



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA**

**Tâmila Siminski**

**Avaliação da atividade antitumoral de novas seleno-  
diidropirimidinonas *in vitro***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre em Bioquímica.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Rozangela Curi Pedrosa

Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Fabiana Ourique da Silva

**Florianópolis / SC  
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Siminski, Tamila

Avaliação da atividade antitumoral de novas  
seleno-diidropirimidinonas in vitro / Tamila  
Siminski ; orientador, Rozangela Curi Pedrosa,  
coorientador, Fabiana Ourique da Silva, 2018.  
89 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em  
Bioquímica, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

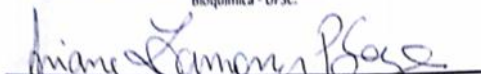
1. Bioquímica. 2. Atividade antitumoral. 3.  
seleno-diidropirimidinonas. 4. Citotoxicidade . 5.  
Antiproliferativo. I. Pedrosa, Rozangela Curi . II.  
Silva, Fabiana Ourique da . III. Universidade  
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação  
em Bioquímica. IV. Título.

"Avaliação da atividade antitumoral de novas Seleno-diidroprimidinomas *in vitro*"

Por

Tâmila Siminski

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (012/2018/PPGBQA) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica - UFSC.

  
Prof. (a) Dr. (a) Arlane Zamoner Pacheco de Souza  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica

Banca examinadora:

  
Dr. (a) Rozangela Curi Pedrosa (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)

  
Dr. (a) Antonio Luiz Braga (Universidade Federal de Santa Catarina)

  
Dr. (a) Karina Bettega Felipe (Universidade Federal do Paraná)

  
Dr. (a) Marcelo Farina (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 15 de junho de 2018.





*À minha Avó Júlia Marciana  
Siminski, a mulher mais forte que já  
conheci (in memoriam) ...*

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.*

*Carl Jung*





## AGRADECIMENTOS

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram no desenvolvimento desse trabalho, que direta ou indiretamente, participaram da minha formação profissional e pessoal:

- À minha orientadora, Prof. Dra. Rozangela Curi Pedrosa, muito obrigada pela oportunidade de participar do grupo de pesquisa do Laboratório de Bioquímica Experimental (LABIOEX) e desenvolver trabalhos que resultaram na dissertação. Assim como pelos ensinamentos no âmbito pessoal, que transformaram a forma com que levo a vida.
- À minha coorientadora Fabiana Ourique da Silva, agradeço pelo esforço e paciência em me ensinar e ajudar em todo o processo do mestrado. Principalmente por ter dado a oportunidade de conhecer a pessoa Fabiana, um exemplo de determinação e dedicação em tudo que faz. Muitíssimo obrigada, daqui para frente seus ensinamentos vão estar sempre comigo, juntamente ao desejo que você realize todos os seus objetivos.
- Aos colegas que participaram da minha caminhada até o presente momento; Cynthia, Daniela, Eduardo, Elinete, Gabriela, Guilherme, Jean, Josi, Luiza, Nádia, Raquel, Rodrigo, Tais, Tânia, Valdelucia e Vilson, que dividiram suas felicidade, tristezas e lutas, tornando-se uma segunda família. Em especial a Valdelucia pelo incentivo a me arriscar na área da bioquímica e por me ensinar muito sobre o ser

humano. À Gabriela que foi um presente que Deus colocou no meu caminho, durante os dois anos de mestrado e se transformou em uma amiga, estando presente nos momentos mais difíceis e de felicidade. Ao Guilherme, que além de ter o dom de gerar alegria por onde passa, ainda contribuiu com uma das partes mais lindas desse trabalho à figura resultante da hipótese proposta. À querida Dani que apesar do pouco tempo de convivência, me conquistou com seu jeitinho gaúcho de ser.

- Aos membros da banca Prof. Dr. Antonio Luiz Braga; Profa. Dra. Ariane Zamoner Pacheco de Souza; Profa. Dra. Karina Bettega Felipe e o Prof. Dr. Marcelo Farina, por aceitarem fazer parte dessa etapa da minha vida, avaliando minha dissertação.
- Ao Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio e Telúrio (LabSelen), coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Luiz Braga. Em especial ao Flavio Augusto, que sintetizou as moléculas do presente trabalho, sendo sempre solícito em todas as dúvidas ao logo dessa jornada.
- A todos os animais criados com o intuito de serem utilizados em pesquisas, para que assim novos tratamentos surjam, beneficiando nossas vidas.
- Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e a toda a estrutura disponibilizadas pela

Universidade Federal de Santa Catarina, possibilitando a efetuação desse trabalho.

- Aos Professores que contribuíram para minha formação.
- A todos os órgãos de fomento que investem em pesquisa e inovação, em especial ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelos auxílios e bolsa concedida, possibilitando o desenvolvimento desse trabalho.
- À minha família, meus pais Mario e Claudia, meus irmãos Tamiris e Matheus, aos meus avós Sebastião, Joaquina, Gerônimo, meus sogros Silvia e José Geraldo, e ao meu noivo Estêvão, gratidão eterna pela educação, investimento e acima de tudo pelo amor incondicional demonstrado todos esses anos, sem vocês nada disso seria possível.
- Aos meus queridos e amados amigos do Mato Grosso, Giovane Bagatini, Jessie Bagatini, Josélen Aragoso, Daniella Talaska, Karla Thayane, Jaqueline Gerhardt, que mesmo longe se fizeram presentes durante esses dois anos.

A todos vocês, fica a minha eterna gratidão.







## RESUMO

**Introdução.** As seleno-diidropirimidinonas são compostos sintéticos com potenciais atividades biológicas, entre elas a antitumoral. Destacam-se por possuírem o selênio, elemento essencial ao funcionamento do organismo, que tem por característica reduzir a proliferação e induzir morte em células tumorais. **Objetivo.** Avaliar o potencial citotóxico, antiproliferativo e antitumoral *in vitro* de novos compostos de seleno-diidropirimidinona. **Metodologia.** Os compostos em estudo (concentrações de 1  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$ ) foram testados quanto à sua citotoxicidade em linhagens tumorais MCF-7 (carcinoma de mama humano) e HeLa (adenocarcinoma cervical humano), bem como em linhagem normal McCoy (fibroblasto de camundongo), pelo ensaio MTT após 72 horas de incubação. A interação dos compostos com o DNA, foi realizada por espectrofotometria UV-Vis, utilizando concentração fixa de DNA (150  $\mu\text{M}$ ), variando as concentrações dos compostos (50  $\mu\text{M}$  a 300  $\mu\text{M}$ ). Para ensaio clonogênico, foi avaliado tratamento com concentração inibitória de 30% ( $\text{IC}_{30}$ ) dos compostos por 72h. Para o ensaio de morte celular, o tratamento com  $\text{IC}_{30}$  dos compostos foi realizado por 72h, e as células foram coradas com uma solução de 10  $\mu\text{M}$  de laranja acridina e iodeto de propídio. A fragmentação do DNA de células MCF-7 foi verificada pelo ensaio cometa ( $\text{IC}_{30}$  / 72h). A análise do ciclo celular foi realizada de acordo com o conteúdo de DNA celular medido por citometria de fluxo usando um kit de solução PI / RNase da Immunostep®. **Resultados.** Os tratamentos com as Seleno- diidropirimidinonas indicaram efeitos citotóxicos e seletivos sobre as células tumorais cultivadas *in vitro*. As seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a**, **8b** e **4a** foram capazes de interagir e intercalar com o DNA plasmidial. Em doses sub tóxica  $\text{IC}_{30}$ , foram capazes de inibir a proliferação, induzindo a morte celular tanto por necrose como por apoptose. Os compostos **8a** e **8b** promoveram fragmentação do DNA em células MCF-7 aumentando o número de células na fase sub/G1, indicativo de indução de apoptose, e reduziram o número de células na fase S, em tratamentos de 72h com doses sub tóxicas. **Conclusão.** Os resultados obtidos permitem sugerir que os compostos de Seleno-diidropirimidinonas **8a** e **8b** tratam-se de promissores protótipos na pesquisa de novos agentes na terapia contra o câncer, se fazendo necessários futuros ensaios para elucidar melhor suas ações e mecanismos.

**Palavras-chave:** Seleno-diidropirimidinonas, atividade antitumoral, dano ao DNA.





## ABSTRACT

**Introduction.** Selenium-dihydropyrimidinones are synthetic compounds with potential biological activities, including antitumor. It stands out for having selenium, an essential element to the functioning of the organism, which has the characteristic of reducing proliferation and inducing death in tumor cells. **Objective.** Evaluation of the *in vitro* cytotoxic, antiproliferative and antitumor potential of new selenide-dihydropyrimidinone compounds. **Methodology.** The compounds under study (concentrations of 1  $\mu\text{M}$  - 1000  $\mu\text{M}$ ) were tested for their cytotoxicity to the MCF-7 (human breast carcinoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma) and normal McCoy (mouse fibroblast) MTT assay in 72 hours of incubation. The interaction of the compounds with DNA was performed by UV-Vis spectrophotometry, with fixed concentration for the DNA of 150  $\mu\text{M}$  and variations of the concentrations of the compounds of 50  $\mu\text{M}$  to 300  $\mu\text{M}$ . In the clonogenic assay, the  $\text{IC}_{30}$  treatment of the compounds was 72 h, which was incubated for 15 days until colony formation. For the cell death assay, the  $\text{IC}_{30}$  treatment of the compounds was 72 h, and the cells were stained with a solution of 10  $\mu\text{M}$  orange acridine plus propidium iodide and categorized by microscopy as viable, apoptotic and necrotic. DNA fragmentation of MCF-7 cells was verified by the comet assay ( $\text{IC}_{30}$  / 72 h). And the cell cycle analysis was performed according to the cellular DNA content measured by flow cytometry using an Immunostep® PI / RNase solution kit. **Results.** Treatments with Selenidipyrimidinones indicated cytotoxic and selective effects on tumor cells cultured *in vitro*. The selene-dihydropyrimidinones **3j**, **8a**, **8b** and **4a** led to the interaction and intercalation of the DNA. At sub-toxic  $\text{IC}_{30}$  doses, they were able to inhibit proliferation, inducing cell death both by necrosis and by apoptosis. Compounds **8a** and **8b** promoted DNA fragmentation in MCF-7 cells and caused an increase in the number of cells in the sub- G1 phase, indicating death by apoptosis and imprisoned the S-phase MCF-7 cells in 72 h treatments at sub-toxic doses. **Conclusion.** The results suggest that Selen-dihydropyrimidinone compounds **8a** and **8b** are promising agents in cancer therapy, and future trials are needed to better elucidate their actions and mechanisms.

**Key words:** Selen-dihydropyrimidinones, antitumor activity, DNA damage.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1**– Características de uma célula tumoral. Na figura é possível observar as principais diferenciações adquiridas pelas células tumorais. Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011. .... 28
- Figura 2** – Molécula de DNA. Na figura é possível observar uma molécula de DNA íntegra e uma molécula que sofreu danos em sua estrutura. Fonte: adaptado de Gonçalves, 2015. .... 30
- Figura 3** – Vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Na figura é possível observar o mecanismo de morte por apoptose envolvendo as vias extrínseca e intrínseca. Fonte: adaptado de Ramaswamy; Siegel; 2011. .... 32
- Figura 4** – Ciclo celular. Na figura é possível observar as principais proteínas que controlam o ciclo celular e os pontos de checagem nas fases G1/S e G2/M. Fonte: adaptado de Wong; 2008. .... 33
- Figura 5** – Reação multicomponentes de Biginelli. Na figura é possível observar a formação estrutural do núcleo das diidropirimidinonas com todos seus derivados conservados. Fonte: Adaptado de Marques; Russowsky; Fontoura, 2010). .... 36
- Figura 6** – Mecanismo de ação do monastrol inibindo a proteína motora cinesina Eg5. Na figura é possível observar o esquema de um fuso bipolar normal em metáfase e a ação inibitória do monastrol sobre a proteína motora cinesina Eg5, formando fuso monoastral. Fonte: adaptado de Huszar et al., 2009. .... 37
- Figura 7** – Estruturas das seleno-diidropirimidinonas sintetizadas. .... 44
- Figura 8** – Estruturas de três novos seleno-diidropirimidinonas, análogos do **3j** sintetizadas para continuidade dos ensaios biológicos. .... 45
- Figura 9** – Padronização da concentração do CT-DNA. Curva de padronização do CT-DNA, com diferentes concentrações do CT-DNA (30 - 300  $\mu$ M) no comprimento de onda de 220 a 320 nm. .... 47
- Figura 10** – Interação de seleno-diidropirimidinonas com CT-DNA em diferentes concentrações. Espectrometria UV/Vis da interação dos compostos de seleno-diidropirimidinonas. Efeitos causados pela ação dos compostos, **3j** com CT-DNA (A), composto **8a** com CT-DNA (B), composto **8b** com CT-DNA (C) e o composto **4a** com CT-DNA (D). Compostos testados em diferentes concentrações (50 - 350  $\mu$ M),

enquanto a concentração do CT-DNA foi fixada em 150  $\mu\text{M}$ . Leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 230 a 340 nm.

..... 55  
**Figura 11** – Intercalação de seleno-diidropirimidinonas e doxorubicina com CT-DNA. Os compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** foram testados nas concentrações de (0 a 350  $\mu\text{M}$ ), com concentração fixa do CT-DNA (150  $\mu\text{M}$ ) e do iodeto de propídio (IP) (350  $\mu\text{M}$ ). Para o controle positivo utilizou-se doxorubicina nas mesmas concentrações dos tratamentos. .... 56

**Figura 12** – Efeito antiproliferativo das seleno-diidropirimidinonas sobre células MCF-7. Células MCF-7 tratadas com concentrações sub-tóxicas dos compostos **3j** (15,12  $\mu\text{M}$ ), **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ), **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ) e **4a** (5,28  $\mu\text{M}$ ), durante 72 h. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Valores expressos como média  $\pm$  D.P, (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas em  $p < 0,001$  em comparação com células de controle (não tratadas). Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

..... 58  
**Figura 13** – Indução a morte celular em MCF-7, via apoptose e necrose pelos tratamentos com seleno-diidropirimidinonas. Morte celular analisada pela coloração com IP/LA, induzida pelo tratamento com seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas (**3j** (15,12  $\mu\text{M}$ ), **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ), **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ), **4a** (5,28  $\mu\text{M}$ )) em células MCF-7, durante 72 h. Número de células viáveis, apoptóticas e necróticas, representado em porcentagem (A); imagens das análises microscópicas (B). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,001$  e (\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,01$  em comparação com células do controle negativo (não tratadas). Valores expressos como média  $\pm$  D.P. Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância. .... 60

**Figura 14** – Índice de dano do DNA após tratamento com as seleno-diidropirimidinonas **8a** e **8b**, determinado pelo ensaio do Cometa. Índice de dano ao DNA de células MCF-7, induzidas por seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas dos compostos **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ) e **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ) (A). Escores de fragmentação do DNA (B). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes, (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas em  $p < 0,001$  e (\*\*) indicam diferenças estatísticas em  $p < 0,01$  em comparação com o controle (células não tratadas). Valores expressos como média  $\pm$  D.P. Os resultados foram

avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

..... **61**  
**Figura 15** – Alterações no ciclo celular causados pelo tratamento das células MCF-7 com as seleno-diidropirimidininas **8a** e **8b**. Análise de citometria de fluxo da progressão do ciclo celular de células MCF-7, na presença de seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas dos compostos **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ), **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ) e porcentagem da distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular (A). Gráfico representando a porcentagem de células na fase sub-G1 (B) e porcentagem de células na fase S (C). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes e os valores expressos como média  $\pm$  D.P, (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,001$ , (\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,01$  e (\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,05$  em comparação com células do controle (não tratadas). Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância. .... **63**

**Figura 16** – Hipótese para o possível mecanismo de ação antitumoral das seleno- diidropirimidinonas **8a** e **8b**. Crédito: Guilherme Zirbel, graduando do curso de farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina. .... **70**









## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1**– Citotoxicidade das seleno- diidropirimidinonas representada pelo valor do  $CI_{50}$  sobre diferentes linhagens tumorais. Citotoxicidade para os diferentes compostos obtida pelo ensaio de MTT nas concentrações de 0,1 a 1000  $\mu M$ , frente as linhagens tumorais MCF-7 e HeLa em tratamentos de 24, 48, 72 h, e linhagem celular normal McCoy. Os dados da  $CI_{50}$  foram obtidos a partir de três experimentos independentes e os resultados expressos pela média  $\pm$  D.P.

..... 52

**Tabela 2** – Citotoxicidade das seleno- diidropirimidinonas representada pelo valor do  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) e índice de seletividade (IS) sobre diferentes linhagens tumorais. Citotoxicidade das seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a**, **8b** e **4a** com tratamento de 72 h para as linhagens tumorais MCF-7, HeLa e linhagem normal McCoy. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir do cálculo:  $IS = CI_{50}$  do composto para linhagem normal /  $CI_{50}$  do composto para linhagem tumoral. Os dados da  $CI_{50}$  foram obtidos a partir de três experimentos independentes e os resultados expressos pela média  $\pm$  D.P.

..... 53



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**AIF:** Fator indutor de apoptose  
**Apaf-1:** Fator de ativação de proteases pró-apoptóticas  
**Bax:** Proteína X associada a Bcl-2  
**Bcl-2:** Linfoma de células B2  
**Bcl-xL:** Linfoma de células B extra grande  
**BSA:** Albumina de soro bovino  
**CAT:** Catalase  
**CDK:** Cinase dependente de ciclina  
**CDKI:** Inibidor de cinase dependente de ciclina  
**CDKs:** Cinases dependentes de ciclinas  
**CI<sub>50</sub>:** Concentração inibitória 50%  
**CT-DNA:** Ácido desoxirribonucleico do timo de vitelo  
**D.P.:** Desvio padrão  
**DMEM:** Meio Eagle modificado por Dulbecco  
**DMSO:** Dimetilsulfóxido  
**DNA:** ácido desoxirribonucleico  
**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético  
**EROs:** Espécies Reativas de Oxigênio  
**FAAD:** Domínio de morte associado ao Fas  
**FADD:** Proteína adaptadora com domínio de morte associada à FAS  
**FBS:** Soro fetal bovino  
**GPx:** Glutaciona peroxidase  
**GR:** Glutaciona redutase  
**GSH:** Glutaciona reduzida (L- $\gamma$ -glutamil-L-cisteinilglicina)  
**GSSG:** Glutaciona dissulfeto  
**GST:** Glutaciona S-transferase  
**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de hidrogênio  
**HeLa:** Adenocarcinoma cervical humano  
**INCA:** Instituto Nacional do Câncer  
**IS:** Índice de seletividade  
**Keap1:** Kelch-like ECH – associated protein 1  
**McCoy:** Fibroblasto de camundongo  
**MCF-7:** Célula de carcinoma de mama humana  
**MTT:** 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio  
**Nrf2:** Nuclear factor erythroid 2-related fator  
**PBS:** Tampão fosfato salina  
**Prx:** Peroxiredoxinas  
**SOD:** Superóxido dismutase  
**TNF- $\alpha$ :** Fator de necrose tumoral







## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1 Câncer .....</b>	<b>27</b>
<b>1.1.1 Dano ao DNA .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1.2 Morte celular .....</b>	<b>31</b>
<b>1.1.3 Ciclo celular .....</b>	<b>32</b>
<b>1.1.4 Terapias do câncer .....</b>	<b>35</b>
<b>1.1.5 Diidropirimidinonas e seus derivados .....</b>	<b>36</b>
<b>1.1.6 Selênio.....</b>	<b>38</b>
<b>1.2 Justificativa .....</b>	<b>41</b>
<b>2 OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>42</b>
<b>2.1.1 Objetivo específico.....</b>	<b>42</b>
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Reagentes.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1.1 Síntese de seleno- diidropirimidinonas.....</b>	<b>43</b>
<b>3.1.2 Cultura de células.....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.3 Avaliação da viabilidade celular .....</b>	<b>45</b>
<b>3.1.4 Interação com CT-DNA .....</b>	<b>46</b>
<b>3.1.5 Intercalação com CT-DNA .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1.6 Efeito antiproliferativo.....</b>	<b>48</b>
<b>3.1.7 Morte celular .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1.8 Avaliação da fragmentação do DNA.....</b>	<b>49</b>
<b>3.1.9 Ciclo celular .....</b>	<b>50</b>
<b>3.1.10 Análise estatística .....</b>	<b>50</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>IN VITRO</i> E MOLECULARES .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.1 Avaliação da viabilidade celular .....</b>	<b>51</b>
<b>4.1.2 Interação com CT-DNA.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.3 Intercalação com CT-DNA.....</b>	<b>55</b>

<b>4.1.4 Avaliação da atividade antiproliferativa.....</b>	<b>57</b>
<b>4.1.5 Indução da morte celular .....</b>	<b>58</b>
<b>4.1.6 Dano ao DNA.....</b>	<b>61</b>
<b>4.1.7 Análise do ciclo celular .....</b>	<b>62</b>
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>72</b>
<b>8 REFERÊNCIA .....</b>	<b>73</b>
<b>9 ANEXO I .....</b>	<b>83</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Câncer

O registro mais antigo desta doença data de 1700 anos a. C., no chamado papiro de Edwin Smith, no qual estudiosos do antigo Egito descrevem um tumor de mama (FELDMAN; GOODRICH, 1999). Anos depois, o famoso grego “pai da medicina” Hipócrates (460 – 375 a. C.), observou que protuberâncias (tumores) apresentavam vasos sanguíneos ao redor, lembrando patas de crustáceo; cunhando, assim, os termos câncer, carcinos e carcinoma, utilizados até os dias de hoje (LAENNEC, 1804).

Posteriormente, Claudius Galeno (131 a 200 d. C.), médico romano considerado uma das maiores autoridades em câncer na antiguidade, determinou que esta doença era incurável e com elevadas probabilidades de levar o indivíduo a óbito (PEMBERTON, 1858). Transcorridos todos esses anos, os estudos clínicos sobre câncer permitiram a catalogação de um grupo de mais de 100 doenças que estão entre as principais causas de morte no mundo ocidental, configurando um grave problema de saúde pública (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014; BLOOM et al., 2012; MARIOTTO et al., 2011). Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), para o ano de 2030 estima-se 27 milhões de novos casos de câncer e 17 milhões de óbitos. No Brasil, para o biênio 2018-2019 estão previstos aproximadamente 600 mil novos casos de câncer/ano (INCA, 2017).

O processo de carcinogênese é modulado por diferentes eventos bioquímicos, dentre eles pode-se citar: desregulação do ciclo celular, proliferação exacerbada, insensibilidade aos inibidores de crescimento e falhas nos mecanismos de morte celular programada. Estes eventos são resultantes de diferentes mutações genéticas hereditárias ou adquiridas, culminando na perda do controle homeostático responsável pela regulação da proliferação e morte celular (HAHN; WEINBERG, 2002). As mutações adquiridas estão relacionadas a hábitos de vida e fatores externos (radiação ionizante, agentes infecciosos, agentes químicos, etc). As mutações endógenas estão relacionadas a fatores endógenos como disfunção hormonal, condições imunológicas, etc. Tais mutações podem agir juntas ou em sequência, promovendo a tumorigênese (INCA, 2013), a partir da ativação de proto-oncogenes em oncogenes e, ainda, a inibição de genes supressores tumorais (ZAIDI et al., 2013; AUDIC; HARTLEY, 2004; WOLF; RAMIREZ, 2001).

Segundo Brasileiro et al. (2011) todos os processos que levam uma célula normal a se tornar cancerosa podem ser classificados em três etapas:

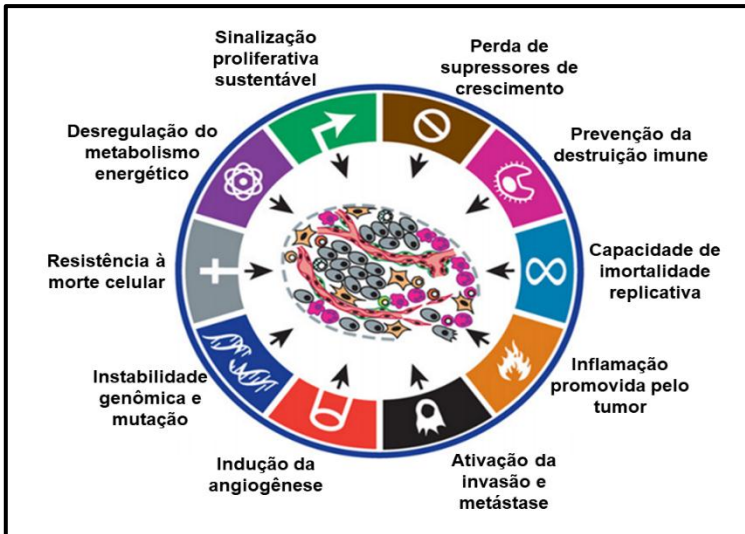
- **Iniciação:** mutações espontâneas ou induzidas por agentes externos que conduzem a danos no DNA e alterações na replicação. Tais mutações em genes relacionados à progressão do ciclo e morte celular ocasionam perda da diferenciação e inibição da apoptose.

- **Promoção:** caracteriza-se pelo acúmulo de mutações e proliferação exacerbada, resultando em um grande número de células mutadas idênticas.

- **Progressão:** caracterizada por multiplicação celular e alterações biológicas, que originam a neoplasia. As células clones possuem a capacidade de invadir novos tecidos e produzir metástase, bem como conferir resistência a diversos fármacos.

Conforme as células progredem à neoplasia, as mesmas vão adquirindo características que as distinguem das normais, levando a um processo patológico e maligno, como pode ser observado na figura 1 (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

**Figura 1**– Características de uma célula tumoral.



Na figura é possível observar as principais diferenciações adquiridas pelas células tumorais. Fonte: Adaptado de Hanahan; Weinberg, 2011.

Nas células tumorais, diferentes vias irão sinalizar para a progressão do ciclo celular, proliferação e inibição da apoptose. Por exemplo, o fator de crescimento epidérmico (EGF) ao ligar-se ao seu receptor do tipo tirosina cinase, conduz a autofosforilação do domínio intracelular do mesmo. Tal evento conduzirá à fosforilação de proteínas de sinalização para a progressão do ciclo e proliferação celular, tais como fosfatidilinositol-3-fosfato (PIK3) e proteína Ras (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Os diversos mecanismos de controle da divisão celular, proliferação e morte são intimamente regulados por diferentes proteínas. Dentre elas destacam-se as proteínas reguladoras do ciclo e proliferação celular p16, p53, Myc e Ras (WANG et al., 2012; VAQUÉ et al., 2008; WU et al., 2003). Já os processos de morte celular são controlados, por exemplo, pelas proteínas da família Bcl-2 pró-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bid) e as proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-W) (ADAMS, 1998; KROEMER, 1997; OLTVAL; MILLIMAN; KORSMEYER, 1993). Ainda, a imortalização celular, que precede a formação de tumores malignos, está relacionada à atividade da telomerase e inibição do encurtamento dos telômeros (HANAHAN; WEINBERG, 2011; BLASCO et al., 2005; SHAY; WRIGHT, 2000).

Sendo assim, de acordo com o supracitado, o entendimento a respeito das características biológicas do câncer e a busca por novas e promissoras alternativas terapêuticas são de extrema valia.

### **1.1.1 Dano ao DNA**

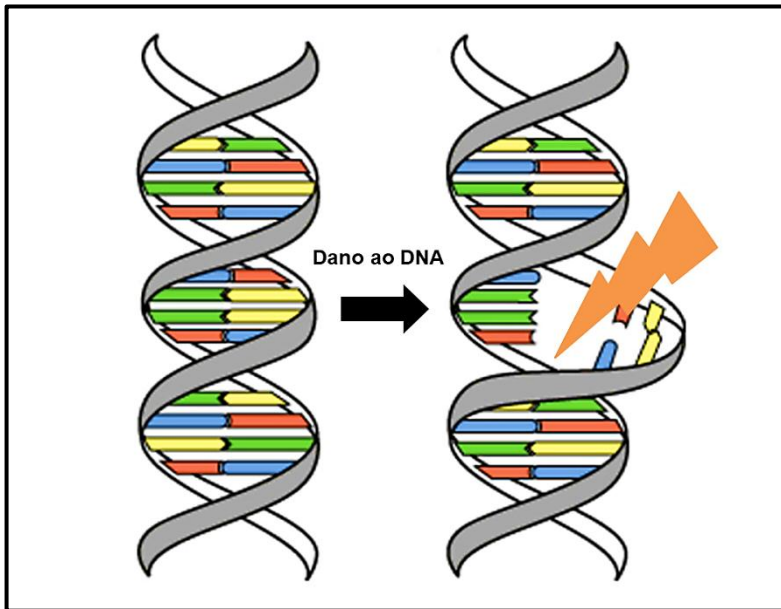
O ácido desoxirribonucleico (DNA) é formado por um conjunto de nucleotídeos, estes por sua vez são constituídos por um grupamento fosfato, uma pentose e uma base nitrogenada podendo ser citosina (C), guanina (G), timina (T), adenina (A), unidos através de ligações fosfodiéster.

Ao longo de um dia a molécula de DNA sofre inúmeros insultos que podem conduzir a alterações no genoma. No entanto, um sistema de checagem e reparo de dano ao DNA durante a progressão do ciclo celular, é capaz de reverter tais alterações. Em caso de inibição desses pontos de checagem as alterações serão transmitidas para as células filhas durante a mitose, podendo dar início ao processo de carcinogênese (BERNSTEIN et al., 2013; HARTWELL; WEINERT, 1989).

Os danos ao DNA ocorrem geralmente em função de uma quebra na fita simples ou na fita dupla da molécula (Figura 2). Esses danos

modificam a estrutura básica do DNA, que na maioria das vezes não consegue ser replicada (BERNSTEIN et al., 2013).

**Figura 2** – Molécula de DNA.



Na figura é possível observar uma molécula de DNA íntegra e uma molécula que sofreu danos em sua estrutura. Fonte: adaptado de Gonçalves, 2015.

Diversos agentes antitumorais utilizados atualmente na clínica médica têm como alvo a molécula do DNA, podendo ser classificados como: antibióticos citotóxicos, agentes antimetabólicos e os agentes alquilantes. Muitos desses fármacos têm também a característica de promover o aumento de EROs no meio intracelular (CHO; WOO; KO, 2014; KUMAR; YEDJOU; TCHOUNWOU, 2014). Dada a importância terapêutica, o DNA está sendo estudado cada vez mais como alvo molecular na terapia do câncer, para o desenvolvimento de novos fármacos que promovam dano irreversível a essa molécula, desencadeando a morte das células cancerosas (BORGES et al., 2009).

### 1.1.2 Morte celular

Classicamente alguns modelos de indução de morte celular foram caracterizados, conforme as características morfológicas desses processos, podendo-se destacar : morte associada à autofagia, morte por necrose, apoptose, *Entosis* (canibalismo celular) e morte por catástrofe mitótica. Dentre os modelos de indução de morte citados, a morte por apoptose e necrose são as que apresentam seus processos de indução a morte e morfologia celular mais difundida dentre os estudos.

A necrose caracteriza-se morfológicamente pelo inchaço das organelas e aumento do volume celular, ocasionando a ruptura da membrana plasmática e assim o extravasamento do conteúdo intracelular para o meio extracelular.

Evidências apontam que o processo de morte por necrose é regulado por mecanismos catabólicos e um conjunto de vias de transdução de sinal, podendo estar envolvidos receptores Toll-like (TLR3 e TLR4) e domínio de morte (TRAIL-R, Fas / CD95 e TNFR1), regulando o processo de necrose na ausência de caspases, aparentemente sendo dependente da cinase RIP. Assim como a regulação da necrose, os agentes desencadeadores desse tipo de morte ainda estão sendo esclarecidos. Atualmente são relatadas alterações morfológicas nas mitocôndrias envolvendo produção de EROs, a degradação lipídica, alterações nucleares e aumento nas concentrações citosólica de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) resultando na ativação de proteases independentes de caspases (KROEMER et al., 2009).

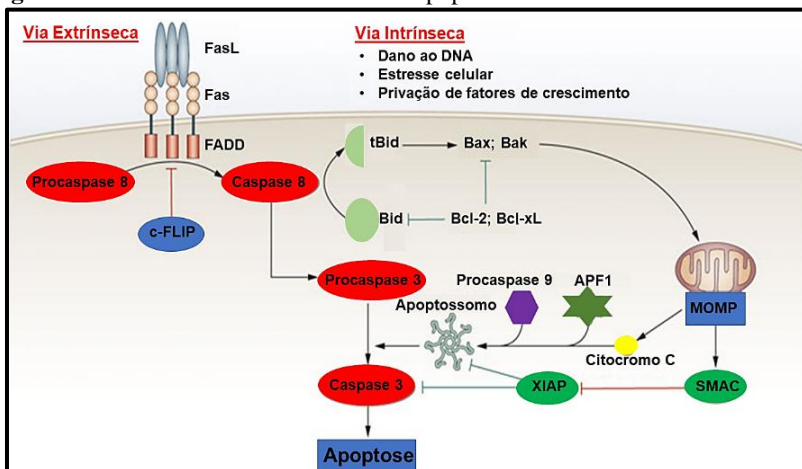
A apoptose é um processo de grande importância na embriogênese, homeostase dos tecidos assim como na defesa do organismo contra agentes patogênicos. Este processo de morte celular programada ocorre em geral em células que estão passando por algum estresse, ou células anormais. Este mecanismo de regulação celular não proporciona reações inflamatórias, impedindo que as células vizinhas saudáveis sejam atingidas (CORY; ADAMS, 2002; MEDINA et al., 2001).

O mecanismo de apoptose pode ser resumido basicamente em duas vias, a intrínseca que consiste em indução de esterases intracelulares promovendo a ativação da caspase-9 a partir do Apaf-1 (fator de ativação de proteases pró-apoptóticas), e em resposta o citocromo *c* é liberado pelas mitocôndrias danificadas (Figura 3). Este mecanismo chamado de intrínseco ou mitocondrial é regulado

principalmente pelas proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 (CORY; ADAMS, 2002; HUANG et al., 1999; STRASSER et al., 1995).

A via extrínseca, por outro lado, ativa a caspases-8. Neste caso a apoptose envolve a ligação ao ligante de morte, que se encontra na superfície celular, que se associa ao TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral) e agregando seus receptores cognatos. O FAAD (domínio de morte associado ao Fas) e outras proteínas adaptadoras ativam a caspase-8 que encaminha a célula à apoptose (HUANG et al., 1999; STRASSER et al., 1995).

**Figura 3** –Vias extrínseca e intrínseca da apoptose.



Na figura é possível observar o mecanismo de morte por apoptose envolvendo as vias extrínseca e intrínseca. Fonte: adaptado de Ramaswamy; Siegel; 2011.

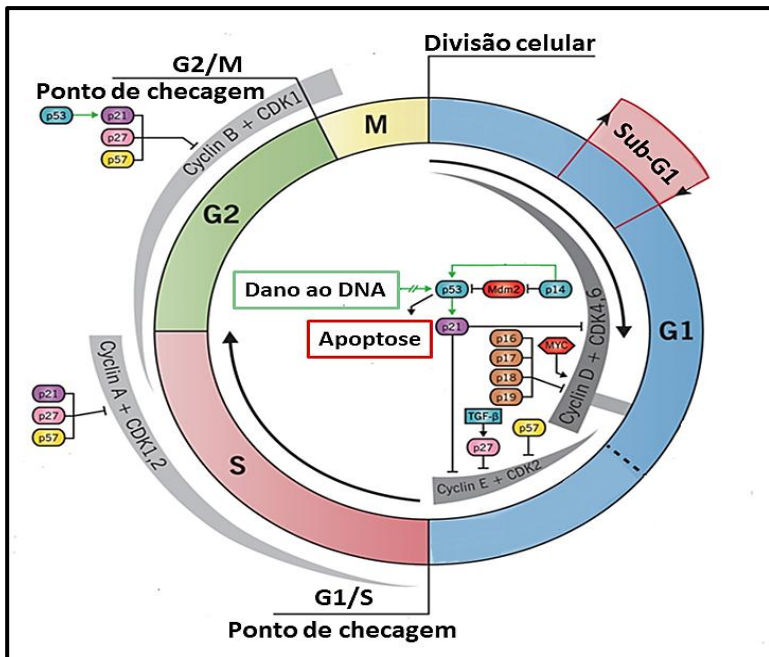
### 1.1.3 Ciclo celular

O ciclo celular é orquestrado em uma rede de eventos complexos e organizados, que ocorrem em um microambiente com diversas vias de sinalização e mecanismos de controle (Figura 4). Estes eventos têm por função realizar a divisão celular de maneira adequada e ordenada para garantir a duplicação e segregação correta do genoma, gerando duas células-filhas. Trata-se de um processo que envolve quatro fases sequenciais e exige alta energia para garantir os eventos de quiescência (fase sub-G1) até a proliferação (fases G1, S, G2 e M), retornando à quiescência (DIAZ-MORALLI et al., 2013; NORBURY; NURSE, 1992).

A primeira fase do ciclo celular é denominada G1. Nessa fase há a preparação da célula para entrar na fase de síntese mediante a mobilização de fosfatos, bases nitrogenadas e riboses, para a síntese de aminoácidos, proteínas, enzimas e nucleotídeos (INCA, 2008).

Já a fase S é sem dúvida uma das fases mais importantes deste processo. É nesta fase que as proteínas realizam a interação entre o DNA e as enzimas de duplicação, conduzindo para a replicação do DNA (WILLIAMS; STOEBER, 2012; DE FALCO et al., 2010; INCA, 2008).

**Figura 4 –** Ciclo celular.



Na figura é possível observar as principais proteínas que controlam o ciclo celular e os pontos de checagem nas fases G1/S e G2/M. Fonte: adaptado de Wong, 2008.

Após a síntese de DNA, a célula encontra-se na fase G2, preparando-se para a mitose. Nesta fase o núcleo se prepara para a divisão celular rearranjando os cromossomos. Além disso, a fase G2 também é responsável por reparar possíveis erros que podem ter

ocorrido na fase S, durante a duplicação do DNA (DE FALCO et al., 2010; KASHANIAN et al., 2008).

Na fase M ocorre a movimentação dos cromossomos e clivagem das células, dividindo os pares de cromossomos para cada uma das células filhas, que podem entrar novamente no ciclo celular na fase G1, serem conduzidas à morte ou entrar em quiescência na fase sub-G1. Em geral as células que entram na fase sub-G1 se encontram com o metabolismo reduzido. Neste caso as células não se dividirão devido à privação de fatores mitógenos ou em resposta a elevada densidade celular (INCA, 2008).

A regulação do ciclo celular é efetuada por dois pontos de checagem denominados *checkpoints*. Os pontos de checagem garantem reparos de dano e, desta forma, permite que o DNA seja dividido de forma igual para ambas as células-filhas (HARTWELL; WEINERT, 1989).

Ainda, o ciclo celular é positivamente regulado pelas proteínas efetoras ciclinas e cinases dependentes de ciclinas (CDKs). Essas proteínas interagem entre si formando o complexo CDK-ciclina e promovem a progressão do ciclo celular (WILLIAMS; STOEBER, 2012; VERMEULEN et al., 2003).

No processo de carcinogênese ocorre uma desregulação nos mecanismos de controle da progressão do ciclo celular, conduzindo à proliferação exacerbada das células tumorais. Sendo assim, o estudo de moléculas que tenham a capacidade de bloquear o ciclo celular é de extrema valia.



### 1.1.4 Terapias do câncer

Os principais tratamentos para o câncer são quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia (para tumores hormônio-responsivos, como, por exemplo, alguns tipos de câncer de mama) e cirurgia (INCA, 2004). Nos últimos anos a imunoterapia tem se destacado, com algumas ressalvas devido ao alto custo e efeitos adversos ainda não suficientemente estabelecidos (COUZIN-FRANKEL, 2013).

No entanto, na maioria dos casos, o tratamento mais abrangente é a quimioterapia. Alguns dos quimioterápicos mais utilizados na clínica médica e que tem como alvo terapêutico o DNA, são os antibióticos citotóxicos (como por exemplo a doxorrubicina), os agentes alquilantes do DNA (como por exemplo a cisplatina e a temozolomida) e os antimetabólicos (como por exemplo o metotrexato). Porém, vale ressaltar os antitumorais com outros alvos moleculares como microtúbulos, proteossomo e proteínas específicas para o controle da proliferação celular (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Em geral o principal efeito dos antitumorais está associado na capacidade de bloquear o ciclo celular, levando a morte celular por apoptose (GANGULY et al., 2010; JORDAN et al., 2004; DONALDSON et al., 1994).

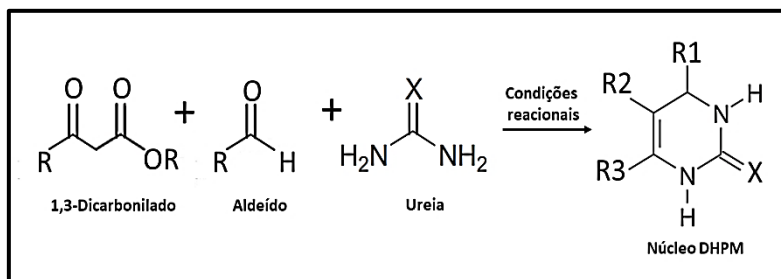
Embora proporcionem diversos benefícios ao paciente, entre eles prolongar o tempo vida, os fármacos atualmente em uso ainda são muito questionados, devido aos diversos efeitos colaterais, como vômito e náusea, sangramento, diarreia, hipotensão, alopecia, trombocitopenia, anemia, reações alérgicas, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, mucosite, neuropatia periférica, aumento da suscetibilidade a infecções dentre outros (RAMOS et. al, 2013). Os inúmeros fatores adversos, a baixa especificidade e a multirresistência celular aos fármacos (MDR) proveniente do tratamento com quimioterápicos (OCTAVIA et al. 2012), faz com que seja imprescindível a pesquisa de novas alternativas terapêuticas que sejam capazes de suprir as deficiências das opções atuais. A expectativa é que novos fármacos possam trazer menor toxicidade para células normais, maior seletividade para as células tumorais, melhorando desta forma a qualidade de vida dos pacientes acometidos com essa doença, levando em consideração a singularidade

das células tumorais quanto a estudos bioquímicos e moleculares (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

### 1.1.5 Diidropirimidinonas e seus derivados

As diidropirimidinonas (DHPM), que compreendem o alvo do presente trabalho, são uma classe de compostos heterocíclicos com grande importância química e medicinal, sendo descritos como potenciais agentes antitumorais (TRON et al., 2011). As DHPMs foram inicialmente sintetizadas a partir de uma reação de multicomponentes que consiste na utilização de três ou mais grupos funcionais distintos dando origem a um aduto, que apresenta todos os componentes envolvidos (Figura 5) (GRAEBIN et. al., 2005).

**Figura 5** – Reação multicomponentes de Biginelli.



Na figura é possível observar a formação estrutural do núcleo das diidropirimidinonas com todos seus derivados conservados. Fonte: Adaptado de Marques; Russowsky; Fontoura, 2010.

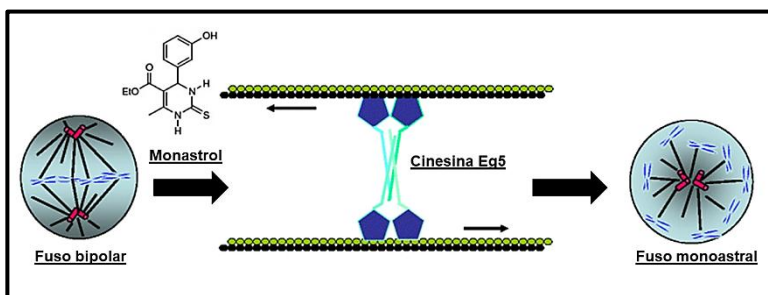
Esse processo de síntese é denominado reação de Biginelli, em homenagem a Pietro Biginelli o primeiro a descrever a técnica por reação de multicomponentes, com o fusão de três componentes, aldeídos aromáticos, um composto dicarbonílico e ureia em 1893 (BIGINELLI, 1893).

As DHPMs têm se tornado um grande atrativo na busca da síntese de novos fármacos, pela sua elevada dinamização estrutural uma vez que pode ser recombinada com diferentes aldeídos aromáticos ou alifáticos, isotioureas, tioureas e selenoureas (KAPPE; STADLER, 2004).

Nos últimos anos, as DHPMs estão sendo amplamente estudadas por demonstrar variadas atividades biológicas e farmacológicas, podendo-se destacar as atividades antiproliferativa, antibacteriana, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, antiviral e antitumoral (TREPTOW et al., 2015; BARIWAL et al., 2011).

O monastrol foi a primeira molécula derivada de DHPM que apresentou atividade antitumoral, por possuir a capacidade de se difundir através da membrana celular, afetando os processos de mitose, através do mecanismo de inibição reversível da proteína cinesina Eg5, responsável pelo pareamento dos fusos bipolar (MÜLLER et. al, 2007; KLEIN et al., 2007). Durante a mitose a proteína cinesina Eg5 tem a função de formar o eixo bipolar e separar os centrossomos (KAAN et. al, 2010). Diferentemente dos outros fármacos com a função de promover a apoptose ou senescência interferindo na mitose, o monastrol por ser inibidor específico de tal proteína não altera nenhum outro processo relacionado aos microtúbulos, deste modo essa molécula aparentemente não promove efeitos neurotóxicos (MULLER et al., 2009). Oliver e colaboradores (2014) destacam que para ocorrer a interação da molécula de DHPM com o sítio ativo da enzima é crucial que a mesma apresente grupos receptores e doadores de elétrons. Alguns derivados de DHPM têm demonstrado a capacidade de sequestrar radicais livres, além de um potencial redutor moderado, por apresentarem funções de quelantes de ferro ( $\text{Fe}^{+2}$ ) e antioxidante (GANGWAR; KASANA, 2012).

**Figura 6** – Mecanismo de ação do monastrol inibindo a proteína motora cinesina Eg5.



Na figura é possível observar o esquema de um fuso bipolar normal em metáfase e a ação inibitória do monastrol sobre a proteína motora cinesina Eg5, formando fuso monoastral. Fonte: adaptado de Huszar et al., 2009.

Em estudo realizado com células BEL-7402 (células de carcinoma hepatocelular humano) e PC-12 (feocromocitoma de rato), foi possível constatar a inibição do crescimento dessas células quando expostas aos compostos derivados de DHPM. Estudos complementares mostraram a interação e intercalação dessas moléculas com o DNA, por meio de ligações de hidrogênio (WANG et al., 2013). Assim além da proteína cinesina Eg5 como alvo molecular, o DNA também é um dos alvos promissores nos estudos das DHPM e seus derivados, como agentes antitumorais. O DNA é um excelente alvo na terapia contra o câncer, já que controla a função de replicação das estruturas celulares. Uma vez que é material de herança genética, a interação e intercalação de pequenas moléculas com o DNA de uma célula cancerosa pode resultar na parada do ciclo celular levando a morte da célula (RUSSOWSKY et. al. 2006; MAYER et. al. 1999;).

Por outro lado, Canto e colaboradores (2014) sintetizaram derivados de DHPM (selenoésteres) que apresentaram resultados promissores para atividade antiacetilcolinesterásica, assim como antioxidante por meio de distintos mecanismos, como a mimetização da glutathione peroxidase (GPx). Estas características não são observadas quando se analisa a molécula de DHPM sozinha (STEFANI et al., 2006).

### **1.1.6 Selênio**

O selênio é um nutriente fundamental para a saúde humana, principalmente por estar presente em distintas enzimas como a GPx e a tioredoxina redutase. Também apresenta função de antioxidante no balanceamento redox, na remoção de peróxidos lipídicos e de hidrogênio além de regulação hormonal (RIBEIRO et al., 2005; MUSTACICH; POWIS, 2000; YU et al., 1999). Por outro lado, nos últimos anos, diversos estudos têm evidenciado um importante papel do selênio como antitumoral (WANG et al., 2012; EL-BAYOUMY; SINHA, 2005; FERNÁNDEZ-BANÁRES et al., 2002; CLARK et al., 1996; SANDSTROM et al., 1990).

Um dos mais importantes e principais mecanismos antitumorais induzidos pelo selênio é a apoptose realizada por meio da oxidação direta de grupos de cisteína e sulfidril em domínios catalíticos de diversas enzimas celulares, e também por produção de EROs (DRAKE et al., 2006). Em mamíferos são mais de vinte selenoproteínas que se

ligam a resíduos de cisteína depois do processo transcricional (KRYUCOV et al., 2003).

O selênio está presente em algumas famílias de enzimas que estão intimamente ligadas ao tratamento de câncer. Um exemplo é a TrxR dependente de NADPH. Nesta enzima, o selênio reduz as pontes dissulfeto. Além da TrxR o selênio também está presente na família GPx, que tem por função reduzir EROs (como os peróxidos de hidrogênio) em água (MUSTACICH; POWIS, 2000; RIBEIRO et al., 2005).

Dentre os compostos calcogênicos, o selênio tem se destacado em inúmeros processos reativos, apresentando uma maior atividade biológica quando comparado com os outros elementos deste grupo 6A, como oxigênio, enxofre, telúrio e polônio (ALCOLEA et al., 2016). Corroborando, estudos com calcogênicos ligados a flavonoides apontaram um maior efeito antiproliferativo, pró-apoptótico e seletivo dos compostos associados ao selênio que os ligados ao enxofre ou ao oxigênio, em células MCF-7 e MCF-7-ADR (MARTINS et al., 2015).

Alguns dos principais efeitos dos compostos de selênio estão relacionados ao aumento nas concentrações de GSH e a inibição da enzima TrxR, desta forma apresentando grande interesse, uma vez que existe importante relação entre a superexpressão da TrxR e inúmeros tipos de câncer (MARTINS et al., 2015).

O selênio quando hibrido à molécula de zidovudina apresentou características antiproliferativas e elevada atividade pró-apoptótica, aumentando os níveis da proteína Bax e apresentando baixa hepatotoxicidade *in vivo*. Neste trabalho, destaca-se também a função dos compostos organosselênios em ativar as caspases 3 e 9 causando possível fragmentação do DNA (MUNCHEN et al., 2018; SOUZA et al., 2015).

Atualmente, as selenoureias vêm atraindo interesse quanto ao seu potencial citotóxico e antiproliferativo, devido ao fato de diversos análogos, como tioureias, indicarem alto potencial quimioterapêutico. Ensaio realizados com selenoureias heterocíclicas, resultaram em um potencial antiproliferativo frente a algumas linhagens tumorais, por inibir as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e XIAP, e ativar as caspases 3 e 7 promovendo a indução da apoptose (ALCOLEA et al., 2016). Tais resultados demonstram que análogos isostéricos da ureia contendo selênio (selenoureia), apresentam atividade antitumoral superior às tioureias, por induzir a apoptose.



## 1.2 Justificativa

O câncer é responsável por milhões de mortes anualmente em todo o mundo. Entre as principais causas desta doença está o crescimento e envelhecimento populacional, hábitos e estilos de vida considerados de risco. Atualmente o câncer tem como principais formas de tratamento, protocolos invasivos e com muitos efeitos colaterais a curto e longo prazo. Entre os tratamentos pode-se destacar intervenções cirúrgicas, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia e imunoterapia. Por vezes estes métodos levam a um controle satisfatório da doença, contudo a baixa seletividade nos tratamentos afeta não só as células neoplásicas mas também as células normais, reduzindo a eficácia do tratamento. Posto estas dificuldades se faz fundamental a busca por novas alternativas para o tratamento ao câncer. Neste sentido recentes estudos demonstram que as diidropirimidinonas podem vir a ser uma nova classe compostos a serem utilizadas no tratamento de diversas doenças, incluído o câncer.

Além das diidropirimidinonas, o elemento essencial selênio, tem sido indicado como anticancerígeno, a partir de diferentes mecanismos de ação, podendo inibir a invasão de células tumorais, regulação da proliferação celular e a promovendo a fragmentação do DNA. Assim a junção dos compostos de diidropirimidinonas e do elemento selênio, poderia resultar em um grupo de compostos com potente efeito antitumoral, maior seletividade e consequentemente menores efeitos colaterais. Portanto, vislumbrando avançar os conhecimentos na terapia do câncer, os compostos de seleno-diidropirimidinonas surgem como um importante grupo de moléculas promissoras na pesquisa de novos agentes antitumorais.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliação do potencial citotóxico, antiproliferativo e antitumoral *in vitro* de novos compostos de seleno-diidropirimidinonas.

### 2.1.1 Objetivo específico

- Avaliar a citotoxicidade dos compostos seleno-diidropirimidinona sobre células MCF-7, HeLa e McCoy;
- Avaliar a interação dos compostos seleno-diidropirimidinona com o DNA plasmidial;
- Avaliar a intercalação dos compostos seleno-diidropirimidinona com o DNA plasmidial;
- Avaliar a atividade antiproliferativa dos compostos seleno-diidropirimidinona em célula MCF-7;
- Caracterizar o tipo de morte celular induzida pelos compostos seleno-diidropirimidinona em células MCF-7;
- Avaliar a capacidade dos compostos seleno-diidropirimidinona de fragmentar o DNA em células MCF-7;
- Avaliar a capacidade dos compostos seleno-diidropirimidinona de interferir e/ou induzir a parada do ciclo celular em células MCF-7.



## 3 METODOLOGIA

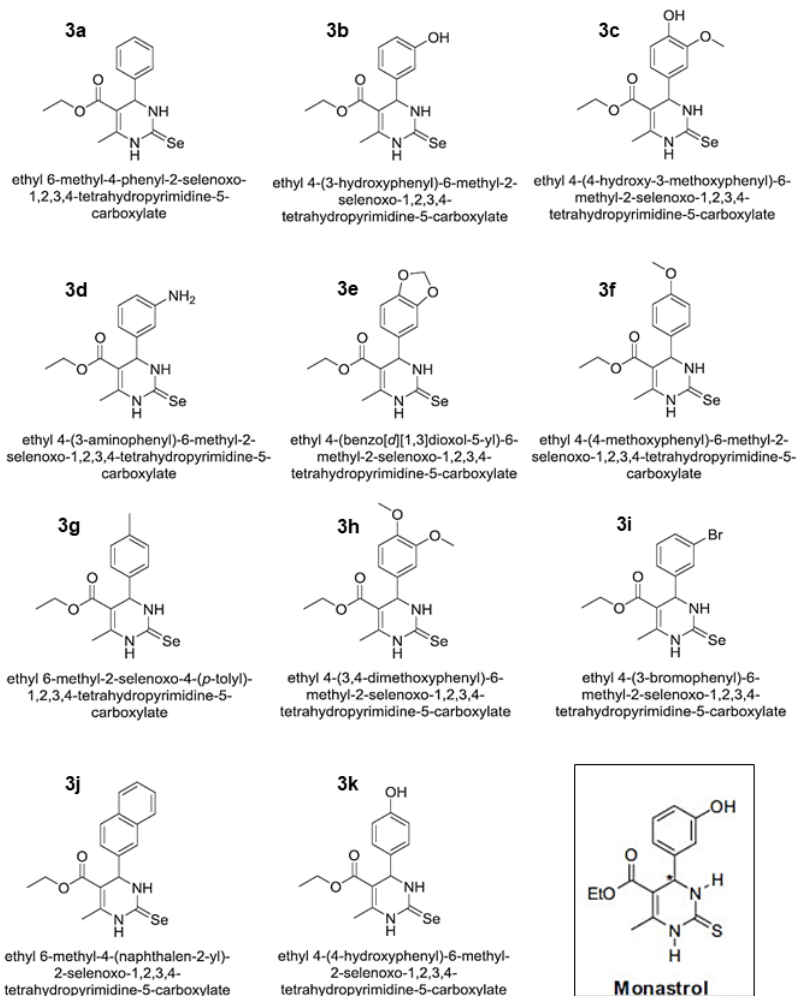
### 3.1 Reagentes

O meio de cultura modificado Dulbecco's Eagle medium (DMEM), soro fetal bovino, tampão fosfato salina (PBS) e os antibióticos para a cultura de células foram obtidos da Gibco (EUA). O *kit* de solução contendo PI/RNase foi adquirido da Immunostep. A albumina de soro bovino, 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)2,5-difenil-brometo de tetrazólio (MTT), DNA de timo de vitelo (*calf thymus DNA* – CT-DNA), iodeto de propídio, dimetilsulfóxido (DMSO), doxorubicina, nocodazol e agarose foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA).

#### 3.1.1 Síntese de seleno- diidropirimidinonas

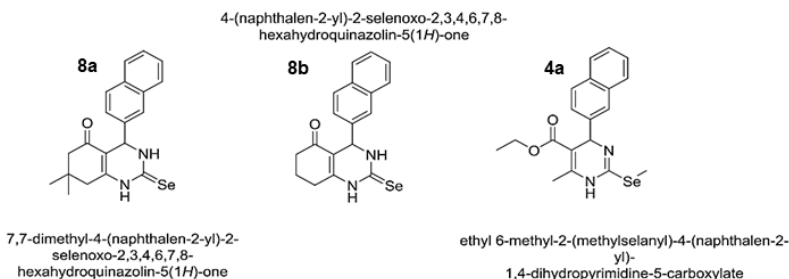
Originalmente foram estudados 11 compostos de seleno-diidropirimidinonas com diferentes demandas eletrônicas no anel aromático, sintetizados a partir da molécula protótipo monastrol, (Figura 7). Estes compostos foram sintetizados no Laboratório de Síntese de Substâncias Quirais de Selênio e Telúrio (LabSelen), coordenado pelo Prof. Dr. Antonio Luiz Braga, do Departamento de Química (UFSC). A síntese das seleno-diidropirimidinonas foram baseadas na modificação da molécula de toiureias em seleno-diidropirimidinonas utilizando uma isotioureia intermediária, a partir da reação de multicomponente, descrita por Biginelli (BARBOSA et al., 2018).

**Figura 7** – Estruturas das seleno- diidropirimidinonas sintetizadas.



Após ensaios preliminares de citotoxicidade, o composto **3j** foi selecionado como mais promissor e a partir dele foram sintetizados três novos compostos homólogos (Figura 8).

**Figura 8** – Estruturas de três novas seleno-diidropirimidinonas análogos do **3j**.



### 3.1.2 Cultura de células

As células de linhagens tumorais MCF-7 (carcinoma de mama humano) e HeLa (adenocarcinoma cervical humano) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro. A linhagem normal McCoy (fibroblasto de camundongo) foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz. Todas as linhagens foram mantidas e cultivadas a 37 °C sob atmosfera contendo CO<sub>2</sub> a 5% com 95% de umidade do ar, o que permite chegar a confluência. O meio DMEM utilizado na cultura foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), penicilina (100 U / mL) e estreptomicina (100 µg / mL).

### 3.1.3 Avaliação da viabilidade celular

A avaliação preliminar da atividade antitumoral *in vitro* das 11 seleno-diidropirimidinonas foram realizadas frente às linhagens MCF-7, HeLa e McCoy. Após a avaliação da citotoxicidade, o composto mais citotóxico **3j** foi selecionado e a partir dele foram sintetizados três compostos homólogos (Figura 8).

A viabilidade celular foi avaliada pelo método colorimétrico do MTT (brometo de 3,4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolil), que é um sal tetrazólio (amarelo-ouro), o qual é reduzido a partir do metabolismo mitocondrial, formando cristais de formazan de coloração púrpura (FRESHNEY, 1999).

O efeito das seleno-diidropirimidinonas foi avaliado frente às células MCF-7, HeLa e McCoy, plaqueadas em placas de 96 poços em uma densidade de (10<sup>4</sup> células / poço) e incubadas em temperatura de

37° C. Passadas 24 h da incubação, as células foram tratadas com as seleno-diidropirimidinonas e com o controle positivo (monastrol) em concentrações crescentes (0,1, 1, 10, 100 e 1000 µM) nos tempos de 24, 48 e 72 h. Nos poços do controle negativo, as células foram incubadas em meio contendo somente o veículo de diluição, DMSO 1%. Após o tempo de exposição dos compostos as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas durante 2 h com MTT (0,5 mg / mL). Os cristais de formazan foram então solubilizados pela adição de DMSO (100 µL / poço), e as soluções coloridas obtidas dessas diluições foram lidas a 550 nm (MOSMANN, 1983). Três experimentos independentes foram realizados, e os resultados da viabilidade celular foram apresentados como valores CI50. Os valores de CI50 obtidos ocorreram de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{[(\text{Abs teste} - \text{Abs branco}) \times 100]}{\text{Abs controle}}$$

A concentração inibitória de 50% (CI<sub>50</sub>) obtida foi calculada a partir de regressão linear e expressas em média ± desvio padrão. O controle negativo, que apresentava somente o meio com veículo foi considerado como 100% de viabilidade celular.

O índice de seletividade (IS) calculado a partir da CI<sub>50</sub> dos compostos de seleno-diidropirimidinonas também foi avaliado de acordo com o cálculo proposto por (KOCH et al., 2005):

$$(\text{IS}) = \frac{\text{CI}_{50} \text{ do composto em linhagem celular normal}}{\text{CI}_{50} \text{ do composto em linhagem celular de câncer}}$$

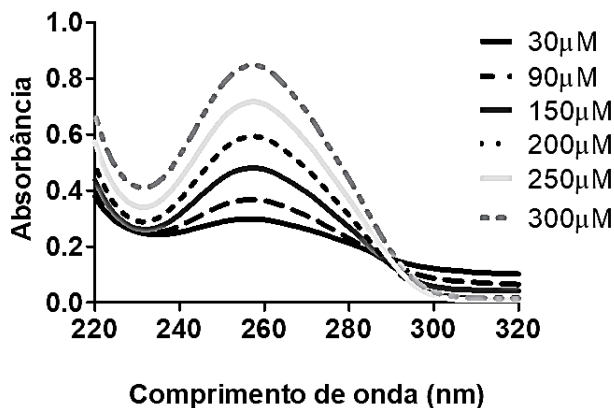
Valores inferiores a 2 indicam toxicidade não seletiva para as células avaliadas e valores igual ou maior que 2 indicam toxicidade seletividade. Com isso quanto maior o valor do IS mais seletivo o composto será frente a determinadas células.

### 3.1.4 Interação com CT-DNA

A interação entre o CT-DNA e os compostos selecionados a partir do ensaio de viabilidade celular foi realizada por espectrometria

de varredura UV-Vis (NAVARRO, 2003). Primeiramente foi obtida uma curva de absorvância somente com o CT-DNA em diferentes concentrações (30 - 300  $\mu\text{M}$ ) (Figura 9) para padronizar a concentração a ser utilizada. O espectro foi obtido lendo a absorção de 230 a 800 nm no espectrofotômetro Hitach U-2910. Os experimentos de absorção foram realizados em cubeta de quartzo, usando diferentes concentrações dos compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** (50 - 350  $\mu\text{M}$ ), mantendo constante a concentração padronizada de CT-DNA (150  $\mu\text{M}$ ). Foi determinado o deslocamento do comprimento de onda da absorvância máxima, procedendo-se a análise da interação ou não interação dos compostos com o CT-DNA.

**Figura 9** – Padronização da concentração do CT-DNA.



Curva de padronização do CT-DNA, com diferentes concentrações do CT-DNA (30 - 300  $\mu\text{M}$ ) no comprimento de onda de 220 a 320 nm.

### 3.1.5 Intercalação com CT-DNA

A intercalação com CT-DNA foi avaliada por medida da fluorescência usando um leitor de microplacas TECAN Infinity M200, de acordo com um protocolo adaptado de Da Silveira et al. (2011). O CT-DNA (150  $\mu\text{M}$ ) foi incubado com o agente de intercalação iodeto de propídio (300  $\mu\text{M}$ ) em tampão fosfato 50 mM contendo NaCl 0,1 M (pH 7,4). As titulações de fluorescência foram realizadas mantendo constante a concentração de CT-DNA e iodeto de propídio e variando a

concentração dos compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** (0 - 350  $\mu\text{M}$ ). A doxorubicina, fármaco antitumoral padrão para intercalação ao DNA, foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações dos compostos. A fluorescência foi avaliada nos comprimentos de onda de excitação 535 nm e emissão 617 nm, respectivamente.

### 3.1.6 Efeito antiproliferativo

O efeito sobre a proliferação celular foi investigado pelo ensaio de formação de colônias, de acordo com Franken et al. (2006). As células MCF-7 foram plaqueadas em placa de 6 poços, contendo 500 células por poço e incubadas a 37° C. Após 24 h, o meio foi substituído por outro contendo os compostos de seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas, **3j** (15,12  $\mu\text{M}$ ), **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ), **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ) e **4a** (5,28  $\mu\text{M}$ ), e as células foram incubadas durante 72 h. Nos poços do controle negativo, as células foram incubadas em meio contendo apenas DMSO 1%. Passado o período do tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se meio fresco. As células foram incubadas durante 15 dias sendo trocado o meio a cada 3 dias. Ao final do ensaio, o meio foi retirado e as células lavadas cuidadosamente com PBS e fixadas com metanol, sucedido pelo processo de coloração com cristal violeta (0,2%), para posteriormente serem quantificadas no software ImageJ v1.47. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem a partir da comparação com o controle negativo, considerado como 100%.

### 3.1.7 Morte celular

As células MCF-7 ( $2 \times 10^5$  células / poço) foram incubadas em placas de 6 poços e após a confluência o meio foi substituído pelos tratamentos com as seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas: **3j** (15,12  $\mu\text{M}$ ), **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ), **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ) e **4a** (5,28  $\mu\text{M}$ ), por um período de 72 h, apresentando o controle negativo apenas o veículo DMSO 1%. Decorrido o tempo de incubação as células foram transferidas para microtubo de 1,5 mL e centrifugadas durante 10 min a 1000 x g. O sobrenadante resultante da centrifugação foi descartado e as células ressuspendidas em 25  $\mu\text{L}$  de PBS. Para a coloração utilizou-se uma solução (6  $\mu\text{L}$ , 1:1) de laranja de acridina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) mais iodeto de propídio (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Posteriormente, 300 células foram categorizadas através da microscopia de fluorescência como células

viáveis, apoptóticas e necróticas. Esse experimento foi realizado em triplicata e apresentado em forma de porcentagem. De acordo com este método, as células viáveis aparecem com o núcleo corado em verde e estrutura organizada. As células apoptóticas se apresentam com o núcleo corado de laranja a vermelho com cromatina condensada e as células necróticas seu núcleo estará vermelho com a cromatina fragmentada (MCGAHON et al., 1995).

### 3.1.8 Avaliação da fragmentação do DNA

Com o intuito de avaliar se os compostos **8a** e **8b** induziam a fragmentação do DNA em célula MCF-7 utilizou-se o ensaio de cometa. Este método se baseia num processo de eletroforese de células lisadas que se apresentam em condições alcalinas e diluídas em agarose de baixo ponto de fusão, colocadas sob uma lâmina de microscopia pré-cobertas com gel de agarose. As células foram incubadas em placas de 24 poços em concentração de  $2,5 \times 10^4$  células por poço e incubadas a 37°C por 24 h. Após o período de aderência as células foram tratadas em concentrações sub-tóxicas durante 72 h, e como controle negativo utilizou-se o veículo DMSO 1%. Passado o tratamento, realizou-se a transferência das células para microtubos e centrifugação durante 5 minutos a 1000 x g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspendidas em 100 µL de PBS. Desta suspensão, 30 µL foram retirados e misturados com 70µL de agarose com baixo ponto de fusão (agarose low-melting, 0,75%). A mistura foi depositada sob uma lâmina de vidro pré-coberta com uma camada fina de agarose (1%) que permaneceram durante 10 min em temperatura de 4° C. Depois, as lâminas foram submersas em solução de lise (2,5 mM de NaCl, 100 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 10% de DMSO, 10 mM de Tris, pH 10,0) a 4 °C durante 5-7 dias. Após o processo de lise para rompimento da membrana, as lâminas foram submetidas à eletroforese horizontal sob voltagem de 25 V e corrente elétrica 300 mA por 20 min a 8° C, em uma cuba contendo tampão (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH 13). Depois da eletroforese as lâminas passaram por uma solução neutralizante (Tris-HCl 0,4 M, pH 7,5), por 5 min, processo que se repetiu por três vezes. Cerca de 1h30min depois da neutralização foi adicionada uma solução de fixação (ácido tricloroacético a 15%, ZnSO<sub>4</sub> a 5%, glicerol a 5%) por 10 min, seguida por três lavagens com água deionizada e secagem. As lâminas foram coradas com AgNO<sub>3</sub> (0,001 g/mL) e analisadas sob um

microscópio óptico. Os resultados foram expressos como índice de dano (pontuação 0-4) (ROSS et al., 1995).

### 3.1.9 Ciclo celular

A distribuição das células nas diferentes fases do ciclo celular foi avaliada de acordo com o conteúdo de DNA celular medido por citometria de fluxo usando um kit de solução PI / RNase da Immunostep® (Salamanca, Espanha) e seguiu o procedimento fornecido pelo fabricante. As células MCF-7 em concentrações de  $2 \times 10^5$  células por poço, foram incubadas em placas de 6 poços. Após a adesão, as células foram sincronizadas usando nocodazol (30 n/ mL) durante 14 h. Em seguida, o meio foi substituído por outro contendo os compostos **8a** (2,34  $\mu$ M) e **8b** (7,86  $\mu$ M) em concentrações sub-tóxicas e o controle contendo meio e DMSO 1%, e as células foram incubadas durante 72 h. Após o período de tratamento as células foram lavadas e fixadas cuidadosamente em etanol 70% a -20 °C durante 24 h. Novamente, as células foram lavadas com PBS, suspensas e incubadas com solução de PI / RNase durante 15 min sob a temperatura ambiente e ausência de luz. Finalmente, as células foram avaliadas pelo citômetro FACSCanto II (BD Biosciences). Os dados foram processados usando *Flowing Software*.

### 3.1.10 Análise estatística

Os ensaios de viabilidade, interação, intercalação, atividade antiproliferativa, morte celular, ciclo celular e dano ao DNA foram realizados em três experimentos independentes expressos pela média  $\pm$  desvio padrão (D.P.). Os dados foram analisados com o teste ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. As comparações e os valores  $CI_{50}$  foram processados usando o *software* GraphPad 5.0 (San Diego, EUA). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E MOLECULARES

#### 4.1.1 Avaliação da viabilidade celular

Inicialmente foi realizada uma triagem para avaliar a citotoxicidade das 11 seleno-diidropirimidinonas sintetizadas, em linhagens de células tumorais (MCF-7 e HeLa), em diferentes tempos de incubação (24, 48, 72 h) e concentrações (0,1-1000  $\mu\text{M}$ ). Os melhores resultados de citotoxicidade, representados pelos valores de  $\text{CI}_{50}$  (concentração inibitória de 50%), foram observados no tempo de tratamento de 72 h. Com isso, a avaliação da citotoxicidade em célula normal (McCoy), bem como os demais ensaios biológicos foram conduzidos com 72 h de tratamento. Esses efeitos foram comparados com a atividade citotóxica do composto monastrol, também em 72 h.

Todos os compostos testados demonstraram potencial citotóxico, contudo o composto designado **3j** reduziu significativamente a viabilidade celular, apresentando o menor valor de  $\text{CI}_{50}$  entre as seleno-diidropirimidinonas nas células tumorais testadas. Em pequenas concentrações este composto diminui em 50% a viabilidade celular, apresentando  $\text{CI}_{50}$  de 25,2  $\mu\text{M}$  para MCF-7 e 87,6  $\mu\text{M}$  para as células HeLa (Tabela 1). A molécula do composto **3j** difere dos demais compostos pela presença do grupamento naftaleno na sua estrutura, indicado que essa modificação estrutural pode potencializar significativamente seu efeito biológico.

**Tabela 1** – Citotoxicidade das seleno-diidropirimidinonas representada pelo valor do  $CI_{50}$  sobre diferentes linhagens tumorais.

Compostos	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )						
	24 horas		48 horas		72 horas		
	MCF-7	HeLa	MCF-7	HeLa	MCF-7	HeLa	McCoy
<b>3a</b>	>1000	>1000	>1000	893,2	452,2	909,1	251,8
<b>3b</b>	75,74	190,2	26,98	108,1	92,9	205,1	175,9
<b>3c</b>	>1000	>1000	68,99	>1000	175,8	390,2	252,7
<b>3d</b>	457,1	>1000	>1000	>1000	207,1	512,3	289,1
<b>3e</b>	>1000	>1000	110	813	200,6	283,8	212,9
<b>3f</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	301	254,3	199,1
<b>3g</b>	>1000	>1000	90,52	>1000	169,4	258,3	107,9
<b>3h</b>	143,2	>1000	112,8	177,4	247,8	149,1	135,6
<b>3i</b>	>1000	>1000	>1000	>1000	251,7	152,6	143,9
<b>3j</b>	142,2	974	48,8	193	25,2	87,6	57,7
<b>3k</b>	>1000	>1000	>1000	901,1	181,1	224,3	194,0
<b>Monastrol</b>	-----	-----	-----	-----	59,1	176,9	26,8

Citotoxicidade para os diferentes compostos obtida pelo ensaio de MTT nas concentrações de 0,1 a 1000  $\mu M$  frente às linhagens tumorais MCF-7e HeLa em tratamentos de 24, 48, 72 h, e linhagem celular normal McCoy (72 h). Os dados da  $CI_{50}$  foram obtidos a partir de três experimentos independentes e os resultados expressos pela média  $\pm$  D.P.

Em função dos resultados apresentados e com o intuito de melhorar a atividade citotóxica, assim como a seletividade, três novos análogos do composto **3j** foram sintetizados, mantendo em todos os grupamentos o naftaleno na estrutura (Figura 8).

Os três novos análogos do **3j** apresentam duas modificações principais em suas estruturas, sendo estas: a modificação da fração seleno-diidropirimidinona por metilação do átomo de selênio levando a uma iso-selenourea denominada **4a** e ciclização na cadeia lateral, levando aos compostos **8a** e **8b**. Essas modificações resultaram em compostos mais citotóxicos quando comparados com as demais seleno-diidropirimidinonas, incluindo o composto **3j** (Tabela 2). No entanto, vale ressaltar que o composto **8a** destacou-se entre todos os demais, apresentando maior citotoxicidade tanto para células MCF-7 quanto para Hela além de maior seletividade em relação a célula normal McCoy. O composto **8b** também apresentou citotoxicidade maior que **3j**, contudo não apresentou seletividade, uma vez que de acordo com Koch et al. (2005) é considerado seletivo o composto que apresentar o índice de seletividade maior do que 2 ( $IS \geq 2$ ). Assim, como o composto **8b**, o **4a** mostrou um valor  $CI_{50}$  inferior ao **3j**; no entanto, o composto **4a** também não se mostrou seletivo, sendo muito tóxico tanto para células tumorais quanto para células normais.

**Tabela 2** – Citotoxicidade das seleno-diidropirimidinonas representada pelo valor do  $CI_{50}$  ( $\mu M$ ) e índice de seletividade (IS) sobre diferentes linhagens tumorais.

Compostos	$CI_{50}$ ( $\mu M$ )			Índice de Seletividade (IS)	
	MCF-7	HeLa	McCoy	MCF-7	HeLa
<b>3j</b>	25,2	87,6	57,7	2,2	0,6
<b>8a</b>	3,9	12,2	425,8	109,1	34,9
<b>8b</b>	13,1	26,2	22,4	1,7	0,8
<b>4a</b>	8,8	11,2	-----	-----	-----
<b>Monastrol</b>	59,1	176,9	26,8	-----	-----

Citotoxicidade das seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a**, **8b** e **4a** com tratamento de 72 h para as linhagens tumorais MCF-7, HeLa e linhagem normal McCoy. O índice de seletividade (IS) foi obtido a partir do cálculo:  $IS = CI_{50}$  do composto para linhagem normal /  $CI_{50}$  do composto para linhagem tumoral. Os dados da

CI<sub>50</sub> foram obtidos a partir de três experimentos independentes e os resultados expressos pela média  $\pm$  D.P.

Os resultados obtidos mostram que a modificação nos grupos dimetas na posição 7 da cadeia lateral no composto **8a** foi importante para a obtenção de uma maior citotoxicidade e seletividade para as células tumorais, quando comparado aos demais compostos, inclusive com o monastrol.

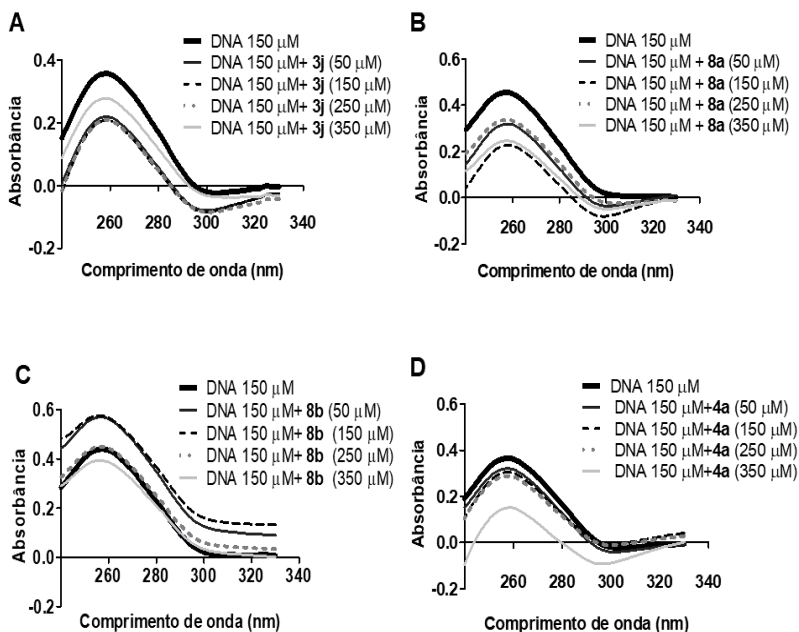
A partir dos resultados obtidos, pode-se constatar um melhor efeito citotóxico, especialmente em células MCF-7, para o composto **3j** e seus análogos (**8a**, **8b** e **4a**). Sendo assim, os demais experimentos foram conduzidos com essa linhagem celular tratada com os compostos mencionados.

#### 4.1.2 Interação com CT-DNA

Com intuito de investigar os possíveis mecanismos que levaram a diminuição da viabilidade celular, os compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** foram avaliados quanto a capacidade de interagir com o CT-DNA, por espectrometria, que é um método eficiente para examinar os tipos de ligação de compostos com o CT-DNA.

A mudança na absorbância do CT-DNA ao ser exposto a diferentes concentrações dos compostos evidenciou uma diminuição da absorbância do CT-DNA indicando um efeito hipocrômico com as seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a** e **4a**, sugerindo uma possível intercalação desses compostos à molécula do CT-DNA. Assim como os demais, o composto **8b** também interagiu com o CT-DNA, mas de modo diferente, aumentando a absorbância, indicando um efeito hipercrômico, comportamento que sugere a ligação não covalente do composto com o CT-DNA, causando alterações conformacionais nessa molécula (Figura 10).

**Figura 10** – Interação de seleno-diidropirimidinonas com CT-DNA em diferentes concentrações.



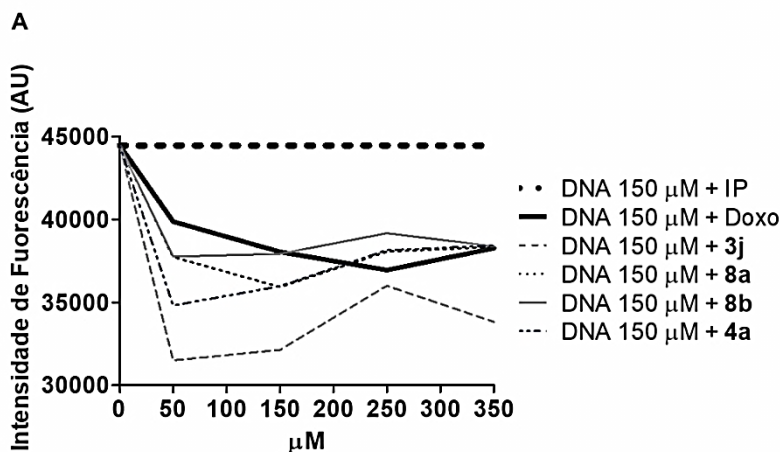
Espectrometria UV/Vis da interação dos compostos de seleno-diidropirimidinonas. Efeitos causados pela ação dos compostos, **3j** com CT-DNA (A), composto **8a** com CT-DNA (B), composto **8b** com CT-DNA (C) e o composto **4a** com CT-DNA (D). Compostos testados em diferentes concentrações (50-350  $\mu$ M), enquanto a concentração do CT-DNA foi fixada em 150  $\mu$ M. Leitura da absorbância nos comprimentos de onda de 230 a 340 nm.

#### 4.1.3 Intercalação com CT-DNA

Os dados apresentados na figura 11 indicam que além de interagir com o CT-DNA, como demonstrado nos resultados anteriores, os compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** também intercalam na molécula de CT-DNA.

O possível efeito de intercalação dos compostos foi investigado pelo ensaio com iodeto de propídio, usado por exibir uma forte intercalação entre pares de bases adjacentes do DNA. As seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a**, **8b**, **4a**, em contato com o CT-DNA e o iodeto de propídio, foram capazes de remover o iodeto de propídio e se inserir entre as fitas de DNA diminuindo desta forma a fluorescência, dando indício de uma possível característica intercalante dessas moléculas. Estes resultados são de grande interesse, uma vez que a intercalação promovida pelos compostos em estudo é um mecanismo de ação compartilhado por diferentes fármacos antitumorais como a doxorrubicina que possui entre seus mecanismos de ação a intercalação neste ácido nucléico.

**Figura 11** – Intercalação das seleno-diidropirimidinonas e doxorrubicina com CT-DNA.

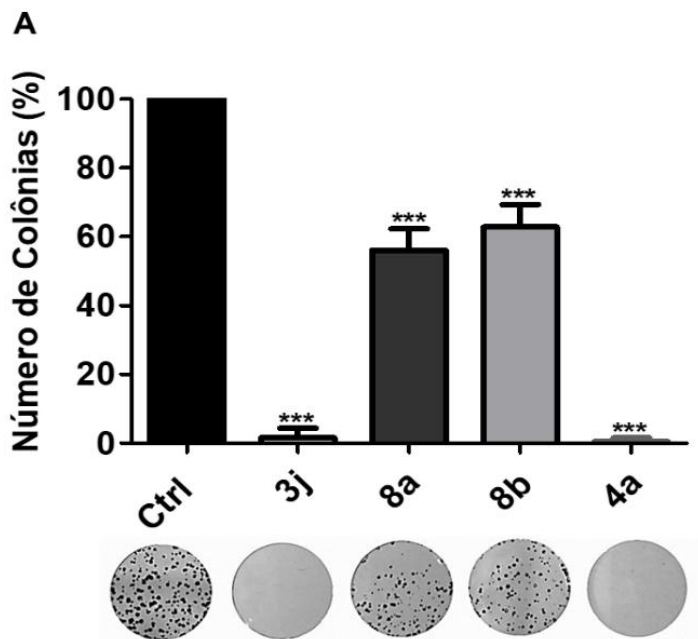


Os compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** foram testados nas concentrações de (0 a 350 μM), com concentração fixa do CT-DNA (150 μM) e do iodeto de propídio (IP) (350 μM). Para o controle positivo utilizou-se doxorrubicina nas mesmas concentrações dos tratamentos.

#### 4.1.4 Avaliação da atividade antiproliferativa

Além da atividade citotóxica, o potencial antiproliferativo de um composto é de extrema importância, uma vez que avalia a capacidade de recuperação das células tumorais, após a exposição a um determinado composto. As seleno-diidropirimidinonas foram testadas em concentrações sub-tóxicas, utilizando os valores da  $CI_{30}$  **3j** (15,12 $\mu$ M), **8a** (2,34 $\mu$ M), **8b** (7,86 $\mu$ M), **4a** (5,28 $\mu$ M) frente a células MCF-7. Os resultados indicam efeito antiproliferativo significativo após 72 h de exposição, como pode ser observado na figura 12. Os dados obtidos sugerem que mesmo em dose sub-tóxica os compostos inibem o processo clonogênico, reduzindo o número de colônias. Todas as seleno-diidropirimidinonas foram capazes de reduzir significativamente o número de colônias quando comparadas ao controle negativo. Os compostos **3j** e **4a** demonstraram resultados semelhantes com diminuição de mais de 90% na formação de colônia, sugerindo elevada citotoxicidade. Já os compostos **8a** e **8b** demonstraram redução de 40% e 30%, respectivamente, em comparação com as células não tratadas. A partir destes dados é possível inferir que todos os compostos derivados do **3j** têm a capacidade de manter os danos às células tumorais, mesmo após cessar o tratamento.

**Figura 12** – Efeito antiproliferativo das seleno-diidropirimidinonas sobre células MCF-7.



Células MCF-7 tratadas com concentrações sub-tóxicas dos compostos **3j** (15,12 $\mu$ M), **8a** (2,34 $\mu$ M), **8b** (7,86 $\mu$ M) e **4a** (5,28 $\mu$ M), durante 72h. Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. Valores expressos como média  $\pm$  D.P, (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas em  $p < 0,001$  em comparação com células de controle (não tratadas). Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

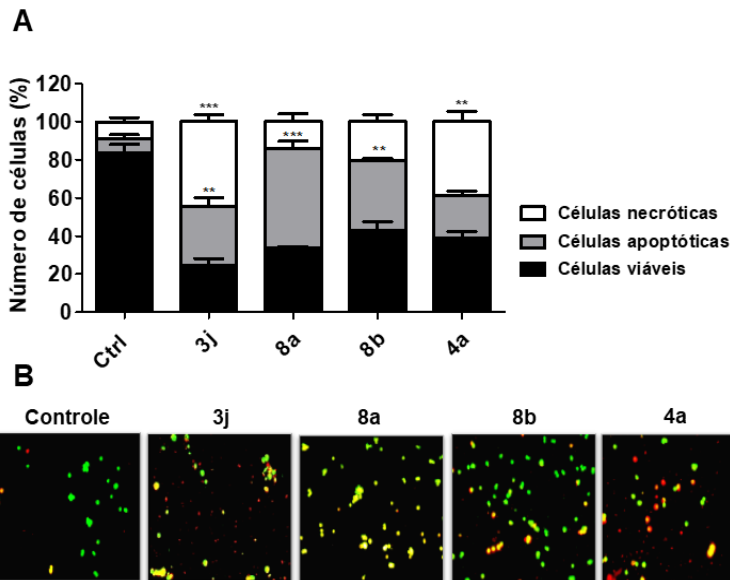
#### 4.1.5 Indução da morte celular

Ao avaliar a capacidade das seleno-diidropirimidinonas em induzir a morte celular, foi possível constatar que todos os eventos



apresentados anteriormente culminaram em morte das células MCF-7. As análises morfológicas destas células revelaram a cromatina condensada e núcleos corados em laranja a vermelho. Tais dados apontam para incorporação de iodeto de propídio e laranja de acridina, nas células MCF-7 tratadas com doses sub-tóxicas dos compostos (**3j** (15,12 $\mu$ M), **8a** (2,34 $\mu$ M), **8b** (7,86 $\mu$ M) e **4a** (5,28 $\mu$ M)), durante 72 h. O resultado sugere que os compostos foram capazes de levar as células tumorais à morte pelo processo de apoptose e necrose, diminuindo significativamente as células viáveis como pode ser observado na figura 13. Os compostos **8a** ( $p < 0,001$ ) e **8b** ( $p < 0,01$ ) apresentaram um maior número de células apoptóticas quando comparados ao controle negativo. Tais dados demonstram que os compostos **8a** e **8b** agem sobre as células tumorais conduzindo prioritariamente à morte programada, não apresentando diferença estatística quanto às células necróticas para nenhum dos tratamentos. Já o composto **3j**, apesar de ter induzido a apoptose, também induziu à necrose de forma significativa ( $p < 0,001$ ). O composto **4a**, conduziu as células MCF-7 preferencialmente à morte por necrose.

**Figura 13** – Indução da morte celular em células MCF-7, via apoptose e necrose pelos tratamentos com seleno-diidropirimidinonas.



Morte celular analisada pela coloração com IP/LA, induzida pelo tratamento com seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas (**3j** (15,12  $\mu\text{M}$ ), **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ), **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ), **4a** (5,28  $\mu\text{M}$ )) em células MCF-7, durante 72 h. Número de células viáveis, apoptóticas e necróticas, representado em porcentagem (A); imagens das análises microscópicas (B). Os dados foram obtidos a partir de três experimentos independentes. (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,001$  e (\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,01$  em comparação com células do controle negativo (não tratadas). Valores expressos como média  $\pm$  D.P. Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

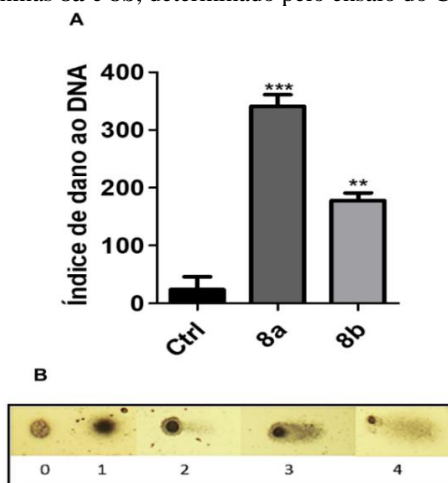
Esses resultados vão de encontro com os resultados apresentados no ensaio de proliferação celular, indicando que os compostos **3j** e **4a**, possivelmente, apresentem elevada toxicidade, o que não seria benéfico para as células normais em um possível tratamento antitumoral. Sendo assim, os demais ensaios foram conduzidos com os compostos **8a** e **8b**.

#### 4.1.6 Dano ao DNA

As seleno-diidropirimidinonas parecem ter ação sobre o DNA, conforme observado nos ensaios moleculares nos quais estas moléculas foram colocadas em contato direto com o CT-DNA (Figuras 10 e 11). Em células MCF-7, os compostos **8a** e **8b** apresentaram resultados relevantes com significativo efeito antiproliferativo e indução da morte celular por apoptose. Sendo assim, a capacidade desses compostos em causar a fragmentação do DNA de células MCF-7 foi avaliada.

Os resultados obtidos no ensaio do cometa, realizado após 72 h de tratamento com doses sub-tóxicas dos compostos **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ) e **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ), demonstraram que houve considerável fragmentação do DNA (Figura 14). Ambos os compostos testados causaram danos significativos a este ácido nucleico quando comparado ao controle. Estes dados indicam que as seleno-diidropirimidininas **8a** ( $p < 0,001$ ) e **8b** ( $p < 0,01$ ) foram capazes de atravessar as membranas plasmática e nuclear e fragmentar o DNA.

**Figura 14** – Índice de dano ao DNA após tratamento das células MCF-7 com as seleno-diidropirimidininas **8a** e **8b**, determinado pelo ensaio do Cometa.



Índice de dano ao DNA de células MCF-7, induzidas por seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas dos compostos **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ) e **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ) (A). Escores de fragmentação do DNA (B). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes, (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas em  $p < 0,001$  e (\*\*) indicam diferenças estatísticas em  $p < 0,01$  em

comparação com o controle (células não tratadas). Valores expressos como média  $\pm$  D.P. Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

#### 4.1.7 Análise do ciclo celular

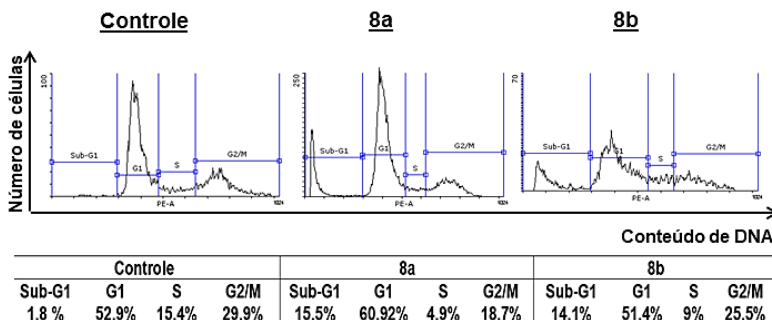
Um efeito sobre a proliferação celular é um dos principais atributos que se espera de um fármaco para o tratamento do câncer. Isto porque a inibição da proliferação celular está intimamente relacionada com a capacidade de uma molécula causar a parada do ciclo celular e assim levar a célula à morte.

Assim, o bloqueio do ciclo celular e a fase em que esse evento acontece é de grande importância na investigação de novos possíveis alvos terapêuticos. Na figura 15 são apresentadas as alterações no ciclo celular causadas pelos compostos **8a** e **8b** em células MCF-7. A partir dos resultados apresentados nos histogramas (Figura 15 A) pode-se verificar que ambos os compostos causaram mudanças significativas na distribuição celular ao longo do ciclo celular. Os tratamentos com os compostos **8a** e **8b** causaram um aumento significativo de um pico na fase sub-G1 quando comparado ao controle,  $p < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente (Figura 15 B). Conforme proposto por Sagar; Green (2009), este pico em sub-G1 é um indicativo de apoptose após as células serem submetidas a um tratamento que induza a morte celular.

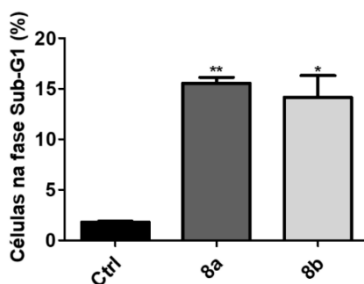
A figura 15 C evidencia que as seleno-diidropirimidinonas **8a** ( $p < 0,001$ ) e **8b** ( $p < 0,01$ ) foram capazes de bloquear o ciclo celular na fase S, sendo este um possível indicativo do dano ao DNA causado pelos compostos estudados.

**Figura 15** – Alterações no ciclo celular causadas pelo tratamento das células MCF-7 com as seleno-diidropirimidininas **8a** e **8b**.

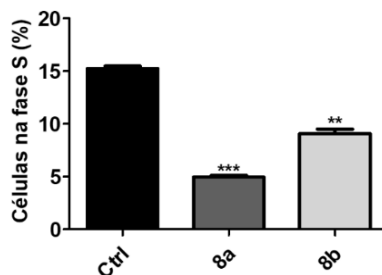
**A**



**B**



**C**



Análise de citometria de fluxo da progressão do ciclo celular de células MCF-7, na presença de seleno-diidropirimidinonas em concentrações sub-tóxicas dos compostos **8a** (2,34  $\mu\text{M}$ ), **8b** (7,86  $\mu\text{M}$ ) e porcentagem da distribuição de células nas diferentes fases do ciclo celular (A). Gráfico representando a porcentagem de células na fase sub-G1 (B) e porcentagem de células na fase S (C). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes e os valores expressos como média  $\pm$  D.P. (\*\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,001$ , (\*\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,01$  e (\*) indicam diferenças estatísticas de  $p < 0,05$  em comparação com células do controle (não tratadas). Os resultados foram avaliados pelo teste de Tukey ao nível de 95% de significância.

## 5 DISCUSSÃO

As DHPMs constituem uma classe de compostos heterocíclicos com grande importância química e medicinal devido a sua versatilidade estrutural (TREPTOW et al., 2015; DA SILVA et al., 2012; AGBAJE et al., 2011). Já compostos de selênio têm sido extensivamente estudados e relatados para o tratamento de algumas doenças, inclusive como antitumorais por inibir a proliferação celular e induzir a morte de células cancerosas (WHANGER et al., 2004; GANTHER et al., 1999; IP et al., 1998). No presente trabalho, foram testados compostos derivados de diidropirimidinonas contendo selênio em suas estruturas, com diferentes demandas eletrônicas no anel aromático e inéditos na literatura científica.

Dados da literatura demonstram que tanto os compostos derivados de DHPMs quanto compostos contendo selênio em suas estruturas apresentam um efeito citotóxico tempo-dependente para diferentes linhagens celulares (YADLAPALLI, et al., 2012; AGBAJE et al., 2011; SUZUKI et al., 2010; RUSSOWSKY et al., 2006). O mesmo perfil foi observado nas seleno-diidropirimidinonas estudadas neste trabalho, tanto para células MCF-7 quanto para células HeLa.

Dentre os compostos testados inicialmente, o composto **3j**, o qual possui o naftaleno na posição 4 do núcleo DHPM, apresentou maior efeito inibitório sobre a viabilidade celular de ambas as linhagens tumorais testadas (Tabela 1). O naftaleno é um hidrocarboneto aromático, com dois anéis de benzeno fundidos, que pode ser relacionado a ações sobre o DNA (SAEED et al., 2007). Agbaje e colaboradores (2011) testaram a citotoxicidade de 17 derivados de diidropirimidinonas em linhagem de câncer de cólon (colo 320 HSR) e verificaram que os melhores resultados, quanto ao efeito antitumoral, foram obtidos para os compostos que apresentavam em sua estrutura os radicais naftila e naftilo. Aliada ao naftaleno, a presença do selênio parece também ter desempenhado um papel importante para a citotoxicidade do composto **3j**. Alguns trabalhos mostraram que compostos contendo selênio possuíam a capacidade de atuar como modulador de agentes antitumorais, levando ao aumento da atividade biológica (KIM et al., 2007; CAO et al., 2004). Por outro lado, a ação farmacológica antitumoral do selênio parece estar relacionada à dose administrada e absorção no meio intracelular (COLLERY et al., 2018).

A partir desses resultados, foram sintetizados análogos do composto **3j** (**8a**, **8b** e **4a**) (Figura 8). As modificações realizadas nos

análogos de **3j** (metilação do selênio e ciclização da cadeia lateral) são bem conhecidas nas relações estrutura-atividade no núcleo DHPM como agentes antitumorais, e essas modificações geralmente levam a moléculas mais ativas (KAAN et al., 2010). Os novos compostos sintetizados apresentaram um efeito mais promissor no que diz respeito à citotoxicidade; porém, os designados como **3j** e **8a** destacaram-se quanto à seletividade para as células tumorais testadas, especialmente para a célula MCF-7 (Tabela 2). A seletividade de agentes antitumorais busca explorar as diferenças que existem entre células normais e tumorais. A seletividade e o efeito antitumoral do selênio vêm sendo relacionados com as vias Nrf2-Prx1. As peroxiredoxinas (Prx) são uma família de tióis-peroxidases que juntamente com a glutatona peroxidase (GPx) e catalase (CAT), controlam o acúmulo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) celular, mantendo a homeostasia redox (PARSONAGE et al., 2008; TRUJILLO et al., 2007). O ambiente de hipóxia na célula tumoral regula negativamente o gene Keap1, um supressor do fator de transcrição Nrf2. A ativação do Nrf2 regula positivamente a Prx1, que interage com proteínas reguladoras, proporcionando em células cancerígenas vantagens como crescimento, sobrevivência e agressividade (CHO et al., 2013). Yoon e colaboradores (2001) descobriram em seus estudos que o selênio é capaz de modular a ativação do Nrf2 de maneira diferente em células cancerosas e células normais. Desta forma, evidenciando que o selênio diminuiu a ativação de Nrf2 reduzindo a regulação de Prx1 em tecidos tumorais. Tais eventos conduzem a um aumento da citotoxicidade da molécula contendo selênio. Já as células normais mantêm o estado redox em homeostase e por consequência a saturação normal de oxigênio, diminuindo a toxicidade. Assim, o efeito do selênio parece ser bastante significativo para tecido tumoral. Em células MCF-7, devido ao ambiente de hipóxia, o Nrf2 está ativado e esta característica tem sido relacionada à resistência à quimioterapia com doxorubicina (ZHONG et al., 2012). Abdullaev e colaboradores (1992) verificaram que os níveis intracelulares de compostos de selênio após os tratamentos são maiores em células cancerosas do que em células normais, possivelmente devido ao ambiente de hipóxia. Desta forma, pode-se inferir que células tumorais se mostram mais sensíveis a seleno-compostos do que células normais (KAECK et al., 1997; ABDULLAEV; et al., 1992; KUCHAN; MILNER, 1991; FICO et al., 1986). De acordo com o comentado anteriormente, a seletividade dos compostos **3j** e especialmente **8a** em células MCF-7 pode estar relacionada à ação do selênio e às

características do ambiente de hipóxia presente no ambiente metabólico desta linhagem celular.

A presença do selênio e do naftaleno parece ser primordial para a citotoxicidade das seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a**, **8b** e **4a**. Inúmeros trabalhos demonstram que o naftaleno pode intercalar na molécula de DNA por meio de interação com a guanina, seguido das demais bases nitrogenadas (CHO et al., 2013; LIU; et al., 1996; LOKEY et al., 1997; SESSLER et al., 1998). Ainda, compostos derivados de diidropirimidinonas aromáticos, heterocíclicos, planares e não planares têm potencial de ligação aos sulcos e de sobreposição com os pares de bases de DNA (WANG et al., 2013). Tendo em vista essas características, a ação dos compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** sobre a molécula de CT-DNA foi avaliada. Significativas mudanças no espectro de absorvância do CT-DNA foram observadas após o mesmo ser exposto a diferentes concentrações dos compostos estudados (Figura 10). O efeito hipocrômico para os compostos **3j**, **8a** e **4a** indica a ocorrência de fortes ligações desses compostos com CT-DNA, bem como sugere intercalação. Já o efeito hiperacrômico observado para o composto **8b** sugere a ocorrência de ligações não covalentes entre o composto e o CT-DNA. Alguns autores relatam efeitos semelhantes sobre a molécula de DNA para diferentes moléculas derivadas de diidropirimidinonas (YAN; LU, 2013; TAN et al., 2007; WANG; et al., 2012).

Rehman et al. (2009) destaca que o efeito hipocrômico é característico de compostos que promovem a intercalação com os pares de bases do DNA. Portanto, o possível efeito intercalante dos compostos à molécula de CT-DNA foi avaliado (Figura 11). Os resultados obtidos evidenciam que os compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** foram capazes de deslocar e tomar o lugar do iodeto de propídio na molécula de CT-DNA, reduzindo a fluorescência. Tal efeito é considerado um forte indicativo para a intercalação das seleno-diidropirimidinonas estudadas sobre a molécula de DNA. Estes resultados estão de acordo com outros estudos com diidropirimidinonas, os quais demonstram um possível efeito intercalante dessas moléculas (WANG et al., 2012). Wang e colaboradores (2013) concluem que modificações na posição 4 do anel benzênico em derivados de diidropirimidinonas, tal como as alterações feitas nos compostos estudados neste trabalho, alteram significativamente as propriedades de ligação com o DNA. Dada a importância dos resultados obtidos frente à molécula de CT-DNA, ensaios subsequentes foram conduzidos em células MCF-7 com os compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** com vistas a elucidação do efeito biológico antitumoral.



A proliferação celular exacerbada e sem controle é um dos principais mecanismos para a progressão do tumor (BARRETT et al., 1993). Conforme observado neste estudo, todos os compostos testados apresentaram significativo efeito antiproliferativo ( $p < 0,001$ ), conforme apresentado na figura 12. A inibição da proliferação e angiogênese em células MCF-7 tratadas com diferentes análogos de diidropirimidinonas estão relacionados com a inibição da proteína motora cinesina Eg5, proteína envolvida na formação e função do fuso mitótico e ao dano ao DNA (GUIDO et al., 2015; SUN et al., 2011). Os inibidores mitóticos tradicionais, como os alcaloides da vinca e taxanos, agem sobre a tubulina nos microtúbulos, podendo apresentar como efeito adverso a neurotoxicidade. Já as diidropirimidinonas diferem-se por inibir de forma alostérica a cinesina Eg5, não interferindo nos processos relacionados aos microtúbulos, desta forma não apresentando efeitos neurotóxicos (WOOD et al., 2001). Compostos contendo selênio se mostraram eficazes na inibição do crescimento de células cancerosas, diminuindo a proliferação por meio do bloqueio da divisão celular ou aumento da morte das células (WHANGER et al., 2004; GANTHER et al., 1999; KAECK et al., 1997). Outros estudos indicam que compostos contendo selênio promovem a redução do número de células pela parada do ciclo na fase G1 ou na fase S (KAECK et al., 1997; SINHA et al., 1996). Yan e Frenkel (1992) destacaram a ação do selênio sobre a diminuição na formação de colônias. A partir dos resultados obtidos para os tratamentos das células MCF-7 com as seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a**, **8b** e **4a**, aliados com dados da literatura, sugere-se que o efeito antiproliferativo de tais compostos possa ter ocorrido devido a ação dos mesmos sobre o fuso mitótico, sugerindo futuros estudos com esses compostos sobre o processo de divisão celular.

Aliado ao efeito antiproliferativo os compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** foram capazes de induzir a morte celular (Figura 13). Deste resultado, vale ressaltar que os compostos **8a** ( $p < 0,001$ ) e **8b** ( $p < 0,01$ ) induziram, preferencialmente, a morte por apoptose em células MCF-7. Estes dados estão de acordo como os resultados de Guido e colaboradores (2015), os quais mostram que células MCF-7 tratadas com derivados de diidropirimidinonas, por 72 h, também apresentaram morte celular por apoptose. A apoptose é um processo de morte celular programada sem causar danos inflamatórios teciduais; desta forma, moléculas capazes de induzirem esse tipo de morte são promissoras para o desenvolvimento de fármacos antitumorais (VRIZ et al., 2014). Dados da literatura mostram que células tumorais tratadas com compostos

contendo selênio em suas estruturas foram conduzidas à morte tanto por apoptose quanto por necrose (NORDBERG; ARNÉR, 2001; SAMALI et al., 1999). Tais efeitos estão relacionados, sobretudo ao aumento de EROs devido possivelmente à inibição de enzimas como tioredoxina redutase, conduzindo ao dano mitocondrial e a morte celular (KORGE; CALMETTES; WEISS, 2015; RECZEK; CHANDEL, 2015; GAUTHIER et al., 2003; PLOTKOWSKI et al., 2002). Estudos mostram também que compostos contendo selênio podem modular a transcrição de proteínas envolvidas no processo de morte celular por apoptose, como Bax e Bcl-xL (CHAKRABORTY et al., 2016a; CHEN; WONG, 2009; HUANG et al., 2009). Alguns trabalhos ainda demonstram que moléculas derivadas do monastrol, como dimetil enastrol, podem inibir cinesinas desencadeando a catástrofe mitótica e conduzindo as células para a apoptose (CARTER et al., 2009; MAYER et al., 1999).

Tendo em vista os promissores resultados obtidos especialmente para as seleno-diidropirimidinonas **8a** e **8b**, principalmente no que diz respeito à indução da morte por apoptose, o possível efeito desses compostos sobre o DNA de células MCF-7 foi avaliado (Figura 14). O composto **8a** difere do composto **8b** pela dimetilação na posição 7 da seleno-diidropirimidinona, conforme mostrado na figura 8. De acordo com Müller e colaboradores (2007) a dimetilação na posição 7 em análogos do monastrol aumentou consideravelmente os efeitos citotóxicos dos compostos em células de glioma humano. Tanto o composto **8a** ( $p < 0,001$ ) quanto o composto **8b** ( $p < 0,01$ ) foram capazes de induzir a fragmentação do DNA das células tratadas. Conforme discutido anteriormente, o naftaleno (grupamento presente nos compostos **8a** e **8b**) é relatado na literatura como importante grupamento intercalante do DNA (CHO et al., 2013). Com isso, pode-se inferir que o efeito dos compostos testados sobre a fragmentação do DNA possivelmente pode estar, em parte, envolvido com a presença no naftaleno nessas moléculas. Conforme discutido anteriormente, compostos organoselênios podem estar envolvidos no aumento da geração de EROs intracelular, o que é relacionado com a fragmentação do DNA (CHAKRABORTY et al., 2016b). A geração de EROs foi relacionado ao potencial antitumoral de compostos de selênio em células de hepatocarcinoma (HepG2), carcinoma de mama murinho (TM6), carcinoma de mama humano (SKBR3) entre outras (SHEN et al., 2002; SINHA; VADGAMA et al., 2000). Os estudos de interações de moléculas com o DNA são de suma importância, não apenas para entender melhor esse mecanismo, mas para o desenvolvimento de novos

fármacos (RESCIFINA et al., 2014). Quebras na dupla-fita do DNA são relatadas como o principal mecanismo de ação de alguns quimioterápicos comumente utilizados na clínica médica levando a inibição da replicação e conseqüente morte celular como é o caso da doxorrubicina e cisplatina (YANG et al., 2016; JEKIMOVVS et al., 2014;).

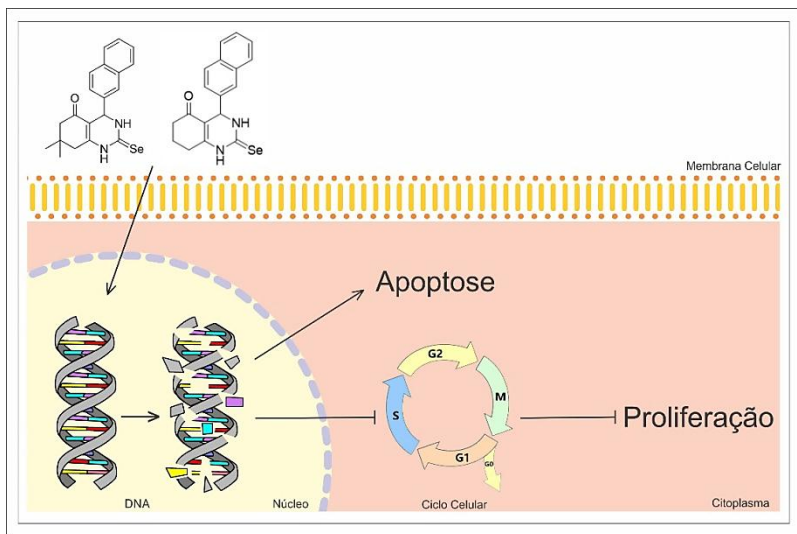
A diminuição da proliferação celular e indução de morte por apoptose está intimamente relacionada com a inibição da progressão da divisão celular. Ao investigar a ação da seleno-diidropirimidinonas **8a** e **8b** sob o ciclo celular foi possível constatar o aumento de células na fase sub-G1 e o bloqueio da fase S, em células MCF-7 (Figura 15). Estes resultados corroboram com os obtidos para a inibição da proliferação celular, fragmentação no DNA e morte celular por apoptose após o tratamento das células com os compostos em estudo. Li e colaboradores (2007) ao tratarem células de câncer de próstata com compostos de selênio observaram um aumento na geração de EROs, o qual foi relacionado a ativação da proteína p53, bloqueio do ciclo celular e morte por apoptose via ativação da proteína Bax. Ainda, alguns trabalhos demonstram que compostos com selênio são capazes de ocasionar a fragmentação do DNA, promovendo a ativação da caspase-3, além da regulação negativa de fatores de crescimento (CHAKRABORTY et al., 2016; CAO et al., 2004). Vale destacar que a diminuição na fase de síntese do DNA, durante a fase S do ciclo celular, é dependente do nível do dano causado no DNA (WILLIS; RHIND, 2009). Por fim, a potencial inibição da cinesina Eg5 em células tratadas com derivados de diidropirimidinonas promove um bloqueio no ciclo celular resultando na morte celular (TAO et al., 2005; SAKOWICZ et al., 2004).

Segundo Senturk e Manfredi (2013), compostos que causam danos ao DNA, parada do ciclo celular e apoptose são considerados agentes promissores para a quimioterapia. Neste sentido, a partir dos resultados obtidos e apresentados neste trabalho para as seleno-diidropirimidinonas **8a** e **8b**, pode-se inferir que ambas são moléculas promissoras para o futuro desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. No entanto, vale destacar a molécula **8a** que apresentou uma maior seletividade para células tumorais.

Finalmente, em resumo a nossa hipótese para o possível mecanismo de ação das seleno-diidropirimidinonas **8a** e **8b** é de que ambas podem ter como alvo terapêutico ao DNA (Figura 16). O dano a essa molécula pode ser irreversível e, desta forma, as células não entram em divisão celular sendo encaminhadas à morte por apoptose. Ou, as células que apresentam um dano menor, iniciam o processo de divisão

celular, que é bloqueado na fase S, diminuindo a proliferação levando a apoptose.

**Figura 16** – Hipótese para o possível mecanismo de ação antitumoral das seleno- dihidropirimidinonas **8a** e **8b**.



Crédito: Guilherme Zirbel, graduando do curso de farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os dados obtidos com presente trabalho foram publicados na *European Journal of Medicinal Chemistry* (Anexo I).

## 6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos neste trabalho, nos permitem concluir que:

- Os tratamentos com as seleno-diidropirimidinonas apresentaram efeitos citotóxicos importante sobre as linhagens tumorais de mama (MCF-7) e cérvix HeLa cultivadas *in vitro*.
- As modificações químicas nos análogos da seleno-diidropirimidinona **3j** aumentaram significativamente a citotoxicidade.
- Os compostos **3j** e seu derivado **8a** apresentaram importante seletividade para células tumorais.
- As seleno-diidropirimidinonas **3j**, **8a**, **8b** e **4a**, interagiram com CT-DNA por intercalação.
- Em doses sub-tóxicas os compostos foram capazes de reduzir a proliferação celular, induzindo a morte das mesmas tanto por necrose como por apoptose.
- Os compostos selecionados, **8a** e **8b** promoveram a fragmentação do DNA em células MCF-7.
- Os tratamentos com doses sub-tóxicas dos compostos **8a** e **8b** causaram alterações significativas na progressão do ciclo celular, bloqueando especialmente nas fases sub-G1 e S.

## 7 PERSPECTIVAS

Apesar das seleno-diidropirimidinonas apresentarem resultados promissores, muito ainda precisa ser elucidado. Com isso alguns experimentos são sugeridos afim de aprimorar e esclarecer o potencial antitumoral dessas moléculas:

- Ensaios biológicos *in vitro* com outras linhagens tumorais;
- A otimização das moléculas **8a** e **8b** em relação a sua solubilidade e seletividade;
- Investigar efeito antiproliferativo dos compostos **3j** e **4a**;
- Verificar a ação das moléculas **3j**, **8a**, **8b** e **4a** na ausência do selênio;
- Ensaios que proporcionem um maior entendimento do mecanismo de ação de **3j**, **8a**, **8b** e **4a** em células MCF-7, como ensaios de imunodeteção de proteínas: p53, Bcl-xL, Bax. Assim como verificar a atividade da enzima TrxR. Bem como o potencial de inibição da atividade da proteína cinesina Eg5.
- Verificar ação dos compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a** na geração intracelular de EROs;
- Maiores estudos sobre a interação com o DNA;
- Ensaios *in silico* por meio de *docking* molecular entre os compostos e o DNA ou possíveis proteínas-alvo;
- Ensaios *in vivo* para avaliação da inibição do crescimento tumoral, angiogênese, biodisponibilidade e toxicidade dos compostos **3j**, **8a**, **8b** e **4a**.

## 8 REFERÊNCIA

- ABDULLAEV, Fikrat I.; MACVICAR, Christina; FRENKEL, Gerald D. **Inhibition by selenium of DNA and RNA synthesis in normal and malignant human cells in vitro.** Cancer Letters, v. 65, n. 1, p. 43–49, jul. 1992.
- ADAMS, Jerry M.; CORY, Suzanne. **The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival.** Science, v. 281, n. 5381, p. 1322–1326, 1998.
- AGBAJE, Oluropo C; et al. **Synthesis and in vitro cytotoxicity evaluation of some fluorinated hexahydropyrimidine derivatives.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 21, p. 989–992, 2011.
- ALCOLEA, Verónica et al. **Novel seleno-and thio-urea derivatives with potent in vitro activities against several cancer cell lines.** European journal of medicinal chemistry, v. 113, p. 134–144, 2016.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Cancer Facts & Figures 2014.** Cancer Facts and Figures, p. 1–72, 2014.
- AUDIC, Yann; HARTLEY, Rebecca S. **Post-transcriptional regulation in cancer.** Biology of the Cell, v. 96, n. 7, p. 479–498, 2004.
- BARBOSA, Flavio AR et al. **Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma.** European journal of medicinal chemistry, 2018.
- BARRETT, J. Carl. **Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment.** Environmental health perspectives, v. 100, p. 9, 1993.
- BERNSTEIN, Carol et al. **DNA damage, DNA repair and cancer.** In: New Research Directions in DNA Repair. InTech, 2013.
- BLOOM, David E. et al. **The global economic burden of noncommunicable diseases.** Program on the Global Demography of Aging, 2012.
- BORGES, Helena Lobo; LINDEN, Rafael; WANG, Jean YJ. **DNA damage-induced cell death: lessons from the central nervous system.** Cell research, v. 18, n. 1, p. 17, 2008.
- BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. **Distúrbios da Proliferação e da Diferenciação Celular.** IN: Bogliolo, L.; Brasileiro Filho, G. Patologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 219–276p.

- CAO, Shousong; DURRANI, Farukh A.; RUSTUM, Youcef M. **Selective modulation of the therapeutic efficacy of anticancer drugs by selenium containing compounds against human tumor xenografts.** *Clinical Cancer Research*, v. 10, n. 7, p. 2561-2569, 2004.
- CARTER, Bing Z. et al. **Inhibition of KSP by ARRY-520 Induces Cell Cycle Block and Cell Death Via the Mitochondrial Pathway in AML Cells.** *American Society of Hematology* v. 110, 2007.
- CHAKRABORTY, Pramita et al. **Sensitization of cancer cells to cyclophosphamide therapy by an organoselenium compound through ROS-mediated apoptosis.** *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 84, p. 1992-1999, 2016.
- CHEN, Tianfeng; WONG, Yum-Shing. **Selenocystine induces caspase-independent apoptosis in MCF-7 human breast carcinoma cells with involvement of p53 phosphorylation and reactive oxygen species generation.** *The international journal of biochemistry & cell biology*, v. 41, n. 3, p. 666-676, 2009.
- CHO, Sung-Gook; WOO, Sang-Mi; KO, Seong-Gyu. **Butein suppresses breast cancer growth by reducing a production of intracellular reactive oxygen species.** *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, v. 33, n. 1, p. 51, 2014.
- CHO, Yeonchoo et al. **Noncovalent interactions of DNA bases with naphthalene and graphene.** *Journal of chemical theory and computation*, v. 9, n. 4, p. 2090-2096, 2013.
- CLARK, Richard F. et al. **Selenium poisoning from a nutritional supplement.** *Jama*, v. 275, n. 14, p. 1087-1088, 1996.
- COLLERY, Philippe. **Strategies for the Development of Selenium-based Anticancer Drugs.** *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018.
- CORY, Suzanne; ADAMS, Jerry M. **The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch.** *Nature Reviews Cancer*, v. 2, n. 9, p. 647, 2002.
- COUZIN-FRANKEL, Jennifer. **Cancer immunotherapy.** 2013.
- DA SILVA, Daniel L. et al. **Free radical scavenging and antiproliferative properties of Biginelli adducts.** *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 20, n. 8, p. 2645-2650, 2012.
- DA SILVEIRA, Vivian Chagas et al. **Binding of oxindole-Schiff base copper (II) complexes to DNA and its modulation by the ligand.** *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 105, n. 12, p. 1692-1703, 2011.



- DAVIES, Kelvin JA. **The broad spectrum of responses to oxidants in proliferating cells: a new paradigm for oxidative stress.** IUBMB life, v. 48, n. 1, p. 41-47, 1999.
- DE FALCO, Maria; DE LUCA, Antonio. **Cell cycle as a target of antineoplastic drugs.** Current pharmaceutical design, v. 16, n. 12, p. 1417-1426, 2010.
- DE SOUZA, Diego et al. **New organochalcogen multitarget drug: synthesis and antioxidant and antitumoral activities of chalcogenozidovudine derivatives.** Journal of Medicinal Chemistry, v. 58, n. 8, p. 3329-3339, 2015.
- DIAZ-MORALLI, Santiago et al. **Targeting cell cycle regulation in cancer therapy.** Pharmacology & therapeutics, v. 138, n. 2, p. 255-271, 2013.
- DRAKE, E. N. **Cancer chemoprevention: selenium as a prooxidant, not an antioxidant.** Medical hypotheses, v. 67, n. 2, p. 318-322, 2006.
- EL-BAYOUMY, Karam; SINHA, Raghu. **Molecular chemoprevention by selenium: a genomic approach.** Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, v. 591, n. 1, p. 224-236, 2005.
- FELDMAN, Robert P.; GOODRICH, James T. **The edwin smith surgical papyrus.** Child's Nervous System, v. 15, n. 6-7, p. 281-284, 1999.
- FERNANDEZ-BANARES, F. et al. **Serum selenium and risk of large size colorectal adenomas in a geographical area with a low selenium status.** The American journal of gastroenterology, v. 97, n. 8, p. 2103, 2002.
- FICO, Maxine E. et al. **Differential effects of selenium on normal and neoplastic canine mammary cells.** Cancer research, v. 46, n. 7, p. 3384-3388, 1986.
- FRANKEN, Nicolaas AP et al. **Clonogenic assay of cells in vitro.** Nature protocols, v. 1, n. 5, p. 2315, 2006.
- FRESHNEY, R. Ian. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.** John Wiley & Sons, 2015.
- GANTHER, Howard E. **Selenium metabolism, selenoproteins and mechanisms of cancer prevention: complexities with thioredoxin reductase.** Carcinogenesis, v. 20, n. 9, p. 1657-1666, 1999.
- GONÇALVES; M. B., **Modelagem molecular,** 2015. <http://modelagemmolecular.ensino.blogspot.com.br/2015/03/mecanismo-de-acao-de-medicamentos.html>. Acesso em: 01 de abril de 2018.

GUÉRIN, Paul J.; GAUTHIER, Eric R. **Induction of cellular necrosis by the glutathione peroxidase mimetic ebselen.** Journal of cellular biochemistry, v. 89, n. 1, p. 203-211, 2003.

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

HAHN, William C.; WEINBERG, Robert A. **Modelling the molecular circuitry of cancer.** Nature Reviews Cancer, v. 2, n. 5, p. 331, 2002.

HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** cell, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HARTWELL, Leland H.; WEINERT, Ted A. **Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.** Science, v. 246, n. 4930, p. 629-634, 1989.

HIRSCH, Tamara et al. **The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death.** Oncogene, v. 15, n. 13, p. 1573, 1997.

HUANG, David CS et al. **Activation of Fas by FasL induces apoptosis by a mechanism that cannot be blocked by Bcl-2 or Bcl-xL.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 96, n. 26, p. 14871-14876, 1999.

HUANG, Fang et al. **Selenite induces redox-dependent Bax activation and apoptosis in colorectal cancer cells.** Free Radical Biology and Medicine, v. 46, n. 8, p. 1186-1196, 2009.

HUSZAR, Dennis et al. **Kinesin motor proteins as targets for cancer therapy.** Cancer and Metastasis Reviews, v. 28, n. 1-2, p. 197-208, 2009.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA:  
[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicações/estimativa\\_incidencia\\_cancer\\_2008.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicações/estimativa_incidencia_cancer_2008.pdf). Acesso eletrônico em 22 de novembro de 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA:  
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>.pdf. Acesso eletrônico em 20 de janeiro de 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA:  
[http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/rastreamento\\_prostata\\_resumido.2013.pdf](http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/rastreamento_prostata_resumido.2013.pdf). Acesso eletrônico em 08 de novembro de 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER – INCA:  
<http://www1.inca.gov.br/inca/>

- Arquivos/RelatorioGestao/RELATGESTAO\_2004.pdf. Acesso eletrônico em 22 de novembro de 2017.
- IP, Clement. **Lessons from basic research in selenium and cancer prevention.** The Journal of nutrition, v. 128, n. 11, p. 1845-1854, 1998.
- JEKIMOV, Christian et al. **Chemotherapeutic compounds targeting the DNA double-strand break repair pathways: the good, the bad, and the promising.** Frontiers in oncology, v. 4, p. 86, 2014.
- JORDAN, Mary Ann; WILSON, Leslie. **Microtubules as a target for anticancer drugs.** Nature Reviews Cancer, v. 4, n. 4, p. 253, 2004.
- KAAN, Hung Yi Kristal et al. **Structural basis for inhibition of Eg5 by dihydropyrimidines: stereoselectivity of antimitotic inhibitors enastron, dimethylenastron and fluorastrol.** Journal of medicinal chemistry, v. 53, n. 15, p. 5676-5683, 2010.
- KAECK, Mark et al. **Differential induction of growth arrest inducible genes by selenium compounds.** Biochemical pharmacology, v. 53, n. 7, p. 921-926, 1997.
- KASHANIAN, Soheila et al. **In vitro study of DNA interaction with clodinafop-propargyl herbicide.** DNA and cell biology, v. 27, n. 10, p. 581-586, 2008.
- KIM, Ryungsa; EMI, Manabu; TANABE, Kazuaki. **Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape.** Immunology, v. 121, n. 1, p. 1-14, 2007.
- KITANAKA, Chifumi; KUCHINO, Yoshiyuki. **Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology.** Cell death and differentiation, v. 6, n. 6, p. 508, 1999.
- KOCH, A., Tamez, P., Pezzuto, J., & Soejarto, D. **Evaluation of plants used for antimalarial treatment by the Maasai of Kenya.** Journal of Ethnopharmacology, v. 101, n. 1-3, p. 95-99, 2005.
- KORGE, Paavo; CALMETTES, Guillaume; WEISS, James N. **Increased reactive oxygen species production during reductive stress: the roles of mitochondrial glutathione and thioredoxin reductases.** Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics, v. 1847, n. 6-7, p. 514-525, 2015.
- KROEMER, Guido 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, 2009.
- KROEMER, Guido. **Mitochondrial implication in apoptosis. Towards an endosymbiont hypothesis of apoptosis evolution.** Cell death and differentiation, v. 4, n. 6, p. 443, 1997.
- KRYUKOV, Gregory V. et al. **Characterization of mammalian selenoproteomes.** Science, v. 300, n. 5624, p. 1439-1443, 2003.

KUCHAN, Matthew J.; MILNER, John A. **Influence of intracellular glutathione on selenite-mediated growth inhibition of canine mammary tumor cells.** *Cancer research*, v. 52, n. 5, p. 1091-1095, 1992.

KUCHAN, Matthew J.; SANTORO, Maxine F.; MILNER, John A. **Consequences of selenite supplementation on the growth and metabolism of cultures of canine mammary cells.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, v. 1, n. 9, p. 478-483, 1990.

KUMAR, Sanjay; YEDJOU, Clement G.; TCHOUNWOU, Paul B. **Arsenic trioxide induces oxidative stress, DNA damage, and mitochondrial pathway of apoptosis in human leukemia (HL-60) cells.** *Journal of experimental & clinical cancer research*, v. 33, n. 1, p. 42, 2014.

LAENNEC, René Théophile Hyacinthe. **Propositions sur la doctrine d'Hippocrate, relativement à la médecine pratique, etc.** THE NEW YORK ACADEMY OF MEDICINE Vol. 2 N° 8, 1804.

LI, Guang- Xun et al. **Differential involvement of reactive oxygen species in apoptosis induced by two classes of selenium compounds in human prostate cancer cells.** *International journal of cancer*, v. 120, n. 9, p. 2034-2043, 2007.

LIU, Zhi-Ren; HECKER, Karl H.; RILL, Randolph L. **Selective DNA binding of (N-alkylamine)-substituted naphthalene imides and diimides to G<sup>+</sup> C-rich DNA.** *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, v. 14, n. 3, p. 331-339, 1996.

LOKEY, R. Scott et al. **A new class of polyintercalating molecules.** *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, n. 31, p. 7202-7210, 1997.

MARIOTTO, Angela B. et al. **Projections of the cost of cancer care in the United States: 2010–2020.** *Journal of the National Cancer Institute*, v. 103, n. 2, p. 117-128, 2011.

MARTINS, Inês L. et al. **Selenium-containing chrysin and quercetin derivatives: attractive scaffolds for cancer therapy.** *Journal of medicinal chemistry*, v. 58, n. 10, p. 4250-4265, 2015.

MAYER, Thomas U. et al. **Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen.** *Science*, v. 286, n. 5441, p. 971-974, 1999.

MCGAHON, Anne J. et al. **The end of the (cell) line: methods for the study of apoptosis in vitro.** In: *Methods in cell biology*. Academic Press, p. 153-185, 1995.

- MEDINA, D. et al. **Se-methylselenocysteine: a new compound for chemoprevention of breast cancer.** *Nutrition and cancer*, v. 40, n. 1, p. 12-17, 2001.
- MOSMANN, Tim. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *Journal of immunological methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MÜLLER, Christine et al. **Inhibitors of kinesin Eg5: antiproliferative activity of monastrol analogues against human glioblastoma cells.** *Cancer chemotherapy and pharmacology*, v. 59, n. 2, p. 157-164, 2007.
- MUNCHEN, Taiana S. et al. **New 3'-Triazolyl-5'-aryl-chalcogenothymidine: Synthesis and Anti-oxidant and Antiproliferative Bladder Carcinoma (5637) Activity.** *ChemistrySelect*, v. 3, n. 12, p. 3479-3486, 2018.
- MUSTACICH, Debbie; POWIS, Garth. **Thioredoxin reductase.** *Biochemical Journal*, v. 346, n. 1, p. 1-8, 2000.
- NAVARRO, Maribel et al. **Synthesis, characterization, DNA binding study and biological activity against *Leishmania mexicana* of [Cu(dppz)<sub>2</sub>]BF<sub>4</sub>.** *Journal of inorganic biochemistry*, v. 97, n. 4, p. 364-369, 2003.
- NORBURY, Chris; NURSE, Paul. **Animal cell cycles and their control.** *Annual review of biochemistry*, v. 61, n. 1, p. 441-468, 1992.
- NORDBERG, Jonas; ARNER, Elias S. J. **Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system.** *Free radical biology and medicine*, v. 31, n. 11, p. 1287-1312, 2001.
- OLTVAL, Zoltán N.; MILLIMAN, Curt L.; KORSMEYER, Stanley J. **Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death.** *cell*, v. 74, n. 4, p. 609-619, 1993.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS: <http://www.who.int/cancer/en/>. Acesso eletrônico em 15 de novembro de 2017.
- PARSONAGE, Derek; KARPLUS, P. Andrew; POOLE, Leslie B. **Substrate specificity and redox potential of AhpC, a bacterial peroxiredoxin.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 24, p. 8209-8214, 2008.
- PEMBERTON, Oliver. **Observations on the history, pathology, and treatment of cancerous diseases.** Churchill, 1858.
- PLOTKOWSKI, M. C. et al. **Early mitochondrial dysfunction, superoxide anion production, and DNA degradation are associated with non-apoptotic death of human airway epithelial cells induced by *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin A.** *Am J Respir Cell Mol Biol*, v. 26, n. 5, p. 617-626, 2002.

- RECZEK, Colleen R.; CHANDEL, Navdeep S. **ROS-dependent signal transduction**. *Current opinion in cell biology*, v. 33, p. 8-13, 2015.
- RESCIFINA, Antonio et al. **Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling**. *European journal of medicinal chemistry*, v. 74, p. 95-115, 2014.
- RIBEIRO, Sonia Machado Rocha et al. **A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico**. *Bioscience journal*, v. 21, n. 3, 2005.
- ROSS, Gillian M. et al. **The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications: Report on the 5th LH Gray Trust Workshop**, Institute of Cancer Research, 1994. *Mutation Research/DNA Repair*, v. 337, n. 1, p. 57-60, 1995.
- RUSSOWSKY, Dennis et al. **Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues**. *Bioorganic chemistry*, v. 34, n. 4, p. 173-182, 2006.
- SAEED, Muhammad et al. **Formation of depurinating N3adenine and N7guanine adducts after reaction of 1,2-naphthoquinone or enzyme-activated 1,2-dihydroxynaphthalene with DNA: Implications for the mechanism of tumor initiation by naphthalene**. *Chemico-biological interactions*, v. 165, n. 3, p. 175-188, 2007.
- SAKOWICZ, Roman et al. **Antitumor activity of a kinesin inhibitor**. *Cancer research*, v. 64, n. 9, p. 3276-3280, 2004.
- SAMALI, Afshin et al. **A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis**. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 255, n. 1, p. 6-11, 1999.
- SANDSTRÖM, B. et al. **Selenium status and absorption of zinc (65Zn), selenium (75Se) and manganese (54Mn) in patients with short bowel syndrome**. *European journal of clinical nutrition*, v. 44, n. 10, p. 697-703, 1990.
- SENTURK, Emir; MANFREDI, James J. **p53 and cell cycle effects after DNA damage**. In: **p53 Protocols**. Humana Press, Totowa, NJ, p. 49-61, 2013.
- SESSLER, Jonathan L. et al. **A Rigid Chlorin Naphthalene Diimide Conjugate. A Possible New Noncovalent Electron Transfer Model System**. *The Journal of organic chemistry*, v. 63, n. 21, p. 7370-7374, 1998.
- SHEN, Han-Ming; DING, Wen-Xing; ONG, Choon-Nam. **Intracellular glutathione is a cofactor in methylseleninic acid-induced apoptotic**

- cell death of human hepatoma HEPG2 cells.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 33, n. 4, p. 552-561, 2002.
- STEFANI, Hélio A. et al. **Dihydropyrimidin-(2H)-ones obtained by ultrasound irradiation: a new class of potential antioxidant agents.** *European journal of medicinal chemistry*, v. 41, n. 4, p. 513-518, 2006.
- STRASSER, A., Harris, et al. **Bcl- 2 and Fas/APO- 1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis.** *The EMBO journal*, v. 14, n. 24, p. 6136-6147, 1995.
- TAN, Li-Feng et al. **Effects of the ancillary ligands of polypyridyl ruthenium (II) complexes on the DNA-binding and photocleavage behaviors.** *Polyhedron*, v. 26, n. 18, p. 5458-5468, 2007.
- TREPTOW, Tamara GM et al. **Novel hybrid DHPM-fatty acids: synthesis and activity against glioma cell growth in vitro.** *European journal of medicinal chemistry*, v. 95, p. 552-562, 2015.
- TRUJILLO, Madia et al. **Pre-steady state kinetic characterization of human peroxiredoxin 5: taking advantage of Trp84 fluorescence increase upon oxidation.** *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 467, n. 1, p. 95-106, 2007.
- VADGAMA, Jayduttv et al. **Effect of Selenium in Combination with Adriamycin or Taxol on.** *Anticancer research*, v. 20, p. 1391-1414, 2000.
- VAQUÉ, José P. et al. **c-Myc inhibits Ras-mediated differentiation of pheochromocytoma cells by blocking c-Jun up-regulation.** *Molecular Cancer Research*, v. 6, n. 2, p. 325-339, 2008.
- VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N. **The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer.** *Cell proliferation*, v. 36, n. 3, p. 131-149, 2003.
- WANG, Gongke et al. **DNA binding properties and biological evaluation of dihydropyrimidinones derivatives as potential antitumor agents.** *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 114, p. 214-219, 2013.
- WANG, Gongke et al. **Specific binding of a dihydropyrimidinone derivative with DNA: Spectroscopic, calorimetric and modeling investigations.** *Journal of Luminescence*, v. 132, n. 7, p. 1656-1662, 2012.
- WILLIAMS, Gareth H.; STOEBER, Kai. **The cell cycle and cancer.** *The Journal of pathology*, v. 226, n. 2, p. 352-364, 2012.

WILLIS, Nicholas; RHIND, Nicholas. **Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint.** Cell division, v. 4, n. 1, p. 13, 2009.

WOLF, Judith K.; RAMIREZ, Pedro T. **The molecular biology of cervical cancer.** Cancer investigation, v. 19, n. 6, p. 621-629, 2001.

WONG; E., **Introduction to neoplasia,** 2008. <http://www.pathophys.org/introneoplasia/> Acesso em: 01 de abril de 2018.

WU, Siqin et al. **Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter.** Oncogene, v. 22, n. 3, p. 351, 2003.

YADLAPALLI, Rama K. et al. **Synthesis and in vitro anticancer and antitubercular activity of diarylpyrazole ligated dihydropyrimidines possessing lipophilic carbamoyl group.** Bioorganic & medicinal chemistry letters, v. 22, n. 8, p. 2708-2711, 2012.

YAN, Changling; LU, Yan. **Exploring DNA binding properties and biological activities of dihydropyrimidinones derivatives.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 106, p. 28-36, 2013.

YOON, Sang-Oh; KIM, Moon-Moo; CHUNG, An-Sik. **Inhibitory effect of selenite on invasion of HT1080 tumor cells.** Journal of Biological Chemistry, v. 276, n. 23, p. 20085-20092, 2001.

YU, Ming-Whei et al. **Plasma selenium levels and risk of hepatocellular carcinoma among men with chronic hepatitis virus infection.** American journal of epidemiology, v. 150, n. 4, p. 367-374, 1999.

ZAIDI, Sayyed K. et al. **Targeting deregulated epigenetic control in cancer.** Journal of cellular physiology, v. 228, n. 11, p. 2103-2108, 2013.

ZHONG, Yan et al. **Drug resistance associates with activation of Nrf2 in MCF- 7/DOX cells, and wogonin reverses it by down-regulating Nrf2- mediated cellular defense response.** Molecular carcinogenesis, v. 52, n. 10, p. 824-834, 2013.



## 9 ANEXO I

European Journal of Medicinal Chemistry 155 (2018) 503–515



Research paper

## Novel pyrimidinic selenourea induces DNA damage, cell cycle arrest, and apoptosis in human breast carcinoma

Flavio A.R. Barbosa <sup>a,1</sup>, Tâmara Siminski <sup>b,1</sup>, Rômulo F.S. Canto <sup>c</sup>, Gabriela M. Almeida <sup>b</sup>,  
Nádia S.R.S. Mota <sup>b</sup>, Fabiana Ourique <sup>b</sup>, Rozângela Curi Pedrosa <sup>b,\*,\*\*</sup>, Antonio Luiz Braga <sup>a,\*,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Estudos de Substâncias de Síntese Bioativas (LabSEB), Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Bioquímica Experimental (LABOQ), Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Laboratório de Química Medicinal de Compostos de Síntese (QMCS), Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA), Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 12 December 2017  
Received in revised form  
7 June 2018  
Accepted 9 June 2018  
Available online 11 June 2018

**Keywords:**  
Dihydropyrimidinones  
Organoselenium  
Cytotoxicity  
DNA damage  
Cell cycle arrest  
Apoptosis  
Selenoureas

## ABSTRACT

Novel pyrimidinic selenoureas were synthesized and evaluated against tumour and normal cell lines. Among these, the compound named **3** initially showed relevant cytotoxicity and selectivity for tumour cells. Three analogues of **3** were designed and synthesized keeping in view the structural requirements of this compound. Almost all the tested compounds displayed considerable cytotoxicity. However, **8a**, one of the **3** analogues, was shown to be highly selective and cytotoxic, especially for breast carcinoma cells (MCF-7) ( $IC_{50} = 3.9 \mu\text{M}$ ). Furthermore, **8a** caused DNA damage, inhibited cell proliferation, was able to arrest cell cycle in S phase, and induced cell death by apoptosis in human breast carcinoma cells. Moreover, predictions of pharmacokinetic properties showed that **8a** may present good absorption and permeation characteristics for oral administration. Overall, the current study established **8a** as a potential drug prototype to be employed as a DNA interactive cytotoxic agent for the treatment of breast cancer.

© 2018 Published by Elsevier Masson SAS.

## 1. Introduction

Dihydropyrimidinones (DHPMs) are a very important class of six-membered heterocycles that are obtained by the Biginelli multicomponent reaction [1]. In the field of medicinal chemistry, DHPMs have been much explored due to the modular nature of the multicomponent reaction that enables the use of several aldehydes, dicarbonyl compounds, and ureas, which readily leads to the preparation of a diverse library of compounds. In addition, these compounds are known for presenting multiple biological activities, such as antioxidant action [2–4], acetylcholinesterase inhibition [5,6], and mPGES-1 inhibition [7] among other activities [8]. However, the anticancer activities of DHPMs are more pronounced, since various reports have described compounds such as Monastrol

and its derivatives as good cytotoxic and antiproliferative agents [9–15]. Molecular hybrids containing the DHPM core are also reported as potential anticancer agents, such as DHPM-Coumarin hybrids for breast tumours [16] and DHPM-semicarbazone hybrids with anticancer activity due to their ability to inhibit human DNA ligase 1 [17]. More recently, DHPMs containing a fatty acid moiety have been found to possess antiproliferative activity against C6 glioma cell line [18] and cytotoxic effects in the melanoma B16F10 cell line [19].

Organoselenium compounds are well known for their antioxidant activity with the ability to mimic selenoenzyme Glutathione Peroxidase (GPx-like activity) [20,21]; there is also emerging evidence indicating the potential of selenium (Se) compounds in cancer chemotherapy; these compounds are well known to inhibit cell proliferation and induce cell death in human cancer cells by apoptosis [22,23]. Se-compounds induce inhibition of proliferation and promote cellular apoptosis, presumably by decreased phosphorylation of Akt [24,25] which, through the phosphatidylinositol 3-kinase PI3K/Akt/mTOR pathway, has been shown to inhibit apoptosis in cancer cells [26] and promote proliferation and

\* Corresponding author.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [rozangela.curipedrosa@ufsc.br](mailto:rozangela.curipedrosa@ufsc.br) (R.C. Pedrosa), [bragaantonio@ufsc.br](mailto:bragaantonio@ufsc.br) (A.L. Braga).

† These authors contributed equally to this work.

