



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EMBIOTECNOLOGIA

SORAYA MARQUES RIBEIRO

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO CARBAPTEROCARPANO

FORTALEZA

2021

SORAYA MARQUES RIBEIRO

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO CARBAPTEROCARPANO

Tese apresentada ao Programa Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dra. Claudia do Ó Pessoa.
Coorientador: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R372i Ribeiro, Soraya Marques.
Investigação do potencial antitumoral do carbapterocarpano / Soraya Ribeiro. – 2021.
128 f.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Claudia do Ó Pessoa.
Coorientação: Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier.
1. Pterocarpanos. 2. Câncer de próstata. 3. Antimitótico. I. Título.

CDD 660.6

SORAYA MARQUES RIBEIRO

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTITUMORAL DO CARBAPTEROCARPANO

Tese apresentada ao Programa Rede Nordeste de Biotecnologia - RENORBIO da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Recursos Naturais.

Aprovada em: 27 / 01 / 2021 .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Claudia do Ó Pessoa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Carlos Roberto Koscky Paier (Co-orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Selene Maia de Moraes
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Prof. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Gilvan Pessoa Furtado
(FIOCRUZ-CEARÁ)

Prof. Dra. Fátima de Cássia Evangelista de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre iluminou meus passos e me conduziu sempre pelo melhor caminho.

Aos familiares pelo apoio e dedicação constante que foram de extrema importância para trilhar esse caminho acadêmico.

A minha filha Lara Ribeiro que sempre foi um incentivo para que eu pudesse me dedicar mais nesse caminho.

A Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa que desde o início me acolheu em seu laboratório e me aceitou como orientanda e pela excelente orientação.

Ao Prof. Dr. Roberto Carlos Paier pela excelente co-orientação e pela dedicação que me auxiliou no desenvolvimento da tese.

Aos professores participantes da banca examinadora pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

A todos os integrantes do LOE pelos ensinamentos, reflexões e pela amizade.

Aos colegas da turma de doutorado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

A todos meus amigos pelo apoio e por tornar os meus dias mais alegres.

A Rede Nordeste de Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará (**RENORBIO- UFC**) pela oportunidade e aprendizado.

As agências de financiamento, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (**CAPES**) e Fundação Cearense de Amparo a Pesquisa (**FUNCAP**) que foram indispensáveis para o desenvolvimento do trabalho.

“Ninguém é tão grande que não possa aprender
e nem tão pequeno que não possa ensinar.”

Esopo

RESUMO

Diversos fármacos têm sido desenvolvidos com intuito de combater o câncer, sendo muitos deles derivados de produtos naturais ou inspirados na natureza. Nos últimos anos, as terapias anticâncer alvo-específicas têm sido intensificadas, incluindo aquelas que visam impedir a proliferação celular. Os microtúbulos se destacam no cenário dos antimitóticos, devido a interferência na replicação celular. A classe dos pterocarpanos vem se mostrando promissora com atividade citotóxica e potencial antimitótico. Nesse sentido, o presente estudo, busca a síntese e realização de *screening* de diferentes análogos dos pterocarpanos, determinação da relação estrutura-atividade e validação das propriedades antimitóticas. O composto LQB 507 foi pré-selecionado como o análogo de melhor perfil dentre os carbapterocarpanos e seguiu para caracterização da atividade citotóxica frente à linhagem celular de câncer de próstata (PC3). O capítulo 1 apresenta um levantamento das propriedades biológicas dos pterocarpanos e seus respectivos alvos moleculares em estudo. Também foram realizados monitoramento científico e tecnológico, indicando que o Brasil está entre os países com maior número de publicações relacionados aos pterocarpanos, porém os estudos em relação a atividade anticâncer e os depósitos de patentes dessa classe ainda são escassos. O capítulo 2 aborda o processo de síntese e avaliação do padrão de citotoxicidade, através do ensaio do MTT, com indicação do análogo com melhor perfil (LQB507 IC 50 no valor de 11,85 μ M). Através da análise do ciclo celular, o análogo apresentou propriedade antimitótica com parada em G2/M. O capítulo 3, avalia o padrão concentração/tempo dependência do composto LQB507, através dos ensaios de MTT e SRB, por inferência metabólica e estrutural, respectivamente. Diferentes alterações induzidas pelo composto LQB507 foram observadas, incluindo padrão de morte celular, despolarização mitocondrial, padrão de interferência em estruturas do fuso mitótico, além de algumas características farmacológicas, como perfil de absorção intestinal e habilidade de penetração da barreira hematoencefálica *in silico* (pkADMETox) e *in vitro* (PAMPA). Uma prospecção do perfil de expressão de possíveis alvos na célula PC3 foi avaliado. O taxol (Tx) foi utilizado como controle positivo. A substância LQB 507 apresenta um perfil citostático, com discreta atividade citotóxica verificada em concentrações mais elevadas. Alterações no padrão de polarização mitocondrial, com indução de apoptose foram verificadas. A morfologia indicou que as células tratadas com LQB 507 apresentaram transição do formato fusiforme (controle) para lobulada (tratadas), adicionalmente, a microscopia confocal indicou desorganização dos centrosomos nas células tratadas com LQB 507, tendo sido esse fenótipo similar ao PT+. Além disso, a predição *in silico* teve seus resultados *in vitro* corroborados. Uma vez que ensaio do

PAMPA da substância LQB 507 indicou que a substância é permeável ao trato gastrointestinal e impermeável a barreira hematoencefálica. Estudos in sílico demonstraram que os genes com expressão mais elevada foram TUBG1, AURKA e CEP57, sendo caracterizados como possíveis alvos para a classe. A LQB 507 e o PT+ apresentaram perfis farmacológicos e biológicos similares, sendo interessante dar continuidade ao estudo com LQB 507 por ser uma substância sintética que apresentou bom rendimento e atividade biológica favorável frente a linhagem de câncer de próstata. Nesse sentido, a molécula apresenta elevado potencial para o desenvolvimento de fármaco antitumoral para o tratamento de câncer de próstata.

Palavras-chave: Pterocarpanos. Câncer de próstata. Antimitótico.

ABSTRACT

Several drugs have been developed in order to fight cancer, many of them derived from natural products. In recent years, target-specific anticancer therapies have been intensified, including those aimed at preventing cell proliferation. Microtubules stand out in the antimitotic scenario, due to interference with cell replication. The class of pterocarpanes has been showing promise with cytotoxic activity and antimitotic potential. In this sense, the present study seeks to synthesize and perform screening of different analogs of pterocarpanes, to determine the structure-activity relationship and validation of antimitotic properties. The compound LQB 507 was pre-selected as the analogue of the best profile and proceeded to characterize the cytotoxic activity against the prostate cancer cell line (PC3). Chapter 1 presents a survey of the biological properties of pterocarpanes and their respective molecular targets under study. Scientific and technological monitoring was also carried out indicating that Brazil is among the countries with the largest number of publications related to pterocarpanes, however studies on anticancer activity and patent filings of this class are still scarce. Chapter 2 deals with the process of synthesis and evaluation of the cytotoxicity pattern, through the MTT assay, with the indication of the analogue with the best profile (LQB507 IC₅₀ in the value of 11.85 μ M). Through the analysis of the cell cycle, the analog showed antimitotic property with stop in G₂/M. Chapter 3, evaluates the concentration / time dependence pattern of the compound LQB507, through MTT and SRB tests, by metabolic and structural inferences, respectively. Different changes induced by the compound LQB507 were observed, including pattern of cell death, mitochondrial depolarization, pattern of interference in structures of the mitotic spindle, in addition to some pharmacological characteristics, such as intestinal absorption profile and ability to penetrate the blood-brain barrier in silico (pkADMETox) and in vitro (PAMPA). A survey of the expression profile of possible targets in the PC3 cell was evaluated. Taxol (Tx) was used as a positive control. The substance LQB 507 has a cytostatic profile, with discrete cytotoxic activity found in higher concentrations. Changes in the pattern of mitochondrial polarization, with induction of apoptosis were verified. The morphology indicated that the cells treated with LQB 507 showed a transition in the fusiform (Control) and lobulated (treated) format, in addition, confocal microscopy indicated disorganization of the centrosomes in the cells treated with LQB 507, and this phenotype was similar to PT +. In addition, in silico prediction had its in vitro results corroborated. Since the PAMPA test of the substance LQB 507 indicated that the substance is permeable to the gastrointestinal tract and impermeable to the blood-brain barrier. In silico studies showed that the genes with the highest expression were

TUBG1, AURKA and CEP57, being characterized as possible targets for the class. LQB 507 and PT+ presented similar pharmacological and biological profiles, and it is interesting to continue the study with LQB 507 as it is a synthetic substance that showed good performance and favorable biological activity in relation to the prostate cancer line. In this sense, the studied molecule has high potential for the development of antitumor drugs for the treatment of prostate cancer.

Keywords: Pterocarpan. Prostate Cancer. Antimitotic.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Progressão do tumor e geração de heterogeneidade.....	17
Figura 2 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.....	19
Figura 3 - Mecanismo de ação da apoptose por via intrínseca e extrínseca.....	28
Figura 4 - Fases do ciclo celular.....	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APAF 1	Fator de ativação de protease apoptótica 1
BAX	Bcl-2-like protein 4
BAK	Bcl-2 antagonist killer
Bcl-2	B-cell lymphoma2
BCLxl	B-cell lymphoma-extra large
BID	BH3 only proteins
BIK	BCL2 interacting killer
BRCA1	Breast cancer 1
BRCA2	Breast cancer 2
CDK's	Quinases dependentes de ciclina
CHK	Quinases de check point
CI ₅₀	Concentração inibitória média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
FDA	Food and Drug Administration
MTIC	Imidazol-4-carboxamida
NCI	National Cancer Institute
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC3	Linhagem celular de câncer de próstata
PSA	Antígeno prostático específico
SBU	Sociedade Brasileira de Urologia
SF 295	Linhagem celular de glioblastoma humano
SAMD5	Sterile Alpha Motif Domain Containing 5
SRB	Sulforodamina B
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Câncer	17
2.1.1	<i>Epidemiologia do câncer</i>	18
2.1.2	<i>Câncer de próstata</i>	19
2.2	Ciclo e morte celular	22
2.2.1	<i>Apoptose</i>	24
2.2.2	<i>Regulação do ciclo celular</i>	28
2.3	Estratégias para o tratamento do câncer	32
2.3.1	<i>Estratégias in silico e moleculares como ferramentas no estudo oncológico</i>	33
2.3.2	<i>Produtos naturais como fonte para desenvolvimento de fármacos</i>	34
2.4	Antimitóticos	36
2.5	Pterocarpanos	39
3	OBJETIVO	41
4	CAPÍTULO 1	42
5	CAPÍTULO 2	71
6	CAPÍTULO 3	89
7	CONCLUSÃO	119
	REFERÊNCIAS	120