. Flavonoids of Lonchocarpus montanus AMG Azevedo and biological activity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 3, p. 351-367, 2007.
- MATOS, Karina Silvia. **Estudos computacionais e experimentais da permeabilidade celular de candidatos a fármacos**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- MAUNZ, Andreas et al. Lazar: a modular predictive toxicology framework. **Frontiers in pharmacology**, v. 4, p. 38, 2013.
- 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.
- NOGUEIRA, M. A. et al. (2003). A novel sunscreen agent having antimelanoma activity. **Il Farmaco**, 58: 1163 - 69.
- OBA-SHINJO, Sueli M. et al. Melanocyte transformation associated with substrate adhesion impediment. **Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 231-241, 2006.
- PETTINARI, Riccardo et al. Ruthenium (II)-arene complexes with dibenzoylmethane induce apoptotic cell death in multiple myeloma cell lines. **Inorganica Chimica Acta**, v. 454, p. 139-148, 2017.
- POLLI, Joseph W. et al. Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 299, n. 2, p. 620-628, 2001.
- SCHINKEL, Alfred H. P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. **Advanced drug delivery reviews**, v. 36, n. 2-3, p. 179-194, 1999.
- SHEN, Guoxiang et al. Chemoprevention of familial adenomatous polyposis by natural dietary compounds sulforaphane and dibenzoylmethane alone and in combination in ApcMin/+ mouse. **Cancer research**, v. 67, n. 20, p. 9937-9944, 2007.
- SINGH, S., JOSHI, Y. C. (2013). Synthesis and antimicrobial screening of novel β -diketones containing 2-substituted 2-imidazoline moiety. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, 5: 398 - 404.
- SINGLETON, K. et al. Effect of the beta-diketones diferuloylmethane (curcumin) and dibenzoylmethane on rat mammary DNA adducts and tumors induced by 7, 12-dimethylbenz [a] anthracene. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 6, p. 1039-1043, 1998.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. Academic Press, London, p. 71-133, 1990.
- WANG, Ching Y.; LEE, Mei-Sie; ZUKOWSKI, Kim. Inhibition by diacylmethane derivatives of mutagenicity in Salmonella typhimurium and tRNA-binding of chemical carcinogens. **Mutation Research Letters**, v. 262, n. 3, p. 189-193, 1991.

- WILSON, Justin J.; LIPPARD, Stephen J. In vitro anticancer activity of cis-diammineplatinum (II) complexes with β -diketonate leaving group ligands. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 11, p. 5326-5336, 2012.
- YEE, Shiyin. In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth. **Pharmaceutical research**, v. 14, n. 6, p. 763-766, 1997.
- ZHANG, P. Gleevec (STI 571) inhibits lung cancer cells growth (A 549) and potentiates the cisplatin effects. **Mol. Cancer**, 2: 2003.

CAPÍTULO 3

CÁLCULO DAS DOSES *IN SILICO* DO COMPOSTO 2-ALIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA (DAP) PARA EXPERIMENTOS *IN VIVO*

1. Introdução

Normalmente, novos fármacos são descobertos testando compostos em múltiplos passos que consomem tempo em uma bateria de *screenings* biológicos *in vitro* e *in vivo*. Os compostos mais promissores são então estudados e suas propriedades farmacocinéticas, o metabolismo e o potencial de toxicidade determinados. Se efeitos adversos forem encontrados nessa etapa, o projeto será interrompido ou reiniciado para encontrar outro candidato clínico gerando prejuízos para o orçamento de pesquisa e desenvolvimento de qualquer empresa farmacêutica (KENNED, 1997). Atualmente, as taxas na qual a triagem biológica produz dados aumentou drasticamente devido as instalações de triagem de alto rendimento (HTS, do inglês *high-throughput screening*) que são comuns em grandes empresas farmacêuticas e biotecnológicas (VAN DE WATERBEEMD, 2002). Para acompanhar estes desenvolvimentos, a química combinatória surgiu para tornar possível sintetizar grandes bibliotecas de produtos químicos usando a mesma reação química e reagentes apropriados. O novo aumento drástico de sínteses causado pela capacidade de triagem biológica e química gerou demandas cada vez maiores sobre absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME) e dados de toxicidade (juntos denominados dados ADMET) o quanto antes possível. Dados iniciais, rápidos e relevantes do ADMET pode ser abordado de alguns modos como uma variedade de ensaios *in vitro* ou utilizando modelos *in silico* ou modelos preditivos (VAN DE WATERBEEMD e GIFFORD, 2003). Aliando experimentos *in vitro* com dados ADMET previstos *in silico* é possível determinar faixas de concentrações alvos para um delineamento menos randômico em experimentos *in vivo*. Neste capítulo estão apresentados os cálculos que foram utilizados para determinar as doses a serem buscadas nos experimentos *in vivo* com DAP.

2. Metodologia

2.1. 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), onde V_{dss} é o volume de distribuição e CL é o *clearance* do medicamento:

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

A seguir, pode-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 da concentração que mata 50% da população de células (IC₅₀) 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:

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

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

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

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

$$F_u \times F = K_p$$

Logo:

$$D = \frac{IC_{50} \times Cl \times T}{K_p}$$

3. Resultados

3.1. Determinação da dose para os animais

As doses utilizadas nos animais foram determinadas a partir dos dados obtidos na 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 grama de peso do animal (STORPIRTIS et al., 2011). Para os cálculos foram consideradas as seguintes fórmulas:

- Tempo de meia vida do medicamento ($T_{1/2}$):

$$T_{\frac{1}{2}} = \frac{(0,693 \times Vd_{ss})}{Cl}$$

- Velocidade de eliminação (K_{el}):

$$K_{el} = \frac{0,693}{T_{\frac{1}{2}}}$$

- Dose (D), temos que:

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

Além dessas fórmulas deve ser levada em conta nos cálculos, que, para formulações transdérmicas, a biodisponibilidade intravenosa é equivalente a $F=1$.

Para o veículo pomada que entregará o composto sobre a superfície da pele, a ação terapêutica depende da ligação do sistema fármaco/veículo/pele e não apenas de cada um destes fatores em separado. Em relação ao fármaco além de considerar o coeficiente de permeabilidade (K_p) do fármaco, deve-se considerar também o coeficiente de partilha óleo/água do composto, pois além de penetrar bem através da pele, este deve se dissolver perfeitamente nos fluidos aquosos do organismo. Durante o processo de absorção devem ser

considerados o coeficiente de difusão, a concentração e o peso molecular do fármaco. Por fim, para a execução eficaz da ação medicamentosa sobre a superfície cutânea, primeiramente o fármaco deve libertar-se do veículo e ligar-se à superfície da camada córnea, formando, assim, um coeficiente de partilha do fármaco entre a pele e o veículo (MARTINS & VEIGA, 2002; PRISTA et al., 2003). Por esse motivo a dose só pode ser calculada para a formulação transdérmica e na tabela 1, abaixo, está representado os valores estipulados com suas respectivas unidades.

Tabela 1 – Valores obtidos da predição das propriedades farmacocinéticas (ADME) por pkCSM análise de similaridade, as fórmulas farmacocinéticas previamente determinadas e os dados obtidos nos experimentos *in vivo*.

Volume de distribuição aparente no estado estacionário (VD _{ss})	90,782 mL/Kg
Clearance Total (CL)	1,791 mL/(min*Kg)
Tempo de meia vida do medicamento (T _{1/2})	35,134 min
Velocidade de eliminação (Kel)	0,0197
Tempo entre doses	24 h
IC ₅₀	26,17 µg/mL
IC ₉₀	50,63 µg/mL
Fração livre (Fu)	0,075
Biodisponibilidade (F)	1,00
Dose equivalente ao IC ₅₀	0,8997 mg composto/g de animal
Dose equivalente ao IC ₉₀	1,741 mg composto/g de animal

4. Referências Bibliográficas

- KENNEDY, Tony. Managing the drug discovery/development interface. **Drug discovery today**, v. 2, n. 10, p. 436-444, 1997.
- MARTINS, Maria Rita Fernandes Moraes; VEIGA, Francisco. Permeation enhancers in transdermal drug delivery systems: A new application of cyclodextrins. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-54, 2002.
- PRISTA, L. N. et al. Tecnologia Farmacêutica, volume I; 6ª edição. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 2003.
- VAN DE WATERBEEMD, Han. High-throughput and in silico techniques in drug metabolism and pharmacokinetics. **Current opinion in drug discovery & development**, v. 5, n. 1, p. 33, 2002.
- VAN DE WATERBEEMD, Han; GIFFORD, Eric. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise?. **Nature reviews Drug discovery**, v. 2, n. 3, 2003.

CAPÍTULO 4**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMELANOMA *IN VIVO* DO 2-ALIL-1,3-DIFENIL-1,3-PROPANODIONA (DAP)****1. Introdução**

Neoplasias ou tumores malignos, apresentam-se como uma massa de tecido com crescimento excedendo ao dos tecidos saudáveis e que persiste mesmo depois da interrupção dos estímulos que o desencadeou. Este tecido crescendo compete com o organismo hospedeiro pelo seu suprimento nutricional e energético. Malignos tendem a ser muito agressivos, podendo se espalhar para outras regiões do corpo (WILLIS, 1952; MCGEE et al., 1992; COTRAN et al., 2004.).

A angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos) é essencial para o desenvolvimento de neoplasias e está diretamente ligada com a formação de metástase, o processo de migração de células tumorais do local primário para órgãos distantes. No melanoma a alta capacidade de formação de sítios metastáticos torna as vias angiogênicas alvos terapêuticos importantes para controle da progressão da doença (HANAHAN e WEINBERG, 2011; JOUR et al., 2016). Os principais 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 (JOUR et al., 2016).

A metástase é uma das principais causas de mortes relacionadas ao câncer, apesar dos avanços terapêuticos nos últimos anos (STEEG, 2016). Vários autores já abordaram diversos avanços da compreensão dos eventos genéticos e moleculares que governam a disseminação metastática (VALASTYAN e WEINBERG, 2011; SETHI e KANG, 2011; MASSAGUÉ e OBENAU, 2016; TURAJLIC e SWANTON, 2016; LAMBERT et al., 2017) e todos concordam que isso destaca a necessidade urgente de entender melhor os mecanismos subjacentes à metástase e identificar novas estratégias terapêuticas e alvos de drogas para tratar a doença.

A formação de metástase é um processo de múltiplas etapas. Inicialmente, ocorre a invasão local do tumor primário, processo este, iniciado pela ativação de vias de sinalização que regulam a dinâmica do citoesqueleto gerando a perda de adesão entre células tumorais e modificações da matriz extracelular (FRIEDL e ALEXANDER, 2011). Permitindo assim, a migração de células tumorais para longe do tumor primário e a infiltração em tecidos adjacentes. O início da propagação é então favorecido pela angiogênese, já que para iniciar a propagação a locais secundários, as células tumorais devem entrar na circulação sanguínea ou no sistema linfático. No melanoma, a dispersão das células tumorais inicialmente ocorre no sistema linfático levando a uma metástase linfonodal, enquanto a metástase distal geralmente requer que as células tumorais se disseminem através da circulação sanguínea (hematogênica) para órgãos como pulmão e cérebro (WONG e HYNES, 2006; SHAIN e BASTIAN, 2016; CHIANG et al., 2016). Antes da colonização, ao atingir os órgãos distais, as células tumorais sobreviventes podem aderir ativamente a vasos sanguíneos e extravasar deste por migração estabelecendo, assim, um ambiente pré-metastático que proporciona um nicho favorável ao recrutamento de novas células tumorais e subsequentemente o seu crescimento (REYMOND et al., 2013; MCALLISTER e WEINBERG, 2014; LIU e CAO, 2016; PEINADO et al., 2017). Após o seu estabelecimento no órgão alvo, as células tumorais são referidas como células tumorais disseminadas e estas possuem a capacidade de estar presentes por anos ou décadas e permanecer em estado latente devido a diversos fatores (MASSAGUÉ e OBENAU, 2016; GAY e MALANCHI, 2017). Por fim, a colonização ocorre quando metástases clinicamente relevantes surgem do crescimento destas células antes dormentes (GÓMEZ-CUADRADO et al., 2017).

Modelos animais de metástase espontânea permitem a disseminação de células de um tumor primário para sítios secundários. Estes modelos podem receber transplantes ectópicos ou ortotópicos de células ou tecidos cancerígenos. Transplantes ectópicos, são aqueles que são realizados em sítios diferentes no qual o tumor seria normalmente encontrado em condições fisiológicas normais, sua vantagem é permitir que a cascata metastática possa ser modelada. Já estudos ortotópicos, em que os transplantes são realizados na mesma região que, fisiologicamente, o tumor seria encontrado, têm a capacidade

de melhor representar cânceres humanos pois permitem interações com o tecido de origem (FRANCIA et al., 2011; KELLAR et al., 2015). A grande limitação dos estudos com transplantes ortópicos é a implantação das células no local a partir do qual o tumor original foi derivado, porém tem sido realizado com sucesso em vários tipos de tumores incluindo mama, pâncreas, pulmão e cólon (FIDLER, 1973; BERTRAM e JANIK, 1980; ASLAKSON e MILLER, 1992; KUPERWASSER et al., 2005; DERKSEN et al., 2006; MUNOZ et al., 2006; CÉSPEDES et al., 2007; CRUZ-MUNOZ et al., 2008; DEROSE et al., 2011; BANKERT et al., 2011; JULIEN et al., 2012; PUIG et al., 2013; DOORNEBAL et al., 2013; COFFELT et al., 2015; EYRE et al., 2016; HIROSHIMA et al., 2016).

Dentro dos modelos de metástase espontânea, destacam-se os estudos com aloenxertos. Estes são gerados pelo transplante de células tumorais derivadas de camundongos e tumores em camundongos, essa técnica evita reações enxerto versus hospedeiro e permite a investigação do sistema imune durante a progressão do câncer e a identificação de novas oportunidades terapêuticas (SERRELS et al., 2015). O primeiro modelo desta técnica foi realizado por Fidler (1973) e forneceu a primeira demonstração de que o potencial metastático das células tumorais poderia ser aumentado através da seleção *in vivo*, este experimento foi realizado com células B16 em cepas C57BL/6 de camundongos de laboratório.

Há muitos estudos relacionados às atividades *in vitro* e *in vivo*, do DBM e seus derivados no combate ao câncer. Porém, a biodisponibilidade oral desses compostos permanece uma barreira a ser superada. O presente capítulo teve por objetivos realizar testes *in vivo* para avaliar a eficácia do DAP.

2. Metodologia

2.1. Teste *in vivo*

Para realização dos ensaios *in vivo*, foram escolhidos camundongos machos da linhagem C57BL/6, com 7-8 semanas de idade pesando em média 20 ± 5 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Estes foram mantidos em biotério ventilado, no 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, AlescoR, de 24 x 37 x 19 cm, forradas com maravalha estéril, em ambiente com condições controladas (22 ± 2 °C, $60\pm 5\%$ umidade), com ciclo claro/escuro de 12 horas, separados por grupos. Foi fornecida 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 65/2015. Os animais foram mantidos por 10 dias antes do início do experimento para ambientação. Após este período, os animais foram separados em 9 grupos de acordo com o peso. O peso dos animais foi avaliado ao início confirmando peso apropriado para a indução e ao final do experimento para o protocolo da eutanásia.

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, 10^6 células da linhagem B16F10 foram inoculadas subcutaneamente no flanco dos camundongos C57BL/6 machos (HAMANO et al., 2003; ZEISBERG et al., 2007). Após 5 dias, os animais começaram a receber o tratamento tópico, sempre no mesmo horário, 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, rins e linfonodo sentinela, além da retirada das amostras de sangue por punção cardíaca.

2.2. Tratamento

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando como veículo para o composto ativo duas formulações. A primeira transdérmica PENTRAVAN®, 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

nove grupos no total, com 6 animais cada, conforme descrição abaixo (n = número de animais por grupo), totalizando 54 animais.

Os animais receberam o tratamento tópico por 21 dias, começando cinco dias após a indução do tumor, de acordo com os grupos listados abaixo:

Grupo 1: Controle sem a inoculação de células (n=6)

Grupo 2: Gel transdérmico sem composto ativo (n=6)

Grupo 3: Pomada sem composto ativo (n=6)

Grupo 4: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g (n=6)

Grupo 5: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g (n=6)

Grupo 6: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g (n=6)

Grupo 7: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g (n=6)

Grupo 8: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g (n=6)

Grupo 9: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g (n=6)

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 da formulação foram de 0,50 mg/g, 1,00 mg/g e 2,00 mg/g. A dose utilizada para cada aplicação foi de 80 mg. Considerando cada concentração, as doses individuais de cada aplicação foram de 40 µg, 80 µg, e 160 µg do composto, respectivamente. Assim, com a média de peso de 20 gramas por camundongo, a dosagem variou de 2 a 8 mg/Kg peso corporal.

2.3. 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 (UFV), 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 embocamento. Foram obtidos cortes de 4 μm em micrótomo rotativo (Reichert-Jung 2045 Multicut®, Germany). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina.

2.4. Avaliação de parâmetros sanguíneos

As análises sanguíneas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas da Divisão de Saúde/UFV. Após um jejum prévio de 8 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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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 preparadas 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 $50\text{ }\mu\text{L}$ do tampão de incubação em todos os poços, exceto os poços que foram selecionados para branco. Em seguida foi adicionado $100\text{ }\mu\text{L}$ dos padrões diluídos nos poços selecionados. Nos poços da amostra e dos controles foi adicionado $50\text{ }\mu\text{L}$ de tampão diluidor seguido de $50\text{ }\mu\text{L}$ da amostra. Os poços que foram usados como branco permaneceram vazios. As placas foram fechadas e incubadas por 2 horas. Logo após, a solução foi completamente aspirada e os poços lavados 4 vezes com solução de lavagem. Posteriormente,

foi adicionado 100 µL de solução de conjugado de biotina Hu-VEGF em cada poço, exceto nos poços selecionados para branco, 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. Decorrido o período de incubação, 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.

2.5. Estresse Oxidativo

Foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes e concentração dos metabólitos da ação de espécies oxidantes no 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.

A concentração da proteína total dos homogenatos foi determinada segundo a metodologia de Lowry et al. (1951), utilizando-se albumina de soro bovino como padrão.

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 O_2^- em peróxido de hidrogênio e, assim, diminuir a razão de auto-oxidação do pirogallol (DIETERICH et al., 2000, modificado). A atividade da SOD foi expressa em U SOD/mg proteína.

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), mantido 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 e AUST,1978). A concentração do MDA foi determinada com auxílio de uma regressão linear com concentrações padrões de TMPO e expressa em nmol/mg proteína.

2.6. 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.

A análise histológica foi realizada de forma descritiva 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 n° 90 (Brasil 2004). Todas as lâminas foram avaliadas por um mesmo patologista, que recebeu as amostras apenas numeradas.

3. Resultados

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando como veículo para o composto ativo duas formulações uma transdérmica e outra pomada. Foi realizado um tratamento tópico nos animais (Figuras 1-3) em intervalos de 24 horas por 21 dias - no mesmo local onde foi induzido o tumor (região tricotomizada) - começando 5 dias após a indução do tumor, de acordo com os grupos listados

nas metodologias. Após o período de tratamento, os animais foram eutanasiados e as amostras de fígado, rim, pulmão, linfonodo sentinela e o tumor foram removidos.



Figura 1 – Detalhe da região tricotomizada



Figura 2 – Detalhes do aparecimento de manchas escuras na região tricotomizada, após o 5º dia de indução tumoral.

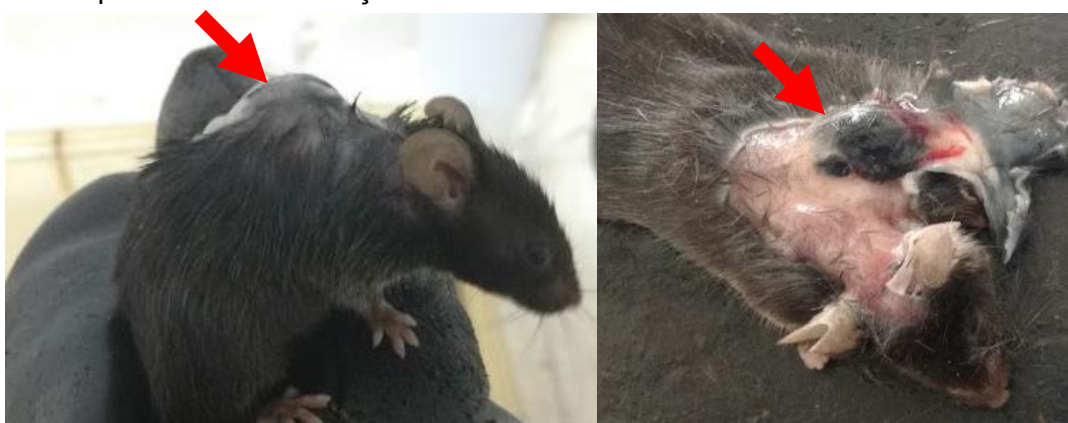


Figura 3 – Foto retirada do mesmo animal no dia da eutanásia, tumor marcado com a seta vermelha.

Os dados biométricos dos animais, como massa média dos grupos, massa média dos fígados e massa média dos tumores, foi aferido estão presentes nas figuras 4, 5 e 6. Todos os grupos tratados não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos quanto aos parâmetros biométricos escolhidos (Figuras 4-6). O composto não demonstrou capacidade de reduzir o volume total do tumor.

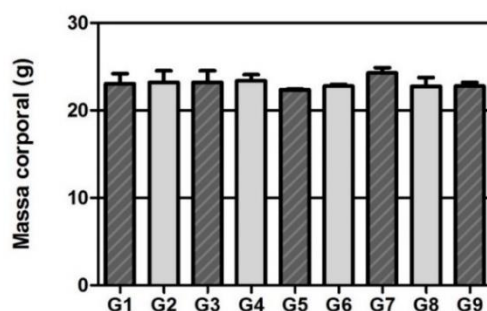


Figura 4 – Massa média corporal. **G1**: Controle sem a inoculação de células; **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

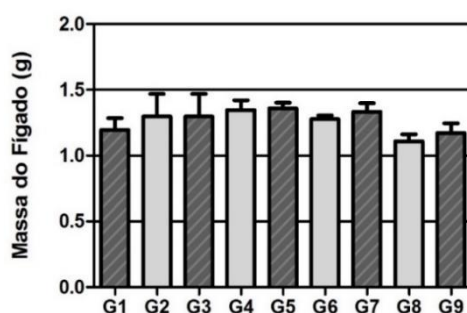


Figura 5 – Massa média dos fígados. **G1**: Controle sem a inoculação de células; **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

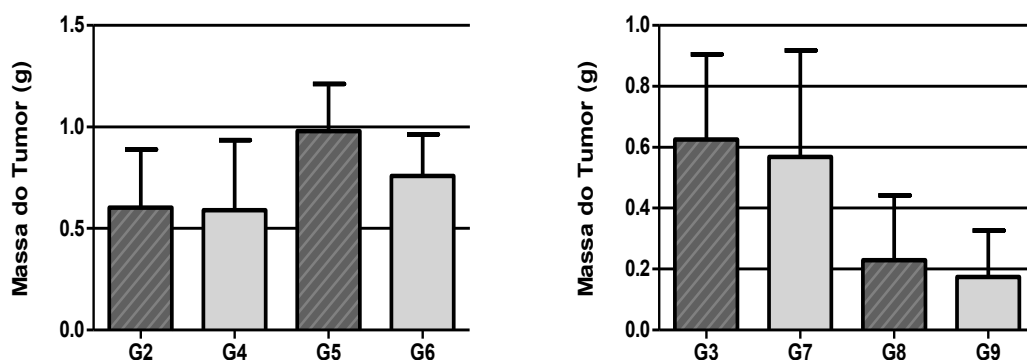


Figura 6 – Massa média dos tumores. **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

3.1. 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. Não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos, porém, o presente estudo realizou a investigação histopatológica, afim de aumentar a possibilidade de detectar algum foco de metástase nos linfonodos. Após fixação e inclusão em parafina, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. A análise foi realizada por meio da microscopia de luz, por um mesmo patologista de forma qualitativa. 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 de células neoplásicas do melanoma.

Na análise histopatológica não foi observada nenhuma alteração que comprometesse a integridade tecidual dos órgãos extirpados. No fígado, os hepatócitos se apresentaram íntegros e sem sinal de degenerações no parênquima. E nos rins, estruturas como Cápsula de Bowman (tecido epitelial de revestimento pavimentoso simples), corpúsculo glomerular, espaço de Bowman, túbulos contorcidos proximais e distais, se apresentaram todos preservados. O fígado e os rins, em geral, são os órgãos mais afetados em casos de toxicidade de fármacos. As análises histopatológicas presentes neste estudo demonstraram que estes órgãos não apresentaram alterações causadas pelo tratamento. Trabalhos realizados com outros derivados de DBM obtiveram o mesmo resultado (FRANÇA, 2013; OLIVEIRA, 2017). Os linfonodos dos animais dos grupos G2, G3, e em alguns animais dos grupos G4 e G5 apresentaram invasão discreta do melanoma, nestes tecidos. O critério usado para avaliar a invasão foi qualitativo nas seguintes características: discreta, moderada e intensa, onde a intensa representa uma invasão total do linfonodo (Figuras 7 e 8). Estes resultados demonstram que o tratamento com o composto pode ter capacidade de diminuir a capacidade de metástase nos animais dos grupos tratados.

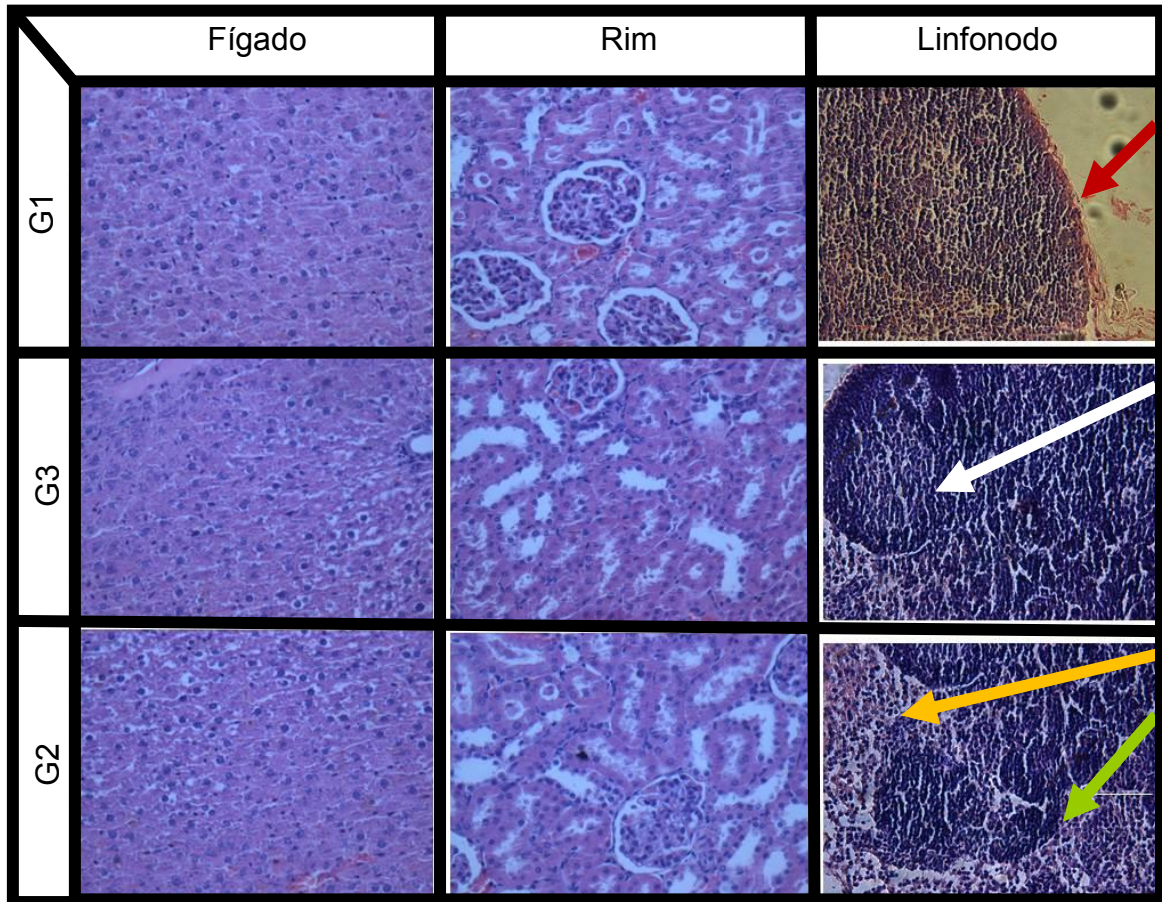


Figura 7 – Histologia dos grupos **G1** (Controle sem a inoculação de células), **G2** (Gel transdérmico sem composto ativo); **G3** (Pomada sem composto ativo). A seta vermelha demarca a cápsula do linfonodo; a seta branca os folículos linfoides; a seta laranja a região medular e seta verde a região cortical.

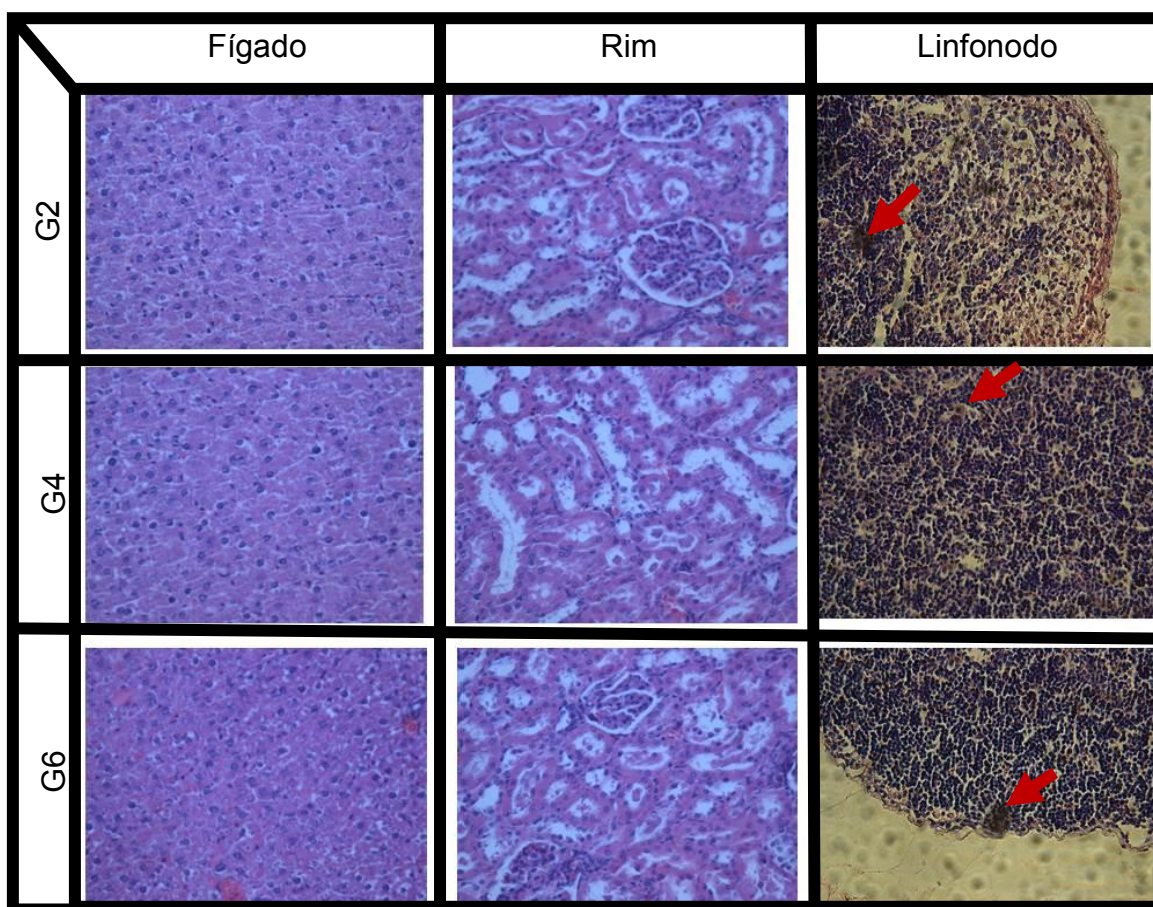


Figura 8 – Histologia dos grupos **G2** (Gel transdérmico sem composto ativo); **G4** (Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g); **G5** (Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g). A seta vermelha destaca invasões discretas por células de melanoma.

3.2. Avaliação de parâmetros sanguíneos

As análises sanguíneas foram realizadas com o soro sanguíneo e foram avaliados os seguintes parâmetros bioquímicos: Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST), Ácido Úrico, Creatinina e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

A dosagem sérica das enzimas transaminases (AST e ALT) (Figura 9) e a análise da creatinina sérica (Figura 10) não apresentaram alterações significativas em todos os tratamentos com os diferentes veículos.

As enzimas AST e ALT podem funcionar como marcadores de dano hepatocelular o não aumento das concentrações dessas proteínas em relação ao controle indicam a ausência atividade hepatotóxica (BERTOLAMI, 2005).

Já a creatinina, é um metabólito derivado da creatina fosfato muscular, este metabólito é formado e excretado em quantidades constantes, caso houvesse alguma alteração na dosagem deste parâmetro bioquímico entre os grupos tratados e não tratados poderia sugerir que o medicamento gera alterações nos rins, podendo causar uma nefrontoxicidade (WALLACH et al, 2013).

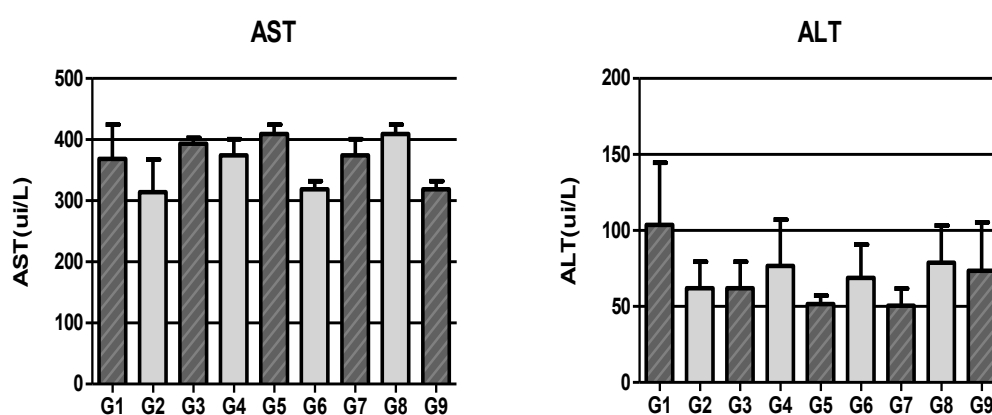


Figura 9 – Dosagem de Alanina Amino Transferase (ALT), Aspartato Amino Transferase (AST). **G1**: Controle sem a inoculação de células; **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

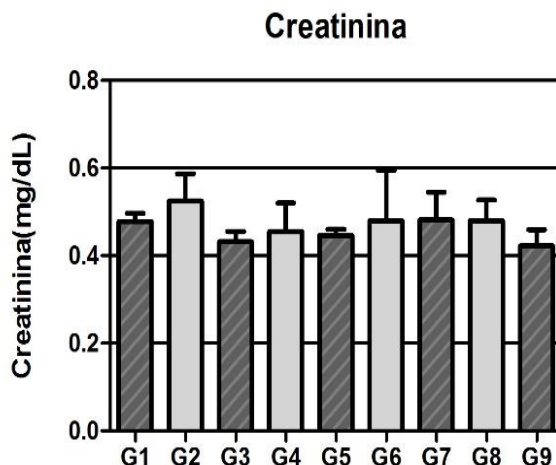


Figura 10 – Dosagem de Creatinina. **G1**: Controle sem a inoculação de células; **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

Pela análise sérica do ácido úrico (Figura 11) verifica-se que não há diferença entre o animal com e sem indução de melanoma. Porém, ambos os tratamentos apresentaram diferenças significativas quando comparados aos controles. No veículo pomada (Figura 11, esquerda) os tratamentos, com as crescentes concentrações de DAP, aparentam uma relação inversa na concentração de ácido úrico. No tratamento com o veículo transdérmico as diferentes concentrações não causaram alterações na concentração de ácido úrico. Altos níveis de ácido úrico e o risco de desenvolver alguns tipos de câncer (colorretal; hepatobiliar; pele não melanoma entre outros) estão associados (YIU et al., 2017). Somado a isso existe uma associação entre os níveis de ácido úrico e o índice de mortalidade em pacientes oncológicos. Uma redução do ácido úrico pode melhorar o microambiente celular e contribuíram para reduzir a metástase, alguns trabalhos relatam que pacientes com altos níveis de ácido úrico apresentam maior propensão a formação de metástases em câncer de pulmão conferindo uma menor sobrevida ao paciente (FINI et al., 2012).

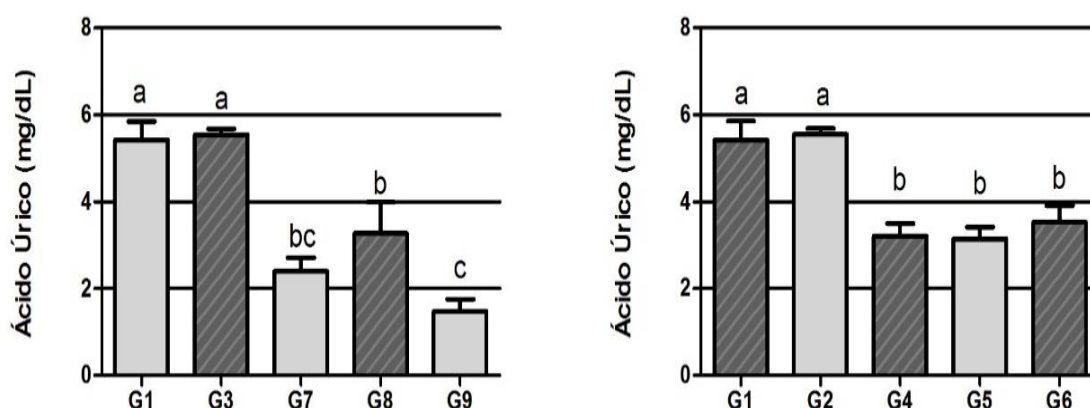


Figura 11 – Dosagem de Ácido úrico. Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. **G1**: Controle sem a inoculação de células; **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

A angiogênese e progressão do melanoma estão relacionados intimamente, pois é através da formação de uma rede de novos vasos que a metástase é disseminada. Durante a fase de progressão vertical, o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um dos fatores de crescimento que promovem o evento de angiogênese para o desenvolvimento do tumor (JOUR et al., 2016). Normalmente, tumores muito vascularizados são mais profundos e possuem alta capacidade de metástase (AUNG et al., 2015). Segundo a diretriz de 2017 da Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica (SBOC), a classificação do melanoma leva em consideração os seguintes parâmetros clínicos: espessura/profundidade do tumor; análise de linfonodos; análise de metástase em outros sítios anatômicos. Esta classificação auxilia na seleção da melhor opção terapêutica para cada tipo de melanoma.

Os níveis sorológicos do VEGF foram determinados para avaliar a capacidade de angiogênese dos tumores (Figura 12). Como esperado o valor de VEGF nos animais não tratados e com indução do tumor foi elevado. No tratamento com o veículo transdérmico o composto foi capaz de reduzir os níveis

de VEGF de modo que ficou semelhante ao controle sem a indução do tumor. Já para os tratamentos com a pomada o grupo G8 apresentou um valor de VEGF estatisticamente igual ao controle com indução de tumor, porém para todos os outros grupos há a redução dos níveis de VEGF, possivelmente este fato está associado ao fato de os animais se lambem após a aplicação da pomada, mesmo após todas as precauções serem tomadas, reduzindo a dose efetiva no local. Estes resultados levam a crer que o composto apresenta capacidade de provocar a morte de células tumorais ou impedir sua multiplicação e dificulta a formação de metástase quando nos dois veículos usados. A pomada possui baixa penetrabilidade na derme, ficando restrita nas camadas superficiais, atua como agente emoliente e possui efeito oclusivo (ALLEN et al., 2013). Portanto, apesar da vascularização ainda poder existir no tumor, o mesmo foi incapacitado de desenvolver metástase no veículo pomada. Já para o veículo gel transdérmico, a redução dos valores sanguíneos de VEGF dificultou a formação de novos vasos sanguíneos contribuindo assim para a pouca invasão da capsula do linfonodo. Assim, o veículo transdérmico parece ser capaz de reduzir 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). Entretanto, o mecanismo transdérmico não foi suficiente para impedir a metástase completa quando comparamos com o veículo pomada.

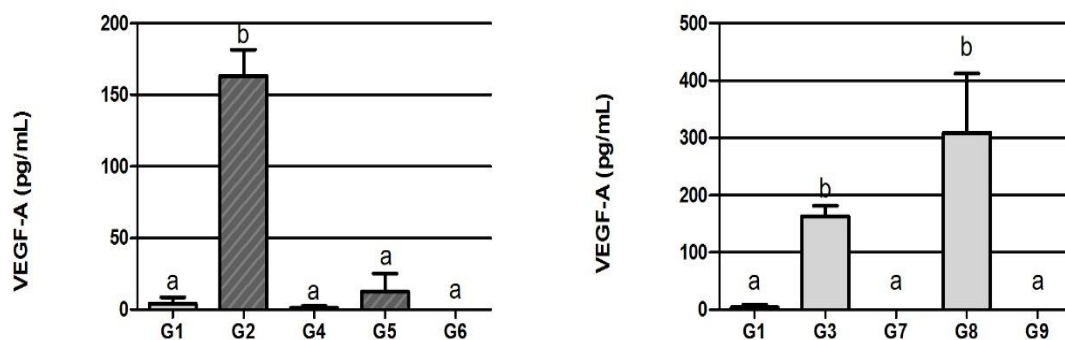


Figura 12 – Dosagem de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Letras diferentes representam valores estatisticamente diferentes. **G1**: Controle sem a inoculação de células; **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

3.3. Avaliação do estresse oxidativos no fígado

Uma forma de os medicamentos causarem hepatotoxicidade ocorre quando, estes inativam ou se ligam a enzimas respiratórias ou ainda se ligam ao DNA mitocondrial desregulando assim a oxidação dos ácidos graxos e a produção de energia celular, resultando em um estresse oxidativo com aparecimento de metabolismo anaeróbico, acidose láctica e acúmulo de triglicérides nas células (esteatohepatite) (JAESCHKE et al., 2002; LEE, 2003).

Para avaliar se ocorreram alterações metabólicas no fígado dos animais, foram determinadas as atividades de enzimas antioxidantes e concentração dos metabólitos da ação de espécies oxidantes neste órgão dos animais (Figura 13). Como pode ser observado na figura 13, não houve diferenças estatísticas entre os grupos tratados e os grupos controle nos parâmetros escolhidos para avaliar o estresse oxidativo. Estes resultados aliados aos dados histológicos e

biométricos indicam que o composto DAP não apresenta hepatotoxicidade nos animais tratados.

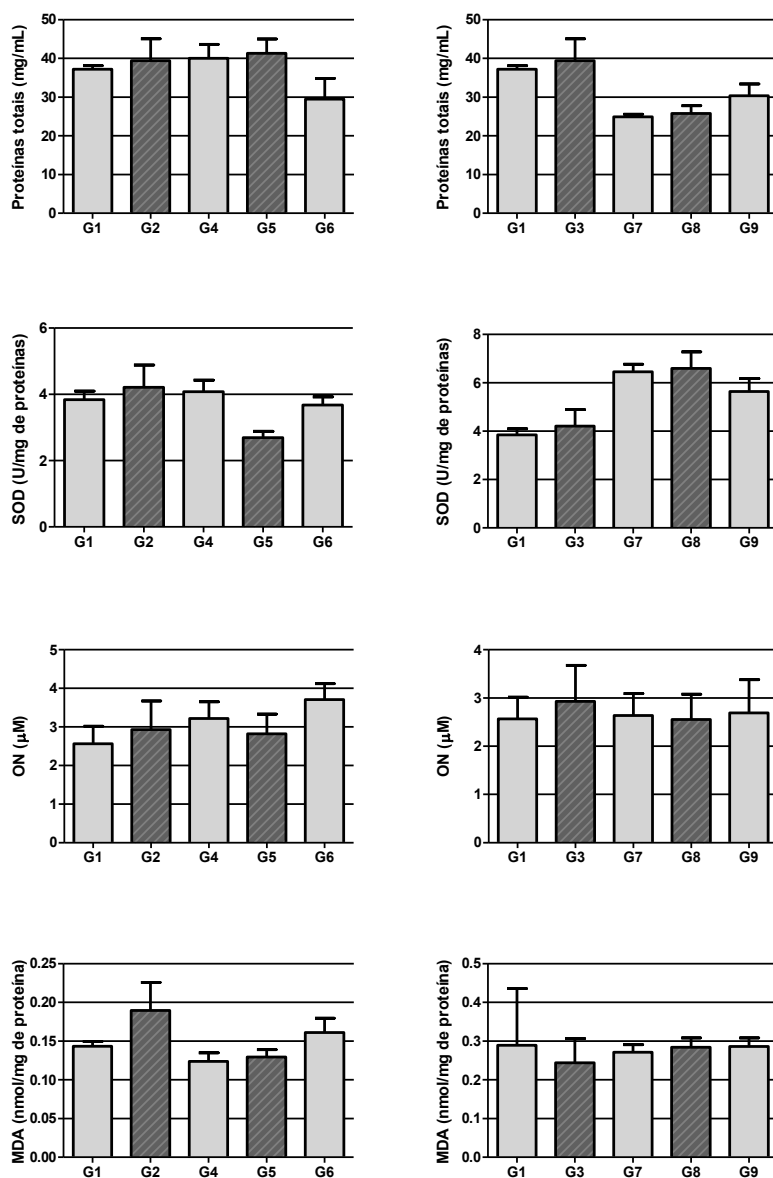


Figura 13 – Parâmetros de estresse oxidativos: proteínas totais, Superóxido dismutase (SOD), Óxido Nítrico (ON), Malondialdeído (MDA). **G1**: Controle sem a inoculação de células; **G2**: Gel transdérmico sem composto ativo; **G3**: Pomada sem composto ativo; **G4**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G5**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G6**: Gel transdérmico com composto ativo – concentração 2,00 mg/g; **G7**: Pomada com composto ativo – concentração 0,50 mg/g; **G8**: Pomada com composto ativo – concentração 1,00 mg/g; **G9**: Pomada com composto ativo – concentração 2,00 mg/g.

4. Conclusão

De maneira geral os dois tipos de tratamentos com os veículos gel transdérmico e pomada apresentaram resultados positivos quanto a ação antimelanoma, apesar de o volume do tumor não ter sido reduzido. Em todas as concentrações testadas não ocorreu ação tóxica observável no fígado e nos rins. Não se observou também alterações no metabolismo e produção de espécies reativas de oxigênio (ou seja, não se observou estresse oxidativos). O veículo pomada se demonstrou melhor em impedir a metástase do que o veículo transdérmico.

5. Referências Bibliográficas

- ALLEN JR, Loyd V.; POPOVICH, Nicholas G.; ANSEL, Howard C. **Formas Farmacêuticas e Sistemas de Liberação de Fármacos-9**. Artmed Editora, 2013.
- ASLAKSON, Cheryl J.; MILLER, Fred R. Selective events in the metastatic process defined by analysis of the sequential dissemination of subpopulations of a mouse mammary tumor. **Cancer research**, v. 52, n. 6, p. 1399-1405, 1992.
- AUNG, Phyu Phyu et al. Microvessel density, lymphovascular density, and lymphovascular invasion in primary cutaneous melanoma—correlation with histopathologic prognosticators and BRAF status. **Human pathology**, v. 46, n. 2, p. 304-312, 2015.
- BANKERT, Richard B. et al. Humanized mouse model of ovarian cancer recapitulates patient solid tumor progression, ascites formation, and metastasis. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24420, 2011.
- BERTOLAMI, Marcelo Chiara. Mechanisms of hepatotoxicity. **Arquivos brasileiros de cardiologia**, v. 85, p. 25-27, 2005.
- BERTRAM, John S.; JANIK, Przemyslaw. Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. **Cancer letters**, v. 11, n. 1, p. 63-73, 1980.
- CÉSPEDES, María Virtudes et al. Orthotopic microinjection of human colon cancer cells in nude mice induces tumor foci in all clinically relevant metastatic sites. **The American journal of pathology**, v. 170, n. 3, p. 1077-1085, 2007.
- CHIANG, Serena PH; CABRERA, Ramon M.; SEGALL, Jeffrey E. Tumor Cell Intravasation. A Review in the Theme: Cell and Molecular Processes in Cancer Metastasis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, 2016.
- COFFELT, Seth B. et al. IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and neutrophils conspire to promote breast cancer metastasis. **Nature**, v. 522, n. 7556, p. 345, 2015.
- COTRAN, R. S., KUMAR, V., COLLINS, T. Neoplasia. In: **Robbins- Pathologic Basis of Disease** Philadelphia, W.B. Saunders Company, 2004.
- CRUZ-MUNOZ, William et al. Development of a preclinical model of spontaneous human melanoma central nervous system metastasis. **Cancer research**, v. 68, n. 12, p. 4500-4505, 2008.

- DE OLIVEIRA, Marcos Rodrigo. **Avaliação da atividade antimelanoma de formulação transdérmica de um derivado sintético de dibenzoilmetano**. Tese de Doutorado. Universidade Federal de Viçosa.
- DERKSEN, Patrick WB et al. Somatic inactivation of E-cadherin and p53 in mice leads to metastatic lobular mammary carcinoma through induction of anoikis resistance and angiogenesis. **Cancer cell**, v. 10, n. 5, p. 437-449, 2006.
- DEROSE, Yoko S. et al. Tumor grafts derived from women with breast cancer authentically reflect tumor pathology, growth, metastasis and disease outcomes. **Nature medicine**, v. 17, n. 11, p. 1514, 2011.
- DOORNEBAL, Chris W. et al. A preclinical mouse model of invasive lobular breast cancer metastasis. **Cancer research**, v. 73, n. 1, p. 353-363, 2013.
- EYRE, Rachel et al. Patient-derived mammosphere and xenograft tumour initiation correlates with progression to metastasis. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 21, n. 3-4, p. 99-109, 2016.
- FIDLER, I. J. Selection of successive tumour lines for metastasis. **Nature New Biology**, v. 242, n. 118, p. 148-149, 1973.
- FINI, Mehdi A. et al. Contribution of uric acid to cancer risk, recurrence, and mortality. **Clinical and translational medicine**, v. 1, n. 1, p. 16, 2012.
- 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.
- FRANCIA, Giulio et al. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 135, 2011.
- FRIEDL, Peter; ALEXANDER, Stephanie. Cancer invasion and the microenvironment: plasticity and reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992-1009, 2011.
- GAY, Laurie J.; FELDING-HABERMANN, Brunhilde. Contribution of platelets to tumour metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 2, p. 123, 2011.
- GÓMEZ-CUADRADO, Laura et al. Mouse models of metastasis: progress and prospects. **Disease models & mechanisms**, v. 10, n. 9, p. 1061-1074, 2017.
- HAMANO, Y. et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. **Cancer Cell**, 3: 589 - 601, 2003.
- HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.
- HIROSHIMA, Yukihiro et al. Patient-derived mouse models of cancer need to be orthotopic in order to evaluate targeted anti-metastatic therapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 44, p. 71696, 2016.
- JAESCHKE, Hartmut et al. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicological sciences**, v. 65, n. 2, p. 166-176, 2002.
- JOUR, George; IVAN, Doina; AUNG, Phyu P. Angiogenesis in melanoma: an update with a focus on current targeted therapies. **Journal of clinical pathology**, v. 69, n. 6, p. 472-483, 2016.
- JULIEN, Sylvia et al. Characterization of a large panel of patient-derived tumor xenografts representing the clinical heterogeneity of human colorectal cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 19, p. 5314-5328, 2012.
- KAKUMANU, S. et al. A nanoemulsion formulation of dacarbazine reduces tumor size in a xenograft mouse epidermoid carcinoma model compared to dacarbazine suspension. **Nanomed.**, 7: 277 - 83, 2011.

- KELLAR, Amelia; EGAN, Cay; MORRIS, Don. Preclinical murine models for lung cancer: clinical trial applications. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- KUPERWASSER, Charlotte et al. A mouse model of human breast cancer metastasis to human bone. **Cancer research**, v. 65, n. 14, p. 6130-6138, 2005.
- LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging biological principles of metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670-691, 2017.
- LEE, William M. Drug-induced hepatotoxicity. **New England journal of medicine**, v. 349, n. 5, p. 474-485, 2003.
- LIU, Yang; CAO, Xuetao. Characteristics and significance of the pre-metastatic niche. **Cancer cell**, v. 30, n. 5, p. 668-681, 2016.
- LOWRY, Oliver H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **Journal of biological chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MASSAGUÉ, Joan; OBENAUF, Anna C. Metastatic colonization by circulating tumour cells. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 298, 2016.
- MCALLISTER, Sandra S.; WEINBERG, Robert A. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. **Nature cell biology**, v. 16, n. 8, p. 717, 2014.
- MCGEE, J. O. D., ISAACSON, P. G., WRIGHT, N. A. Neoplasia. In: **Oxford Textbook of Pathology**. Oxford. Oxford University Press., 569-718, 1992.
- MUNOZ, Raquel et al. Highly efficacious nontoxic preclinical treatment for advanced metastatic breast cancer using combination oral UFT-cyclophosphamide metronomic chemotherapy. **Cancer research**, v. 66, n. 7, p. 3386-3391, 2006.
- PEINADO, Héctor et al. Pre-metastatic niches: organ-specific homes for metastases. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 5, p. 302, 2017.
- PUIG, Isabel et al. A personalized preclinical model to evaluate the metastatic potential of patient-derived colon cancer initiating cells. **Clinical Cancer Research**, v. 19, n. 24, p. 6787-6801, 2013.
- RES/ANVISA n° 90. Brasil, 2004
- REYMOND, Nicolas; D'AGUA, Barbara Borda; RIDLEY, Anne J. Crossing the endothelial barrier during metastasis. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 12, p. 858, 2013.
- SERRELS, Alan et al. Nuclear FAK controls chemokine transcription, Tregs, and evasion of anti-tumor immunity. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 160-173, 2015.
- SETHI, Nilay; KANG, Yibin. Unravelling the complexity of metastasis—molecular understanding and targeted therapies. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 10, p. 735, 2011.
- SHAIN, A. Hunter; BASTIAN, Boris C. From melanocytes to melanomas. **nature reviews Cancer**, v. 16, n. 6, p. 345, 2016.
- STEEG, Patricia S. Targeting metastasis. **Nature reviews cancer**, v. 16, n. 4, p. 201, 2016.
- TAGNE, J., KAKUMANU, S., NICOLOSI, R. J. Nanoemulsion Preparations of the Anticancer Drug Dacarbazine Significantly Increase Its Efficacy in a Xenograft Mouse Melanoma Model. **Mol. Pharmac.**, 5: 1055 - 1063, 2008.
- TURAJLIC, Samra; SWANTON, Charles. Metastasis as an evolutionary process. **Science**, v. 352, n. 6282, p. 169-175, 2016.
- VALASTYAN, Scott; WEINBERG, Robert A. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. **Cell**, v. 147, n. 2, p. 275-292, 2011.
- WALLACH, J. B. et al. Wallach interpretação de exames laboratoriais. 2013.

- WILLIS, R. A. **The spread of tumors in the human body**. Butterworth e Co. Londres, 1952.
- WONG, Sunny Y.; HYNES, Richard O. Lymphatic or hematogenous dissemination: how does a metastatic tumor cell decide?. **Cell cycle**, v. 5, n. 8, p. 812-817, 2006.
- YIU, Andrew et al. Circulating uric acid levels and subsequent development of cancer in 493,281 individuals: findings from the AMORIS Study. **Oncotarget**, v. 8, n. 26, p. 42332, 2017.
- ZEISBERG, E. M. et al. Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. **Cancer Res.**, 67: 10123 - 10128, 2007.

CONCLUSÃO GERAL

Antes de partir para a conclusão geral, vale lembrar que o objetivo desta tese é avaliar a ação do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona em ensaios *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. A avaliação da ação *in vitro* e *in vivo* dos outros compostos que foram sintetizados no capítulo 2 está presente nas teses de doutorados de França (2013), Nascimento (2018) e de Oliveira (2017), bem como no artigo de Nascimento e colaboradores de 2018.

A síntese e caracterização do composto 2-alil-1,3-difenil-1,3-propanodiona (DAP) foi realizada com sucesso. O composto DAP apresentou IC₅₀ frente a células tumorais (IC_{50B16F10} = 26,17±1,11 µg/mL; IC_{50Tm5} = 44,40±6,88 µg/mL) menores que o medicamento Dacarbazina (IC_{50B16F10} = 258,51±44,09 µg/mL), ou seja, o composto se mostrou mais eficiente que a Dacarbazina nas condições testadas. Os índices de seletividade do composto (IS_{B16F10} = 7,917; IS_{Tm5} = 4,667) foram superiores ao valor mínimo para ser considerado significativo (IS = 2,0) em ensaios de novas drogas. A citometria de fluxo e os ensaios moleculares indicaram que o composto causa a apoptose celular atuando em receptores Fas e nas vias relacionadas com as caspases 3, 8 e 9, estimulando os promotores de apoptose Apaf1, Bax, Bid, Fasl, Pidd1 e Puma e inibindo a expressão relativa de Bcl2, um inibidor de apoptose, além de interferir no ciclo celular através da modulação da expressão dos genes p21 e CDK1.

Os ensaios ADMET, *in silico*, para o DAP, demonstraram que ele apresenta alta absorção intestinal e tem uma boa distribuição, porém ele tem baixa solubilidade em água e é substrato para as principais proteínas do metabolismo (CYP) e de resistência (P-gp) a drogas, não apresentou capacidade carcinogênica mas apresentou a capacidade de ser hepatotóxico.

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados dois veículos de entrega do composto DAP (formulação com pomada e com gel transdérmico). A concentração aplicada nos animais foi determinada com base nos resultados do ensaio ADMET. Foram coletados e analisados sangue, fígado, rim e linfonodo. Afim de determinar se o composto apresenta ação hepatotóxica como predito *in silico*, foram realizadas avaliação histopatológica do tecido, avaliação de marcadores de dano celular (ALT e AST), além de marcadores de estresse oxidativos e foi observado que o composto não apresentou hepatotoxicidade. O

DAP também não alterou as características histológicas ou bioquímicas (creatinina) dos rins. As análises histológicas do linfonodo revelaram que o composto pode ser capaz de reduzir a migração de células tumorais para este tecido. O composto apresentou também a capacidade de reduzir os níveis de VEGF, um dos principais fatores responsáveis pela angiogênese e consequentemente a metástase de tumores.

Finalmente, de acordo com os dados observados para o composto DAP podemos concluir que o mesmo apresenta atividade antitumoral para o câncer do tipo melanoma. Este trabalho foi uma contribuição para um estudo mais amplo onde será avaliada mais detalhadamente a toxicidade e a farmacocinética deste composto, uma vez que este apresenta um bom potencial para futura utilização na clínica médica.

ANEXOS

Lista de Genes Alvos

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
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 a sua sequência 3' UTR. Camundongos knockout homozigotos para este gene apresentam letalidade embrionária. Numerosos pseudogenes deste gene foram identificados no genoma do rato [fornecido por RefSeq, setembro de 2015].	PATRINOSTRO et al. (2018); PERRIN e ERVASTI (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 et al. (1998); HARA et al. (2002).

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
BCL2-associated X protein	Bax	<p>A proteína codificada por este gene pertence a 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 a perda do potencial de membrana e a liberação do citocromo c. A expressão deste gene regulada pelo supressor tumoral P53 e demonstrou estar envolvida na apoptose mediada por P53. [Fornecido por RefSeq, julho de 2008]</p>	<p>OLTVAL et al. (1993); LOTEM e SACHS(1995)</p>

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
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 et al. (1993); LOTEM e SACHS (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 et al. (1996); FOOTZ et al. (1998); NEITEMEIER et al. (2017)

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
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 (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]	MALUMBRES et al. (2009); LINDQVIST et al. (2009); AOKI et al. (1992)
Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	FasL	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 et al. (1994); STUART et al. (1997)

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
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 este locus são encontrados em todo o genoma do rato. [Fornecido por RefSeq, janeiro de 2014].	RAJE et al. (2007)

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
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 et al. (2010)

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
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 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]	TELLIEZ et al. (2000); BOCK et al. (2012)
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 et al. (2010); HAN et al. (2001); NAKANO e VOUSDEN (2001)

Nome	Símbolo	Função	Referências Bibliográficas
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 et al. (2014); FRYE (1999)
Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	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 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]	FRENCH e TSCHOPP (1999); PITTI et al. (1996); WILEY et al. (1995)
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 et al. (1983); LEE et al. (1984); LOHMANN et al. (2013)

Patentes



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



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 6



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

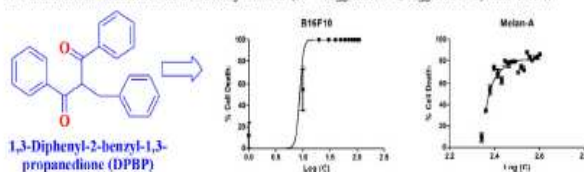
^e Department of Chemistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais 31270-901, Brazil

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), marisaguerra@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.

Certificado CEUA**CERTIFICADO**

A Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/UFV certifica que o processo nº 65/2015, intitulado “Avaliação da atividade antimelanoma *in vitro* e *in vivo* de um derivado de dibenzoilmetano 2”, 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 01/03/2016, com validade de 12 meses.

CERTIFICATE

The Ethic Committee in Animal Use/UFV certify that the process number 65/2015, named “Evaluation of antimelanoma activity *in vitro* and *in vivo* of a dibenzoylmethane derivative 2”, 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 March 01, 2016 valid for 12 months.


Prof. Atima Clemente Alves Zuanon

Presidente

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFV