



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

Nabyla Paixão Pereira

Análise *in vitro* da atividade antitumoral de derivados de segunda geração
da 3,4-dihidropirimidinona (DHPM's)

Brasília
2018

Nabyla Paixão Pereira

Análise *in vitro* da atividade antitumoral de derivados de segunda geração
da 3,4-dihidropirimidinona (DHPM's)

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Co-orientador: Prof. Dr. Brenno Amaro da Silveira Neto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Brasília

2018

Nabyla Paixão Pereira

Análise *in vitro* da atividade antitumoral de derivados de segunda geração
da 3,4-dihidropirimidinona (DHPM's)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, da Faculdade de Medicina, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Patologia Molecular.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Bruna Cândido Guido (Membro Titular)

Leo Kei Iwai (Membro Titular)

Vicente de Paulo Martins (Membro Suplente)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha mãe Mônica, minha fonte de inspiração, meu maior apoio e maior incentivo. Sem você eu não teria chegado até aqui. Sou muito grata e orgulhosa da mãe maravilha que eu tenho.

Agradeço aos meus irmãos, Brummel e André, por todos os momentos de alegria e distração compartilhados. Pelo apoio nos momentos de sufoco e por sempre estarem presentes na torcida por mim. Também, à minha tia querida, à Lulu e ao tio Luiz.

Em memória, ao meu pai, em quem me espelho no otimismo, garra e força de vontade. Espero que um dia eu possa contribuir para diminuir o sofrimento daqueles que passam pela difícil batalha contra o câncer.

Agradeço ao meu pingo, companheiro de vida social e acadêmica. Que me incentiva a seguir em frente, que me inspira por sua dedicação ao trabalho, que chegou de fininho e fez da minha vida muito mais leve. Responsável pelo meu sorriso mais sincero. Muito obrigada por existir na minha vida.

Agradeço ao professor e orientador José Raimundo Correa por ter me recebido de portas abertas, pelos inúmeros ensinamentos, conversas e orientações técnicas e pessoais que levarei para toda vida. Também, pela dedicação, atenção e cordialidade.

Agradeço imensamente à querida florzinha Bruna Guido. Você foi parte essencial nesses dois anos. Pelos ensinamentos, protocolos compartilhados e discussões de resultados. Pelo carinho e atenção, pelos abraços nos momentos de tensão, pela companhia e por sempre me apoiar fazendo que eu acreditasse mais em mim. Meu agradecimento, de coração, por ter tido o prazer de compartilhar momentos com você.

Aos amigos do grupo quimioterapia aplicada, à Dani que me ensinou e abraçou nos primeiros momentos, ao Doug pelas melhores risadas, ao José por todo apoio técnico, à Mirian, Núbia e, em especial à Lorena que foi a primeira a me receber no laboratório, me ensinou a rotina e já embarcou comigo nessa vida na construção de uma amizade sincera e sem exigências. Obrigada, vocês são demais.

Agradeço aos aprendizados compartilhados com as alunas de estágio e iniciação científica, Isabella, Renata, Giovana, Natália, Ana Luísa, Marina e Monique. Agradeço também à Karen pelo suporte nos últimos experimentos. Aprendi muito com vocês.

Aos amigos que cultivei ao longo desse período e que fizeram da rotina de trabalho mais leve e animada, Ingrid, Aninha, Nih, Stefany, Eloísio, Diogo e, em especial, à Barbara Yasmin por sua paciência, suas dicas e orientações.

Aos amigos da vida, em especial à Paulinha pelo infinito apoio e carinho; ao Facó por sempre acreditar em mim, me apoiar e ter sido presente nos momentos mais delicados; ao Luis Miguel/*macboy* que sempre me salvou nos momentos de desesperos tecnológicos; e, ao MJ por compartilhar leituras e fontes de iluminação e incentivo. Também, agradeço à Angela, quem muito fez e faz pelo meu pai e por mim, pela sua dedicação e apoio. Obrigada por me ajudar a superar os momentos de desespero e me apoiar em seus ombros. Vocês são muito importantes para mim, muito obrigada por tudo.

Agradeço aos professores, Sônia Nair Bao, Bergman Ribeiro, Renato Rezende Tatsuya Nagata, Kelly Magalhães, Enrique Argañaraz e seus respectivos alunos pela força no desenvolvimento do meu projeto, por sempre estarem dispostos a ajudar seja emprestando algum material, ensinando a usar algum equipamento ou apenas pelas risadas. Em especial, ao Rafa, Pasqua, Dalila, Gabi, Fernanda e Vanessa.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPQ e FAP-DF e ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular, que fizeram possível a realização desse trabalho.

“O conhecimento é uma aventura em aberto. O que significa que aquilo que sabemos amanhã é algo que desconhecemos hoje; e esse algo pode mudar as verdades de ontem.”

(Karl Popper)

Resumo

O câncer é considerado um dos maiores problemas de saúde pública mundial. Tendo em vista a grande necessidade de desenvolver tratamentos mais eficazes para essa doença, estudamos derivados de segunda geração da 3,4-dihidropirimidina-2(1H)-ona (ou tiona) DHPMs, uma classe de moléculas inibidoras da proteína motora do fuso, cinesina Eg5, que apresenta pronunciada atividade antitumoral contra várias linhagens celulares de câncer. Inicialmente, foi realizada uma triagem *in vitro* para identificar derivados de DHPMs (TZD 06, 07, 08, 09, 14 e 15) com potente efeito citotóxico sobre células de linhagem MCF-7, MDA-MB-231, A2780, T47-D, DU-145, CACO-2, CAPAN-2 e PANC-1 através do ensaio de viabilidade celular do MTT. Os compostos foram avaliados quanto a sua concentração inibitória 50 (IC₅₀) a partir de 72 horas de tratamento nas linhagens que foram sensíveis na menor concentração da triagem, A2780 e MDA-MB-231, e quanto a concentração máxima não citotóxica em células normais HUVEC e fibroblastos. A linhagem que apresentou melhor resultado foi a A2780 e, portanto, a escolhida para seguir com os demais testes com os compostos selecionados TZD 06, TZD 07, TZD 14 e TZD 15. Após receber os tratamentos, a morfologia das células foi analisada em microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura. Os efeitos do tratamento com DHPMs na formação do fuso mitótico foram avaliados através da marcação imunofluorescente da alfa-tubulina analisada por microscopia confocal de varredura a laser. Além disso, a análise do perfil de indução da morte celular, do ciclo celular e da proliferação celular foi realizada por citometria de fluxo para avaliar a influência dos DHPMs selecionados. Foi observada alteração da morfologia das células como redução de pontos de adesão focal, arredondamento da célula, retração do citoplasma e formação de protrusões nas membranas. Após 24 horas de tratamento com a dose máxima não citotóxica, as células A2780 em divisão exibiram o fuso monoastral, o que confirma a atividade dos derivados de DHPM similar a do monastrol. O tratamento com os compostos TZD 06 e TZD 14 por 72 horas induziu a morte celular por apoptose mas não houve alteração estatisticamente significativa do ciclo celular. O índice de proliferação das células A2780 foi reduzido significativamente após receber o tratamento com os compostos TZD 06, TZD 14 e TZD 15 na concentração do IC₅₀. Esses resultados sugerem que os derivados de segunda geração de DHPMs testados inibem características tumorigênicas importantes das células cancerosas e que a estrutura molecular desses compostos possa ser uma alternativa promissora para a quimioterapia do câncer de ovário.

Palavras chave: câncer, DHPMs, atividade antitumoral, índice de proliferação.

Abstract

Cancer is one of the major public health issue worldwide. It is paramount to invest in the development of new and more efficient cancer treatments. Aiming to contribute to this field, we studied second generation 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-one (or thione) DHPM's a type of molecules that inhibit the spindle motor protein, kinesin Eg5, which has antitumoral activity against some cancer cells lines. Initially, we conducted an *in vitro* screening in order to identify some DHPMs derivatives (TZD 06, 07, 08, 09, 14 e 15) able to induce high cytotoxic effects on cell strains MCF-7, MDA-MB-231, A2780, T47-D, DU-145, CACO-2, CAPAN-2 e PANC-1. This evaluation was performed by using the viability assay (MTT) method. Compounds were analyzed with regards to their inhibiting concentration 50 (IC₅₀) after 72 hours of cells treatment, this assay showed that A2780 and MDA-MB231 were sensitive to the lowest concentration tested. It was also evaluated the compounds with regards to their maximal non-cytotoxic concentration in normal HUVEC and fibroblasts cells. The best result was obtained with A2780 cells and that lineage was chosen for the next analysis with compounds TZD 06, TZD 07, TZD 14 and TZD 15. After treatment, cell morphology was analyzed by optical microscopy and scanning electron microscopy. It was observed several alterations in cell morphology such as the reduction on focal adhesion point, cell roundness, cytoplasm retraction and formation of cell membrane protrusions. DHPMs treatment effects on the mitotic fuse formation was evaluated by immunofluorescent staining of alpha-tubulin and analyzed by laser scanning confocal microscopy. After 24h of treatment with highest non-cytotoxic dosage, A2780 cells undergoing mitosis exhibited monoastral spindle. These results indicated that DHPM and monastrol had a similar activity. In order to evaluate the selected DHPMs impact on ovarian cancer cells, we analyzed the cell death profile, cell cycle and proliferation index by flow cytometry. Treatment with TZD 06 and TZD 14 compounds after 72 hours induced cellular death by apoptosis. However, it was not observed any significant statistical effect on cell cycle. A2780 cells proliferation index decreased significantly after treatment with TZD 06, TZD 14 e TZD 15 compounds used at IC₅₀ concentration. We conclude that the second generation DHPMs derivatives evaluated in this work was capable of inhibiting key tumorigenic cancer cells features and that the molecular structure of these novel compounds can be a promising alternative to further evaluation aiming to be applied as ovarian cancer chemotherapy agent.

Keywords: Cancer, DHPMs, antitumor activity, proliferation index.

Índice de Figuras

Figura 1. Principais características de uma célula tumoral. A figura ilustra as dez características adquiridas pelas células tumorais. Adaptado de (Hanahan e Weinberg, 2011).	3
Figura 2. Proporção das principais regiões corporais de incidência de câncer em ambos os sexos ano de 2012.	7
Figura 3. Mortalidade pelo câncer em ambos os sexos ano de 2012.	7
Figura 4. Incidência e mortalidade do câncer em ambos os sexos, normalizado pela idade por 100 mil casos, ano de 2012.	8
Figura 5. Principais tipos de novos casos de câncer e taxa de morte estimados para 2017 (Sociedade Americana do Câncer, 2017).	9
Figura 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2017.	10
Figura 7. Estruturas anatômicas dos órgãos reprodutivos femininos. As três classes principais de estruturas ovarianas das quais se originam as neoplasias são: células epiteliais, células estromais do cordão sexual e células germinativas.	12
Figura 8. Esquema da segregação cromossômica. Fonte (Foley e Kapoor, 2013)	18
Figura 9. Organização dos elementos do citoesqueleto e proteínas motoras e suas associações no evento da segregação dos cromossomos na mitose. Adaptado de: (Tolic, 2018)).	18
Figura 10. Movimentação das cinesinas	19
Figura 11. Representação da atividade e localização da cinesina Eg5 durante a divisão celular.	20
Figura 12. Modelo de um fuso normal bipolar e um fuso monoastral. Fonte: (Adaptado de (El-Nassan, 2013).	21
Figura 13. Reação de Biginelli.	22
Figura 14. Esquema das modificações do núcleo DHPM de segunda geração. Os círculos vermelhos indicam a posição das modificações.	24

Figura 15. Avaliação da Viabilidade celular por MTT das linhagens tumorais. Gráficos de viabilidade das linhagens MCF-7(A), MDA-MB-231(B), T47-D(C), A2780(D), DU-145(E), CACO-2(F), PANC-1(G), CAPAN-2(H) após 24 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas..... 36

Figura 16. Avaliação da viabilidade celular por MTT das linhagens MDA-MB-231 e A2780 após 24 horas de tratamento com emprego de concentrações decrescentes dos compostos. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas por 24 horas. 37

Figura 17. Avaliação da viabilidade celular por MTT nas linhagens MDA-MD-231 e A2780 após 48 horas de tratamento com emprego de concentrações decrescentes dos compostos. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas por 48 horas. 38

Figura 18. Avaliação da viabilidade celular por MTT nas linhagens MDA-MD-231 e A2780 após 72 horas de tratamento com emprego de concentrações decrescentes dos compostos. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas por 72 horas. 39

Figura 19. Avaliação da citotoxicidade em células normais dos derivados das DHPMs. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com TDZ 06, TZD 07, TZD 14 e TZD 15 nas concentrações indicadas por um período de 72 horas. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ comparados ao tratamento dos fibroblastos e HUVEC para cada concentração..... 41

Figura 20. Avaliação morfológica da linhagem A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os derivados de DHPMs selecionados (IC_{50}). As linhas de imagens representam o período de tratamento e as colunas de imagens representam os controles

negativo e positivo (monastrol) e os demais compostos testados. TDZ 06 e TDZ 14 induziram as modificações morfológicas mais expressivas (imagens H, I, N e O). Barras de referência de 50 μ M. 43

Figura 21. Avaliação morfológica da linhagem A2780 após 72 horas de tratamento com os derivados de DHPMs selecionados (IC₅₀). A imagem (A) apresenta os pontos de adesão da célula ao substrato bem preservados mesmo em regiões de acúmulo celular (setas). Imagem (B), (C) e (F) mostra uma significativa redução dos pontos de adesão sendo que na imagem (B) observamos alterações em que a superfície da célula se apresenta mais rugosa. Na imagem (F) as cabeças de setas mostram células com a membrana parcialmente extraída. Imagens (C), (D) e (E) apresentam células com alterações em sua membrana (blebs) condizente com processo de apoptose (cabeça de seta). Barra de referência de 10 μ m. 44

Figura 22. Efeito dos derivados de DHPMs selecionados na formação de colônia de células A2780 (dose máxima não citotóxica, 72h). Imagem (A) mostra a capacidade plena na formação de colônias, Imagem (B) mostra a perturbação da formação colônia induzida pelo monastrol (controle positivo) Imagens (C-F) mostram a interferência induzida pelos compostos testados. Imagens (C) e (E) representam a perda mais acentuada da capacidade de formar colônias por estas células. As colônias formadas pelas amostras tratadas (imagens C-F) foram menores que as formadas pelas amostras não tratadas (imagem B). Barras de referência 200 μ M. 46

Figura 23. Confirmação de atividade dos TZDs pela indução do fuso mitótico monoastral nas células A2780 (concentração máxima não citotóxica). Imagens (A-C) apresentam fusos mitóticos normais (cabeça de seta). Imagens (D-F) apresentam o fuso mitótico monoastral clássico. Imagens (G-R) mostram a indução do fuso monoastral pelos compostos TDZ 06, 07, 14 e 15 respectivamente. α -tubulina em vermelho e DNA corado com DAPI (azul). Barras de referência de 10 μ m. 49

Figura 24. Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos compostos TZDs (dose máxima não citotóxica 72 h). Imagem (A) distribuição das populações celulares de acordo com a positividade das marcações. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, inferior direito às células em apoptose inicial, superior esquerdo às células necróticas e o superior direito células em apoptose tardia. Figura (B) representação gráfica dos perfis de morte celular com tratamento estatístico. Os

compostos induziram predominantemente a morte celular por apoptose. ***P<0,001 e ****P<0,0001..... 50

Figura 25. Avaliação do ciclo celular em células A2780 tratadas com TZDs (IC₅₀, 24 e 48 h). A) Histogramas das fases do ciclo celular, células não tratadas, Monastrol, TZD 06. B) Histogramas das fases do ciclo celular, TZD 07, TZD 14 e TZD 15. C) Quantificação do percentual de células em cada fase do ciclo celular. Os dados representam três experimentos independentes, n=1, expressos como a porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular ± SEM. Embora visualmente seja possível identificar diferenças entre as fases do ciclo nos grupos controles e tratados, esta diferença não apresentou significância estatística. 52

Figura 26. 72 horas de tratamento com os compostos TZD 06, 14 e 15 reduzem significativamente o índice de proliferação das células testadas. A) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência do CFSE. Controle de células não divididas (representado em vermelho); de células tratadas com os derivados de DHPM indicados (laranja) e de células não tratadas (azul). B) Avaliação quantitativa dos dados expressos como o índice de proliferação das células ± SEM. Os compostos TZD 06, 14 e 15 inibiram de forma estatisticamente significativa a proliferação celular. **P<0,01 e ***P<0,001. 54

Índice de Tabelas

Tabela 1. Fórmula estrutural, código e massa molecular de cada composto desenvolvido pela reação de Biginelli. 28

Tabela 2. Concentração máxima não citotóxica e concentração inibitória 50 (IC₅₀) de tratamento estabelecida para cada um dos compostos DHPM's selecionados pelo teste de viabilidade celular pelo MTT após 72h de tratamento na linhagem A2780. 31

Tabela 3. IC₅₀ estabelecida para os 4 compostos pré-selecionados e o monastrol. A tabela apresenta o IC₅₀ calculado para 72h horas de tratamento. *A concentração inibitória 50 (IC₅₀) do monastrol para linhagem MDA-MB-231 para o mesmo período são dados já publicados pelo nosso grupo (Guido et al., 2015). 40

Tabela 4. Quadro resumo dos resultados obtidos neste trabalho. 60

Lista de Abreviaturas e Siglas

°C	Graus Celsius
A2780	Linhagem celular de carcinoma de ovário
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Albumina Sérica Bovina (<i>Bovine serum albumin</i>)
CACO-2	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CAPAN-2	Linhagem celular de adenocarcinoma de pâncreas
CFSE	Éster carboxifluoresceína succinimidil (<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>)
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	<i>4',6-Diamidine-2-Phenylindole Dihydrochloride</i>
DHPM	Dihidropirimidinona
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMEM:F12	Meio de Eagle modificado por Dulbecco: Mistura de nutrientes F-12
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DU-145	Linhagem celular de carcinoma de próstata
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Eg5	Proteína Cinesina do Fuso mitótico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (<i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
HCl	Ácido Clorídrico
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)
HUVEC	células endoteliais de veia umbilical humana
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50%
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KSP	Proteína Cinesina do Fuso (<i>Kinesin Spindle Protein</i>)
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MCR	Reação Multicomponente (<i>Multicomponent Reaction</i>)
MEM	Meio mínimo essencial
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium

NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PANC-1	Linhagem celular de carcinoma de pâncreas
PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PI	Iodeto de Propídio (<i>Propidium Iodide</i>)
SFB	Soro fetal bovino
T47-D	Linhagem celular de carcinoma ductal de mama

SUMÁRIO

RESUMO	vII
ABSTRACT	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xiiiIV
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer.....	1
1.2 Incidência, prevalência e mortalidade do câncer	5
1.3 Câncer de ovário	10
1.4 Tratamento para o Carcinoma Epitelial de Ovário	14
1.5 Ciclo celular, Cinesinas, Centrossomo.....	16
1.6 Monastrol e Dihidropirimidinonas (DHPMs).....	21
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo Geral.....	25
3.2. Objetivos Específicos.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1. Reagentes e equipamentos.....	26
4.2. Síntese de DHPMs pelo método de Biginelli	27
4.3. Manutenção das células.....	28
4.4. Esquema de testes com os derivados da 3,4-dihidropirimidinona.....	29
4.5. Ensaio de viabilidade celular/triagem de linhagens.....	30
4.6. Cálculo do IC ₅₀	30
4.7. Esquema de tratamento com os compostos pré-selecionados pelo teste de viabilidade celular por MTT.....	30
4.8. Imunomarcção de alfa-tubulina	31
4.9. Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com DHPM's	32
4.10. Análise da morfologia das células por microscopia eletrônica de varredura ...	32
4.11. Análise da capacidade de formação de colônia após o tratamento.....	32
4.12. Análise do tipo de morte celular causada pelo tratamento	33
4.13. Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI)	33
4.14. Análise de proliferação celular	34

4.15. Análise estatística.....	34
5. RESULTADOS	35
5.1 Triagem de citotoxicidade e definição de susceptibilidade celular aos tratamentos.....	35
5.2 O tratamento com derivados de DHPMs induz alterações morfológicas em células tumorais de ovário (A2780)	42
5.3 O tratamento realizado com os análogos do monastrol afeta a capacidade de sobrevivência e de formação de colônias pelas células A2780	45
5.4 Confirmação de atividade inibitória da cinesina Eg5, os derivados de DHPMs 6, 7, 14 e 15 induzem a formação de fusos mitóticos monoastrais	46
5.5. O composto TZD 06 induz morte celular principalmente por apoptose	49
5.6 Os derivados de DHPM induzem alterações sutis no perfil do ciclo celular em células A2780, mas sem significância estatística	50
5.7. Os derivados TZD06, TZD 14 e TZD 15 inibem a proliferação das células tumorais de ovário	52
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES.....	59
8. QUADRO RESUMO DOS RESULTADOS	60
9. PERSPECTIVAS	60
10. REFERÊNCIAS.....	.61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Câncer é uma denominação genérica para um grande grupo de doenças que pode afetar qualquer parte do corpo. O câncer surge da transformação de células normais, através de um processo de várias etapas que geralmente progride de lesões pré-cancerosas para o tumor maligno. Esta transformação é caracterizada pela proliferação descontrolada de células somáticas já anormais, resistência aos processos naturais de morte celular e capacidade de invadir e se disseminar por regiões do corpo restritas a outros tipos de tecidos, em um processo tardio denominado metástase (Sociedade Americana do Câncer, 2017; WHO 2018; (Gupta e Massagué, 2006; Weinberg, 2014). Esta doença é progressiva e sem tratamento resultará em morte, sendo a metástase a principal causa dos óbitos provocados pelo câncer (Sociedade Americana do Câncer, 2017, WHO 2018). Muitos tipos de câncer, especialmente aqueles originados durante a infância, permanecem sem o estabelecimento exato de suas causas. Em adultos, fatores como estilo de vida, exposições químicas e físicas devido a natureza ocupacional dos indivíduos, tabagismo, alcoolismo, obesidade, descontrole hormonal, processos inflamatórios crônicos, infecções virais, herança genética de mutações, dentre outros, são os principais fatores indutores dos tumores conhecidos (De Pergola e Silvestris, 2013; Tabuchi *et al.*, 2013; Katzke *et al.*, 2015). Dentre estes fatores, tem destaque o tabagismo o qual está associado a 22% das mortes por câncer (WHO 2018). Em países com baixo e médio patamares de desenvolvimento, as infecções virais representam cerca de 25% das causas de câncer, com destaque para as hepatites virais e o vírus do papiloma humano (HPV). Estes fatores de riscos podem estar simultaneamente presentes ou ocorrerem em sequência para dar início às modificações celulares que serão as bases para o desenvolvimento do câncer (Society, 2018). O envelhecimento também é outro fator fundamental para o desenvolvimento do câncer, a incidência do câncer aumenta de forma significativa com a idade dos indivíduos. Este aspecto provavelmente está associado ao acúmulo de tempo de exposição a fatores de risco para específicos tipos de cânceres comumente associados com a idade combinado com a tendência natural de perda de eficiência dos mecanismos de manutenção e reparo das funções celulares a medida que os humanos envelhecem (Duray *et al.*, 2014; Falandry *et al.*, 2014; Navarrete-Reyes *et al.*, 2016).

Do ponto de vista molecular, os tumores são mais do que massas de células que se proliferam indefinidamente. Eles são tecidos complexos compostos de diferentes tipos celulares que participam em interações heterotípicas umas com as outras. Conforme as

células normais se transformam progressivamente para um estágio neoplásico elas vão adquirindo diferentes capacidades que fazem com que possam se caracterizar como tumorigênicas e, posteriormente, malignas (Hanahan e Weinberg, 2011; Pickup *et al.*, 2014).

Do ponto de vista genômico, todos os tipos de câncer são causados e, portanto, contêm mutações em seu material genético (Alexandrov *et al.*, 2013). Algumas dessas mutações têm repercussão na biologia da célula cancerosa direcionando-a para o crescimento tumoral descontrolado resultante de um aumento da sensibilidade aos fatores de crescimento, gerando uma massa tumoral característica de neoplasias. Outras, podem inativar genes que protegeriam as células de uma proliferação anormal; normalmente chamados de genes supressores de tumores (Morris e Chan, 2015).

Além disso, mutações podem dar origem a proteínas que apresentem funções oncogênicas que estimulam a proliferação celular ou acrescentam outras vantagens às células pré-tumorais que afetarão, portanto, os processos biológicos envolvidos na transformação de células normais em células cancerosas (Horne Steven *et al.*, 2014). Como por exemplo: o escape das células anormais frente ao sistema imune, o que possibilita que elas sobrevivam na corrente sanguínea e gerem metástases (Vinay *et al.*, 2015); a imortalidade replicativa, que faz com que as células percam ou diminuam a capacidade de entrar em apoptose ganhando, assim, resistência à morte celular programada (Mohammad *et al.*, 2015); a indução da formação de vasos para irrigação do tumor com O₂ e nutrientes; a instabilidade genômica, que faz com que a massa tumoral apresente diversidade de tipos celulares, o que dificulta o tratamento (Suzuki e Takahashi, 2013); e, a desregulação do metabolismo energético, que faz com que a fonte de energia principal seja a respiração anaeróbia (Ngo *et al.*, 2015). Portanto, o processo no qual uma célula normal torna-se neoplásica é caracterizado por acúmulo de diversas mutações como essas (Figura 1) (Weinberg, 2014).

Hoje em dia já estão bem estabelecidas e aceitas diversas características que são comuns a todas as células tumorais. Diferentes e complementares entre si, são capazes de promover o crescimento tumoral e a sua disseminação metastática. São elas: a manutenção da sinalização proliferativa, perda dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, ativação da invasão e metástase (Hanahan e Weinberg, 2000), a instabilidade e mutação genômica, a inflamação promovida pelo tumor, desregulação do metabolismo energético e o escape

da destruição pelo sistema imune (Hanahan e Weinberg, 2011). Estas características estão sumarizadas abaixo na figura 1.



Figura 1. Principais características de uma célula tumoral. A figura ilustra as dez características adquiridas pelas células tumorais. Adaptado de (Hanahan e Weinberg, 2011).

A ativação da imortalidade replicativa é requisito básico para geração de tumores macroscópicos. Acredita-se que a capacidade de proliferação ilimitada esteja relacionada com a presença de telômeros que protegem as caudas dos cromossomos (Hegde *et al.*, 2013). O comprimento do DNA telomérico em uma célula determina quantas gerações de células sucessivas sua progênie poderá passar antes de que os telômeros sejam desgastados e, conseqüentemente, tenham perdido suas funções de proteção, desencadeando a entrada da célula em um processo de crise que a levará à senescência e ou à apoptose (De Vitis *et al.*, 2018). Células tumorais são capazes de ativar diversos mecanismos de manutenção telomérica que impedem o encurtamento dos telômeros, processo esse que costuma ser inevitável durante as divisões celulares. Alguns tumores expressam telomerasas enquanto outros, em menor proporção, ativam a via alternativa de alongamento dos telômeros (Bordeira Gaspar *et al.*, 2018). Portanto, a imortalidade replicativa é uma das características comportamentais de células tumorais mais

contrastantes quando com comparadas às células normais do corpo, as quais passam por números limitados de ciclos de crescimento e divisão celular (Hanahan e Weinberg, 2011).

O câncer é também um grupo de doenças silenciosas, a depender da região do corpo onde surge, podendo permanecer assintomático durante longos períodos (em torno de 10 anos) até ser tornar detectável (Ott *et al.*, 2009; Weinberg, 2014). Outro aspecto importante ligado ao controle do câncer é que populações de baixa renda em muitos países não tem acesso a métodos de diagnóstico e nem ao tratamento. Em 2017, apenas 26% dos países considerados mundialmente de baixa renda per capita declararam ter serviços de patologia disponíveis pelo setor público (WHO 2018). Em contraste, mais que 90% dos países considerados mundialmente de elevada renda per capita declararam possuir serviços de diagnóstico e tratamento (WHO 2018). A demora para a obtenção do diagnóstico é uma das principais características ligadas a elevada taxa de mortalidade desta doença (Richards, 2009; Neal *et al.*, 2015). Como um grande número dos casos são revelados apenas por diagnóstico tardio, a doença já se encontra em fases avançadas, instalada em diversos pontos do corpo, inviabilizando a cura e, portanto, tornando o tratamento apenas uma busca pela extensão da vida (Kamb *et al.*, 2006; Salzman *et al.*, 2009).

Essa doença é atualmente considerada como um dos maiores problemas de saúde pública mundial, com taxas de incidência que vêm aumentando em muitos países desde 1990 (Global Burden of Disease Cancer, 2015). O câncer já é considerado globalmente como a segunda principal causa de morte em humanos, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares (Siegel *et al.*, 2018), tendo levado a óbito cerca de 8,8 milhões de pessoas em 2015 (Sociedade Americana do Câncer, 2017; WHO 2018). O ônus global dessa doença continua crescendo e, segundo agências de vigilância e controle do câncer, a estimativa é de que, durante as duas próximas décadas, a incidência anual do câncer dobre chegando a 29,4 milhões de novos casos em 2035 (Sociedade Americana do Câncer, 2017; WHO 2018). Essa carga cada vez maior ocorrerá, principalmente, em países de média e baixa renda que estão passando por grandes transições sociais e econômicas, representando cerca de 70% das mortes causadas pelo câncer (Sociedade Americana do Câncer, 2017; WHO 2018; Jacques Ferlay, 2015). Todos estes aspectos reforçam o elevado impacto econômico causado por esta doença, e atualmente continua com uma forte tendência de aumento. O custo anual do câncer calculado para 2010 foi de aproximadamente 1,16 trilhões de dólares (Cancer, 2014).

No entanto, o mais elevado custo do câncer é o custo humano que é representado pelas incertezas e pelo sofrimento trazidos pelo diagnóstico do câncer. Escondido atrás de todo conjunto de dados estatísticos ligados aos novos casos de câncer existem pessoas, acompanhadas de suas famílias e amigos que são arrastados para este grave problema e o vivenciam por muitos anos, cujo desfecho na grande maioria dos casos ainda é a morte. Não importando a nacionalidade, cultura e conjunto de crenças e valores de um povo, o grande estresse provocado pelo diagnóstico do câncer é um evento universal e devastador para saúde física e mental de todos os envolvidos.

Embora alguns tipos de câncer continuem incuráveis, existem formas de prevenir o surgimento de muitos outros tipos numa taxa que varia entre 30 a 50% dos tipos conhecidos, pela mudança de comportamento e hábitos que implicam na redução da exposição a riscos ligados ao surgimento desta doença (WHO 2018). O número total da doença assim como o número de óbitos ligados ao câncer também pode ser reduzido através do diagnóstico precoce e tratamento destes doentes de forma adequada e em tempo hábil uma vez que muitos tipos de câncer podem ser curados se diagnosticados precocemente (WHO 2018).

As medidas de maior sucesso na prevenção do câncer podem ser sumariadas em: (1) eliminar o tabagismo, (2) eliminar a obesidade, (3) ter uma dieta equilibrada rica em frutas, legumes e verduras, (4) eliminar o sedentarismo, (5) eliminar o consumo de álcool, (6) evitar infecções virais pela vacinação ou ajuste de comportamento (HPV, hepatites e outras infecções virais carcinogênicas, (7) evitar exposição a radiação ionizante e ultravioleta, (8) evitar inalar poluição do ar e (9) eliminar o uso dentro das residências de combustível sólido para não haver inalação de seus resíduos (WHO 2018).

1.2 Incidência, prevalência e mortalidade do câncer

O câncer afeta de forma geral todos os humanos, no entanto, existem diferenças se considerarmos as fronteiras locais, regionais e nacionais em especial quando se avalia tipos específicos de tumor (Cancer, 2014). Os dados epidemiológicos de incidência e óbitos ligados ao câncer variam enormemente em termos de qualidade e cobertura populacional a depender da região geográfica ou país considerado. Estes dados estão distribuídos entre agências nacionais e hospitais que contêm um registro completo e detalhado de todas as ocorrências ligadas ao câncer ou até a total ausência de dados, o que obriga realizar inferências baseadas em países para se ter uma boa estimativa da doença nestas localidades (Cancer, 2014).

A compilação de dados realizada no projeto GLOBOCAN (2012) demonstrou que naquele ano a estimativa era de 14,1 milhões de novos casos diagnosticados mundialmente com 8,2 milhões de mortes por câncer, excluindo casos de câncer de pele do tipo não melanoma.

Este levantamento demonstrou que a incidência de câncer estava mais elevada em homens quando comparados às mulheres, 57% e 53% respectivamente. Dentre os homens, os 5 tipos mais comuns de câncer diagnosticados em 2012 foram: pulmão (16,7%), próstata (15%), colorretal (10%), estômago (8,5%) e fígado (7,5%). Já entre as mulheres, os mais comuns foram mama (25,2%), colorretal (9,2%), pulmão (8,7%), colo uterino (7,9%), e estômago (4,8%) (World Cancer Report, 2014).

Entre os homens, o câncer de pulmão apresentou a mais alta incidência, 34,2 casos em cada 100.000, ficando o câncer de próstata em segundo lugar com 31,1 casos em cada 100.000. Entre as mulheres o câncer de mama apresentou uma incidência consideravelmente mais elevada, 43,3 em cada 100.000, ficando o câncer colorretal em segundo lugar com 14,3 casos em 100.000.

A prevalência estimada para 2012 indicava que 8,7 milhões de pessoas acima de 15 anos de idade, vivas, haviam sido diagnosticadas com câncer há um ano, 22 milhões haviam sido diagnosticadas em um período de 3 anos e 32,6 milhões apresentavam diagnóstico num período de 5 anos (Cancer, 2014).

A estimativa mundial para o número de câncer infantil diagnosticado entre 0 e 14 anos de idade em 2012 foi de 165.000, sendo 95.000 para meninos e 70.000 para meninas. Se considerados todos os tipos de câncer, excluindo o câncer de pele não melanoma, as mais altas taxas de incidência estão associadas a países de elevado desenvolvimento econômico e social como os Estados Unidos da América, Europa Ocidental, Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia (Cancer, 2014).

Mais que 60% dos casos de câncer registrados em todo o mundo ocorreram na África, Ásia e nas Américas Central e do Sul, sendo que estas regiões representam 70% de todos as mortes por câncer no período avaliado (Cancer, 2014). Portanto, os desdobramentos desta doença, lamentavelmente, estão diretamente associados à infraestrutura e aos serviços de vigilância e atendimento do local onde o indivíduo vive.

Abaixo nas figuras 2, 3 e 4 estão apresentados os dados mundiais das principais regiões corporais de incidência do câncer, taxa de mortalidade e incidência normalizada pela idade em ambos os sexos.

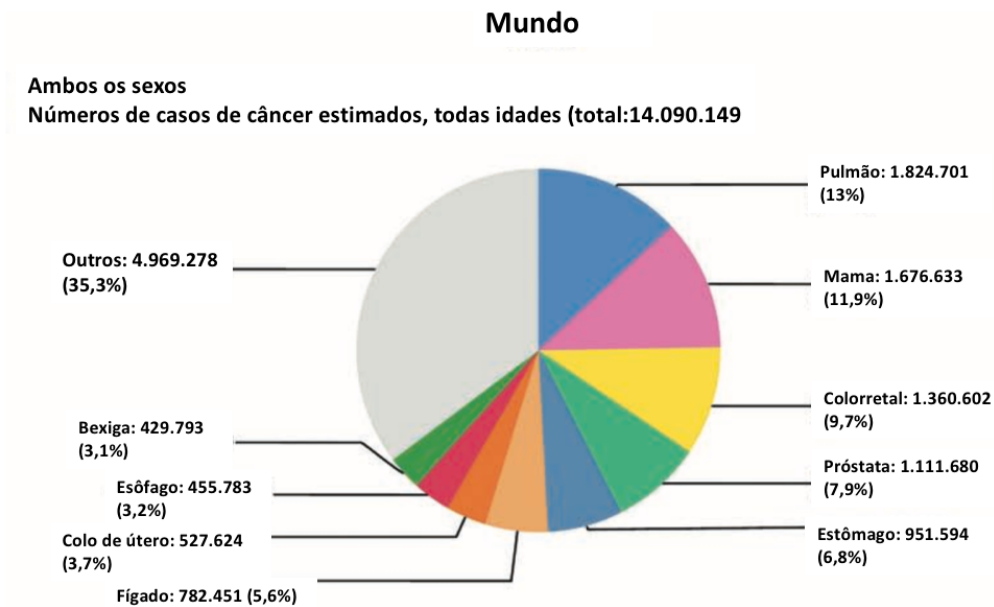


Figura 2. Proporção das principais regiões corporais de incidência de câncer em ambos os sexos no ano de 2012(Cancer, 2014).

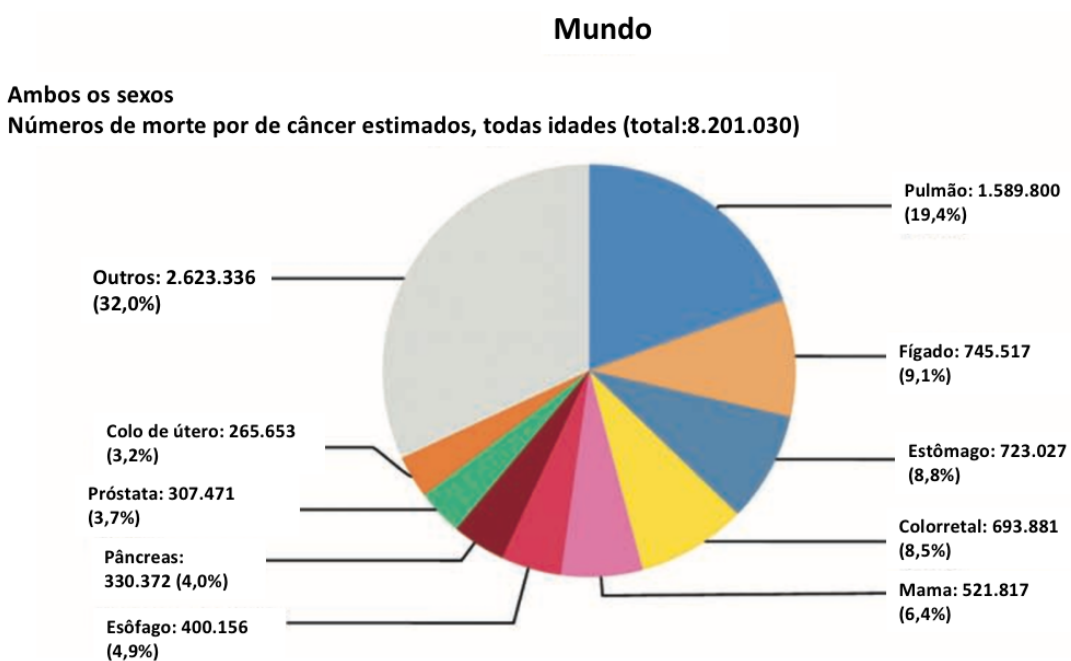


Figura 3. Mortalidade pelo câncer em ambos os sexos ano de 2012 (Cancer, 2014).

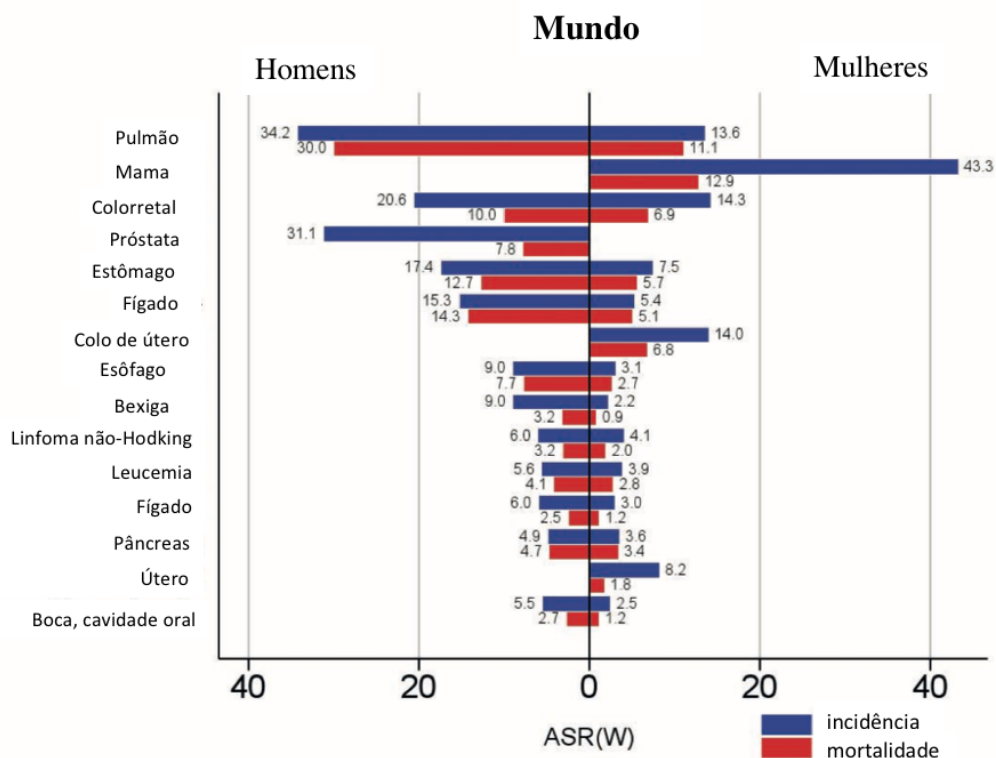


Figura 4. Incidência e mortalidade do câncer em ambos os sexos, normalizado pela idade por 100 mil casos, ano de 2012 (Cancer, 2014).

Em países desenvolvidos predominam os tipos de câncer associados à urbanização e ao desenvolvimento, como por exemplo pulmão, próstata, mama e colorretal, diferente do que se constata nos demais países. Com algumas exceções, é interessante notar que em países de médio e baixo níveis de desenvolvimento socioeconômico, os tipos mais comuns de câncer são associados a infecções: colo do útero, estômago, esôfago e fígado. Apesar de apresentarem uma baixa incidência, a mortalidade desses tipos representa quase 80% dos óbitos de câncer no mundo (Jacques Ferlay, 2015; Torre *et al.*, 2015).

Os Estados Unidos são um bom modelo para a visualização destes dados. Os principais tipos de câncer e suas respectivas taxas diferenciais de incidências para homens e mulheres nos Estados Unidos estão representados na figura 5.

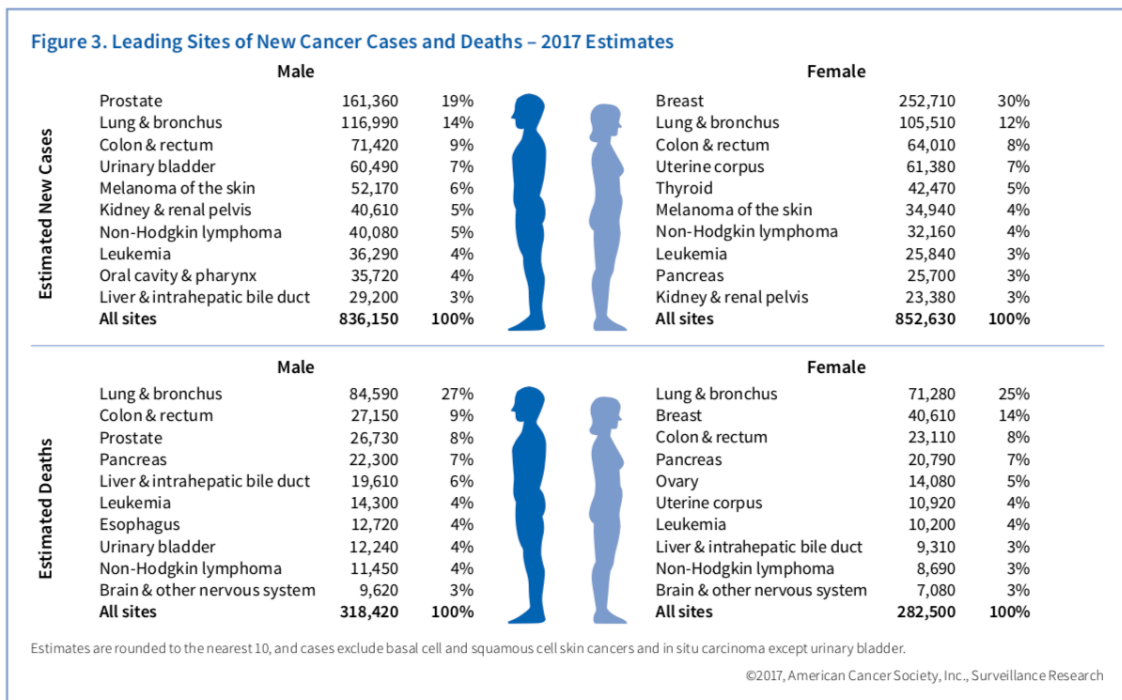




Figura 5. Principais tipos de novos casos de câncer e taxa de morte estimados para 2017 (Sociedade Americana do Câncer, 2017).

No Brasil, a incidência estimada para o biênio 2018-19 é de 600 mil casos de câncer para cada ano. Além do câncer de pele não melanoma, que contribuirá para uma incidência de 170 mil casos, ocorrerão 420 mil novos casos de câncer. No Brasil, os tipos mais incidentes de câncer em homens são os de próstata, pulmão, cólon e reto, enquanto as mulheres são mais acometidas por câncer de mama, cólon e reto, colo uterino, pulmão e tireoide. No entanto, o Brasil ainda se encontra no perfil que apresenta altas taxas para os cânceres do estômago e esôfago. Os dez tipos mais incidentes de câncer por sexo estimados para 2018 estão listados na tabela da figura 6 (Isabelle R. Barbosa, 2015; Silva, 2017).

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
					Homens	Mulheres	
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Figura 6. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma. Fonte: INCA, 2017.

As taxas de incidência ajustadas por idade tanto para homens (217,27/100 mil) quanto para mulheres (191,78/100 mil) são consideradas intermediárias e compatíveis com as apresentadas para países em desenvolvimento (INCA, 2018).

A distribuição da incidência no Brasil por Região geográfica mostra que as Regiões Sul e Sudeste concentram 70% da ocorrência de casos novos; sendo que, na Região Sudeste, encontra-se quase a metade dessa incidência. Existe, entretanto, grande variação na magnitude e nos tipos de câncer entre as diferentes Regiões do Brasil. Nas Regiões Sul e Sudeste, o padrão da incidência mostra que predominam os cânceres de próstata e de mama feminina, bem como os cânceres de pulmão e de intestino. A Região Centro-Oeste, apesar de semelhante, incorpora em seu perfil os cânceres do colo do útero e de estômago entre os mais incidentes. Nas Regiões Norte e Nordeste, apesar de também apresentarem os cânceres de próstata e mama feminina entre os principais, a incidência dos cânceres do colo do útero e estômago tem impacto importante nessa população (INCA 2018).

1.3 Câncer de ovário

O Câncer de ovário é o oitavo tipo de câncer mais frequente em mulheres representando 3,0% de todos os tumores femininos. Dados de 2012 mostraram que ocorreram 239 mil novos casos o que corresponde a um risco de 6,1/100 mil. Neste mesmo ano ocorreram 152 mil óbitos em mulheres devido ao câncer de ovário, o que representou 4,3% das mortes em mulheres neste ano. O câncer de ovário é a oitava causa de morte por câncer na população feminina. A letalidade do câncer de ovário é mais elevada quando comparada com outros tipos de câncer que acometem os órgãos reprodutores femininos (INCA, 2018).

A incidência do câncer de ovário apresenta variação de 9,1/100 mil mulheres nas Regiões mais desenvolvidas do globo para 4,9/100 mil mulheres nas menos desenvolvidas; enquanto a mortalidade varia de 5,0/100 mil mulheres nas Regiões mais desenvolvidas e 3,1/100 mil mulheres nas menos desenvolvidas. Em 2012, a incidência foi maior em países com altos níveis de desenvolvimento humano (55%). Observaram-se elevadas taxas de incidência e mortalidade na Europa e América do Norte. Em 2015, no Brasil, ocorreram 3.536 óbitos por câncer de ovário (INCA, 2018).

No Canadá, destacam-se como fatores na redução da mortalidade por câncer de ovário: a redução da terapia de reposição hormonal, melhorias na gestão e no tratamento dessa doença; todavia, a sobrevida em cinco anos ou mais, em mulheres com câncer de ovário, é de 44% (Statistics, 2017). Nos Estados Unidos, a mortalidade também vem decrescendo de 2005 a 2014, o que pode estar associado ao uso de contraceptivos orais; e a sobrevida em cinco anos ou mais foi de 92% nas pacientes com doença localizada ao diagnóstico (American Cancer Society, 2017). De acordo com dados do INCA, 2018, a estimativa é de 6.150 novos casos desse tipo de câncer no Brasil. Apesar de não apresentar uma frequência tão alta, ele é o tumor ginecológico com menor chance de cura pois aproximadamente 75% dos casos diagnosticados já estão em estágio avançado.

As causas desse tipo de câncer ainda não estão bem estabelecidas. Sabe-se que a menarca precoce, a menopausa tardia e a nuliparidade estão associados com um aumento das chances do desenvolvimento do câncer de ovário, enquanto que o uso de contraceptivos orais combinados por longos períodos, gravidez e lactação são fatores protetores possivelmente por evitarem a ovulação e prolongar a amenorreia (Jordan *et al.*, 2012; Hasselblad; Gillian D. Sanders; Evan R. Myers, 2013; Caserta D., 2014; Feng *et al.*, 2014). Outros possíveis fatores de risco são a reposição hormonal estrogênica pós menopausa, a obesidade e a endometriose. Entretanto, o fator de risco mais evidente é o histórico familiar de câncer em familiares de primeiro grau. Esse risco é aumentado quando duas ou mais familiares em primeiro grau são afligidas (Nezhat *et al.*, 2002; Webb e Jordan, 2017). Acredita-se que 20% dos casos seja de causa hereditária e mais de 90% dos casos hereditários estão associadas com mutação nos genes de reparo do DNA, o BRCA1 e o BRCA2. As chances de desenvolver o câncer é de 40% para os portadores de mutação do BRCA1 e 20% para BRCA2 (Gayther e Pharoah, 2010; Bolton *et al.*, 2012; Davidson e Tropé, 2014).

BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumores que interagem com proteínas de reparo do DNA para preservar a estrutura do cromossomo. Quando mutados, os genes BRCA1 e BRCA2 produzem instabilidade genética sujeitando as células a maiores chances de sofrerem transformações malignas. O gene BRCA1 está localizado no cromossomo 17q21 e os pacientes que apresentam mutação nesse gene têm risco consideravelmente maior de evoluírem com câncer de ovário (39-46%). O gene BRCA2 está localizado no 13q12 e, normalmente, associado a menor chance de evolução para o câncer de ovário (12-20%). Para as pacientes com mutação comprovada em algum desses

genes, a estratégia para redução de risco é a cirurgia de retirada dos ovários e das tubas de falópio (Matulonis *et al.*, 2016; Webb e Jordan, 2017).

Embora considerado como uma entidade única, o câncer de ovário pode ser dividido em diferentes tipos histológicos que apresentam subtipos com diferentes fatores de risco, células de origem, composição molecular, características clínicas e de tratamento. Mais de 90% dos casos são do tipo epitelial que incluem os subtipos serosos (68-71%), endometrióide (9-11%), de células claras (12-13%) e carcinomas mucinosos (3%). Dentre eles, o mais frequente é o carcinoma seroso de alto grau que apresenta estágio avançado da doença e, portanto, um pior prognóstico quando comparado a estádios mais iniciais. Os outros tipos não epiteliais incluem os tumores de células germinativas e do estroma do cordão sexual, que são responsáveis por aproximadamente 10% dos casos (Davidson e Tropé, 2014; Nezhat *et al.*, 2015; Matulonis *et al.*, 2016). Essas três classes principais, epitelial, de células germinativas e do estroma do cordão sexual, são divididos com base nas estruturas anatômicas das quais se originam as neoplasias (Figura 7).

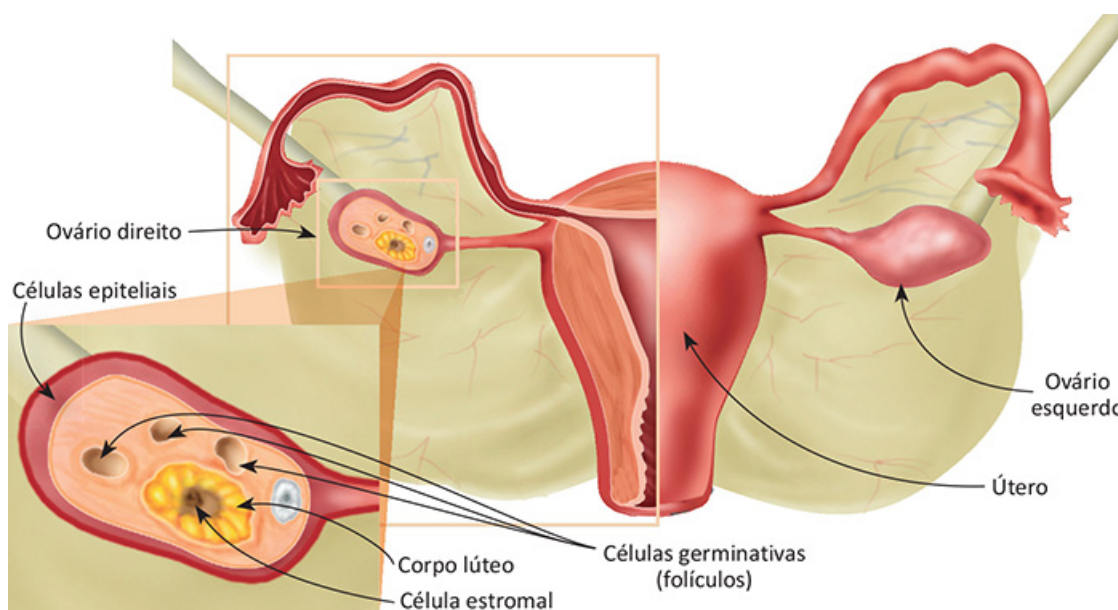


Figura 7. Estruturas anatômicas dos órgãos reprodutivos femininos. As três classes principais de estruturas ovarianas das quais se originam as neoplasias são: células epiteliais, células estromais do cordão sexual e células germinativas.

O carcinoma epitelial seroso de alto grau é originado da superfície do ovário ou do tubo de falópio distal. Compreende de 70 a 80% de todos os casos, tem altos níveis de expressão da p53 e p16, expressa fator Wilm's tumor-1 (WT-1) e receptor de estrógeno (ER). Alterações do BRCA1 e BRCA2 estão presentes em mais de 10% das mulheres

desse grupo e 96% apresentam alterações genéticas do TP53. Já o carcinoma epitelial seroso de baixo grau compreende menos de 5% dos casos, apresenta uma expressão normal da p53, normalmente expressa WT-1 e ER além de expressar também receptores de progesterona (PR) (The Cancer Genome Atlas Research, 2011; Kurman, 2013; Ghoneum *et al.*, 2018). O carcinoma endometrióide compreende aproximadamente 10% dos casos, expressa vimentina, ER, PR e CA-125. Assim como o carcinoma de células claras, normalmente surgem devido a endometriose. Outros 10% dos casos de carcinoma epitelial são do tipo carcinoma de células claras. Esse tipo apresenta alterações genéticas que incluem mutações na KRAS, PTEN e PIK3CA (Lee *et al.*, 2007; Tan e Kaye, 2007). O último tipo, carcinomas mucinosos, compreendem 3% dos casos e normalmente expressam mutações na KRAS assim como nos genes MUC2, MUC3 e MUC17 (Vaughan *et al.*, 2011; Ghoneum *et al.*, 2018).

Baseado nas características genéticas, clínicas e patológicas, o carcinoma epitelial de ovário é dividido em dois tipos: Tumores do tipo I incluem tumores endometrióide de baixo grau, seroso de baixo grau, células claras, mucinoso e Brenner. De acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO), os tumores de tipo I normalmente ficam confinados no ovário e não são agressivos, sendo classificados também como estágio I. Já os tumores do tipo II incluem carcinomas serosos de alto grau, endometrióides de alto grau, Mülleriano maligno e o carcinoma indiferenciado. Em comparação com o tipo I, os tumores do tipo II são mais agressivos e invadem outros tecidos muito mais rápido, classificados pela FIGO como estágios II-IV (Abdulfatah *et al.*, 2018). Os mais frequentes são os carcinomas do tipo II, geralmente de histologia serosa e que parecem ter sido originados do epitélio fimbrial em mais de 60% dos casos.

O perfil molecular dos dois tipos é diferente e está correlacionado com a natureza distinta de cada um dos tipos. Os carcinomas do tipo I são caracterizados por uma série de mutações dentre elas do KRAS, BRAF e BCL2. Enquanto isso, os carcinomas do tipo II, em sua maioria, são caracterizados por mutações no gene TP53, que também está presente em quase 96% dos carcinomas serosos ovarianos de alto grau. Ainda, os tumores do tipo II apresentam alterações moleculares que prejudicam a expressão do BRCA tanto por mutação do gene ou por promover sua metilação. A marca característica desses tumores é que eles são altamente instáveis geneticamente (Kurman e Shih, 2011; The Cancer Genome Atlas Research, 2011; Nezhat *et al.*, 2014; Nezhat *et al.*, 2015).

O diagnóstico e a avaliação de estadiamento da doença podem ser realizados por meio de testes e procedimentos como exames físicos, análise de histórico familiar, exame

pélvico, quantificação do marcador tumoral CA-125, ultrassom pélvico ou transvaginal, tomográfica computadorizada, PET scan, ressonância magnética e biópsia.

Por conta da baixa especificidade e sensibilidade do teste com o CA-125, ele acaba sendo mais utilizado para avaliação do tratamento e probabilidade de recorrência.

1.4 Tratamento para o Carcinoma Epitelial de Ovário

Nas últimas décadas, apesar do grande avanço das cirurgias de citorredução e das quimioterapias, pouco avanço foi obtido com respeito a sobrevida das pacientes de carcinoma epitelial de ovário. Tentativas de diagnósticos precoce também falharam em melhorar esse aspecto. Apesar dos benefícios de uma detecção precoce, até os dias de hoje nenhum estudo demonstrou impacto significativo na diminuição da morbidade e mortalidade desse câncer (National Cancer Institute, 2018; (Nezhat *et al.*, 2015).

Cerca de 25% das mulheres diagnosticadas com o câncer de ovário se apresentarão com a doença em estágio I e, portanto, com uma boa taxa de sobrevivência a longo prazo. Contudo, ainda não existem testes diagnósticos que sejam realmente efetivos para o câncer de ovário e, além disso, os sintomas iniciais são pouco perceptíveis. Por essa razão, 75% das pacientes já se encontram com a doença em estágio avançado quando são diagnosticadas o que dificulta a realização de tratamentos curativos. Além disso, a tendência natural dessa doença é de recorrência. Aproximadamente 80% das pacientes diagnosticadas com câncer epitelial de ovário vão ter recidivas depois do tratamento padrão de primeira linha (Ozga *et al.*, 2015).

O primeiro objetivo do tratamento como um todo é maximizar o controle do desenvolvimento tumoral e aliviar os sintomas pelo maior período possível. Apesar de não específicos, com frequência os sintomas sugerem a presença de uma doença abdominal. Pacientes reportam inchaço, dor abdominal e constipação como resultado de um aumento da pressão abdominal por conta das ascites ou de envolvimento do omentum (Goff *et al.*, 2007; Goff, 2012; Doubeni *et al.*, 2016). Algumas vezes, as pacientes apresentam dor pélvica (Goff *et al.*, 2004).

Existem diferentes tipos de tratamento para uma paciente de câncer epitelial de ovário. Alguns são tratamentos padrões e outros ainda estão em fases de testes clínicos. Três tipos clássicos são utilizados: cirurgia, quimioterapia e terapia alvo.

A cirurgia é o tratamento principal para a maioria das pacientes e sua extensão dependerá do estadiamento da doença e das condições clínicas da paciente, por exemplo, mulheres em estágios avançados devem passar por uma ooforectomia bilateral, mas

aquelas que apresentem um baixo risco e ainda tenham intenção de preservar sua fertilidade podem optar pela ooforectomia apenas do lado afetado (Schwartz, 2008; Romanidis *et al.*, 2014; Mallen *et al.*, 2018). Se for utilizado um esquema com quimioterapia neoadjuvante é necessário realizar uma biópsia para confirmar a patologia (Feng *et al.*, 2018).

Muitas pacientes passam por cirurgia para remoção do tumor. A cirurgia pode ser uma histerectomia que remove o útero (histerectomia parcial) e, às vezes, o colo do útero (histerectomia total); uma Salpingo-ooforectomia unilateral que remove o ovário e uma trompa de Falópio; Salpingo-ooforectomia bilateral quando a remoção inclui ambos ovários e trompas de Falópio; e, Omentectomia que remove o omento, tecido no peritônio que contém vasos sanguíneos, nervos, vasos linfáticos e gânglios linfáticos (National Cancer Institute, 2018).

O manejo padrão das pacientes em estágio avançado da doença é a cirurgia de retirada da maior massa possível do tumor seguida de quimioterapia adjuvante com uma platina (cisplatina ou carboplatina) e um taxano (paclitaxel ou docetaxel) (Jayson *et al.*, 2014; Oza *et al.*, 2015). Os análogos da platina são os agentes mais eficazes contra essa doença, mediando seus efeitos através da formação de ligações cruzadas intra-cadeias com o DNA. Entretanto, os taxanos exercem seu efeito citotóxico por um efeito que envolve ligação e estabilização da polimerização da tubulina. Frequentemente, são usadas combinações de uma platina com um taxano e foi demonstrado que a inclusão do taxano na terapia de primeira linha reduziu o risco de morte em 30% (Mcguire *et al.*, 1996; Piccart *et al.*, 2000). Apesar de serem efetivos, também apresentam muito efeitos adversos como vômitos, leucopenia, mielossupressão e neuropatia (Du Bois *et al.*, 2003; Ozols *et al.*, 2003). Mesmo que o regime de combinação platina-taxano resulte em um aumento da sobrevida média de 5 anos, o desenvolvimento da neuropatia reduz drasticamente a qualidade de vida dessas pacientes (Ozols *et al.*, 2003; Cannistra, 2004).

Dentro das terapias alvo, o Bevacizumab é um anticorpo monoclonal que pode ser usado juntamente com a quimioterapia para o tratamento do câncer de ovário que tenha retornado após o tratamento cirúrgico. Os inibidores de PARP também são terapias alvo utilizadas que bloqueiam o reparo do DNA e podem levar as células a morte. Alguns exemplos de inibidores de PARP utilizados no tratamento dos casos avançados são o Olaparib, rucaparib, niraparib e veliparib. O Cediranib é um inibidor de angiogênese que tem sido estudado para tratar casos de recidiva (Suh *et al.*, 2018).

Depois da resposta inicial, a recorrência do tumor proveniente da doença residual após o tratamento ocorre em mais de 70% das pacientes que evoluirão para óbito por conta do desenvolvimento da resistência ao tratamento adquirida pelo câncer (Luvero *et al.*, 2014). Por isso, é tão necessário desenvolver alternativas terapêuticas que sejam capazes de reverter as limitações das cirurgias e que diminuam os mecanismos de resistência que surgem em consequência dos tratamentos quimioterápicos não específicos e prolongados.

1.5 Ciclo celular, Cinesinas e Centrossomo

A mitose é um processo de divisão celular fundamental para a vida de todas as células eucarióticas. Em organismos metazoários, a mitose é essencial para a manutenção dos diferentes tipos de tecidos, uma vez que frequentemente ocorrem perdas de células por processos fisiológicos de morte celular e estas células devem ser repostas durante toda a vida do organismo (Bruce Alberts *et al.*, 2007; Mcintosh *et al.*, 2012; Reece e Al, 2015). Durante a mitose, as células eucarióticas organizam o seu DNA, o qual adquire o grau máximo de compactação e, desta forma, são organizados em cromossomos que serão acoplados a elementos do citoesqueleto celular que, através da dinâmica dos microtúbulos associada a forças de tração exercida por proteínas motoras das famílias das cinesinas e dineínas, posicionam os cromossomos na região central das células e promovem a segregação das cromátides irmãs, cujo objetivo é de distribuir igualmente o material genético replicado para as futuras células filhas (Bai *et al.*, 2017; Maiato *et al.*, 2017; Oriola *et al.*, 2018). Classicamente, esse processo é descrito em quatro fases sequenciais: a quiescência identificada pela fase G0 e a proliferação que está contida nas fases G1, S, G2/M. A proliferação é necessária para o desenvolvimento, crescimento, regeneração e manutenção dos organismos (Bertoli *et al.*, 2013; Bai *et al.*, 2017).

Para que a mitose ocorra, as células contam com uma maquinaria baseada em elementos do citoesqueleto representados pelos microtúbulos, centríolos e diversas proteínas associadas, dentre as quais destacam-se as proteínas motoras, pelo seu papel essencial na divisão celular (Cheeseman e Desai, 2008; Mcintosh *et al.*, 2012). Uma das peças mais importantes deste processo é a duplicação do centrossomo para a formação do fuso mitótico (Rieder *et al.*, 2001; Doxsey *et al.*, 2005; Vicente e Wordeman, 2015). O centrossomo passa por processos essenciais de duplicação e posterior migração para os polos opostos da célula, dos centrossomos partem diversos microtúbulos, parte destes microtúbulos são microtúbulos astrais que se associaram a membrana plasmática através

de sua ligação com proteínas motoras ancoradas na membrana da célula. Estes microtúbulos são responsáveis pela migração do centrôssomo e sua fixação nos polos opostos das células (Rieder *et al.*, 2001; Vicente e Wordeman, 2015; Oriola *et al.*, 2018). Os demais microtúbulos irão se conectar aos cromossomos condensados por meio do cinetócoro no centrômero formando o fuso mitótico (Inoué e Salmon, 1995; Komlodi-Pasztor *et al.*, 2011). Diversos microtúbulos não se ligarão aos cromossomos e sim a outros microtúbulos vindos do centrôssomo oposto. Esta ligação será mediada por proteínas motoras da família das cinesinas (cinesina-14 e cinesina-5) que são proteínas que se deslocam sobre os microtúbulos no sentido de sua extremidade (-) para a extremidade (+). Haverão ainda proteínas motoras também da família das cinesinas (cinesina-4,10) associando o DNA dos cromossomos, fora da região do cinetócoro, aos microtúbulos. As forças de tração das proteínas motoras somada aos movimentos da dinâmica dos microtúbulos geram a força resultante que puxa os cromossomos na direção dos polos opostos da célula (Maddox *et al.*, 2003; Rogers *et al.*, 2005; Wordeman, 2010). A segregação final das cromátides irmãs é dependente de um ponto de checagem que verifica se todas as cromátides estão associadas aos microtúbulos do fuso. Após esta checagem, uma via mediada por ubiquitina e proteasoma libera a enzima separase cujo alvo são as proteínas coesinas que mantêm as cromátides unidas umas as outras (Valentine *et al.*, 2006; Joglekar, 2016). Após a clivagem das coesinas, a força resultante da tração exercida por todo o sistema de proteínas motoras promove o deslocamento das cromátides irmãs para os polos opostos da célula que é o evento conhecido como a segregação dos cromossomos (Foley e Kapoor, 2013; Losada, 2014). A figura 8 apresenta o evento da migração dos centrôssomos e a figura 9 sumariza a associação dos microtúbulos com as proteínas motoras, DNA e membrana da célula durante o processo de divisão celular.

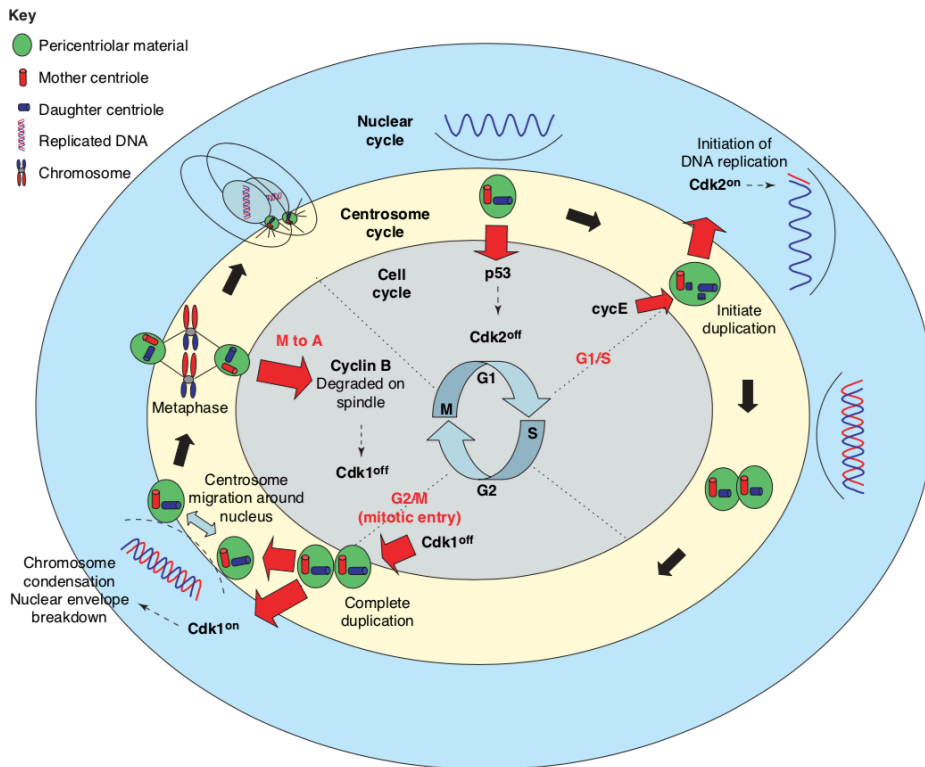


Figura 8. Esquema da segregação cromossômica. Fonte (Foley e Kapoor, 2013)

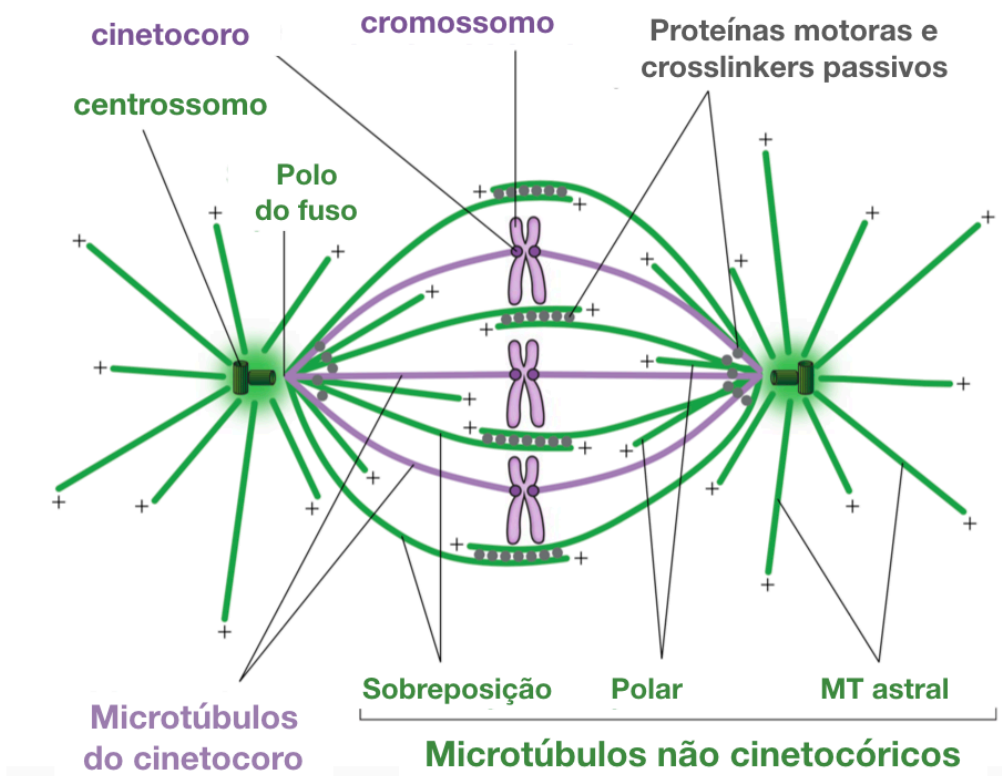


Figura 9. Organização dos elementos do citoesqueleto e proteínas motoras e suas associações no evento da segregação dos cromossomos na mitose. Adaptado de: (Tolic, 2018).

Proteínas motoras cinesinas são fundamentais para o processo de divisão celular, pois além da sua atividade de deslocamento sobre microtúbulos, influenciam a dinâmica dos próprios microtúbulos e contribuem no alongamento do fuso durante a prometáfase (Yu e Feng, 2010; Vicente e Wordeman, 2015). Dessa forma, as cinesinas juntamente com os microtúbulos são as responsáveis por garantir que a distribuição do material genético entre as células filhas ocorra corretamente e evite a aneuploidia (Michel *et al.*, 2001; Ward *et al.*, 2014).

As cinesinas utilizam a energia obtida da hidrólise de ATP para se movimentarem através dos microtúbulos funcionando como motores que fazem com que a energia liberada da hidrólise do ATP seja convertida em força de motilidade, deslocando as suas regiões flexíveis lateralmente ao longo dos microtúbulos em um movimento semelhante a um passo (figura 10) (Desai *et al.*, 1999; Mcgrath *et al.*, 2013; Myers e Collins, 2016).

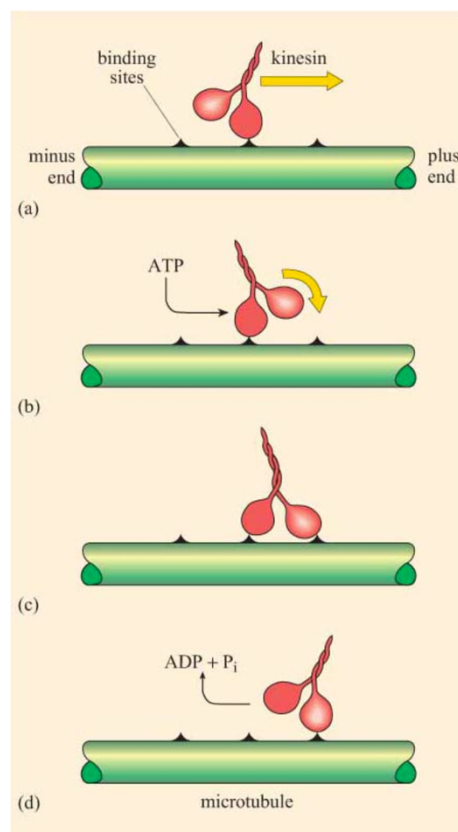


Figura 10. Movimentação das cinesinas.

O mau funcionamento de cinesinas produz diversos problemas graves para a fisiologia celular, como a parada do tráfego de vesículas de secreção e falha da montagem do fuso mitótico e/ou citocinese, que são erros irreparáveis no processo de divisão celular

(Compton, 2000; El-Nassan, 2013). Esses erros desencadeiam a apoptose através da proteína p53 ou outras vias de sinalização da morte celular (Sakowicz *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2013).

A cinesina Eg5, também chamada de KSP (*kinesin spindle protein*), é a representante da família das cinesinas motoras indispensável para a formação do fuso bipolar necessário para a correta divisão e separação das cromátides irmãs. Essa proteína é expressa nos testículos, no timo, nas tonsilas e na medula óssea (El-Nassan, 2013). Sabe-se, também, que é super expressa em tumores sólidos como de mama, pulmão, ovário, bexiga e pâncreas enquanto quase não aparece em tecidos não proliferativos (Sawin *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 2013).

A Eg5 funciona nos estágios iniciais da mitose, responsável pela separação dos centrossomos e montagem do fuso bipolar (figura 11). Sua inibição impede a migração do centrossomo para a região polar levando a formação de um fuso monopolar chamado de monoastral: fuso monoastral apresenta-se cercado por um anel de cromossomos condensados (figura 12). A progressão do ciclo celular é impedida pela ativação do checkpoint do fuso mitótico causando uma retenção das células neste ponto da mitose (fase G2/M). Por ser um erro irreparável para a maquinaria celular, leva as células a ativarem a via de morte celular, majoritariamente pela via da apoptose ou da catástrofe mitótica (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008; Zhang e Xu, 2008; El-Nassan, 2013).

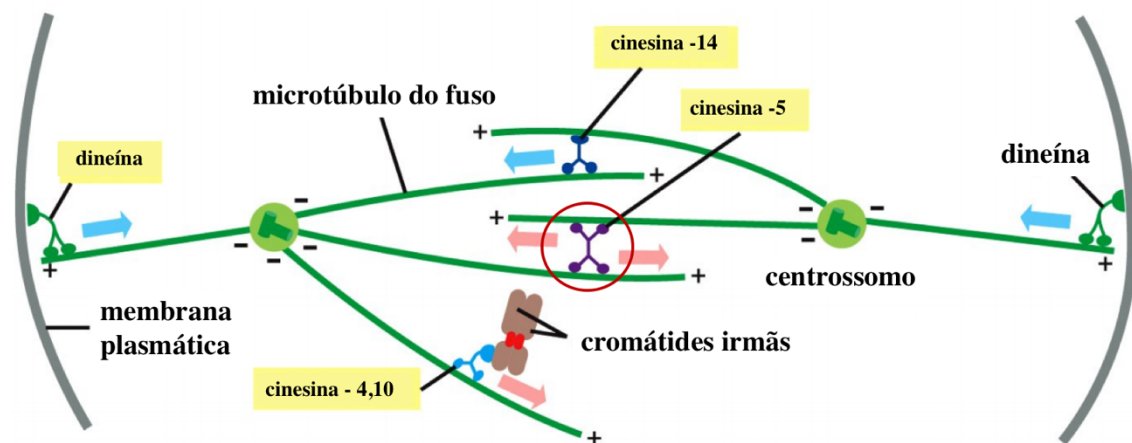


Figura 11. Representação da atividade e localização da cinesina Eg5 durante a divisão celular.

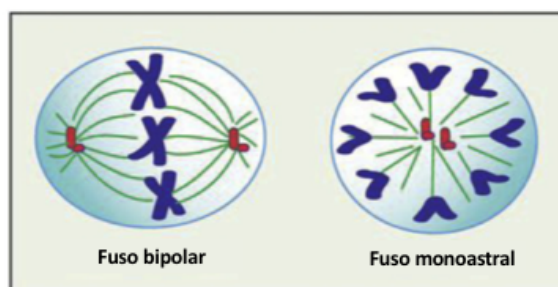


Figura 12. Modelo de um fuso normal bipolar e um fuso monoastral. Fonte: Adaptado de (El-Nassan, 2013).

A inibição da cinesina Eg5 tem sido bastante estudada pois é capaz de induzir a morte celular majoritariamente por apoptose e catástrofe mitótica em vários tipos de linhagens celulares tumorais (Hayashi *et al.*, 2008; Nakai *et al.*, 2009). Entretanto, por ter atividade somente nas células em mitose, os inibidores da Eg5 não afetam células não proliferativas, o que potencialmente faz com que esse tipo de agente antimitótico não provoque tantos efeitos adversos como os observados durante o uso de antimitóticos tradicionais como por exemplo o taxol.

Diversos compostos antimitóticos amplamente utilizados para o tratamento do câncer têm como alvo os microtúbulos interferindo com a sua estrutura e dinâmica (Kavallaris, 2010; Masawang *et al.*, 2014). Estes agentes foram inicialmente isolados de plantas como os alcalóides da Vinca, vincristine, vimblastina e taxol, sendo que o taxol foi aprovado para o tratamento de carcinoma de mama e de ovário metastáticos. Todos os antimitóticos antitubulina produzem nas células o fenótipo de parada mitótica característica. Entretanto, drogas antitubulina induzem sérios efeitos adversos incluindo neurotoxicidade, uma vez que os microtúbulos desempenham um importante papel nos elementos do citoesqueleto e tráfego de vesícula, que são essenciais para a manutenção das funções normais de todas as células e em particular dos neurônios (Debonis *et al.*, 2004; Dumontet e Jordan, 2010; Van Vuuren *et al.*, 2015; Bates e Eastman, 2017).

1.6 Monastrol e Dihidropirimidinonas (DHPMs)

Algumas estratégias vêm sendo propostas para o desenvolvimento de agentes antitumorais que induzam menos efeitos adversos e desta forma contribuam para a melhoria da qualidade de vida dos pacientes com câncer. Uma delas é o desenvolvimento de compostos que tenham como alvo proteínas motoras associadas ao microtúbulo ou proteínas que controlam os pontos de checagem na mitose. Neste contexto, em 1999, o

primeiro antimitótico inibidor seletivo de uma proteína motora foi desenvolvido. Este composto atua inibindo a mobilidade da cinesina Eg5 por associação alostérica com a proteína (Mayer *et al.*, 1999). Devido ao fenótipo celular produzido em células em divisão, o composto recebeu o nome de monastrol (Mayer *et al.*, 1999). Atualmente, muitos outros compostos vêm sendo desenvolvidos tendo como alvo proteínas motoras e apresentados como promessas para o tratamento do câncer (Canto *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2013; Guido *et al.*, 2015).

O monastrol é uma pequena molécula orgânica permeável às membranas celulares e o primeiro inibidor da maquinaria mitótica que não tem como alvo a tubulina (Mayer *et al.*, 1999; Maliga *et al.*, 2002). Ao contrário do taxol, o monastrol é um agente antimitótico que pode não produzir neurotoxicidade (Abnous *et al.*, 2013). Este agente é um protótipo derivado da família das Dihidropirimidinonas (Mayer *et al.*, 1999; Kapoor *et al.*, 2000).

Dihidropirimidinona é o produto heterocíclico de uma reação multicomponente de ciclo-condensação (Figura 13) que foi descrita em 1893 por um químico italiano, Pietro Biginelli (Nagarajaiah *et al.*, 2016). Tal reação, hoje conhecida como reação de Biginelli, é realizada através do aquecimento de três componentes: acetoacetato de etila, benzaldeído e (thio)ureia, dissolvidos em etanol, utilizando ácido clorídrico (HCl) como catalisador, em uma temperatura de refluxo resultando na formação do composto 3,4-dihidropirimidin-2(1H)-onas (DHPM). (De Vasconcelos *et al.*, 2012; Matos *et al.*, 2018)

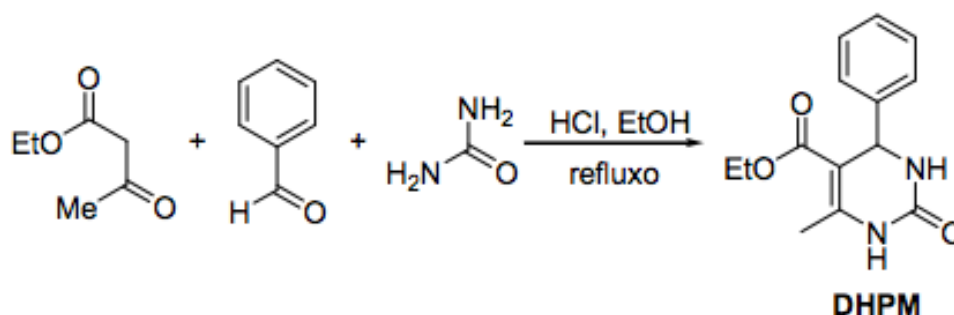


Figura 13. Reação de Biginelli.

A partir da década de 1990, variações dos três componentes principais dessa reação vêm chamando a atenção na área da síntese orgânica, pois estas variações geram produtos que ampliaram a diversidade molecular dos DHPMs, trazendo consigo um aumento na diversidade da atividade biológica desses compostos (Sweet e Fissekis, 1973; Ramos *et al.*, 2013; Matos *et al.*, 2018). A introdução de grupos específicos nas regiões heterocíclicas do núcleo DHPM pode alterar a atividade biológica do composto final e,

portanto, vários grupos de pesquisa em química vêm desenvolvendo novas reações de sínteses para as DHPMs com diferentes radicais (Kappe, 2000; Sośnicki *et al.*, 2014). Com isso, essa classe de compostos passou a ser importante na área médica por apresentar diversas atividades como: (1) antiproliferativa/antitumoral, (2) antibacteriana, (3) antiviral, (4) antifúngica, (5) anti-inflamatória, (6) antioxidante, (7) antimalárica, dentre outras (Bahekar e Shinde, 2004; Chhillar *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009; Akhaja e Raval, 2011; Kamal *et al.*, 2011; Abdou *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2017; Richard Soni *et al.*, 2017).

No trabalho desenvolvido por Guido e colaboradores (2015), foram avaliados 37 derivados de DHPMs, dentre os quais, cinco foram identificados com potencial aplicação antitumoral em ensaios com linhagens de câncer de mama. Neste mesmo trabalho são mostrados resultados de testes de dinâmica molecular no qual se demonstrou que os compostos com atividade antiproliferativa se associavam diretamente a cadeia polipeptídica das cinesina Eg5 limitando a mobilidade de suas regiões flexíveis, áreas estas fundamentais para o seu movimento e função (Guido *et al.*, 2015). Ensaios de inibição *in vitro* da atividade da Eg5 realizados pelo mesmo grupo, puderam confirmar a ação de inibição dessas proteínas com seletividade para células tumorais (Guido *et al.*, 2015). Além disso, alguns compostos foram capazes de modular o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ reduzindo a população de células-tronco tumorais (CTT) na linhagem tumoral de adenocarcinoma mamário triplo negativo (Guido *et al.*, 2015). Esse efeito é bastante importante tendo em vista que as CTT apresentam resistência a diversas terapias convencionais, sendo a população celular ligada à recidiva desta doença (Prud'homme, 2012; Luvero *et al.*, 2014). Além destes aspectos, as DHPMs também induziram a redução da capacidade angiogênica em ensaios *in vitro* e *in vivo* (Guido *et al.*, 2015). Assim, diferentes propostas para atividade de derivados de DHPMs (González-Ballesteros *et al.*, 2015; Guido *et al.*, 2015; Han Yu *et al.*, 2017; Makala e Ulaganathan, 2018) sugerem estas moléculas como promissoras alternativas para o uso no tratamento do câncer, impulsionando o seu desenvolvimento.

Dando continuidade ao trabalho do nosso grupo com derivados das DHPMs, foram sintetizadas novas moléculas contendo as modificações indicadas na figura 14, gerando seis novos produtos os quais serão referidos aqui como compostos de segunda geração.

DHPMs

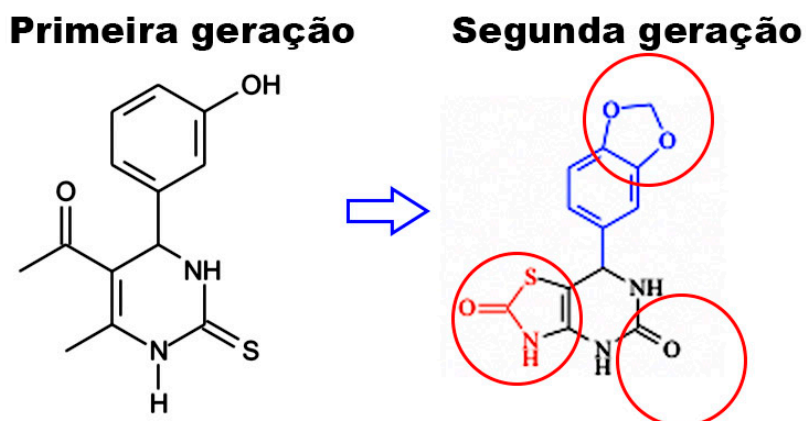


Figura 14. Esquema das moléculas sintetizadas pelo laboratório de química, utilizando o núcleo DHPM, demonstrando a estrutura principal da primeira geração de moléculas sintetizadas e as diferenças para a segunda geração de moléculas utilizadas nesse trabalho. Os círculos vermelhos indicam a posição das modificações.

2 JUSTIFICATIVA

O câncer é um grupo de patologias de incidência mundial e até o presente momento os esquemas terapêuticos aplicados com fins de cura e controle desta doença não foram capazes de reduzir o ônus global desta enfermidade. Levando em consideração a magnitude e agressividade do câncer e seu impacto social e econômico, tratamentos convencionais permanecem insatisfatórios para diminuir as taxas de mortalidade dentro das populações humanas. Apesar de já existirem muitos quimioterápicos efetivos, os efeitos adversos produzidos por estes fármacos, assim como o surgimento de tumores resistentes e/ou a seleção de células resistentes em um tumor sob tratamento, limitam em muito o uso desses fármacos, aumentando a necessidade do desenvolvimento de novas drogas mais eficazes. Neste sentido, há um esforço mundial para a realização de estudos voltados ao melhor entendimento das bases da carcinogênese, da manutenção dos tumores, do escape da edição imune e do processo de metástase. Todas estas informações alimentam um gigantesco sistema cujo objetivo principal é o desenvolvimento de novas drogas antitumorais que levem à cura do câncer e causem o menor impacto possível na saúde e qualidade de vida dos pacientes. Neste contexto, nosso grupo vem trabalhando no desenvolvimento de compostos derivados das DHPMs, com ação inibidora da cinesina Eg5, no intuito de apresentar possíveis quimioterápicos mais eficazes, que possam ser aplicados em baixas concentrações, que induzam reduzidos efeitos adversos e que tenham um baixo custo de produção.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Geral

Avaliar *in vitro* a especificidade dos seis novos compostos sintetizados utilizando 8 diferentes linhagens celulares tumorais; após selecionar a linhagem mais sensível e os compostos mais citotóxicos, analisar a atividade desses compostos na alteração das características básicas da célula tumoral.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Selecionar o modelo tumoral mais sensível e os compostos de acordo com a sua atividade citotóxica e determinar o IC₅₀ para os compostos que apresentem atividade significativa;

3.2.2 Avaliar a ação citotóxica dos derivados de DHPMs sobre células de linhagens não tumorais e calcular a dose máxima não citotóxica para cada composto;

3.2.3 Realizar a confirmação da atividade inibitória da cinesina Eg5 pelos derivados de DHPMs selecionados por meio da imunomarcagem de alfa-tubulina;

3.2.4 Analisar as células tumorais quanto à sua morfologia, formação de colônia, perfil de morte, ciclo celular e proliferação quando submetidas aos tratamentos com os compostos selecionados.

4 MATERIAS E MÉTODOS

4.1 Reagentes e equipamentos

Os seis compostos testados neste trabalho foram sintetizados e cedidos pelo Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica da Universidade de Brasília.

Para manutenção das culturas de células foram utilizados os meios de cultivo *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), *Minimum Essential Media* (MEM), *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12* (DMEM+F12) e *RPMI Media 1640* (RPMI), Soro Fetal Bovino (SFB), Tripsina 0,25% em EDTA, todos obtidos da empresa GIBCO – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; o meio de cultivo Leibovitz – L15 e, Streptomicina e Penicilina da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA.

Os anticorpos utilizados neste trabalho foram: anticorpo monoclonal anti- α -tubulina produzido em camundongo - Clone DM 1A, da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA e IgG de coelho anti-camundongo conjugado a Alexa-546 da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA.

Os reagentes utilizados ao longo do trabalho foram: MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e Iodeto de Propídio da Molecular Probes – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; RNase livre de DNase, Anexina-V conjugada a Alexa 680, DAPI e Cell Trace TM CFSE Cell Proliferation Kit, todos da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; Colchicina e DMSO, da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA;

Para imunofluorescência utilizou-se Triton x-100 e albumina sérica bovina (BSA) da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; leite desnatado Molico (Nestlé do Brasil, SP, Brasil) e meio de montagem anti-decaimento da fluorescência, ProLong Gold da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA. A análise foi realizada em Microscópio Confocal de Varredura a Laser TCS SP5 (Leica, Wetzlar, HE, Germany).

Para análise da morfologia celular foi utilizado o Microscópio de luz Axiovert e as imagens foram capturadas com o auxílio do software AxioVision 100 – ambos da Zeiss, Alemanha; para imagens detalhadas da morfologia superficial das células foi utilizado o microscópio eletrônico de varredura, JSM- 7001F, Jeol® – Tokyo, Japão.

Para leitura de absorbâncias foi utilizado o equipamento Spectramax M5 e os dados analisados pelo programa SoftMax Pro 6.2, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. O citômetro de fluxo utilizado foi FACSCalibur (BD Biosciences, Inc., San Jose, CA) e a análise dos dados foi realizada no programa FlowJo v.9.9.4 (Tree Star, Inc.,

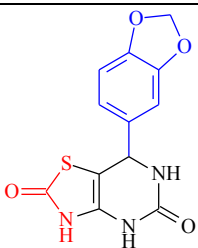
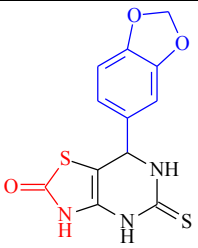
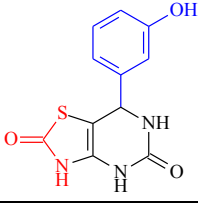
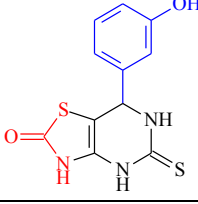
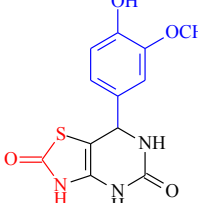
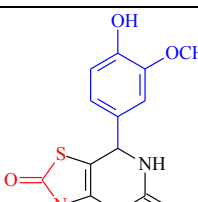
Ashland, OR). Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4.2. Síntese de DHPMs pelo método de Biginelli

Levando em consideração o grande potencial antitumoral que o monastrol tem apresentado, novos análogos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de se obter compostos que apresentem maior especificidade e avidéz pelas regiões de interação com o seu alvo, aumento da solubilidade, melhorando assim a atividade antitumoral, porém com menor toxicidade para células normais. Por isso, a síntese dos seis compostos estudados nesse trabalho foi realizada mantendo o núcleo de dihidropirimidinona alterando apenas as cadeias laterais. Estes compostos foram sintetizados pela reação descrita por Pietro Biginelli em 1983 (Biginelli e Gazz, 1893) com acréscimo de um catalisador reciclável de ferro ligado ao imidazol (Ramos *et al.*, 2013). Esta modalidade diferencial de síntese foi desenvolvida e realizada no Laboratório de Química Medicinal e Tecnológica da Universidade de Brasília, coordenado pelo Prof. Dr. Brenno Amaro Da Silveira Neto, protegida pela patente sob pedido de número BR 10 2012 021717-1.

As fórmulas estruturais e moleculares, bem como as massas molares dos seis compostos testados neste trabalho estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Fórmula estrutural, código e massa molecular de cada composto desenvolvido pela reação de Biginelli.

Produto	código	Massa molar
	TZD6	291.28
	TZD7	307.34
	TZD8	263.27
	TZD9	279.33
	TZD14	293.30
	TZD15	309.36

4.3 Manutenção das células

As células de adenocarcinoma mamário humano, MCF-7 e T47-D foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células de cultura primária de tecido conjuntivo foram extraídas de polpa dental humana saudável no Laboratório de

Microscopia e Microanálises da Universidade de Brasília. As linhagens celulares MDA-MB-231, A2780, CACO-2, DU-145, CAPAN-2, PANC-1 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células de cultura primária, extraídas de polpa dental humana saudável, constituídas prioritariamente de fibroblastos e as células de linhagem do epitélio vascular fetal, HUVEC, foram usadas como controle de células normais. As células CACO-2, PANC-1 e os fibroblastos foram cultivadas em meio DMEM e foram mantidas à 37°C com 5% de CO₂. As células DU-145 foram cultivadas em meio MEM e foram mantidas à 37°C com 5% de CO₂. As células CAPAN-2 foram cultivadas em meio McCoy's e foram mantidas à 37°C com 5% de CO₂. As células MCF-7 e A2780 foram cultivadas em meio RPMI e foram mantidas à 37°C com 5% de CO₂. As células T47-D foram cultivadas em meio RPMI com insulina (0,1%) e foram mantidas à 37°C com 5% de CO₂. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em meio Leibovitz L15 à 37° na ausência de CO₂. Todos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1% de Penicilina e Streptomicina.

4.4 Esquema de testes com os derivados da 3,4 - dihidropirimidinona

Os seis compostos, com potencial atividade antimitótica, derivados da 3,4-dihidropirimidinona foram solubilizados em DMSO, na concentração de 100mM e 200mM, para realização dos testes *in vitro*. As concentrações testadas variaram de 500µM a 25µM e os tempos de tratamento estabelecidos foram 24, 48 e 72h. Como controle positivo do tratamento foi utilizado o monastrol e o controle negativo (sem tratamento) foi feito incubando-se as células apenas com meio de cultura suplementado.

O tratamento com os compostos que apresentaram melhor atividade também foi repetido utilizando-se células de cultura primária de tecido conjuntivo e as células HUVEC para avaliar a citotoxicidade destes compostos em células normais.

Todos os experimentos subsequentes foram realizados utilizando-se apenas os compostos selecionados pelo teste de MTT (item 4.5) nas células A2780, tendo como concentração máxima estabelecida aquela que apresentou atividade satisfatória contra células tumorais sem possuir citotoxicidade considerável para as células normais. A concentração máxima para cada composto está descrita na tabela contida no item 4.7.

4.5 Ensaio da viabilidade celular/ Triagem de linhagens

A viabilidade das células MCF-7, MDA-MB-231, T47-D, Capan-2, PANC-1, DU-145, CACO-2, A2780, HUVEC e das células de cultura primária de tecido conjuntivo tratadas com os compostos derivados da 3,4- dihidropirimidinona foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT) segundo as recomendações do fabricante. 3 a 5 x 10³ células foram semeadas por poço, em placas de 96 poços e incubadas *overnight* a 37°C. Após sua adesão, as células foram tratadas com diferentes concentrações de cada derivado da 3,4- dihidropirimidinona, do monastrol, ou foram mantidas apenas com meio de cultivo. Após o período de tratamento (24, 48 e 72h), os poços foram incubados por 4h, no escuro e a 37°C, com 150 µL da solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura) e em seguida esta solução foi retirada e 200 µL de DMSO foram adicionados à cada um dos poços para a dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). O ensaio de MTT foi feito em triplicata para cada composto e concentração utilizada e três experimentos independentes foram realizados. A porcentagem de inibição foi determinada comparando a densidade celular do grupo tratado com o grupo controle no mesmo período de incubação [porcentagem de inibição = (1 – densidade da célula do grupo tratado) /densidade da célula do grupo controle].

4.6 Cálculo do IC₅₀

Os valores da concentração inibitória 50 (IC₅₀) para as células A2780 e MDA-MB-231 foram calculados com base nos resultados obtidos pelo teste de viabilidade celular por MTT com o tratamento das células por 72h. Para tal, a porcentagem de células viáveis foi plotada contra a dose de tratamento em escala logarítmica. O cálculo foi feito utilizando-se o *Software GraphPad Prism 6* (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4.7 Esquema de tratamento com os compostos pré-selecionados pelo teste de viabilidade celular por MTT

Os tratamentos para todos os experimentos posteriores foram realizados utilizando-se a linhagem A2780 e os compostos que apresentaram melhor atividade citotóxica no teste de viabilidade celular por MTT nas concentrações do IC₅₀ ou nas concentrações que apresentaram alta mortalidade de células tumorais e que não causaram danos consideráveis às células normais, denominada concentração máxima não citotóxica para células normais. Estas concentrações estabelecidas encontram-se na tabela 2 e os

tempos de tratamento para cada experimento foram determinados de acordo com a variável em avaliação sendo estes de 24, 48 ou 72h.

Tabela 2. Concentração máxima não citotóxica e concentração inibitória 50 (IC₅₀) de tratamento estabelecida para cada um dos compostos DHPM's selecionados pelo teste de viabilidade celular pelo MTT após 72h de tratamento na linhagem A2780.

Composto	Concentração máxima não citotóxica	Concentração inibitória 50 (IC₅₀)
TZD 06	200µM	69,98µM
TZD 07	100µM	29,47µM
TZD 14	200µM	83,71µM
TZD 15	100µM	76,70µM
Monastrol	1mM	44,25µM

4.8 Imunomarcção de α -tubulina

Para analisar a influência dos tratamentos na formação do fuso mitótico durante a divisão celular, foi feita a marcação das células com anticorpo anti- α -tubulina. 1×10^5 células A2780 foram semeadas sobre lamínulas redondas colocadas no fundo dos poços em placas de 24 poços. Após a adesão, as células receberam ou não o tratamento por 24h com os compostos nas concentrações máximas não citotóxicas contidas na tabela do item 4.7. Em seguida, as células foram lavadas com PBS, fixadas com formaldeído 3,7% por 30 min e permeabilizadas com triton X-100 0,1% por 20 min. Posteriormente, incubada em solução de bloqueio (leite desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS – pH7,4) por 20 min, em seguida as células foram incubadas com anticorpo primário anti- α -tubulina (1:500) produzido em camundongos por 16h a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados com PBS e o anticorpo secundário *Alexa-546 anti-camundongo* (5 µg/mL) foi incubado por 1h a 37°C protegido da luz. Os poços foram então lavados com PBS e incubados por 7 min com DAPI (300 nM) para marcação do DNA celular. Finalmente, os poços foram lavados novamente com PBS e as lâminas foram montadas com *ProLong Gold Antifade* e analisadas em Microscópio Confocal de Varredura a Laser (Leica Microsystems).

4.9 Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com DHPMs

As análises das alterações morfológicas nas células A2780, ocasionadas em decorrência de 24, 48 ou 72h de tratamento, nas concentrações do IC₅₀ contidas na tabela do item 4.7 dos análogos do monastrol, foram avaliadas por microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) com magnificação de 10x e as imagens foram capturadas com o auxílio do *software AxioVision* (Zeiss).

4.10 Análise da morfologia das células por microscopia eletrônica de varredura

Para visualizar as diferenças causadas na morfologia estrutural e da membrana celular das células após os tratamentos por 72h na concentração do IC₅₀, as células A2780 foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV). 5x10⁵ células foram semeadas sobre lamínulas 18x18mm colocadas no fundo da placa de 6 poços. Após adesão, as células receberam ou não o tratamento por 72h com os compostos nas concentrações do IC₅₀ contidas na tabela do item 4.7. Em seguida, o meio de cultivo foi descartado, as células foram lavadas duas vezes com PSB 1X, e depois fixadas com a solução fixadora Karnovsky 0,1M overnight. No dia seguinte, o fixador foi descartado e as células foram lavadas com tampão cacodilato 0,1M. As lamínulas foram incubadas no vapor de tetróxido de ósmio 2% por 30 minutos e depois foram lavadas com água destilada. Foi feita a desidratação em série crescente com acetona (50-100%) e, por último, as células passaram pelo ponto crítico e posterior metalização para serem analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (Jeol – Japão).

4.11 Análise da capacidade de formação de colônia após tratamento

Para esse teste, 1x10⁵ células A2780 foram semeadas por poço em placa de 24 poços. Após sua adesão, as células foram tratadas ou não (controle negativo) com os compostos selecionados na concentração máxima não citotóxica conforme tabela 2 por 72 horas. Depois do tempo de tratamento, as células que sobreviveram foram lavadas com PBS 1x e desaderidas das placas utilizando tripsina-EDTA. Cada grupo teste foi contado e 1x10³ células foram semeadas em placas de 6 poços e ficaram em cultivo por 7 dias, renovando o meio de cultivo a cada 2 dias.

As colônias que se formaram foram processadas para visualização em microscopia de luz. Os poços foram lavados duas vezes com PBS, as células fixadas com metanol puro por duas vezes durante banhos de 5 minutos. Após a fixação, as células

foram coradas por cinco minutos com cristal violeta 0,5% em água destilada. O corante foi retirado e os poços foram lavados abundantemente com água destilada.

As colônias que se formaram foram observadas em microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) com magnificação de 10x e as imagens foram capturadas com o auxílio do *software AxioVision* (Zeiss).

4.12 Análise do tipo de morte causada pelo tratamento

A análise do tipo de morte induzida pelos tratamentos foi realizada pela marcação das células tumorais de ovário, A2780, com Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI). $1,5 \times 10^5$ células foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24h, as células receberam os tratamentos por 72h com os compostos e concentrações máximas não citotóxicas indicados na tabela do item 4.7. Decorrido o tempo de tratamento, tanto as células aderentes como as flutuantes foram lavadas com PBS e ressuspensas em 100 μ L de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl_2 – pH 7,4) contendo 5 μ L de anexina-V, por 15 min a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, 400 μ L do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados aos tubos que foram mantidos no gelo e 500 μ L da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – para concentração final de 2 μ g/mL) foram adicionados posteriormente. As células foram incubadas por mais 5 minutos no gelo, lavadas com PBS e a aquisição dos dados foi feita no citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson) com o auxílio do *software CellQuest-Pro*. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.13 Análise do ciclo celular por marcação com iodeto de propídio (PI)

Células A2780 (4×10^5) foram semeadas em placas de 12 poços. Após sua adesão as células foram tratadas com os compostos nas concentrações do IC_{50} indicadas na tabela do item 4.7 por 24, 48h e 72h. Após o tratamento, as células foram fixadas com etanol 70% por 2h no gelo, lavadas com PBS e ressuspensas em solução de iodeto de propídio (0,1% de Triton X-100, 10 μ g/mL de PI e 100 μ g/mL de RNase livre de DNase) diluído em PBS, por 10 min a 37°C. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas, ressuspensas em PBS e 15.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo. O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinado utilizando-se a plataforma de ciclo celular do *software*

FlowJo. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em monoplicata.

4.14 Análise de proliferação celular

A análise da atividade proliferativa das células A2780 tratadas ou não (controle negativo) foi medida por citometria de fluxo por meio da marcação com CFSE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) na concentração final de 10 μ M (diluído em PBS/BSA 0,1%) segundo as recomendações do fabricante. As células previamente marcadas foram colocadas em cultura na concentração de $1,5 \times 10^5$ células por poço em placas de 12 poços. Após sua adesão, as células receberam o tratamento com os compostos indicados na tabela 2 na concentração do seu IC₅₀, calculado a partir de 72h de tratamento, ou receberam apenas meio de cultivo (controle). Para o controle experimental de células que não proliferaram, um grupo foi tratado com 10 μ M de colchicina por 1h a 37°C e, em seguida, os poços foram lavados com meio suplementado e deixados em cultura pelo mesmo tempo que todos os outros grupos experimentais. Após 72h de tratamento, as células foram removidas da placa e 20.000 eventos foram analisados em citômetro de fluxo. O cálculo da atividade proliferativa foi feito utilizando-se a plataforma de Proliferação Celular do *software FlowJo*.

4.15 Análise estatística

Os dados das análises quantitativas foram submetidos ao teste two-way ANOVA comparações múltiplas de Dunnett's para as médias ou à análise de variância simples (ANOVA) (entre três ou mais grupos). As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *Software GraphPad Prism* e os resultados foram expressos como Média \pm SEM. Valores de $P \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Triagem de citotoxicidade e definição de susceptibilidade celular aos tratamentos dos DHPMs.

O objetivo desta etapa foi a avaliação da atividade de 6 compostos análogos do monastrol sobre um painel de linhagens celulares tumorais humanas. Inicialmente o ensaio foi direcionado para o estabelecimento da sensibilidade entre 8 diferentes linhagens tumorais, para a identificação dos tipos celulares mais suscetíveis à atividade citotóxica dos compostos na menor concentração de tratamento (250 μ M). Para isso, foram utilizadas as células de linhagem MCF-7, MDA-MB-231, T47-D, A2780, DU-145, CACO-2, PANC-1, CAPAN-2. Após 24 horas de tratamento com os compostos em duas concentrações 250 μ M e 500 μ M, a viabilidade dessas células foi avaliada pelo ensaio do MTT. Ao analisar o efeito dos tratamentos, verificou-se que o composto TZD 06 induziu citotoxicidade em mais de 50% da população celular quando empregado na maior concentração (500 μ M) nas linhagens MCF-7, MDA-MB-231, A2780, DU-145, CACO-2 e PANC-1; já na concentração de 250 μ M somente as linhagens MDA-MB-231 e A2780 apresentaram redução de viabilidade maior que 50%. O composto TZD 07 induziu atividade citotóxica semelhante ao TZD 06 em ambas concentrações. O composto TZD 08 induziu citotoxicidade maior que 50% somente quando empregado na maior concentração de tratamento para a linhagem MDA-MB-231; A mesma atividade foi verificada para o composto TZD 09. Já no tratamento com os compostos TZD 14 e 15 foi possível observar que apenas as linhagens DU-145, CACO-2, PANC-1 foram sensíveis, mas somente nos ensaios em que os compostos foram empregados na sua maior concentração, enquanto a linhagem de câncer de ovário A2780 apresentou sensibilidade nas duas concentrações testadas (figura 15).

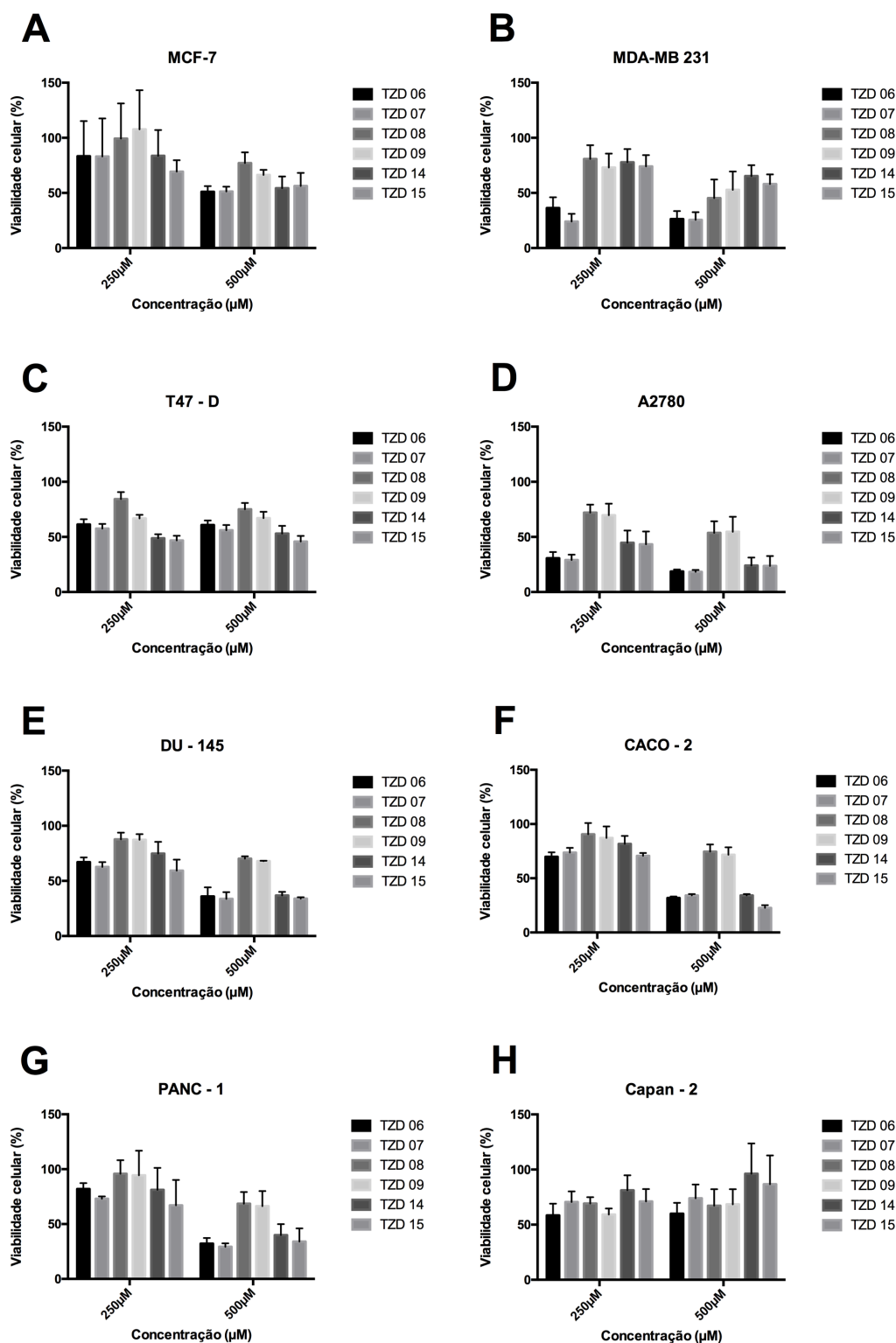


Figura 15. Avaliação da Viabilidade celular por MTT das linhagens tumorais. Gráficos de viabilidade das linhagens MCF-7(A), MDA-MB-231(B), T47-D(C), A2780(D), DU-145(E), CACO-2(F), PANC-1(G), CAPAN-2(H) após 24 horas de tratamento. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas.

Para os compostos TZD 06 e TZD 07, que induziram citotoxicidade para as linhagens MDA-MB-231 e A2780 na menor concentração, foi calculada a concentração inibitória para 50% da população celular (IC_{50}) para os três tempos avaliados (24, 48 e 72 horas). A concentração inibitória nos três tempos também foi calculada para os compostos TZD 14 e 15, que induziram citotoxicidade considerável na linhagem A2780. Para esse cálculo, as linhagens foram incubadas com os compostos nas concentrações de 250 μ M, 200 μ M, 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M por 24, 48 e 72 horas e a viabilidade foi avaliada também pelo ensaio do MTT (figuras 16, 17 e 18).

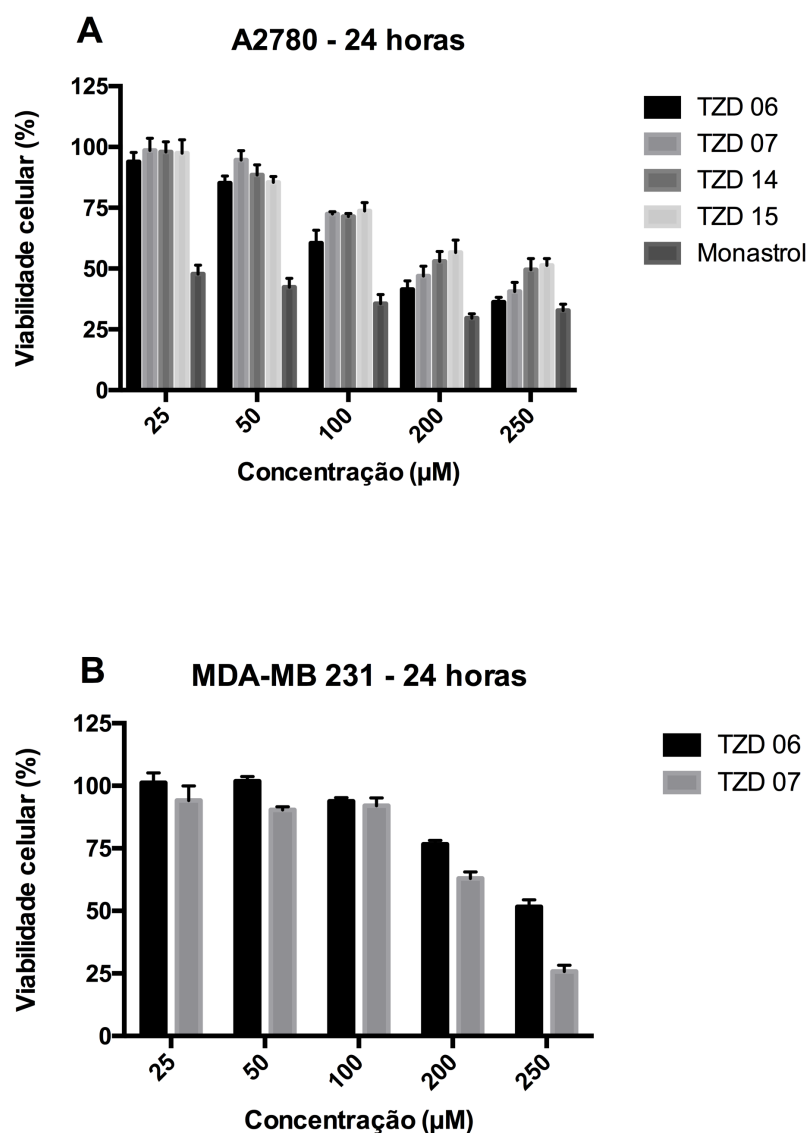


Figura 16. Avaliação da viabilidade celular por MTT das linhagens MDA-MB-231 e A2780 após 24 horas de tratamento com emprego de concentrações decrescentes dos compostos. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em

percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas por 24 horas.

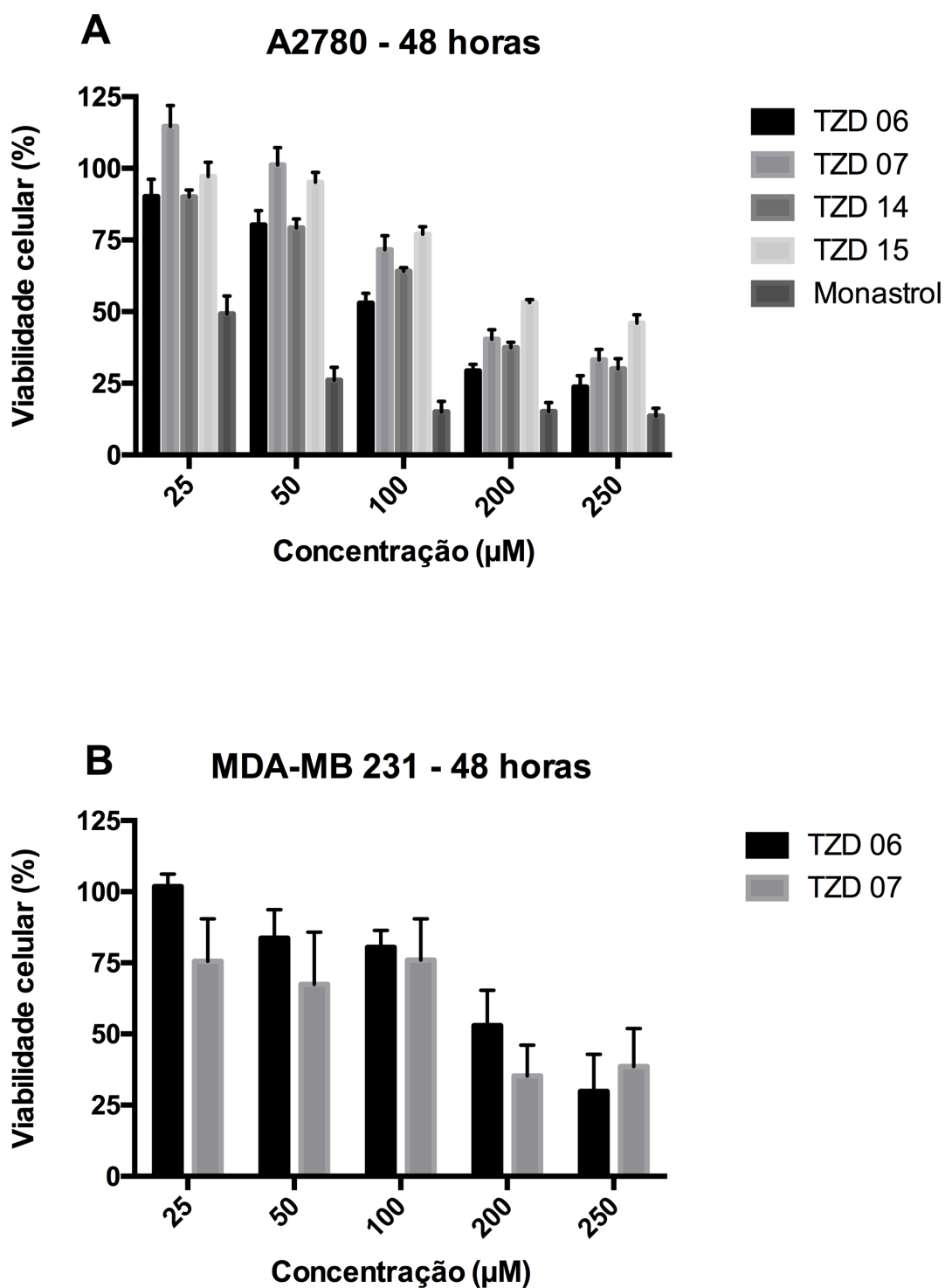


Figura 17. Avaliação da viabilidade celular por MTT nas linhagens MDA-MD-231 e A2780 após 48 horas de tratamento com emprego de concentrações decrescentes dos compostos. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas por 48 horas.

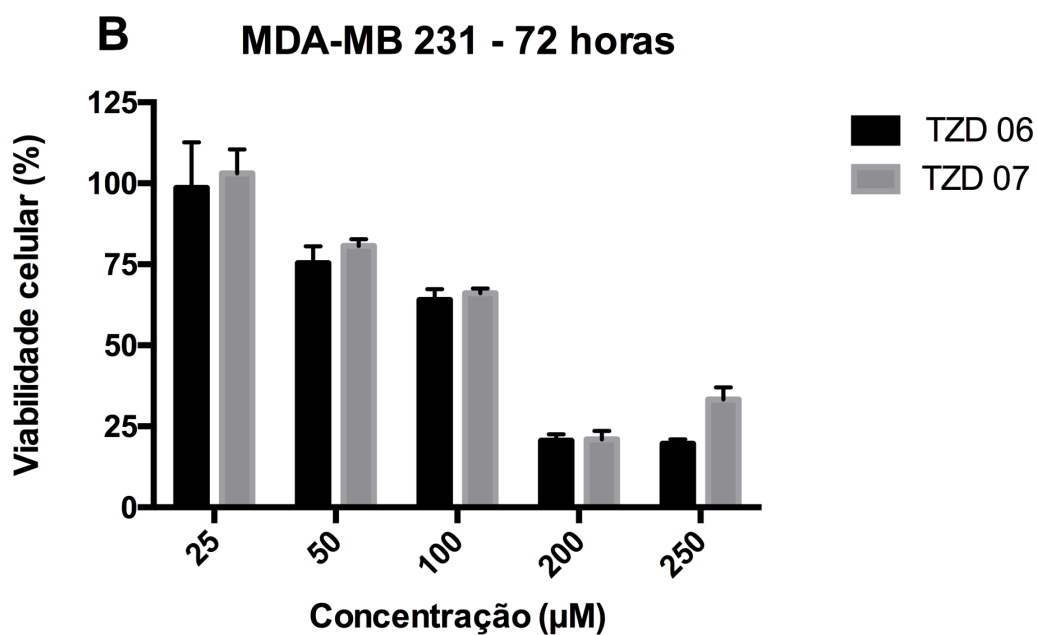
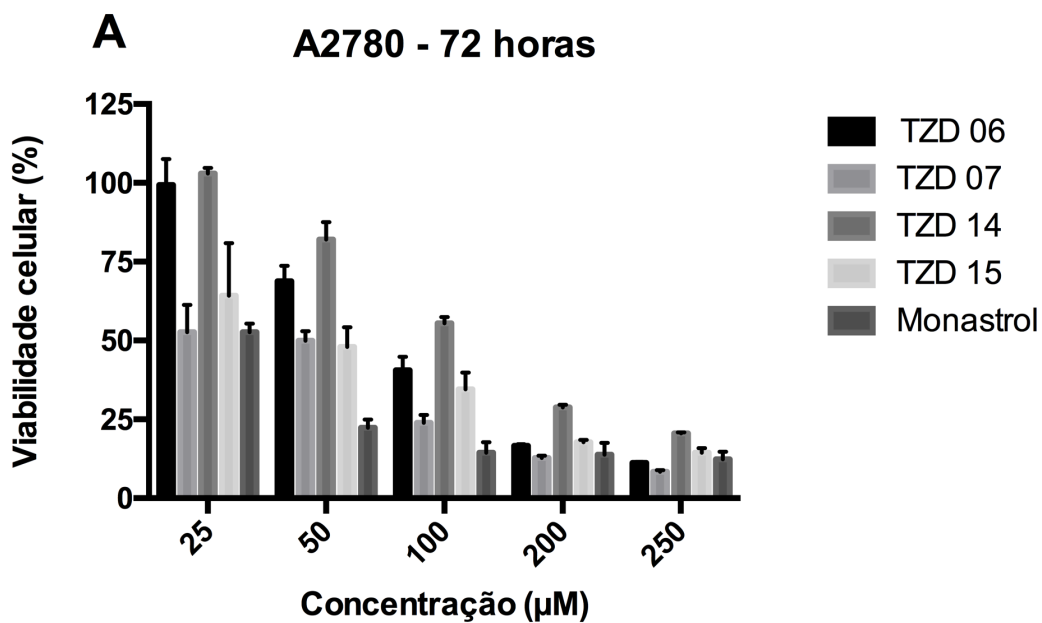


Figura 18. Avaliação da viabilidade celular por MTT nas linhagens MDA-MD-231 e A2780 após 72 horas de tratamento com emprego de concentrações decrescentes dos compostos. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com os 6 compostos nas concentrações indicadas por 72 horas.

Os dados gerados pelos resultados destes experimentos nos permitiram concluir que os efeitos citotóxicos observados são tempo dependentes e, por isso, a concentração inibitória 50 para o tempo de 72h foi a escolhida para a realização dos demais experimentos (Tabela 3).

Tabela 3. IC₅₀ estabelecida para os 4 compostos pré-selecionados e o monastrol. A tabela apresenta o IC₅₀ calculado para 72h horas de tratamento. *A concentração inibitória 50 (IC₅₀) do monastrol para linhagem MDA-MB-231 para o mesmo período são dados já publicados pelo nosso grupo (Guido *et al.*, 2015).

COMPOSTO	MDA-MB- 231 (IC₅₀)	A2780 (IC₅₀)
TZD 06	88,45 µM	69,98 µM
TZD 07	92,98 µM	29,47 µM
TZD 14	-	83,71 µM
TZD 15	-	76,70 µM
Monastrol	113,9 µM*	44,25 µM

Para a definição da dose máxima não citotóxica dos compostos selecionados de acordo com as linhagens, foram realizados testes de viabilidade celular adicionais com fibroblastos, extraídos de polpa dentária humana, e com células da linhagem de veia endotelial umbilical humana, HUVEC. Nestes experimentos foram empregadas as concentrações de 250µM a 25µM por um período de 72 horas de incubação com os compostos (Figura 11). A concentração de cada grupo de tratamento que apresentou a maior diferença comparada à linhagem tumoral foi selecionada para os próximos experimentos, conforme descrito na tabela do item 4.7.

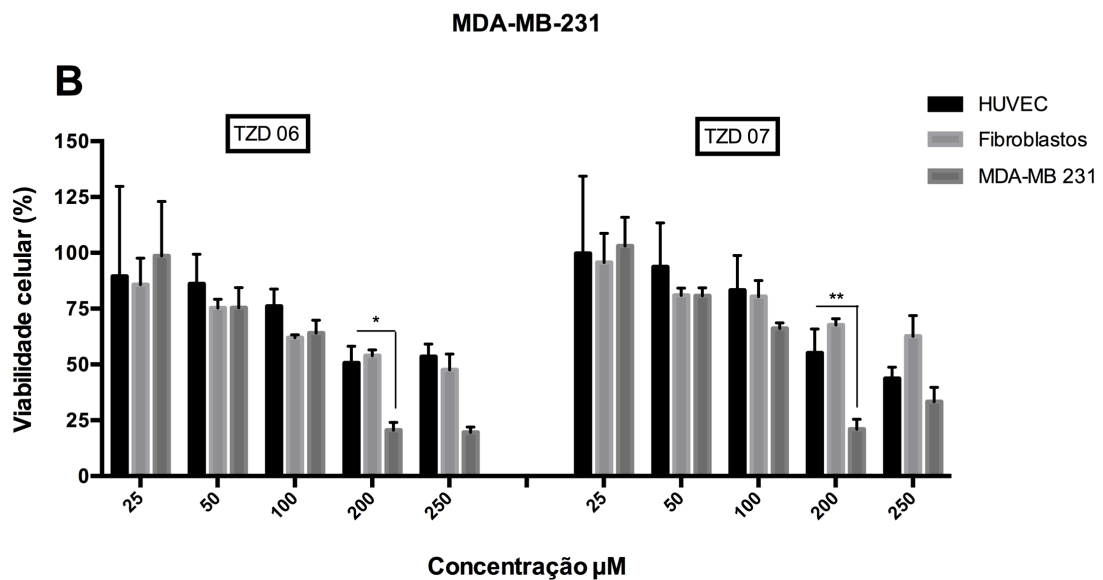
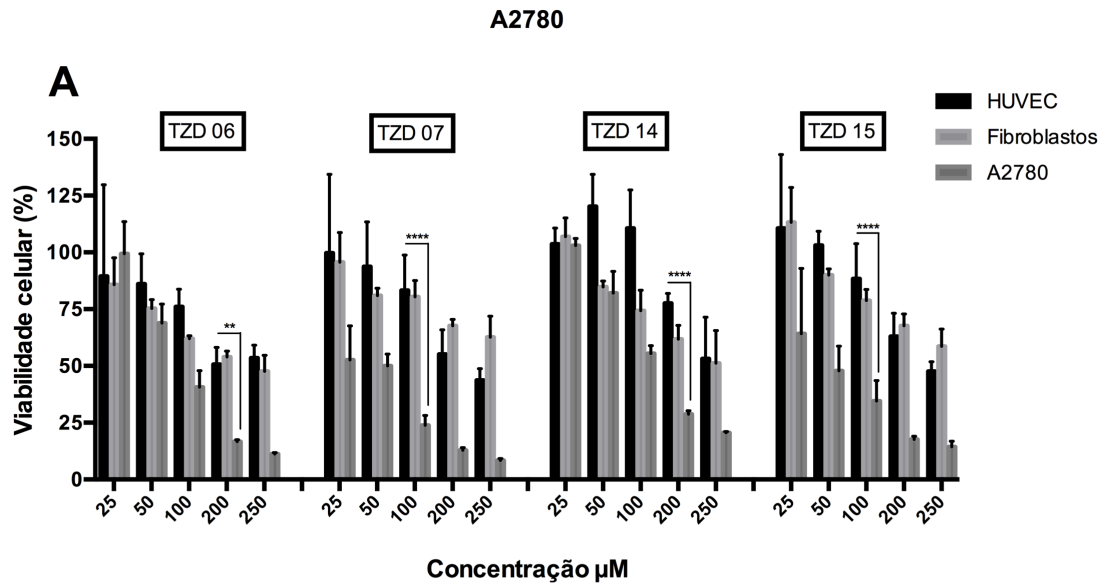


Figura 19. Avaliação da citotoxicidade em células normais dos derivados das DHPMs. Gráfico A representa a linhagem A2780 e gráfico B a linhagem MDA-MD-231. As barras representam a viabilidade celular em percentual para cada linhagem estudada após o tratamento com TDZ 06, TZD 07, TZD 14 e TZD 15 nas concentrações indicadas por um período de 72 horas. **** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$ e * $P < 0,05$ comparados ao tratamento dos fibroblastos e HUVEC para cada concentração.

A linhagem A2780 foi a escolhida para seguir com os testes posteriores devido a ter apresentado sensibilidade a um maior número de compostos e porque quando comparada às linhagens celulares normais as diferenças nas concentrações necessárias para produzir citotoxicidade são estatisticamente mais significativas em favor das células de adenocarcinoma de ovário (A2780).

5.2 O tratamento com derivados de DHPM induz alterações morfológicas em células tumorais de ovário (A2780)

Dos compostos selecionados no ensaio de viabilidade, todos eles foram capazes de causar alterações na morfologia das células A2780 tanto em 24, quanto em 48 e 72 horas de tratamento (Figura 20). É possível notar em todos os grupos que há um menor número de células aderidas, característica observada com mais intensidade nas amostras tratadas com o composto TZD 06 (Figura 20, letras G, H e I). Essa redução nos sugere que ou as células morreram e/ou pararam sua proliferação devido a ação do tratamento. Os compostos TZD 06 e TZD 14 são os que induziram as alterações mais significativas, dentre elas a redução no tamanho das células e a perda dos pontos de adesão focal, principalmente após 72 horas (Figura 20, letras I e O respectivamente). O tratamento com o TZD 15 induziu um aumento do volume das células, as quais ficaram com aspecto mais arredondado (Figura 20, letra R), enquanto o tratamento com o TZD 07 foi o que causou menos alterações (Figura 20, letras J, K e L) comparado ao controle negativo de células não tratadas (Figura 20, letras A, B e C). Porém, ainda assim, é possível notar que após o tratamento com o TZD 07 uma menor quantidade de células proliferou (Figura 20, letra L).

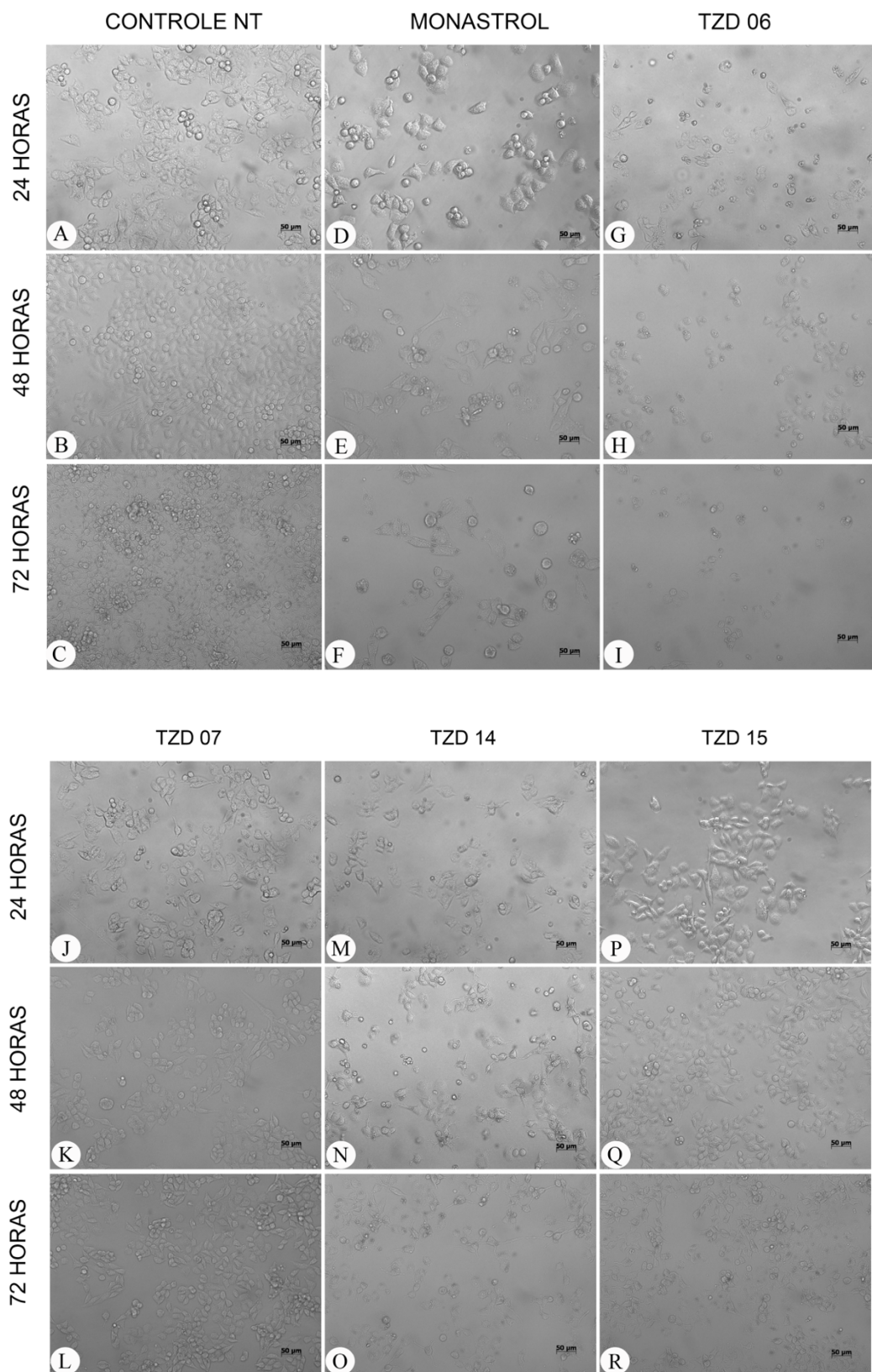


Figura 20. Avaliação morfológica da linhagem A2780 após 24, 48 e 72 horas de tratamento com os derivados de DHPMs selecionados (IC_{50}). As linhas de imagens representam o período de tratamento e as colunas de imagens representam os controles negativo e positivo (monastrol) e os demais compostos testados. TDZ 06 e TDZ 14 induziram as modificações morfológicas mais expressivas (imagens H, I, N e O). Barras de referência de 50 μ M.

Na avaliação realizada com auxílio do microscópio eletrônico de varredura, foi possível confirmar a redução dos pontos de adesão focal em comparação com o controle negativo, principalmente nos tratamentos com o TZD 06 e o TZD 15. Além disso, verificou-se que as células que foram tratadas com os compostos TZD 15 apresentavam significativas alterações morfológicas da superfície de suas membranas plasmáticas, aspecto mais rugoso/esponjoso. Algumas imagens sugerem uma profunda perda de estabilidade destas membranas uma vez que as células estão com suas membranas parcialmente extraídas (imagem F figura 21). Também, foi observado uma significativa retração do citoplasma resultado parecido com o observado quando as mesmas células são tratadas com o monastrol. Os tratamentos das células realizados com os compostos TZD 06, 07 e 14 produziram projeções na membrana plasmática compatíveis com “*blebs de membrana*”, fenômeno observado nas fases tardias do processo de morte celular por apoptose.

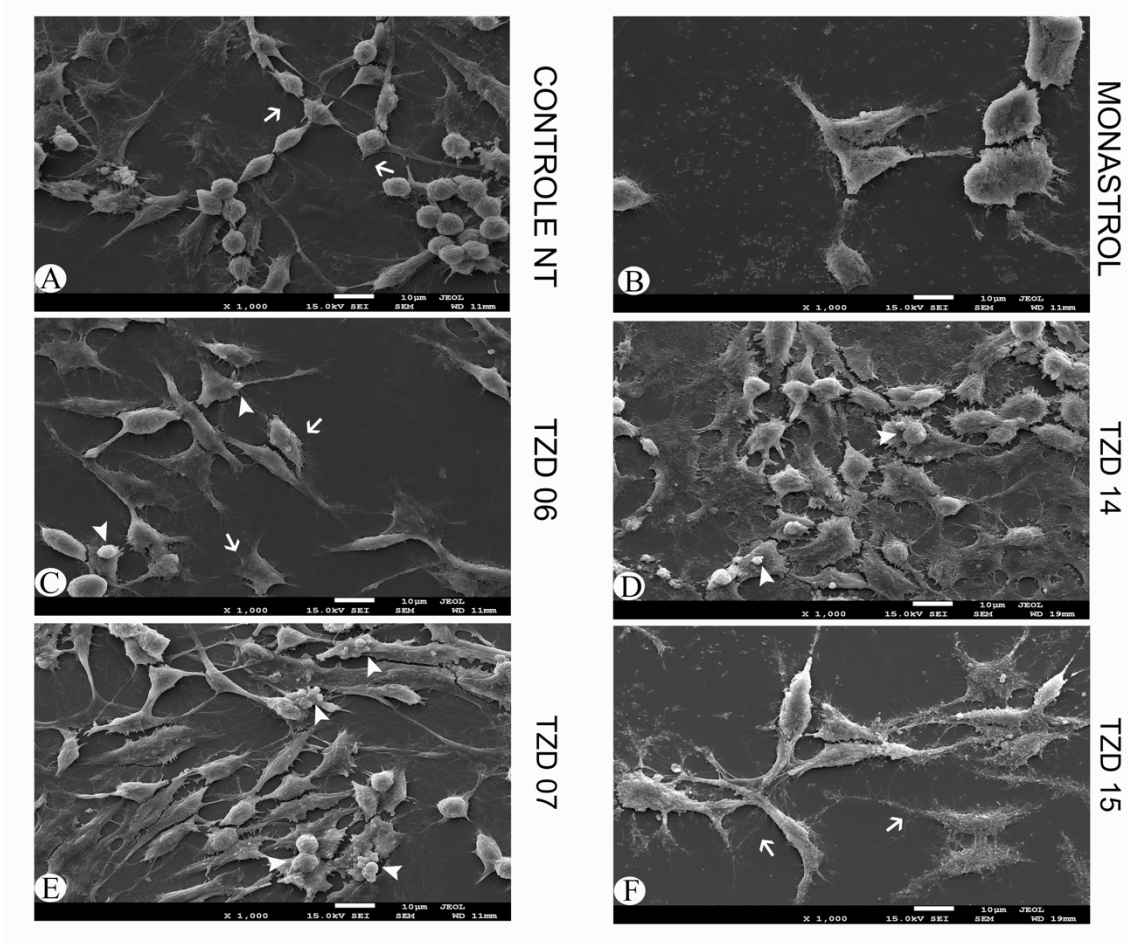


Figura 21. Avaliação morfológica da linhagem A2780 após 72 horas de tratamento com os derivados de DHPMs selecionados (IC_{50}). A imagem (A) apresenta os pontos de adesão da célula (setas) ao substrato bem preservados mesmo em regiões de acúmulo celular. Imagem (B), (C) e (F) mostra uma significativa redução dos pontos de adesão sendo que na imagem (B) observamos alterações em que a superfície da

célula se apresenta mais rugosa. Na imagem (F) as cabeças de setas mostram células com a membrana parcialmente extraída. Imagens (C), (D) e (E) apresentam células com alterações em sua membrana (blebs) condizente com processo de apoptose (cabeça de seta). Barra de referência de 10 μm .

5.3 O tratamento realizado com os análogos do monastrol afeta a capacidade de sobrevivência e formação de colônias pelas células A2780

O ensaio de formação de colônia, estabelecido há mais de 50 anos, é um ensaio *in vitro* de sobrevivência celular baseado na sua habilidade de proliferar e formar colônias. Após 72 horas de tratamento das células A2780 com os compostos nas concentrações máximas não citotóxicas, as células sobreviventes foram novamente plaqueadas e deixadas em cultivo por uma semana. As células foram então fixadas e coradas para obtenção de imagens no microscópio óptico. Conforme observado na Figura 22, todos os tratamentos interferiram de forma expressiva na formação das novas colônias, sendo os compostos TZD 06 e TZD 14 os que inibiram de forma mais expressiva a formação de colônia.

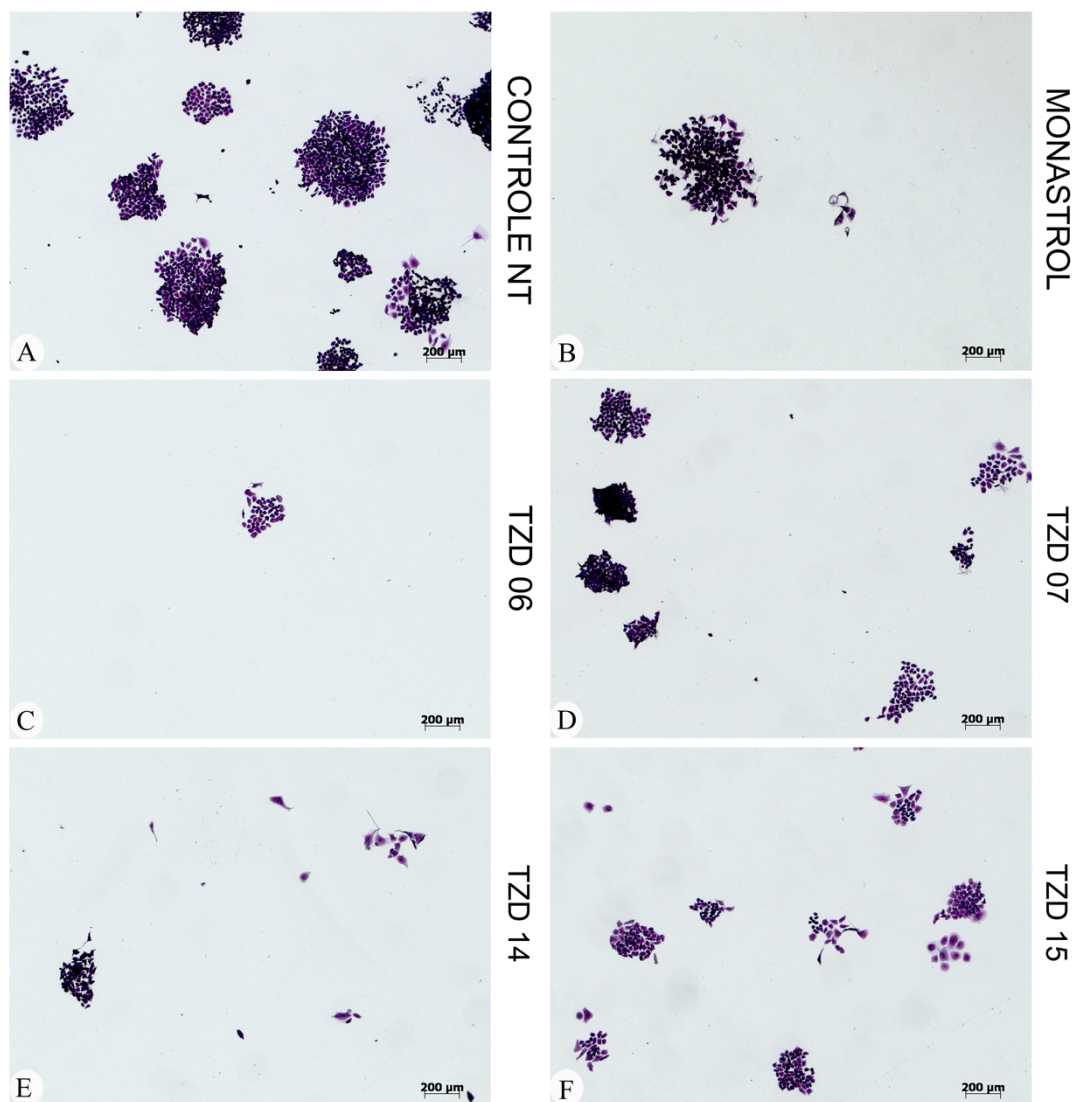


Figura 22 Efeito dos derivados de DHPMs selecionados na formação de colônia de células A2780 (dose máxima não citotóxica, 72h). Imagem (A) mostra a capacidade plena na formação de colônias, Imagem (B) mostra a perturbação da formação de colônia induzida pelo monastrol (controle positivo). Imagens (C-F) mostram a interferência induzida pelos compostos testados. Imagens (C) e (E) representam a perda mais acentuada da capacidade de formar colônias por estas células. As colônias formadas pelas amostras tratadas (imagens C-F) foram menores que as formadas pelas amostras não tratadas (imagem B). Barras de referência 200µM.

5.4 Confirmação da atividade inibitória da cinesina Eg5, os derivados de DHPMs 6, 7, 14 e 15 induzem a formação de fusos mitóticos monoastrais

Para o ensaio de confirmação da atividade dos TZDs sobre as cinesinas Eg5, foi realizada uma imunomarcagem fluorescente (anticorpo anti- α -tubulina) para verificar se os compostos testados conservaram a atividade de formação da bipolaridade. A inibição desta proteína impede a migração dos centrosomos para os polos das células, interferindo de forma destrutiva com a organização do fuso mitótico, levando a formação de um clássico fuso monoastral. Utilizando a concentração máxima não citotóxica de cada

composto, foi possível verificar a formação dos fusos monoastrais nas células que receberam o tratamento por apenas 24 horas. Esta evidência morfológica confirma a atividade destes derivados como similar à ação do monastrol. Todos os 4 compostos testados induziram a formação do fuso monoastral semelhante ao induzido pelo monastrol conforme mostrado na Figura 23.

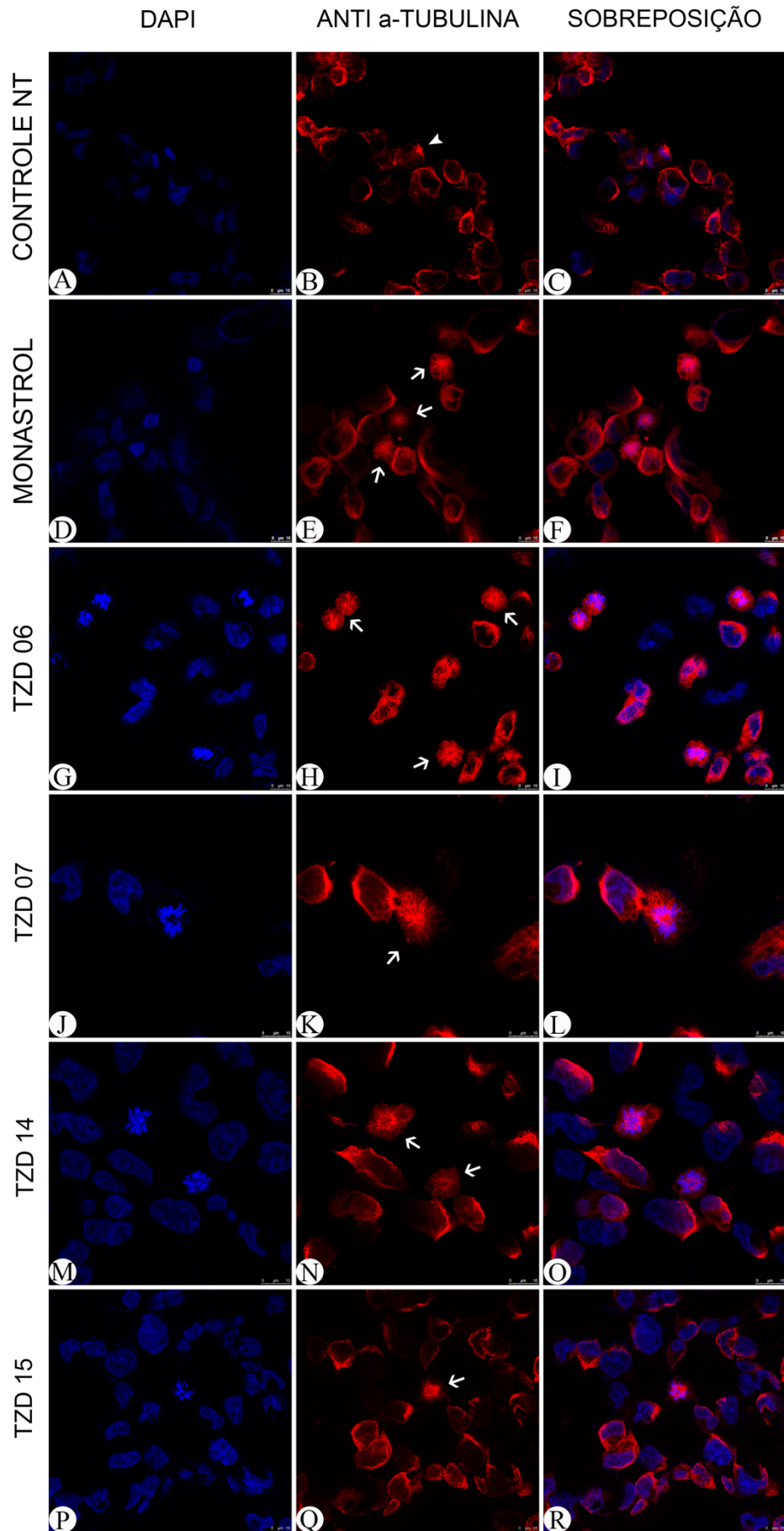


Figura 23. Confirmação de atividade dos TZDs pela indução do fuso mitótico monoastral nas células A2780 (concentração máxima não citotóxica). Imagens (A-C) apresentam fusos mitóticos normais (cabeça de seta). Imagens (D-F) apresentam o fuso mitótico monoastral clássico (setas). Imagens (G-R) mostram a indução do fuso monoastral pelos compostos TDZ 06, 07, 14 e 15 respectivamente. α -tubulina em vermelho e DNA corado com DAPI (azul). Barras de referência de 10 μ m.

5.5 O composto TZD 06 induz morte celular principalmente por apoptose

Com o intuito de identificar o tipo de morte celular induzida pelo tratamento com os derivados de DHPM, as células A2780 foram tratadas por 72 horas com a dose máxima não citotóxica conforme tabela do item 4.7. Após o período de incubação com os compostos, as células foram marcadas com Anexina-V e iodeto de Propídio e avaliadas por citometria de fluxo. Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em apoptose inicial, em apoptose tardia, em necrose e também as células viáveis.

O composto que induziu a morte na maior quantidade de células foi o composto 6, com o qual foi possível verificar prioritariamente a indução da apoptose. Assim como o composto 6, o composto 14 também induziu a apoptose, porém em menor escala. Já os outros dois compostos, 7 e 15, através da quantidade de células analisadas, não foi possível verificar morte de quantidade significativa de células.

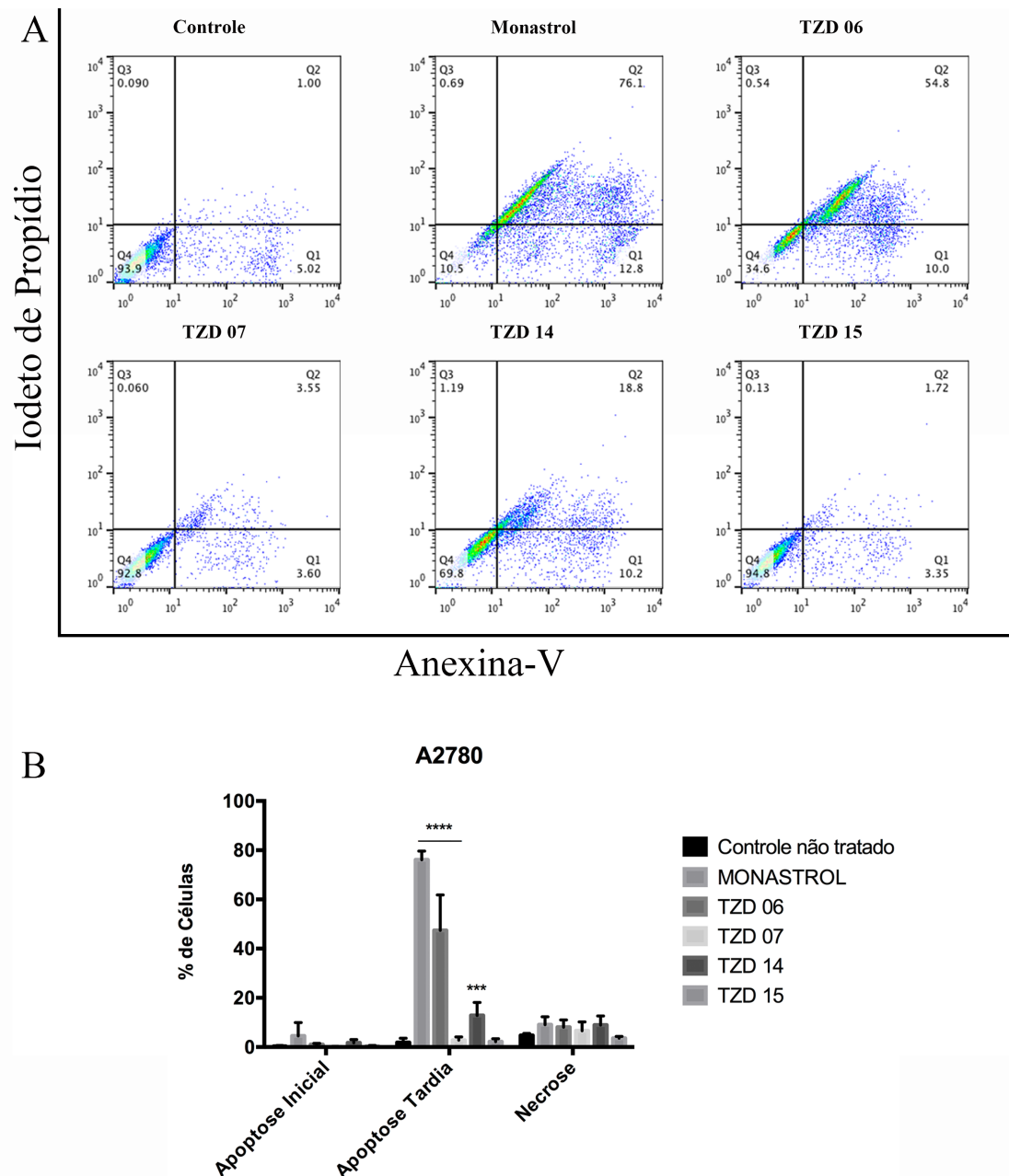


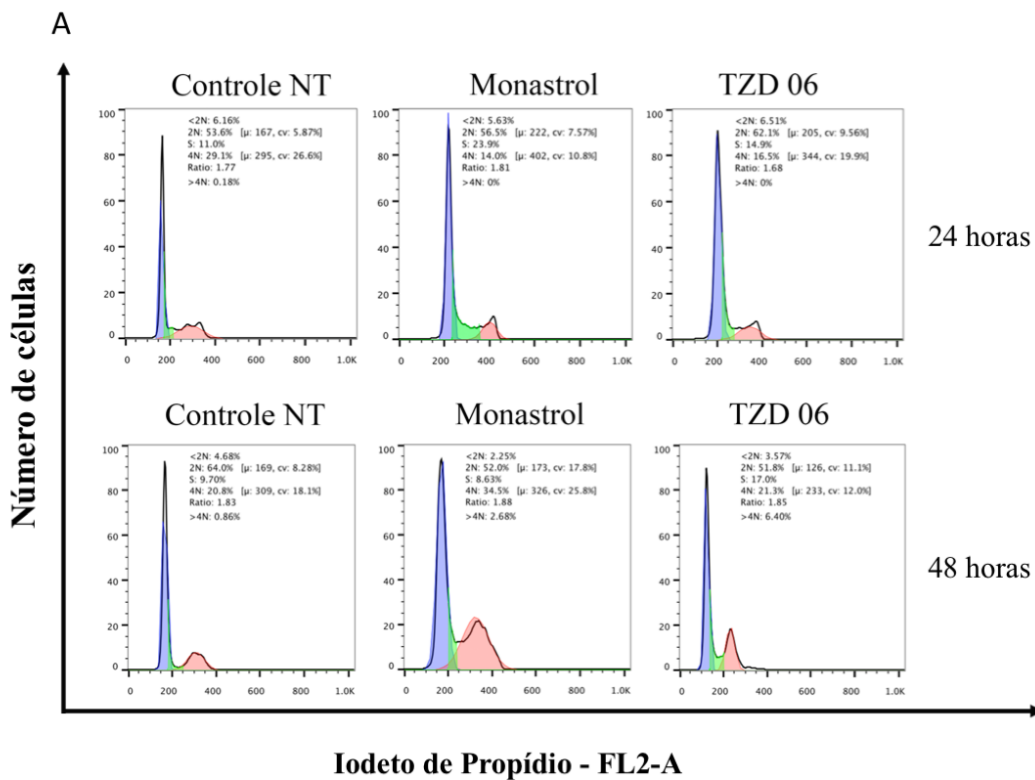
Figura 24. Avaliação do perfil de morte celular induzido pelos compostos TZDs (dose máxima não citotóxica 72 h). Imagem (A) distribuição das populações celulares de acordo com o perfil das marcações. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, inferior direito às células em apoptose inicial, superior esquerdo às células necróticas e o superior direito células em apoptose tardia. Figura (B) representação gráfica dos perfis de morte celular com tratamento estatístico. Os compostos induziram predominantemente a morte celular por apoptose. *** $P < 0,001$ e **** $P < 0,0001$ comparado ao controle NT.

5.6 Os derivados de DHPM induzem alterações sutis no perfil do ciclo celular em células A2780.

Para avaliar se os derivados influenciam na progressão do ciclo celular, as células A2780 foram tratadas por 24, 48 e 72 horas com a dose máxima não citotóxica e, após esse período, foram marcadas com iodeto de propídio para análise no citômetro de fluxo.

Esse marcador é um intercalante de DNA, e com isso a marcação presente na célula é diretamente proporcional à quantidade de DNA que essa célula possui. Assim, em análise por citometria de fluxo, pode-se quantificar as populações que estão em G0/G1 (2N de DNA); em G2/M (4N de DNA); e as que estão na fase S (quantidades intermediárias de DNA). Ainda, aquelas células cujo DNA está fragmentado apresentam uma quantificação de fluorescência abaixo do pico G0/G1, sendo então chamadas de pico sub-G1.

O tratamento por 72 horas inviabilizou o processamento das células para esse tipo de avaliação, fazendo com que ao final não fosse possível obter a quantidade mínima de células necessárias para esse tipo de análise. Nos tratamentos por 24 e 48 horas não foi observado alteração significativa na progressão do ciclo celular quando comparado com o controle negativo. Entretanto, apesar de não significativo, a partir de 48 horas já é possível verificar que os compostos TZD 14 e 15 levaram a um aumento da retenção de células na fase G2/M, figura 24.



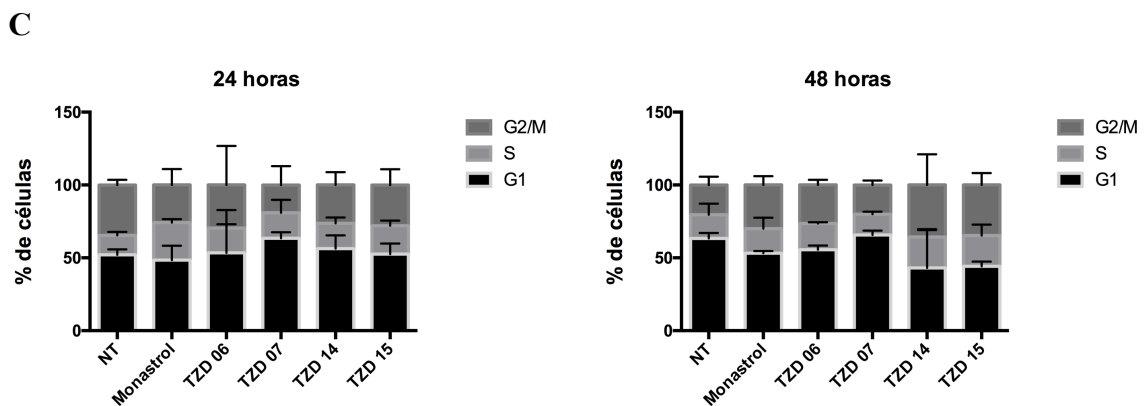
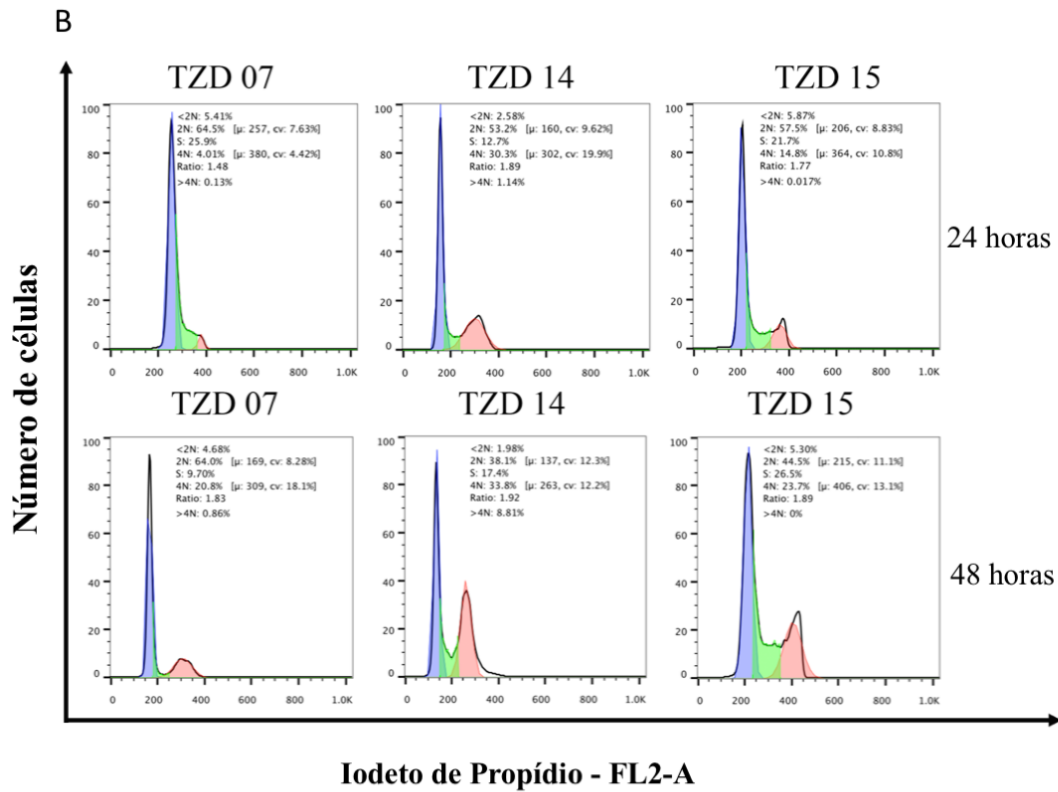


Figura 25. Avaliação do ciclo celular em células A2780 tratadas com TZDs (IC₅₀, 24 e 48 h). A) Histogramas das fases do ciclo celular, células não tratadas, Monastrol, TZD 06. B) Histogramas das fases do ciclo celular, TZD 07, TZD 14 e TZD 15. C) Quantificação do percentual de células em cada fase do ciclo celular. Os dados representam três experimentos independentes, expressos como a porcentagem média de células em cada fase do ciclo celular ± SEM. Embora visualmente seja possível identificar diferenças entre as fases do ciclo nos grupos controles e tratados, esta diferença não apresentou significância estatística.

5.7 Os derivados TZD 06, TZD 14 e TZD 15 inibem a proliferação das células tumorais de ovário

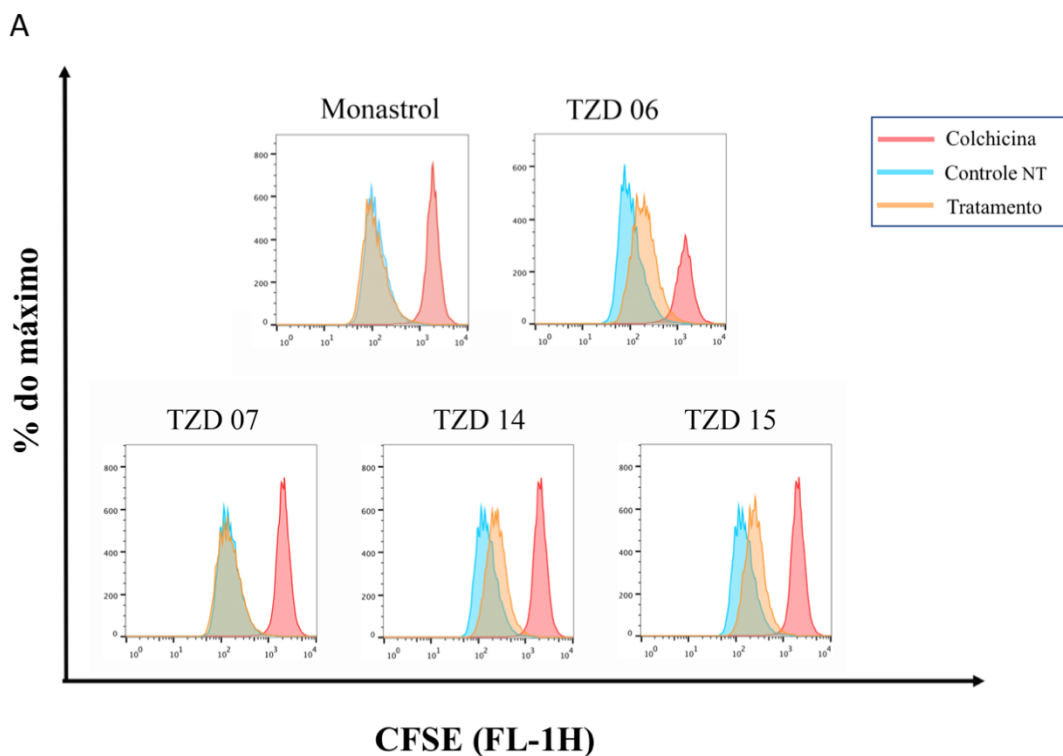
Após análise por citometria de fluxo, foi calculado o índice de proliferação das células A2780 previamente marcadas com o CFSE e tratadas com os compostos teste na concentração do IC₅₀ por 72 horas. O CFSE é um marcador que entra passivamente em células viáveis e, após sua clivagem por esterases citoplasmáticas, torna-se fluorescente.

Dessa forma, a cada divisão celular, uma célula divide seu conteúdo fluorescente para as células-filhas, de forma que cada geração subsequente fique com metade da fluorescência da geração anterior.

Os compostos TZD 6, 14 e 15 reduziram de forma estatisticamente significativa o índice proliferativo das células quando comparadas ao controle não tratado. Já o monastrol e o composto 7 não foram capazes de reduzir esse índice.

O resultado obtido com os compostos TZD 6, 14 e 15 é particularmente interessante uma vez que corrobora com o resultado do ensaio de formação de colônia, no qual os mesmos grupos de tratamento apresentaram atividade inibitória semelhante.

Além disso, deve-se levar em consideração que apesar de os compostos 14 e 15 não alterarem o ciclo e nem causarem morte por apoptose conforme esperado, os mesmos foram capazes de reduzir o índice proliferativo dessas células. Isso indica que eles provavelmente apresentem mais atividade citostática do que citotóxica para esse tipo celular.



B

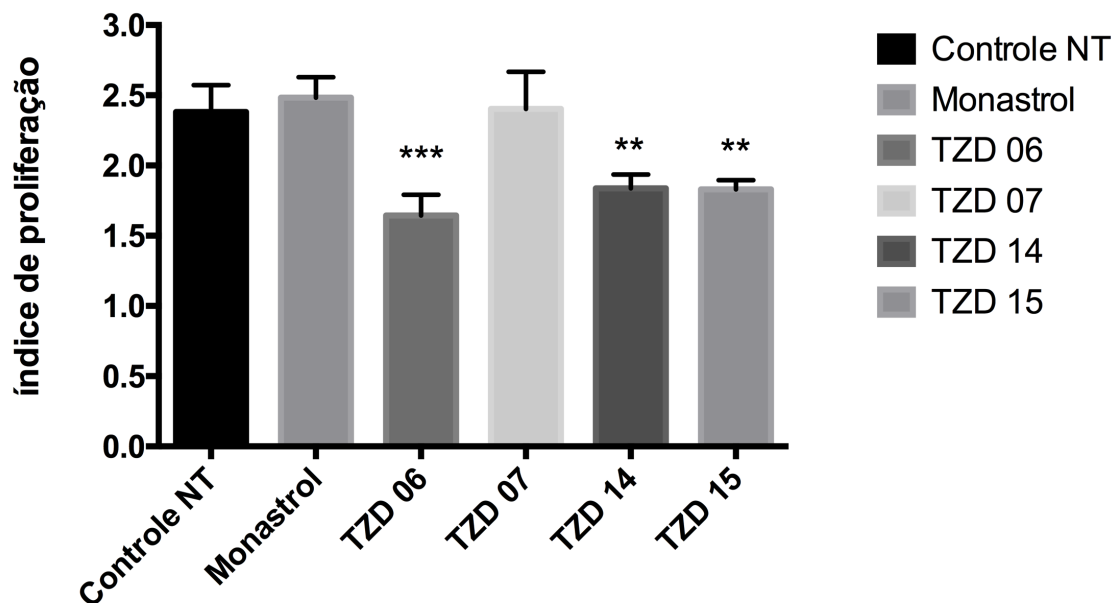


Figura 26. Células A2780 após 72 horas de tratamento com os compostos TZD 06, 14 e 15 sofrem redução significativa do índice de proliferação. A) Histogramas representativos da intensidade de fluorescência do CFSE. Controle de células não divididas (representado em vermelho); de células tratadas com os derivados de DHPM indicados (laranja) e de células não tratadas (azul). B) Avaliação quantitativa dos dados expressos como o índice de proliferação das células \pm SEM. Os compostos TZD 06, 14 e 15 inibiram de forma estatisticamente significativa a proliferação celular. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

6 DISCUSSÃO

Levando em consideração que a imortalidade replicativa é uma das principais características das neoplasias (Hanahan e Weinberg, 2011; Mohammad *et al.*, 2015), ou seja, a proliferação celular descontrolada que pode levar ao mais devastador agravo do câncer conhecido como metástase (Liotta e Stetler-Stevenson, 1991; Feller e Lemmer, 2011) o acúmulo cada vez maior de dados sobre a origem destes processos (Castronovo *et al.*, 1991; Eccles e Welch, 2007; Geiger e Peeper, 2009; Hu *et al.*, 2012) subsidiam mundialmente um grande esforço para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Vários agentes antimetabólicos vêm sendo desenvolvidos e avaliados contra o câncer (Cores *et al.*, 2014; Perez-Melero, 2014; Van Vuuren *et al.*, 2015). Porém, muitos deles apresentam uma limitação extremamente comum, estes compostos atuam em alvos moleculares conservados e essenciais a manutenção da vida de células normais (Jiang *et al.*, 2006; Kunal *et al.*, 2014). Este aspecto é o responsável por provocar nos pacientes as reações adversas que deterioram a qualidade de vida das pessoas em tratamento. Dentre os efeitos adversos mais comuns provocados por agentes amplamente empregados no tratamento do câncer podemos destacar como muito deletérios a neurotoxicidade, a anorexia, a fadiga muscular e a neutropenia (Tohgo *et al.*, 2002; Schiff *et al.*, 2009; Gilliam e St Clair, 2011; Hashiguchi *et al.*, 2015). Em busca da produção de compostos orgânicos que levem a um tratamento cujos alvos moleculares sejam mais específicos e com atividade conservadas em células tumorais, portanto que produzam menos efeitos adversos é que nosso grupo vem trabalhando na síntese e na avaliação dos derivados das DHPMs (Ramos *et al.*, 2013; Guido *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015). Dos compostos sintetizados pelo nosso grupo, cinco derivados das DHPMs (primeira geração de modificações) produziram uma significativa atividade antitumoral contra linhagens de câncer de mama (Ramos *et al.*, 2013; Guido *et al.*, 2015), com base nestas estruturas uma nova geração de derivados foi sintetizada (segunda geração de modificações) com intuito de melhorar a solubilidade dos compostos, manter a sua especificidade por cinesina Eg5 o que os tornam mais efetivos contra células tumorais e potencializar o seus efeitos citotóxicos.

Neste trabalho, avaliamos seis novos compostos de derivados dos DHPM's de segunda geração. A modificação introduzida nas moléculas foi a adição de uma cadeia lateral conforme previamente mostrado na introdução desta dissertação. Após a avaliação da atividade *in vitro*, foi observado que a adição destas cadeias laterais ao núcleo DHPM tiveram um impacto positivo na solubilidade dos compostos. No entanto, foi aleatória a

influência na sua atividade não sendo possível ainda prever, através da estrutura, qualquer impacto para a atividade ou seletividade do composto frente aos diferentes tipos celulares tumorais. Outros autores têm buscado uma via alternativa a experimentação direta *in vitro* e/ou *in vivo* para a predição de atividade utilizando simulações *in silico* (Bhat *et al.*, 2017; Cruz *et al.*, 2018; Elshaflu *et al.*, 2018; Wang e Yu, 2018). Como nosso grupo trabalha com um número reduzido de moléculas optamos por realizar uma triagem a partir de uma série de experimentos tradicionais *in vitro* deixando as avaliações *in silico* para a determinação de sítios de ligação nas moléculas alvo dos compostos selecionados. Utilizando o parâmetro de citotoxicidade, foi possível selecionar quatro compostos como sendo os mais promissores a partir das avaliações *in vitro* (TZD 06, TZD 07, TZD 14 e TZD 15), uma vez que estas moléculas produziram uma redução significativa da viabilidade celular em duas linhagens testadas e também em menores concentrações quando comparados aos seus pares e aos compostos de primeira geração produzidos e avaliados pelo nosso grupo (Guido *et al.*, 2015). O parâmetro de citotoxicidade é a escolha principal para a triagem da atividade de novos compostos propostos contra o câncer assim como para diversas outras doenças (Chari, 2008; Casi e Neri, 2015; Petrova *et al.*, 2015). A avaliação de citotoxicidade mais amplamente utilizada é baseada na avaliação da função redox das células (Mosmann, 1983; Śliwka *et al.*, 2016) e foi o parâmetro seguido nos nossos testes durante as fases iniciais deste trabalho.

Nossas análises apontaram para o modelo de células do câncer de ovário como as mais sensíveis a este grupo de compostos de forma que a maior parte das avaliações foram realizadas exclusivamente nestas células. Um ponto muito importante neste trabalho foi a determinação da conservação da atividade destes derivados em comparação com o monastrol, de forma a se estabelecer uma linearidade entre a primeira e a segunda geração destas moléculas. Para isso foi realizada a imunomarcção fluorescente de α -tubulina em células de ovário tratadas com os compostos. Nossos resultados nos permitem afirmar que a atividade dos compostos aqui testados foi conservada em relação a primeira geração dos derivados (Guido *et al.*, 2015) sendo semelhante a observada com o uso do monastrol, que produz a inibição da cinesina Eg5 (Mayer *et al.*, 1999; Kapoor *et al.*, 2000). Conforme já descrito, a inibição desta proteína provoca a formação de fusos monoastrais e induzem as células à morte celular por apoptose ou por catástrofe mitótica (Guido *et al.*, 2015)(Nakai *et al.*, 2009; Stolz *et al.*, 2015). Cada vez mais, diversos grupos em todo o mundo vêm produzindo derivados das DHPMs com objetivo de empregá-los no tratamento do câncer (Treptow *et al.*, 2015; Matias *et al.*, 2016; Han Yu *et al.*, 2017; Geng

et al., 2018), estes trabalhos validam o nosso esforço de produção e avaliação destes tipos de moléculas.

Em comparação com o resultado obtido na avaliação de indução de fuso monoastral com os derivados de primeira geração das DHPMs que foram DHPM 4bt [800 μ M], DHPM 4m [1mM], DHPM 4x [800 μ M] e DHPM 4bc [1mM] em células MCF-7 (Guido *et al.*, 2015), a modificação na estrutura química dos derivados de segunda geração formaram moléculas mais eficientes na indução deste fenótipo. Os compostos TZD 06 [200 μ M], 07 [100 μ M], 14 [200 μ M] e 15 [100 μ M] levaram a formação de fuso monoastral em células do câncer de ovário A2780 em divisão mesmo quando empregados em concentrações bem menores.

Com a confirmação indireta da atividade inibidora da cinesina Eg5 pela formação dos fusos monoastrais, era de se esperar que os mesmos compostos induzissem a morte das células por apoptose ou por catástrofe mitótica, (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008; Guido *et al.*, 2015) uma vez que a inibição da cinesina Eg5 previne a separação dos cromossomos, o que ativa o ponto de checagem do fuso mitótico retendo as células na fase G2/M do ciclo celular e, desencadeia a morte das células por apoptose (Nakai *et al.*, 2009; El-Nassan, 2013). Células apoptóticas são removidas do tecido pelos macrófagos e neutrófilos e a interação destas células com estes fagócitos induzem a produção e liberação de mediadores químicos anti-inflamatórios, fazendo com que ocorra um processo de morte “limpa” (Kerr *et al.*, 1972; Kerr *et al.*, 1994; Khan *et al.*, 2014). A indução da apoptose mediada por moléculas com atividade antitumoral é de extrema relevância por se assemelhar com os processos fisiológicos de renovação tecidual (Renehan *et al.*, 2001; Khan *et al.*, 2014). Nossos resultados indicaram que dos tratamentos com os quatro compostos, os derivados TZD 06 e TZD 14 foram capazes de induzir a morte celular por apoptose. A catástrofe mitótica, também observada em células tumorais tratadas com derivados das DHPMs (Guido *et al.*, 2015), não pode ser identificada em nossos ensaios. Este tipo de morte celular é caracterizada por alterações nucleares que podem levar a multinucleação e/ou micronucleação (Vakifahmetoglu *et al.*, 2008; Mc Gee, 2015; Denisenko *et al.*, 2016).

Uma vez já descrito que a inibição da cinesina Eg5 retêm as células na fase G2/M da mitose, avaliamos se o tratamento com os quatro compostos selecionados causaria alteração do ciclo celular nas células A2780. Entretanto, assim como no trabalho realizado por Kapoor e colaboradores (Kapoor *et al.*, 2000), não foi observada inibição da progressão pelas fases S e G2 do ciclo celular. Possivelmente, a parada mitótica

causada pelos TZDs testados é semelhante a do monastrol induzindo rapidamente a remoção das células por apoptose o que impede a sua detecção ou ainda podendo ser rapidamente reversível (Marques *et al.*, 2016) nas células resistentes, não sendo possível observar alterações do ciclo.

Apesar de não gerar alteração na progressão do ciclo celular, três dos quatro compostos testados reduziram significativamente a proliferação das células. Este efeito citostático foi bastante significativo principalmente para o composto TZD 06. A indução da inibição da atividade proliferativa em células tumorais é um dos alvos encontrados em todos os agentes antitumorais empregados por ser o descontrole da proliferação celular um evento essencial para a carcinogênese estando ainda intimamente associada ao processo de metástase (Eccles e Welch, 2007; Geiger e Peeper, 2009).

Em nossos ensaios para avaliar a formação de colônias de células tumorais, os compostos TZD 06, 14 e 15 foram os que reduziram de forma mais acentuada a formação de colônias das células do carcinoma de ovário. A avaliação da formação de colônias por células tumorais é um teste amplamente empregado (Zips *et al.*, 2005; Subramaniam *et al.*, 2011; Ho *et al.*, 2018) e está diretamente relacionado com a capacidade proliferativa destas células. Sendo assim, os nossos resultados relativos a inibição da formação de colônia além de evidenciar este aspecto dos compostos testados também corrobora com os nossos resultados de inibição da proliferação celular.

Tendo em vista que esse tipo de células tumorais apresenta mecanismos que levam a resistência aos quimioterápicos, o efeito citostático produzido por esses compostos os torna potenciais candidatos para o emprego em ensaios adicionais *in vivo* visando a sua proposição para o tratamento do câncer de ovário.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com este trabalho nos levam a concluir que dos 6 compostos testados, 4 apresentam toxicidade significativa para as células A2780 e 2 deles para as células MDA-MB-231. Dos 4 compostos testados na linhagem A2780, todos causaram alterações na morfologia das células e reduziram a capacidade de formação de colônias após receberem o tratamento por 72 horas. Além disso, foi possível confirmar indiretamente a atividade inibitória da cinesina Eg5 através da detecção por imagem da formação do fuso monoastral a partir de ensaios de imunomarcagem fluorescente de α -tubulina. Dentre os compostos testados, apenas o composto TZD 06 induziu morte celular por apoptose de forma estatisticamente significativa. No entanto, nenhum dos compostos avaliados foi capaz de provocar alterações nas fases do ciclo celular de forma expressiva. Todos os compostos selecionados inibiram a proliferação celular com exceção do composto TZD 07. Finalmente, acreditamos que diversas avaliações complementares devam ser realizadas com os compostos TZD 06, 14 e 15 a fim de definir diversos parâmetros quantitativos como taxa de inibição das cinesinas Eg5, análise *in silico* de sua associação à cadeia polipeptídica das cinesinas Eg5, dentre outras. Estes estudos poderão subsidiar o desenho e síntese de outras classes de derivados (terceira geração) ou a continuidade destes estudos no modelo *in vivo*.

8 QUADRO RESUMO DOS RESULTADOS

	TZD 06	TZD 07	TZD 14	TZD 15
Alteração da morfologia celular	SIM	SIM	SIM	SIM
Alteração na capacidade de formação de colônias	SIM	SIM	SIM	SIM
Formação de fuso monoastral	SIM	SIM	SIM	SIM
Morte celular por apoptose	SIM	NÃO	SIM	NÃO
Alteração do ciclo celular	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
Inibição da proliferação	SIM	NÃO	SIM	SIM

Tabela 4. Quadro resumo dos resultados obtidos neste trabalho.

9 PERSPECTIVAS

As perspectivas para continuidade deste trabalho são:

- 9.1 Avaliar as características que os tratamentos com os compostos TZD 06 e TZD 07 produziram nas células da linhagem MDA-MB-231;
- 9.2 Avaliar o efeito dos derivados TZDs sobre a neovascularização no modelo células HUVEC e sobre a vascularização no modelo de membrana *in vivo*;
- 9.3 Analisar *in silico* por dinâmica molecular a interação entre os compostos selecionados e a cinesina Eg5.
- 9.4 Avaliar *in vitro* a inibição das cinesinas pelos compostos selecionados.
- 9.5 Avaliar a interferência com a migração e invasibilidade das células tumorais causada pelos derivados selecionados;
- 9.6 Avaliar o perfil de células tronco tumorais após as amostras serem tratadas com os compostos selecionados.

10 REFERÊNCIAS

ABDOU, A. M. et al. Useful four-carbon synthons en route to monastrol analogs. **Tetrahedron**, v. 71, n. 1, p. 139-146, 2015/01/07/ 2015.

ABDULFATAH, E. et al. Gynecologic Cancers: Molecular Updates 2018. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 38, n. 2, p. 421-438, 2018/06/01/ 2018.

ABNOUS, K. et al. Synthesis and molecular modeling of six novel monastrol analogues: evaluation of cytotoxicity and kinesin inhibitory activity against HeLa cell line. **DARU Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 1, p. 70, 2013/12/19 2013.

AKHAJA, T. N.; RAVAL, J. P. 1,3-dihydro-2H-indol-2-ones derivatives: Design, Synthesis, in vitro antibacterial, antifungal and antitubercular study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 11, p. 5573-5579, 2011/11/01/ 2011.

ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415-421, 08/14 2013.

BAHEKAR, S. S.; SHINDE, D. B. Synthesis and anti-inflammatory activity of some [4,6-(4-substituted aryl)-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydro-pyrimidin-5-yl]-acetic acid derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, n. 7, p. 1733-1736, 2004/04/01/ 2004.

BAI, J.; LI, Y.; ZHANG, G. Cell cycle regulation and anticancer drug discovery. **Cancer Biology & Medicine**, Tianjing China, v. 14, n. 4, p. 348-362, 03/31/received 10/13/accepted 2017.

BATES, D.; EASTMAN, A. Microtubule destabilising agents: far more than just antimitotic anticancer drugs. **Br J Clin Pharmacol**, v. 83, n. 2, p. 255-268, Feb 2017.

BERTOLI, C.; SKOTHEIM, J. M.; DE BRUIN, R. A. M. Control of cell cycle transcription during G1 and S phases. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 8, p. 518-528, 2013.

BHAT, J. et al. In Silico Screening and Binding Characterization of Small Molecules toward a G-Quadruplex Structure Formed in the Promoter Region of c-MYC Oncogene. **ACS Omega**, v. 2, n. 8, p. 4382-4397, Aug 31 2017.

BIGINELLI, P.; GAZZ, P. Synthesis of 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-Ones. **Chim Ital**, v. 23, p. 360-416, 1893.

BOLTON, K. L. et al. Role of common genetic variants in ovarian cancer susceptibility and outcome: progress to date from the ovarian cancer association consortium (OCAC). **Journal of Internal Medicine**, v. 271, n. 4, p. 366-378, 2012/04/01.

BORDEIRA GASPAS, T. et al. Telomere Maintenance Mechanisms in Cancer. **Genes**, v. 9, n. 5, p. 241, 05/03/2018.

BRUCE ALBERTS et al. **Molecular biology of the cell**. 5. Garland Science, 2007.

- CANCER, I. A. F. R. O. **World Cancer Report**. World Health Organization. Lyon. 2014
- CANNISTRA, S. A. Cancer of the Ovary. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 24, p. 2519-2529, 2004/12/09 2004.
- CANTO, R. F. S. et al. Synthesis of dihydropyrimidin-2-one/thione library and cytotoxic activity against the human U138-MG and Rat C6 glioma cell lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1379-1388, 2011.
- CASERTA D., R. E., MATTEUCCI E., BORDI G., MALLOZZI M., MOSCARINI M. Combined oral contraceptives: health benefits beyond contraception. **Panminerva Medica**, v. 56, n. 3, p. 233-244, 2014.
- CASI, G.; NERI, D. Antibody-Drug Conjugates and Small Molecule-Drug Conjugates: Opportunities and Challenges for the Development of Selective Anticancer Cytotoxic Agents. **J Med Chem**, v. 58, n. 22, p. 8751-61, Nov 25 2015.
- CASTRONOVO, V. et al. Molecular inhibition of cancer cell invasion and metastasis. **Princess Takamatsu Symp**, v. 22, p. 319-37, 1991.
- CHARI, R. V. Targeted cancer therapy: conferring specificity to cytotoxic drugs. **Acc Chem Res**, v. 41, n. 1, p. 98-107, Jan 2008.
- CHEESEMAN, I. M.; DESAI, A. Molecular architecture of the kinetochore–microtubule interface. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, p. 33, 01/01/ 2008.
- CHHILLAR, A. K. et al. Microwave-assisted synthesis of antimicrobial dihydropyridines and tetrahydropyrimidin-2-ones: Novel compounds against aspergillosis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 973-981, 2006/02/15/ 2006.
- COMPTON, D. A. Spindle Assembly in Animal Cells. **Annual Review of Biochemistry**, v. 69, n. 1, p. 95-114, 2000/06/01 2000.
- CORES, A.; CARBAJALES, C.; COELHO, A. Multicomponent reactions in antimetabolic drug discovery. **Curr Top Med Chem**, v. 14, n. 20, p. 2209-30, 2014.
- CRUZ, S. et al. In Silico HCT116 Human Colon Cancer Cell-Based Models En Route to the Discovery of Lead-Like Anticancer Drugs. **Biomolecules**, v. 8, n. 3, Jul 17 2018.
- DAVIDSON, B.; TROPÉ, C. G. Ovarian Cancer: Diagnostic, Biological and Prognostic Aspects. **Women's Health**, v. 10, n. 5, p. 519-533, 2014/09/01 2014.
- DE PERGOLA, G.; SILVESTRIS, F. Obesity as a Major Risk Factor for Cancer. **Journal of Obesity**, v. 2013, p. 291546, 08/29/2013.
- DE VASCONCELOS, A. et al. **Antioxidant capacity and environmentally friendly synthesis of dihydropyrimidin-(2H)-ones promoted by naturally occurring organic acids**. 2012. 155-61.

DE VITIS, M.; BERARDINELLI, F.; SGURA, A. Telomere Length Maintenance in Cancer: At the Crossroad between Telomerase and Alternative Lengthening of Telomeres (ALT). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 2, p. 606, 02/18/2018.

DEBONIS, S. et al. In vitro screening for inhibitors of the human mitotic kinesin Eg5 with antimetabolic and antitumor activities. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 3, n. 9, p. 1079, 2004.

DENISENKO, T. V. et al. Mitotic catastrophe and cancer drug resistance: A link that must to be broken. **Drug Resistance Updates**, v. 24, p. 1-12, 2016/01/01/ 2016.

DESAI, A. et al. Kin I Kinesins Are Microtubule-Destabilizing Enzymes. **Cell**, v. 96, n. 1, p. 69-78, 1999.

DOUBENI, C. A.; DOUBENI, A. R.; MYERS, A. E. Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. **Am Fam Physician**, v. 93, n. 11, p. 937-44, Jun 1 2016.

DOXSEY, S.; ZIMMERMAN, W.; MIKULE, K. Centrosome control of the cell cycle. **Trends in Cell Biology**, v. 15, n. 6, p. 303-311, 2005.

DU BOIS, A. et al. A randomized clinical trial of cisplatin/paclitaxel versus carboplatin/paclitaxel as first-line treatment of ovarian cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 17, p. 1320-9, Sep 3 2003.

DUMONTET, C.; JORDAN, M. A. Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 9, n. 10, p. 790-803, 2010.

DURAY, A. et al. [Aging and cancer: coincidence or etiologic relationship?]. **Rev Med Liege**, v. 69, n. 5-6, p. 276-81, May-Jun 2014.

ECCLES, S. A.; WELCH, D. R. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. **Lancet**, v. 369, n. 9574, p. 1742-57, May 19 2007.

EL-NASSAN, H. B. Advances in the discovery of kinesin spindle protein (Eg5) inhibitors as antitumor agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 614-631, 2013/04/01/ 2013.

ELSHAFLU, H. et al. Selenazoly-hydrazones as Novel Selective MAO Inhibitors With Antiproliferative and Antioxidant Activities: Experimental and In-silico Studies. **Front Chem**, v. 6, p. 247, 2018.

FALANDRY, C. et al. Biology of Cancer and Aging: A Complex Association With Cellular Senescence. **Journal of Clinical Oncology**, v. 32, n. 24, p. 2604-2610, 2014/08/20 2014.

FELLER, L.; LEMMER, J. Cancer metastasis: a short account. **Sadj**, v. 66, n. 4, p. 180-3, May 2011.

FENG, L.-P.; CHEN, H.-L.; SHEN, M.-Y. Breastfeeding and the Risk of Ovarian Cancer: A Meta-Analysis. **Journal of Midwifery & Women's Health**, v. 59, n. 4, p. 428-437, 2014/07/01 2014.

FENG, Z. et al. A triage strategy in advanced ovarian cancer management based on multiple predictive models for R0 resection: a prospective cohort study. **J Gynecol Oncol**, v. 29, n. 5, 9/ 2018.

FOLEY, E. A.; KAPOOR, T. M. Microtubule attachment and spindle assembly checkpoint signaling at the kinetochore. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 1, p. 25-37, 2013.

GAYTHER, S. A.; PHAROAH, P. D. P. The inherited genetics of ovarian and endometrial cancer. **Current opinion in genetics & development**, v. 20, n. 3, p. 231-238, 04/24 2010.

GEIGER, T. R.; PEEPER, D. S. Metastasis mechanisms. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, n. 2, p. 293-308, Dec 2009.

GENG, P.-F. et al. Design, synthesis and preliminary biological evaluation of 5,8-dihydropteridine-6,7-diones that induce apoptosis and suppress cell migration. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1959-1967, 2018/01/01/ 2018.

GHONEUM, A. et al. Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. **Oncotarget**, v. 9, n. 32, p. 22832-22849, 04/27/2018.

GILLIAM, L. A.; ST CLAIR, D. K. Chemotherapy-induced weakness and fatigue in skeletal muscle: the role of oxidative stress. **Antioxid Redox Signal**, v. 15, n. 9, p. 2543-63, Nov 1 2011.

GLOBAL BURDEN OF DISEASE CANCER, C. The global burden of cancer 2013. **JAMA Oncology**, v. 1, n. 4, p. 505-527, 2015.

GOFF, B. Symptoms associated with ovarian cancer. **Clin Obstet Gynecol**, v. 55, n. 1, p. 36-42, Mar 2012.

GOFF, B. A. et al. Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. **Cancer**, v. 109, n. 2, p. 221-7, Jan 15 2007.

GOFF, B. A. et al. Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. **Jama**, v. 291, n. 22, p. 2705-12, Jun 9 2004.

GONZÁLEZ-BALLESTEROS, N. et al. Copper(I) complexes of methyl 4-aryl-6-methyl-3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-thione-5-carboxylates. Synthesis, characterization and activity in human breast cancer cells. **Inorganica Chimica Acta**, v. 438, p. 160-167, 2015/11/01/ 2015.

GUIDO, B. C. et al. Impact of kinesin Eg5 inhibition by 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-one derivatives on various breast cancer cell features. **BMC Cancer**, London, v. 15, p. 283, 04/14/2015.

GUPTA, G. P.; MASSAGUÉ, J. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679-695, 2006/11/17/ 2006.

HAN YU et al. Enantioselective synthesis and evaluation of 4-styryldihydropyrimidin-2-thiones as anti-proliferative agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 4, p. 787-795, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HANAHAN, D.; WEINBERG, ROBERT A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HASHIGUCHI, Y. et al. Chemotherapy-induced neutropenia and febrile neutropenia in patients with gynecologic malignancy. **Anticancer Drugs**, v. 26, n. 10, p. 1054-60, Nov 2015.

HASSELBLAD; GILLIAN D. SANDERS; EVAN R. MYERS, L. J. H. P. G. M. W. J. L. J. M. G. R. R. C. R. P. U. M. D. A. J. M. V. Oral Contraceptive Pills as Primary Prevention for Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. **Obstetrics & Gynecology**, v. 122, n. 1, p. 139-147, 2013.

HAYASHI, N. et al. Effects of Eg5 knockdown on human prostate cancer xenograft growth and chemosensitivity. **The Prostate**, v. 68, n. 12, p. 1283-1295, 2008/09/01 2008.

HEGDE, M. V.; MALI, A. V.; CHANDORKAR, S. S. What is a Cancer Cell? Why does it Metastasize?. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, n. 6, p. 3987-3989, 2013.

HO, J.-N. et al. Anticancer effect of S-allyl-L-cysteine via induction of apoptosis in human bladder cancer cells. **Oncology Letters**, v. 15, n. 1, p. 623-629, 10/26/2018.

HORNE STEVEN, D.; POLLICK SARAH, A.; HENG HENRY, H. Q. Evolutionary mechanism unifies the hallmarks of cancer. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 9, p. 2012-2021, 2015/05/01 2014.

HU, Y. Y. et al. Notch signaling pathway and cancer metastasis. **Adv Exp Med Biol**, v. 727, p. 186-98, 2012.

INOUE, S.; SALMON, E. D. Force Generation by Microtubule Assembly/Disassembly in Mitosis and Related Movements. **Molecular Biology of the Cell**, v. 6, n. 12, p. 1619-1640, 1995.

ISABELLE R. BARBOSA, D. L. B. D. S., MARÍA M. BERNAL, AND ÍRIS DO C.C. COSTA. Cancer mortality in Brazil Temporal Trends and Predictions for the Year 2030. **Medicine journal**, v. 94, n. 16, 2015.

JACQUES FERLAY, I. S., RAJESH DIKSHIT, SULTAN ESER, COLIN MATHERS, MARISE REBELO, DONALD MAXWELL PARKIN, DAVID FORMAN AND FREDDIE BRAY. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, p. 359-386, 2015.

JAYSON, G. C. et al. Ovarian cancer. **The Lancet**, v. 384, n. 9951, p. 1376-1388, 2014.

JIANG, N. et al. Advances in mitotic inhibitors for cancer treatment. **Mini Rev Med Chem**, v. 6, n. 8, p. 885-95, Aug 2006.

JOGLEKAR, A. P. A Cell Biological Perspective on Past, Present and Future Investigations of the Spindle Assembly Checkpoint. **Biology**, v. 5, n. 4, p. 44, 11/19/2016.

JORDAN, S. J. et al. Breast feeding and risk of epithelial ovarian cancer. **Cancer causes & control : CCC**, v. 23, n. 6, p. 919-927, 04/24 2012.

KAMAL, A. et al. Synthesis and biological evaluation of conformationally flexible as well as restricted dimers of monastrol and related dihydropyrimidones. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 3274-3281, 2011/08/01/ 2011.

KAMB, A.; WEE, S.; LENGAUER, C. Why is cancer drug discovery so difficult? **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 115, 12/08/online 2006.

KAPOOR, T. M. et al. Probing Spindle Assembly Mechanisms with Monastrol, a Small Molecule Inhibitor of the Mitotic Kinesin, Eg5. **The Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 5, p. 975-988, 05/18/2000.

KAPPE, C. O. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type — a literature survey. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 35, n. 12, p. 1043-1052, 2000/12/01/ 2000.

KATZKE, V. A.; KAAKS, R.; KÜHN, T. Lifestyle and Cancer Risk. **The Cancer Journal**, v. 21, n. 2, 2015.

KAUR, R. et al. Recent synthetic and medicinal perspectives of dihydropyrimidinones: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 132, p. 108-134, 2017/05/26/ 2017.

KAVALLARIS, M. Microtubules and resistance to tubulin-binding agents. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 194, 02/11/online 2010.

KERR, J. F.; WINTERFORD, C. M.; HARMON, B. V. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. **Cancer**, v. 73, n. 8, p. 2013-26, Apr 15 1994.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239-57, Aug 1972.

- KHAN, K. H.; BLANCO-CODESIDO, M.; MOLIFE, L. R. Cancer therapeutics: Targeting the apoptotic pathway. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 90, n. 3, p. 200-19, Jun 2014.
- KOMLODI-PASZTOR, E. et al. Mitosis is not a key target of microtubule agents in patient tumors. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 4, p. 244-50, Feb 1 2011.
- KUNAL, N. et al. Tubulin Inhibitors: A Patent Survey. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 9, n. 2, p. 176-220, 2014.
- KURMAN, R. J. Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. **Annals of Oncology**, v. 24, n. suppl_10, p. x16-x21, 2013.
- KURMAN, R. J.; SHIH, I.-M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—Shifting the paradigm. **Human Pathology**, v. 42, n. 7, p. 918-931, 2011/07/01/ 2011.
- LEE, S. et al. Over-expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in ovarian clear cell carcinoma. **Gynecologic Oncology**, v. 106, n. 2, p. 311-317, 2007.
- LIOTTA, L. A.; STETLER-STEVENSON, W. G. Tumor invasion and metastasis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cancer Res**, v. 51, n. 18 Suppl, p. 5054s-5059s, Sep 15 1991.
- LIU, X.; GONG, H.; HUANG, K. Oncogenic role of kinesin proteins and targeting kinesin therapy. **Cancer Science**, v. 104, n. 6, p. 651-656, 2013/06/01 2013.
- LOSADA, A. Cohesin in cancer: chromosome segregation and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 14, p. 389, 05/23/online 2014.
- LUVERO, D.; MILANI, A.; LEDERMANN, J. A. Treatment options in recurrent ovarian cancer: latest evidence and clinical potential. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, Sage UK: London, England, v. 6, n. 5, p. 229-239, 2014.
- MADDOX, P. et al. Direct observation of microtubule dynamics at kinetochores in *Xenopus* extract spindles: implications for spindle mechanics. **J Cell Biol**, v. 162, n. 3, p. 377-82, Aug 4 2003.
- MAIATO, H. et al. Mechanisms of Chromosome Congression during Mitosis. **Biology (Basel)**, v. 6, n. 1, Feb 17 2017.
- MAKALA, H.; ULAGANATHAN, V. Identification of novel scaffolds to inhibit human mitotic kinesin Eg5 targeting the second allosteric binding site using in silico methods. **J Recept Signal Transduct Res**, v. 38, n. 1, p. 12-19, Feb 2018.
- MALIGA, Z.; KAPOOR, T. M.; MITCHISON, T. J. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Chem Biol**, v. 9, n. 9, p. 989-96, Sep 2002.
- MALLEN, A. et al. Surgical prevention strategies in ovarian cancer. **Gynecol Oncol**, Aug 4 2018.

MARQUES, L. A. et al. Antiproliferative activity of monastrol in human adenocarcinoma (MCF-7) and non-tumor (HB4a) breast cells. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 389, n. 12, p. 1279-1288, Dec 2016.

MASAWANG, K. et al. Evaluation of 2',4'-dihydroxy-3,4,5-trimethoxychalcone as antimitotic agent that induces mitotic catastrophe in MCF-7 breast cancer cells. **Toxicol Lett**, v. 229, n. 2, p. 393-401, Sep 2 2014.

MATIAS, M. et al. Synthesis, in vitro evaluation and QSAR modelling of potential antitumoral 3,4-dihydropyrimidin-2-(1H)-thiones. **Arabian Journal of Chemistry**, 2016/12/19/ 2016.

MATOS, L. H. S. et al. Biological activity of dihydropyrimidinone (DHPM) derivatives: A systematic review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 143, p. 1779-1789, 2018/01/01/ 2018.

MATULONIS, U. A. et al. Ovarian cancer. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16061, 08/25/online 2016.

MAYER, T. U. et al. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971, 1999.

MC GEE, M. M. Targeting the Mitotic Catastrophe Signaling Pathway in Cancer. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 146282, 09/27/2015.

MCGRATH, M. J. et al. Adenosine Triphosphate Hydrolysis Mechanism in Kinesin Studied by Combined Quantum-Mechanical/Molecular-Mechanical Metadynamics Simulations. **Journal of the American Chemical Society**, v. 135, n. 24, p. 8908-8919, 2013/06/19 2013.

MCGUIRE, W. P. et al. Cyclophosphamide and Cisplatin Compared with Paclitaxel and Cisplatin in Patients with Stage III and Stage IV Ovarian Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 334, n. 1, p. 1-6, 1996/01/04 1996.

MCINTOSH, J. R.; MOLODTSOV, M. I.; ATAULLAKHANOV, F. I. Biophysics of mitosis. **Quarterly Reviews of Biophysics**, v. 45, n. 2, p. 147-207, 2012.

MICHEL, L. S. et al. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. **Nature**, v. 409, p. 355, 01/18/online 2001.

MOHAMMAD, R. M. et al. Broad targeting of resistance to apoptosis in cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S78-S103, 2015/12/01/ 2015.

MORRIS, L. G. T.; CHAN, T. A. Therapeutic Targeting of Tumor Suppressor Genes. **Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1357-1368, 12/29 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, Dec 16 1983.

MYERS, S. M.; COLLINS, I. Recent findings and future directions for interpolar mitotic kinesin inhibitors in cancer therapy. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 4, p. 463-489, 2016/03/01 2016.

NAGARAJAIAH, H.; MUKHOPADHYAY, A.; MOORTHY, J. N. Biginelli reaction: an overview. **Tetrahedron Letters**, v. 57, n. 47, p. 5135-5149, 2016/11/23/ 2016.

NAKAI, R. et al. K858, a Novel Inhibitor of Mitotic Kinesin Eg5 and Antitumor Agent, Induces Cell Death in Cancer Cells. **Cancer Research**, v. 69, n. 9, p. 3901, 2009.

NAVARRETE-REYES, A. P.; SOTO-PEREZ-DE-CELIS, E.; HURRIA, A. Cancer and Aging: A Complex Biological Association. **Rev Invest Clin**, v. 68, n. 1, p. 17-24, Jan-Feb 2016.

NEAL, R. D. et al. Is increased time to diagnosis and treatment in symptomatic cancer associated with poorer outcomes? Systematic review. **British Journal of Cancer**, v. 112, n. Suppl 1, p. S92-S107, 03/03 2015.

NEZHAT, F. et al. Comparative immunohistochemical studies of bcl-2 and p53 proteins in benign and malignant ovarian endometriotic cysts. **Cancer**, v. 94, n. 11, p. 2935-2940, 2002/06/01 2002.

NEZHAT, F. R. et al. New insights in the pathophysiology of ovarian cancer and implications for screening and prevention. **American Journal of Obstetrics & Gynecology**, v. 213, n. 3, p. 262-267, 2015.

NEZHAT, F. R. et al. The Link Between Endometriosis and Ovarian Cancer: Clinical Implications. **International Journal of Gynecological Cancer**, v. 24, n. 4, 2014.

NGO, D. C. et al. Introduction to the molecular basis of cancer metabolism and the Warburg effect. **Molecular Biology Reports**, v. 42, n. 4, p. 819-823, 2015/04/01 2015.

ORIOLA, D.; NEEDLEMAN, D. J.; BRUGUES, J. The Physics of the Metaphase Spindle. **Annu Rev Biophys**, v. 47, p. 655-673, May 20 2018.

OTT, J. J.; ULLRICH, A.; MILLER, A. B. The importance of early symptom recognition in the context of early detection and cancer survival. **European Journal of Cancer**, v. 45, n. 16, p. 2743-2748, 2009.

OZA, A. M. et al. Standard chemotherapy with or without bevacizumab for women with newly diagnosed ovarian cancer (ICON7): overall survival results of a phase 3 randomised trial. **The Lancet. Oncology**, v. 16, n. 8, p. 928-936, 2015.

OZGA, M. et al. A Systematic Review of Ovarian Cancer and Fear of Recurrence. **Palliative & supportive care**, v. 13, n. 6, p. 1771-1780, 03/02 2015.

OZOLS, R. F. et al. Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: a Gynecologic Oncology Group study. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 17, p. 3194-200, Sep 1 2003.

PEREZ-MELERO, C. KSP inhibitors as antimitotic agents. **Curr Top Med Chem**, v. 14, n. 20, p. 2286-311, 2014.

PETROVA, K. T. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of 1,2,3-triazole-sucrose derivatives. **Carbohydr Res**, v. 417, p. 66-71, Nov 19 2015.

PICCART, M. J. et al. Randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 9, p. 699-708, May 3 2000.

PICKUP, M. W.; MOUW, J. K.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. **EMBO Reports**, Oxford, UK, v. 15, n. 12, p. 1243-1253, 11/10/2014.

PRUD'HOMME, G. J. Cancer stem cells and novel targets for antitumor strategies. **Curr Pharm Des**, v. 18, n. 19, p. 2838-49, 2012.

RAMOS, L. M. et al. The Biginelli reaction with an imidazolium-tagged recyclable iron catalyst: kinetics, mechanism, and antitumoral activity. **Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 4156-4168, 2013.

REECE, J. B.; AL, E. **Biologia de Campbell**. 10. Porto Alegre: Artmed, 2015.

RENEHAN, A. G.; BOOTH, C.; POTTEN, C. S. What is apoptosis, and why is it important? **Bmj**, v. 322, n. 7301, p. 1536-8, Jun 23 2001.

RICHARD SONI et al. Synthesis and Cytotoxic Screening of Fused Analogues of Dihydropyrimidinones against Hepg2 Cancer Cell Lines. **iMedPub Journals**, v. 1, n. 3, 2017.

RICHARDS, M. A. The size of the prize for earlier diagnosis of cancer in England. **Br J Cancer**, v. 101 Suppl 2, p. S125-9, Dec 3 2009.

RIEDER, C. L.; FARUKI, S.; KHODJAKOV, A. The centrosome in vertebrates: more than a microtubule-organizing center. **Trends in Cell Biology**, v. 11, n. 10, p. 413-419, 2001.

ROGERS, G. C.; ROGERS, S. L.; SHARP, D. J. Spindle microtubules in flux. **J Cell Sci**, v. 118, n. Pt 6, p. 1105-16, Mar 15 2005.

ROMANIDIS, K. et al. The role of cytoreductive surgery in advanced ovarian cancer: the general surgeon's perspective. **J buon**, v. 19, n. 3, p. 598-604, Jul-Sep 2014.

SAKOWICZ, R. et al. Antitumor Activity of a Kinesin Inhibitor. **Cancer Research**, v. 64, n. 9, p. 3276, 2004.

SALZMAN, B. E. et al. Diagnosing Cancer in the Symptomatic Patient. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 36, n. 4, p. 651-670, 2009/12/01/ 2009.

SAWIN, K. E. et al. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. **Nature**, v. 359, p. 540, 10/08/online 1992.

SCHIFF, D.; WEN, P. Y.; VAN DEN BENT, M. J. Neurological adverse effects caused by cytotoxic and targeted therapies. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 6, n. 10, p. 596-603, Oct 2009.

SCHWARTZ, P. E. Cytoreductive surgery in the management of ovarian cancer. **Oncology (Williston Park)**, v. 22, n. 9, p. 1025-33; discussion 1033-8, 1041, 1045, Aug 2008.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics, 2018. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 1, p. 7-30, 2018.

SILVA, G. C. O. et al. The Biginelli reaction under batch and continuous flow conditions: catalysis, mechanism and antitumoral activity. **RSC Advances**, v. 5, n. 60, p. 48506-48515, 2015.

SILVA, I. N. D. C. N. J. A. G. D. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil **Coordenação de Prevenção e Vigilância - Rio de Janeiro**, 2017.

SINGH, N. et al. An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* overexpressing pteridine reductase 1. **Parasitology Research**, v. 105, n. 5, p. 1317, 2009/07/21 2009.

ŚLIWKA, L. et al. The Comparison of MTT and CVS Assays for the Assessment of Anticancer Agent Interactions. **PLoS ONE**, San Francisco, CA USA, v. 11, n. 5, p. e0155772, 05/19/2016.

SOCIETY, A. C. Cancer Facts & Figures 2018. **Atlanta: American Cancer Society**, 2018.

SOŚNICKI, J. G. et al. Regioselective synthesis of novel 4,5-diaryl functionalized 3,4-dihydropyrimidine-2(1H)-thiones via a non-Biginelli-type approach and evaluation of their in vitro anticancer activity. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 12, n. 21, p. 3427-3440, 2014.

STATISTICS, C. C. S. S. A. C. O. C. **Canadian Cancer Statistics**. Canadian Cancer Society. Toronto. 2017

STOLZ, A.; ERTYCH, N.; BASTIANS, H. A phenotypic screen identifies microtubule plus end assembly regulators that can function in mitotic spindle orientation. **Cell Cycle**, v. 14, n. 6, p. 827-37, 2015.

SUBRAMANIAM, V. et al. Tranilast treatment decreases cell growth, migration and inhibits colony formation of human breast cancer cells. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 90, n. 1, p. 116-122, 2011/02/01/ 2011.

- SUH, D. H. et al. Major clinical research advances in gynecologic cancer in 2017. **Journal of Gynecologic Oncology**, v. 29, n. 2, p. e31, 02/22/2018.
- SUN, X.-D. et al. Dimethylenastron suppresses human pancreatic cancer cell migration and invasion in vitro via allosteric inhibition of mitotic kinesin Eg5. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 32, n. 12, p. 1543-1548, 10/10/2011.
- SUZUKI, M.; TAKAHASHI, T. Aberrant DNA replication in cancer. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 743-744, p. 111-117, 2013/03/01/ 2013.
- SWEET, F.; FISSEKIS, J. D. Synthesis of 3,4-dihydro-2(1H)-pyrimidinones and the mechanism of the Biginelli reaction. **Journal of the American Chemical Society**, v. 95, n. 26, p. 8741-8749, 1973/12/01 1973.
- TABUCHI, T. et al. Tobacco smoking and the risk of subsequent primary cancer among cancer survivors: a retrospective cohort study. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 10, p. 2699-2704, 2013.
- TAN, D. S. P.; KAYE, S. Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 60, n. 4, p. 355, 2007.
- THE CANCER GENOME ATLAS RESEARCH, N. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. **Nature**, v. 474, p. 609, 06/29/online 2011.
- TOHGO, A. et al. Anticancer drugs that induce cancer-associated cachectic syndromes. **Expert Rev Anticancer Ther**, v. 2, n. 1, p. 121-9, Feb 2002.
- TOLIC, I. M. Mitotic spindle: kinetochore fibers hold on tight to interpolar bundles. **European Biophysics Journal**, v. 47, p. 191-203, 2018.
- TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA Cancer J Clin**, v. 65, n. 2, p. 87-108, Mar 2015.
- TREPTOW, T. G. M. et al. Novel hybrid DHPM-fatty acids: Synthesis and activity against glioma cell growth in vitro. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 552-562, 2015/05/05/ 2015.
- VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell Death Differ**, v. 15, n. 7, p. 1153-62, Jul 2008.
- VALENTINE, M. T.; FORDYCE, P. M.; BLOCK, S. M. Eg5 steps it up! **Cell Division**, v. 1, n. 1, p. 31, 2006/12/15 2006.
- VAN VUUREN, R. J. et al. Antimitotic drugs in the treatment of cancer. **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 76, n. 6, p. 1101-12, Dec 2015.
- VAUGHAN, S. et al. Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, p. 719, 09/23/online 2011.

- VICENTE, J. J.; WORDEMAN, L. Mitosis, microtubule dynamics and the evolution of kinesins. **Experimental Cell Research**, v. 334, n. 1, p. 61-69, 2015/05/15/ 2015.
- VINAY, D. S. et al. Immune evasion in cancer: Mechanistic basis and therapeutic strategies. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. S185-S198, 2015/12/01/ 2015.
- WANG, S.-H.; YU, J. Structure-based design for binding peptides in anti-cancer therapy. **Biomaterials**, v. 156, p. 1-15, 2018/02/01/ 2018.
- WARD, J. J. et al. Mechanical design principles of a mitotic spindle. **eLife**, v. 3, 2014.
- WEBB, P. M.; JORDAN, S. J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 41, p. 3-14, 2017/05/01/ 2017.
- WEINBERG, R. A. **The biology of Cancer**. second. Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC, 2014.
- WORDEMAN, L. How Kinesin Motor Proteins Drive Mitotic Spindle Function: Lessons from Molecular Assays. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 3, p. 260-268, 01/28 2010.
- YU, Y.; FENG, Y.-M. The role of kinesin family proteins in tumorigenesis and progression. **Cancer**, v. 116, n. 22, p. 5150-5160, 2010/11/15 2010.
- ZHANG, Y.; XU, W. Progress on Kinesin Spindle Protein Inhibitors as Anti-Cancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 698-704, 2008.
- ZIPS, D.; THAMES, H. D.; BAUMANN, M. New anticancer agents: in vitro and in vivo evaluation. **In Vivo**, v. 19, n. 1, p. 1-7, Jan-Feb 2005.