

Universidade de Brasília
Departamento de Biologia Celular
Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular

BRUNA CÂNDIDO GUIDO

**Avaliação da atividade antitumoral dos derivados da
3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) sobre células do
adenocarcinoma mamário humano**

Brasília

2014

BRUNA CÂNDIDO GUIDO

**Avaliação da atividade antitumoral dos derivados da
3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) sobre células do
adenocarcinoma mamário humano**

Orientador: Prof. Dr. José Raimundo Corrêa

Co-orientadora: Profa. Dra. Anamélia Lorenzetti Bocca

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Patologia.

Brasília
2014

BRUNA CÂNDIDO GUIDO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DOS DERIVADOS DA 3,4-
DIHIDROPIRIMIDINONA (DHPMS) SOBRE CÉLULAS DO ADENOCARCINOMA
MAMÁRIO HUMANO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade de Brasília, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Patologia Molecular.

Aprovada em ___ / ___ / ___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Raimundo Corrêa (Presidente)

Prof. Dr. Márcio José Poças Fonseca (Membro Titular)

Prof. Dr. Mauricio Homem de Mello (Membro Titular)

Prof. Dra. Sônia Nair Bão (Membro Titular)

Prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva (Membro Titular)

Prof. Dr. Tatsuya Nagata (Membro Suplente)

Dedico este trabalho aos grandes propulsores do meu desenvolvimento pessoal e profissional, os grandes amores da minha vida: meus pais, Guido e Dirce, e meu amor, Diego Nolasco. Sem vocês eu não chegaria a lugar algum!

Agradecimentos

Primeiramente gostaria de agradecer à minha família. Ao meu amor, Diego Nolasco, por sua dedicação, amor e paciência. Por ter sido presente em todos os momentos, me apoiando, alegrando e trazendo paz e serenidade à minha vida. Por sempre me dar forças e me fazer ir mais longe. Agradeço também pela grande contribuição no trabalho, com as análises de dinâmica molecular. Que nós possamos sempre continuar juntos na busca por nossos sonhos e objetivos! Amo você! Às minhas pequeninas, Mel e Sophie, pelo amor incondicional, e por serem meu ponto de equilíbrio e me tirarem o estresse diário com suas deliciosas demonstrações de carinho. Aos meus pais, Guido e Dirce, a quem tanto amo e de quem tanto me orgulho. Por todo amor e apoio incondicional. Por serem meu porto seguro, onde sempre posso encontrar a paz e o amor que me impulsionam à viver, à buscar, à sonhar e tentar realizar. Vocês são os grandes responsáveis por eu ter chegado até aqui! Meu amor e gratidão eternos a vocês! Às minhas queridas irmãs, Janaina e Geovana, e aos meus cunhados, Rogério e Marco Aurélio, por todo amor, cuidado, dedicação e torcida. Aos meus queridos sobrinhos Kaique, Arthur e à princesa Ana Júlia, por encherem meu coração de alegria e por seu amor puro e sincero. O amor que sinto por todos vocês é imensurável e todas as minhas conquistas dedico a vocês! Sempre!!!

Ao professor José Raimundo Corrêa pela orientação e pela oportunidade. Pela constante busca por recursos para que este trabalho pudesse ser desenvolvido e, por juntamente com o Prof. Brenno Amaro DaSilveira Netto, me dar a oportunidade de participar do desenvolvimento de diversos outros trabalhos. Isso me permitiu dar um grande passo no meu desenvolvimento profissional. Foi um grande prazer fazer parte desta colaboração! Meus sinceros agradecimentos!

Às minhas queridas amigas, Nathalia e Rafaela por deixarem meus dias tão mais leves. Pela troca de ideias, pelas discussões, pelas risadas, pelo aprendizado constante, tanto profissional quanto pessoal e pela adorável companhia. Agradeço a Deus por tê-las encontrado e por ter a oportunidade de conviver com vocês!

Às minhas amigas e companheiras de trabalho Catharine e Yasmin, por contribuírem substancialmente com o desenvolvimento do trabalho e também pela amizade e doce companhia.

A todos os amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica por todo o apoio, ajuda, discussões, ensinamentos e não menos importante, por todas as conversas informais e diversão que tornaram esses anos de trabalho muito mais fáceis e agradáveis. Com certeza levarei um pouquinho de cada um pra onde quer que eu vá. Foi um enorme prazer fazer parte deste grupo tão harmonioso e cooperativo. Vocês se fizeram parte importantíssima da minha vida. Um agradecimento especial aos amigos Cláudio, Dani, Ingrid, Karine, Khesler, Lorena, Ludmilla, Marcella, Márcia, Mari, Mayara, Misléia, Natalia, Núbia, Rachel e Shaiane.

Aos professores Sonia Bão, Bergmann Ribeiro, Renato Resende e Tatsuya Nagata e aos seus respectivos grupos de pesquisa, pela colaboração e prestatividade sempre. Por estarem sempre prontos e dispostos a ajudar. Por todas as festinhas de fim de ano, nas quais eu podia sentir ainda mais forte a homogeneidade e união do grupo, e também um grande orgulho por fazer parte dele. Agradeço imensamente pelo apoio de cada um. Isto certamente facilitou muito a execução do meu trabalho.

À professora Anamélia Lorenzetti Bocca, pela viabilização do desenvolvimento deste trabalho e pelo apoio.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof. Brenno Amaro DaSilveira Netto, Prof. Diego Oliveira Nolasco da Silva, Profa. Aline Pic-Taylor e à Luciana Ramos, por terem contribuído de forma ímpar no desenvolvimento do trabalho. Pela contribuição com ideias, ensinamentos, aquisição e análise de dados.

À CAPES e ao Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular pelo financiamento deste trabalho.

Finalmente à Deus, que me agraciou com suas bênçãos e me permitiu ter uma vida cheia de oportunidades e realizações e que me deu forças em todos os momentos para superar todas as dificuldades e obstáculos no meio do caminho.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor,
mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus,
não sou o que era antes.”

(Martin Luther King)

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Traços característicos de uma célula tumoral	03
Figura 2. Representação esquemática do processo de metastase	05
Figura 3. Transição Epitélio-Mesenquimal	06
Figura 4. Cinesina motora Eg5	16
Figura 5. Estrutura homotetramérica da cinesina Eg5 e sua atividade no fuso mitótico	17
Figura 6. Fórmula estrutural do monastrol e do núcleo das dihidropirimidinonas que é mantido conservado em todos os derivados	21
Figura 7. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MCF-7 em 24h de tratamento	38
Figura 8. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MCF-7 em 48h de tratamento	39
Figura 9. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MCF-7 em 72h de tratamento	40
Figura 10. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MDA-MB-231 em 24h de tratamento	41
Figura 11. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MDA-MB-231 em 48h de tratamento	42
Figura 12. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MDA-MB-231 em 72h de tratamento	43
Figura 13. Viabilidade celular <i>versus</i> tempo	44
Figura 14. Os DHPMs causam altas taxas de morte em células MCF-7 e MDA-MB-231 em concentrações acima de 100 µM	45
Figura 15. Efeito dos derivados de DHPM selecionados na viabilidade de células de cultura primária de tecido conjuntivo comparado ao tratamento por 72h em células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231	46
Figura 16. Alterações morfológicas em células MCF-7 e MDA-MB-231 após 72h de tratamento com DHPM	48
Figura 17. Modelo 3D baseado na estrutura dos complexos da Eg5 após os ensaios de Dinâmica Molecular.	49
Figura 18. O composto 4bc leva a proteína Eg5 a uma conformação muito estável	51

Figura 19. Derivados de DHPM inibem a atividade de cinesinas <i>in vitro</i>	48
Figura 20. O compostos com núcleo DHPM induzem a formação de fuso mitótico monoastral em células MCF-7	54
Figura 21. Alterações estruturais e ultraestruturais causadas pelo tratamento com (0,4 mM) do composto 4p evidenciadas por microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão	56
Figura 22. Tratamento com os derivados de DHPM induz morte por apoptose nas células tumorais de mama	58
Figura 23. Derivados de DHPMs inibem a proliferação de células de adenocarcinoma mamário	60
Figura 24. Derivados de DHPMs podem impedir a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais em G2/M – Histogramas das fases do ciclo celular	62
Figura 25. Derivados de DHPMs podem impedir a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais em G2/M – Quantificação da % de células em cada fase do ciclo	63
Figura 26. Os DHPMs reduzem a população de células-tronco tumorais na linhagem MDA-MB-231	65
Figura 27. Os DHPMs inibem a formação de vasos <i>in vitro</i>	68
Figura 28. Os DHPMs inibem ligeiramente a formação de novos vasos pelas células tumorais de mama e diminuem a convergência dos vasos em direção ao tumor	69
Figura 29. Os DHPMs não influenciam no potencial invasivo das células MDA-MB-231	71

ÍNDICE DE TABELAS

- Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma* (INCA, 2014). **01**
- Tabela 2. Dose máxima de tratamento estabelecida para cada um dos compostos DHPMs selecionados pelo teste de viabilidade celular por MTT em um tratamento de 72h nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231 **28**
- Tabela 3. Identificação e valores atribuídos aos padrões de reconhecimento da formação de vasos para a realização da análise quantitativa da neovascularização *in vitro* **34**
- Tabela 4. IC₅₀ e máxima concentração não citotóxica estabelecida para os 5 compostos pré-selecionados (4m, 4bt, 4p, 4bc e 4x) e monastrol **47**
- Tabela 5. Resultado da quantificação baseada em 300 células MCF-7 controle ou tratadas por 24 ou 48 h e marcadas com anticorpo anti- α -tubulina **55**
- Tabela 6. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronca-tumorais, CD44 e CD24, em células MCF-7 **66**
- Tabela 7. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronca-tumorais, CD44 e CD24, em células MDA-MB-231 **66**

LISTA DE ABREVIATURAS

786-0	Linhagem celular de adenocarcinoma renal
ALDH	Aldeído desidrogenase
APAF	<i>Apoptotic Protease Activating Factor</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
BRCA1	Proteína do tipo 1 de susceptibilidade ao câncer de mama
BRCA2	Proteína do tipo 2 de susceptibilidade ao câncer de mama
BSA	Albumina Sérica Bovina
CAD	Desoxirribonuclease ativada por caspase
CAM	Membrana corioalantóica (<i>Chorioallantoic Membrane</i>)
CFSE	Éster carboxifluoresceína succinimidil (<i>Carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>)
CHK1	Checkpoint kinase 1
CTT	Célula-tronco tumoral
DAPI	<i>4',6-Diamidino-2-Phenylindole, Dihydrochloride</i>
DHPM	Dihidropirimidinona
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ECGS	Suprimento de crescimento de células endoteliais (<i>Endothelial Cell Growth Supplement</i>)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Eg5	Proteína Cinesina do Fuso Mitótico
ELIPA	Ensaio de Fosfato Inorgânico Ligado à Enzima (<i>Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay</i>)
ER	Receptor de Estrógeno (<i>Estrogen Receptor</i>)
FADD	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
Fas	<i>Apoptosis Stimulating Fragment</i>
FITC	Fluoresceína
GROMACS	GRoningen MACHine for Chemical Simulations
HER2	Receptor do fator de crescimento epidermal humano 2 (<i>Human Epidermal growth factor Receptor 2</i>)

HT-29	Linhagem celular de adenocarcinoma colorretal
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>Multicomponente Reaction</i>)
MD	Dinâmica Molecular (<i>Molecular Dynamics</i>)
MDA-MB-231	Linhagem celular de adenocarcinoma mamário
MESG	2-amino-6-mercaptopurina ribonucleosídeo
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
NCI-ADR	Linhagem celular de mama expressando fenótipo de resistência à multidrogas
OMS	Organização Mundial de Saúde
OVCAR03	Linhagem celular de tumor ovariano
PBS	Tampão Fosfato Salina (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PC-3	Linhagem celular de câncer de próstata
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PI	Iodeto de Propídio (<i>Propidium Iodide</i>)
Pi	Fosfato Inorgânico (<i>Inorganic Phosphate</i>)
PNP	Purina Nucleosídeo Fosforilase
PR	Receptor de Progesterona (<i>Progesterone Receptor</i>)
RMSD	<i>Root-Mean-Square Deviation</i>
SAC	Ponto de Checagem da Montagem do Fuso (<i>Spindle Assembly Checkpoint</i>)
SFB	Soro Fetal Bovino
SPC	<i>Single Point Charge</i>
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
UACC62	Linhagem celular de melanoma
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Câncer	1
1.2. Células-tronco tumorais (CTT) e transição epitélio-mesenquimal (TEM)	5
1.3. Câncer de mama.....	7
1.4. Marcadores de células-tronco tumorais de mama	10
1.5. Tratamentos convencionais	11
1.6. Cinesina Eg5	15
1.7. Dihidropirimidinona e seus derivados.....	20
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. METODOLOGIA	24
4.1. Reagentes e equipamentos	24
4.2. Síntese diferencial de DHPMs pelo método de Biginelli	25
4.3. Manutenção das células	26
4.4. Esquema de testes com os derivados da 3,4- dihidropirimidinona	26
4.5. Ensaio da viabilidade celular	27
4.6. Cálculo do IC ₅₀	27
4.7. Esquema de tratamento com os compostos pré-selecionados pelo teste de viabilidade celular por MTT	28
4.8. Análise <i>in silico</i> por Dinâmica Molecular	28
4.9. Ensaio de inibição da atividade enzimática de cinesinas por DHPMs	29
4.10. Imunomarcção de α -tubulina	30
4.11. Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão	30
4.12. Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com DHPMs.....	31
4.13. Caracterização da morte celular induzida pelos DHPMs.....	31
4.14. Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI).....	32
4.15. Análise de proliferação celular.....	32

4.16.	Análise da população de células-tronco tumorais	33
4.17.	Análise do potencial antiangiogênico dos DHPMs	34
4.17.1.	Ensaio de formação de tubos por células endoteliais	34
4.17.2.	Ensaio de CAM.....	34
4.18.	Ensaio de invasão celular.....	35
4.19.	Análise estatística	36
5.	RESULTADOS.....	36
5.1.	Os derivados de DHPM apresentam citotoxicidade dose e tempo dependentes e são seletivos para células tumorais	36
5.2.	O tratamento com DHPM induz alterações morfológicas em células tumorais de mama.....	47
5.3.	Os DHPMs influenciam de diferentes maneiras na movimentação da cinesina Eg5.....	48
5.3.1.	Análise de componente principal (PCA) e RMSD.....	50
5.4.	A atividade da cinesina Eg5 é inibida <i>in vitro</i> pelos derivados de DHPM.....	51
5.5.	Os derivados de DHPM induzem a formação de fusos mitóticos monoastrais e podem levar as células tumorais de mama a apresentarem o fenótipo de catástrofe mitótica.....	52
5.6.	A morte celular induzida pelos derivados de DHPM ocorre prioritariamente por apoptose.....	57
5.7.	Os derivados de DHPM são potentes inibidores da proliferação de células tumorais de mama.....	59
5.8.	Os derivados de DHPM podem impedir a progressão do ciclo celular mantendo as células em G2/M.....	61
5.9.	Os DHPMs levam a uma diminuição na subpopulação de células-tronco tumorais.	64
5.10.	Os DHPMs inibem a angiogênese tanto <i>in vitro</i> quanto <i>in vivo</i>	67
5.11.	Os DHPMs não interferem no potencial de invasibilidade das células tumorais de mama.....	70
6.	DISCUSSÃO	72
7.	CONCLUSÕES	80
8.	QUADRO DE RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS.....	81
9.	PERSPECTIVAS	81
10.	REFERÊNCIAS	82
11.	ANEXOS	96

RESUMO

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento celular desordenado e por alterações na fisiologia das células. É considerado uma das principais causas de morte em todo o mundo representando uma ameaça de saúde global com consequências econômicas consideráveis. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e o mais comum entre as mulheres também sendo o tipo que mais gera óbitos neste gênero. Este fato gera uma grande demanda por novos tratamentos e novas metodologias para enfrentamento da doença que permitam não só uma melhora na qualidade, mas também, um aumento do tempo de vida dos pacientes portadores desse tipo de câncer. Neste cenário, os derivados da dihidropirimidinona (DHPMs) foram identificados como potenciais agentes antitumorais uma vez que eles se ligam de forma específica e reversível à cinesina Eg5 tendo como consequência a disrupção do fuso mitótico e a prevenção da progressão do ciclo celular durante a mitose apresentando notável atividade antitumoral contra diversas linhagens tumorais. Por meio de um *screening, in vitro*, nós identificamos 5 DHPMs com potente atividade antitumoral contras as linhagens MCF-7 e MDA-MB-231. Dados de dinâmica Molecular e ensaios de inibição *in vitro* da cinesina Eg5 mostraram que alguns compostos são realmente potentes inibidores desta proteína motora, causando uma importante diminuição em suas funções dependentes da motilidade. Os DPHMs interferem com a correta formação do fuso mitótico durante a divisão celular prejudicando a conclusão do ciclo celular nas células tumorais de mama e mostraram ser seletivos para células tumorais. Além disso, alguns destes compostos possuem uma interessante propriedade de modulação do fenótipo CD44⁺/CD44⁻, levando a uma diminuição na população de células-tronco tumorais (CTT) nas células MDA-MB-231, um efeito importante já que as CTTs são resistentes à muitas terapias antitumorais convencionais e desempenham um papel central na iniciação e manutenção do tumor. Estas observações corroboram com os resultados de que as células tratadas com os DHPMs têm capacidade proliferativa e angiogênica prejudicadas e são finalmente conduzidas à morte por apoptose, um dos mais almejados objetivos no desenvolvimento de fármacos. Juntos, estes resultados fornecem a compreensão de como os derivados de DHPM podem eliminar as células tumorais de mama e ainda abrem um horizonte para estudos adicionais destas arquiteturas moleculares como promissores compostos para uso no tratamento do câncer de mama.

ABSTRACT

Cancer is a disease characterized by uncontrolled cell growth and severe alterations in cells physiology. It is considered a major cause of death throughout the world representing a threat to global health with considerable economic consequences. The breast cancer is the second most common cancer worldwide and the most common among women also being the type that generates more deaths in this gender. In addressing the need of treatments for this life-threatening illness allowing not only an improvement in quality, but also an increase in the patient's life expectancy with this cancer, we study 3,4-dihydropyrimidinone derivatives (DHPMs), a class of inhibitor molecules of motor spindle protein Eg5 that shows pronounced antitumor activity against several cancer cell lines. Using an *in vitro* screening, we identified five DHPMs with potent antitumor effects on MCF-7 and MDA-MB-231 cells. Molecular dynamics and *in vitro* Eg5 inhibition assays by DHPMs show that some compounds are really effective inhibitors of this motor protein causing an important decreasing in its major mobility-depended functions. DHPM activity interferes with the proper mitotic spindle formation during cell division impairing the correct conclusion of cell cycle of the breast cancer cells and showed to be selective for tumor cells. Moreover, they modulate the CD44⁺/CD24⁻ phenotype leading to a decrease in the cancer stem cell (CSC) population in MDA-MB-231 cells, an important effect since CSCs are resistant to many conventional cancer therapies and play a pivotal role on initiation and maintenance of a tumor. This observation corroborates with the results that DHPM treated cells showed impaired able of proliferation and angiogenesis and are finally conducted to death by apoptosis, one of the most pursued goal in drug development. Together, our results provide insights into how DHPMs derivatives can eliminate breast tumor cells and also open a possible window for further studies of theses molecular architectures as promising compounds to cancer treatment.

1. INTRODUÇÃO


1.1. Câncer

O câncer é um grupo formado por mais de cem doenças caracterizadas por uma sequência de eventos anormais na fisiologia celular que levam principalmente a proliferação descontrolada e a imortalidade das células. As Nações Unidas identificaram o câncer como uma doença sem necessidade de comunicação, mas que representa uma ameaça à saúde global com consequências econômicas consideráveis (BLOOM et al., 2011; MARIOTTO et al., 2011, AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo, sendo em 2012, responsável por 8,2 milhões de óbitos (WHO, 2014, GLOBOCAN, 2012). Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que, no ano de 2030, a carga global será de 21,4 milhões de novos casos de câncer e 13,2 milhões de mortes por câncer, em consequência do crescimento e do envelhecimento da população, bem como da redução na mortalidade infantil e nas mortes por doenças infecciosas em países em desenvolvimento (INCA, 2014). Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e glândula tireoide (INCA, 2014).

São estimados 576 mil novos casos de câncer no Brasil em 2014. Exceto os casos de câncer de pele não melanoma, 48% desses novos casos ocorrerão em mulheres, sendo o câncer de mama o mais frequente (20,8%) e 52% em homens, sendo o câncer de próstata o mais frequente (22,8%), como pode ser observado na tabela 1 (INCA, 2014).

Tabela 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma* (INCA, 2014).

Localização primária	casos	%			Localização primária	casos	%
Próstata	68.800	22,8%		Homens	Mama Feminina	57.120	20,8%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	16.400	5,4%			Cólon e Reto	17.530	6,4%
Cólon e Reto	15.070	5,0%			Colo do Útero	15.590	5,7%
Estômago	12.870	4,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
Cavidade Oral	11.280	3,7%			Glândula Tireoide	8.050	2,9%
Esôfago	8.010	2,6%			Estômago	7.520	2,7%
Laringe	6.870	2,3%			Corpo do Útero	5.900	2,2%
Bexiga	6.750	2,2%			Ovário	5.680	2,1%
Leucemias	5.050	1,7%			Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
Sistema Nervoso Central	4.960	1,6%			Leucemias	4.320	1,6%

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10.

As células cancerosas diferem tipicamente de suas vizinhas normais por um conjunto de características fenotípicas tais como rápida taxa de divisão, alta taxa metabólica, perda da inibição por contato, perda de adesão, síntese de proteases, habilidade de invadir e colonizar domínios reservados para outras células e morfologia anormal (GRIFFITHS et al., 2006).

O tumor surge como resultado de vários eventos, podendo ser eles fatores externos como agentes infecciosos, agentes químicos, radiação ionizante ou fatores internos como mutações herdadas, disfunção hormonal, condições imunológicas e mutações geradas em decorrência do metabolismo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Estes fatores causais podem agir juntos ou em sequência para iniciar ou promover a carcinogênese. O diagnóstico precoce é fundamental para o sucesso do tratamento, no entanto é estimado que dez ou mais anos se passem entre a exposição à fatores externos e a detecção do câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Em todos os tipos de cânceres são identificadas disfunções gênicas envolvidas no controle da divisão e morte celular. O balanço e a dimerização competitiva entre os membros da família Bcl-2 de proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, A1) e pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid) são os responsáveis pela determinação do destino da célula e pela regulação da sua resposta aos sinais apoptóticos (ADAMS; CORY, 1998; KROEMER, 1997; OLTVAI et al., 1993). Ainda, genes como PTGS2, EREG, MMP1, LOX, CCL5 e ANGPTL4 são descritos para o câncer de mama como promotores da sobrevivência da célula tumoral e indutores de metástase (MARINO et al., 2013). Aproximadamente 5% de todos os cânceres são de origem hereditária, nos quais a alteração herdada confere um risco muito alto de desenvolvimento de um ou mais tipos específicos de câncer (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Foram descritos seis traços característicos das células tumorais (Figura 1), adquiridos como capacidades funcionais que permitem às células cancerosas sobreviverem, proliferarem e se disseminarem. Essas funções são adquiridas em diferentes tipos de tumores por meio de mecanismos distintos e em vários períodos durante o curso de múltiplos passos da tumorigênese. Essas características incluem a manutenção da sinalização proliferativa, perda dos supressores de crescimento, resistência à morte celular, imortalidade replicativa, indução da angiogênese e ativação da invasão e metástase (HANAHAN; WEINBERG, 2000). A aquisição destas funções é possibilitada por duas outras características intrínsecas às células tumorais. A mais proeminente delas é o desenvolvimento de instabilidade genômica, a qual gera mutações

aleatórias incluindo rearranjos cromossômicos; entre estas estão as mudanças genéticas raras que podem orquestrar a aquisição desses traços tumorais. A segunda característica habilitada nestas células envolve o estado inflamatório das lesões pré-malignas e fracamente malignas que é dirigido pelas células do sistema imune, algumas das quais servem para promover a progressão tumoral. O progresso conceitual na última década adicionou ainda duas características emergentes a esta lista, que são a reprogramação do metabolismo energético e a evasão da destruição imune (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Todas essas dez características apresentadas pelas células tumorais podem ser observadas na figura 1.



Figura 1. Traços característicos de uma célula tumoral. A figura ilustra as oito características principais adquiridas pelas células tumorais, que são a perda de supressores de crescimento, capacidade de imortalidade replicativa, indução da angiogênese, resistência à morte celular, sinalização proliferativa sustentável, ativação da invasão e metástase, prevenção da destruição imune e desregulação do metabolismo energético, e as duas características intrínsecas do tumor que permitem a aquisição de todos esses traços que definem a célula tumoral, que são a instabilidade genômica e a inflamação promovida pelo tumor (Adaptado de Hanahan & Weinberg, Cell, 2011).

Assim como os tecidos normais, para que o tumor possa crescer e suprir sua insaturável demanda metabólica, a formação contínua de novos vasos sanguíneos deve ocorrer. A vascularização recém-formada associada ao tumor, gerada pelo processo de angiogênese, direciona essas necessidades (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Sob condições não patológicas, este processo é estritamente regulado por proteínas de matriz, conexões célula-célula e por abundantes fatores pró e antiangiogênicos (POLLINA et al., 2008). Enquanto na homeostase a angiogênese é estritamente

regulada, estes eventos tornam-se perturbados na tumorigênese, na qual há a formação descontrolada de novos vasos (HIELSCHER; GERECHT, 2012). Durante a progressão do tumor, um “interruptor angiogênico” é quase sempre ativado e permanece ligado, gerando vasos quiescentes para, continuamente, brotarem novos vasos que ajudam a sustentar a expansão do crescimento neoplásico (HANAHAN; FOLKMAN, 1996). Historicamente, acreditava-se que a angiogênese era importante somente quando tumores macroscópicos crescendo rapidamente eram formados, mas recentemente alguns dados indicaram que a angiogênese também contribui para a fase pré-maligna microscópica da progressão do tumor, consolidando ainda mais a sua posição como uma marca integrante do câncer (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A invasão e a metástase tumoral são acontecimentos marcantes e dependentes da angiogênese, os quais transformam um tumor que está confinado localmente em um tumor sistêmico, metastático e uma doença ameaçadora à vida (FRIEDL; ALEXANDER, 2011). A metástase pode estar relacionada à metilação do DNA, a qual é capaz de regular a transcrição de genes de adesão celular, invasão e angiogênese (COCK-RADA; WEITZMAN, 2013); ou ainda à ação de fatores de transcrição como o NFκB, Myc e Pdx1 por meio de mutações de perda de função em seus genes ou aumento/diminuição de suas expressões (ELL; KANG, 2013). Os passos iniciais da invasão local incluem a ativação de vias de sinalização que controlam as dinâmicas do citoesqueleto nas células tumorais, a renovação dos elementos da matriz extracelular das junções célula-célula, seguida pela migração ativa das células tumorais para o tecido adjacente (CHAMBERS et al., 2002; FRIEDL; WOLF, 2003; SAHAI, 2007). A metástase então ocorre quando as células tumorais se conectam aos vasos sanguíneos e linfáticos, penetram a membrana basal e a parede endotelial e se disseminam pelo lúmen dos vasos com consequente colonização de órgãos distantes do tumor primário (Figura 2) (FIDLER, 2003).

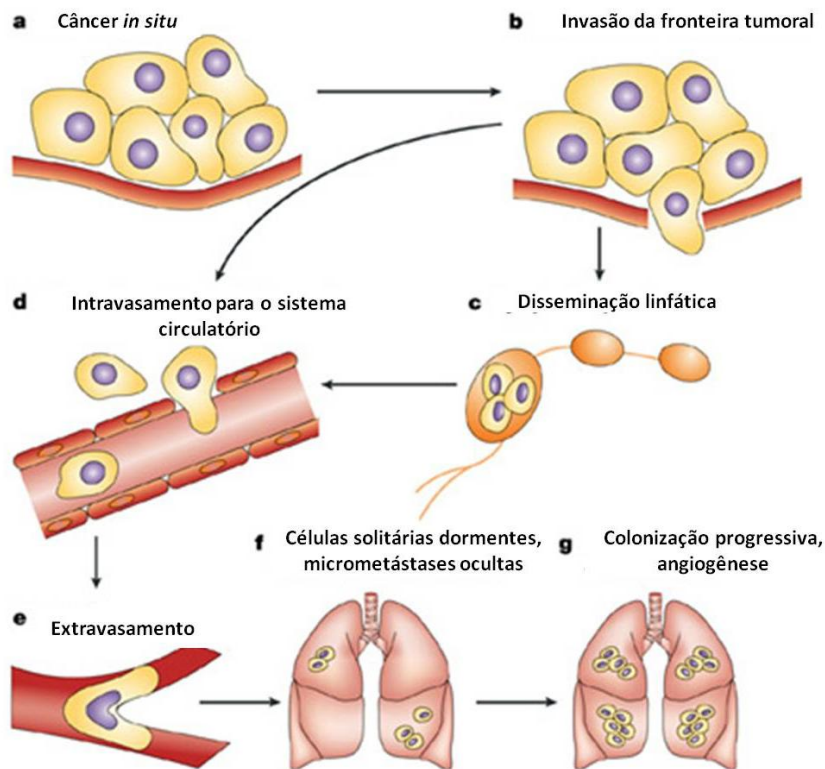


Figura 2. Representação esquemática do processo de metástase. A metástase se inicia com um tumor *in situ* circundado por uma membrana basal intacta (a). A invasão requer mudanças reversíveis na adesão célula-célula e célula-matriz extracelular, destruição de proteínas na matriz e estroma e motilidade (b). As células em metástase podem entrar por meio dos vasos linfáticos (c) ou diretamente entram na corrente sanguínea (d). As células tumorais ficam temporariamente presas dentro dos vasos e depois sofrem o extravasamento do sistema circulatório (e). A colonização metastática de sítios distantes progride por meio de células individuais, as quais podem permanecer dormentes por anos, caracterizando micrometástases ocultas (f), e crescer progressivamente, originando as metástases angiogênicas (g). (Adaptado de Steeg, Nature Reviews Cancer, 2003).

1.2. Células-tronco tumorais (CTT) e transição epitélio-mesenquimal (TEM)

Na massa tumoral heterogênea, encontra-se uma subpopulação celular particular que apresenta como principais características a capacidade de autorrenovação e diferenciação, aspectos compartilhados com células-tronco, e por esta razão foram denominadas de células-tronco tumorais (CTT) (O'BRIEN et al., 2007; SINGH et al., 2004). De forma similar às células-tronco normais, a CTTs podem também dar origem a todas as células de câncer em um tumor e por isso receberam esta denominação (JAGGUPILLI; ELKORD, 2012). Este subgrupo de células tem um papel vital na iniciação e manutenção de um tumor além de sua capacidade de invasão, metástase, heterogeneidade e resistência terapêutica nos tumores (CREIGHTON et al., 2009; GUPTA et al., 2009).

As células-tronco tumorais podem ser intrínsecas ao tumor, estando presentes desde a sua formação, ou ainda ser geradas por meio de uma diferenciação denominada Transição Epitélio-Mesenquimal (TEM) (BRABLETZ, 2012). A TEM pode ser ativada transitoriamente ou de forma estável e em diferentes graus pelas células de carcinoma, durante o curso da invasão e metástase. Este tipo de transformação celular tem se tornado proeminentemente envolvido como um meio pelo qual as células epiteliais transformadas podem adquirir capacidades de invadir, resistir à apoptose e se disseminar (KLYMKOWSKY; SAVAGNER, 2009; POLYAK; WEINBERG, 2009).

A TEM compreende um processo biológico que permite que uma célula epitelial polarizada, a qual normalmente interage com a membrana basal por meio de sua superfície basal, se submeta à alterações bioquímicas múltiplas, incluindo a mudança progressiva do perfil de expressão de marcadores deste processo (Figura 3), que possibilita que ela assuma um fenótipo de célula mesenquimal, a qual inclui evidenciada capacidade migratória, invasiva, elevada resistência à apoptose e uma produção extensivamente aumentada de componentes de matriz extracelular (KALLURI; NEILSON, 2003; MALLINI et al., 2013). A conclusão da TEM é sinalizada pela degradação da membrana basal subjacente e pela formação de uma célula mesenquimal que pode migrar para longe da camada epitelial onde foi originada (KALLURI; WEINBERG, 2009). A TEM vem sendo ligada à progressão do câncer e ao aumento das características de células-tronco de tumores (CREIGHTON et al., 2009). Esta correlação entre TEM e CTTs pode fornecer uma ligação direta das CTTs com o potencial metastático do câncer (DAVE et al., 2012).

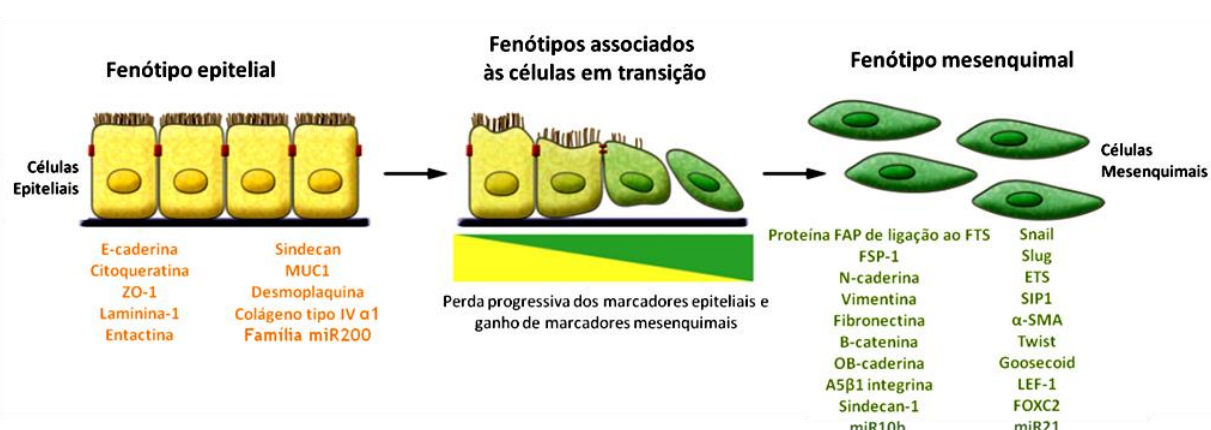


Figura 3. Transição Epitélio-Mesenquimal. A TEM envolve uma transição funcional das células epiteliais polarizadas para células mesenquimais móveis e secretoras de componentes da matriz extracelular. A colocalização destes dois conjuntos de marcadores distintos define um fenótipo intermediário de TEM, indicando células que passaram apenas parcialmente por esta transição. A detecção de células expressando ambos os conjuntos de marcadores torna possível

a identificação de todas as células mesenquimais que foram originadas do epitélio via TEM, visto que muitas células mesenquimais provavelmente perdem todos os marcadores epiteliais uma vez que a transição é completada (Adaptado de Kalluri & Weinberg, *The Journal of Clinical Investigation*, 2009).

A transição epitélio-mesenquimal, juntamente com processos migratórios executados durante a embriogênese, é orquestrada por um conjunto de fatores de transcrição como o Snail, Slug, Twist e Zeb1/2, que agem de forma pleiotrópica. Estes reguladores transcricionais são expressos em várias combinações em diversos tipos de tumores malignos. Trabalhos com modelos experimentais de formação de carcinoma mostraram que estes reguladores podem ser casualmente importantes para a invasão, e alguns deles podem dar início a metástase quando ectopicamente superexpressos (MICALIZZI et al., 2010; SCHMALHOFER et al., 2009; YANG; WEINBERG, 2008). Alguns traços biológicos das células evocados por tais fatores de transcrição são: a perda de junções de adesão e a conversão associada de uma morfologia poligonal/epitelial para uma delgada/fibroblástica; expressão de enzimas degradadoras de matriz; motilidade aumentada e resistência a apoptose intensificada, sendo todos estes traços implicados no processo de invasão e metástase. Diversos destes fatores de transcrição podem ainda reprimir diretamente a expressão do gene da E-caderina, portanto, privando as células neoplásicas epiteliais deste importante supressor de motilidade e invasividade (CREIGHTON et al., 2009; PEINADO et al., 2004).

1.3. Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença heterogênea complexa e uma das grandes causas de morte entre as mulheres. Em 2012, 1,7 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer, sendo o segundo tipo de câncer mais comum no mundo e o mais comum entre as mulheres, estando associado à 522 mil registros de óbitos, em 2012 (GLOBOCAN, 2012). Este tipo de câncer compreende em termos mundiais, a quinta causa de morte por câncer em geral e a causa mais frequente de morte por neoplasias em mulheres (WHO, 2008). O câncer de mama representa 25% dos casos de câncer diagnosticado em mulheres, sendo o mais frequente neste gênero em 140 dos 184 países no mundo (GLOBOCAN, 2012).

No Brasil, este cenário se repete. Informações processadas pelos Registros de Câncer de Base Populacional, disponíveis para 16 cidades brasileiras, mostram que na

década de 90, este foi o câncer mais frequente no país, tendo as maiores taxas de incidência observadas em São Paulo, no Distrito Federal e em Porto Alegre. Excluídos os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em mulheres de todas as regiões do país, exceto na região Norte, onde o câncer do colo do útero ocupa a primeira posição, e o câncer de mama é o segundo mais incidente (INCA, 2014).

O aumento da incidência do câncer de mama no país tem sido acompanhado do aumento da mortalidade, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Nos últimos 40 anos, a sobrevida associada aos pacientes com câncer de mama vem aumentando nos países desenvolvidos, sendo atualmente de 85% em cinco anos, enquanto que nos países em desenvolvimento, esta taxa permanece com valores entre 50% e 60% (INCA, 2014).

A cada ano, aproximadamente 22% dos novos casos de câncer em mulheres são de mama (INCA, 2014). Os fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher, como menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal, assim como a idade estão bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento deste tipo de câncer (HENDERSON; FEIGELSON, 2000; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; INCA, 2014). As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e posteriormente esse aumento ocorre de forma mais lenta.

Fatores genéticos também estão associados ao maior risco de desenvolvimento de câncer de mama. Mulheres que apresentam mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (ARMES et al., 1998; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). A estimativa de novos casos deste tipo de câncer no Brasil em 2014 foi de 57.120, correspondendo a 20,8% dos novos casos (INCA, 2014).

O câncer de mama pode ser diferenciado, segundo classificações terapêuticas, em três grupos principais: ER+, que expressam o receptor de estrógeno (VEER et al., 2002); HER2 aumentado, que possuem elevada expressão do receptor do fator de crescimento epidermal humano (SLAMON et al., 1987); e triplo negativos, que não expressam o receptor de estrógeno (ER), progesterona (PR) e nem HER2 (PEROU, 2011). Esses três grupos de tumores de mama humanos são atualmente subdivididos em 5 subtipos genomicamente distintos: luminal A, luminal B, enriquecido pra HER2, tipo basal e tumores com baixa expressão de claudina (CAREY et al., 2006; PEROU et al., 2000; PRAT et al., 2010). Cada subtipo de tumor apresenta características

biológicas e prognósticas únicas e interage com células endoteliais por meio de fatores secretados e diretamente pelo contato célula-célula (FOLKMAN, 2006). Estas associações facilitam a entrada das células tumorais nos vasos sanguíneos e linfáticos, as quais iniciam a cascata metastática (PARKIN et al., 1999).

Os tumores claudina-low são caracterizados pela baixa expressão ou pela ausência de marcadores de diferenciação luminal, elevado enriquecimento para marcadores de transição epitelial-mesenquimal, genes de resposta imune e características de células-tronco (mesenquimais), por exemplo, as linhagens MDA-MB-231 e BT-549. Tais células são derivadas de células progenitoras menos diferenciadas e por isso não apresentam a expressão de E-caderina, mas expressam vimentina. Clinicamente, a maioria dos tumores com baixa expressão de claudina é triplo-negativo, apresentando assim prognóstico ruim e sendo, portanto carcinomas ductais invasivos com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular (PRAT et al., 2010). Por outro lado, aquelas linhagens pertencentes ao grupo das células luminais possuem características epiteliais, como a expressão de E-caderina e ausência de vimentina, tendem a ser menos invasivas, havendo também um menor conteúdo de células-tronco tumorais e de genes relacionados com a resposta imune (SOMMERS et al., 1994).

Foi recentemente descrito por Harrell e colaboradores (2014) que subtipos tumorais ER⁻ do tipo basal e claudina-low são propensos a se espalhar para órgãos vitais tais como o cérebro e pulmão; na ausência de terapias alvo, os tumores enriquecidos para HER2 colonizam agressivamente o fígado, enquanto que o ER⁺ dos tipos luminal A e luminal B são mais lentos em se disseminar e são geralmente primeiramente identificados nos ossos (HARRELL et al., 2012). É possível que alguns subtipos de câncer de mama tendam a sofrer metástase mais prontamente que outros devido à quantidade de vasos presentes dentro e ao redor do tumor primário. Portanto, há a hipótese de que tumores do tipo basal e claudina-low, quando comparados aos tumores luminais, atraem preferencialmente um aumentado número de células endoteliais do sangue e da linfa, as quais facilitam sua metástase por meio da associação com os vasos, do intra e extravasamento e da disseminação. Alternativamente, pode não haver diferenças consideráveis na quantidade de vasos presentes dentro dos diferentes subtipos, mas ao invés disso, as propriedades fisiológicas das células tumorais regulam como os diferentes subtipos interagem com as células endoteliais (HARRELL et al., 2014).

Muitos pesquisadores especularam que estes subtipos tumorais definidos genomicamente podem representar a transformação de células-tronco com paradas em estágios específicos de desenvolvimento ou, alternativamente, transformação direta de vários tipos celulares maduros (PRAT; PEROU, 2009). Estas novas descobertas suportam a hipótese das células-tronco tumorais (CTT), pelo menos para alguns subtipos intrínsecos de tumores de mama.

1.4. Marcadores de células-tronco tumorais de mama

As células-tronco tumorais da mama são particularmente bem descritas com base em marcadores de superfície celular, sendo o fenótipo mais consistentemente associado com este tipo de células o $CD44^+/CD24^{-low}$ (ABRAHAM et al., 2005; MALLINI et al., 2013; PONTI, 2005). A presença da atividade da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) também foi associada com propriedades de células-tronco, e foi mostrado que tumores expressando ALDH1 são mais resistentes à quimioterapia baseada em platina, são mais agressivos e estão associados a um pior prognóstico (DENG et al., 2010; GINESTIER et al., 2007; MORIMOTO et al., 2009; TANEI et al., 2009).

CD44 é uma glicoproteína transmembrana multifuncional de classe I (NAOR et al., 2008) que geralmente age como um receptor específico para o ácido hialurônico, promovendo migração em células normais e é altamente expressa em quase todos os tipos de células tumorais em sua forma padrão ou variável (PONTA et al., 2003). Ela está principalmente associada com proteínas que monitoram as mudanças extracelulares e é crítica em regular a adesão celular, proliferação, crescimento, sobrevivência, motilidade, migração, angiogênese e diferenciação (DU et al., 2008; NAOR et al., 2008). CD44 é expressa na superfície de células tumorais e auxilia na disseminação hematogênica enquanto interage com a P ou L-selectina. Ela também está envolvida em numerosas cascatas de sinalização complexas auxiliando na iniciação do tumor pela interação com receptores vizinhos como a tirosina cinase (BOURGUIGNON, 2001).

CD24 é uma pequena molécula proteica da superfície celular, ancorada por glicosilfosfatidilinositol em uma ampla variedade de células tumorais. Ela é fortemente glicosilada e funciona nas interações célula-célula e célula-matriz (EL-SAFI et al., 2006; KRISTIANSEN et al., 2003; LEE et al., 2010; PIERRES et al., 1987). A glicosilação variável em CD24 atribui funções distintas em diferentes células nas quais

algumas ainda não são claras. Devido a sua distinta glicosilação ela age como um ligante versátil em várias células incluindo as tumorais, com diversas funções fisiológicas, tornando assim o seu mecanismo mais complexo para ser entendido (FANG et al., 2010).

É bem aceito que o fenótipo CD44⁺/CD24⁻ exibe propriedades de célula não diferenciada basal/mesenquimal e o CD44⁺/CD24⁺ exibe propriedades de célula altamente diferenciada basal/epitelial (RICARDO et al., 2011), entretanto o mecanismo pelo qual células epiteliais como as da linhagem MDA-MB-468 com alta expressão de CD24 podem induzir os tumores ainda permanece obscuro (JAGGUPILLI; ELKORD, 2012). Acredita-se que poucas células CD44⁺/CD24⁻ nesta linhagem passem por uma interconversão para o fenótipo CD44⁺/CD24⁺ após a metástase (SHERIDAN et al., 2006).

1.5.Tratamentos convencionais

Importantes avanços na abordagem do câncer de mama aconteceram nos últimos anos, principalmente no que diz respeito a cirurgias menos mutilantes, assim como a busca da individualização do tratamento. Levando em consideração o tamanho do tumor, bem como o estadiamento da doença, o tratamento pode envolver a terapia local ou sistêmica. A terapia local compreende o tratamento do tumor em seu sítio, sem afetar o restante do corpo, como por exemplo, a remoção cirúrgica do tumor e a aplicação da radiação ionizante; já a terapia sistêmica, refere-se aos fármacos que são administradas de forma oral ou endovenosa para alcançar as células tumorais em qualquer lugar do corpo, como a quimioterapia, a terapia hormonal (com a utilização, por exemplo, do tamoxifeno ou inibidores da aromatase) ou ainda terapias alvo, as quais utilizam anticorpos monoclonais capazes de limitar o crescimento do tumor, como exemplo o trastuzumab, que se liga a HER2 (CANCER FACTS & FIGURES, 2010).

O tratamento cirúrgico para o câncer de mama é geralmente dividido em duas categorias: a terapia de conservação da mama e a mastectomia. Existem dois tipos de cirurgia conservativa, a lumpectomia, que consiste na remoção cirúrgica apenas do tumor e uma margem adjacente do tecido normal e a quadrantectomia, na qual aproximadamente um quarto da mama é retirado (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, ACS).

Com relação à mastectomia, cirurgia para a retirada total da mama, vários tipos de procedimentos podem ser realizados (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; AMERICAN CANCER SOCIETY, ACS):

- i) Mastectomia simples: consiste na remoção da mama inteira, incluindo o mamilo, aréola e a maior parte da pele adjacente.
- ii) Mastectomia radial modificada: remoção de toda a mama, incluindo o mamilo, a aréola, a pele adjacente e o revestimento sobre os músculos do peito. Além disso, alguns linfonodos axilares podem ser removidos.
- iii) Mastectomia radial: remoção da mama inteira, incluindo o mamilo, a aréola, a pele adjacente, os linfonodos axilares e os músculos do peito. Por muitos anos, este tipo de operação foi o padrão. Entretanto, nos dias de hoje, a mastectomia radial é raramente realizada e geralmente apenas recomendada quando o câncer de mama já se espalhou para o músculo peitoral.
- iv) Mastectomia com preservação da pele: neste procedimento o tecido da mama, o mamilo e a aréola são removidos, mas a maioria da pele sobre a mama é conservada. Este tipo de cirurgia parece ser similar em eficácia à mastectomia radial modificada para muitas mulheres. Ela é apenas utilizada quando a reconstrução da mama é realizada imediatamente após a mastectomia e pode não ser indicada para tumores grandes ou que estão próximo da superfície da pele.
- v) Mastectomia com preservação do mamilo: Este procedimento é semelhante à mastectomia com conservação de pele, e é algumas vezes referida como mastectomia com conservação total da pele. Todo o tecido da mama, incluindo os ductos, é removido, mas a pele do mamilo e da aréola é preservada. Os tecidos sob e ao redor do mamilo e aréola são cuidadosamente cortados e examinados. Caso não haja células tumorais próximas ao mamilo ou à aréola, estes podem ser preservados, caso contrário, este procedimento não é indicado.

Há diversos casos em que a quimioterapia é recomendada, e ela pode ser adjuvante, neoadjuvante ou específica para casos mais avançadas quando já ocorreu a metástase. A quimioterapia adjuvante é realizada em pacientes que não apresentam mais

evidências de câncer após a cirurgia e tem a função de remover células tumorais ainda circulantes, e que não podem ser detectadas, evitando desta forma o risco de recidiva. A quimioterapia neoadjuvante, por sua vez, é realizada antes da remoção cirúrgica do tumor e utiliza os mesmos tratamentos que a quimioterapia adjuvante. O maior benefício da quimioterapia neoadjuvante é que ela promove uma diminuição no tamanho da massa de células tumorais e a conseqüente diminuição do volume tumoral facilitando sua remoção com uma cirurgia menos extensiva, além de permitir a visualização de como as células tumorais respondem ao tratamento. A quimioterapia ainda pode ser usada como tratamento principal para mulheres com metástase (AMERICAN CANCER SOCIETY, ACS).

Os medicamentos mais utilizados na quimioterapia para o câncer de mama incluem as antraciclina (doxorrubicina e epirrubicina) e os taxanos (paclitaxel e docetaxel). Estes podem ser usados em combinações com outros fármacos como fluorouracil (5-FU) e ciclofosfamida para se obter um melhor resultado. Muitos outros medicamentos como agentes de platina (cisplatina ou carboplatina), vinorelbina, capecitabina, doxorrubicina lipossomal, gemcitabina, mitoxantrona, paclitaxel ligado à albumina e eribulina também são utilizados, embora com menor frequência (AMERICAN CANCER SOCIETY, ACS).

Os medicamentos antimetabólicos que se ligam aos microtúbulos são amplamente utilizados e são geralmente classificados em dois grupos principais. Um grupo, conhecido como agentes desestabilizadores de microtúbulos, que inibe a polimerização dos microtúbulos em altas concentrações e inclui diversos compostos, tais como os alcaloides da vinca (vimblastina, vincristina, vinorelbina, vindesina e vinflunina), criptoficinas, halicondrinas, estramustina, colchicina e combrestatinas, que são usados clinicamente ou estão sob investigação clínica para o tratamento do câncer. O segundo grupo principal é conhecido como agentes estabilizadores de microtúbulos. Estes agentes mantêm o estado de associação entre as tubulinas dificultando ou impedindo o evento da catástrofe dos microtúbulos, e inclui o paclitaxel (o primeiro agente a ser identificado nesta classe), docetaxel (Taxotere), as epotilonas, discodermolide, as eleuterobinas, sarcodictinas, laulimalide, rhazinalam e certos esteroides e poliisoprenil benzofenonas (HUSZAR et al., 2009).

O paclitaxel é um dos fármacos mais amplamente utilizados, e como referido acima, foi inicialmente identificado como um produto natural, as taxanas. É um composto com atividade antimetabólica por estabilizar a formação dos microtúbulos

(HORWITZ, 1992; BRITO et al., 2008; GANGULY, 2010) interferindo com o fuso mitótico e levando a célula à apoptose (VLERKEN et al., 2008; GANGULY, 2010). O tratamento contínuo com este medicamento previne a conclusão da mitose, resultando no bloqueio do ciclo celular na fase G2/M (SCHIFF; HORWITZ, 1980; BRITO et al., 2008; GANGULY, 2010). Este bloqueio é interpretado no ponto de checagem subsequente da divisão celular o qual dispara a apoptose ou mantém a célula dentro da fase G1 sem a ocorrência da divisão celular (BHARADWAJ; YU, 2004; BRITO et al., 2008). Em resumo, a citotoxicidade observada neste composto antitumoral está ligada à associação irreversível com a tubulina, ao bloqueio do ciclo celular em metáfase e à morte da célula por apoptose (DONALDSON et al., 1994, JORDAN; WILSON, 2004; GANGULY, 2010).

Apesar de seus papéis benéficos no tratamento do câncer, esse medicamento ainda apresenta diversos efeitos adversos como hipotensão, alterações no eletrocardiograma, alopecia, náusea e vômito, diarreia, mucosite, sangramento, neutropenia, leucopenia, trombocitopenia, anemias, elevação das enzimas hepáticas, neuropatia periférica, reações alérgicas, mialgia e aumento da susceptibilidade a infecções dentre outras. Dada à ocorrência desses inúmeros efeitos, a identificação de compostos que tenham ação mais específica e eficaz são constante alvo de busca.

Muitos desses efeitos adversos são comuns à maioria dos medicamentos empregados na quimioterapia contra o câncer, pois, no geral, esses fármacos têm como alvo as células que se dividem mais rapidamente, e por isso eliminam as células tumorais. Entretanto, outros tipos celulares, como as células da medula óssea, dos revestimentos da boca e dos intestinos, dos folículos capilares, da camada germinativa da pele dentre outras, também se dividem rapidamente, e desta forma são também afetadas por estes esquemas terapêuticos. Atividades essenciais para a fisiologia celular e tecidual como endocitose e exocitose são mediadas por tráfego de vesículas dependentes de microtúbulos, sendo assim, a interferência com a dinâmica destas estruturas altera a eficiência destas atividades. Em decorrência do somatório destes tipos de interferências promovido pela administração dos fármacos mencionados anteriormente é que surgem os inúmeros efeitos adversos aqui relatados.

1.6. Cinesina Eg5

A mitose é um processo fundamental durante a divisão celular, designada a garantir a distribuição correta das cromátides-irmãs replicadas para as células filhas emergentes. O fuso mitótico é uma peça central neste processo, o qual consiste de fibras de microtúbulos que surgem dos polos dos fusos e se ligam aos cromossomos condensados por meio de uma estrutura especializada, o cinetocoro, no centrômero (CHEESEMAN; DESAI, 2008; COMPTON, 2000).

Novas terapias que tem como alvo a mitose continuam sendo desenvolvidas como drogas antineoplásicas. A progressão da mitose pode ser bloqueada não apenas pela interrupção da dinâmica dos microtúbulos, mas também pela inibição da função de outras moléculas essenciais para a mitose, como por exemplo, a proteína motora cinesina Eg5 (KAPOOR ; MITCHISON, 2001).

Recentemente, as cinesinas mitóticas ganharam significativa atenção como novos alvos para terapia do câncer. A superfamília das cinesinas é constituída por proteínas que se ligam e se movem ao longo dos microtúbulos por meio de seu domínio motor dependente de ATP (BERGNES et al., 2005; VALENTINE et al., 2006) e são responsáveis pela formação dos fusos mitóticos (BLANGY et al., 1995). Durante a intérfase, as cinesinas são responsáveis pelo transporte de cargas, tais como cromossomos e vesículas ao longo dos microtúbulos (VALE; FLETTERICK, 1997). Já durante a mitose, elas regulam a separação dos centrossomos bem como o alinhamento e a segregação cromossômica, exercendo assim um papel central nos eventos dinâmicos associados ao citoesqueleto (ENDOW, 1999; HSU et al., 2011).

Estas proteínas operam utilizando a energia proveniente da hidrólise do ATP para moverem-se ao longo dos microtúbulos na direção das extremidades positivas destas estruturas, região onde as moléculas de tubulina são adicionadas. Uma vez que a cinesina motora se liga ao microtúbulo, a taxa da sua atividade ATPase é geralmente aumentada de diversas centenas a milhares de vezes (JOHNSON; GILBERT, 1995), o que torna este um de seus principais parâmetros funcionais e que serve como um valioso método para monitorar a atividade de cinesina.

Todos os membros da superfamília de cinesinas compartilham um domínio motor catalítico de aproximadamente 350 – 450 aminoácidos, que é responsável pelos movimentos ao longo dos microtúbulos. Este compacto domínio medeia a interação com os microtúbulos e com o ATP e transforma a energia liberada pela hidrólise do ATP em força de motilidade (VALE; MILLIGAN, 2000). Próximo ao domínio motor ou “cabeça”, as cinesinas contêm uma região de “haste”, seguida por um domínio de “cauda” (Figura 4). Enquanto o domínio motor hidrolisa o ATP para gerar energia necessária para o movimento ao longo dos microtúbulos, as regiões da haste e da cauda são requeridas para a dimerização ou oligomerização e interação com as cargas (MIKI et al., 2005).

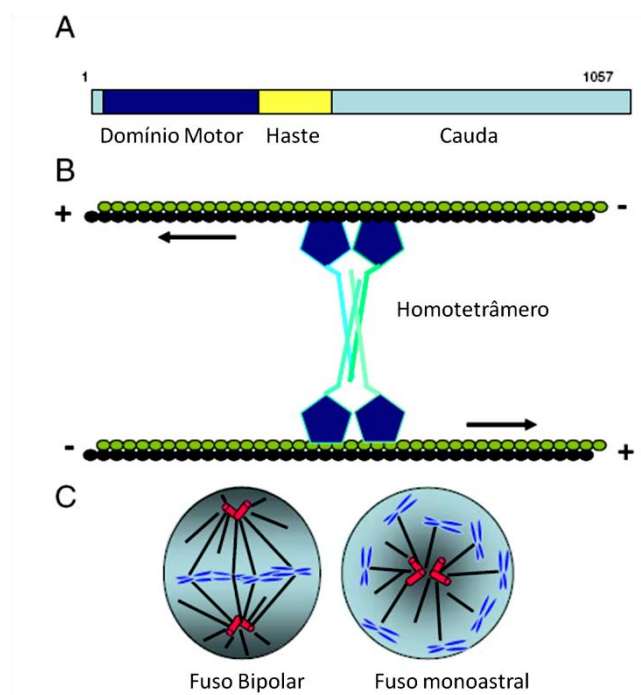


Figura 4. Cinesina motora Eg5. (A) Representação esquemática dos domínios da cinesina Eg5. (B) Modelo da função da Eg5: a estrutura tetramérica liga-se de forma antiparalela aos filamentos do microtúbulo; o movimento simultâneo em direção às extremidades positivas ao longo de ambas as fibras resulta no deslizamento dos microtúbulos ao longo um do outro. (C) representação esquemática de um fuso bipolar normal em metáfase e de um fuso monoastral causado pela inibição da cinesina (Adaptado de HUSZAR et al., Cancer Metastasis Rev, 2009).

A cinesina Eg5, também conhecida como KSP (*Kinesin Spindle Protein*), é a proteína motora representativa desta família e é requerida para a formação do fuso bipolar essencial para a correta separação das cromátides irmãs (BERGNES et al., 2005; GERECITANO et al., 2013). Esta proteína possui estrutura homotetramérica e quando ligada a microtúbulos antiparalelos se desloca para suas extremidades positivas (Figura

5). Diversas evidências sugerem que a Eg5 separa os centrossomos duplicados puxando os microtúbulos antiparalelos de forma independente, então estabelecendo o fuso bipolar (COLE et al., 1994; SAWIN et al., 1992; VALENTINE; GILBERT, 2007).

O fuso mitótico é um estado organizacional transitório dos microtúbulos do citoesqueleto em que as propriedades dinâmicas são essenciais para a separação dos cromossomos (INOUE; SALMON, 1995; NICKLAS, 1988; WITTMANN et al., 2001). A dinâmica dos microtúbulos nos fusos é dominada por dois processos: (1) pela rápida renovação de suas subunidades ocasionada pela instabilidade dinâmica (MITCHISON; KIRSCHNER, 1984) e (2) pelo constante movimento em direção aos polos dos fusos, denominado fluxo em direção aos polos (*polewards flux* ou *treadmiling*) (MITCHISON, 1989).

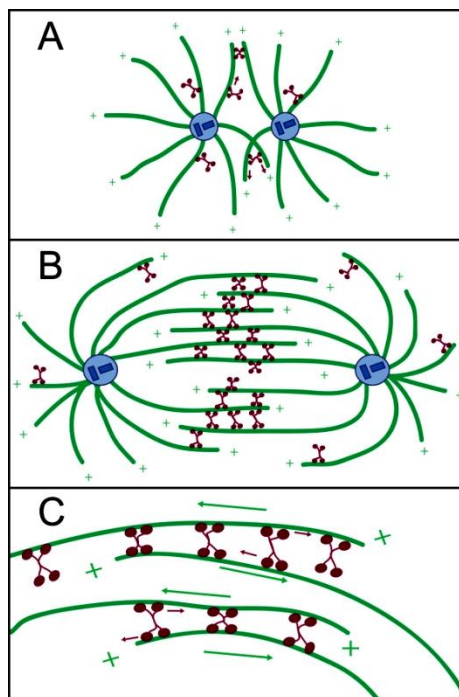


Figura 5. Estrutura homotetramérica da cinesina Eg5 e sua atividade no fuso mitótico. A proteína Eg5 (vermelha) auxilia na organização dos microtúbulos (verde) para formar o fuso mitótico. (A) No início da mitose, os centrossomos duplicados (azul) se separam e sofrem nucleação formando dois microtúbulos astrais. A Eg5 transloca-se então para as extremidades positivas dos microtúbulos e promovem a bipolaridade. (B) Na metáfase, um fuso bipolar estável é formado. A Eg5 motora provavelmente provê integridade estrutural e também desliza os microtúbulos em direção aos centrossomos, contribuindo para o estabelecimento do fluxo em direção aos polos. (C) Figura evidenciando a cinesina Eg5 movimentando-se em direção às extremidades positivas dos microtúbulos antiparalelos. (VALENTINE et al., Cell Division, 2006).

O papel específico da proteína Eg5 na mitose a tornou um alvo terapêutico interessante para bloquear o crescimento tumoral por prevenir a progressão do ciclo celular durante a mitose. Hayashi e colaboradores (2008) mostraram em seu trabalho que oligonucleotídeos antisense contra Eg5 eram responsáveis pela redução do crescimento de tumores em modelos xenograftos. Foi também demonstrado que na crise blástica da leucemia mieloide crônica e em células do câncer de próstata, nas quais a Eg5 é altamente expressa, a inibição desta proteína causa uma significativa parada no ciclo celular e uma supressão da proliferação celular (CARTER et al., 2006; HAYASHI et al., 2008).

Marcus e colaboradores (2005) demonstraram que inibidores da Eg5 permanecem mais efetivos em células tumorais resistentes ao paclitaxel. Além disso, Castillo e colaboradores (2007) demonstraram que a superexpressão de Eg5 é responsável pela condução da tumorigênese, visto que camundongos transgênicos superexpressando esta proteína eram propensos a desenvolver uma variedade de tipos tumorais.

A inibição desta proteína previne a separação dos centrossomos, resultando na formação de um fuso monoastral e na ativação do checkpoint do fuso mitótico (SAC), causando parada da divisão celular em metáfase devido à manutenção da atividade de cdc2/ciclina B (BLANGY et al., 1995; MAYER et al., 1999; STERN; MURRAY, 2001; WEIL et al., 2002). A ativação do checkpoint da mitose então, leva a ocorrência de uma mitose prolongada e a subsequente morte das células por apoptose em certas linhagens tumorais (MAYER et al., 1999).

A apoptose, um dos tipos de morte celular programada, é um processo de múltiplos passos importante por controlar o número de células e a proliferação como parte do desenvolvimento normal em organismos multicelulares. Conseqüentemente, a indução da morte celular por apoptose vem sendo enfatizada em estratégias antitumorais (FULDA; DEBATIN, 2006; PRADOS et al., 2005). Em relação à iniciação e execução da morte celular, duas vias apoptóticas foram identificadas: a via extrínseca, mediada pelo receptor de morte – Fas (Apoptosis Stimulating Fragment), e a via intrínseca ou mitocondrial, iniciada com a liberação do citocromo *c* para o citoplasma. Ambas as vias envolvem a ativação de caspases, que é uma família de cisteíno-proteases que são ativadas em uma cascata sequencial de clivagem por outros membros também da família das caspases. Nas células de mamíferos foram identificadas diferentes caspases e estas enzimas foram agrupadas em dois tipos básicos segundo o seu substrato:

caspases iniciadoras (caspases 8, 9, 10 e 12) e caspases executoras (caspases 2, 3, 6 e 7) (KIM, 2005; PHILCHENKOV et al., 2004).

A via extrínseca da apoptose é iniciada pela ligação entre ligante e receptor de morte transmembrana (receptor Fas). Esta ligação promove a trimerização dos receptores Fas e ativação de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain), que por sua vez, participa da remoção do pró-domínio das pró-caspases (pró-caspases 8 e 10 proximais da membrana plasmática) convertendo-as em caspases que se dimerizam e se tornam ativas. Estas caspases iniciadoras, em cascata, ativam outras caspases iniciadoras e também as executoras pelo mesmo mecanismo de remoção do pró-domínio. Caspases executoras têm como substrato as biomoléculas e assim ocorre a degradação do conteúdo citoplasmático. A caspase 3, indiretamente, é a enzima responsável pela degradação do genoma celular, uma vez que degrada o inibidor da CAD (desoxirribonuclease ativada por caspase). A enzima CAD livre e ativa migra para o núcleo e cliva o DNA em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases.

Já a via intrínseca da apoptose, é mediada pela mitocôndria e é iniciada pela liberação de citocromo *c* para o citoplasma. O citocromo *c* no citoplasma se associa ao APAF (Apoptotic Protease Activating Factor) e à caspase 9 gerando o oligômero conhecido como apoptossoma (KIM, 2005; PHILCHENKOV et al., 2004). A caspase 9 ativa irá ativar outras caspases iniciadoras e executoras levando à degradação dos substratos citoplasmáticos e do material genético pelo mesmo mecanismo já descrito para a via extrínseca.

As células apoptóticas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos, um processo que representa um passo crítico no remodelamento de tecidos, respostas imunes e na resolução da inflamação. A fagocitose das células apoptóticas suprime ativamente o processo inflamatório pela inibição da produção de citocinas inflamatórias e pela indução da produção de fatores antiinflamatórios, incluindo TGF- β e prostaglandina E2 (HENSON; BRATTON, 2013). A rápida eliminação destas células é necessária para a manutenção da saúde e homeostase em geral e para a prevenção da autoimunidade, da carga de patógenos ou do câncer. A rápida remoção das células que estão morrendo é uma etapa final chave, senão o objetivo final do programa de apoptose (HOCHREITER-HUFFORD; RAVICHANDRAN, 2013).

A morte celular por apoptose através da via intrínseca, devido a todas as suas características e vantagens fisiológicas é o resultado que se espera obter a partir do uso de quimioterápicos utilizados para a eliminação e/ou controle do câncer.

1.7. Dihidropirimidinona e seus derivados

Recentemente, diversos compostos que podem bloquear especificamente a proteína Eg5 vem sendo identificados, como por exemplo, os compostos derivados da dihidropirimidina (DHPMs). Estes compostos DHPM, que compreendem o alvo de estudo deste trabalho, são sintetizados por uma reação multicomponente (*Multicomponent Reaction* - MCR) descrita por Pietro Biginelli (BIGINELLI, 1893) e por este motivo recebeu o nome de reação de Biginelli. Esta reação é uma das metodologias mais elegantes de síntese de dihidropirimidinonas (RAMOS et al., 2013).

Estes compostos vêm atraindo muito a atenção dos pesquisadores devido ao fato da plataforma de dihidropirimidina ser multifuncional representando um sistema heterocíclico com eficiência farmacológica notável (KAPPE, 2000). Nas últimas décadas, uma ampla gama de efeitos biológicos incluindo atividade antiviral, antitumoral, antibacteriana e antiinflamatória foi atribuída a esses derivados parcialmente reduzidos da pirimidina (KAMAL et al., 2011; KAPPE, 1993; RUSSOWSKY et al., 2006; SVETLIK et al., 2010; TAWFIK et al., 2009).

A primeira pequena molécula permeável à célula contendo o núcleo DHPM descrita foi o monastrol (MAYER et al., 1999). Esta molécula apresenta função inibitória sobre a proteína Eg5 e foi isolada em uma busca baseada no fenótipo para descobrir compostos que bloqueiam a mitose. O monastrol causa um aprisionamento das células em mitose, as quais passam a apresentar fuso monoastral, de onde derivou o seu nome. Este fuso compreende um arranjo radial dos microtúbulos circundados por um anel de cromossomos (MAYER et al., 1999). Antes do monastrol, todas as pequenas moléculas que afetavam a maquinaria mitótica tinham como alvo a tubulina, que é a unidade formadora dos microtúbulos.

Os taxanos, alcalóides da vinca e as epotilonas naturais que se ligam à tubulina e aos microtúbulos interferindo com a dinâmica dos microtúbulos foram e continuam sendo amplamente utilizados como eficazes fármacos antitumorais (JORDAN; WILSON, 2004a; LI et al., 2014; NEHATE et al., 2014). Embora estas substâncias possuam propriedades antitumorais por impedir a mitose e a proliferação celular, os pacientes tratados com elas também passam pelos efeitos adversos que estão associados à perturbação de vias celulares dependentes dos microtúbulos; dentre estes efeitos podemos citar as neuropatias periféricas (ROWINSKY et al., 1993). Devido aos riscos desta neurotoxicidade induzida por estas moléculas e à seleção de populações

resistentes de células tumorais, alternativas aos fármacos cuja atividade se baseia na interferência com a dinâmica dos microtúbulos são amplamente desejadas. Muito dos esforços foram gerados em direção ao desenvolvimento de inibidores da mitose que fossem mais potentes e mais específicos, reduzindo a toxicidade dose-dependente e os indesejados efeitos adversos.

Assim, desde a descoberta do monastrol, diversos grupos vêm buscando desenvolver compostos estruturalmente análogos a ele, mantendo-se o núcleo DHPM e variando as cadeias laterais (Figura 6). A ideia é tentar otimizar a atividade antitumoral desses compostos para que eles sejam mais hidrossolúveis apresentando um efeito mais potencializado, específico e conseqüentemente menos danoso a outros tipos celulares que não as células tumorais.

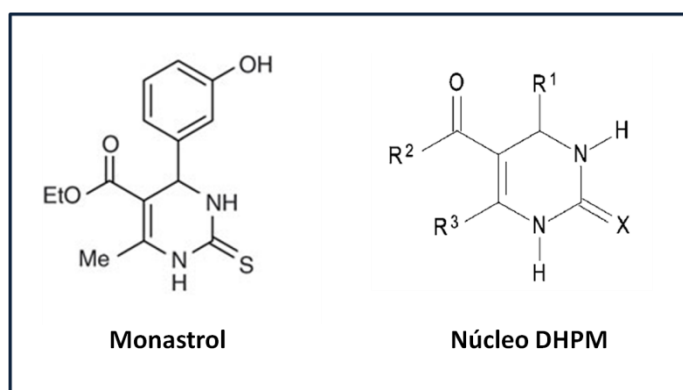


Figura 6. Fórmula estrutural do monastrol e do núcleo das dihidropirimidinonas que é mantido conservado em todos os derivados.

O monastrol, assim como outros compostos contendo o núcleo DHPM, diferentemente dos compostos que se ligam à tubulina, tem sua atividade baseada na inibição reversível e específica da motilidade da cinesina mitótica Eg5 por meio da inibição alostérica da hidrólise de ATP (BRIER et al., 2004; COCHRAN et al., 2005; HEALD, 2000; MALIGA et al., 2002; PETERS et al., 2006; SAKOWICZ et al., 2004). Além disso, foi observado que nos compostos contendo o motivo DHPM, a configuração estereogênica do centro influenciava em seus efeitos biológicos (KAPPE, 2000).

Russowsky e colaboradores (2006) mostraram que o monastrol e alguns de seus tio-análogos apresentam atividade antiproliferativa em diversas linhagens de células tumorais humanas como MCF-7 (mama), OVCAR03 (ovário), PC-3 (próstata), HT-29 (colo do útero), 786-0 (renal), NCI-ADR (mama expressando fenótipo de resistência a

multidrogas) e principalmente em UACC62 (melanoma). Alguns compostos derivados da 3,4-dihidropirimidinona já testados também apresentaram atividade antitumoral em células Hep-G2 (carcinoma hepatocelular) e HCT-116 (carcinoma colorretal) (TAWFIK et al., 2009). Estas características fazem com que compostos contendo o núcleo DHPM se tornem excelentes opções de uso como agentes antimitóticos, provendo inestimáveis oportunidades para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, com possível citotoxicidade mais específica e potencialmente menos efeitos adversos.

2. JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres. Segundo dados da American Cancer Society (2014), uma em cada oito mulheres (12%) norte-americanas desenvolverão câncer de mama invasivo durante suas vidas.

Apesar dos avanços terapêuticos dos últimos anos, o câncer continua sendo responsável por alta taxa de mortalidade dentro das populações humanas e os medicamentos utilizados no tratamento dessas doenças provocam uma série de efeitos adversos. Dessa forma, o tratamento convencional permanece insatisfatório para diminuir o ônus global do câncer.

Dentre os fármacos mais utilizados para o tratamento do câncer de mama atualmente estão os que têm como alvo os microtúbulos. Enquanto essenciais para a mitose, os microtúbulos também são requeridos para uma variedade de outras funções fisiológicas. Os microtúbulos são componentes essenciais do citoesqueleto, regulando o tráfego de vesículas nas células e o posicionamento de organelas (JORDAN; WILSON, 2004). É possível que alguns dos benefícios terapêuticos advindos do uso de fármacos que se ligam aos microtúbulos possam derivar da sua interação com estas atividades, ao invés de ser devido apenas às perturbações no fuso mitótico. Como os microtúbulos estão diretamente associados à excitose, estas estruturas são primordiais para o transporte de vesículas ao longo das fibras dos axônios. A perturbação desta função é a base para a neurotoxicidade que é geralmente observada em pacientes fazendo uso de medicamentos que têm como alvo os microtúbulos. Além disso, o uso desta classe de compostos pode selecionar células tumorais resistentes aos “venenos” de microtúbulos. Esta resistência vem sendo identificada em diversos mecanismos como mutações nas tubulinas, superexpressão de bombas para efluxo de medicamentos e expressão alterada de subtipos de tubulina (HUSZAR et al., 2009; JORDAN; WILSON, 2004). Assim, há

um esforço global significativo para gerar novos compostos antimetabólicos, os quais tenham o potencial de superar algumas das toxicidades e mecanismos de resistência apresentados pelos fármacos que tem como alvo os microtúbulos. Somado a isto e tendo em vista que o aprisionamento das células em mitose é uma estratégia terapêutica geral em câncer, inibidores da cinesina Eg5 seriam tão eficazes quanto os fármacos que se ligam aos microtúbulos, no que se refere à citotoxicidade para células tumorais, entretanto, devido ao seu mecanismo de ação, estas moléculas poderiam não apresentar neurotoxicidade como um efeito adverso.

Assim, o impacto esperado com a execução deste trabalho está centrado na identificação de compostos derivados da 3,4-dihidropirimidinona que, em baixas concentrações de uso sejam potentes inibidores da mitose, apresentem baixa citotoxicidade para as células normais e que possivelmente acarrete menos efeitos adversos em decorrência da sua utilização *in vivo*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de trinta e sete derivados da 3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) no modelo de adenocarcinoma mamário humano *in vitro*, utilizando as linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231; e após selecionar os compostos com melhor atividade citotóxica e/ou citostática identificar sua ação na modulação de diversas características-chave apresentadas pelas células tumorais.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1. Avaliar e selecionar os derivados da 3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) quanto aos seus efeitos citostáticos e citotóxicos no modelo de adenocarcinoma mamário *in vitro*;
- 3.2.2. Determinar a citotoxicidade dos derivados selecionados sobre células não tumorais;

3.2.3. Analisar, *in silico* por dinâmica molecular, a interação dos inibidores selecionados com a proteína Eg5 de forma a verificar a estabilidade conformacional e a flexibilidade da proteína Eg5 ligada aos compostos selecionados;

3.2.4. Avaliar, *in vitro*, o potencial de inibição das cinesinas pelos compostos selecionados e sua interferência no fuso mitótico;

3.2.5. Analisar as células tumorais quanto a sua morfologia, proliferação, ciclo celular, perfil de morte, capacidade de neovascularização, invasibilidade e população de células-tronco tumorais quando tratadas com os DHPMs.

4. METODOLOGIA

4.1. Reagentes e equipamentos

Os trinta e sete 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 DMEM, RPMI, SFB, Tripsina 0,25% em EDTA, todos obtidos da empresa GIBCO – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA e Leibovitz – L15 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-488 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 CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, todos da Invitrogen – Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA; Colchicina e DMSO, da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; ATP da Invivogen, San Diego, CA, EUA; Kit para o ensaio de fosfato inorgânico ligado à enzima - *Kinesin ELIPA (Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay)* da Biochem – Cytoskeleton Inc., Denver, CO; Suprimento de crescimento de células endoteliais (ECGS); Kit de ensaio *in vitro* de angiogênese da Millipore (Billerica, MA, EUA) e os insertos para ensaio de invasão e a matriz de membrana basal (Matrigel™) foram adquiridos da BD Biosciences (San Jose, CA, EUA).

Para imunofluorescência utilizou-se Triton x-100 e BSA da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA; leite desnatado Molico 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 o ensaio de CAM foram utilizados ovos de galinha fertilizados cedidos pela Asa Alimentos, esponja hemostática de colágeno hidrolisado – Hemospon e genisteína da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA. As análises do ensaio de CAM foram realizadas usando o *Software* Wimasis Image Analysis (Wimasis GmbH, Munich, 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 e para análises ultraestruturais foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão, Jeol® 1011 – Tokyo, Japão, operando em 80 kV.

Para leitura de absorbâncias foi utilizado o equipamento Spectramax M5 e os dados analisados pelo programa SoftMax Pro 5.2, ambos da Molecular Devices, LLC, EUA. O citômetro de fluxo utilizado foi FACSTalibur, BD Biosciences, Inc., San Jose, CA e a análise dos dados foi realizada no programa FlowJo v.5.2.7, Tree Star, Inc. Análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc.

4.2. Síntese diferencial de DHPMs pelo método de Biginelli

Tendo em vista a potente atividade antitumoral apresentada pelo monastrol, análogos desse composto foram sintetizados mantendo-se o núcleo de dihidropirimidinona e alterando-se as cadeias laterais com o intuito de se obter derivados com melhor atividade antitumoral. A melhora esperada da sua atividade estaria associada à maior hidrossolubilidade, maior avidéz e especificidade pelas regiões de interação com o seu alvo, apresentando assim menos citotoxicidade para células normais. Os derivados foram sintetizados pela reação de Biginelli, desenvolvida por Pietro Biginelli (BIGINELLI, 1893) com o aprimoramento da reação pelo acréscimo de um catalisador reciclável de ferro ligado ao imidazol, como descrito em 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 DaSilveira Neto, protegida pela patente sob pedido de número BR 10 2012 021717-1.

As fórmulas estruturais e moleculares, bem como as massas molares dos trinta e sete compostos testados neste trabalho estão contidos no anexo 1.

4.3. Manutenção das células

As células de adenocarcinoma mamário humano, MCF-7, e de cultura primária de tecido conjuntivo foram cedidas pelo Laboratório de Morfologia da Universidade de Brasília. As células MDA-MB-231 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, foram usadas como controle de células normais. As células MCF-7 e os fibroblastos foram cultivadas em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) 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. Ambos os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) e 25 µg/mL de gentamicina.

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

Os trinta e sete compostos, com potencial atividade antimetabólica, derivados da 3,4-dihidropirimidinona foram solubilizados em DMSO, na concentração de 100 mM, para realização dos testes *in vitro*. As concentrações testadas variaram de 25 µM a 1 mM 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 para avaliar a citotoxicidade destes em células normais.

Todos os experimentos subsequentes foram realizados utilizando-se apenas os compostos selecionados pelo teste de MTT (item 4.5) 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

A viabilidade das células MCF-7, MDA-MB-213 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. 3×10^3 células MCF-7, MDA-MB-231 ou fibroblastos, por poço, foram semeadas 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 das células tratadas com as células controle no mesmo período de incubação [porcentagem de inibição = $(1 - \text{densidade da célula do grupo tratado}) / \text{densidade da célula do grupo controle}$].

4.6. Cálculo do IC₅₀

Os valores da concentração inibitória 50 (IC₅₀) para as células MCF-7 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* (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

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 os compostos que apresentaram melhor atividade citotóxica no teste de viabilidade celular por MTT 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. Dose máxima de tratamento estabelecida para cada um dos compostos DHPMs selecionados pelo teste de viabilidade celular por MTT em um tratamento de 72h nas linhagens MCF-7 e MDA-MB-231.

Composto	[] máxima não citotóxica
4m	1 mM
4bt	0,8 mM
4p	0,4 mM
4bc	1 mM
4x	0,8 mM
Monastrol	1 mM

4.8. Análise *in silico* por Dinâmica Molecular

As simulações de dinâmica molecular (MD) da proteína Eg5 sozinha ou em complexos com cada um dos 5 compostos pré-selecionados foram realizadas em um ambiente aquoso, usando o modelo de água *Single Point Charge* (SPC) (BERENDSEN et al., 1981). As análises foram feitas usando o pacote computacional GROMACS 4 (HESS et al., 2008). As dinâmicas utilizaram o modelo tridimensional da proteína Eg5, coletada do PDB (PDB-ID 1X88) como estrutura inicial. Os complexos foram imersos em aproximadamente 65.600 moléculas de água em caixas dodecaédricas com uma distância mínima de 0,7 nm entre os complexos e os limites da caixa. Íons de sódio foram também inseridos nos sistemas com o objetivo de neutralizar a carga total. A

geometria das moléculas de água foi ajustada usando o algoritmo *SETTLE* (MIYAMOTO; KOLLMAN, 1992). Todos os comprimentos de átomos de ligação foram ligados usando o algoritmo *LINCS* (HESS et al., 1997). As correções eletrostáticas foram feitas pelo algoritmo de *Particle Mesh Ewald* (DARDEN et al., 1993), com um raio de corte de 1,4 nm, no intuito de minimizar o tempo computacional. O mesmo raio de corte foi usado para as interações de Van der Waals. A lista dos vizinhos de cada átomo foi atualizada a cada 10 passos da simulação de 2 fs. O gradiente conjugado e o algoritmo *Steepest Descent* foram implementados para a minimização de energia. Após, o sistema foi submetido à normalização de pressão e temperatura, usando um integrador *Stochastic Dynamics*. As topologias para os compostos foram construídas usando o servidor PRODRG (SCHÜTTELKOPF; AALTEN, VAN, 2004). As simulações foram realizadas *in silico* a 300 k, usando o campo de força GROMOS96. O tempo total para cada simulação, realizado em triplicata, foi de 50 ns.

4.9. Ensaio de inibição da atividade enzimática da cinesina por DHPMs

A taxa ATPásica da cinesina ativa é considerada uma função que serve de parâmetro para monitorar e estudar a atividade de cinesina sob várias condições experimentais. Desta forma, para testar a atividade inibitória dos DHPMs sobre a cinesina Eg5 foi utilizado o kit *Kinesin ELIPA (Enzyme Linked Inorganic Phosphate Assay – Biochem)* que se baseia na mudança de absorbância de 330 para 360 nm, a qual ocorre quando 2-amino-6-mercaptopurina ribonucleosídeo (MESG) é convertida cataliticamente em 2-amino-6-mercaptopurina na presença de fosfato inorgânico (Pi). Esta reação é catalisada pela purina nucleosídeo fosforilase (PNP). Uma molécula de fosfato inorgânico irá produzir uma molécula de 2-amino-6-mercaptopurina em uma reação irreversivelmente essencial (Analytical Biochemistry, 1997). Assim, a absorbância de 360 nm é diretamente proporcional à quantidade de Pi gerado na reação ATPásica da cinesina.

As reações foram conduzidas em placa de 96 poços de acordo com as recomendações do fabricante (Kinesin ELIPA Biochem Kit – BK060). A cada reação foi adicionado o IC₅₀ de cada inibidor, calculado com base no tratamento das células MCF-7 por 72h: 4m (197,3 µM), 4bt (126,9 µM), 4p (87,54 µM), 4bc (234,9 µM), 4x (276,5 µM) e monastrol (110,4 µM). A leitura foi feita por 30 min em intervalos de 30s,

imediatamente após a incubação, utilizando-se o espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices) no comprimento de onda de 360nm.

4.10. Imunomarcação 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. 7×10^4 células MCF-7 foram semeadas sobre lamínulas redondas em placas de 24 poços. Após a adesão, as células receberam ou não o tratamento por 24h, 48h ou 72h com os compostos e concentrações 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, a solução de bloqueio (leite desnatado 1%, albumina sérica bovina (BSA) 2,5%, soro fetal bovino (SFB) 8% em PBS – pH7,4) foi adicionada e deixada por 20 min e logo após, as células foram incubadas com anticorpo primário *anti- α -tubulina* produzido em camundongos por 16h a 4°C. No dia seguinte, os poços foram lavados com PBS e o anticorpo secundário *Alexa-488 anti-camundongo* (5 μ g/mL) foi adicionado por 1h a 37°C protegido da luz. Os poços foram então lavados com PBS e incubados por 5 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).

4.11. Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão

Para a análise ultraestrutural ocasionada em decorrência do tratamento com o composto 4p, 8×10^5 células MCF-7 foram plaqueadas em placas de 6 poços e após a adesão, as células receberam ou não (controle) o tratamento com o composto 4p na concentração de 0,4 mM por 48h. Para o processamento, as células foram previamente lavadas com PBS e fixadas *overnight* com glutaraldeído 2,5% a 4°C. Após, as células foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) e pós-fixadas, por 30 minutos, com tetróxido de ósmio 1% e ferricianeto de potássio 0,8% em tampão cacodilato de sódio (10 mM de CaCl_2 em 0,2 M de cacodilato de sódio). As células foram lavadas duas vezes com água e então foram contrastadas com acetato de uranila

0,5% a 4°C. Após, as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (30% a 100%) por 10 min cada e emblocadas em resina Spurr. Cortes ultrafinos foram realizados e as secções ultrafinas foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão (Jeol, 1011), operado à 80 KV.

4.12. Análise das alterações morfológicas causadas pelos tratamentos com DHPMs

As análises das alterações morfológicas nas células MCF-7 e MDA-MB-231, ocasionadas em decorrência de 72h de tratamento com os análogos do monastrol como diminuição do tamanho das células, aquisição de uma morfologia mais arredondada representada por perdas dos pontos de adesão focal e redução da densidade celular, foram avaliadas por microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiovert 100) com magnificação de 20x e as imagens foram capturadas com o auxílio do *software AxioVision* (Zeiss).

4.13. Caracterização da morte celular induzida pelos DHPMs

A análise do tipo de morte induzida pelos tratamentos foi realizada pela marcação das células tumorais de mama, MCF-7 e MDA-MB-231 com Anexina V-Alexa 680 (para MCF-7) ou Anexina V-FITC (para MDA-MB-231) e Iodeto de propídio (PI). Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em apoptose inicial, em apoptose tardia, em necrose e também as células viáveis. 1×10^5 células MCF-7 foram semeadas em placas de 12 poços. Após 24h, as células receberam os tratamentos por 72h com os compostos e concentrações indicados na tabela do item 4.7. Decorrido o tempo de tratamento, tanto as células aderentes como as flutuantes foram lavadas com PBS e ressuspendidas 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

feito no citômetro FACSTalibur (Becton Dickinson) com o auxílio do *software CellQuest-Pro*. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em monoplicata.

4.14. Análise do conteúdo de DNA por marcação com iodeto de propídio (PI)

Para a análise do conteúdo de DNA foi realizada a marcação intracelular com Iodeto de Propídio (PI). 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.

Células MCF-7 ou MDA-MB-231 (1×10^5) foram semeadas em placas de 12 poços. Após sua adesão as células foram tratadas com os compostos nas concentrações indicadas na tabela do item 4.7 por 24, 48h e 72h. Após o tratamento, as células foram fixadas com etanol 70% por 2 h no gelo, lavadas com PBS e ressuspensas em solução de iodeto de propídio (0,1% de Triton X-100, 10 $\mu\text{g/mL}$ de PI e 100 $\mu\text{g/mL}$ 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 20.000 eventos de cada amostra foram analisados por citometria de fluxo. O conteúdo de DNA das células nas diferentes fases do ciclo celular foi determinada utilizando-se a plataforma de ciclo celular do *software FlowJo*. As análises foram feitas a partir de 3 experimentos independentes realizados em monoplicata.

4.15. Análise de proliferação celular

A análise da atividade proliferativa das células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas ou controle foi medida por citometria de fluxo por meio da marcação com CFSE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster) na concentração final de 10 μM (diluído em PBS/BSA 0,1%) segundo as recomendações do fabricante.

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.

As células previamente marcadas foram colocadas em cultura na concentração de 1×10^5 células por poço em placas de 12 poços. Após sua adesão, as células receberam o tratamento com os compostos 4m, 4bt, 4p, 4bc, 4x e monastrol na concentração do seu IC_{50} , 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 $10 \mu\text{M}$ 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 24, 48 e 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 feita utilizando-se a plataforma de Proliferação Celular do *software FlowJo*.

4.16. Análise da população de células-tronco tumorais

Para a avaliação da modulação do fenótipo de células-tronco tumorais pelos DHPMs selecionados, anticorpos contra os marcadores de superfície celular CD44 e CD24 foram utilizados nas linhagens MCF-7 e MDA-MB231, controle ou tratadas. Para esta análise, 1×10^5 células foram cultivadas em placas de 12 poços e após sua adesão receberam tratamento por 24h com os compostos e concentrações da tabela do item 4.7, ou apenas meio de cultivo (controle negativo). Decorrido o tempo de tratamento, as células foram coletadas, lavadas com PBS/BSA 1% e incubadas por 30 min, no gelo, com os anticorpos anti-CD24-PE e anti-CD44-FITC, ambos na concentração de 1:20 em PBS/BSA 1%. Os controles isotípicos foram incubados nas mesmas condições experimentais. Após a incubação, as células foram centrifugadas e lavadas com PBS/BSA 1%. As análises foram realizadas por meio da aquisição de 20.000 eventos no citômetro de fluxo.

4.17. Análise do potencial antiangiogênico dos DHPMs

4.17.1. Ensaio de formação de tubos por células endoteliais

Para a análise do potencial antiangiogênico *in vitro*, o Kit de ensaio *in vitro* de angiogênese (Millipore) foi utilizado seguindo as recomendações do fabricante. 8×10^3 células endoteliais da linhagem HUVEC foram ressuspensas em meio contendo suplemento para crescimento de células endoteliais (ECGS – Millipore) (1 DMEM:1 RPMI, 2% SFB, 25 µg/ml gentamicina, 15 µg/ml ECGS) com ou sem tratamento com os derivados selecionados, nas concentrações de 30 µM, IC₅₀ ou 300 µM e plaqueadas sobre a superfície de matrigel (ECMatrix™) polimerizada, em placas de 96 poços. As células foram incubadas por 11h a 37°C e 5% de CO₂. Decorrido este tempo, os poços foram fotografados utilizando o sistema de captura de imagens acoplado ao microscópio de luz invertido, na magnificação de 20x. A análise quantitativa da formação de estruturas semelhantes a vasos foi realizada por padrão de reconhecimento, segundo as recomendações do fabricante, as quais também podem ser observadas na tabela 3.

Tabela 3. Identificação e valores atribuídos aos padrões de reconhecimento da formação de vasos para a realização da análise quantitativa da neovascularização *in vitro*.

Padrão	Valor
Células individuais, bem separadas.	0
Células começando a migrar e alinhando-se umas em relação às outras	1
Tubos capilares visíveis. Ausência de brotamento.	2
Brotamento de novos vasos visíveis.	3
Início da formação de polígonos fechados.	4
Desenvolvimento de estruturas semelhantes a uma rede complexa.	5

4.17.2. Ensaio de CAM

Como uma abordagem complementar, foi explorada a possibilidade de usar o modelo *in vivo* de tumores cultivados na membrana corioalantóica (CAM) de ovos embrionados de galinha, para testar o potencial antiangiogênico dos DHPMs. Para tal, utilizamos o protocolo estabelecido por Ribatti (RIBATTI, 2012) com algumas

adaptações de tempo, segundo Sun e colaboradores (SUN et al., 2012). Um mínimo de três ovos embrionados por grupo foi incubado a 30°C e 60-70% de umidade. No terceiro dia do desenvolvimento, uma pequena abertura quadrilateral de aproximadamente 1 cm² para a possibilitar a observação da viabilidade e crescimento embrionário foi feita na casca, a qual foi selada com fita adesiva transparente logo após a abertura. No décimo dia, 1 x 10⁵ células MCF-7 ou MDA-MB-231 ressuscendidas em meio de cultura suplementado (controle experimental) ou em meio suplementado contendo 500 ng dos compostos 4m, 4bt, 4p, 4bc, 4x, monastrol ou genisteína (controle antiangiogênico), foram inoculados em um pequeno inserto (~ 1 mm²) de esponja hemostática feita de colágeno hidrolisado (Hemospon), o qual foi inserido na membrana corioalantóica dos ovos. A abertura foi então novamente selada com fita adesiva para prevenir a desidratação e contaminação e os ovos foram incubados a 37°C por outros sete dias. No décimo sétimo dia, uma abertura maior foi feita nos ovos, e a CAM foi fotografada com o auxílio de um estereomicroscópio (Zeiss, Alemanha) para a posterior quantificação dos vasos sanguíneos, a qual foi realizada utilizando as facilidades oferecidas pelo servidor Wimasis Image Analysis..

4.18. Ensaio de invasão celular

Os efeitos dos DHPMs na capacidade invasiva das células tumorais de mama MDA-MB-231 foram determinados pelo ensaio de invasão celular. Insertos para placas de 24 poços (BD Biosciences), com poros de 8 µm, foram revestidos com uma fina camada (30 µL) de MatrigelTM (BD Biosciences) diluído 5x em meio L15 gelado livre de soro fetal bovino e a placa foi deixada por 1h a 37°C para a solidificação da camada de matrigel.

Células MDA-MB-23, previamente privadas de nutrientes pela ausência de soro fetal bovino no meio de cultivo por 24h, na densidade de 1 x 10⁵ células/inserto, foram ressuscendidas em 500 µL de meio L15 não suplementado, contendo ou não os compostos 4m, 4bt, 4p, 4bc, 4x ou monastrol na concentração do seu IC₅₀ e foram plaqueadas no inserto coberto com matrigel. Na parte inferior, correspondente ao poços, foi adicionado 750 µL de meio L15 suplementado com 10% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por 48h.

Após a incubação, as células que não invadiram, correspondentes às que ficaram na superfície superior ao filtro, foram removidas com cotonetes umedecidos com meio de cultura. As células que invadiram através da membrana de matrigel e dos poros para o lado inferior do filtro foram fixadas com metanol 100% por 5 min, coradas com cristal violeta 0,1% por 5 min e lavadas em dois banhos de H₂O destilada para remover o excesso de corante. Após a secagem dos insertos, dez campos por grupo foram fotografados, na magnificação de 32X, e contados. A taxa de invasividade das células foi expressa como média do número de células que invadiram/campo. Os experimentos foram repetidos três vezes em triplicata.

4.19. Análise estatística

Os dados das análises quantitativas foram submetidos ao teste t de Student para amostras não pareadas (entre dois grupos) 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 ± SEM. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Os derivados de DHPM apresentam citotoxicidade dose e tempo dependentes e são seletivos para células tumorais

O monastrol foi a primeira pequena molécula permeável à célula conhecida com propriedades inibitórias potenciais contra a maquinaria mitótica (MAYER, 1999). Este trabalho foi baseado em 37 compostos com o mesmo núcleo do monastrol, os derivados da 3,4-dihidropirimidinona. Assim, o estudo começou com a realização de uma triagem com o objetivo de identificar os compostos com atividade citotóxica mais elevada contra as linhagens de tumor de mama e ao mesmo tempo com poucos efeitos sobre as células normais. A atividade antitumoral desses 37 DHPMs foi testada pelo ensaio de viabilidade celular por MTT utilizando-se as células de adenocarcinoma mamário, MCF-7 e MDA-MB-231 nos tempos de 24, 48 e 72h de tratamento na concentração máxima de 1 mM.

Ao analisar as células MCF-7 foi possível observar que após 24h de tratamento, 5 compostos (4bo, 4bq, 4bu, 4h e 4f) apresentaram citotoxicidade $\geq 50\%$ (Figura 7); em 48h, 13 (4bo, 4bt, 4bq, 4j, 4m, 4x, 4r, 4p, 4bc, 4ba, 4h, 4i e 4f) tiveram esta atividade (Figura 8) e em 72h, 22 compostos (4bo, 4br, 4bs, 4bt, 4k, 4bq, 4j, 4m, 4v, 4x, 4t, 4u, 4r, 4p, 4bc, 4n, 4ba, 4bj, 4bv, 4h, 4i, 4f) eliminaram mais do que 50% das células (Figura 9). Desta forma, é possível observar uma relação direta entre o tempo de tratamento e a citotoxicidade destes compostos. Em 72h de tratamento, 6 compostos (4bt, 4x, 4p, 4bc, 4h e 4m) causaram a morte de mais de 80% das células.

As células MDA-MB-231, entretanto, mostraram-se bem mais sensíveis ao tratamento com os DHPMs (Figuras 10-12). Um número mais elevado de compostos apresentou citotoxicidade bastante relevante, e estas células respondem mais rapidamente ao tratamento. Em 24h, 13 derivados (4bp, 4bm, 4bo, 4d, 4bs, 4bt, 4z, 4v, 4t, 4u, 4p, 4bc e 4n) levaram $\geq 60\%$ de células à morte (Figura 10); em 48h, 22 DHPMs (4bn, 4p, 4bm, 4bo, 4d, 4bs, 4bt, 4bq, 4m, 4z, 4v, 4t, 4u, 4p, 4bc, 4bu, 4bx, 4h, 4i e 4f) tiveram esse padrão de atividade (Figura 11) e em 72h, apenas 8 compostos (4c, 4o, 4ba, 4bd, 4bj, 4be, 4bv e 4by) não reduziram a viabilidade para $\leq 40\%$ (Figura 12).

Após este teste, um cruzamento dos dados obtidos com as duas linhagens foi realizado e 5 compostos que apresentaram atividade citotóxica de mais de 70% em ambas as linhagens celulares foram selecionados (4m, 4bt, 4p, 4bc e 4x) para prosseguir com os testes. Embora alguns outros compostos tenham apresentado atividade mais satisfatória contra a linhagem MDA-MB-231, o objetivo da escolha foi selecionar os compostos que mantivessem seus efeitos nas duas linhagens. Como pode ser observado na figura 13, todos estes compostos tem sua atividade dependente do tempo. Desta forma, foi estabelecido o tempo de 72h para a realização dos experimentos posteriores.

MCF-7

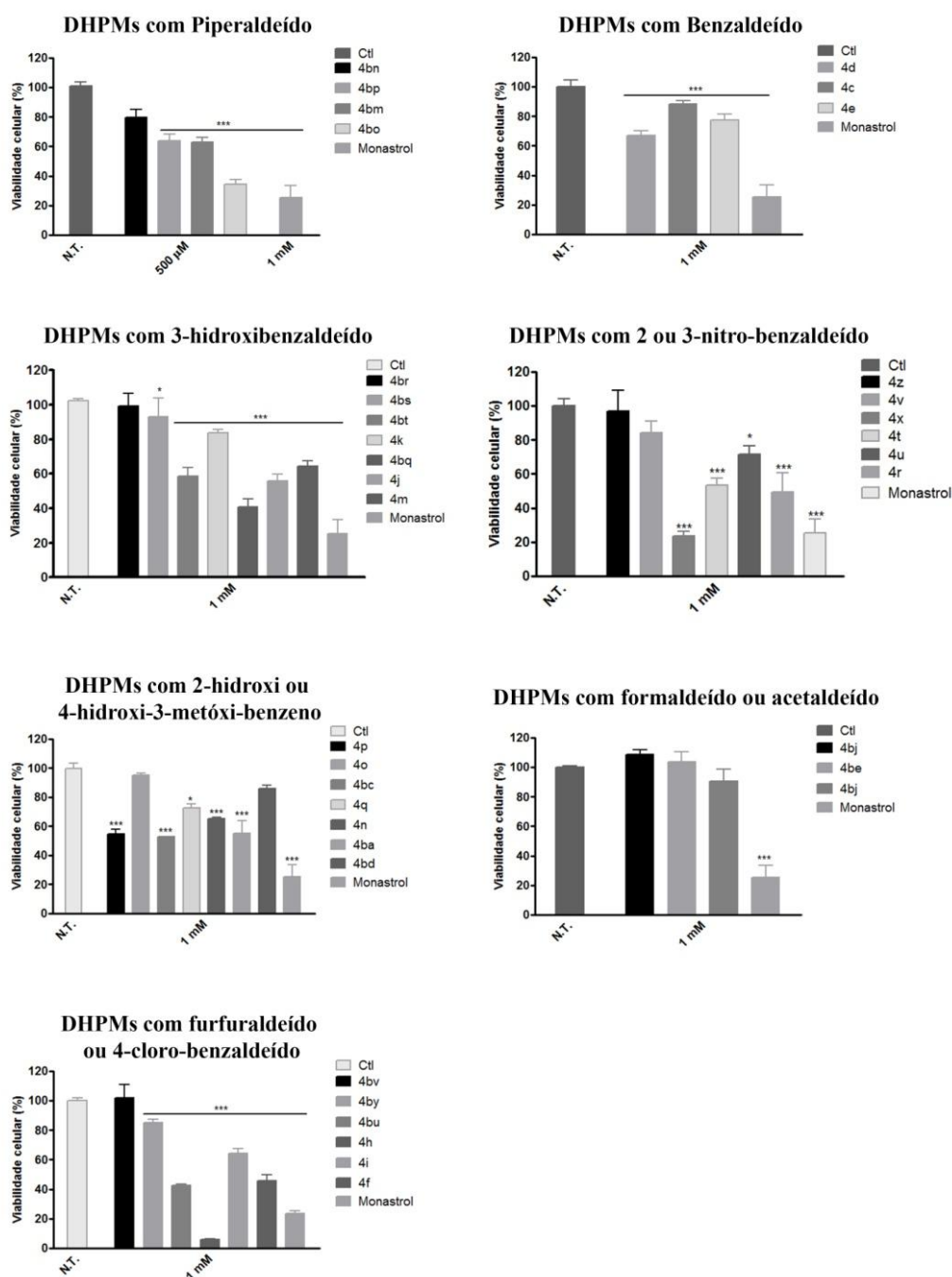


Figura 7. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MCF-7 em 24h de tratamento. As células MCF-7 foram tratadas com os 37 compostos na concentração de 1 mM por 24h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle não tratado.

MCF-7

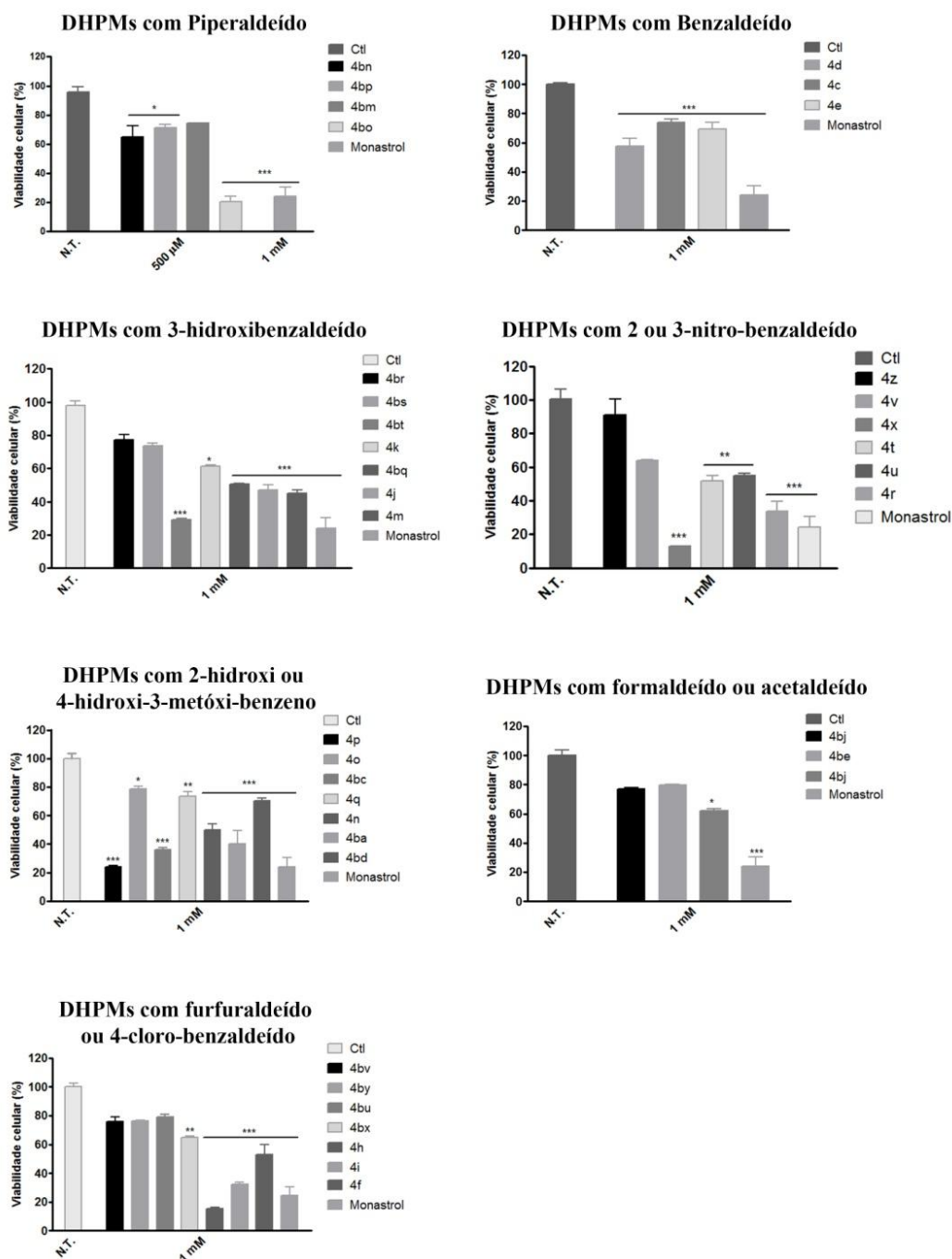


Figura 8. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MCF-7 em 48h de tratamento. As células MCF-7 foram tratadas com os 37 compostos na concentração de 1 mM por 48h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle não tratado.

MCF-7

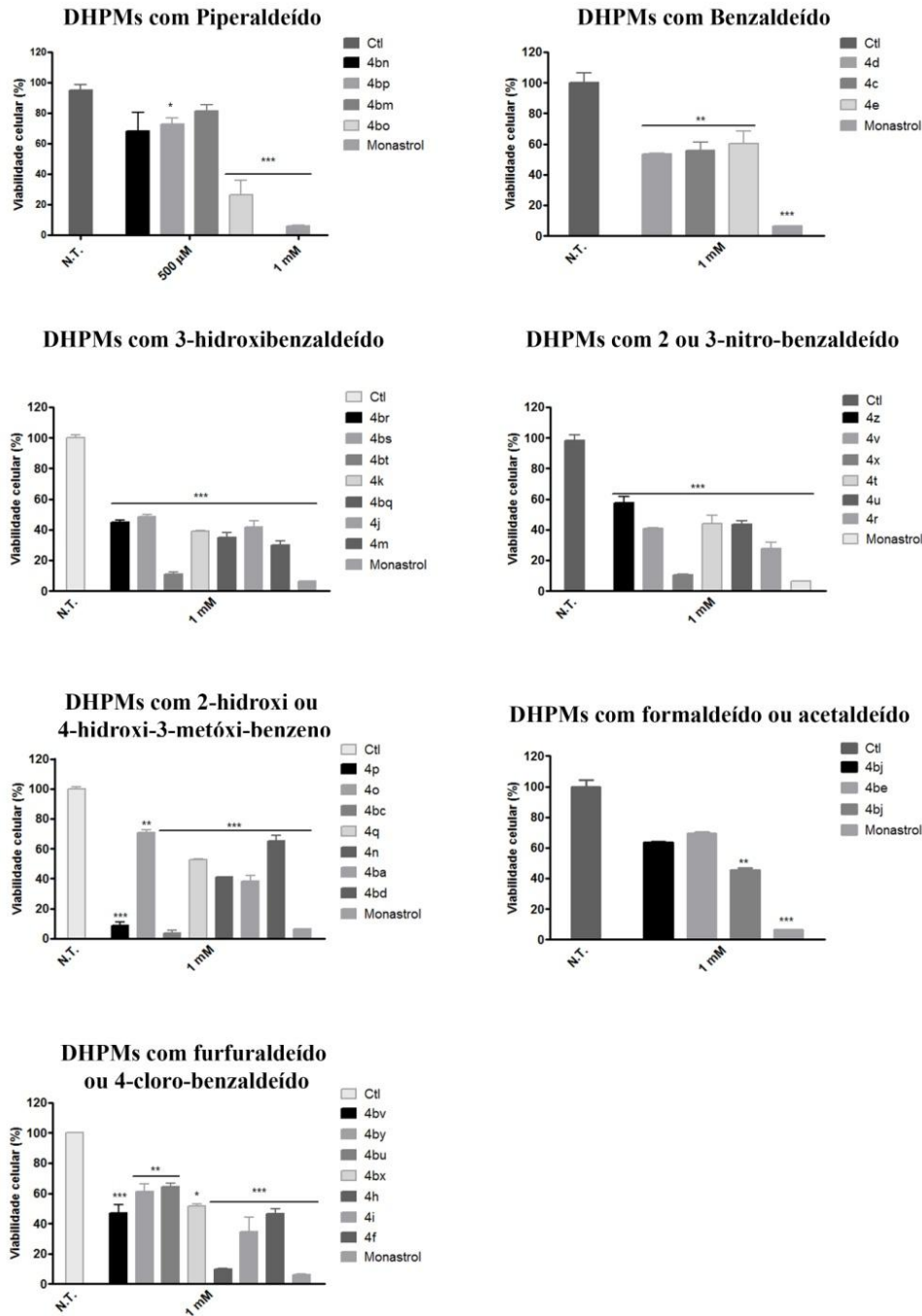


Figura 9. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MCF-7 em 72h de tratamento. As células MCF-7 foram tratadas com os 37 compostos na concentração de 1 mM por 72h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle não tratado.

MDA-MB-231

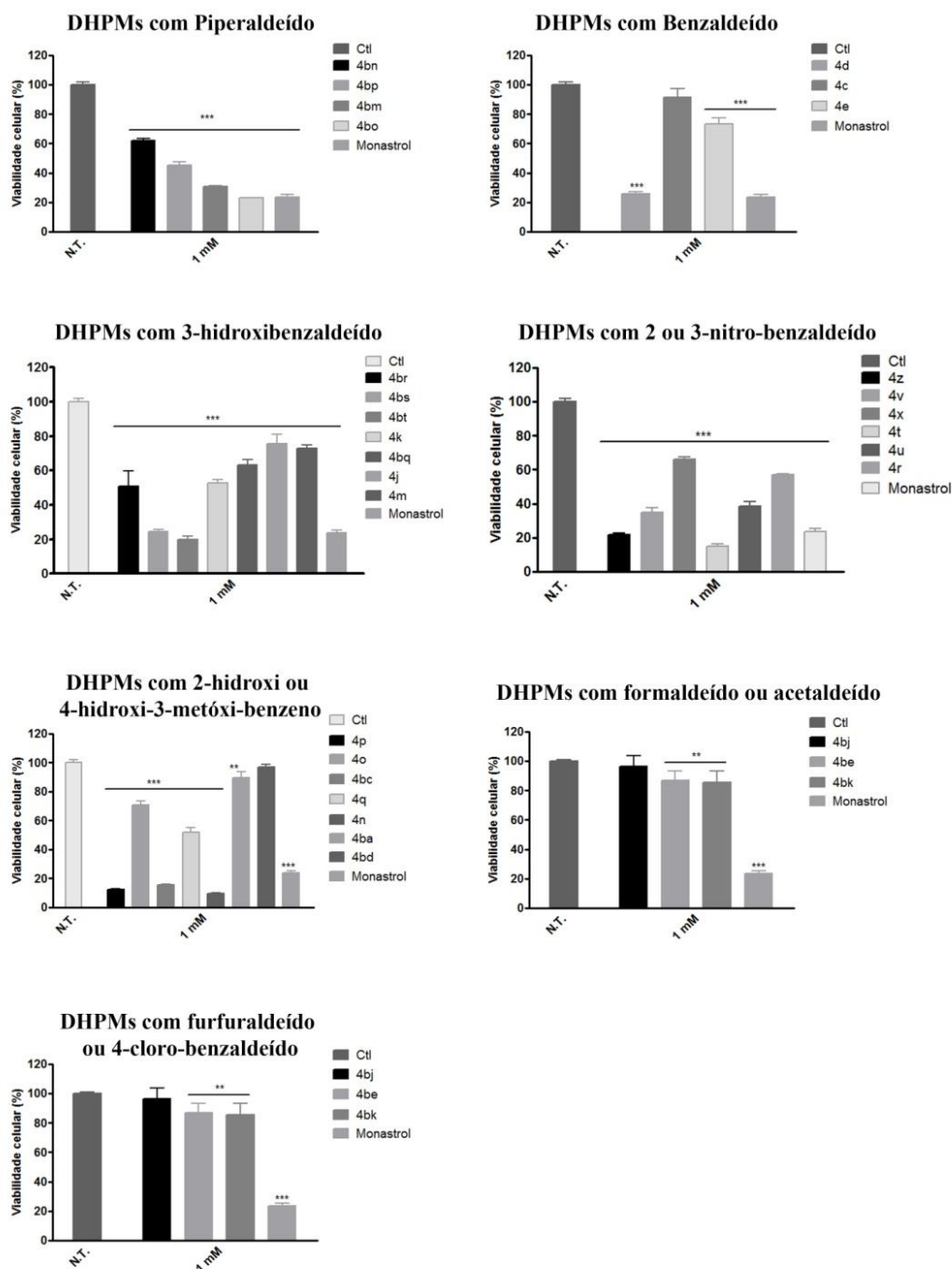


Figura 10. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MDA-MB-231 em 24h de tratamento. As células MDA-MB-231 foram tratadas com os 37 compostos na concentração de 1 mM por 24h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0.05$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle não tratado.

MDA-MB-231

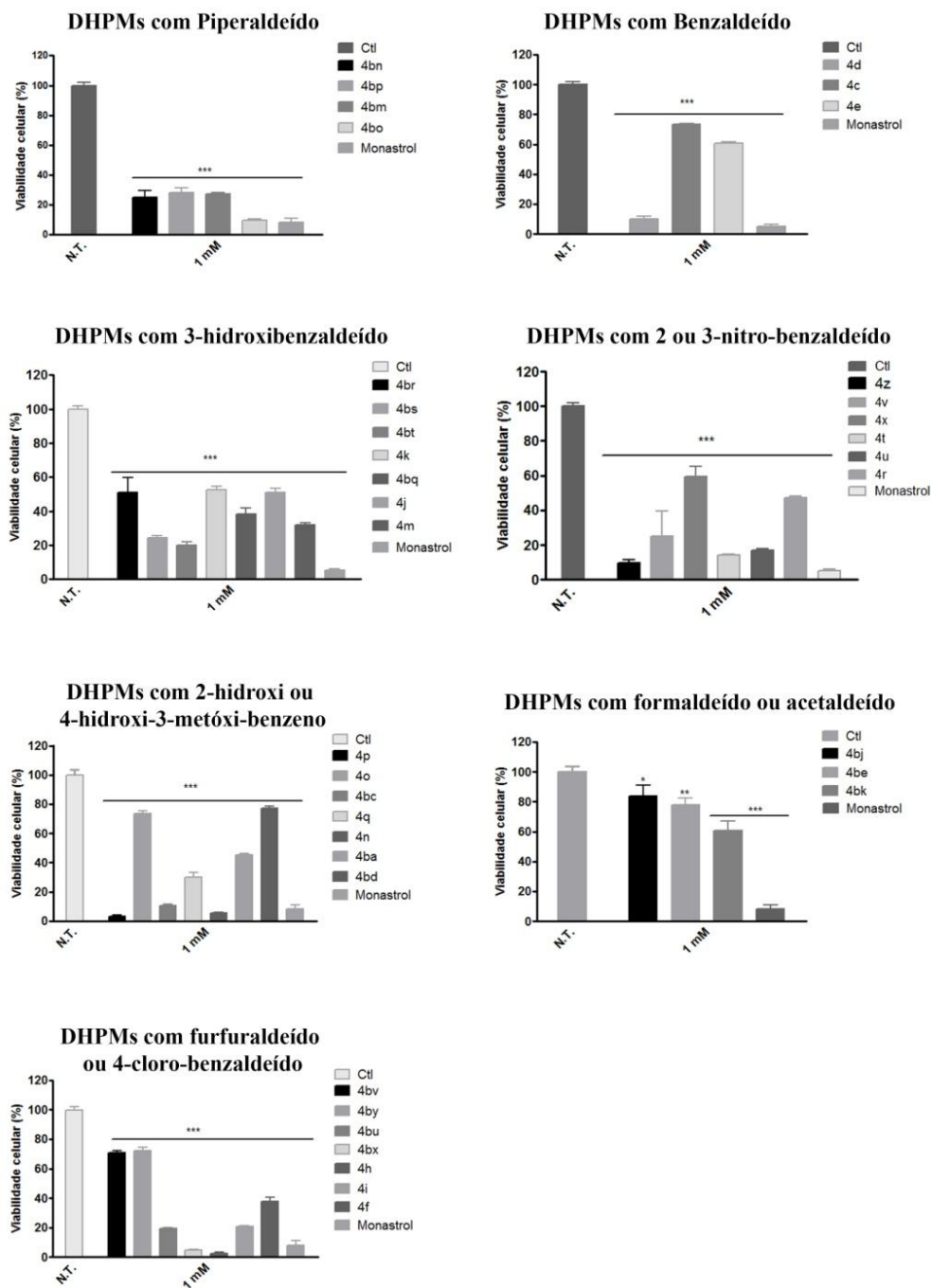


Figura 11. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MDA-MB-231 em 48h de tratamento. As células MDA-MB-231 foram tratadas com os 37 compostos na concentração de 1 mM por 48h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle não tratado.

MDA-MB-231

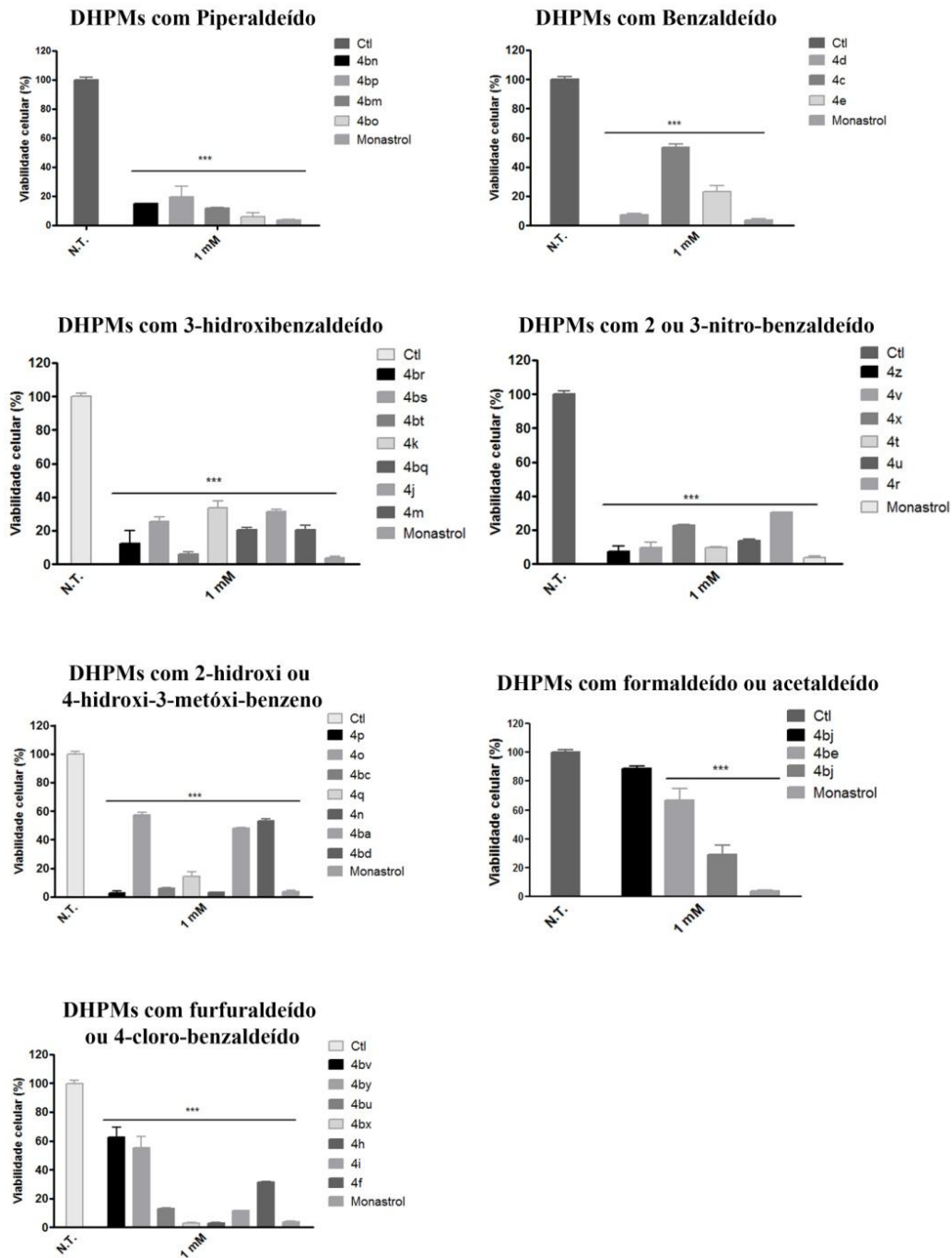


Figura 12. Efeito dos derivados de DHPM na viabilidade celular de MDA-MB-231 em 72h de tratamento. As células MDA-MB-231 foram tratadas com os 37 compostos na concentração de 1 mM por 72h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. *** $P < 0,001$ comparados ao controle não tratado.

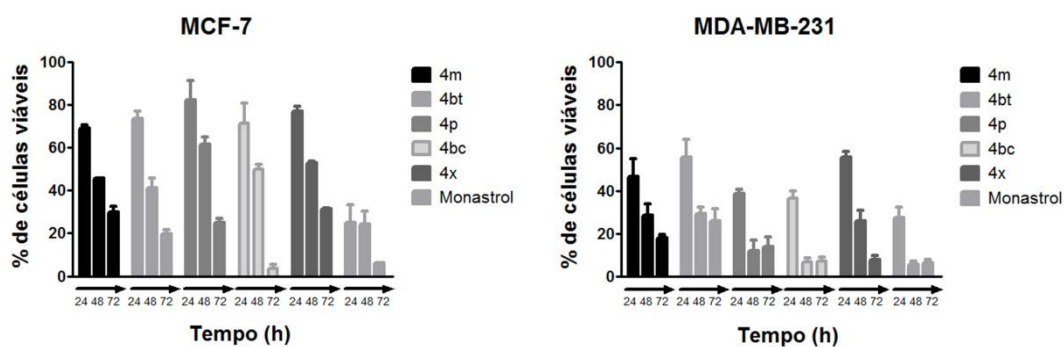


Figura 13. Viabilidade celular *versus* tempo. Células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com os 5 compostos pré-selecionados (4m, 4bt, 4p, 4bc e 4x) e com o monastrol na concentração de 1 mM por 24, 48 e 72h, e a viabilidade celular foi avaliada ao longo do tempo.

Testes de viabilidade celular utilizando-se as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram novamente realizados, agora com uma faixa de concentrações variando de 25 μ M – 1 mM para se estabelecer o IC_{50} para cada um dos compostos nestas duas linhagens. Os dados dos tratamentos nas concentrações de 100 μ M a 1 mM podem ser observados na figura 14. Todas essas concentrações levaram a reduções significativas na viabilidade das células MCF-7 e MDA-MB-231 após 72h de tratamento.

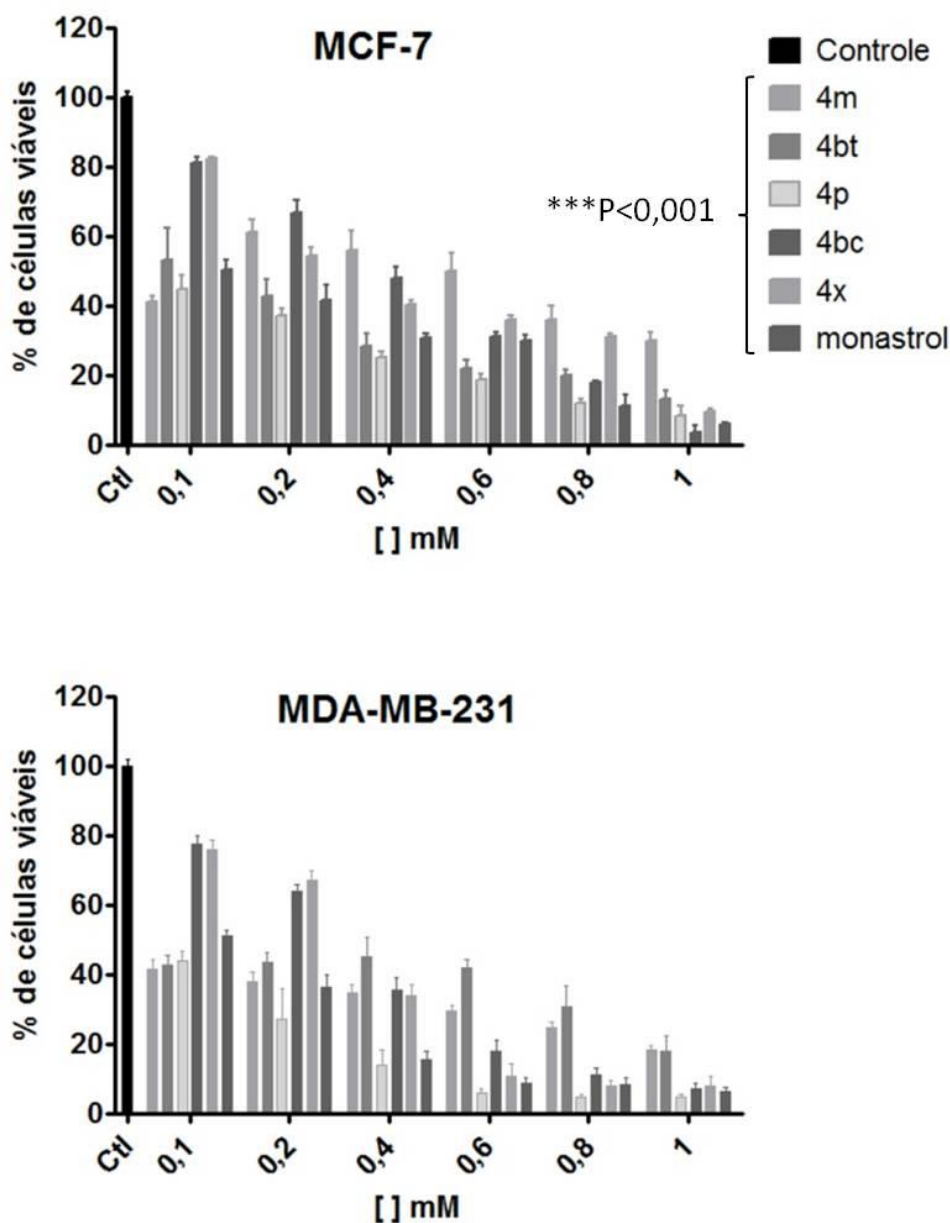


Figura 14. Os DHPMs causam altas taxas de morte em células MCF-7 e MDA-MB-231 em concentrações acima de 100 μ M. As células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com concentrações variando de 100 μ M a 1mM com os compostos que apresentaram melhor atividade citotóxica, por 72h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. Todos os tratamentos apresentaram diferenças significativas em relação ao controle de ambas as linhagens, apresentando $P<0,001$.

Para determinar a concentração ótima de tratamento com cada um dos 5 compostos, um teste de viabilidade celular com fibroblastos humanos (células normais) foi conduzido utilizando-se as concentrações que causaram 70% ou mais de morte em ambas as linhagens celulares, após 72h de tratamento. A maior concentração de cada derivado que não causou efeitos citotóxicos significativos nas células normais (máxima concentração não-citotóxica) foi selecionada para os próximos experimentos (Figura 15 e tabela 4). Este experimento mostrou que estes compostos são seletivos para as células tumorais visto que, no geral, eles são dose-dependentes para células tumorais, mas não para células normais.

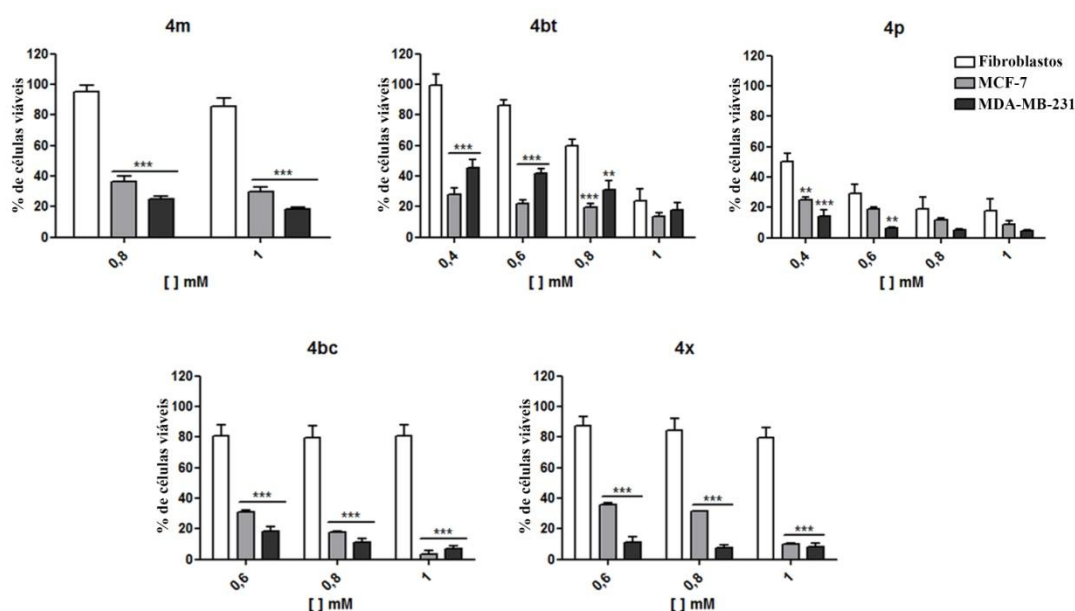


Figura 15. Efeito dos derivados de DHPM selecionados na viabilidade de células de cultura primária de tecido conjuntivo comparado ao tratamento por 72h em células tumorais MCF-7 e MDA-MB-231. As células de cultura primária de tecido conjuntivo, constituídas prioritariamente de fibroblastos, foram tratadas com os compostos e concentrações que apresentaram melhor atividade nas células tumorais de mama por 72h e a viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao tratamento dos fibroblastos na mesma concentração.

A concentração inibitória de 50% das células (IC_{50}) foi calculada com base no tratamento das células tumorais por 72h e estão apresentados na tabela 4. Os IC_{50} obtidos para as células MDA-MB-231 tratadas com os compostos 4m, 4bt e 4p foram menores do que os apresentados pelo monastrol. Embora os derivados 4bc e 4x tenham apresentado maiores concentrações associadas ao IC_{50} , suas atividades não foram dependentes da dose para as células normais (Figura 15).

Tabela 4. IC_{50} e máxima concentração não citotóxica estabelecida para os 5 compostos pré-selecionados (4m, 4bt, 4p, 4bc e 4x) e monastrol. O IC_{50} foi calculado para 72h de tratamento das células com os compostos selecionados.

Compostos	IC_{50} (μ M)		[] máxima não citotóxica (mM)
	MCF7	MDA-MB-231	
4m	197,3	77,08	1
4bt	126,9	17,91	0,8
4p	87,5	68,38	0,4
4bc	234,9	249,5	1
4x	276,5	237,4	0,8
Monastrol	110,4	113,9	1

5.2. O tratamento com DHPMs induz alterações morfológicas em células tumorais de mama

Os cinco derivados selecionados foram capazes de produzir alterações morfológicas significativas nas células MDA-MB-231 após 72h de tratamento (Figura 16 – Painel inferior). Entretanto, nas células MCF-7 apenas os compostos 4bt, 4p e 4bc foram capazes de produzir os mesmos resultados nas mesmas condições experimentais (Figura 16 – painel superior). Estas alterações são caracterizadas por células com tamanho reduzido e morfologia arredondada, ausência de pontos de adesão focal e um menor número de células aderidas à superfície da placa. Esta redução no número de células sugere que muitas morreram pela ação do composto utilizado. Os compostos 4m e 4x não causaram alterações significativas nas células MCF-7, as quais apresentaram morfologia muito semelhante às células não tratadas (Figura 16).

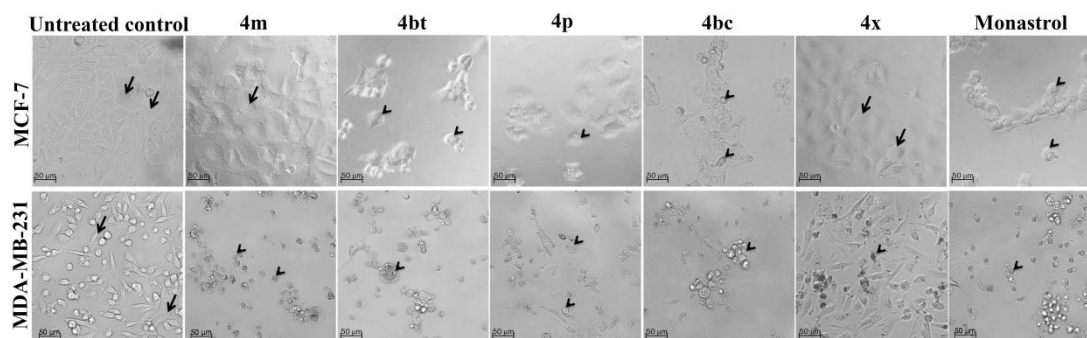


Figura 16. Alterações morfológicas em células MCF-7 e MDA-MB-231 após 72h de tratamento com DHPMs. Células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com a máxima concentração não citotóxica de cada composto por 72h e as alterações morfológicas foram analisadas sob microscópio de luz invertido. O tratamento com os DHPMs causou uma redução e arredondamento nas células (cabeças de setas) que podem ser observadas em uma menor confluência nas imagens. Os compostos 4m e 4x não causaram alterações morfológicas nas células MCF-7, estando estas muito semelhantes às células controle, as quais se apresentam em maior confluência e com uma morfologia mais esticadas (setas). Barras, 50 µm.

5.3. Os DHPMs influenciam de diferentes maneiras na movimentação da cinesina Eg5

Os ensaios de dinâmica molecular foram realizados com o objetivo de verificar o padrão de ligação e a influência dos cinco compostos no comportamento da Eg5. Acredita-se que os movimentos da proteína exerçam uma importante influência em sua atividade (MIKI et al., 2005). Assim, o estudo *in silico* do enrijecimento da proteína dependente do ligante, juntamente com os dados *in vitro* podem fornecer uma interessante visão sobre a relação do impacto dos derivados e sua atividade inibitória nos movimentos da proteína.

Os diferentes padrões de ligação dos DHPMs (Figura 17) mostram que a interação entre alguns resíduos da Eg5 e os derivados é realmente relevante. O composto 4bc, por exemplo, interage diretamente com a Leu214 e com a Arg119, e também faz interações mediadas por moléculas de água com o Glu116, fechando fortemente o sítio de ligação. É importante notar que o 4bc interage com a Arg119, assim como o monastrol, mas ao invés de interagir com o Glu118, ele se liga ao Glu116, o que assegura a estabilidade da α -hélice. A interação com a Leu214 também é muito relevante já que o 4bc é o único que se liga a esse resíduo de ambos os lados do sítio de ligação.

O composto 4bt também mostra uma interação com a Arg119. Esta interação ocorre tanto de forma direta quanto mediada por moléculas de água, o que garante uma forte ligação entre o composto e o resíduo (Figura 17).

Os compostos 4m e 4x interagem com o resíduo Leu214, mas apenas o 4m interage também com a Arg221. Todas estas interações diretas são feitas com resíduos que estão localizados na α -hélice, sem interagir com resíduos do outro lado do sítio de ligação (Figura 17).

O derivado 4p apresentou um padrão diferente dos demais compostos, pois ele não interage diretamente com nenhum resíduo, apresentando apenas uma ligação mediada por água com a Gly117, o que mostra que a α -hélice é realmente muito importante na formação do sítio catalítico da cinesina Eg5 (Figura 17).

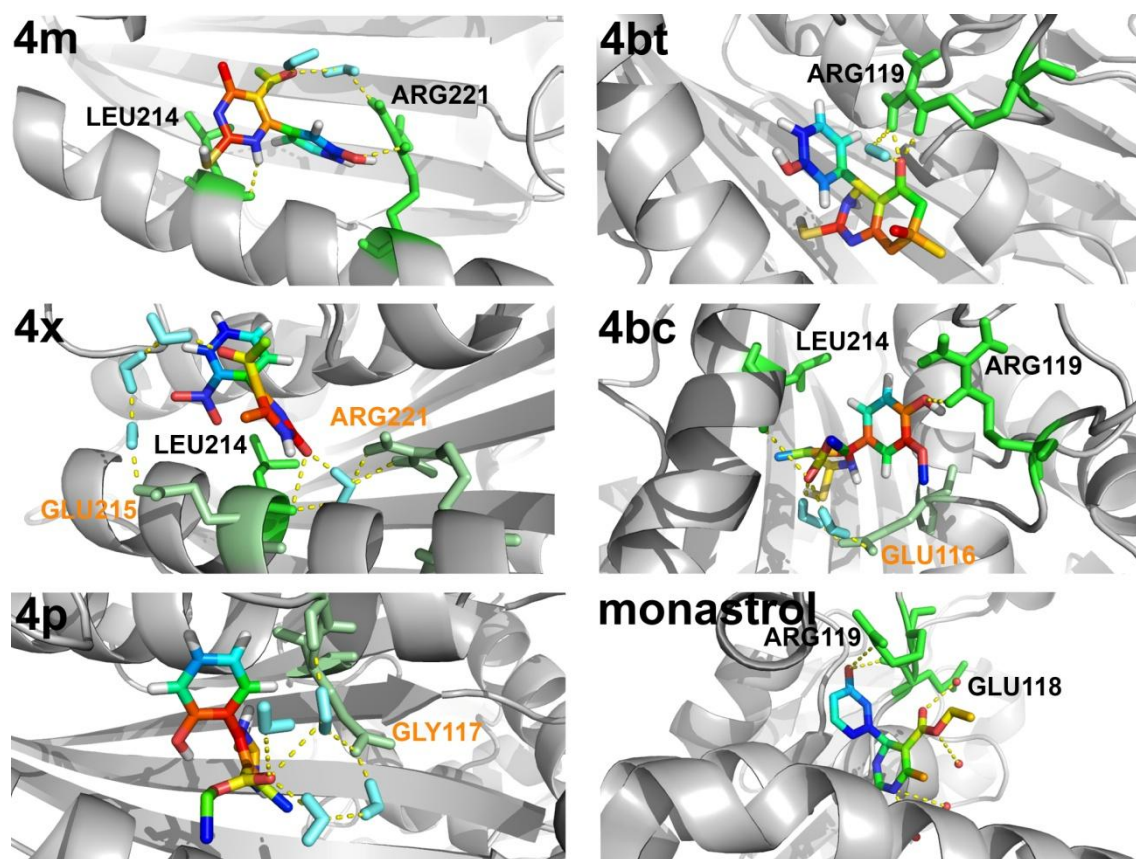


Figura 17. Modelo 3D baseado na estrutura dos complexos da Eg5 após os ensaios de Dinâmica Molecular. Os painéis mostram representações da Eg5 (cinza) e dos compostos (linhas coloridas). As linhas pontilhadas em amarelo mostram os contatos polares responsáveis pela manutenção da ligação da molécula com o sítio de ligação da proteína. A região de ligação é perfeitamente conservada, mas os resíduos de ligação são alterados indicando a influência da topologia dos compostos. Os resíduos anotados em preto indicam aminoácidos (verde) em que ocorre ligação direta com os compostos, e os em laranja indicam ligações mediadas por moléculas de água (ciano).

5.3.1. Análise de componente principal (PCA) e RMSD (Root-Mean-Square Deviation)

A análise de componente principal, ou dinâmica essencial, é uma ferramenta útil quando o interesse é buscar por diferentes modos de movimentação durante a simulação (AMADEI et al., 1993). É possível separar os movimentos dependendo de suas frequências e amplitudes. A primeira componente compreende os movimentos de grande amplitude, responsáveis pelas principais mudanças conformacionais da proteína. Assim, esta análise foi realizada para verificar a influência desta primeira componente ao longo da simulação e então elucidar a interferência dos compostos na estabilidade conformacional da proteína.

A comparação dos autovetores de trajetória (Figura 18A) mostra que o composto 4bc levou a proteína a uma menor movimentação ao longo da simulação. Este composto restringe os movimentos da Eg5 de forma que a primeira componente principal chega perto de zero em aproximadamente 20 ns e assim permanece até o fim da simulação. Os compostos 4m e 4x agem de forma semelhante, mas é possível observar que o 4m leva os movimentos da proteína a um platô estabilizado após 40 ns, enquanto que o 4x permanece em um comportamento crescente. Os compostos 4bt, 4p e monastrol estão nas menores variações de todas as projeções, mas apresentam um valor final de projeção mais distante do zero que o composto 4bc (Figura 18A).

O RMSD também foi avaliado para verificar o quão diferente da conformação inicial a estrutura se torna ao longo da simulação. É bastante notável que os compostos exercem influência de diferentes magnitudes (Figura 18B).

O composto 4bc permitiu uma importante modificação inicial da conformação estrutural da proteína, aproximadamente 0,5 nm, até 20 ns, e então a estrutura se torna estável até o fim da simulação. O composto 4m exerceu uma significativa influência sobre a estrutura até aproximadamente 10 ns, levando a proteína a uma mudança de aproximadamente 0,4 nm da estrutura inicial, quando a estrutura da proteína estabiliza até o final da simulação. Os compostos 4x, 4bt e monastrol apresentaram uma influência semelhante nas alterações conformacionais da proteína, levando o RMSD a um platô de aproximadamente 0,35 nm. O composto 4p mostrou ser o menos influente com relação às mudanças conformacionais na estrutura da Eg5, levando a um platô de 0,3 nm já no começo da simulação (Figura 18B).

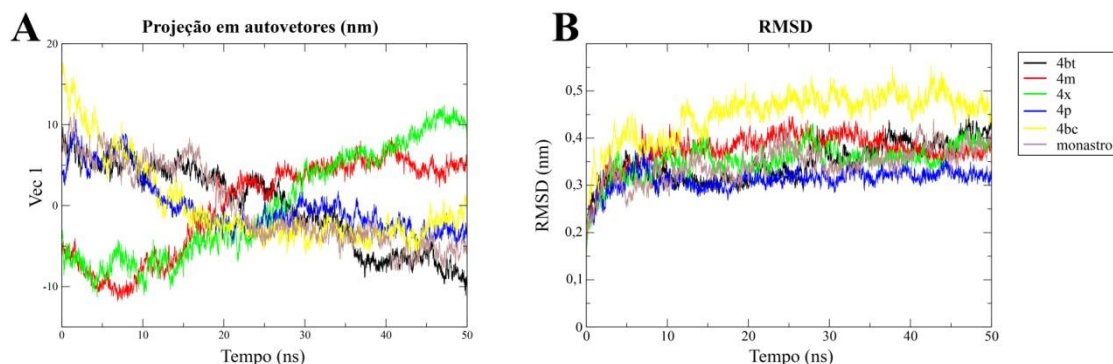


Figura 18. O composto 4bc leva a proteína Eg5 a uma conformação muito estável. A, Análise de componente principal ao longo do tempo. Valores distantes do zero indicam que a estrutura apresenta movimento de maior amplitude em sua primeira componente principal. É possível notar que o composto 4bc leva a proteína a uma conformação mais estável após o ensaio de dinâmica molecular. **B,** RMSD da estrutura inicial ao longo do tempo. O composto 4bc permite a maior alteração inicial comparado às outras moléculas, entretanto, todos os compostos levam a proteína a uma conformação estável após aproximadamente 15 ns.

5.4. A atividade da cinesina Eg5 é inibida *in vitro* pelos derivados de DHPM

A inibição da cinesina motora pelos derivados de DHPM foi avaliada pela incubação desta proteína com 4m (197,3 μM), 4bt (126,9 μM), 4p (87,54 μM), 4bc (234,9 μM), 4x (276,5 μM) e monastrol (110,4 μM) utilizando-se o kit *Kinesin ELIPA*. De acordo com os resultados obtidos é possível verificar os compostos 4bc e 4m inibiram a atividade desta proteína de forma mais pronunciada, sendo mais eficazes que o monastrol, utilizado como controle positivo do experimento. Os compostos 4bt, 4p e 4x mostraram-se semelhantes ao monastrol quanto à taxa de inibição da Eg5 (Figura 19).

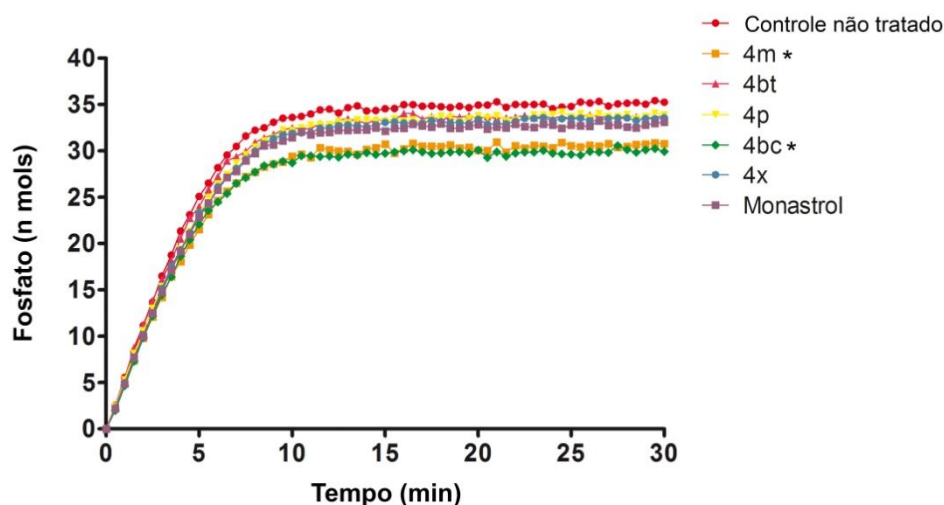


Figura 19. Derivados de DHPM inibem a atividade da cinesina Eg5 *in vitro*. A taxa de inibição da cinesina, *in vitro*, foi testada utilizando-se o kit *Kinesin ELIPA Biochem Kit* (BK060 – Cytoskeleton) segundo as recomendações do fabricante. Para os testes de inibição, a cinesina (1 μg) foi incubada com 197,3 μM do composto 4m, 126,9 μM do 4bt, 87,54 μM do 4p, 234,9 μM do 4bc, 276,5 μM do 4x e 110,4 μM de monastrol, correspondentes ao IC_{50} de cada um dos compostos, e a leitura foi feita imediatamente após a incubação por 30 min em intervalos de 30s utilizando-se o espectrofotômetro Spectramax M5 (Molecular Devices – USA). Os dados representam a média de dois experimentos independentes, $n=1$. * $P<0,05$.

5.5. Os derivados de DHPM induzem a formação de fusos mitóticos monoastrais e podem levar as células tumorais de mama a apresentarem o fenótipo de catástrofe mitótica

Com o intuito de verificar a interferência dos compostos na organização dos microtúbulos e na formação do fuso mitótico, foi realizada uma imunofluorescência utilizando o anticorpo *anti- α -tubulina*. Nas concentrações testadas, 4 dos 5 compostos (4m, 4bt, 4bc e 4x) causaram a formação de fuso monoastral nas células em mitose, semelhantemente ao monastrol (Figura 20). Esta atividade corrobora com os dados de dinâmica molecular e de inibição da atividade da cinesina KSP/Eg5 *in vitro*, indicando que estes compostos são de fato bons inibidores desta proteína.

Com o tratamento das células por 24h, os compostos 4m (1 mM) e 4bt (0,8 mM) levaram ao aparecimento do fenótipo de fuso monoastral em praticamente todas as células em divisão, sendo estes valores de 100% para o composto 4m e 99,35% para 4bt (Tabela 5). Após 48h de tratamento, as células tratadas com o derivado 4m continuaram

presas em mitose apresentando fuso monoastral. Este tratamento tem seu efeito conservado ao longo do tempo de tratamento, visto que em 48h ainda 100% das células que estão em divisão apresentam fuso monoastral (Figura 20 e tabela 5), e em 72h praticamente todas as células já morreram, tendo em vista que não sobrou praticamente nenhuma célula para quantificação.

O tratamento com o composto 4bt por 48h, em contrapartida, fez com que 80% das células em divisão possuíssem este padrão radial do fuso mitótico, o que poderia indicar que as células que ainda não haviam se dividido em 24h podem ter escapado do efeito do tratamento, ou a pequena parcela de células que não apresentou este padrão na primeira divisão (0,65%) pode ter se dividido outras vezes e suas gerações conseguiram proliferar sem sofrer os efeitos da inibição da proteína motora do fuso em decorrência do tratamento.

Os derivados 4x e 4bc também levam a formação de fusos monoastrais nas células em divisão, entretanto, isso ocorre numa parcela menor de células, 50,8% e 44,35%, respectivamente, para 24h de tratamento. Após 48h de tratamento este efeito aumenta para 87,99% e 89,67% respectivamente, mostrando que estes dois compostos podem ter uma ação mais lenta nestas células (tabela 5).

O tratamento das células com o composto 4p (0,4 mM) levou ao aparecimento de um padrão completamente diferente de organização dos microtúbulos. É possível observar que as células que receberam este tratamento sofrem quebra dos microtúbulos, os quais ficaram desorganizados e parecem estar mais concentrados nas porções próximas a membrana plasmática das células. Outra alteração que pode ser observada é a fragmentação nuclear, com a formação de múltiplos micronúcleos (Figura 20 e 21).

Para os tratamentos de 72h não foi possível fazer a aquisição das imagens e nem quantificar a presença de fuso monoastral, já que praticamente todas as células haviam morrido em decorrência do tratamento e, portanto se desaderiram da lâmina.

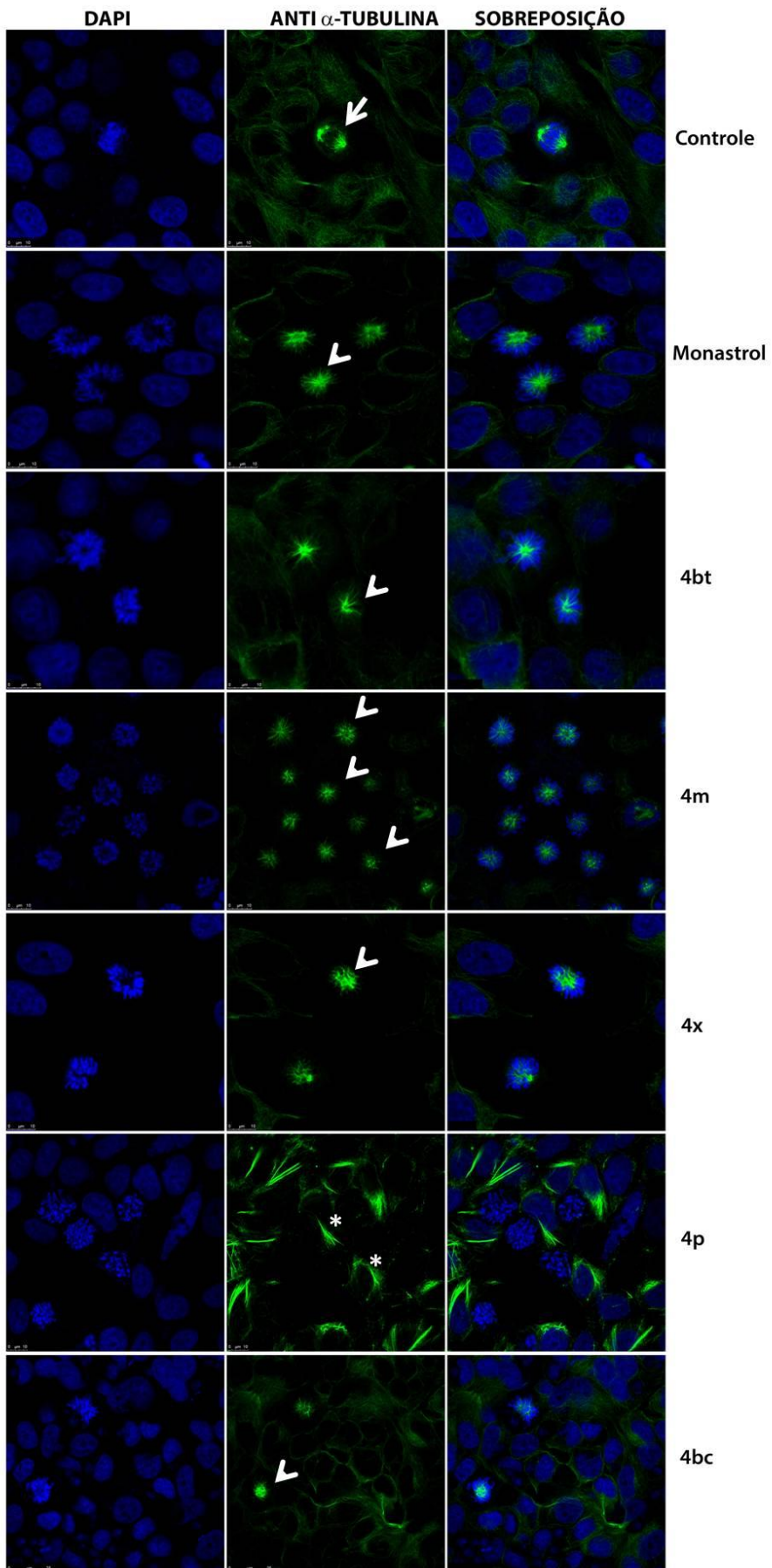


Figura 20. O compostos com núcleo DHPM induzem a formação de fuso mitótico monoastral em células MCF-7. Células MCF-7 foram tratadas por 24 horas com monastrol (0,1 mM – controle positivo), composto 4bt (0,8 mM), 4m (1 mM), 4x (0,8 mM), 4p (0,4 mM), 4bc (1 mM) ou não receberam nenhum tratamento (controle negativo). As células foram imunomarcadas com anticorpo anti- α -tubulina (verde) e o DNA das células foi corado com DAPI (azul). As análises foram feitas em microscópio confocal de varredura a laser e mostram a formação atípica de fusos monoastrais (cabeças de setas) induzida pelos tratamentos com os derivados de DHPMs, reproduzindo o efeito já descrito pelo monastrol. O tratamento com o composto 4p induziu a fragmentação nuclear e a disrupção do fuso mitótico (asteriscos). As células não tratadas, em sua maioria, apresentam correta separação das cromátides-irmãs possuindo fuso mitótico bipolar (seta).

Tabela 5. Resultado da quantificação baseada em 300 células MCF-7 controle ou tratadas por 24 ou 48 h e marcadas com anticorpo anti- α -tubulina. Esta indicada na tabela a porcentagem da formação de fusos monoastrais ou bipolar determinada

Grupo experimental	Fuso Monoastral		Fuso Bipolar	
	24h	48h	24h	48h
Controle – não tratado	25,7%	23%	74,3%	77%
4m (1 mM)	100%	100%	----	----
4bt (0,8 mM)	99,35%	80%	0,65%	20%
4p (0,4 mM)	----	----	----	----
4bc (1 mM)	44,35%	89,67%	55,75%	10,33%
4x (0,8 mM)	50,8%	87,99%	49,2%	12,01%
Monastrol (0,1 mM)	97,66%	92%	2,33%	8%

Segundo dados da literatura, as falhas na mitose estão geralmente associadas com quebras cromossômicas e a cariocinese deficiente, as quais levam a alterações nucleares grosseiras como micronucleação e multinucleação, que constituem os traços morfológicos mais proeminentes da catástrofe mitótica (VITALE et al., 2011).

Para confirmar se as células tratadas com o composto 4p apresentam o fenótipo clássico da catástrofe mitótica, uma análise por microscopia eletrônica de transmissão das células controle e tratadas por 48h com 0,4 mM de 4p foi realizada a fim de verificar as possíveis mudanças ultraestruturais presentes nestas células. As células que

receberam o tratamento apresentaram fragmentação nuclear, evidenciada tanto por marcação com DAPI quanto pelos resultados da análise por microscopia eletrônica de transmissão (Figuras 19) e presença de integridade da membrana plasmática (Figura 21), o que é característico da catástrofe mitótica (CASTEDO et al., 2004). Foi ainda observada vacuolização perinuclear (Figura 21) em um pequeno número de células.

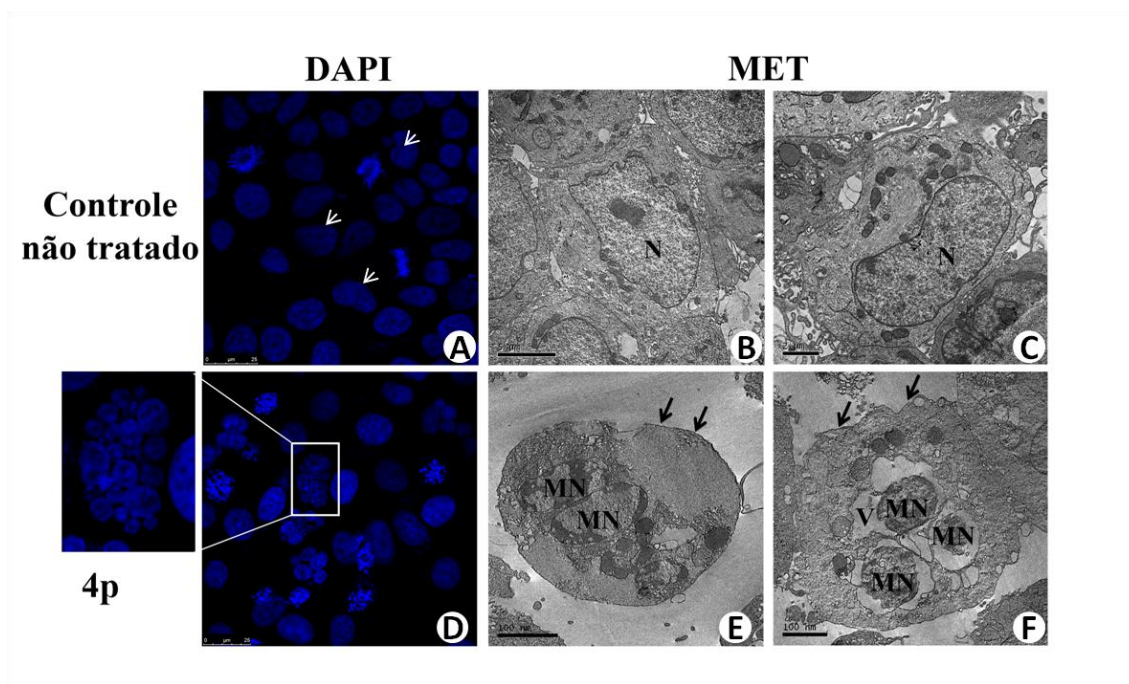


Figura 21. Alterações estruturais e ultraestruturais causadas pelo tratamento com (0,4 mM) do composto 4p evidenciadas por microscopia confocal e microscopia eletrônica de transmissão. Células não tratadas (A-C) ou tratadas com 0,4 mM do composto 4p por 48h (D-F) foram marcadas com DAPI e analisadas por Microscopia Confocal de Varredura a Laser ou foram processadas e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. As células controle apresentam núcleo íntegro, como pode ser visualizado tanto na marcação por DAPI (cabeças de setas brancas) quanto nas amostras processadas para MET (N). O tratamento com o composto 4p leva à fragmentação nuclear formando múltiplos micronúcleos (MN), conforme em destaque nas figuras E e F. As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão mostram em detalhes os micronúcleos (MN) formados nas células tratadas, as quais ainda apresentaram acúmulo de vacúolos perinucleares (V). Por outro lado foi observada a manutenção da integridade de membrana (setas pretas).

5.6. A morte celular induzida pelos derivados de DHPM ocorre prioritariamente por apoptose

Para investigar o tipo de morte celular induzida pelos derivados de DHPM, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com cada um dos cinco compostos nas concentrações de 1 mM para 4m, 4bc e monastrol, 0,8 mM para 4bt e 4x e 0,4 mM para 4p por 72h e após este período foram marcadas com Anexina-V e iodeto de propídio.

Ambas as linhagens celulares foram levadas à morte prioritariamente por apoptose após o tratamento com os DHPMs (Figuras 22A e B). Os compostos 4bc e 4bt causaram uma notável indução de morte celular, o que pode posteriormente ser traduzido em atividade antitumoral. O derivado 4bc levou aproximadamente 92% das células MCF-7 e 97% das MDA-MB-231 à apoptose. Já o 4bt foi responsável pela morte de 39% e 83% das células MCF-7 e MDA-MB-231, respectivamente, por apoptose, mostrando ter uma atividade similar à registrada para o monastrol (Figura 22 B). Os demais compostos (4m, 4p e 4x) também causaram morte das células tumorais de mama por apoptose embora de uma forma menos pronunciada.

Estes resultados indicam que o tratamento com DHPMs é responsável por uma diminuição significativa na viabilidade celular. Um dado interessante, é que as células MDA-MB-231 são mais susceptíveis à morte por apoptose induzida pelos DHPMs que as células MCF-7. Doses menores e períodos mais curtos de tratamento foram suficientes para induzir um grande número de células desta linhagem à apoptose (Figuras 10–13 e 22B), assim, seria possivelmente por esta razão que em 72h de tratamento um grande número de células encontra-se em apoptose tardia e não em apoptose inicial como foi observado em células MCF-7 (Figura 22).

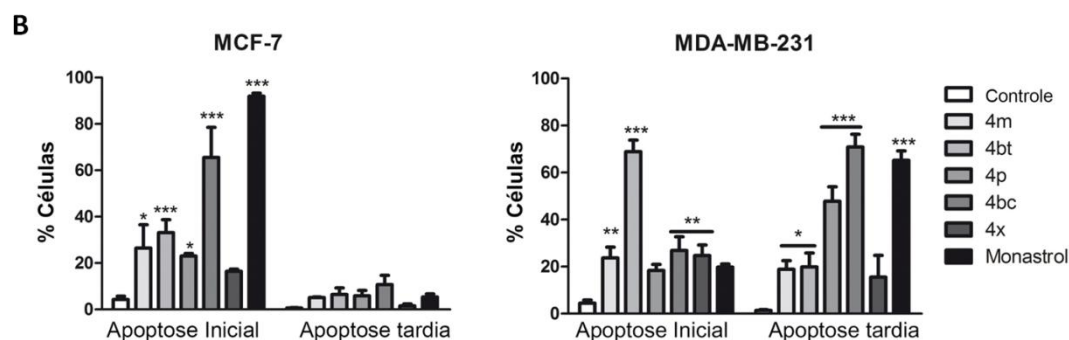
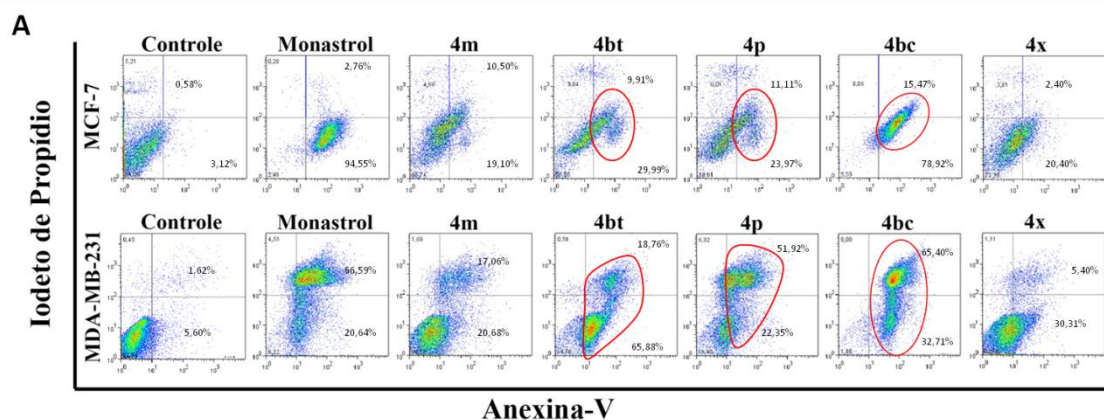


Figura 22. Tratamento com os derivados de DHPM induz morte por apoptose nas células tumorais de mama. Células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas por 72h com os compostos 4m (1 mM), 4bt (0,8 mM), 4p (0,4 mM), 4bc (1 mM), 4x (0,8 mM) e monastrol (1 mM – controle positivo), ou não receberam nenhum tratamento (controle negativo) e então foram analisadas usando citômetro de fluxo para marcação com Anexina-V conjugada a Alexa 680/FITC e Iodeto de Propídio (PI). **A)** Dados representativos de um experimento independente são mostrados. Quadrante inferior esquerdo corresponde às células viáveis, quadrante inferior direito às células em apoptose inicial, o superior direito às células em apoptose tardia e o superior esquerdo às células necróticas. **B)** Porcentagem de células em apoptose inicial ou tardia induzidas por 72h de tratamento como descrito acima. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independente, n=1. *P<0.05, **P<0,01 e ***P<0,001 comparados ao controle não tratado.

5.7. Os derivados de DHPM são potentes inibidores da proliferação de células tumorais de mama

Células MCF-7 e MDA-MB-231 previamente marcadas com CFSE foram tratadas com a concentração inibitória 50 (IC_{50}) de cada um dos cinco compostos por 24, 48 e 72h e a taxa de proliferação foi analisada por citometria de fluxo.

Os tratamentos com os compostos 4m, 4bt, e 4p já em 24h de tratamento inibiram significativamente tanto a proliferação das células MCF-7 quanto das MDA-MB-231, quando comparadas ao controle não tratado e essa inibição continua ao longo do tempo sendo ainda mais pronunciada após 48 e 72h de tratamento (Figuras 23A) de forma semelhante ao monastrol (controle positivo). Esses compostos inibiram aproximadamente 50% da proliferação destas duas linhagens tumorais nas concentrações testadas (Figura 23B). Estes resultados mostram-se bastante interessantes já que concentrações menores desses compostos, apesar de não levarem um grande percentual de células à morte, atuam impedindo consideravelmente a proliferação celular, o que reforça consideravelmente a indicação do uso destes compostos como opções de tratamento antitumoral

O derivado 4bc, apesar de ser o composto com melhor atividade citotóxica, começa a apresentar atividade antiproliferativa apenas após 48h de tratamento nas duas linhagens (Figura 23A) e em 72h é responsável por inibir a proliferação celular em aproximadamente 20% (Figura 23B). Isto indica que este composto apresenta muito mais atividade citotóxica do que citostática.

O composto 4x por sua vez não apresentou atividade antiproliferativa em nenhuma das linhagens celulares testadas para as quais os resultados foram semelhantes ao controle negativo (Figura 23A e B).

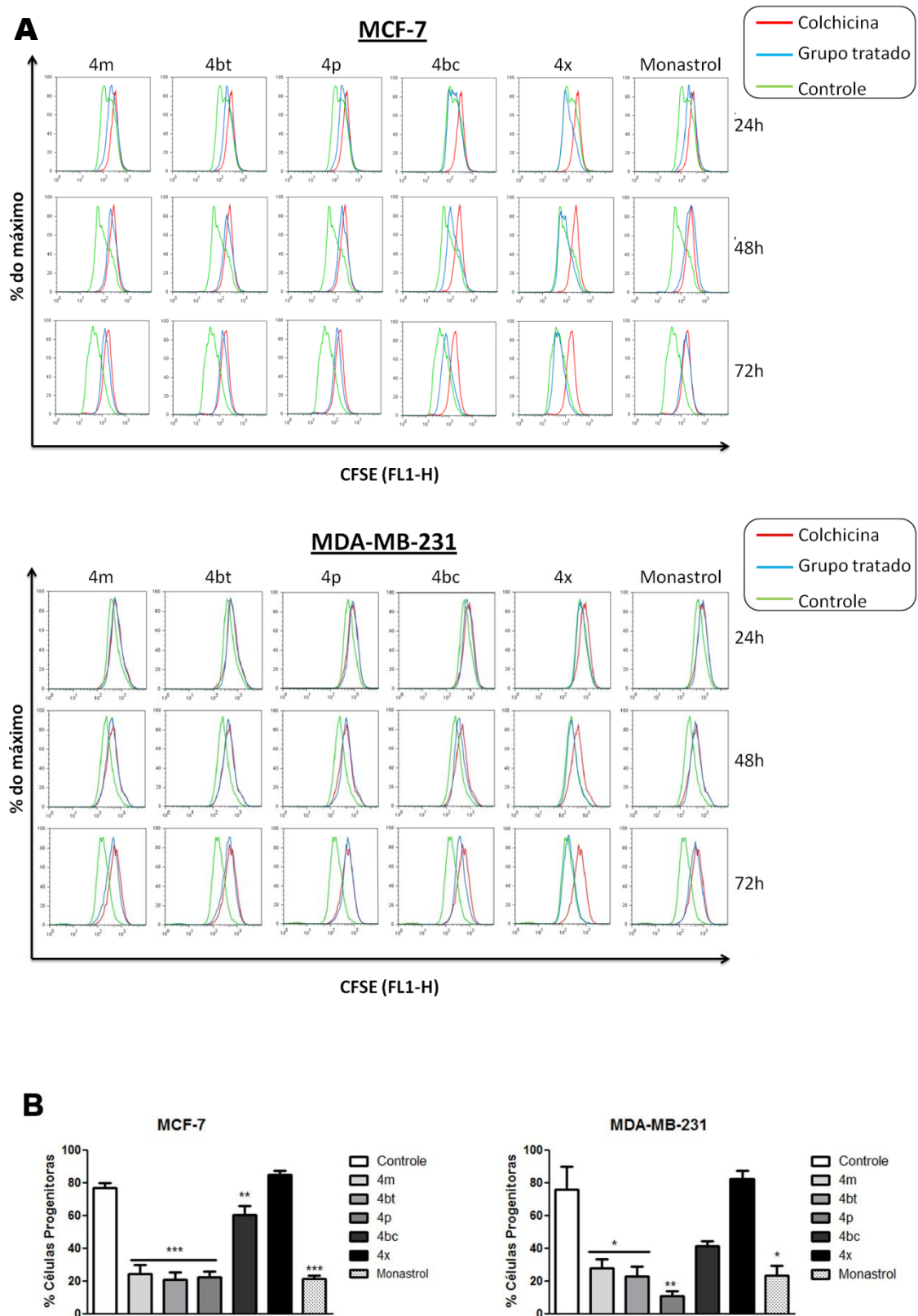


Figura 23. Derivados de DHPM inibem a proliferação de células de adenocarcinoma mamário. Células MCF-7 e MDA-MB-231 marcadas com CFSE antes do plaqueamento foram tratadas com o IC₅₀ dos compostos 4m, 4bt, 4p, 4bc, 4x, e monastrol (controle positivo) por 24, 48 e 72h, ou não receberam tratamento (controle negativo). Após os tempos estabelecidos de tratamento, as células foram analisadas por citometria de fluxo quanto a sua taxa de

proliferação. **A)** Intensidade de fluorescência do CFSE do controle de células não divididas - tratadas com 10 μ M de colchicina por 1h (representado em vermelho); de células tratadas com cada um dos compostos indicados (azul) e de células não tratadas (verde), nos tempos de 24, 48 e 72h. **B)** Dados de três experimentos independentes expressos como a porcentagem média de células que proliferaram \pm SEM após 72h de tratamento. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$ comparados ao controle negativo não tratado.

5.8. Os derivados de DHPM podem impedir a progressão do ciclo celular mantendo as células em G2/M

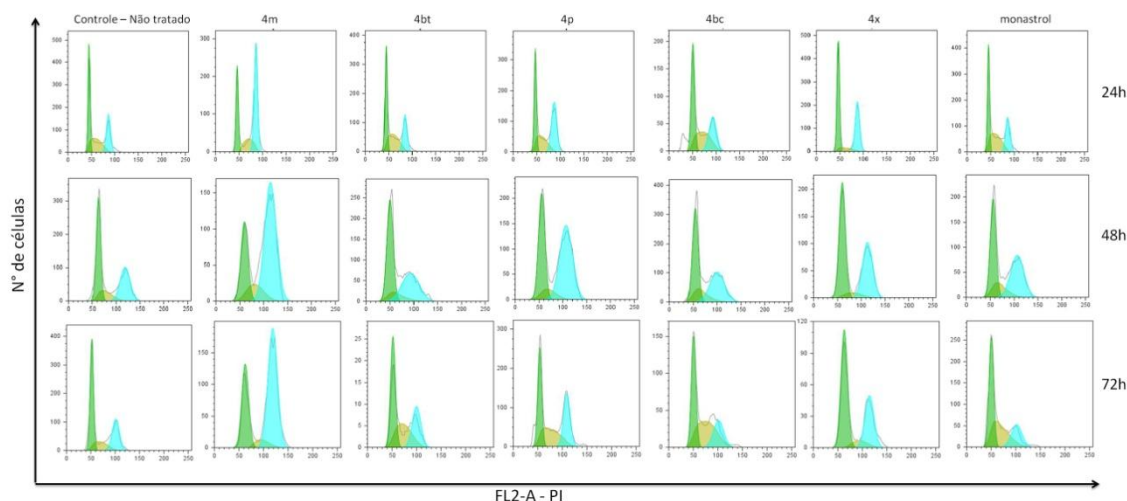
Para avaliar a influência dos compostos na progressão do ciclo celular, as células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas por 24h, 48h ou 72h e após esse período foram marcadas com iodeto de propídio e analisadas por citometria de fluxo. Com relação às células MCF-7, no tempo de 24h, apenas o composto 4m causou alteração no ciclo celular. Este derivado levou à retenção das células em G2/M impedindo a progressão do ciclo celular, quando comparado com as células não tratadas (Figuras 24 e 25). O tratamento com os demais compostos não causou nenhuma alteração estatisticamente significativa na porcentagem de células em cada uma das fases do ciclo celular (Figuras 24 e 25) no tempo de 24 horas.

Em 48h, os compostos 4m, 4p e 4x causaram a retenção das células em G2/M e os derivados 4bt e 4bc levaram a uma diminuição das células nesta fase (Figuras 24 e 25). Este fato pode ser explicado devido à alta toxicidade destes compostos (4bt e 4bc) para esta linhagem celular. Desta forma, nos tempos analisados, muitas células que poderiam ter tido seu ciclo interrompido por alterações estruturais causadas por estes compostos já haviam sido impedidas de dar continuidade ao ciclo pelos pontos de checagem e levadas à morte, como pode ser observado pela marcação com anexina/PI na figura 22. Após 72h, as células tratadas com o 4m permaneceram paradas em G2/M. O tratamento com os demais compostos não levou à alterações significativas no ciclo celular neste tempo.

As células MDA-MB-231 tratadas com os DHPMs não apresentaram tantas alterações no perfil do ciclo celular quando comparadas ao controle. Apenas o composto 4m, no tempo de 48h, levou a uma parada destas células em G2/M (Figuras 24 e 25). Os demais compostos não causaram alterações significativas nesta fase do ciclo celular. Como foi mostrado nos experimentos prévios, esta linhagem é consideravelmente mais sensível ao tratamento com os DHPMs que as células MCF-7, desta forma, a rápida

eliminação das células por estes compostos pode ter sido a responsável pela não visualização das alterações no ciclo celular, como a parada em G2/M, nos tempos estudados. Esta linhagem mostrou-se também mais assíncronica em relação à MCF-7 quanto ao tempo de divisão celular. Este pode ter sido outro fator determinante que influenciou nos resultados de análise do ciclo.

MCF-7



MDA-MB-231

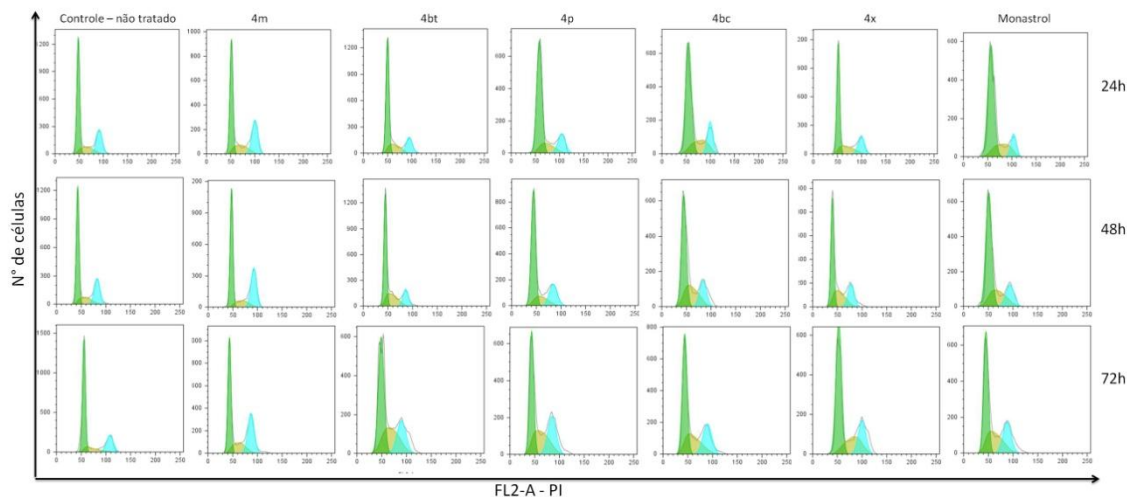


Figura 24. Derivados de DHPMs podem impedir a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais em G2/M – Histogramas das fases do ciclo celular. Células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com os compostos 4m (1 mM), 4bt (0,8 mM), 4p (0,4 mM), 4bc (1 mM), 4x (0,8 mM) e monastrol (1 mM) por 24h, 48 e 72h. Após, as células foram marcadas com PI para análise do conteúdo de DNA em citômetro de fluxo. Os histogramas correspondem a um experimento representativo de três experimentos independentes e mostram a distribuição das células controle e tratadas nas diferentes fases do ciclo celular (Intensidade da fluorescência – FL2-A x N° de células) nos tempos de 24, 48 e 72h. Fases: G1 (Verde), S (amarelo), G2/M (azul).

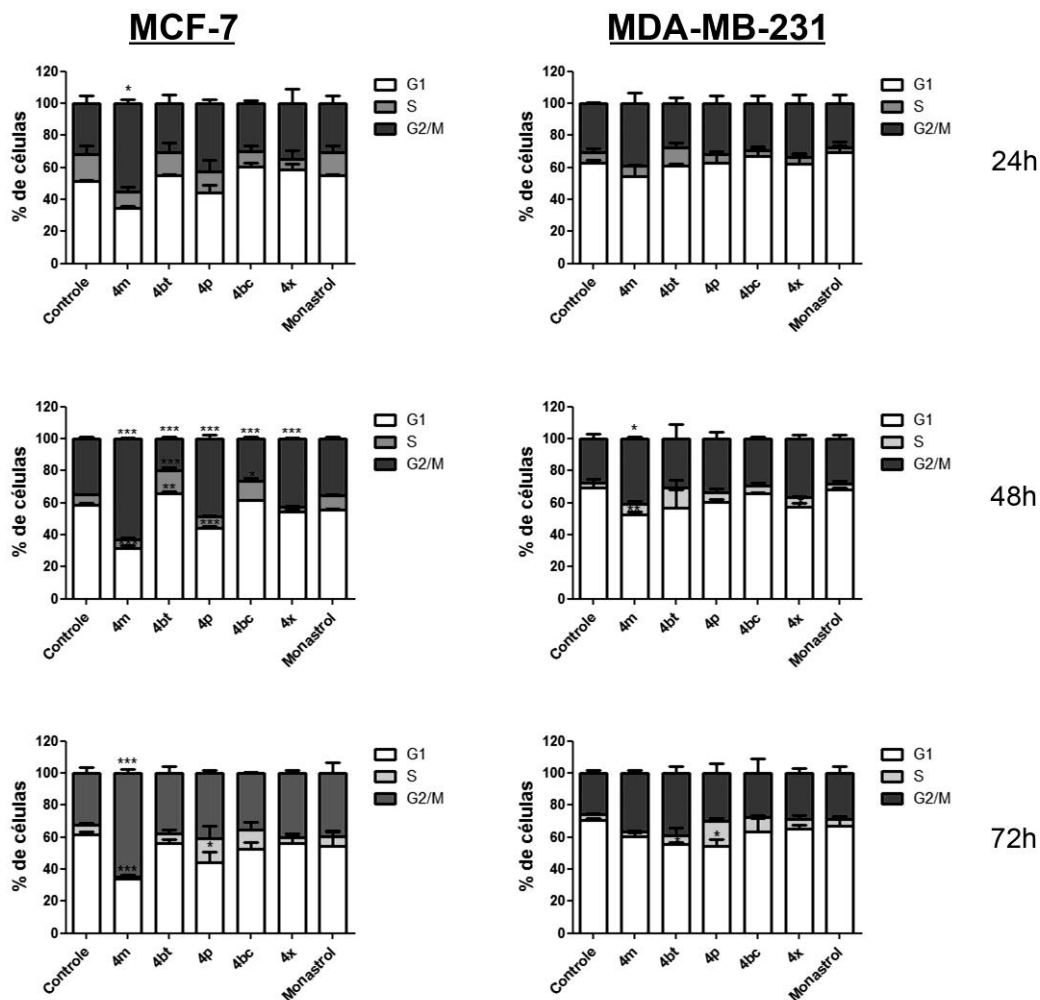


Figura 25. Derivados de DHPM podem impedir a progressão do ciclo celular causando retenção das células tumorais em G2/M – Quantificação da % de células em cada fase do ciclo. Células MCF-7 e MDA-MB-231 foram tratadas com os compostos 4m (1 mM), 4bt (0,8 mM), 4p (0,4 mM), 4bc (1 mM), 4x (0,8 mM) e monastrol (1 mM) por 24h, 48 e 72h. Após, as células foram marcadas com PI para análise do conteúdo de DNA em citômetro de fluxo. Representação gráfica da porcentagem 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 \pm SEM, após 24, 48 e 72h de tratamento. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ e *** $P < 0.001$ comparados ao controle não tratado.

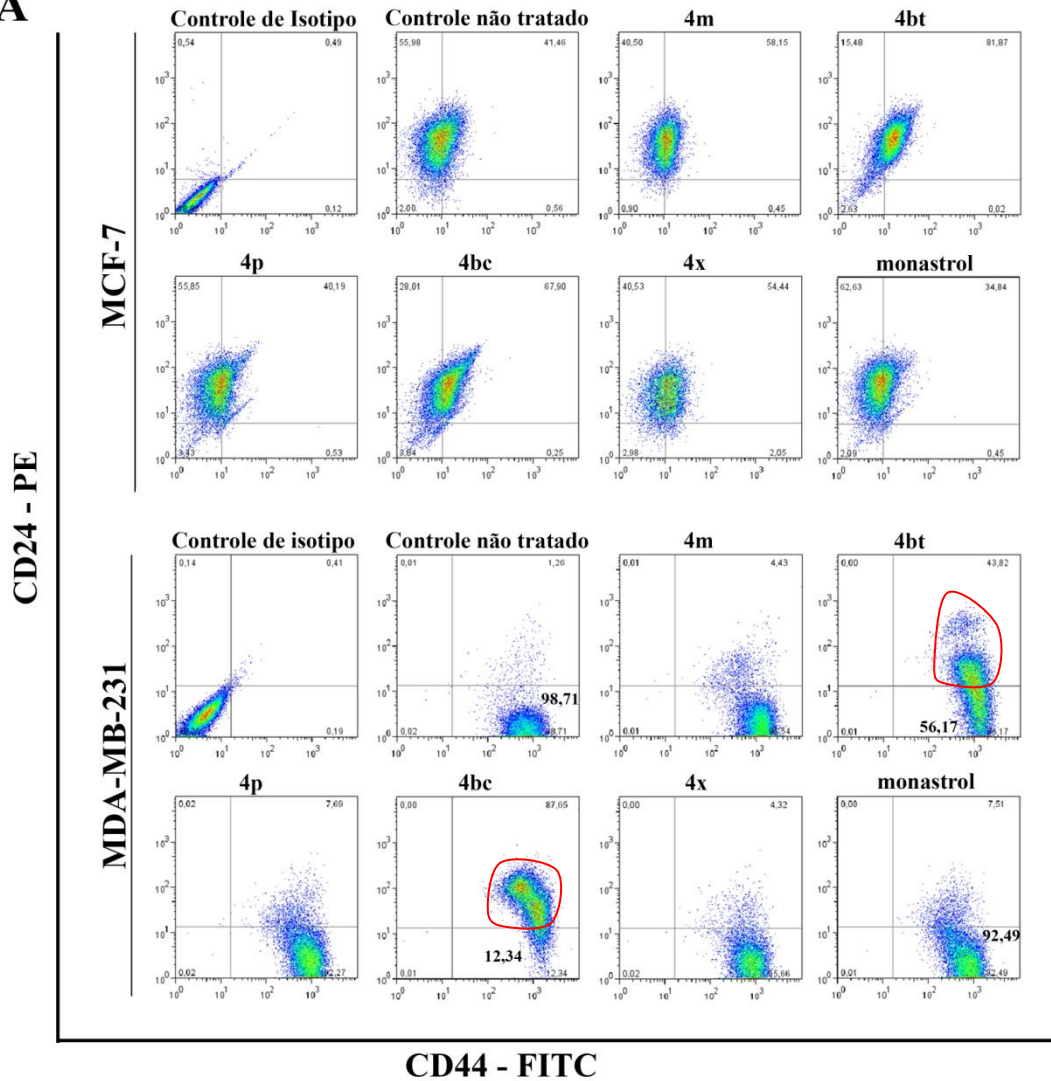
5.9. Os DHPMs levam a uma diminuição na subpopulação de células-tronco tumorais nas células MDA-MB-231

No câncer de mama, foi mostrado que um subconjunto de marcadores, incluindo CD44⁺/CD24⁻, aldeído desidrogenase, efluxo do corante Hoechst e retenção do corante lipofílico PKH26, indicam o enriquecimento em CTT em várias linhagens celulares (AL-HAJJ et al., 2003; GINESTIER et al., 2007; PECE et al., 2010). Para investigar se os DHPMs poderiam influenciar no perfil fenotípico das subpopulações de células tumorais de mama, os marcadores de superfície, CD44 e CD24, foram avaliados em células MCF-7 e MDA-MB-231 tratadas com cada um dos cinco derivados.

As células MCF-7 possuem uma população de CTT bastante reduzida com uma média 0,38% de células CD44⁺/CD24⁻. O tratamento com os DHPMs não teve nenhum impacto sobre a expressão desses marcadores e, portanto não alterou a quantidade de células-tronco tumorais nesta linhagem celular (Figura 26 e tabela 6). Entretanto, os resultados foram extremamente interessantes com relação à influência dos DHPMs na modulação da expressão destas moléculas nas células MDA-MB-231. Os compostos 4bt e 4bc diminuíram significativamente a subpopulação células CD44⁺/CD24⁻ de 98,45% (controle não tratado) para aproximadamente 47,83% e 14,84%, respectivamente (Figura 26 e tabela 7).

Um aumento no fenótipo CD44⁺/CD24⁺ foi também observado nas amostras tratadas com estes derivados. Esses resultados indicam que os compostos 4bt e 4bc podem induzir uma transformação das células MDA-MB-231 para um fenótipo mais epitelial, e ainda que o tratamento foi capaz de reduzir consideravelmente a população de CTT nesta linhagem.

A



B

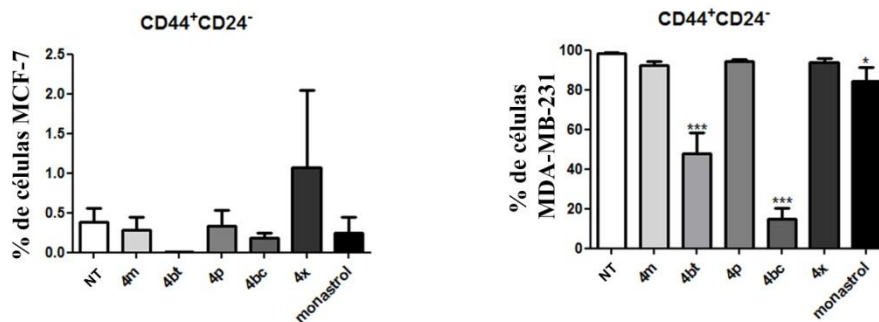


Figura 26. Os DHPMs reduzem a população de células-tronco tumorais na linhagem MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 foram tratadas com 4m (1 mM), 4bt (0,8 mM), 4p (0,4 mM), 4bc (1 mM), 4x (0,8 mM) e monastrol (1 mM) por 24h e a expressão dos marcadores de superfície CD44 e CD24 foi avaliada por citometria de fluxo. **A**, Dados representativos de um experimento independente. **B**, Porcentagem de células MDA-MB-231 com fenótipo CD44⁺/CD24⁻ antes e após o tratamento com os DHPMs. Os dados representam a média ± SEM de três experimentos independentes, n=1. *P<0.05 e ***P<0,001 comparados ao controle não tratado.

Tabela 6. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronco-tumorais, CD44 e CD24, em células MCF-7 controle ou tratadas com 4m (1 mM), 4bt (0,8 mM), 4p (0,4 mM), 4bc (1 mM), 4x (0,8 mM) ou monastrol (1 mM) por 24 h. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes.

MCF-7	Fenótipos (Média \pm SEM)			
	CD44 ⁻ /CD24 ⁻	CD44 ⁻ /CD24 ⁺	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	CD44 ⁺ /CD24 ⁺
Controle	2,14 \pm 0,15	65,21 \pm 9,23	0,38 \pm 0,18	32,26 \pm 9,20
4m	1,01 \pm 0,12	55,59 \pm 15,09	0,28 \pm 0,15	43,10 \pm 15,06
4bt	3,09 \pm 0,46	34,92 \pm 19,45	0,005 \pm 0,005	61,97 \pm 19,91
4p	2,83 \pm 0,59	66,42 \pm 10,57	0,33 \pm 0,20	30,40 \pm 9,78
4bc	3,90 \pm 0,070	46,49 \pm 18,49	0,18 \pm 0,07	49,42 \pm 18,49
4x	2,45 \pm 0,52	61,35 \pm 20,83	1,065 \pm 0,97	35,11 \pm 19,33
Monastrol	1,64 \pm 0,43	68,56 \pm 5,93	0,2400 \pm 0,20	29,53 \pm 5,30

Tabela 7. Porcentagem das subpopulações definidas pela combinação dos marcadores de células tronco-tumorais, CD44 e CD24, em células MDA-MB-231 controle ou tratadas com 4m (1 mM), 4bt (0,8 mM), 4p (0,4 mM), 4bc (1 mM), 4x (0,8 mM) ou monastrol (1 mM) por 24 h. Os dados representam a média \pm SEM de três experimentos independentes.

MDA-MB-231	Fenótipos (Média \pm SEM)			
	CD44 ⁻ /CD24 ⁻	CD44 ⁻ /CD24 ⁺	CD44 ⁺ /CD24 ⁻	CD44 ⁺ /CD24 ⁺
Controle	0,03 \pm 0,006	0,003 \pm 0,003	98,45 \pm 0,47	1,507 \pm 0,47
4m	0,01 \pm 0,003	0,017 \pm 0,012	92,57 \pm 1,62	7,390 \pm 1,611
4bt	0,01 \pm 0,00	0,0 \pm 0,0	47,83 \pm 10,60 ***	52,14 \pm 10,60 ***
4p	0,02 \pm 0,009	0,003 \pm 0,003	94,45 \pm 1,13	5,507 \pm 1,13
4bc	0,01 \pm 0,003	0,003 \pm 0,003	14,84 \pm 5,27 ***	85,13 \pm 5,26 ***
4x	0,01 \pm 0,003	0,020 \pm 0,0200	93,88 \pm 2,12	6,08 \pm 2,10
Monastrol	0,00 \pm 0,003	0,007 \pm 0,003	84,41 \pm 6,97 *	15,56 \pm 6,96 *

5.10. Os DHPMs inibem a angiogênese tanto *in vitro* quanto *in vivo*

Os efeitos do tratamento com os DHPMs foram avaliados *in vitro* na formação de estruturas semelhantes à vasos pelas células endoteliais (HUVEC) e *in vivo* utilizando o modelo da membrana corioalantóica (CAM) de ovos de galinha fertilizados. Com relação ao ensaio *in vitro*, as células HUVEC foram capazes de formar tubos por meio da conexão com células vizinhas, formando uma rica malha de túbulos semelhantes a capilares ramificados (Figura 27A). Entretanto, após o tratamento com diferentes concentrações dos DHPMs (30 μ M, IC₅₀ e 300 μ M) as conexões intercelulares foram anuladas e as células HUVEC perderam a capacidade de formar tubos (Figuras 27 A e B). Foi possível observar que as estruturas semelhantes a capilares foram interrompidas e nas concentrações mais altas, muitas células apresentaram morfologia esférica, estando tanto isoladas quanto agregadas em pequenos grupos (Figura 27A). Além disso, todos os compostos levaram a uma diminuição significativa na formação de tubos pelas células HUVEC na maior concentração testada, como é possível observar pela análise por padrão de reconhecimento (Figura 27B). O composto 4p e o 4bt foram os que apresentaram atividade antiangiogênica mais pronunciada, o que sugere que estes derivados possuem propriedades que interferem substancialmente na habilidade das células HUVEC em formarem estruturas semelhantes a vasos, *in vitro*.

Para avaliar se os DHPMs poderiam inibir a formação de vasos pelas células tumorais de mama, um modelo *in vivo* baseado na CAM de ovos fertilizados de galinha foi utilizado. Estes resultados indicam que em doses muito baixas (500 ng) todos os derivados foram capazes de reduzir a formação de novos vasos por ambas as linhagens celulares (Figura 28). Embora as propriedades antiangiogênicas apresentadas pelos DHPMs no ensaio de CAM não tenham sido estatisticamente significativas, nossos dados indicam uma relevante redução na convergência dos vasos em direção ao implante de células tumorais, bem como na espessura dos vasos, como pode ser observado na Figura 28 – painéis da direita.

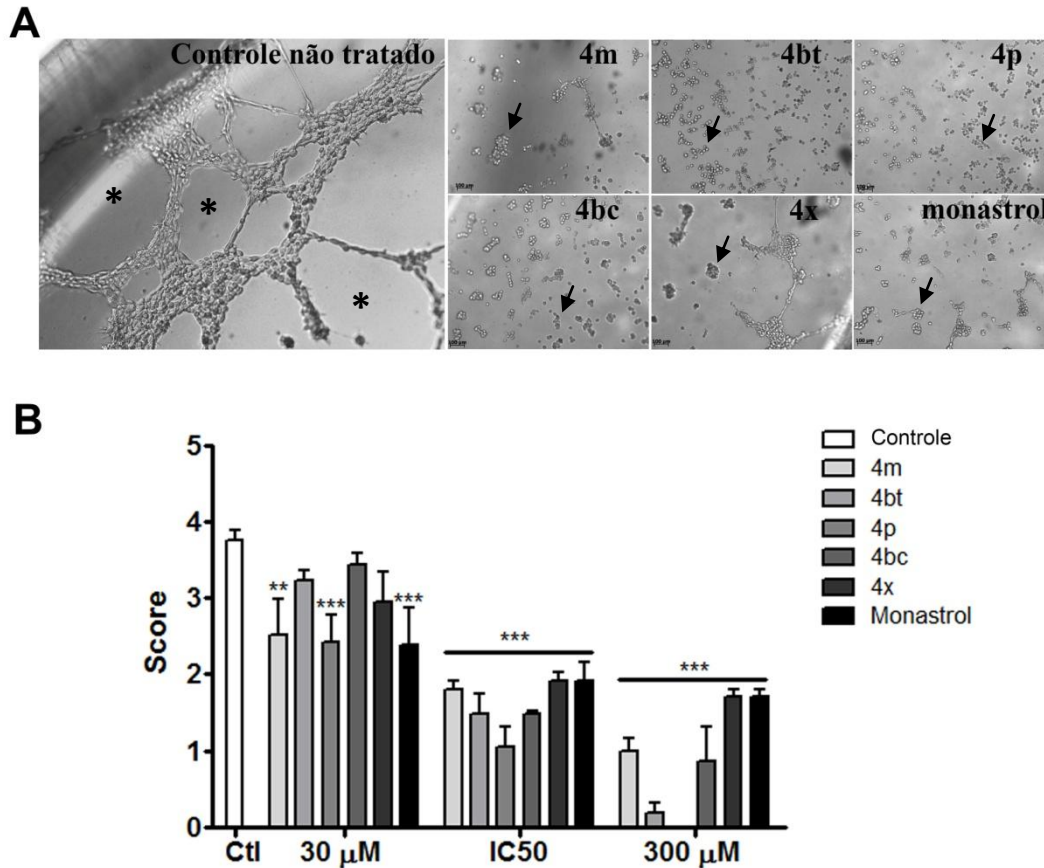


Figura 27. Os DHPMs inibem a formação de vasos *in vitro*. A análise da formação de estruturas semelhantes a vasos foi realizada utilizando-se células HUVEC controle ou tratadas com 4m, 4bt, 4p, 4bc, 4x e monastrol (30 μ M, IC₅₀ e 300 μ M), plaqueadas sobre a superfície de matrigel (ECMatrix™) polimerizado. **A**, Imagens representativas dos grupos controle ou tratados com 300 μ M de cada um dos compostos, capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio de luz invertido na magnificação de 20x. As células HUVEC que não receberam o tratamento se organizam formando estruturas semelhantes a vasos (asteriscos). O tratamento com os DHPMs inibe esta capacidade das células HUVEC que se apresentam mais soltas, desconectadas umas das outras e arredondas (setas). **B**, As estruturas semelhantes a tubos formadas pelas células HUVEC controle ou tratadas por 11h foram quantificadas por padrão de reconhecimento. Os dados representam a média \pm SEM de 7 campos por grupo experimental, de três experimentos independentes, n=1. **P<0,01 e ***P<0,001 comparados ao controle não tratado.

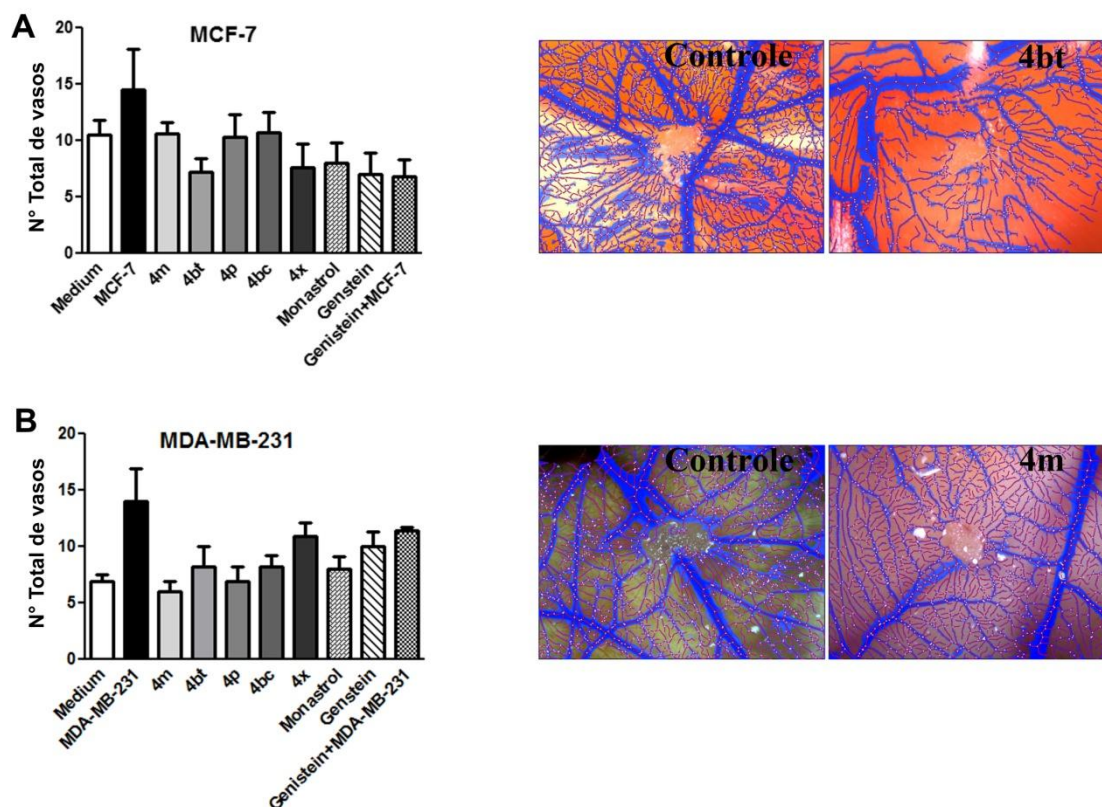


Figura 28. Os DHPMs inibem ligeiramente a formação de novos vasos pelas células tumorais de mama e diminuem a convergência dos vasos em direção ao tumor. Células MCF-7 e MDA-MB-231 controle ou tratadas com 500 ng dos compostos 4m, 4bt, 4p, 4bc, 4x, monastrol ou genisteína (controle antiangiogênico) foram implantadas na CAM. No 17º dia os vasos da CAM foram fotografados. Em (A) é possível visualizar uma imagem representativa do tratamento mais eficaz em cada uma das linhagens, comparada com os respectivos controles. Em (B) temos a quantificação do número total de redes realizada pela Wimasis Image Analysis. Os dados representam a média \pm SEM de um experimento realizado com 3 a 5 animais por grupo.

5.11. Os DHPMs não interferem no potencial de invasibilidade das células tumorais de mama

No intuito de verificar se os DHPMs poderiam influenciar na capacidade de invasão das células MDA-MB-231, um ensaio de invasão utilizando insertos revestidos com uma fina camada de matrigel, simulando a membrana basal, foi realizado. Os resultados deste teste indicam que nenhum dos cinco derivados testados influencia de maneira significativa nas propriedades invasivas desta linhagem celular (Figuras 29 A e B). Um pequeno aumento estatisticamente não significativo foi observado no grupo tratado com os compostos 4m e 4bt, e uma ligeira diminuição, também não significativa, ocorreu após o tratamento com o composto 4x (Figura 29 B).

As células que não receberam nenhum tratamento, quando plaqueadas sobre o matrigel tenderam a formar aglomerados, já as tratadas com os derivados não mantiveram essa característica, visto que elas ficaram mais individualizadas e separadas umas das outras. Essa atividade apresentada por estes compostos pode ter sido responsável pela ausência de inibição do potencial invasivo das células MDA-MB-231, visto que as células não aglomeradas podem ter passado mais facilmente pela camada de matrigel e principalmente pelos poros do inserto.

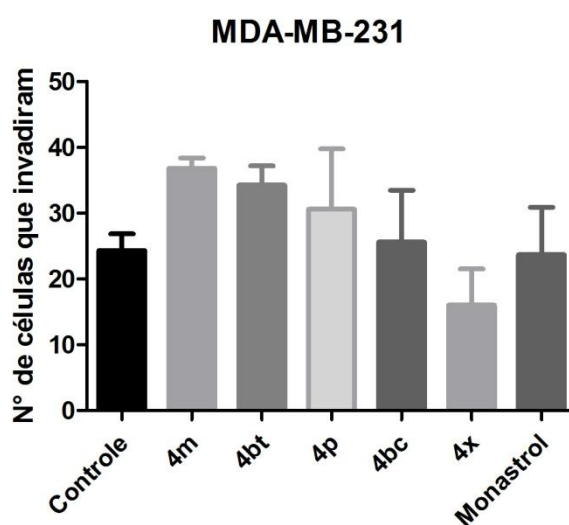
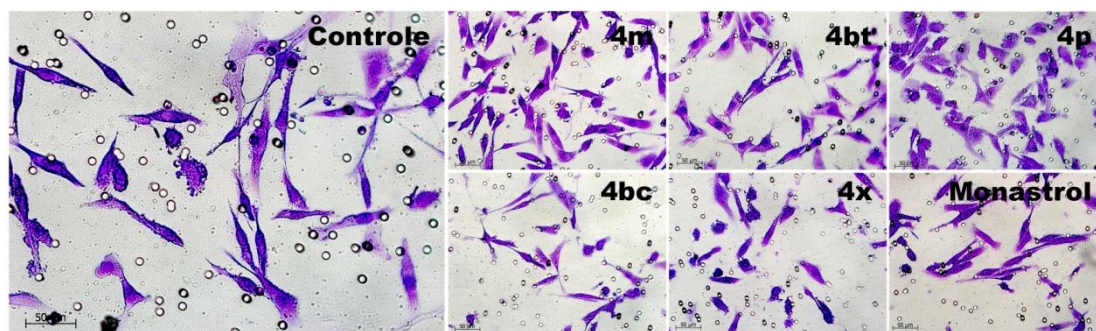


Figura 29. Os DHPMs não influenciam no potencial invasivo das células MDA-MB-231. Células MDA-MB-231 pré-privadas de nutrientes por 24h, foram plaqueadas no inserto apenas em meio de cultivo sem SFB ou em meio de cultivo contendo o IC₅₀ dos compostos 4m, 4bt, 4p, 4bc, 4x e monastrol. Após 48h de incubação a 37°C, as células na superfície inferior da membrana foram fixadas, coradas com cristal violeta fotografadas com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz invertido na magnificação de 32X. **A**, Imagens representativas de cada um dos grupos experimentais. Barra = 50 µm. **B**, Quantificação das células que invadiram. As colunas representam a média de células que invadiram/campo ± SEM. Dez campos por grupo foram quantificados, de três experimentos independentes com n = 1.

6. DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós analisamos *in vitro* diferentes aspectos da citotoxicidade induzida por trinta e sete compostos derivados da 3,4-dihidropirimidinona (DHPMs) em células de adenocarcinoma mamário, MCF-7 e MDA-MB-231. Diversas evidências mostraram que os DHPMs podem inibir a cinesina Eg5 de forma específica, levando à ocorrência de um erro severo na montagem do fuso mitótico, o qual é responsável por conduzir as células à morte por apoptose. A indução deste evento de morte celular em células tumorais é um dos objetivos mais almejando no processo de desenvolvimento de fármacos (CERELLA et al., 2014; HENSON; BRATTON, 2013; HOCHREITER-HUFFORD; RAVICHANDRAN, 2013), devido ao fato da apoptose ser considerada uma morte “limpa”, já que não há liberação do conteúdo intracelular; pela não associação com mecanismos inflamatórios e também por seu papel relacionado à regeneração tecidual (VRIZ et al., 2014). Foram identificados cinco derivados (4m, 4bt, 4p, 4bc e 4x) com atividade citotóxica bastante significativa para ambas as linhagens celulares testadas e que apresentaram efeitos brandos para as células normais, mesmo quando usados em elevadas concentrações.

Foi demonstrado também, que a concentração inibitória de 50% (IC₅₀) obtida para os compostos 4m, 4bt e 4p foram menores que as apresentadas pelo monastrol, utilizado neste trabalho como controle experimental. O IC₅₀ dos derivados 4bc e 4x foram maiores que os obtidos para os demais compostos citados acima, entretanto, esta característica não representa uma desvantagem para o uso dos mesmos, já que nossos ensaios demonstraram que estes não apresentam um efeito dose-dependente para as células normais. Esta característica é considerada altamente favorável dentro do processo de desenvolvimento de fármacos antitumorais já que diversos agentes antineoplásicos já utilizados apresentam elevada citotoxicidade para células normais de forma dependente da dose (WANG et al., 2014).

A proliferação celular é considerada um processo crucial relacionado com a iniciação, manutenção e progressão do tumor (BARRETT, 1993). Em nossos estudos, os tratamentos com baixas concentrações dos derivados 4m, 4bt e 4p desempenhou um papel prioritário na prevenção da proliferação celular tanto nas células MCF-7 quanto nas células MDA-MB-231. Estes dados sugerem que os DHPMs apresentam um efeito citostático bastante interessante o qual é um recurso útil a ser utilizado em casos de tumores contendo células resistentes à apoptose ou pouco responsivos à agentes pró-

apoptóticos. Barret (1993) demonstrou em seu trabalho que a proliferação celular desempenha um papel crucial na carcinogênese podendo influenciar neste evento por inúmeros mecanismos, tal que a proliferação por si só poderia ser carcinogênica. Considerando o importante papel da proliferação no processo de formação do tumor, os derivados 4m, 4bt e 4p, poderiam ser incluídos como potenciais candidatos para futuras fases experimentais *in vivo* na tentativa de estabelecer sua eficácia e segurança farmacológica no tratamento de adenocarcinomas mamários.

A inibição da proliferação celular é consequência de uma parada no ciclo celular, um efeito já descrito para o monastrol, o qual pode induzir uma parada rápida e reversível no ciclo na fase G2/M, por interferir na formação do fuso mitótico (KAPOOR et al., 2000). Estas alterações no fuso podem conduzir as células à três diferentes vias: (1) Ficar aprisionadas na fase G2/M (CARTER et al., 2006); (2) escapar da parada mitótica, tanto passando para a próxima interfase em decorrência de um evento conhecido como “derrapagem mitótica” (*mitotic slippage*) quanto submetendo-se a uma rodada de mitose aberrante com a geração de células tetraploides (DAI, 2004); ou (3) ser conduzidas à morte celular (CARTER et al., 2009).

Nós demonstramos que aproximadamente 92% das células MCF-7 e 97% das células MDA-MB-231 são levadas a apoptose após 72h de tratamento com o derivado 4bc. Diversos fármacos antitumorais apresentam baixos índices apoptóticos (ZAKARIA et al., 2014) quando comparados aos resultados apresentados para esta molécula. Outra descoberta bastante interessante foi que embora o composto 4p não tenha interagido diretamente com a Eg5, como demonstrado pelos dados de dinâmica molecular, ele foi capaz de induzir nas células o evento da catástrofe mitótica. Baseado em evidências morfológicas (Figuras 20 e 21) foi possível observar que este composto se mostrou bastante singular quando comparado aos outros análogos do monastrol, visto que produziu um efeito de quebra e desorganização dos microtúbulos.

Em concentrações muito inferiores, o derivado 4p apresentou elevada atividade citotóxica sobre as células tumorais de mama, entretanto esse efeito também foi bem pronunciado sobre células normais, o que se deve, provavelmente, ao fato dele se ligar à outra molécula alvo que não a proteína motora Eg5. A imunomarcagem de α -tubulina em células tratadas com o 4p demonstrou que este composto causa uma disrupção nos microtúbulos e uma desorganização do citoesqueleto. Estes dados corroboram com os resultados de dinâmica molecular, nos quais foi possível observar que o 4p não faz

nenhuma ligação direta com nenhum resíduo da proteína Eg5, gerando uma forte indicação de que esta molécula se ligue em outro alvo.

Diversos agentes que interferem com a dinâmica dos microtúbulos como a colchicina (MUELLER e BROWN, 1982), cobrestatina (patente EP1434778 A1), e ELR510444 (RISINGER et al., 2011) continuamente vem sendo identificados, com destaque para os alcalóides extraídos da vinca: vinblastina, vincristina, e vinorelbina (YANG, et al., 2010). Todos estes agentes apresentam como características comuns elevada e inespecífica citotoxicidade que é traduzida em uma limitada janela terapêutica, levando ainda à seleção de células resistentes e não apresentando biodisponibilidade quando do seu uso oral (LEESE et al., 2014). Apesar de todos estes pontos contrários, estes compostos continuam sendo propostos como potentes agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer (JORDAN; WILSON, 2004, LEESE et al., 2014, RISINGER et al., 2011, YANG et al., 2010). Logo, embora nossos resultados com o composto 4p apontem para citotoxicidade em células normais, estudos complementares estão em andamento em nosso laboratório para determinar os limites para a sua utilização.

Por meio das análises de microscopia eletrônica de transmissão (Figura 21) foi observado que além das mudanças na estrutura dos microtúbulo, o composto 4p também causou uma fragmentação nuclear com a formação de grandes células com múltiplos micronúcleos. Segundo Vitale e colaboradores (2011), falhas na mitose estão geralmente associadas com quebras cromossômicas e cariocinese deficiente, o que leva a alterações nucleares grosseiras (multinucleação e micronucleação) que constituem os traços morfológicos mais proeminentes da catástrofe mitótica (VITALE et al., 2011).

A catástrofe mitótica é definida como um tipo de morte celular que deriva da entrada prematura ou inapropriada das células em mitose, ela ocorre tanto durante ou logo depois de uma mitose desregulada ou falha (CASTEDO; PERFETTINI; ROUMIER; ANDREAU; et al., 2004; MANSILLA et al., 2006; RONINSON et al., 2001) sendo um processo que resulta na morte celular (VAKIFAHMETOGLU et al., 2008). Características típicas deste evento são o bloqueio da mitose, a desorganização do fuso mitótico e a falha na separação dos cromossomos (WOLANIN et al., 2006). A catástrofe mitótica pode ser induzida por danos no DNA, disrupção dos fusos mitóticos, crescimento celular prolongado ou pela inibição da cinase dependente de ciclina, CHK1, ou aurora cinases (MANSILLA et al., 2006; RONINSON et al., 2001). Uma combinação das deficiências dos pontos de checagem do ciclo celular podem também

resultar em catástrofe mitótica (CASTEDO; et al., 2004). Estas anormalidades mitóticas podem levar a formação de células em intérfase com múltiplos micronúcleos, que é seguida por apoptose, senescência ou necrose, dependendo do perfil genético das células (RONINSON et al., 2001; VAKIFAHMETOGLU et al., 2008). Estas células mitóticas anormais podem então morrer durante a metáfase como resultado da ativação de caspases e subsequente dano mitocondrial (CASTEDO; et al., 2004). Devido à diversas vias de morte serem ativadas após a catástrofe mitótica, a indução deste evento é considerado um mecanismo válido para subverter a resistência à drogas (WOLANIN et al., 2006). Alguns trabalhos ainda mostraram que moléculas tais como o monastrol, o dimetil enastrol, K858 e ARRY-520 podem desencadear a catástrofe mitótica e a morte celular pela inibição da cinesina (CARTER et al., 2009; MAYER et al., 1999; RELLOVARONA et al., 2009).

Embora um padrão de atividade particular tenha sido identificado para o composto 4p, semelhantemente aos outros derivados ele também induziu a apoptose, inibiu a proliferação das células tumorais e a formação de estruturas semelhantes a vasos pelas células endoteliais usadas como modelo experimental.

Kapoor e colaboradores (2000) demonstraram que o monastrol não afeta os microtúbulos de células em interfase ou a polimerização de microtúbulos *in vitro*. O monastrol também não atrapalha no tráfego de vesículas dependente de microtúbulos ou a dinâmica dos cromossomos nas células. Ele age apenas na inibição da cinesina mitótica, Eg5, gerando fusos monoastrais que levam à parada das células em mitose de forma dependente de SAC (*spindle assembly checkpoint*) (BLANGY et al., 1995; MAYER et al., 1999). Este atraso mitótico culmina na morte celular de uma ampla gama de linhagens celulares, tanto em células em cultura quanto em modelos xenográficos (SAKOWICZ et al., 2004; TAO et al., 2005), além disso, as células tumorais resistentes aos taxanos permanecem sensíveis à inibição da cinesina (MARCUS et al., 2005). A abordagem usada para produzir moléculas derivadas do monastrol (RAMOS et al., 2013) não afetou suas características principais, com exceção do composto 4p que apresentou uma atividade nova e atípica para derivados do monastrol. Isto pode ser evidenciado devido ao fato de que a maioria absoluta dos derivados testados neste trabalho causa a formação do fuso monoastral e conseqüentemente induz a morte celular por apoptose, em alguns casos de forma mais eficaz que o monastrol.

Sabe-se que eventos tais como a duplicação e separação dos centrosomos, bem como a formação do fuso bipolar são essenciais para a correta segregação cromossômica. A cinesina Eg5 é um dos reguladores chave destes processos e a sua inibição acarreta em uma parada das células em prometáfase (WORDEMAN, 2010). Esta parada no ciclo é mediada pelo ponto de checagem da montagem do fuso (*spindle assembly checkpoint* – SAC), que tem sua atividade dependente de diversos efetores tais como Mad2, BubR1, Mps1 ou Aurora B, uma cinase essencial durante o mecanismo de correção do erro que monitora a ligação apropriada dos microtúbulos aos cinetócoros. A anulação deste ponto de checagem provoca a segregação cromossômica anormal e a instabilidade cromossômica (MANCHADO et al., 2012).

O atraso na mitose monitorado pelo SAC em decorrência da formação de erros no fuso provê tempo adicional às células para solucionar os erros de ligação microtúbulo-cinetocoro (KOPS et al., 2005; MUSACCHIO; SALMON, 2007). O SAC inibe o complexo promotor da anáfase/ciclossomo (APC/C), uma ubiquitina E3-ligase que desencadeia o fim da mitose principalmente por se ligar a ciclina B para sua degradação, então inibindo a atividade de Cdk1 (WORDEMAN, 2010). O atraso na mitose dependente de SAC aumenta a susceptibilidade das células à morte celular. Alternativamente, as células podem escapar da retenção em mitose pela lenta degradação da ciclina B, um processo conhecido como “derrapagem mitótica” (*mitotic slippage*), com a geração de células tetraplóides. Estas células tetraploides podem ser incapazes de replicar seu DNA no ciclo celular subsequente se o ponto de checagem correspondente estiver funcional ou podem eventualmente proliferar como culturas poliploides (MANCHADO et al., 2012).

Neste trabalho, foi demonstrado que os derivados 4m, 4p, e 4x são capazes de produzir um aprisionamento das células MCF-7 em G2/M, após 48h de tratamento. Por outro lado, apenas o composto 4m teve esse mesmo efeito em células MDA-MB-231. Após 72h de tratamento, uma porcentagem significativa destas células morreu por apoptose (Figura 20). Este atraso no ciclo celular, entretanto, não foi verificado nos tratamentos com os compostos que apresentaram maior atividade citotóxica nas células MCF-7 (4bc, 4bt e monastrol) e nas células MDA-MB-2321 (4bt, 4p, 4bc, 4x e monastrol). Duas hipóteses foram levantadas para justificar esta ocorrência: (1) a não detecção deste atraso poderia ocorrer devido à eliminação mais rápida destas células por apoptose, impossibilitando assim a visualização deste evento nos tempos estudados ou (2) o tratamento com estes compostos poderia ter atrapalhado algum dos efetores de

SAC e assim, as células conseguiram escapar deste mecanismo de verificação de erro e seguiram sua divisão como células tetraploides, como descrito em 2004 por Dai e colaboradores. Posteriormente essas células podem ter sido identificadas no ponto de checagem subsequente sendo então direcionadas à morte.

Nossos resultados indicaram o composto 4bc como potente e específico agente antitumoral. Esta molécula apresentou uma ação letal dose-dependente para células tumorais, entretanto seus efeitos sobre as células normais não seguiram este perfil. O 4bc e o 4bt foram considerados os melhores compostos dentre todos os testados, segundo o que foi observado nos ensaios *in vitro*. Estes resultados corroboram com os dados de dinâmica molecular, na qual foi possível observar que estes dois compostos formam as ligações mais estáveis com a proteína Eg5 e estas conexões são feitas em resíduos comuns aos que o monastrol se liga (TCHERNIUK et al., 2010). O fechamento do sítio de ligação promovido pela ligação do composto 4bc inibiu consideravelmente a mobilidade da proteína, causando uma importante diminuição em suas funções dependentes do seu movimento. Nossos resultados mostram que este mecanismo de ação pode ser o maior responsável pela inibição da Eg5 causada pelo composto 4bc. Como os outros compostos não levaram a proteína a um estado de enrijecimento tão relevante como o 4bc, é possível assumir que há uma relação notável entre os movimentos da proteína e sua atividade. Além disso, é possível notar a importância do resíduo Arg119 na formação do sítio catalítico visto que as moléculas com maior efeito inibitório sobre a proteína interagiram com este resíduo.

Ao observar os resultados da análise de componente principal e RMSD foi possível notar que o composto 4bc levou a estrutura conformacional da Eg5 a um deslocamento relevante, e conseqüentemente a uma importante estabilização, diferentemente dos outros compostos. Esta estabilização em uma conformação estrutural diferente pode ser a chave para a inibição competitiva da atividade da Eg5.

O derivado 4x foi o que obteve resultados menos satisfatórios, com o IC50 mais alto dentre os compostos testados, menor atividade citotóxica em ambas as linhagens celulares e nenhuma inibição significativa da Eg5 em ensaios diretos.

Uma característica muito importante para o estabelecimento e manutenção do tumor é a presença de células-tronco tumorais (CTTs), as quais são definidas pela sua capacidade de dar início ao tumor e parecem ser responsáveis por coordenar o crescimento tumoral, a sua recorrência e metástase (AL-HAJJ et al., 2003; DALERBA et al., 2007; TAM et al., 2013). A presença de diversos marcadores de superfície vem

sendo utilizada para o isolamento das CTT em linhagens de células tumorais de mama e em tecidos tumorais. Mais notavelmente, o subconjunto de células $CD44^+/CD24^{-/low}$ isoladas de câncer de mama são enriquecidas com CTT devido ao seu alto potencial tumorigênico (YIN; GLASS, 2011). Nós demonstramos neste trabalho, que os DHPMs apresentaram atividade altamente relevante na modulação do perfil fenotípico das células MDA-MB-231 baseado na expressão destes marcadores de superfície. Uma considerável diminuição na população de CTT ($CD44^+/CD24^-$) foi detectada nesta linhagem celular após o seu tratamento, que apresentou também um aumento na população de células com um perfil mais epitelial ($CD44^+/CD24^+$). Este foi um resultado muito surpreendente já que foi previamente verificado em outros trabalhos que as células-tronco tumorais isoladas de linhagens celulares de câncer de mama são resistentes à radiação e quimioterapia e que estes tratamentos podem selecionar as células acarretando no crescimento de subpopulações resistentes à quimioterapia, que são mais tumorigênicas, invasivas e apresentam características de células-tronco (CREIGHTON et al., 2009; GUPTA; ONDER; et al., 2009). Consequentemente, as terapias antitumorais podem tornar-se ineficazes, pois grandes quantidades de células cancerosas no interior de um tumor podem ser eliminadas, deixando para trás as CTT que tem a capacidade de regenerar o tumor (TAM et al., 2013). Os derivados de DHPM mostraram ter atividade inibitória contra as principais características relacionadas com a recorrência do tumor, as quais estão relacionadas a um pior prognóstico para os portadores da doença.

As CTTs são geradas em alguns ou talvez em todos os carcinomas como um dos produtos da transição epitelial-mesenquimal (TEM), indicando que estas células possuem um fenótipo mais mesenquimal que é associado com a presença de traços muito agressivos (THIERY et al., 2009). A TEM ativada em células de carcinoma as tornam capazes de adquirir traços celulares associados com alto grau de malignidade, incluindo a capacidade de completar vários passos da cascata metastática (BRABLETZ et al., 2005; SINGH; SETTLEMAN, 2010). Além disso, certas células epiteliais que passam pela TEM adquirem traços de auto-renovação associados a tecidos normais e células-tronco tumorais (MANI et al., 2008; MOREL et al., 2008). Nossos resultados indicam que os DHPMs podem estar mediando o processo reverso à TEM, conhecido como transição mesenquimal-epitelial (MET), já que as células tratadas passaram a apresentar um fenótipo duplo positivo, com características mais epiteliais. Esta alteração no perfil fenotípico da população de células tumorais pode ter levado à maior

susceptibilidade das células aos efeitos citotóxicos produzidos pelos DHPMs. Outras análises, entretanto, são necessárias a fim de melhor caracterizar esta alteração celular, como, por exemplo, a análise do perfil de expressão de proteínas de adesão celular.

Os resultados obtidos nas análises de neovascularização *in vitro* e no ensaio de CAM podem estar intrinsecamente relacionados à aquisição destas características mais epiteliais pelas células tumorais após o tratamento com os DHPMs. Por estas células terem perdido parte de sua capacidade tumorigênica, deixando de expressar características basais/mesenquimais, podem conseqüentemente ter reduzido sua habilidade em formar novos vasos, evento essencial para a manutenção e metástase dos tumores sólidos. Em baixas concentrações testadas, estes compostos levaram a diminuição na capacidade das células endoteliais (HUVEC) em formarem estruturas semelhantes a vasos bem como a formação de novos vasos convergentes à massa tumoral, observado no ensaio de CAM. A capacidade de invasibilidade destas células, no entanto, não foi alterada significativamente após a exposição aos DHPMs. Isto pode dever-se ao fato de o tratamento induzir uma quebra das ligações célula-célula, impedindo que as mesmas cresçam em aglomerados, como ocorre no grupo controle, facilitando assim sua passagem pelos poros da membrana. Por este motivo consideramos este resultado pouco conclusivo e este ponto específico deverá ser adicionalmente investigado pelo nosso grupo.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo fornecem evidências sobre potentes inibidores da cinesina Eg5, os quais impedem a formação correta do fuso mitótico durante a divisão celular levando as células tumorais de mama à morte por apoptose. Estes compostos apresentaram potente atividade contra células MCF-7 e MDA-MB-231, com baixa citotoxicidade para células normais, o que revelou uma grande vantagem sobre os fármacos já amplamente utilizados no tratamento do câncer. Os DHPMs foram ainda capazes de interferir, *in vitro*, com o desenvolvimento de propriedades essenciais para o estabelecimento e a progressão tumoral, como a proliferação e a angiogênese, sendo alguns compostos testados mais eficientes em muitos aspectos que o monastrol. Assim, a arquitetura dos DHPMs pode representar um promissor caminho para o desenvolvimento de um potente e específico quimioterápico contra o câncer. Neste trabalho nós identificamos e caracterizamos *in vitro* dois potenciais candidatos à quimioterápicos contra o câncer devido a sua bioatividade seletiva nas células tumorais, que será posteriormente avaliada em ensaios *in vivo*.

7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho até o momento nos permitem concluir que:

- Dos trinta e sete compostos testados, cinco foram identificados apresentando potencial atividade citotóxica para ambas as linhagens celulares, MCF-7 e MDA-MB-231.
- Quatro dos cinco compostos selecionados (4m, 4bt, 4bc e 4x) tem como alvo a cinesina Eg5 e, portanto interferem na montagem do fuso mitótico levando as células tumorais de mama à apoptose e diminuindo sua capacidade proliferativa e angiogênica.
- O composto 4p, apresentou um padrão diferente de atividade, possivelmente apresentando um alvo diferente da cinesina Eg5. Este composto causa o fenômeno de catástrofe mitótica nas células, entretanto também apresenta interessante atividade antiproliferativa e antiangiogênica.
- Nenhum dos compostos afetou de forma significativa a capacidade invasiva das células MDA-MB-231.
- Os compostos 4bc e 4bt apresentaram os melhores resultados entre os DHPMs testados, sendo responsáveis pela morte de mais de 90% das células de ambas as linhagens por apoptose. Estes compostos foram capazes de diminuir a população de CTT levando a uma maior presença de células com características epiteliais na linhagem MDA-MB-231. O 4bc e 4bt serão inseridos na próxima etapa de testes *in vivo*, utilizando camundongos nude em modelo xenográfico, que dará continuidade a este trabalho.

8. QUADRO DE RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS

	4m	4bt	4p	4bc	4x	Monastrol
Interação direta com resíduos de Eg5 por DM	+	+	-	++	+	++
Inibição <i>in vitro</i> da cinesina Eg5	++	+	+	++	+	+
Formação de fuso monoastral	++	++	-	++	++	++
Indução de apoptose	+	++	+	++	+	++
Parada do ciclo celular em G2/M	+	-	+	-	+	-
Inibição da Proliferação	++	++	++	+	-	++
Modulação das CTTs	-	++	-	++	-	+
Inibição da angiogênese	++	++	++	++	++	++
Inibição da invasão	-	-	-	-	-	-

9. PERSPECTIVAS

As perspectivas propostas para a continuidade deste trabalho são:

- 9.1. Avaliar a expressão de proteínas e fatores de transcrição associados à adesão celular em células MDA-MB-231 tratadas com os compostos 4bc e 4bt a fim de caracterizar a transição fenotípica das CTTs.
- 9.2. Continuar os estudos com o composto 4p para caracterizar seu mecanismo de ação.
- 9.3. Avaliar *in vivo* os efeitos da terapia mediada pelos DHPMs que apresentaram os melhores resultados nos teste *in vitro*, por meio de análises clínicas, histopatológicas, bioquímicas, hematológicas bem como a regressão tumor e sobrevida de camundongos *nude*;

10. REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, B. K.; FRITZ, P.; MCCLELLAN, M.; et al. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clinical cancer research**, v. 11, n. 3, p. 1154–9, 2005.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1322–1326, 1998.
- AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITO-HERNANDEZ, A.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983–8, 2003.
- AMADEI, A.; LINSSEN, A. B.; BERENDSEN, H. J. Essential dynamics of proteins. **Proteins**, v. 17, n. 4, p. 412–25, 1993.
- AMERICAN CANCER SOCIETY, ACS. Revisado em: 31/01/14. Disponível em: <http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-treating-surgery>.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2014**. Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2014.
- ARMES, J. E.; EGAN, A. J.; SOUTHEY, M. C.; et al. The histologic phenotypes of breast carcinoma occurring before age 40 years in women with and without BRCA1 or BRCA2 germline mutations: a population-based study. **Cancer**, v. 83, n. 11, p. 2335–2345, 1998.
- BARRETT, J. C. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. **Environmental health perspectives**, v. 100, p. 9–20, 1993.
- BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; GUNSTEREN, W. F. VAN; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration. **Intermolecular Forces**, v. 11, n. (Suppl. 1), p. 331–338, 1981.
- BERGNES, G.; BREJC, K.; BELMONT, L. Mitotic kinesins: prospects for antimitotic drug discovery. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 5, n. 2, p. 127–45, 2005.
- BHARADWAJ, R.; YU, H. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 11, p. 2016–27, 2004.
- BIGINELLI, P. Aldehyde-Urea Derivatives of Aceto- and Oxaloacetic Acids. **Gazz. Chim. Ital.**, v. 23, p. 360-413, 1893.
- BLANGY, A.; LANE, H. A.; D'HÉRIN, P.; et al. Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. **Cell**, v. 83, n. 7, p. 1159–69, 1995.

- BLOOM, D.E., CAFIERO, E.T., JANÉ-LLOPIS, E., ABRAHAMS-GESSEL, S., BLOOM, L.R., FATHIMA, S., FEIGL, A.B., GAZIANO, T., MOWAFI, M., PANDYA, A., PRETTNER, K., ROSENBERG, L., SELIGMAN, B., STEIN, A.Z., & WEINSTEIN, C. The Global Economic Burden of Noncommunicable Diseases. Geneva: World Economic Forum. 2011.
- BOURGUIGNON, L. Y. CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 6, n. 3, p. 287–97, 2001.
- BRABLETZ, T. TEM and MET in metastasis: where are the cancer stem cells? **Cancer cell**, v. 22, n. 6, p. 699–701, 2012.
- BRABLETZ, T.; JUNG, A.; SPADERNA, S.; HLUBEK, F.; KIRCHNER, T. Opinion: migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 9, p. 744–9, 2005.
- BRIER, S.; LEMAIRE, D.; DEBONIS, S.; FOREST, E.; KOZIELSKI, F. Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Biochemistry**, v. 43, n. 41, p. 13072–13082, 2004.
- BRITO, D. A.; YANG, Z.; RIEDER, C. L. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied. **The Journal of cell biology**, v. 182, n. 4, p. 623–9, 2008.
- CAREY, L. A.; PEROU, C. M.; LIVASY, C. A.; et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA: the journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 21, p. 2492–502, 2006.
- CARTER, B. Z.; MAK, D. H.; SHI, Y.; et al. Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: overcoming imatinib resistance. **Cell cycle**, v. 5, n. 19, p. 2223–9, 2006.
- CARTER, B. Z.; MAK, D. H.; WOESSNER, R.; et al. Inhibition of KSP by ARRY-520 induces cell cycle block and cell death via the mitochondrial pathway in AML cells. **Leukemia**, v. 23, n. 10, p. 1755–62, 2009.
- CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.-L.; ROUMIER, T.; ANDREAU, K.; et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825–37, 2004.
- CASTEDO, M.; PERFETTINI, J.-L.; ROUMIER, T.; VALENT, A.; et al. Mitotic catastrophe constitutes a special case of apoptosis whose suppression entails aneuploidy. **Oncogene**, v. 23, n. 25, p. 4362–70, 2004.
- CASTILLO, A.; MORSE, H. C.; GODFREY, V. L.; NAEEM, R.; JUSTICE, M. J. Overexpression of Eg5 causes genomic instability and tumor formation in mice. **Cancer research**, v. 67, n. 21, p. 10138–47, 2007.

- CERELLA, C.; TEITEN, M.-H.; RADOGNA, F.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. From nature to bedside: Pro-survival and cell death mechanisms as therapeutic targets in cancer treatment. **Biotechnology advances**, *In Press*, 2014.
- CHAMBERS, A. F.; GROOM, A. C.; MACDONALD, I. C. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 8, p. 563–72, 2002.
- CHEESEMAN, I. M.; DESAI, A. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 1, p. 33–46, 2008.
- COCHRAN, J. C.; GATIAL, J. E.; KAPOOR, T. M.; GILBERT, S. P. Monastrol inhibition of the mitotic kinesin Eg5. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 13, p. 12658–12667, 2005.
- COCK-RADA, A.; WEITZMAN, J. B. The methylation landscape of tumour metastasis. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 105, n. 2, p. 73–90, 2013.
- COLE, D. G.; SAXTON, W. M.; SHEEHAN, K. B.; SCHOLEY, J. M. A “slow” homotetrameric kinesin-related motor protein purified from *Drosophila* embryos. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 37, p. 22913–6, 1994.
- COMPTON, D. A. Spindle assembly in animal cells. **Annual review of biochemistry**, v. 69, p. 95–114, 2000.
- CREIGHTON, C. J.; LI, X.; LANDIS, M.; et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 33, p. 13820–5, 2009.
- DAI, W. Slippage of Mitotic Arrest and Enhanced Tumor Development in Mice with BubR1 Haploinsufficiency. **Cancer Research**, v. 64, n. 2, p. 440–445, 2004.
- DALERBA, P.; CHO, R. W.; CLARKE, M. F. Cancer stem cells: models and concepts. **Annual review of medicine**, v. 58, p. 267–84, 2007.
- DARDEN, T.; YORK, D.; PEDERSEN, L. Particle mesh Ewald: An N·log(N) method for Ewald sums in large systems. **The Journal of Chemical Physics**, v. 98, n. 12, p. 10089, 1993.
- DAVE, B.; MITTAL, V.; TAN, N. M.; CHANG, J. C. Epithelial – mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. **Breast Cancer Research**, v. 14, n.1, p. 202, 2012.
- DENG, S.; YANG, X.; LASSUS, H.; et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. **PLoS One**, v. 5, n. 4, p. e10277, 2010.

- DONALDSON, K.; WAHI, A. F.; KIENER, P. A. Activation with Taxol-induced Coincident Apoptosis. **Cell Growth & Differentiation**, v. 5, p. 1041–1050, 1994.
- DU, L.; WANG, H.; HE, L.; et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. **Clinical cancer research**, v. 14, n. 21, p. 6751–60, 2008.
- ELL, B.; KANG, Y. Transcriptional control of cancer metastasis. **Trends in cell biology**, v. 23, n. 12, p. 603–11, 2013.
- EL-SAFI, S.; KHEIR, M. M.; BUCHETON, B.; et al. Genes and environment in susceptibility to visceral leishmaniasis. **Comptes Rendus Biologies**, v. 329, n. 11, p. 863–870, 2006.
- ENDOW, S. A. Determinants of molecular motor directionality. **Nature cell biology**, v. 1, n. 6, p. E163–7, 1999.
- FANG, X.; ZHENG, P.; TANG, J.; LIU, Y. CD24: from A to Z. **Cellular & molecular immunology**, v. 7, n. 2, p. 100–3, 2010.
- FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the “seed and soil” hypothesis revisited. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 6, p. 453–8, 2003.
- FOLKMAN, J. Angiogenesis. **Annual review of medicine**, v. 57, p. 1–18, 2006.
- FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. Review Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity. **Cell**, v. 147, n. 5, p. 992–1009, 2011.
- FRIEDL, P.; WOLF, K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 5, p. 362–74, 2003.
- FULDA, S.; DEBATIN, K.-M. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene**, v. 25, n. 34, p. 4798–811, 2006.
- GERECITANO, J. F.; STEPHENSON, J. J.; LEWIS, N. L.; et al. A Phase I trial of the kinesin spindle protein (Eg5) inhibitor AZD4877 in patients with solid and lymphoid malignancies. **Investigational New Drugs**, v. 31, n. 2, p. 355–362, 2013.
- GINESTIER, C.; HUR, M. H.; CHARAFE-JAUFFRET, E.; et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell stem cell**, v. 1, n. 5, p. 555–67, 2007.
- GLOBOCAN 2012: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon, France: IARC; 2013 Dec. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/>
- GUPTA, P. B.; CHAFFER, C. L.; WEINBERG, R. A. Cancer stem cells: mirage or reality? **Nature medicine**, v. 15, n. 9, p. 1010–2, 2009.
- GUPTA, P. B.; ONDER, T. T.; JIANG, G.; et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. **Cell**, v. 138, n. 4, p. 645–59, 2009.

- HANAHAHAN, D.; FOLKMAN, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. **Cell**, v. 86, n. 3, p. 353–64, 1996.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, n. 3, p. 57–70, 2000.
- HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARRELL, J. C.; PFEFFERLE, A. D.; ZALLES, N.; et al. Endothelial-like properties of claudin-low breast cancer cells promote tumor vascular permeability and metastasis. **Clinical & experimental metastasis**, v. 31, n. 1, p. 33–45, 2014.
- HARRELL, J. C.; PRAT, A.; PARKER, J. S.; et al. Genomic analysis identifies unique signatures predictive of brain, lung, and liver relapse. **Breast cancer research and treatment**, v. 132, n. 2, p. 523–35, 2012.
- HAYASHI, N.; KOLLER, E.; FAZLI, L.; GLEAVE, M. E. Effects of Eg5 knockdown on human prostate cancer xenograft growth and chemosensitivity. **The Prostate**, v. 68, n. 12, p. 1283–95, 2008.
- HEALD, R. Motor Function in the Mitotic Spindle Minireview. **Cell**, v. 102, n. 4, p. 399–402, 2000.
- HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. Hormonal carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 427–433, 2000.
- HENSON, P. M.; BRATTON, D. L. Antiinflammatory effects of apoptotic cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 123, n. 7, p. 2773–2774, 2013.
- HESS, B.; BEKKER, H.; BERENDSEN, H. J. C.; FRAAIJE, J. G. E. M. LINCS: A linear constraint solver for molecular simulations. **Journal of Computational Chemistry**, v. 18, n. 12, p. 1463–1472, 1997.
- HESS, B.; KUTZNER, C.; SPOEL, D. VAN DER; LINDAHL, E. GROMACS 4: Algorithms for Highly Efficient, Load-Balanced, and Scalable Molecular Simulation. **Journal of Chemical Theory and Computation**, v. 4, n. 3, p. 435–447, 2008.
- HIELSCHER, A. C.; GERECHT, S. Engineering Approaches for Investigating Tumor Angiogenesis : Exploiting the Role of the Extracellular Matrix. **Cancer Research**, n. 4, p. 1–8, 2012.
- HOCHREITER-HUFFORD, A.; RAVICHANDRAN, K. S. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 5, n. 1, p. a008748, 2013.
- HORWITZ, S. B. Mechanism of action of taxol. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 13, n. 4, p. 134–136, 1992.

- HSU, L.; DURRANT, D. E.; HUANG, C.; et al. Development of hemiassterlin derivatives as potential anticancer agents that inhibit tubulin polymerization and synergize with a stilbene tubulin inhibitor. **Drugs**, 2011.
- HUSZAR, D.; THEOCLITOU, M.-E.; SKOLNIK, J.; HERBST, R. Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy. **Cancer metastasis reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 197–208, 2009.
- INCA. **Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>
- 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. 1619–40, 1995.
- JAGGUPILLI, A.; ELKORD, E. Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. **Clinical & developmental immunology**, v. 2012, p. 708036, 2012.
- JOHNSON, K. A.; GILBERT, S. P. Pathway of the microtubule-kinesin ATPase. **Biophysical journal**, v. 68, n. 4 Suppl, p. 173S–176S; discussion 176S–179S, 1995.
- JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253–65, 2004.
- KALLURI, R.; NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **The Journal of clinical investigation**, v. 112, n. 12, p. 1776–84, 2003.
- KALLURI, R.; WEINBERG, R. A. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 6, 2009.
- KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **Journal of clinical oncology**, v. 24, n. 14, p. 2137–50, 2006.
- KAPOOR, T. M.; MAYER, T. U.; COUGHLIN, M. L.; MITCHISON, T. J. Probing Spindle Assembly Mechanisms with Monastrol , a Small Molecule Inhibitor of the Mitotic Kinesin , Eg5 7. **Assembly**, v. 150, n. 5, p. 975–988, 2000.
- KAPOOR, T. M.; MITCHISON, T. J. Eg5 is static in bipolar spindles relative to tubulin: evidence for a static spindle matrix. **The Journal of cell biology**, v. 154, n. 6, p. 1125–33, 2001.
- KAPPE, C. O. 100 years of the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. **Tetrahedron**, v. 49, n. 32, p. 6937–6963, 1993.
- KAPPE, C. O. Recent advances in the Biginelli dihydropyrimidine synthesis. New tricks from an old dog. **Accounts of Chemical Research**, v. 33, n. 12, p. 879–888, 2000.

- KIM, R. Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy. **Cancer**, v. 103, n. 8, p. 1551–60, 2005.
- KLYMKOWSKY, M. W.; SAVAGNER, P. Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. **The American journal of pathology**, v. 174, n. 5, p. 1588–93, 2009.
- KOPS, G. J. P. L.; WEAVER, B. A. A.; CLEVELAND, D. W. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. **Nature reviews. Cancer**, v. 5, n. 10, p. 773–85, 2005.
- KRISTIANSEN, G.; WINZER, K.-J.; MAYORDOMO, E.; et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. **Clinical cancer research**, v. 9, n. 13, p. 4906–13, 2003.
- KROEMER, G. Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution. **Cell Death and Differentiation**, v. 4, n. 6, p. 443–456, 1997.
- KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.
- LEE, H. J.; CHOE, G.; JHEON, S.; et al. CD24, a novel cancer biomarker, predicting disease-free survival of non-small cell lung carcinomas: a retrospective study of prognostic factor analysis from the viewpoint of forthcoming (seventh) new TNM classification. **Journal of thoracic oncology**, v. 5, n. 5, p. 649–57, 2010.
- LEESE, M. P.; JOURDAN, F. L.; MAJOR, M. R.; et al. Tetrahydroisoquinolinone-based steroidomimetic and chimeric microtubule disruptors. **ChemMedChem**, v. 9, n. 1, p. 85–108, 1, 2014.
- LI, Q.; LV, S.; TANG, Z.; et al. A Co-Delivery System Based On Paclitaxel Grafted mPEG-b-PLG Loaded with Doxorubicin: Preparation, In Vitro and In Vivo Evaluation. **International journal of pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p. 412-420. 2014.
- MALIGA, Z.; KAPOOR, T. M.; MITCHISON, T. J. Evidence that monastrol is an allosteric inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. **Chemistry & Biology**, v. 9, n. 9, p. 989–996, 2002.
- MALLINI, P.; LENNARD, T.; KIRBY, J.; MEESON, A. Epithelial-to-mesenchymal transition: What is the impact on breast cancer stem cells and drug resistance. **Cancer treatment reviews**, v. 40, n. 3, p. 341–8, 2013.
- MANCHADO, E.; GUILLAMOT, M.; MALUMBRES, M. Killing cells by targeting mitosis. **Cell Death and Differentiation**, p. 369–377, 2012.
- MANI, S. A.; GUO, W.; LIAO, M.-J.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, v. 133, n. 4, p. 704–15, 2008.

- MANSILLA, S.; BATALLER, M.; PORTUGAL, J. Mitotic catastrophe as a consequence of chemotherapy. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 6, n. 6, p. 589–602, 2006.
- MARCUS, A. I.; PETERS, U.; THOMAS, S. L.; et al. Mitotic kinesin inhibitors induce mitotic arrest and cell death in Taxol-resistant and -sensitive cancer cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 12, p. 11569–77, 2005.
- MARIOTTO, A. B.; YABROFF, K. R.; SHAO, Y.; FEUER, E. J.; BROWN, M. L. Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010–2020. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 103, n. 2, p. 117–28, 2011.
- MAYER, T. U. Small Molecule Inhibitor of Mitotic Spindle Bipolarity Identified in a Phenotype-Based Screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971–974, 1999.
- MAYER, T. U.; KAPOOR, T. M.; HAGGARTY, S. J.; et al. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. **Science**, v. 286, n. 5441, p. 971–4, 1999.
- MICALIZZI, D. S.; FARABAUGH, S. M.; FORD, H. L. Epithelial-mesenchymal transition in cancer: parallels between normal development and tumor progression. **Journal of mammary gland biology and neoplasia**, v. 15, n. 2, p. 117–34, 2010.
- MIKI, H.; OKADA, Y.; HIROKAWA, N. Analysis of the kinesin superfamily: insights into structure and function. **Trends in cell biology**, v. 15, n. 9, p. 467–76, 2005.
- MITCHISON, T. J. Polewards microtubule flux in the mitotic spindle: evidence from photoactivation of fluorescence. **The Journal of cell biology**, v. 109, n. 2, p. 637–52, 1989.
- MITCHISON, T.; KIRSCHNER, M. Dynamic instability of microtubule growth. **Nature**, v. 312, n. 5991, p. 237–42, 1984.
- MIYAMOTO, S.; KOLLMAN, P. A. Settle: An analytical version of the SHAKE and RATTLE algorithm for rigid water models. **Journal of Computational Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 952–962, 1992.
- MOREL, A.-P.; LIÈVRE, M.; THOMAS, C.; et al. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. **PloS one**, v. 3, n. 8, p. e2888, 2008.
- MORIMOTO, K.; KIM, S. J.; TANEI, T.; et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. **Cancer science**, v. 100, n. 6, p. 1062–8, 2009.
- MUELLER, S. C.; BROWN, R. M. The control of cellulose microfibril in the cell wall of higher plants. **Planta**, v. 154, p. 501–515. 1982.
- MUSACCHIO, A.; SALMON, E. D. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 8, n. 5, p. 379–93, 2007.

- NAOR, D.; WALLACH-DAYAN, S. B.; ZAHALKA, M. A.; SIONOV, R. V. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. **Seminars in cancer biology**, v. 18, n. 4, p. 260–7, 2008.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE, 2000. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast>
- NEHATE, C.; JAIN, S.; SANEJA, A.; et al. Paclitaxel Formulations: Challenges and Novel Delivery Options. **Current drug delivery**, 2014.
- NICKLAS, R. B. The forces that move chromosomes in mitosis. **Annual review of biophysics and biophysical chemistry**, v. 17, p. 431–49, 1988.
- O'BRIEN, C. A.; POLLETT, A.; GALLINGER, S.; DICK, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, v. 445, n. 7123, p. 106–10, 2007.
- OLTVAI, Z. N.; MILLIMAN, C. L.; KORSMEYER, S. J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 609–619, 1993.
- PARKIN, D. M.; PISANI, P.; FERLAY, J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. **International journal of cancer**, v. 80, n. 6, p. 827–41, 1999.
- PECE, S.; TOSONI, D.; CONFALONIERI, S.; et al. Biological and molecular heterogeneity of breast cancers correlates with their cancer stem cell content. **Cell**, v. 140, n. 1, p. 62–73, 2010.
- PEINADO, H.; MARIN, F.; CUBILLO, E.; et al. Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. **Journal of cell science**, v. 117, n. Pt 13, p. 2827–39, 2004.
- PEROU, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **The oncologist**, v. 16 Suppl 1, p. 61–70, 2011.
- PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–52, 2000.
- PETERS, T.; LINDENMAIER, H.; HAEFELI, W. E.; WEISS, J. Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 372, n. 4, p. 291–9, 2006.
- PHILCHENKOV, A.; ZAVELEVICH, M.; KROCZAK, T. J.; LOS, M. Caspases and cancer: mechanisms of inactivation and new treatment modalities. **Experimental oncology**, v. 26, n. 2, p. 82–97, 2004.
- PIERRES, M.; NAQUET, P.; BARBET, J.; et al. Evidence that murine hematopoietic cell subset marker J11d is attached to a glycosyl-phosphatidylinositol membrane anchor. **European journal of immunology**, v. 17, n. 12, p. 1781–5, 1987.

- POLLINA, E. A.; LEGESSE-MILLER, A.; HALEY, E. M.; et al. Regulating the angiogenic balance in tissues. **Cell cycle**, v. 7, n. 13, p. 2056–70, 2008.
- POLYAK, K.; WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 4, p. 265–73, 2009.
- PONTA, H.; SHERMAN, L.; HERRLICH, P. A. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 1, p. 33–45, 2003.
- PONTI, D. Isolation and In vitro Propagation of Tumorigenic Breast Cancer Cells with Stem/Progenitor Cell Properties. **Cancer Research**, v. 65, n. 13, p. 5506–5511, 2005.
- PRADOS, J.; MELGUIZO, C.; BOULAIZ, H.; MARCHAL, J. A.; ARÁNEGA, A. Cancer gene therapy: strategies and clinical trials. **Cellular and molecular biology**, v. 51, n. 1, p. 23–36, 2005.
- PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast cancer research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.
- PRAT, A.; PEROU, C. M. Mammary development meets cancer genomics. **Nature medicine**, v. 15, n. 8, p. 842–4, 2009.
- RAMOS, L. M.; GUIDO, B. C.; NOBREGA, C. C.; et al. The Biginelli reaction with an imidazolium-tagged recyclable iron catalyst: kinetics, mechanism, and antitumoral activity. **Chemistry**, v. 19, n. 13, p. 4156–68, 2013.
- RELLO-VARONA, S.; VITALE, I.; KEPP, O.; et al. Preferential killing of tetraploid tumor cells by targeting the mitotic kinesin Eg5. **Cell Cycle**, v. 8, n. 7, p. 1030–1035, 2009.
- RIBATTI, D. **Methods in Molecular Biology - Chapter 5**. Humana Press, 2012.
- RICARDO, S.; VIEIRA, A. F.; GERHARD, R.; et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **Journal of clinical pathology**, v. 64, n. 11, p. 937–46, 2011.
- RISINGER, A. L.; WESTBROOK, C. D.; ENCINAS, A.; et al. ELR510444 , A Novel Microtubule Disruptor with Multiple Mechanisms of Action. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 336, n. 3, p. 652–660, 2011.
- RONINSON, I. B.; BROUDE, E. V; CHANG, B. D. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. **Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 4, n. 5, p. 303–13, 2001.

- ROWINSKY, E. K.; CITARDI, M. J.; NOE, D. A.; DONEHOWER, R. C. Sequence-dependent cytotoxic effects due to combinations of cisplatin and the antimicrotubule agents taxol and vincristine. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 119, n. 12, p. 727–33, 1993.
- SAHAI, E. Illuminating the metastatic process. **Nature reviews. Cancer**, v. 7, n. 10, p. 737–49, 2007.
- SAKOWICZ, R.; FINER, J. T.; BERAUD, C.; et al. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. **Cancer Research**, v. 64, n. 9, p. 3276–3280, 2004.
- SAWIN, K. E.; LEGUELLEC, K.; PHILIPPE, M.; MITCHISON, T. J. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. **Nature**, v. 359, n. 6395, p. 540–3, 1992.
- SCHIFF, P. B.; HORWITZ, S. B. Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 77, n. 3, p. 1561–1565, 1980.
- SCHMALHOFER, O.; BRABLETZ, S.; BRABLETZ, T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. **Cancer metastasis reviews**, v. 28, n. 1-2, p. 151–66, 2009.
- SCHÜTTELKOPF, A. W.; AALTEN, D. M. F. VAN. PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes. **Acta crystallographica**, v. 60, n. Pt 8, p. 1355–63, 2004.
- SINGH, S. K.; HAWKINS, C.; CLARKE, I. D.; et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature**, v. 432, n. 7015, p. 396–401, 2004.
- SINGH, A.; SETTLEMAN, J. TEM, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v. 29, n. 34, p. 4741–51, 2010.
- SLAMON, D. J.; CLARK, G. M.; WONG, S. G.; et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177–82, 1987.
- SOMMERS, C. L.; BYERS, S. W.; THOMPSON, E. W.; TORRI, J. A.; GELMANN, E. P. Differentiation state and invasiveness of human breast cancer cell lines. **Breast cancer research and treatment**, v. 31, n. 2-3, p. 325–35, 1994.
- STEEG, P. S. Metastasis suppressors alter the signal transduction of cancer cells. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 1, p. 55–63, 2003.
- STERN, B. M.; MURRAY, A. W. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. **Current biology**, v. 11, n. 18, p. 1462–7, 2001.
- SUN, H.; JIA, J.; WANG, X.; et al. CD44+/CD24- breast cancer cells isolated from MCF-7 cultures exhibit enhanced angiogenic properties. **Clinical & translational oncology**, v. 15, n. 1, p. 46–54, 2012.

- TAM, W. L.; LU, H.; BUIKHUISEN, J.; et al. Protein kinase C α is a central signaling node and therapeutic target for breast cancer stem cells. **Cancer cell**, v. 24, n. 3, p. 347–64, 2013.
- TANEI, T.; MORIMOTO, K.; SHIMAZU, K.; et al. Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. **Clinical cancer research**, v. 15, n. 12, p. 4234–41, 2009.
- TAO, W.; SOUTH, V. J.; ZHANG, Y.; et al. Induction of apoptosis by an inhibitor of the mitotic kinesin KSP requires both activation of the spindle assembly checkpoint and mitotic slippage. **Cancer cell**, v. 8, n. 1, p. 49–59, 2005.
- TAWFIK, H. A.; BASSYOUNI, F.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; ABO-ZEID, M. A.; EL-HAMOULY, W. S. Tumor anti-initiating activity of some novel. **Pharmacological Reports**, p. 1153–1162, 2009.
- TCHERNIUK, S.; LIS, R. VAN; KOZIELSKI, F.; SKOUFIAS, D. A. Mutations in the human kinesin Eg5 that confer resistance to monastrol and S-trityl- L -cysteine in tumor derived cell lines. **Biochemical Pharmacology**, v. 79, p. 864–872, 2010.
- THIERY, J. P.; ACLOQUE, H.; HUANG, R. Y. J.; NIETO, M. A. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell**, v. 139, n. 5, p. 871–90, 2009.
- VAKIFAHMETOGLU, H.; OLSSON, M.; ZHIVOTOVSKY, B. Death through a tragedy: mitotic catastrophe. **Cell death and differentiation**, v. 15, n. 7, p. 1153–62, 2008.
- VALE, R. D.; FLETTERICK, R. J. The design plan of kinesin motors. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 13, p. 745–77, 1997.
- VALE, R. D.; MILLIGAN, R. A. The way things move: looking under the hood of molecular motor proteins. **Science**, v. 288, n. 5463, p. 88–95, 2000.
- VAN'T VEER, L. J. VAN; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530–6, 2002.
- VALENTINE, M. T.; FORDYCE, P. M.; KRZYSIAK, T. C.; GILBERT, S. P.; BLOCK, S. M. Individual dimers of the mitotic kinesin motor Eg5 step processively and support substantial loads in vitro. **Nature cell biology**, v. 8, n. 5, p. 470–6, 2006.
- VALENTINE, M. T.; FORDYCE, P. M.; BLOCK, S. M. Eg5 steps it up! **Cell division**, v. 1, p. 31, 2006.

- VALENTINE, M. T.; GILBERT, S. P. To step or not to step? How biochemistry and mechanics influence processivity in Kinesin and Eg5. **Current opinion in cell biology**, v. 19, n. 1, p. 75–81, 2007.
- VITALE, I.; GALLUZZI, L.; CASTEDO, M.; KROEMER, G. Mitotic catastrophe: a mechanism for avoiding genomic instability. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 12, n. 6, p. 385–92, 2011.
- VLERKEN, L. E. VAN; DUAN, Z.; LITTLE, S. R.; SEIDEN, M. V; AMIJI, M. M. articles Biodistribution and Pharmacokinetic Analysis of Paclitaxel and Ceramide Administered in Multifunctional Polymer-Blend Nanoparticles in Drug Resistant Breast Cancer Model. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 2, p. 48–58, 2008.
- VRIZ, S.; REITER, S.; GALLIOT, B. Cell death: a program to regenerate. **Current topics in developmental biology**, v. 108, p. 121–51, 2014.
- WANG, N.; SWITALSKA, M.; WU, M.-Y.; et al. Synthesis and in vitro cytotoxic effect of 6-amino-substituted 11H- and 11Me-indolo[3,2-c]quinolines. **European journal of medicinal chemistry**, v. 78C, p. 314–323, 2014.
- WEIL, D.; GARÇON, L.; HARPER, M.; et al. Targeting the kinesin Eg5 to monitor siRNA transfection in mammalian cells. **BioTechniques**, v. 33, n. 6, p. 1244–8, 2002.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Cancer Report, 2008**. International Agency for Research on Cancer, Lyon. 2009.
- WITTMANN, T.; HYMAN, A.; DESAI, A. The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. **Nature cell biology**, v. 3, n. 1, p. E28–34, 2001.
- WOLANIN, K.; MAGALSKA, A.; MOSIENIAK, G.; et al. Curcumin affects components of the chromosomal passenger complex and induces mitotic catastrophe in apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing cells. **Molecular cancer research**, v. 4, n. 7, p. 457–69, 2006.
- WORDEMAN, L. How kinesin motor proteins drive mitotic spindle function: Lessons from molecular assays. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 21, n. 3, p. 260–8, 2010.
- YANG, H.; GANGULY, A.; CABRAL, F. Inhibition of Cell Migration and Cell Division Correlate with Distinct Effects of Microtubule Inhibiting Drugs. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32242–32250. 2010.
- YANG, J.; WEINBERG, R. A. Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis. **Developmental cell**, v. 14, n. 6, p. 818–29, 2008.

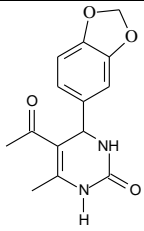
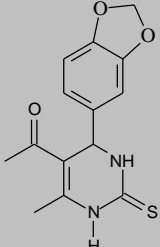
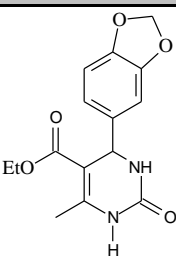
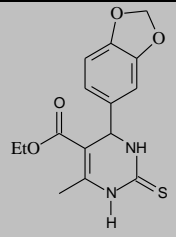
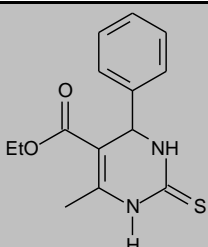
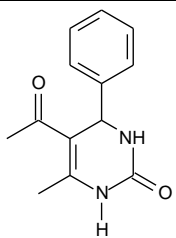
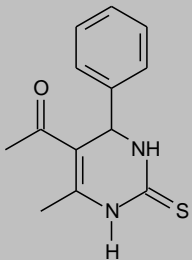
YIN, H.; GLASS, J. The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. **PloS one**, v. 6, n. 9, p. e24080, 2011.

ZAKARIA, S.; GAMAL-ELDEEN, A. M.; EL-DALY, S. M.; SALEH, S. Synergistic Apoptotic Effect of Doxil® and Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy on Human Breast Adenocarcinoma Cells. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 11, n. 2, p. 227-238, 2014.

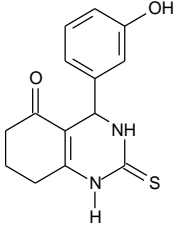
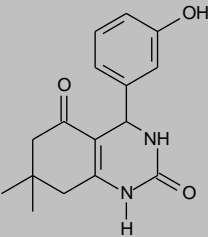
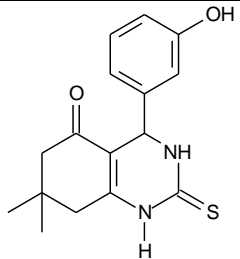
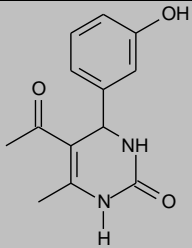
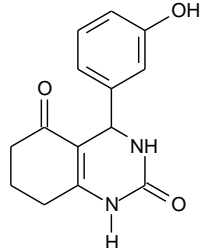
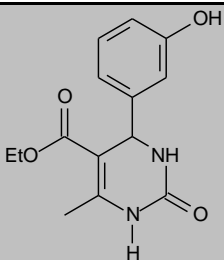
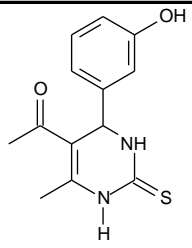
11. ANEXOS

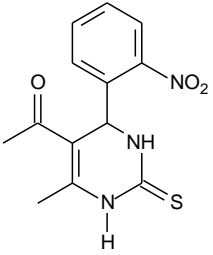
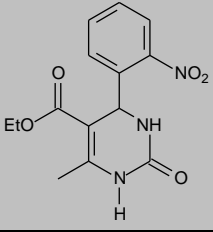
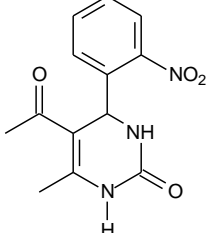
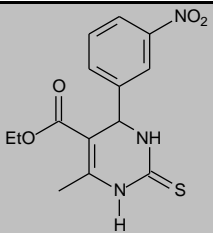
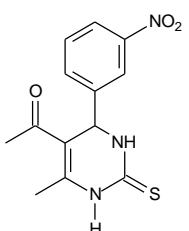
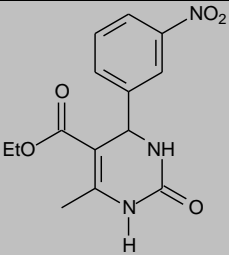
11.1. ANEXO I

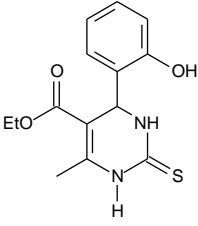
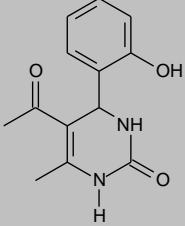
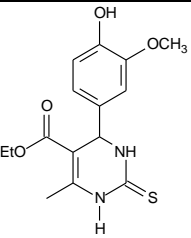
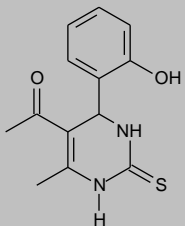
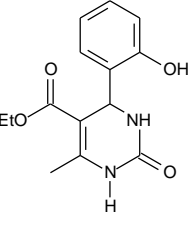
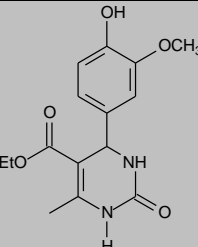
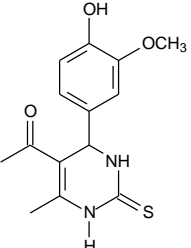
Tabela dos trinta e sete derivados da 3,4-dihidropirimidinona utilizados no trabalho

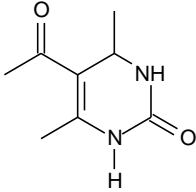
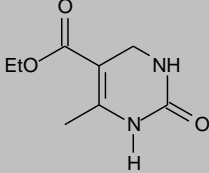
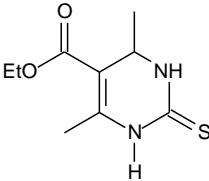
DHPM com piperaldeído			
Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar
4bn	$C_{14}H_{14}N_2O_4$		274.28
4bp	$C_{14}H_{14}N_2O_3S$		290.34
4bm	$C_{15}H_{16}N_2O_5$		304.30
4bo	$C_{15}H_{16}N_2O_4S$		320.36
DHPM com benzaldeído			
4d	$C_{14}H_{16}N_2O_2S$		276.35
4c	$C_{13}H_{14}N_2O_2$		230.27
4e	$C_{13}H_{14}N_2OS$		246.33

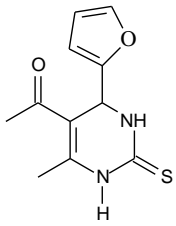
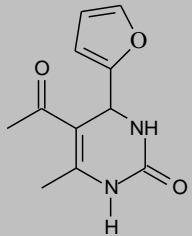
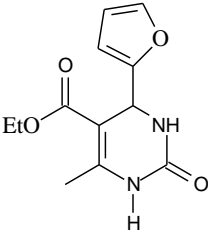
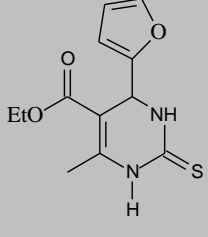
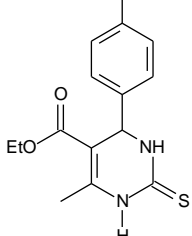
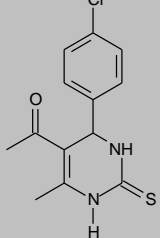
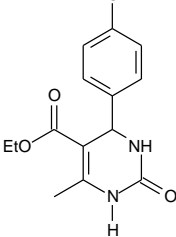
DHPM com 3-hidroxi-benzaldeído

Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar
4br	$C_{14}H_{14}N_2O_2S$		274.34
4bs	$C_{16}H_{18}N_2O_3$		286.36
4bt	$C_{16}H_{18}N_2O_2S$		302.39
4k	$C_{13}H_{14}N_2O_3$		246.27
4bq	$C_{14}H_{14}N_2O_3$		258.28
4j	$C_{14}H_{16}N_2O_4$		276.29
4m	$C_{13}H_{14}N_2O_2S$		262.33

DHPM com 2 ou 3-nitro-benzaldeído			
Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar
4z	$C_{13}H_{13}N_3O_3S$		291.32
4v	$C_{14}H_{15}N_3O_5$		305.29
4x	$C_{13}H_{13}N_3O_4$		275.23
4t	$C_{14}H_{15}N_3O_4S$		321.35
4u	$C_{13}H_{13}N_3O_3S$		291.32
4r	$C_{14}H_{15}N_3O_5$		305.29

DHPM com 2-hidroxi ou 4-hidroxi-3-metóxi-benzaldeído			
Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar
4p	$C_{14}H_{16}N_2O_3S$		292.35
4o	$C_{13}H_{14}N_2O_3$		246.27
4bc	$C_{15}H_{18}N_2O_4S$		322.38
4q	$C_{13}H_{14}N_2O_2S$		262.33
4n	$C_{14}H_{16}N_2O_4$		276.29
4ba	$C_{15}H_{18}N_2O_5$		306.32
4bd	$C_{14}H_{16}N_2O_3S$		292.35

DHPM com formaldeído ou acetaldeído			
Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar
4bj	$C_8H_{12}N_2O_2$		168.20
4be	$C_8H_{12}N_2O_3$		184.19
4bk	$C_9H_{14}N_2O_2S$		214.28

DHPMs com furfuraldeído ou 4-cloro-benzaldeído			
Composto	Fórmula Molecular	Fórmula Estrutural	Massa Molar
4bv	$C_{11}H_{12}N_2O_2S$		236.29
4by	$C_{11}H_{12}N_2O_3$		220.23
4bu	$C_{12}H_{14}N_2O_4$		250.25
4bx	$C_{12}H_{14}N_2O_3S$		263.31
4h	$C_{14}H_{15}ClN_2O_2S$		310.80
4i	$C_{13}H_{13}ClN_2OS$		280.77
4f	$C_{14}H_{15}ClN_2O_3$		294.74

11.2. ANEXO II

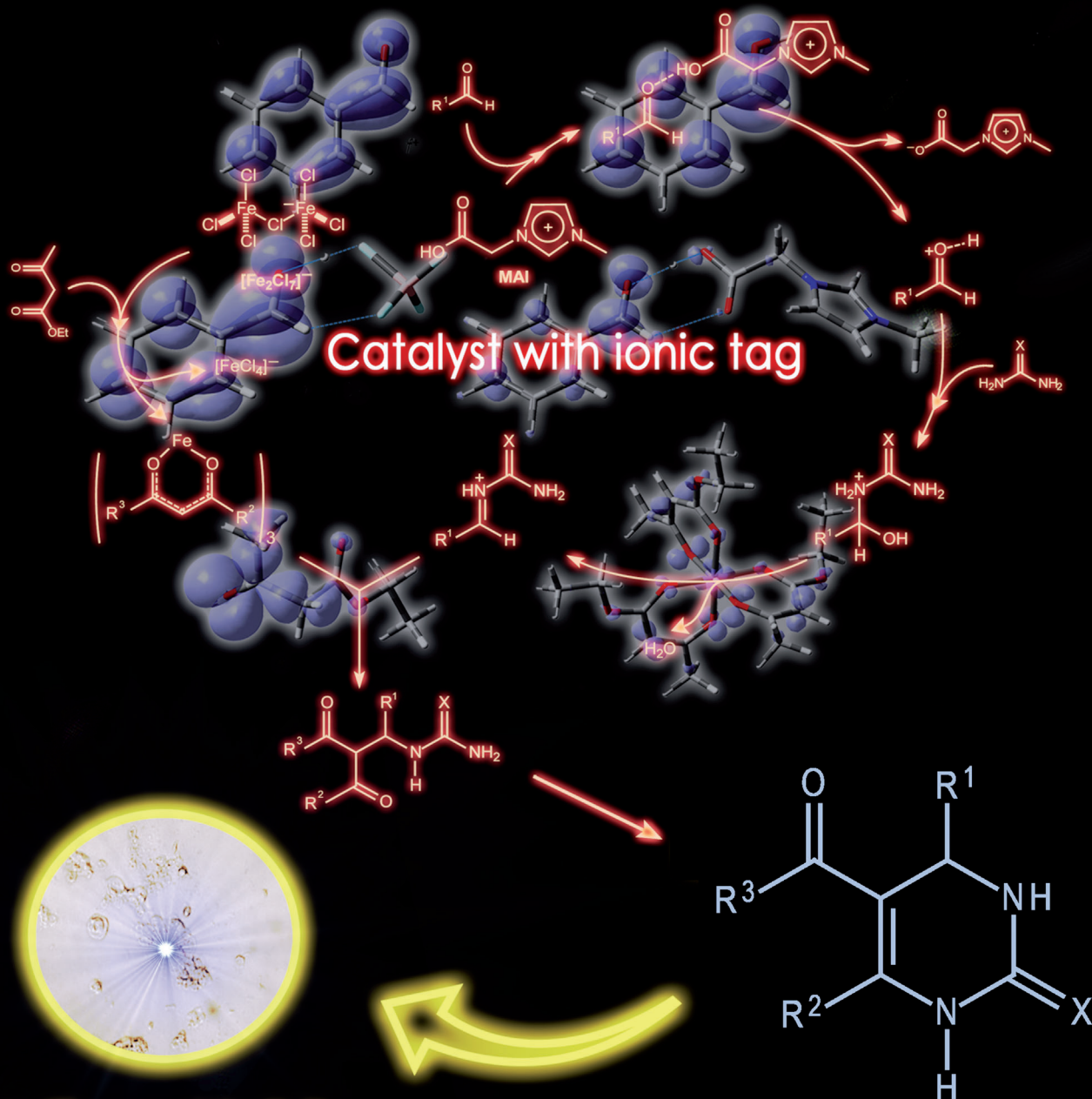
ARTIGO CIENTÍFICO:

**The Biginelli Reaction with an Imidazolium–Tagged Recyclable Iron
Catalyst: Kinetics, Mechanism, and Antitumoral Activity**

The Biginelli Reaction with an Imidazolium-Tagged Recyclable Iron Catalyst: Kinetics, Mechanism, and Antitumoral Activity

Luciana M. Ramos,^[a] Bruna C. Guido,^[a] Catharine C. Nobrega,^[a] José R. Corrêa,^[a]
Rafael G. Silva,^[b, c] Heibbe C. B. de Oliveira,^[a] Alexandre F. Gomes,^[d]
Fábio C. Gozzo,^[d] and Brenno A. D. Neto^{*[a]}

BIGINELLI REACTIONS IN IONIC LIQUIDS



Antitumoral Activity

Abstract: The present work describes the synthesis, characterization, and application of a new ion-tagged iron catalyst. The catalyst was employed in the Biginelli reaction with impressive performance. High yields have been achieved when the reaction was carried out in imidazolium-based ionic liquids (BMI·PF₆, BMI·NTf₂, and BMI·BF₄), thus showing that the ionic-liquid effects play a role in the reaction. Moreover, the ion-tagged catalyst could be recovered and reused up to eight times

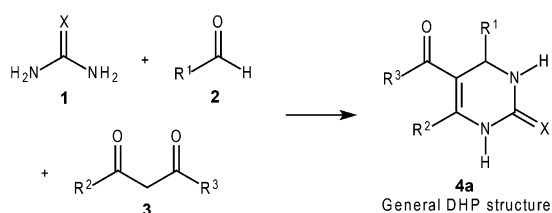
without any noticeable loss in activity. Mechanistic studies performed by using high-resolution electrospray-ionization quadrupole-time-of-flight mass (HR-EI-QTOF) spectrometry and kinetic experiments indicate only one reaction pathway and rule out the other two

Keywords: density functional calculations • ionic liquids • iron • mass spectrometry • multicomponent reactions • NMR spectroscopy

possibilities under the development conditions. The theoretical calculations are in accordance with the proposed mechanism of action of the iron catalyst. Finally, the 37 dihydropyrimidinone derivatives, products of the Biginelli reaction, had their cytotoxicity evaluated in assays against MCF-7 cancer cell linages with encouraging results of some derivatives, which were virtually non-toxic against healthy cell linages (fibroblasts).

Introduction

The multicomponent reaction (MCR) named the Biginelli reaction (Scheme 1), originally discovered by Pietro Biginelli,^[1] is one of the most elegant methodologies used for the synthesis of dihydropyrimidinones (DHPs). The great inter-



Scheme 1. The Biginelli reaction for dihydropyrimidinone (4) synthesis.

est in DHPs stems from the fact that this class of compounds and their derivatives has, in principle, pronounced biological activity.^[2] As a consequence, many catalytic methodologies have been developed to improve the synthesis of this attractive family of compounds, as very recently reviewed.^[3] Their biological properties include antitubercular,^[4] antifungal,^[5] antimicrobial,^[6] antimitotic,^[7] and anticancer,^[8] amongst others.^[9]

Ionic liquids (ILs) are commonly used as very efficient reaction media to support a plethora of catalysts (i.e., enzymes, organic catalysts, organometallic complexes, etc.).^[10] In fact, ILs (especially those based on the imidazolium cation, Figure 1) are regarded as desirable solvents for MCRs with a positive synergy towards eco-compatible heterocyclic synthesis.^[11] For instance, some derivatives have been synthesized by using ultrasound irradiation when dissolved in ILs with yields ranging from reasonable to excellent.^[12] Dicationic acid ILs have also been successfully used to promote the Biginelli reaction.^[13] Sulfonic acid-containing ILs have been employed as catalysts in the synthesis of DHPs derivatives.^[14] There is no doubt about the potential of ILs as an attractive alternative to classic organic solvents to perform the Biginelli reaction,^[15] whether they acting as media or as catalysts (or both) for the MCR. Surprisingly, ionic-liquid effects themselves have not been adequately exploited regarding MCR, and investigations into the mechanism of action of these salts in organic reactions are limited. Very recently, we have demonstrated the importance of the IL as the reaction medium for the Biginelli reaction and its role in the formation and stabilization of some new reactive intermediates.^[16]

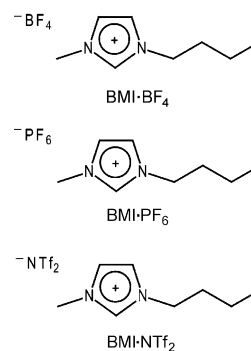


Figure 1. Imidazolium-based ionic liquids commonly used for catalytic reactions.

[a] Dr. L. M. Ramos, B. C. Guido, C. C. Nobrega, Dr. J. R. Corrêa, Dr. H. C. B. de Oliveira, Prof. B. A. D. Neto
Laboratory of Medicinal and Technological Chemistry
University of Brasilia (IQ-UnB)
Campus Universitário Darcy Ribeiro
CEP 70904970, P.O.Box 4478
Brasilia-DF (Brazil)
Fax: (+55) 61-32734149
E-mail: brenno.ipi@gmail.com

[b] Dr. R. G. Silva
Department of Biochemistry
Albert Einstein College of Medicine
of Yeshiva University
Bronx, NY (USA)

[c] Dr. R. G. Silva
Present address: Center for Chemistry
Innovation and Excellence
Pfizer Inc., Groton, CT 06340 (USA)

[d] A. F. Gomes, Prof. F. C. Gozzo
Institute of Chemistry
University of Campinas (Unicamp)
Campinas, SP (Brazil)

Supporting information for this article (including full experimental description, synthesis, kinetics plot, energy and thermal corrections for all the calculated structures) is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/chem.201204314>.

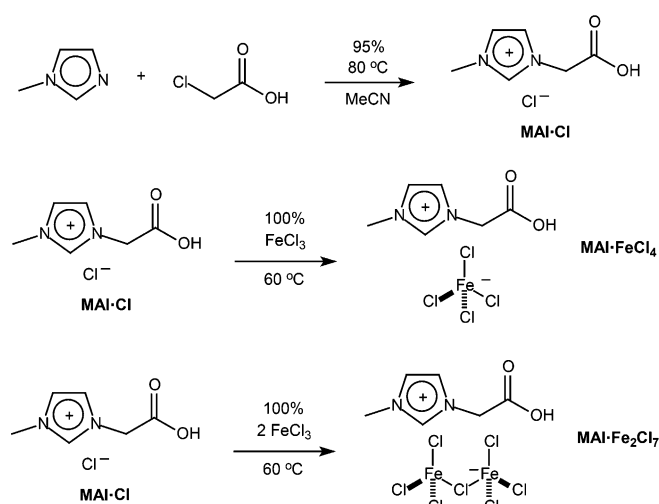
Due to the possibility of charged and polar intermediates in the Biginelli reaction pathways, it is reasonable to envisage ion-pairing formation of those species with ionic components (cations and anions), thus accelerating the product formation by lowering the activation barrier in the presence of ILs^[17] when compared with reactions carried out in classical organic solvents. In other words, it is the so-called ionic-liquid effect.

Despite advances observed in the scientific literature to perform the Biginelli MCR,^[18] there are still many questions to be answered and improvements to be achieved.^[19] For example, the Biginelli mechanism is still under debate, with no consensus reached about the preferred pathway. Because there seems to be supporting evidence for the three mechanistic proposals depicted in Scheme 3 (see later), with many intermediates proposed, the discussion surrounding the mechanism of the Biginelli reaction is highly controversial. In the 1930s it was proposed that urea addition to the aldehyde was a key step for the synthesis of DHPs.^[20] The Knoevenagel mechanism was later invoked.^[21] Kappe then re-examined the Biginelli mechanism^[22] and found that the experimental evidence aligned with an iminium-like mechanism. Due to our interest in the development of new ion-tagged catalysts^[23] in reaction mechanism investigations,^[24] in ionic-liquid effects on catalysis,^[25] and on MCR reactions,^[16] we describe herein the synthesis, characterization, and application of a new ion-tagged recyclable iron catalyst to the Biginelli reaction. Mass spectrometry, kinetics, and density functional theory are employed to investigate the mechanism by which the Biginelli reaction proceeds in the presence of the catalyst. In addition, the antitumoral activity of selected DHP derivatives synthesized in this work is described.

Results and Discussion

Catalyst synthesis and characterization: Aiming at a more efficient support in the selected reaction media and envisaging catalyst recyclability, two new ion-tagged iron catalysts were synthesized (Scheme 2). The choice of iron as the metal with the ionophilic ligand is compatible with green and sustainable processes. The ion-tagged catalyst would also allow an efficient support in the ionic media, thus improving the solubility/stability^[26] of the catalyst and its electrostatic activation^[27] favoring the ionic-liquid effect, that is, an auto-organization forming well-ordered nano-organized structures,^[28] as discussed below. Moreover, ILs are regarded as promising candidates for green and sustainable processes.^[29] Hence, this unique combination of ILs and ion-tagged iron catalysts is expected to be a powerful combination towards eco-friendly catalytic processes.

The ionophilic ligand (**MAI-Cl**) was obtained as previously described.^[30] **MAI-Cl** was directly treated with FeCl_3 , affording the new catalysts in quantitative yields (**MAI-FeCl₄** and **MAI-Fe₂Cl₇**). Both catalysts were characterized by high-resolution electrospray-ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-QTOF-MS and MS/MS) (Figure 2).



Scheme 2. Synthesis of the two ion-tagged iron catalysts.

Notably, in the gas phase, the anion $[\text{Fe}_2\text{Cl}_7]^-$ from **MAI-Fe₂Cl₇** loses neutral FeCl_3 forming the anion $[\text{FeCl}_4]^-$. It has been recently demonstrated that in the presence of $[\text{FeCl}_4]^-$, additional quantities of FeCl_3 forces the formation of $[\text{Fe}_2\text{Cl}_7]^-$.^[31]

Catalyst performance: Traditional conditions for the Biginelli reaction commonly require large excess of one of the reagents, large amounts of catalyst, high temperatures, several hours of reaction, and occasionally the presence of a co-catalyst.^[32] In an attempt to find milder conditions, the activities of the new catalysts were tested in several organic solvents and ILs. The reaction of urea (3.00 mmol), benzaldehyde (3.00 mmol), and ethyl acetoacetate (3 mmol) in the presence of either **MAI-FeCl₄** (10 mol %) or **MAI-Fe₂Cl₇** (10 mol %) at 80 °C for 1 h was used as a model reaction. The results are summarized in Table 1.

As seen in Table 1, **MAI-Fe₂Cl₇** is more active than **MAI-FeCl₄** in all cases. This reaction has already been described with FeCl_3 as the promoter,^[33] and it required large excess of one of the reagents (urea), iron (30 mol), additional catalytic amounts of HCl, and at least four hours to achieve reasonable yields. In the absence of solvent (Table 1, entries 1 and 2) the yields were comparable to reactions carried out in the presence of classical solvents (Table 1, entries 3–14). Conversely, reactions carried out in ionic media (Table 1, Entries 15–22) provided higher yields than those performed in organic solvents, except entries 15 and 16. To improve the results, we optimized the reaction conditions by using **MAI-Fe₂Cl₇** as the catalyst and the IL BMI BF_4 as the reaction medium (Table 1, entry 21). BMI- PF_6 resulted in the same yield as BMI- BF_4 (Table 1, entries 19 and 20), but the reaction medium turned dark, most probably due to anion degradation, as previously reported.^[34] It has been reported that hexafluorophosphate (PF_6^-) degradation may be more pronounced in reactions involving metals, which can catalyze this decomposition.^[35]

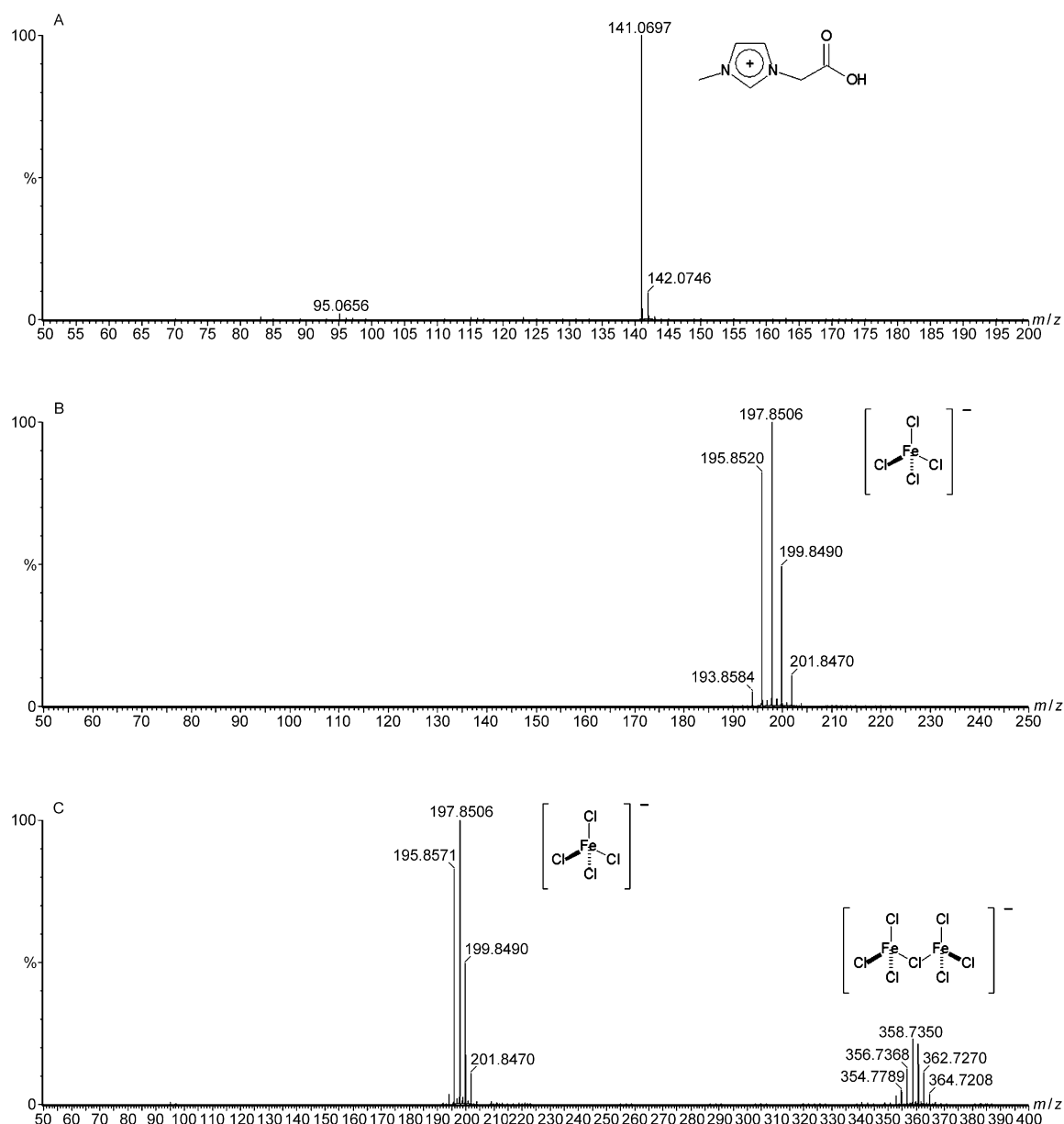
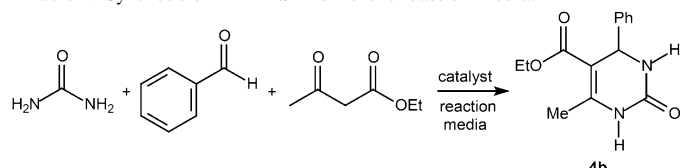


Figure 2. A) ESI-QTOF of the cation. B) ESI(-)-QTOF of the anion $[\text{FeCl}_4]^-$ from $\text{MAI}\cdot\text{FeCl}_4$ and C) ESI(-)-QTOF of the anion $[\text{Fe}_2\text{Cl}_7]^-$ from $\text{MAI}\cdot\text{Fe}_2\text{Cl}_7$. Note that both catalysts have the same cation of $m/z = 141$ Da.

The effect of temperature on the reaction yield was investigated with the model reaction by using $\text{BMI}\cdot\text{BF}_4$ as the reaction media and $\text{MAI}\cdot\text{Fe}_2\text{Cl}_7$ as the catalyst (Figure 3), and the best yields were achieved at 80°C . The catalyst concentration also affected the reaction yield (Figure 4); the catalyst is prone to concentration-dependent yields due to the imidazolium moiety (catalyst aggregation effect), which probably explains the decrease in yield when the catalyst concentration is above 5 mol%. Overall, yields of up to 75% are obtained with equimolar amounts of reagents, low catalyst concentration, and moderate temperature, presenting significant improvements in the synthesis of DHP.

Kinetics: To shed light on the preferred mechanism of the Biginelli reaction catalyzed by $\text{MAI}\cdot\text{Fe}_2\text{Cl}_7$, the kinetics of product formation was analyzed for different reactant ratios (Figure S1, the Supporting Information). The observed rate constant (k_{obs}) was independent of the number of benzaldehyde or ethyl acetoacetate, but clearly decreased with excess urea (Figure 5). These observations are compatible with the iminium mechanism (Scheme 3), as excess of urea would displace the equilibrium between **b** and **c** towards the latter, and the rate of reversal of this equilibrium would contribute significantly to the overall rate of product formation. The enamine and Knoevenagel routes do not seem to provide a rationale for the decrease in k_{obs} with an excess of urea.

Table 1. Synthesis of DHP **4b** in different reaction media.^[a]


Entry	Reaction media	Catalyst	Yield [%]
1	–	MAI-Fe₂Cl₇	26
2	–	MAI-FeCl₄	14
3	H ₂ O	MAI-Fe₂Cl₇	≈ 1
4	H ₂ O	MAI-FeCl₄	≈ 1
5	CH ₂ Cl ₂	MAI-Fe₂Cl₇	12
6	CH ₂ Cl ₂	MAI-FeCl₄	6
7	benzene	MAI-Fe₂Cl₇	5
8	benzene	MAI-FeCl₄	1
9	MeCN	MAI-Fe₂Cl₇	27
10	MeCN	MAI-FeCl₄	1
11	MeOH	MAI-Fe₂Cl₇	39
12	MeOH	MAI-FeCl₄	26
13	EtOH	MAI-Fe₂Cl₇	38
14	EtOH	MAI-FeCl₄	25
15	BMI-Cl	MAI-Fe₂Cl₇	19
16	BMI-Cl	MAI-FeCl₄	14
17	BMI-NTf ₂	MAI-Fe₂Cl₇	40
18	BMI-NTf ₂	MAI-FeCl₄	26
19	BMI-PF ₆	MAI-Fe₂Cl₇	46
20	BMI-PF ₆	MAI-FeCl₄	42
21	BMI-BF ₄	MAI-Fe₂Cl₇	46
22	BMI-BF ₄	MAI-FeCl₄	42

[a] All reactions were conducted at 80 °C over a period of 1 h with a catalyst load of 10 mol% and 3 mmol of each reagent added to 1 mL of solvent (or ionic liquid). Yields refer to the isolated product.

The time course for product formation is sigmoidal except when urea is in excess (the Supporting Information, Figure S1). This type of behavior is characteristic of autocatalysis; however, the proposed mechanisms do not readily pro-

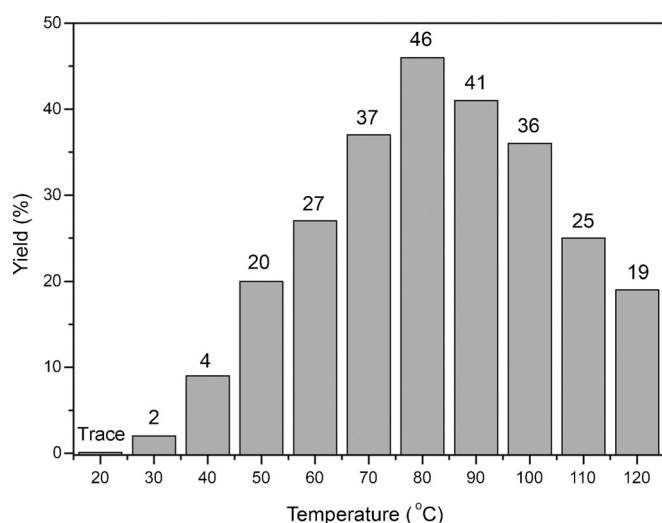


Figure 3. Temperature effect on the yield of the Biginelli reaction catalyzed by **MAI-Fe₂Cl₇** (10 mol%) in BMI-BF₄ (1 mL).

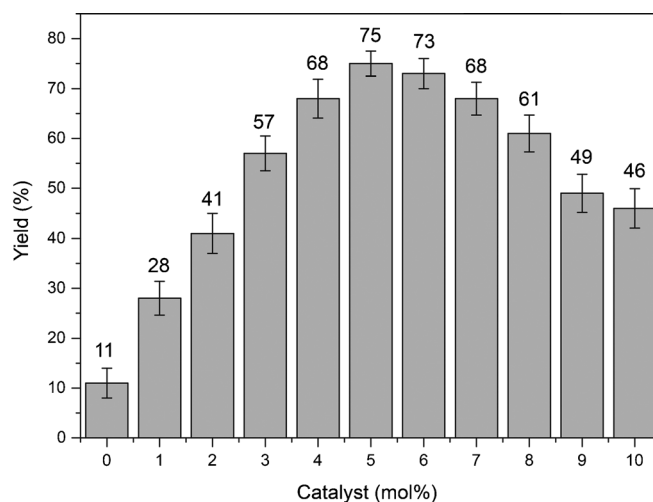


Figure 4. Effect of **MAI-Fe₂Cl₇** concentration on the Biginelli reaction in BMI-BF₄ (1 mL) at 80 °C. Bars represent the mean ± standard deviation of seven replicates for each concentration.

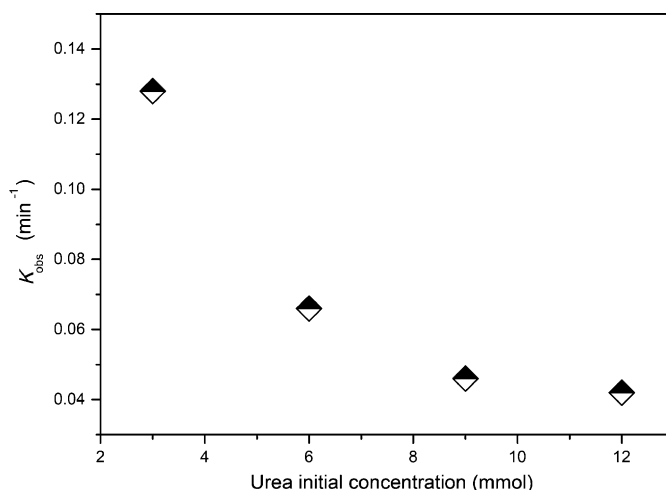
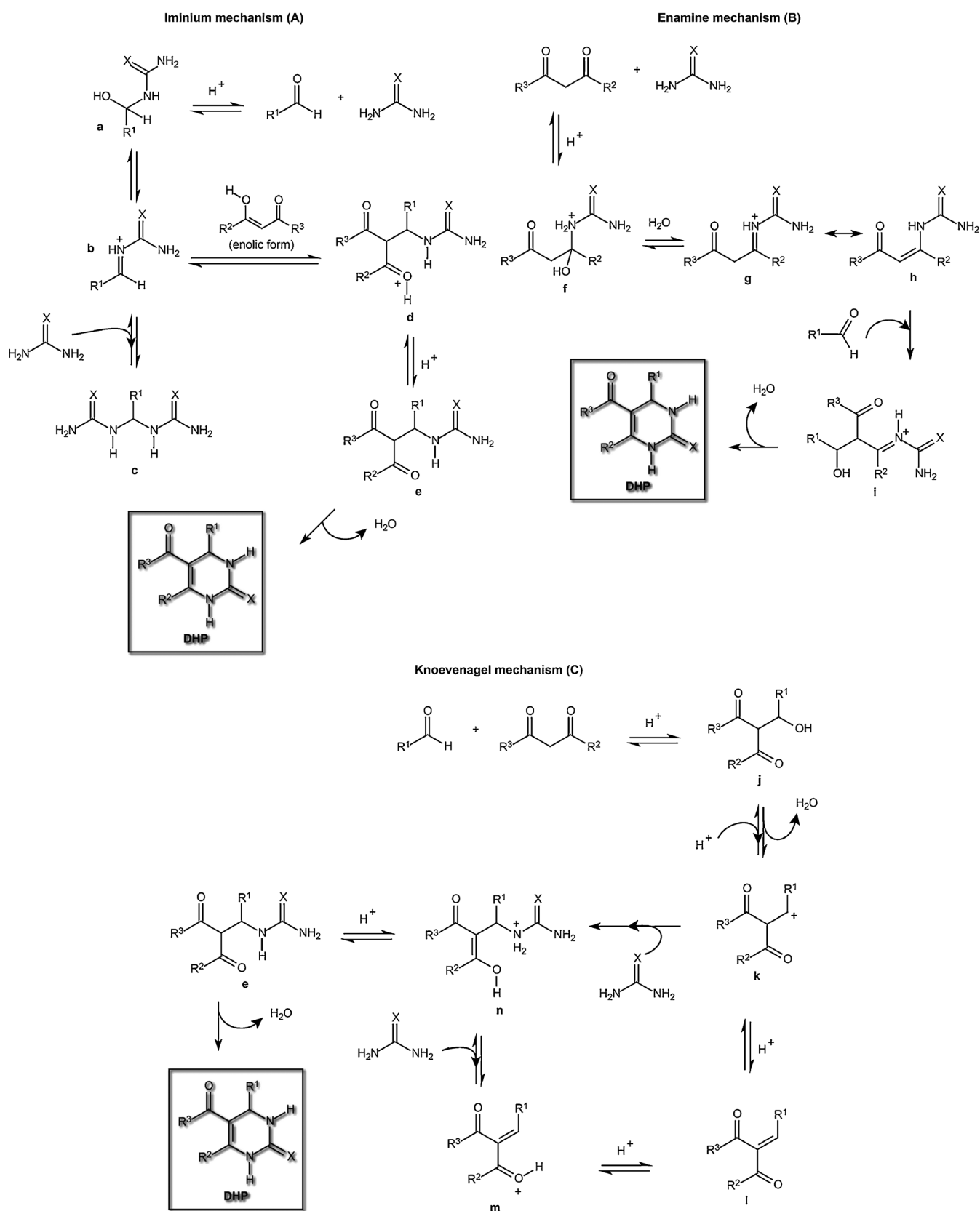


Figure 5. Dependence of k_{obs} on urea.

vide an explanation for it. If we consider that the product precipitates in the reaction media, thus leaving the reactive phase, the equilibrium is displaced towards the product formation with a similar effect as in autocatalyzed reactions. This effect is reflected by the sigmoidal curves for most of the experiments. Nevertheless, with an excess of urea, the reaction yield decreases as a consequence of favoring a second addition to the iminium intermediate **a**. Under this situation, the normal course of the reaction (product formation) is no longer favored, rather the formation of **c** (second urea addition to **a**), thus the plot seems more like an exponential curve.

With all kinetics data and bearing the three mechanisms in mind (see Scheme 3), it was possible to make some important mechanistic inferences:

- 1) The iminium-based mechanism seems to be the more appropriate to explain the obtained data.



Scheme 3. Three proposed mechanisms for the Biginelli reaction, namely, iminium (A), enamine (B), and Knoevenagel (C) mechanisms. Several charged and polar intermediates are invoked (a–n).

- 2) Excess aldehyde favors the equilibrium to form intermediate **b** and avoids the second urea addition, which would lead to intermediate **c** formation (see Scheme 3). This issue is reflected in an augmentation of the yield with excess aldehyde.
- 3) Excess urea has a direct effect on the k_{obs} (slowing the reaction) favoring intermediate **b** formation, but the yield decreases (see Figure 5) mostly probably due to a second urea addition to the recently formed intermediate **b**. Above 9.00 mmol of urea the k_{obs} has no significant change in their values and it became a zero order for this reagent since it would be necessary the presence of additional quantities of benzaldehyde to consume it.
- 4) All kinetics data are not coherent whether evaluated based on the enamine mechanism or the Knoevenagel mechanism.
- 5) Excess aldehyde should not increase the reaction yield for the enamine mechanism, however it should increase with an excess of ethyl acetoacetate; and this effect was not observed with an excess of ethyl acetoacetate (see Scheme 3).
- 6) Excess urea excess should not have a direct influence on the k_{obs} considering the Knoevenagel mechanism because intermediate **k** (a carbocation) is very reactive and would be prompt trapped by urea (even at low concen-

trations); thus urea concentration is not the limitation for the Knoevenagel mechanism (see Scheme 3).

Based on the kinetics data it is more than reasonable to support the iminium mechanism as the preferred path under the developed conditions and to discard both the enamine and the Knoevenagel mechanisms. Indeed, all results described herein points firmly to the iminium mechanism as the correct one. To be sure on the mechanism of action of **MAI-Fe₂Cl₇** as the catalyst, mass spectrometry analyses and theoretical calculations were also conducted.

Mass spectrometric and NMR spectroscopic analyses: ESI-QTOF-MS and MS/MS analyses were conducted to further probe the Biginelli reaction catalyzed by **MAI-Fe₂Cl₇**. Samples from a mixture of all reagents (3 mmol each and 5 mol% of the catalyst at 80°C) were directly injected and analyzed after 10, 30, 60, and 120 min with no significant difference in the MS spectra. Since the catalyst has a charge-tag in its structure, it was necessary to dilute the samples to form 100 μM solutions to avoid any signal suppression by the imidazolium moiety. By monitoring the reaction in acetonitrile solutions with in-line direct infusion ESI(+)-QTOF-MS(/MS), we were able to detect ions that were then structurally characterized by product ion spectrum experiments

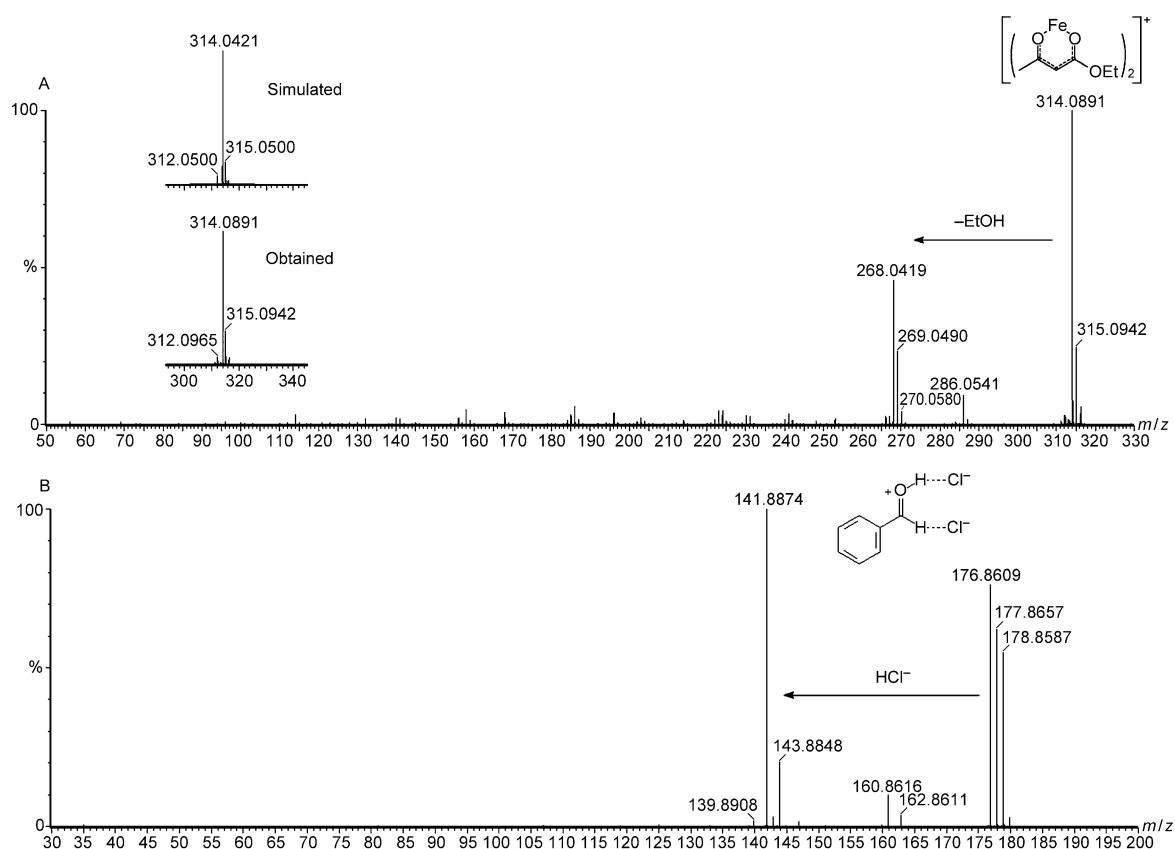
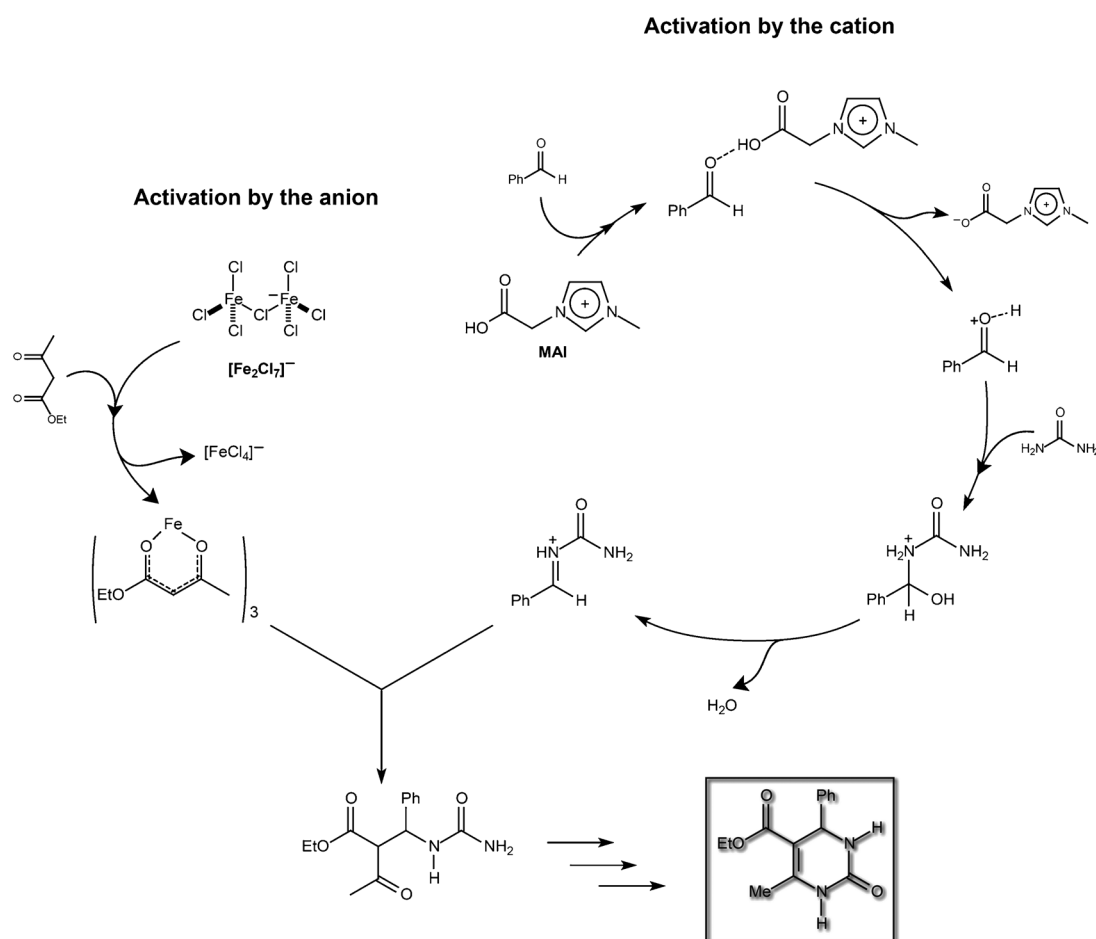
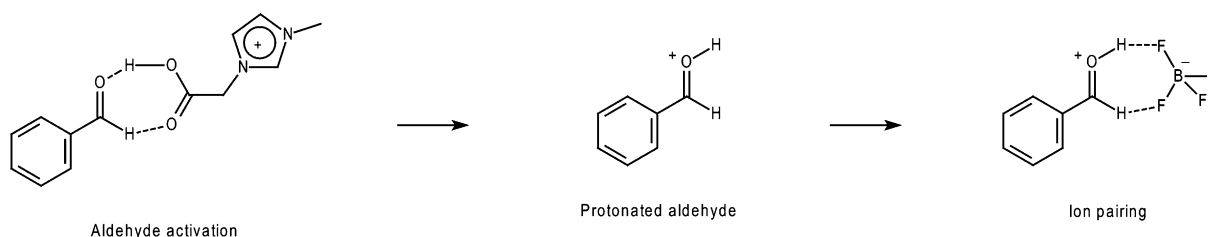


Figure 6. A) ESI(+)-QTOF product ion spectrum of iron-containing isotopologues of m/z ranging from 312 to 316. B) ESI(-)-QTOF product ion spectrum of isotopologues of $m/z = 176$ and 178.



Scheme 4. Proposed catalytic mechanism promoted by **MAI-Fe₂Cl₇**, in which both the anion (iron complex) and the cation (imidazolium) moieties play a role in promoting the reaction. Note that this proposed mechanism is compatible with the iminium mechanism for the Biginelli reaction.



Scheme 5. Aldehyde activation by the cation **MAI** and ionic-liquid effect (ion-pairing formation) in **BMI·BF₄**.

(Figure 6). A mechanism is proposed based on these findings (Scheme 4).

The Brønsted acid in the cation structure of **MAI** is responsible for the aldehyde carbonyl activation, similar to the mechanism by using 1-butyl-3-methylimidazolium derivatives as first proposed by the group of Dupont,^[36] and followed by Yadav^[37] and Raval.^[38] The anion Fe_2Cl_7^- , a strong Lewis acid, is responsible for the in situ formation of the nucleophilic complex $\text{Fe}(\text{acac})_3$, which in turn reacts with the iminium intermediate. $\text{Fe}(\text{acac})_3$ is a better nucleophile than free ethyl acetoacetate, and, therefore, the dual activation promoted by the **MAI-Fe₂Cl₇** explains the superior efficiency of the ion-tagged iron catalyst.

It should be pointed out that ESI has already been used to study the Biginelli reaction promoted by a strong Brønsted acid (10 mol %) with the same reagents used herein.^[39] In that report, the protonated intermediates shown in Scheme 3 were observed, such as **b**, **c**, **d**, and **e** from the iminium pathway. From the Knoevenagel mechanism, the protonated intermediates **j** and **l** were detected after reaction times of 2 and 24 h, respectively. In the present study, only intermediates arising from the iminium mechanism, **b**, **d**, and **e** were detected (data not shown). We failed to detect the protonated intermediate **c** or any derivative of it by using 3 mmol of urea, strongly indicating the efficiency of the developed reaction conditions to avoid the second urea

addition and to favor the reaction equilibrium towards DHP formation. Interestingly, no intermediates from the enamine and Knoevenagel pathways were observed, even with in-line direct infusions carried out after 2, 5, 10, 18, and 24 h of reaction from samples of the crude mixture. After 2 h we could detect the protonated DHP derivative, the protonated aldehyde, and the protonated intermediates **b**, **d**, and **e** but at considerably lower intensities. Analyses from longer reaction times showed no significant difference.

Other authors have developed different reaction conditions that favor an enamine-like mechanism;^[40] their experiments ruled out the iminium and Knoevenagel-like pathways. In our case, however, a key step is the reaction of the urea-derived *N*-acyliminium ion with the π -nucleophile species, that is, the enolate-like iron complex (i.e., Fe(acac)₃) formed from ethyl acetoacetate (Scheme 4). Additions involving 1,3-dicarbonyl compounds and urea-derived *N*-acyliminium ions have been reported to yield derivatives of DHP.^[41] Moreover, our experimental data (kinetics and mass spectrometry) corroborate those of Kappe's^[22] Follers and Johnson's^[20] indicate urea addition to the aldehyde as the first step in the reaction.

¹³C NMR spectroscopy experiments were also performed to probe the effect of the imidazolium moiety (**MAI-Cl**) on the reaction, and the results are shown in Figure 7. All experiments were performed using pure reagents (i.e., benzaldehyde, **MAI-Cl** and **BMI-BF₄**) in a sealed NMR tube containing a sealed capillary tube charged with [D₆]DMSO to set the scale (external standard). The carbonyl of the aldehyde shifts to a higher frequency (deshielded) in the presence of the acid ligand **MAI-Cl**, indicating that in the presence of the Brønsted acid, the carbon of the electrophile becomes more susceptible to nucleophilic attack. This effect is due to the cation, since the ligand has no metal center in its structure. The results confirm the aldehyde activation by the acid moiety of the cation, in accordance with the mechanism proposed based on kinetics and mass experiments.

Theoretical calculations: To investigate the efficiency of the catalytic system and the plausibility of the proposed mechanism of action of **MAI-Fe₂Cl₇**, theoretical calculations were performed. Fukui functions (f^+ and f^-) were calculated considering the proposed mechanism. All structures had their geometries fully optimized by quantum mechanics ab initio hybrid Hartree-Fock/density functional theory (DFT) calculations prior to the Fukui function determination. The results are depicted in Figure 8.

Highly elucidative values were obtained for the calculated Fukui functions. The nucleophilic species (ethyl acetoacetate) has an f^- of 0.02 for the CH₂ group (Figure 8). For the in situ complex formation (Fe(acac)₃), the f^- is 0.19, reflecting a far more reactive nucleophile than free ethyl acetoacetate. The Fukui functions clearly show anion-activation promoted by **BMI-Fe₂Cl₇**. In addition, a rationale is provided for the enamine mechanism not taking place under these conditions. As the ethyl acetoacetate is compromised to form a nucleophilic complex, it is not available to react with

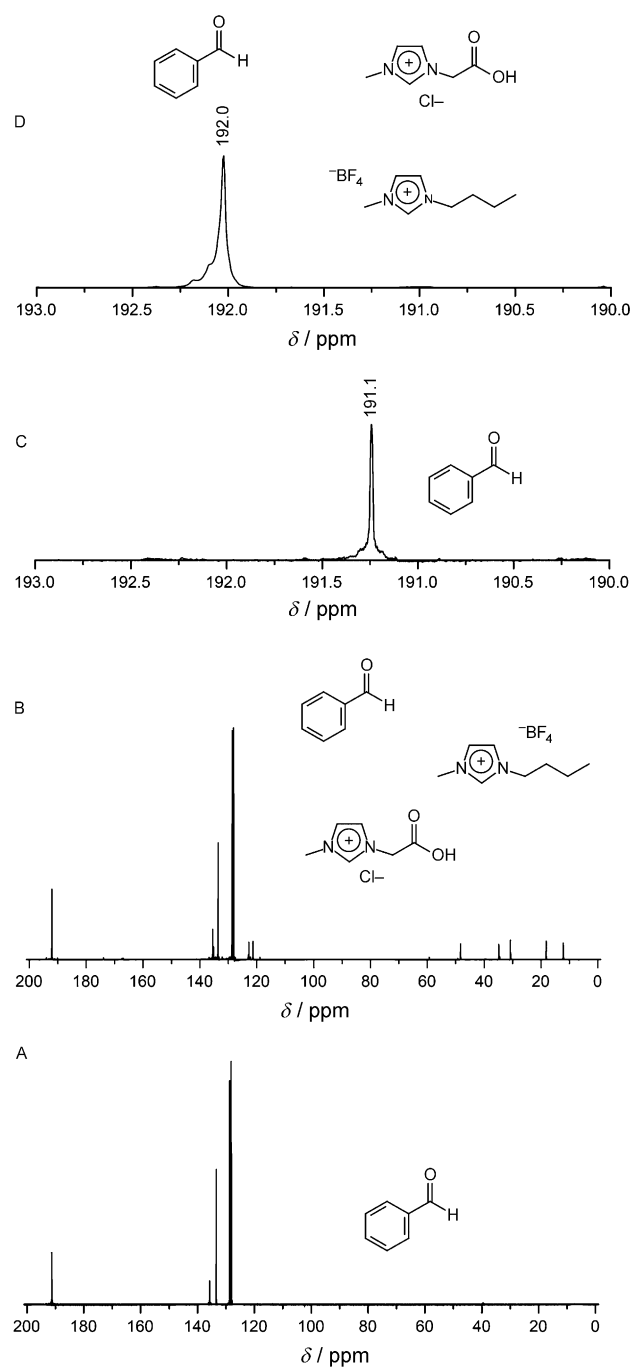


Figure 7. ¹³C{¹H} NMR spectra. A) Pure benzaldehyde (0.8 mL). B) Mixture of all components (benzaldehyde (0.8 mL), **MAI-Cl** (\approx 50 mg) and **BMI-BF₄** (0.8 mL)). C) Expansion from A. D) Expansion from B. [D₆]DMSO in a sealed capillary tube was used to set the scale as an external standard. Note the deshielding effect of the aldehyde C=O from δ = 191.1 (C) to 192.0 ppm (D) in the mixture of the reagents. Also, note the low intensity of **MAI-Cl** signals in (B) due to its low concentration compared with the aldehyde and ionic-liquid concentrations.

urea acting as an electrophilic species, as required in the enamine mechanism (Scheme 3).

The f^+ of the isolated benzaldehyde was determined to be 0.22. The protonated benzaldehyde displays a value of 0.31

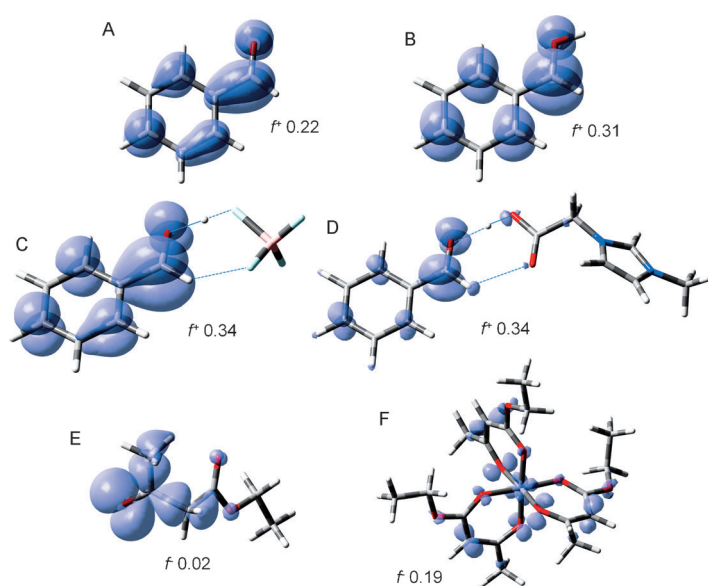


Figure 8. Optimized geometries and calculated Fukui functions (f^+ and f^-) of reactive intermediates from the Biginelli reaction and their isosurfaces by using the CAM-B3LYP/6-311+G(2df,p)/LANL2DZ level of theory. A) Benzaldehyde and f^+ (0.22) for the C=O carbon atom. B) Protonated benzaldehyde and f^+ (0.31) for the C=O⁺-H carbon atom. C) Benzaldehyde coordinated with the anion (BF₄⁻) of the ionic liquid (BMI-BF₄) and f^+ (0.34) for the C=O⁺-H...B-F₄ carbon atom. D) Benzaldehyde activation by the cation of the catalyst (MAI) and f^+ (0.34) for the C=O...MAI carbon atom. E) Ethyl acetoacetate and f^- (0.02) of the reactive CH₂ group (O=CCH₂C=O). F) Fe(acac)₃ complex (formed in situ) and f^- (0.19) of the reactive CH₂ group (O=CCH₂C=O). In the case of the complex, three f^- values for the CH₂ groups were obtained (0.19, 0.21, and 0.19).

and, as expected, is more electrophilic. It is worth remembering that Brønsted acids (the cation MAI) show a superacid behavior in ionic liquids, as reviewed elsewhere.^[42] The reaction performed in BMI-BF₄ also showed two interesting features of ionic-liquid effect. The anion BF₄⁻ was capable of coordinating (ion-pair formation) the protonated aldehyde, rendering its carbonyl carbon more susceptible to undergo nucleophilic addition (f^+ 0.34). Moreover, the aldehyde was also directly activated by the cation MAI, contributing to increase the electrophilicity of the carbonyl (f^+ 0.34), as shown in Scheme 5.

The calculated Gibbs free energy for ion-pair formation (BF₄⁻ coordination) was -90.97 kcal mol⁻¹ (more stable than the protonated aldehyde), indicating how these species become more stable in the ionic medium through the ionic-liquid effect, supplying additional rationale for the higher yields observed in the reactions performed in ILs. Moreover, two hydrogen bonds form upon MAI approximation (aldehyde-activation step), and two upon the anion (BF₄⁻) coordination (Figure 8).

Recyclability and broad applicability of MAI-Fe₂Cl₇: An important goal in modern catalyst design is the development of recyclable, inexpensive, environmentally friendly, and efficient catalysts that must be active to form many derivatives

of interest from the promoted reaction. In this context, MAI-Fe₂Cl₇ possesses the hallmarks of an outstanding green catalyst.

The recycling reactions were performed with the optimized model reaction. Following formation of product, which precipitates, the system was filtered to isolate the product, and the reagents were recharged. At least 8 reactions were carried out with no noticeable loss of catalyst activity (Figure 9).

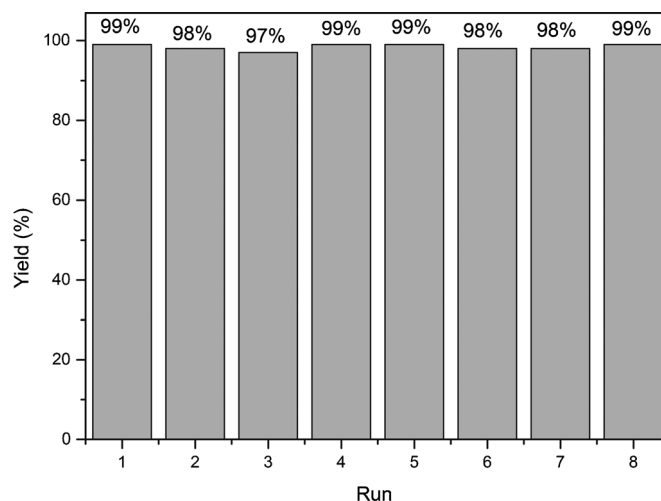
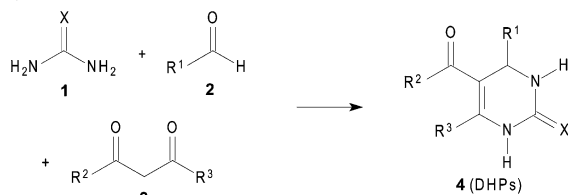


Figure 9. Recycling reactions using MAI-Fe₂Cl₇ (5 mol%), BMI-BF₄ (1 mL), benzaldehyde (9.00 mmol), urea (3.00 mmol), and ethyl acetoacetate (3.00 mmol) at 80°C for 2 h for each cycle.

Finally, MAI-Fe₂Cl₇ was applied in the synthesis of DHP derivatives **4b–4bt**, with yields ranging from good to excellent (Table 2). The use of vanillin, a deactivated aldehyde (Table 2, Entries 25–28), resulted in the desired DHPs **4ba–4bd** in impressive yields (80–98%). Compounds with promising biological activities were equally obtained in good to excellent yields, for instance, monastrol (Table 2, entry 11, 93%), piperastrol (Table 2, entry 39, 97%), enastron (Table 2, entry 42, 82%) and dimethylenastron (Table 2, entry 44, 80%). Furthermore, the application of MAI-Fe₂Cl₇ allowed the direct synthesis of analogues of these interesting compounds.

Antitumoral activity: The promising antitumoral activity of this class of compounds is a subject of interest of many research groups.^[43] Nevertheless, many of the previous reports are restricted to monastrol, piperastrol, enastron, and dimethylenastron (and their analogues). Here we evaluated the antitumoral activity of most of the synthesized compounds, beginning with cytotoxicity assays in MCF-7 cancer cell lines (mammalian human cells). Significant differences in the viability of treated and untreated cells were observed in cell viability assays (all performed with racemic DHPs). Many compounds have an inhibitory activity on cell proliferation in a dose- and time-dependent manner. However, some of them displayed considerable activity within 24 h

Table 2. Synthesis of DHP derivatives using MAI-Fe₂Cl₇ (5 mol %), BMI-BF₄ (1 mL), aldehyde (9.00 mmol), urea or thiourea (3.00 mmol), and 1,3-dicarbonyl compound (3.00 mmol) at 80 °C for 2 h.

Entry	Reagent				Product	Yield [%]	Entry	Reagent				Product	Yield [%]
	R ¹	R ²	R ³	X				R ¹	R ²	R ³	X		
1	Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4b	99	25	4-OH-3-MeO-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4ba	98
2	Ph	Me	Me	O	4c	93	26	4-OH-3-MeO-Ph	Me	Me	O	4bb	80
3	Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4d	83	27	4-OH-3-MeO-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4bc	85
4	Ph	Me	Me	S	4e	87	28	4-OH-3-MeO-Ph	Me	Me	S	4bd	85
5	4-Cl-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4f	82	29	H	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4be	96
6	4-Cl-Ph	Me	Me	O	4g	80	30	H	Me	Me	O	4bf	94
7	4-Cl-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4h	77	31	H	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4bg	86
8	4-Cl-Ph	Me	Me	S	4i	98	32	H	Me	Me	S	4bh	84
9	3-OH-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4j	80	33	Me	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4bi	82
10	3-OH-Ph	Me	Me	O	4k	93	34	Me	Me	Me	O	4bj	66
11 ^[a]	3-OH-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4l	88	35	Me	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4bk	70
12	3-OH-Ph	Me	Me	S	4m	84	36	Me	Me	Me	S	4bl	60
13	2-OH-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4n	80	37		OCH ₂ CH ₃	Me	O	4bm	87
14	2-OH-Ph	Me	Me	O	4o	84	38		Me	Me	O	4bn	79
15	2-OH-Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4p	90	39 ^[b]		OCH ₂ CH ₃	Me	S	4bo	70
16	2-OH-Ph	Me	Me	S	4q	96	40		Me	Me	S	4bp	71
17	3-NO ₂ -Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4r	97	41	3-OH-Ph			O	4bq	60
18	3-NO ₂ -Ph	Me	Me	O	4s	86	42 ^[c]	3-OH-Ph			O	S4br	72
19	3-NO ₂ -Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4t	86	43	3-OH-Ph			O	4bs	70
20	3-NO ₂ -Ph	Me	Me	S	4u	70	44 ^[d]	3-OH-Ph			O	S4bt	70
21	2-NO ₂ -Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	O	4v	60	45		OCH ₂ CH ₃	Me	O	4bu	66 ^[f]
22	2-NO ₂ -Ph	Me	Me	O	4x	72	46		Me	Me	S	4bv	50 ^[f]
23	2-NO ₂ -Ph	OCH ₂ CH ₃	Me	S	4y	60 ^[e]	47		OCH ₂ CH ₃	Me	S	4bx	42 ^[f]
24	2-NO ₂ -Ph	Me	Me	S	4z	98	48		Me	Me	O	4by	83

[a] Monastrol. [b] Piperastrol. [c] Enastron. [d] Dimethylenastron. [e] After 12 h of reaction. [f] Product formation is above 90%, but there is considerable loss in the purification procedure (chromatograph column).

(Figure S2 in the Supporting Information). The distribution of cell viability according to treatment and time is shown in Figures S2–4 in the Supporting Information.

Derivatives **4bo**, **4bq**, **4x**, and **4h** (Figures S2A, C, D and F, respectively) showed inhibitory activity greater than 50% at the highest tested concentration when compared with the control. Compounds derived from piperonal (Table 2, entries 37–40) had their highest concentration established based on previous studies, which showed that this group is about 30 times as potent as monastrol when tested against 5–7 different cancer cell lineages.^[2b]

DHP derivatives with benzaldehyde (Table 2, entries 1–4), 2-hydroxy-benzaldehyde (Table 2, entries 13–16) or 4-hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (Table 2, entries 25–28) and 4-chloro-benzaldehyde (Table 2, entries 5–8) also showed significant cytotoxic effects in 24 h at 1.00 mM, although these activities were smaller than 50% (Figure S2B and D, respectively). The class of acetaldehyde or formalde-

hyde derivatives did not show statistically significant activities.

After 48 h (Figure S3 in the Supporting Information), compounds **4bt**, **4bq**, **4m**, **4r**, **4p**, **4bc**, **4ba**, and **4i** (Figure S3C–E and S4G) have inhibitory activity higher than 50%, and in three of them their anti-proliferative activity was greater than 75%, **4bo** (79%), **4x** (87%), and **4h** (85%) (Figure S3A, G and D, respectively). After 72 h of treatment, 33 of the 37 tested compounds showed statistically significant inhibitory activity (Figure S4 in the Supporting Information) at the highest concentration. Among those, 20 compounds showed activity greater than 50%, which are **4bo**, **4br**, **4bs**, **4bt**, **4k**, **4bq**, **4j**, **4m**, **4v**, **4x**, **4t**, **4u**, **4p**, **4bc**, **4n**, **4ba**, **4bv**, **4h**, **4i**, and **4f** (Figure S4A, C–G). Groups treated with compounds **4bo** (500 μM), **4bt** (1.00 mM), **4x** (1.00 mM), **4t** (1.00 mM), **4bc** (1.00 mM), and **4h** (1.00 mM) had mean cell viabilities of 26, 11, 10, 9, 4, and 10%, respectively. This shows that these derivatives exert significant tox-

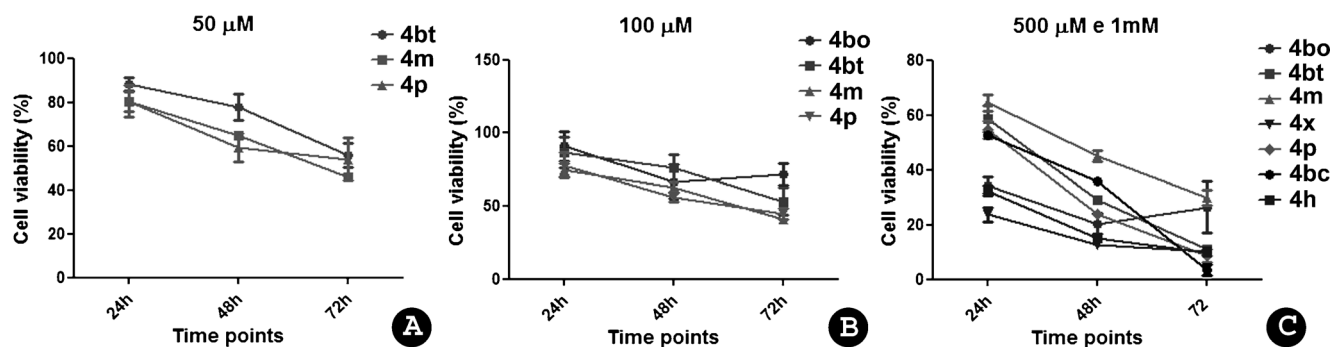


Figure 10. Cell viability versus time (24, 48, and 72 h) for the best cytotoxicity results at 50, 100, and 500 μM , and 1 mM concentration of the DHP derivatives.

icity on tumor cells (Figures S4A, C, D, E, and G in the Supporting Information). The highest concentration of DHPs with benzaldehyde and formaldehyde derivatives did not show satisfactory activity in any of the experiments.

Inhibitory activity was observed in cells treated with derivatives **4bt**, **4n**, and **4p** at lower doses when compared with untreated cells at 72 h (Figure S4C and E in the Supporting Information). These compounds may be promising chemotherapeutics for cancer treatment, since they could be cytotoxic and/or cytostatic for cancer cells with small doses with no considerable damage to normal cells. The best results of cytotoxicity time-dependence obtained by the treatment with the derivatives at 50, 100, 500 μM and 1 mM concentrations are shown in Figure 10.

Morphological alteration related to cell death after 72 h upon treatment of MCF-7 cells with derivatives **4bt** (800 μM), **4m** (1 mM), **4x** (800 μM), **4p** (400 μM), and **4bc** (1 mM) can be seen in Figure 11. All of these compounds showed high specific toxicity towards tumor cells at different concentrations. Figure 11 also shows round and detached cells (dead cells) and only a few attached cells, depending on the specific DHP effects. Compounds **4c** (dimethylenastron), **4p** and **4bc** showed the best results on the morphological alteration test, with almost no MCF-7 cells visible after 72 h. The few remaining attached cells showed enhanced morphological alterations, which are undoubtedly as-

sociated with cell-death processes, thus indicating the efficiency of such compounds against this cancer cells line.

Preliminary studies using healthy cells (fibroblasts) showed the virtual non-toxicity of the derivatives. Moreover, it shows the preference of this class of compounds to act against cancer cells, thus making these compounds potential new candidates for cancer therapy.

Conclusion

We have synthesized and applied a new ion-tagged iron catalyst as an efficient promoter of the Biginelli reaction. The ionic-liquid effect played a role in stabilizing the charged and polar intermediates formed during the reaction, explaining why yields performed in ILs were considerable higher than those obtained in classical organic solvents. The iron catalyst could be reused at least eight times with no noticeable loss in its activity. Moreover, the catalyst was applied in the synthesis of several DHP derivatives. Kinetic studies suggested the iminium mechanism is preferred under the present conditions. Additionally, ESI-QTOF experiments were consistent with the iminium mechanism. Theoretical calculations shed light on the atomic details of the proposed mechanism and are in agreement with the reactivity expected for the in situ-formed intermediates. Finally, 37 DHPs derivatives were evaluated against MCF-7 cancer cell line with promising results. Preliminary studies showed the virtual non-toxicity of the analyzed compounds when tested against healthy cells, which attests their apparent preference for rapidly proliferating cells.

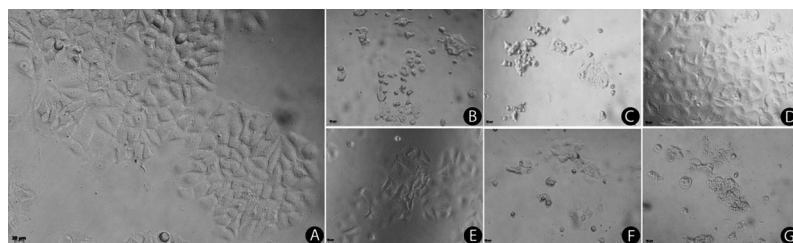


Figure 11. Morphological alterations in cells upon 72 h of DHP treatment. A) Untreated MCF-7 cells; no morphological changes observed. B) Monastrol (**4l**, 1 mM as the positive control); only a few attached round cells observed. C) Dimethylenastron (**4bt**, 800 μM); only a few attached round cells observed. D) Compound **4m** (1 mM); only a subtle effect on morphological features is observed. E) Compound **4x** (800 μM); remaining cells show conserved morphological aspect. F) Compound **4p** (400 μM); significant effect on the morphological aspects of MCF-7 cells. G) Compound **4bc** (1 mM); significant effect on the morphological aspects of MCF-7 cells.

Acknowledgements

This work has been supported by CAPES, CNPq, FINEP-MCT, FINATEC, FAPESP, FAPDF, and DPP-

UnB. B.A.D.N. also thanks INCT-Catalysis and LNLS. B.A.D.N. dedicates this article to Prof. J. Dupont (UFRGS).

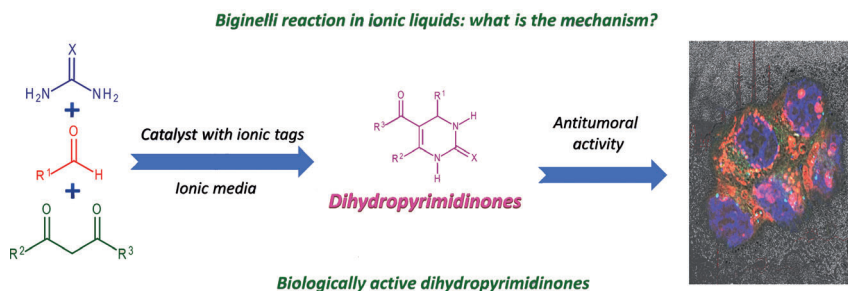
- [1] G. C. Tron, A. Minassi, G. Appendino, *Eur. J. Org. Chem.* **2011**, 5541–5550.
- [2] a) C. O. Kappe, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 6937–6963; b) R. F. S. Canto, A. Bernardi, A. M. O. Battastini, D. Russowsky, V. L. Eifler-Lima, *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 1379–1388; c) C. O. Kappe, *Acc. Chem. Res.* **2000**, *33*, 879–888.
- [3] M. J. Climent, A. Corma, S. Iborra, *RSC Adv.* **2012**, *2*, 16–58.
- [4] S. M. Rajesh, R. S. Kumar, L. A. Libertsen, S. Perumal, P. Yogeewari, D. Sriram, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 3012–3016.
- [5] O. M. Singh, S. J. Singh, M. B. Devi, L. N. Devi, N. I. Singh, S. G. Lee, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 6462–6467.
- [6] A. K. Chhillar, P. Arya, C. Mukherjee, P. Kumar, Y. Yadav, A. K. Sharma, V. Yadav, J. Gupta, R. Dabur, H. N. Jha, A. C. Watterson, V. S. Parmar, A. K. Prasad, G. L. Sharma, *Bioorg. Med. Chem.* **2006**, *14*, 973–981.
- [7] a) H. Y. K. Kaan, V. Ulaganathan, O. Rath, H. Prokopcova, D. Dalinger, C. O. Kappe, F. Kozielski, *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 5676–5683; b) V. Sarli, S. Hueimmer, N. Sunder-Plassmann, T. U. Mayer, A. Giannis, *ChemBioChem* **2005**, *6*, 2005–2013.
- [8] B. C. Raju, R. N. Rao, P. Suman, P. Yogeewari, D. Sriram, T. B. Shaik, S. V. Kalivendi, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2011**, *21*, 2855–2859.
- [9] a) G. C. Rovnyak, S. D. Kimball, B. Beyer, G. Cucinotta, J. D. Dimarco, J. Gougoutas, A. Hedberg, M. Malley, J. P. McCarthy, R. A. Zhang, S. Moreland, *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 119–129; b) H. L. Luo, W. Yang, Y. Li, S. F. Yin, *Chem. Nat. Compd.* **2010**, *46*, 412–416; c) C. O. Kappe, W. M. F. Fabian, M. A. Semones, *Tetrahedron* **1997**, *53*, 2803–2816; d) C. O. Kappe, *Eur. J. Med. Chem.* **2000**, *35*, 1043–1052.
- [10] a) J. P. Hallett, T. Welton, *Chem. Rev.* **2011**, *111*, 3508–3576; b) T. Welton, *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2071–2083; c) N. V. Plechkova, K. R. Seddon, *Chem. Soc. Rev.* **2008**, *37*, 123–150; d) J. Dupont, R. F. de Souza, P. A. Z. Suarez, *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 3667–3691; e) J. Dupont, J. D. Scholten, *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39*, 1780–1804; f) F. van Rantwijk, R. A. Sheldon, *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 2757–2785; g) R. Sheldon, *Chem. Commun.* **2001**, 2399–2407.
- [11] N. Isambert, M. D. S. Duque, J. C. Plaquevent, Y. Genisson, J. Rodriguez, T. Constantieux, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1347–1357.
- [12] A. R. Gholap, K. Venkatesan, T. Daniel, R. J. Lahoti, K. V. Srinivasan, *Green Chem.* **2004**, *6*, 147–150.
- [13] D. V. Jawale, U. R. Pratap, A. A. Mulay, J. R. Mali, R. A. Mane, *J. Chem. Sci.* **2011**, *123*, 645–655.
- [14] R. Kore, R. Srivastava, *J. Mol. Catal. A: Chem.* **2011**, *345*, 117–126.
- [15] a) D. Fang, D. Z. Zhang, Z. L. Liu, *Monatsh. Chem.* **2010**, *141*, 419–423; b) J. K. Joseph, S. L. Jain, S. Singhal, B. Sain, *Ind. Eng. Chem. Res.* **2011**, *50*, 11463–11466; c) A. Shaabani, A. Rahmati, *Catal. Lett.* **2005**, *100*, 177–179.
- [16] L. M. Ramos, A. Y. Ponce de Leon y Tobio, M. R. dos Santos, H. C. B. de Oliveira, A. F. Gomes, F. C. Gozzo, A. L. de Oliveira, B. A. D. Neto, *J. Org. Chem.* **2012**, *77*, 10184–10193.
- [17] J. Dupont, P. A. Z. Suarez, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2006**, *8*, 2441–2452.
- [18] a) J. P. Wan, Y. Y. Liu, *Curr. Org. Chem.* **2011**, *15*, 2758–2773; b) V. A. Chebanov, V. E. Saraev, S. M. Desenko, V. N. Chernenko, I. V. Knyazeva, U. Groth, T. N. Glasnov, C. O. Kappe, *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 5110–5118; c) J. G. Xin, L. Chang, Z. R. Hou, D. J. Shang, X. H. Liu, X. M. Feng, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 3177–3181; d) J. E. Biggs-Houck, A. Younai, J. T. Shaw, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2010**, *14*, 371–382.
- [19] a) J. J. Wu, S. Cao, *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1791–1804; b) P. J. Tambade, Y. P. Patil, B. M. Bhanage, *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1805–1819; c) K. Kumaravel, G. Vasuki, *Curr. Org. Chem.* **2009**, *13*, 1820–1841.
- [20] K. Folkers, T. B. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1933**, *55*, 3784–3791.
- [21] F. Sweet, J. D. Fissekis, *J. Am. Chem. Soc.* **1973**, *95*, 8741–8749.
- [22] C. O. Kappe, *J. Org. Chem.* **1997**, *62*, 7201–7204.
- [23] a) F. F. D. Oliveira, M. R. dos Santos, P. M. Lalli, E. M. Schmidt, P. Bakuzis, A. A. M. Lapis, A. L. Monteiro, M. N. Eberlin, B. A. D. Neto, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 10140–10147; b) M. R. dos Santos, A. F. Gomes, F. C. Gozzo, P. A. Z. Suarez, B. A. D. Neto, *ChemSusChem* **2012**, *5*, 2383–2389.
- [24] V. M. de Oliveira, R. S. de Jesus, A. F. Gomes, F. C. Gozzo, A. P. Umpierre, P. A. Z. Suarez, J. C. Rubim, B. A. D. Neto, *ChemCatChem* **2011**, *3*, 1911–1920.
- [25] a) W. S. D. Silva, A. A. M. Lapis, P. A. Z. Suarez, B. A. D. Neto, *J. Mol. Catal. B* **2011**, *68*, 98–103; b) M. S. Carvalho, R. A. Lacerda, J. P. B. Leao, J. D. Scholten, B. A. D. Neto, P. A. Z. Suarez, *Catal. Sci. Technol.* **2011**, *1*, 480–488.
- [26] R. Sebesta, I. Kmentova, S. Toma, *Green Chem.* **2008**, *10*, 484–496.
- [27] M. Lombardo, C. Trombini, *ChemCatChem* **2010**, *2*, 135–145.
- [28] J. Dupont, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1223–1231.
- [29] M. Petkovic, K. R. Seddon, L. P. N. Rebelo, C. S. Pereira, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 1383–1403.
- [30] J. Z. Li, Y. Q. Peng, G. H. Song, *Catal. Lett.* **2005**, *102*, 159–162.
- [31] J. G. Li, Y. F. Hu, S. F. Sun, S. Ling, J. Z. Zhang, *J. Phys. Chem. B* **2012**, *116*, 6461–6464.
- [32] a) D. Russowsky, F. A. Lopes, V. S. S. da Silva, K. F. S. Canto, M. G. M. D'Oca, M. N. Godoi, *J. Braz. Chem. Soc.* **2004**, *15*, 165–169; b) S. Saha, J. N. Moorthy, *J. Org. Chem.* **2011**, *76*, 396–402; c) O. Rosati, M. Curini, F. Montanari, M. Nocchetti, S. Genovese, *Catal. Lett.* **2011**, *141*, 850–853; d) M. N. Godoi, H. S. Costenaro, E. Kramer, P. S. Machado, M. G. Montes D'Oca, D. Russowsky, *Quim. Nova* **2005**, *28*, 1010–1013; e) D. R. Ding, C. G. Zhao, *Eur. J. Org. Chem.* **2010**, 3802–3805; f) J. Yu, F. Shi, L. Z. Gong, *Acc. Chem. Res.* **2011**, *44*, 1156–1171.
- [33] J. Lu, H. R. Ma, *Synlett* **2000**, 63–64.
- [34] a) J. Dupont, J. Spencer, *Angew. Chem.* **2004**, *116*, 5408–5409; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 5296–5297; b) J. D. Holbrey, A. E. Visser, S. K. Spear, W. M. Reichert, R. P. Swatloski, G. A. Broker, R. D. Rogers, *Green Chem.* **2003**, *5*, 129–135.
- [35] G. S. Fonseca, A. P. Umpierre, P. F. P. Fichtner, S. R. Teixeira, J. Dupont, *Chem. Eur. J.* **2003**, *9*, 3263–3269.
- [36] L. S. Santos, B. A. D. Neto, C. S. Consorti, C. H. Pavam, W. P. Almeida, F. Coelho, J. Dupont, M. N. Eberlin, *J. Phys. Org. Chem.* **2006**, *19*, 731–736.
- [37] L. D. S. Yadav, V. K. Rai, B. S. Yadav, *Tetrahedron* **2009**, *65*, 1306–1315.
- [38] A. N. Dadhania, V. K. Patel, D. K. Raval, *J. Braz. Chem. Soc.* **2011**, *22*, 511–516.
- [39] R. De Souza, E. T. da Penha, H. M. S. Milagre, S. J. Garden, P. M. Esteves, M. N. Eberli, O. A. C. Antunes, *Chem. Eur. J.* **2009**, *15*, 9799–9804.
- [40] I. Cepanec, M. Litvic, M. Filipan-Litvic, I. Grungold, *Tetrahedron* **2007**, *63*, 11822–11827.
- [41] K. T. Okamoto, J. Clardy, *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 2937–2940.
- [42] K. E. Johnson, R. M. Pagni, J. Bartmess, *Monatsh. Chem.* **2007**, *138*, 1077–1101.
- [43] a) B. R. P. Kumar, G. Sankar, R. B. N. Baig, S. Chandrashekar, *Eur. J. Med. Chem.* **2009**, *44*, 4192–4198; b) J. Azizian, M. K. Mohammadi, O. Firuzi, B. Mirza, R. Miri, *Chem. Biol. Drug Des.* **2010**, *75*, 375–380; c) C. Müller, D. Gross, V. Sarli, M. Gartner, A. Gianini, G. Bernhardt, A. Buschauer, *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2007**, *59*, 157–164; d) D. Russowsky, R. F. S. Canto, S. A. A. Sanches, M. G. M. D'Oca, A. de Fatima, R. A. Pilli, L. K. Kohn, M. A. Antonio, J. E. de Carvalho, *Bioorg. Chem.* **2006**, *34*, 173–182; e) D. L. da Silva, F. S. Reis, D. R. Muniz, A. Ruiz, J. E. de Carvalho, A. A. Sabino, L. V. Modolo, A. de Fatima, *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 2645–2650.

Received: December 4, 2012
Published online: ■■■■, 2013

Multicomponent Reactions

L. M. Ramos, B. C. Guido,
C. C. Nobrega, J. R. Corrêa,
R. G. Silva, H. C. B. de Oliveira,
A. F. Gomes, F. C. Gozzo,
B. A. D. Neto*..... ■■■■-■■■■

The Biginelli Reaction with an Imidazolium-Tagged Recyclable Iron Catalyst: Kinetics, Mechanism, and Antitumoral Activity

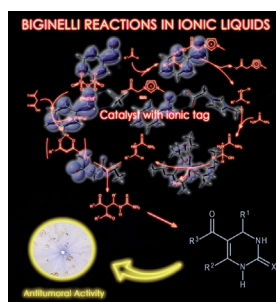


Ion/Iron will: The use of a new imidazolium-tagged iron catalyst as the promoter of the Biginelli reaction allowed the synthesis of several dihydropyrimidinones with attractive biological activ-

ity (see scheme). The mechanism of this interesting transformation was evaluated by means of kinetics, NMR spectroscopy, ESI-MS(/MS), and theoretical calculations.

Multicomponent Reactions

In their Full Paper on page ■■, B. A. D. Neto and co-workers demonstrate the mechanism of the Biginelli reaction with an imidazolium-tagged iron catalyst with dual activation mode. For the first time, a kinetic study is conducted to demonstrate the iminium pathway is favoured under the developed conditions in ionic liquids. The combination of kinetics, NMR and ESI-MS(/MS) allowed an unambiguous assignment of the preferred reaction mechanism. Moreover, 37 racemic dihydropyrimidinones had their cytotoxicity evaluated in assays against MCF-7 cancer cell linages with encouraging results of some few derivatives, which were virtually non-toxic against healthy cell linages.



11.3. ANEXO III

PATENTE:

Catalisadores Metálicos Ionicamente Marcados para Reações Multicomponentes, seu Processo de Obtenção e Aplicação do Mesmo na Obtenção de Substâncias Bioativas

29/08/2012 012120000485
14:44 DEDF



BR 10 2012 021717 1

Espaço reservado ao protocolo

Espaço para etiqueta

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas

1. Depositante (71):

- 1.1 Nome: Fundação Universidade de Brasília
- 1.2 Qualificação
- 1.3 CNPJ/CPF: 00038174/0001-43
- 1.4 Endereço Completo Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro
- 1.5 CEP: 70904-970 1.6 Telefone 61 3107-4100 1.7 Fax: 61 3107-4136
- 1.8 E-mail: nupitec@cdt.unb.br

continua em folha anexa

2. Natureza: Invenção Modelo de Utilidade Certificado de Adição

Escreva, obrigatoriamente, e por extenso, a Natureza desejada: Invenção

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade ou Certificado de Adição(54):

CATALISADORES METÁLICOS IONICAMENTE MARCADOS PARA REAÇÕES MULTICOMPONENTES, SEU PROCESSO DE OBTENÇÃO E APLICAÇÃO DO MESMO NA OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N° Data de Depósito:

5. Prioridade: interna unionista

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou organização de origem	Número de depósito	Data do depósito

6. Inventor (72):

Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)

6.1 Nome: Brenno Amaro da Silveira Neto

6.2 Qualificação Químico

6.3 CPF: [REDACTED]

6.4 Endereço completo [REDACTED]

6.5 CEP: [REDACTED]

6.6 Telefone: [REDACTED]

6.7 Fax: [REDACTED]

6.8 E-Mail: brenno.ipi@gmail.com

continua em folha anexa

7. Declaração na forma do item 3.2 do Ato Normativo nº 127/97:

7.1 Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

em anexo

8. Declaração de divulgação anterior não prejudicial: (Período de Graça):
(art. 12 da LPI e item 2 do AN nº 127/97)

em anexo

9. Procurador (74)

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço completo

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 Fax

9.8 E-Mail:

10. Listagem de sequências Biológicas (documentos anexados) (se houver):

- Listagem de sequências em arquivo eletrônico: n° de CDs ou DVDs (original e cópia).
 Código de controle alfanumérico no formato de código de barras: fl.
 Listagem de sequências em formato impresso: fls.
 Declaração de acordo com o artigo da Resolução INPI nº 228/09: fls.

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
(Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

<input checked="" type="checkbox"/>	11.1 Guia de Recolhimento	1 fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.5 Relatório descritivo	29 fls.
<input type="checkbox"/>	11.2 Procuração	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.6 Reivindicações	6 fls.
<input type="checkbox"/>	11.3 Documentos de Prioridade	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.7 Desenhos	8 fls.
<input type="checkbox"/>	11.4 Doc. de contrato de trabalho	fls.	<input checked="" type="checkbox"/>	11.8 Resumo	1 fls.
<input checked="" type="checkbox"/>	11.9 Outros que não aqueles definidos no campo 11 (especificar) Ato da Reitoria, Estatuto da UnB e Declaração dos Inventores.				9 fls.

12. Total de folhas anexadas (referentes aos campos 10 e 11): 54 fls.

13. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Brasília - DF - 18/07/2012

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Prof. Luis Afonso Bermudez
Diretor CDT
Mat. 114740

DEPÓSITO DE PEDIDO DE PATENTE OU DE CERTIFICADO DE ADIÇÃO

Continuação

1. Depositante (71):

1.4 Endereço Completo: **Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro, Edifício CDT, Asa Norte, Brasília-DF.**

6. Inventor (72):

6.1 Nome: **José Raimundo Corrêa**

6.2 Qualificação: **Biólogo**

6.3 CPF: [REDACTED]

6.4 Endereço completo: [REDACTED]

6.5 CEP: [REDACTED]

6.6 Telefone: [REDACTED]

6.7 Fax: **correa@unb.br**

6.1 Nome: **Luciana Machado Ramos**

6.2 Qualificação: **Química**

6.3 CPF: [REDACTED]

6.4 Endereço completo: [REDACTED]

6.5 CEP: [REDACTED]

6.6 Telefone: [REDACTED]

6.7 Fax:

6.8 E-mail: **lucianamramos@unb.br**

6.1 Nome: **Bruna Cândido Guido**

6.2 Qualificação: **Bióloga**

6.3 CPF: [REDACTED]

6.4 Endereço completo: [REDACTED]

[REDACTED]

6.5 CEP: [REDACTED]

6.6 Telefone: [REDACTED]

6.7 Fax:

6.8 E-mail: **brunaguido@unb.br**