

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO PROFISSIONAL EM BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

PRISCILA KONRAD ALVES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS COMPLEXADOS COM ZINCO FRENTE A
MODELO DE MELANOMA MURINO IN VITRO**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PRISCILA KONRAD ALVES

**ANÁLISE DA ATIVIDADE DE COMPOSTOS COMPLEXADOS COM ZINCO
FRENTE A MODELO DE MELANOMA MURINO *IN VITRO***

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Farmacêutica pelo Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica.

Orientadora: Prof. Dr^a. Ana Paula Duarte de Souza.

PORTO ALEGRE-RS

2019

Ficha Catalográfica

A474a Alves, Priscila Konrad

Análise da atividade de compostos complexados com zinco frente a modelo de melanoma murino in vitro / Priscila Konrad Alves . – 2019.

39.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Ana paula Duarte de Souza.

1. Melanoma. 2. Fármacos. 3. Complexo Zn⁺². I. Souza, Ana paula Duarte de. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

A minha família, pela dedicação, amor e carinho,
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu meios para ingressa no curso e me fez persistente para dar continuidade nas atividades para chegar até a conclusão.

A professora Doutora Ana Paula Duarte de Souza, pela dedicação em suas orientações prestadas na elaboração deste trabalho; Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Farmacêutica pela Pontifícia Universidade Católica Do Rio Grande Do Sul, bem como a todos os professores do programa, por tornar possível a realização deste trabalho e por todo conhecimento transmitido; A minha formação como profissional não poderia ter sido concretizada sem a ajuda de todos vocês, expresso aqui minha eterna gratidão e o reconhecimento de que sem vocês eu não teria conseguido percorrer todo este caminho.

Agradeço a todos familiares e amigos pelo carinho, respeito e incentivo.

RESUMO

O câncer é uma doença que vêm sendo a segunda maior causa de mortes no mundo. São diversos tipos de câncer, tais como, mama, próstata, pele, dentre outros. O câncer de pele por melanoma apresenta 132.000 casos mundialmente, o que torna necessário a busca para cura, através de medicamentos para combater e meios de prevenção. O tratamento mais indicado para o melanoma é cirúrgico e invasivo seguido de quimioterapia e outros medicamentos. No entanto, há uma constante busca para novos tratamentos, mas a maioria deles apresentam alta toxicidade e efeitos colaterais. Portanto, novas substâncias estão sendo investigados com o intuito de buscar um medicamento para o tratamento do melanoma com baixa toxicidade e efeitos colaterais. Com base nisso, a presente pesquisa visa testar a atividade antitumoral *in vitro* do composto que contém um complexo de Zn^{+2} com o fármaco antiepilético ácido valproico e a ação dos compostos de coordenação também com complexo de Zn^{+2} com os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais diclofenaco e ibuprofeno, PRS22 – Zn (Diclofenaco) $_2$ Nic e PRS40 Zn (Ibuprofeno) $_2$ (Nic) $_2$. Nossos dados demonstraram que os compostos PRS22 e PRS40 apresentaram maior citotoxicidade em relação ao diclofenaco e Ibuprofeno. Os compostos PRS01 e PRS17 não apresentaram citotoxicidade no ensaio de viabilidade usando MTT, mas tem um efeito de morte quando testado pelo ensaio de apoptose. Estes resultados indicam a importância da modificação das moléculas com complexos de Zinco.

Palavras-Chave: Melanoma, Fármacos, complexo de Zn^{+2}

ABSTRACT

Cancer is a disease that has been the biggest cause of death in the world. There are several types of cancer such as, breast, prostate, skin, among others. Melanoma skin cancer presents 132.000 cases worldwide, which makes it necessary to search for cures, drugs to fight against, and means of prevention. The most indicated treatment for melanoma is surgical and invasive followed by chemotherapy and medications. However, there is a constant search for new treatments, but most of them present high toxicity and side effects. Therefore, new drugs are being investigated in order to find a drug for the treatment of melanoma with syntheses of low toxicity and side effects. Based on this, the present research aims to test the antitumor activity of the compound containing a Zn^{+2} complex with the antiepileptic drug valproic acid and the action of the Zn^{+2} complex with the non-steroids diclofenac anti-inflammatory drugs and ibuprofen, PRS22-Zn (Diclofenac) $2Ni$ and PRS40 Zn (Ibuprofen) $2(Ni)$ 2 . The data demonstrate that the compounds PRS22 and PRS40 present greater cytotoxicity in relation to diclofenac and Ibuprofen. Compounds PRS01 and PRS17 did not show cytotoxicity in the MTT assay, but had a death effect when assayed by the apoptosis assay. These results indicate the importance of modifying the molecules with Zinc complexes.

Keywords: Melanoma, Drugs, Zn^{+2} complex

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais camadas e estruturas da pele.....	12
Figura 2 - Estruturas químicas dos compostos testados.....	25
Figura 3 - Análise da viabilidade celular usando o ensaio de redução do MTT.....	31
Figura 4 - Análise por citometria de fluxo da morte celular.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Estadiamento do melanoma cutâneo.....	15
Tabela 2 - Especificidade dos Anti-inflamatórios Não-esteroidais.....	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 OBJETIVOS.....	11
2.1 OBJETIVO GERAL.....	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	11
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	12
3.1 PELE.....	12
3.1.1 Epiderme.....	12
3.1.2 Derme.....	13
3.1.3 Hipoderme.....	14
3.2 CÂNCER DE PELE.....	15
3.3 MELANOMA.....	17
3.4 TRATAMENTO.....	19
3.5 FARMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS.....	20
3.6 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO.....	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS.....	26
4.2 LINHAGENS CELULARES E MANUTENÇÃO DO CULTIVO CELULAR.....	27
4.3 ENSAIO DE MTT.....	27
4.4 ENSAIO DE MARCAÇÃO DE ANEXINA V-FITC/IODETO DE PROPÍDIO.....	28
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
6 CONCLUSÃO.....	35
7 REFERÊNCIAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou que ocorrerão mais de 21 milhões de novos casos de câncer até 2030. Bem definido como um problema de saúde pública, o câncer é apontado como a maior causa de mortes no mundo, principalmente em países em desenvolvimento (OMS, 2017).

Dentre os diversos tipos de câncer está o de pele, e, a OMS informa que são 132.000 casos de cânceres de pele por melanoma que ocorrem globalmente a cada ano. Estima-se que o melanoma está relacionado à exposição solar e há um histórico de queimadura solar. Contudo, esta forma de tumor tem sua prevalência em pessoas de pele clara, principalmente as que possuem sardas e olhos claros, confirmando os dados acima, ou seja, indivíduos que tem uma tendência a queimaduras solares (Organização Mundial da Saúde, 2017).

O diagnóstico do melanoma é feito por médicos dermatologistas, através de exames dermatológicos, onde são avaliados todos os sinais e pintas que pareçam anormais, com base nos seguintes critérios: cor, forma e textura. O método mais usual para verificar a existência de tais tumores é a dermatoscopia, procedimento que utiliza um aparelho que amplia as lesões e deve ser realizado no consultório do médico (GRUPO BRASILEIRO DE MELANOMA, 2017).

Para pacientes com alto risco de desenvolver câncer de pele, é feito também o mapeamento corporal total e dermatoscopia digital, um dermatoscópio acoplado numa máquina fotográfica digital. Porém, o exame mais recente da dermatologia envolve a tecnologia de imagem, recurso que possibilita avaliar a camadas iniciais da pele em busca de células que sugiram o diagnóstico de câncer. A biopsia, que ocorre por remoção cirúrgica, também é realizada quando há uma suspeita de câncer de pele (GRUPO BRASILEIRO DE MELANOMA, 2017).

No entanto, para o tratamento do melanoma o mais indicado ainda é o cirúrgico, seguido de radioterapia e a quimioterapia, procedimentos que dependem do estágio em que o câncer se encontra. Nos casos de metástase, o melanoma é incurável na maioria dos casos (BRASIL, 2017).

Novos tratamentos já foram aprovados para o melanoma e outros encontram-se em fase de desenvolvimento. Dentre os fármacos, estão aqueles que agem por mecanismos diferentes, como os anticorpos monoclonais Ipilimumab e Nivolumab totalmente humanizados. No mês de fevereiro de 2019 a Anvisa aprovou o uso do

pembrolizumabe o mais novo anticorpo monoclonal anti PD-1 (Manual de oncologia clínica do Brasil). Além disso, existem os fármacos vemurafenid e dabrafenid, terapias que têm como alvo o gene mutante do melanoma BRAF e são indicadas para o melanoma avançado. Binimetinib (em desenvolvimento) é um alósterico seletivo. Trametinid é um fármaco administrado de uso oral, Selumetinib (em desenvolvimento) estudos mostraram que é um fármaco sem futuro promissor na monoterapia. Apesar dos novos tratamentos existentes, estes ainda apresentam problemas de toxicidade muito elevada, e existem algumas diferenças entre pacientes que fazem com que os fármacos funcionem somente para grupos específicos (VOLPE, et al, 2017).

Logo, faz-se necessário o estudo de novos fármacos para o tratamento do melanoma. O desenvolvimento de compostos de coordenação com metais de transição é uma abordagem recente para o desenvolvimento de moléculas bioativas candidatas a fármacos com ação antitumoral. Deste modo, o presente trabalho visa testar a atividade antitumoral do composto que contém um complexo de Zn^{+2} com o fármaco antiepilético ácido valproico. O complexo de zinco é constituído por dois volproatos, um N doador e uma molécula de água de hidratação para centro do metal, seus complexos possuem menor toxicidade como demonstrado por Santos et al (2015). Além disso, o trabalho tem como objetivo investigar a ação dos compostos de coordenação também com complexo de Zn^{+2} com os fármacos anti-inflamatórios não esteriodais diclofenaco e ibuprofeno, PRS22 - Zn (Diclofenaco)₂ Nic e PRS40 - Zn (Ibuprofeno)₂ (Nic)₂. O intuito do trabalho é verificar a ação desses compostos como estudo de novos fármacos, contribuindo assim, para o desenvolvimento de novos medicamentos com baixa toxicidade.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral da presente pesquisa é investigar a atividade antitumoral de compostos de coordenação com metais de transição em modelo de melanoma *in vitro*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a. Avaliar a atividade antitumoral das moléculas PRS01, PRS17, PRS22 e PRS40 por meio da análise da viabilidade celular pelo ensaio de MTT.
- b. Avaliar se os compostos são capazes de induzir morte celular utilizando ensaio de marcação com anexina iodeto por citometria de fluxo.

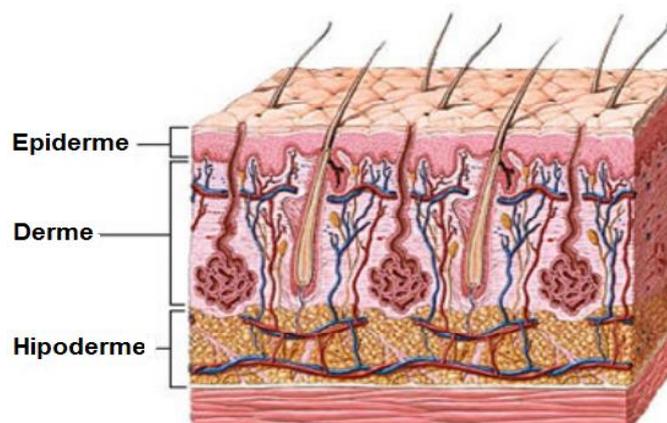
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PELE

A pele foi descrita por Virchow, há mais de 150 anos, como um envoltório do corpo que possui a função de revestir e proteger órgãos mais complexos, porém, os últimos estudos têm demonstrado que a pele também é um órgão complexo e com sofisticada funcionalidade. As interações moleculares e celulares são complexas, ocorrendo renovação e reparo a todo momento. A pele é um tecido altamente dinâmico e apresenta a capacidade de responder a variações do ambiente externo e interno, permitindo expressar através de alterações cutâneas muitas manifestações do organismo (BARBOSA, 2011).

Diferentes tecidos constituem a pele, são reunidos para a realização de funções específicas. A pele corresponde a cerca de 15% do peso corpóreo do ser humano, revestindo e delimitando o organismo, protegendo e interagindo com o ambiente externo. A sua principal função é a conservação da homeostasia, através da proteção contra desidratação, atritos e raios UV, percepção sensorial, termo regulação do corpo, excreção, imunidade e também formação de vitamina D3 (ARAÚJO, 2010).

Considerada com um dos maiores órgãos do corpo, a pele apresenta uma superfície que varia entre 1,50 m² e 1,80 m² para uma pessoa adulta. As três principais camadas da pele são: a epiderme, a derme e a hipoderme, conforme apresentado na Figura 1 (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).



Fonte: Araújo (2010).

Figura 1 - Principais camadas e estruturas da pele

3.1.1 Epiderme

A epiderme é a camada mais superficial da pele, é constituída pela primeira barreira de proteção contra agentes externos. A espessura da epiderme classifica a pele em fina ou espessa. Sua espessura varia de 0,07 a 0,12 mm na maior parte do corpo, na palma da mão pode chegar a 0,8 mm e na planta do pé a 1,4 mm. É constituída por células epiteliais (queratinócitos), que são dispostos de maneira semelhante a uma parede de tijolos, e também existem os melanócitos, que estão localizados nas camadas inferiores e produzem a melanina, pigmento que determina a cor da pele (FRANQUILINO, 2014).

A barreira formada pela epiderme é responsável por proteger a pele de substâncias químicas, microrganismos, traumatismos físicos e ressecamento por perda transepidérmica de água. À medida que os queratócitos se movem na camada de células basais para o estrato córneo a barreira é criada, e são produzidos e renovados por células-tronco existentes na camada basal (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2008).

A renovação da epiderme é necessária ao longo de sua vida para a manutenção da homeostase e para reparar danos após ferimentos. A capacidade de regeneração do epitélio e sua homeostase dependem do balanço entre a proliferação e diferenciação do tipo principal de células, que são substituídas a cada 28 dias, aproximadamente, e levam 14 dias para atingir o estrato córneo e mais 14 dias para descamar (ARAÚJO, 2010).

3.1.2 Derme

A derme está localizada logo abaixo da epiderme, e tem como objetivo conferir resistência e elasticidade à pele, permitindo uma base firme para sua sustentação. Possui organização complexa, apresentando um tecido conjuntivo com grande quantidade de vasos, glândulas sebáceas e sudoríparas, folículos pilosos e corpúsculos tácteis. O fluxo sanguíneo é controlado através dos plexos vasculares que estão presentes na derme, que é realizado por estímulos provocados pelo hipotálamo e pelas fibras nervosas simpáticas, que além da nutrição realizam o mecanismo de termo regulação (ARAÚJO, 2010).

Duas camadas compõem a derme: a camada papilar e a camada reticular. A camada papilar é formada por tecido conjuntivo frouxo que fica em contato com a

epiderme, e a camada reticular é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, principalmente as fibras de colágeno. Os vasos sanguíneos e linfáticos que vascularizam a epiderme estão localizados na derme, além dos nervos e órgãos sensoriais, como os sensores de estímulos vibracionais e táteis, de pressão, mecânicos, dolorosos e térmicos de frio (FRANQUILINO, 2014).

Diferentes tipos de células compõem a derme, como os fibroblastos e fibrócitos, células imunológicas, eosinófilos, mastócitos e leucócitos sanguíneos, linfócitos e monócitos. Os fibroblastos são células fusiformes que são as principais responsáveis pelo processo de cicatrização, pois são capazes de sintetizar fibras colágenas, elastina, fibronectina, proteases e glicosaminoglicanas. Além disso, também são responsáveis pelo debridamento e remodelamento fisiológico da célula (ARAÚJO, 2010).

Os fibrócitos em condições fisiológicas ou patológicas são encontrados em vários tecidos e são importantes para o processo de cicatrização, de remodelagem da pele e nos processos inflamatórios, através da produção de fatores de crescimento. Derivadas de precursores da medula óssea, os fibrócitos favorecem a presença de miofibroblastos no tecido cicatricial (ARAÚJO, 2010).

3.1.3 Hipoderme

A hipoderme é a camada subcutânea adiposa localizada abaixo da derme, não faz parte da derme, porém possui a mesma origem embrionária. É um depósito de gordura e de reserva e a função principal da hipoderme é isolar a pele, sendo responsável por unir a pele com os órgãos adjacentes do corpo, protegendo contra lesões causadas por pressão ou estiramento sofridos (ARAÚJO, 2010).

A derme e a hipoderme são ligadas por fibras de elastina e colágeno. A espessura da hipoderme varia de acordo com a região do corpo e também o sexo do indivíduo. Os principais tecidos que compõem a hipoderme são o adiposo e o conjuntivo frouxo vascularizado. As principais células são os adipócitos, que produzem e acumulam gordura (FRANQUILINO, 2014).

3.2 CÂNCER DE PELE

As neoplasias malignas de pele, popularmente chamadas de câncer de pele, são consideradas como uma das doenças mais comuns no mundo, sendo mais incidente em pessoas com mais de 40 anos, de pele clara e sensível à ação dos raios solares. A incidência do câncer de pele é relativamente rara em negros e crianças, exceto em pessoas portadoras de doenças cutâneas prévias (INCA, 2011).

Existem 3 tipos de câncer de pele: o carcinoma basocelular, o carcinoma espinocelular e o melanoma cutâneo. O carcinoma basocelular é o tipo mais frequente e agressivo e surge como um pequeno nódulo rosado que lentamente cresce por meses ou até por anos, após este nódulo se torna uma ferida. O carcinoma espinocelular é o segundo câncer de pele mais frequente e se desenvolve mais rapidamente como uma pequena ferida ou uma crosta. Os carcinomas basocelular e espinocelular são também conhecidos como câncer de pele não melanoma e são mais encontrados em áreas constantemente expostas ao sol, como a face e os braços (SILVA et al., 2016).

O não melanoma representa cerca de 90% de todos os tipos de câncer de pele, sua incidência tem aumentado principalmente na população mais jovem. A prevenção, e o diagnóstico inicial e o tratamento são fatores importantes para a saúde pública e causa sérios impactos nas políticas governamentais (ZINK, 2014).

A pele é heterogênea e o câncer de pele não melanoma pode apresentar tumores de várias linhagens diferentes, sendo os mais frequentes o carcinoma basocelular, que é responsável por 70% dos diagnósticos e o carcinoma das células escamosas ou carcinoma epidermoide representa 25% dos casos. Embora seja o menos agressivo, o carcinoma basocelular é o tipo mais incidente (INCA, 2011).

O estadiamento do melanoma é um fator de muita importância para a orientação clínica do paciente, sendo um sistema de classificação que considera os fatores prognósticos. O estadiamento é regido por normas internacionais contidas no livro TNM – *Classification of Malignant Tumors*, que visa a análise da extensão anatômica da doença, conforme a Tabela 1. A avaliação é realizada a partir dos componentes: “T” – extensão do tumor primário, “N” – ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais e “M” – ausência ou presença de metástase à distância (VICENTE, 2016).

Tabela 1 – Estadiamento do melanoma cutâneo.

Tumor Primário (T)	
Tis	Melanoma <i>in situ</i> (Clark nível I) (hiperplasia melanocítica atípica, displasia melanocítica importante, lesão maligna não invasiva)
T1	≤ 1,0 mm a. sem ulceração e mitoses < 1/mm ² b. com ulceração ou mitoses ≥ 1/mm ²
T2	> 1- 2,0 mm a. sem ulceração b. com ulceração
T3	> 2 – 4,0 mm a. sem ulceração b. com ulceração
T4	> 4,0 mm a. sem ulceração b. com ulceração
Linfonodos Regionais (N)	
N0	Ausência de metástases em linfonodo regional
N1	a. metástase microscópica ¹ em apenas um linfonodo b. metástase macroscópica ² em apenas um linfonodo
N2	a. metástase microscópica ¹ em dois ou três linfonodos regionais b. metástase macroscópica ² em dois ou três linfonodos regionais c. satélite ^{**} ou em trânsito ^{**} sem metástase linfonodal regional
N3	Metástase em quatro ou mais linfonodos regionais, ou linfonodos coalescentes, ou satélite(s)/metástase(s) em trânsito com metástase(s) em linfonodo(s) regional
Metástases Distância (M)	
M0	Sem metástases distantes
M1a	Metástases distantes na pele, subcutâneo ou linfonodos não regionais e nível sérico de desidrogenase láctica (LDH) normal
M1b	Metástases no pulmão e nível de desidrogenase láctica (LDH) normal
M1c	Metástases em outros locais, ou qualquer local com aumento do nível sérico de desidrogenase láctica (LDH)

¹ Metástases microscópicas são diagnosticadas após biópsia de linfonodo sentinela.

² Metástases macroscópicas são definidas como metástases linfonodais clinicamente detectadas e confirmadas patologicamente.

* Satélites são ninhos tumorais ou nódulos (micro ou macroscópicos) até 5 cm do tumor primário.

** Metástases em trânsito envolvem a pele ou tecido subcutâneo com distância superior a 5 cm do tumor primário mas não além dos linfonodos regionais.

Fonte: Vicente (2016).

Os fatores de risco que contribuem para o desenvolvimento do câncer de pele estão relacionados com a gênese de lesões da pele, fatores genéticos, história familiar de câncer de pele e a radiação ultravioleta (raios UV). Os raios UV facilitam mutações gênicas e exercem efeito supressos no sistema cutâneo imune. Uma forma efetiva de proteção é a utilização de foto protetora, que tem sido amplamente discutida na literatura e também recomendada para a prevenção de todos os tipos de neoplasias da pele (CASTILHO et al., 2010).

A ressecção cirúrgica com margens oncológicas continua sendo o tratamento padrão, além da clássica cirurgia excisional e de outras opções cirúrgicas que incluem

a curetagem e eletrodissecação, a criocirurgia, a cirurgia a laser e a cirurgia micrográfica de Mohs. A escolha do tratamento a ser utilizado deve levar em consideração a correção do defeito com preservação da função e também do bom estado estético sempre que possível. A quimioterapia, a radioterapia, a imunoterapia e as medicações orais e tópicos também devem ser consideradas no momento de escolher a terapia mais adequada (SILVA et al., 2016).

A microscopia de superfície, também chamada de dermatoscopia, é um método auxiliar clínico não invasivo in vivo, que é indicado principalmente para realizar o diagnóstico das lesões pigmentadas cutâneas como benignas, altamente suspeitas ou malignas. Este método também é utilizado para monitorar as lesões melanocíticas, principalmente em pacientes de risco para o desenvolvimento de melanoma cutâneo (COSTA, 2017).

3.3 MELANOMA

O melanoma cutâneo é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos, que são as células produtoras de melanina, substância que determina a cor da pele. Apenas 4% das neoplasias malignas da pele são representadas pelo melanoma, sendo o tipo mais grave por apresentar alta possibilidade de metástase. Se o tumor for detectado em estágios iniciais ou precocemente, o prognóstico desse tipo de câncer é positivo e melhora a sobrevivência dos pacientes com melanoma (INCA, 2011).

Os melanócitos são responsáveis pela resposta da pele frente à exposição à luz ultravioleta, que realiza a síntese e a transferência dos grânulos de melanina empacotados na chamada unidade de pigmentação cutânea. O número de melanócitos e queratinócitos basais e suprabasais apresentam na pele a proporção de 1:35, aproximadamente. A quantidade de melanócitos presentes na epiderme apresenta variação em função da região anatômica, sendo a cabeça e o antebraço as regiões com maior densidade de células. A proliferação dos melanócitos é causada por estímulos externos de radiação UV (SILVA, 2016).

A incidência global do melanoma cutâneo é de 132.000 casos por ano e estima-se que no Brasil há aproximadamente 5.670 casos por ano, sendo 2.670 casos em mulheres e 3.000 em homens. O melanoma cutâneo pode levar a óbito e o Brasil

apresenta 1.547 casos, sendo 644 óbitos de mulheres e 903 de homens, com incidência de faixa etária de 45 a 55 anos (SILVA, 2016).

Existem quatro tipos de melanomas: (a) melanoma de disseminação superficial ou radial, (b) melanoma nodular, (c) melanoma maligno lentigo e (d) melanoma lentiginoso acral. As metástases podem ocorrer por via linfática e por via sanguínea. Através da via linfática as metástases ocorrem nas adjacências do tumor (microssatelitose e lesões-satélite) e nos gânglios regionais, já através da via sanguínea atingem com maior frequência a pele, os pulmões, o fígado e encéfalo frequentemente (COSTA, 2017).

O melanoma de disseminação superficial é o tipo mais comum de melanoma cutâneo, que corresponde a aproximadamente 70% dos casos. O local mais frequente de seu aparecimento é na região posterior das pernas de mulheres e no dorso dos homens. Esse tipo de melanoma é mais comumente encontrado nas áreas de pele que possuem maior exposição, particularmente em áreas de exposição solar intermitente. Normalmente apresentam disseminação pagetóide proeminente e são compostos por células epitelióide (COSTA, 2008).

O segundo tipo de melanoma mais comum é o nodular, que representa de 15 a 30% dos casos e ocorre com mais frequência entre os 50 e 60 anos de idade, principalmente em pessoas do sexo masculino. Este melanoma se apresenta como uma lesão papulosa ou nodular, elevada, de cor castanha, negra ou azulada, frequentemente ocorrem ulcerações e sangramentos. Existe a variante amelanótica, que apresenta superfície eritematosa e crescimento vertical com metástases precoces (DIMATOS et al., 2009).

O melanoma maligno lentigo é o tipo que atinge a pele de idosos em regiões cronicamente expostas ao sol, principalmente o rosto. Histologicamente este tipo de melanoma se caracteriza pela proliferação melanicítica linear e aninhado ao longo da junção da derme com a epiderme, a atrofia epidérmica e elastose solar estão associadas à lesão. Nos países onde a população é predominantemente branca, este melanoma atinge de 4 a 15% dos casos (DIMATOS et al., 2009).

O lentiginoso acral é o tipo de melanoma cutâneo que apresenta características hispopatológicas diferentes dos demais tipos e atinge as palmas das mãos, as plantas dos pés e regiões subungueais. Este tipo de melanoma atinge pacientes idosos com pico aos 70 anos de idade, sendo mais frequente em homens do que em mulheres. Clinicamente na sua fase radial é caracterizado por acantose, alongamento das cristas

epiteliais e proliferação de melaócitos atípicos com grandes prolongamentos dendríticos ao longo da epiderme basal (DIMATOS et al., 2009).

Pessoas de pele clara, várias pintas atípicas ou histórico familiar de melanoma são consideradas como pertencentes à classe de alto risco da doença, por isso, devem ser acompanhadas em intervalos regulares. Geralmente a triagem do melanoma inclui um exame cutâneo de todo o corpo, realizado por dermoscopia ou outras técnicas de imagem, sendo útil para a detecção precoce, incluindo a biópsia e diagnóstico histopatológico em caso de lesões suspeitas (SCHADENDORF et al., 2018).

As células B16-F10 foram obtidas por Fidler (1973) selecionando as células com maior capacidade de colonizar os pulmões a partir de uma variante parental menos metastática.

3.4 TRATAMENTO

O diagnóstico do melanoma é realizado histopatologicamente e as decisões subsequentes de tratamento são baseadas na classificação do melanoma e também do cálculo de risco. A classificação é realizada a partir da espessura do tumor, o envolvimento de linfonodos e da metástase. A maioria dos melanomas é diagnosticada antes das metástases linfonodais. A espessura do tumor é o critério mais crucial para avaliar o prognóstico de tratamento e incluir as margens de segurança exigidas para a realização da biópsia. A ulceração também é um critério relevante que deve ser incorporado ao prognóstico (SCHADENDORF et al., 2018).

O tratamento definitivo do melanoma cutâneo é sua extensa excisão cirúrgica local, uma vez que o diagnóstico histológico foi confirmado. Ocasionalmente, o tratamento cirúrgico do tumor primário deve ser adaptado às suas peculiaridades anatômicas de alguns locais, do tamanho do tumor ou da situação médica do paciente. Desta forma, no caso de tumores invasivos ungueais, recomenda-se a amputação abaixo da articulação interfalângica distal. Em tumores subungueais uma cirurgia conservadora deve ser considerada. A radioterapia ou outros tratamentos são reservados para os casos em que a cirurgia não pode ser realizada (pacientes inoperáveis) ou aqueles em que a completa extirpação da lesão é altamente desfigurante, ou seja, grandes lentigos maligno da região facial (MARTÍNEZ et al., 2017).

A dacarbazina é uma alternativa para o tratamento do melanoma metastático, um análogo das purinas inibindo a síntese de DNA (ácido desoxirribonucleico) e RNA (ácido ribonucleico). Os tratamentos direcionados e avanços na imunoterapia são eficientes para melhorar a sobrevida e se tornaram uma parte do entendimento clínico de rotina dos pacientes com melanoma e estão sendo incorporados ao arsenal terapêutico brasileiro (VICENTE, 2016).

O tratamento do melanoma mudou drasticamente nos últimos anos devido ao desenvolvimento de inibidores do checkpoint imunológico e inibidores de proteína quinase ativada por mitógeno (MAP), como os inibidores de BRAF, vemurafenibe e os inibidores da MAP quinase, trametinibe e cobimetinibe. Estas drogas criam novas oportunidades para prolongar sem progressão a sobrevida global para pacientes com a doença melanoma (RUAN et al., 2018).

O PLX4032 (Vemurafenibe) é um inibidor capaz de parar o ciclo celular e demonstra até 80% de taxa de resposta clínica em portadores de melanoma. Porém, o uso de Vemurafenibe se associou ao crescimento de lesões nos pacientes portadores de um gene selvagem e com mutações. Vários pacientes desenvolveram resistência após a resposta inicial, sendo observada recidiva e/ou progressão do tumor (VICENTE, 2016).

O c-Kit é uma tirosina quinase do receptor transmembrana do tipo III, que causa a autofosforilação e ativação de várias vias de sinalização, inibindo o crescimento, a proliferação e a metástase das células cancerígenas. As vias ativadas incluem proteína quinase ativada por mitógeno fosfatidilinositol. Mutações em c-Kit são relatadas em 39% das mucosas, 36% do acral e 28% de melanomas crônicos danificados pelo sol (MISHRA et al., 2018).

É preciso realizar a seleção adequada de subconjuntos de pacientes que podem se beneficiar de inibidores de checkpoint ou inibidores MAP. A aplicação dessas novas drogas representa um grande desafio, sendo necessária a realização de pesquisas sobre os potenciais efeitos colaterais e também levantar questões sobre sua relação custo benefício para a prática clínica diária (RUAN et al., 2018).

3.5 FARMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS

No século 19, Rudolf Virchow foi um dos primeiros pesquisadores a propor que a inflamação é um componente importante para a progressão tumoral, pois muitos

casos de câncer têm origem a partir de locais de infecção, irritação crônica ou inflamação. A permanência de inflamação crônica pode acarretar problemas na capacidade funcional dos tecidos, prejudicando o processo de cura e a formação de tecido fibroso cicatricial da pele (ALBERTI et al., 2013).

Uma lesão tissular provoca como resposta o processo inflamatório, pois envolve fenômenos bioquímicos e celulares complexos, que liberam substâncias chamadas prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) atuam principalmente pela inibição da síntese de prostaglandinas através da inibição da ciclooxigenase (COX), que é a enzima responsável pela produção da prostaglandina a partir de ácido araquidônico. Há duas isozimas da COX, a ciclooxigenase-1 (COX-1) e a ciclooxigenase-2 (COX-2) (BERNARDI; JACQUES-SILVA, 2002).

Estudos apontam que a COX-2 contribui fortemente para favorecer o potencial tumorigênico da célula epitelial por elevar sua adesão à matriz extracelular, fazendo com que se torne resistente à apoptose, aumentando a viabilidade de desenvolver um tumor, que foi reversível com a associação de inibidores de COX-2, ou seja, com a administração de anti-inflamatórios não esteroides. Evidências comprovam a relação entre a COX-2 com a regulação angiogênese relacionada com as células tumorais neoplásicas. A Tabela 2 apresenta os antiinflamatórios não esteroidais inibidores da COX-1 e da COX-2 (KUMMER; COELHO, 2002).

Os anti-inflamatórios não esteroides são conhecidos pela humanidade há mais de 100 anos e estão entre os fármacos mais comumente utilizados para tratamentos médicos. Estes fármacos compõem um grupo heterogêneo de compostos, que consiste de um ou mais anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido funcional. Atuam principalmente nos tecidos inflamados e se ligam à albumina plasmática, sua absorção é rápida e completa depois da administração oral, não atravessam imediatamente a barreira hematoencefálica e são metabolizados principalmente pelo fígado. Todos os anti-inflamatórios não esteroidais são transformados em metabólitos inativos pelo e fígado, e são excretados pela urina ou por excreção biliar (MONTEIRO et al., 2008).

Droga	IC50 COX-1 (μM)	IC50 COX-2 (μM)	IC50 COX-2/COX-1
Inibidores não Específicos da COX-2			
Aspirina	1,67	278	166
Ácido Mefenâmico	0,15	0,28	1,87
Cetoprofeno	0,006	0,119	19,8
Cetorolaco	0,32	0,88	2,75
Diclofenaco Sódio	1,57	1,1	0,70
Fenoprofeno	2,73	4,03	1,47
Flurbiprofeno	0,59	3,46	5,90
Indometacina	0,028	1,68	60
Ibuprofeno	4,88	22,4	4,60
Nabumetona	278	187	0,67
Naproxeno	11	52,3	4,6
Oxaprozino	14,6	36,7	2,51
Piroxicam	0,0005	0,3	600
Tenoxicam	23,0	14,2	0,62
Tolmetino	1,23	7,09	5,76
Inibidores Específicos da COX-2			
Celecoxibe	15	0,04	0,003
Cetorolaco	0,083	0,012	0,14
DFU	50,0	0,04	< 0,001
Etodalaco	34,0	3,4	0,10
L-745337	369	1,5	0,004
Meloxicam	4,8	0,43	0,09
Nimesulide	9,2	0,52	0,06
NS-398	16,8	0,10	0,006
Rofecoxibe	26,3	0,34	0,01
SC-58125	38,7	0,27	0,007

Fonte: Carvalho et al. (2004).

Tabela 2 - Especificidade dos Anti-inflamatórios Não-esteroidais

3.6 COMPOSTOS DE COORDENAÇÃO

Há evidências que muitos compostos orgânicos são comumente utilizados na medicina e não apresentam atuação orgânica. Muitas moléculas orgânicas são capazes de serem ativadas ou biotransformadas através de íons metálicos. O organismo possui várias reações que utilizam metaloproteínas como catalisadores,

por isso, em tratamentos médicos à base de fármacos orgânicos, estes compostos podem apresentar uma atividade relacionado à coordenação do íon metálico. Os compostos de coordenação são amplamente atuantes na química medicinal para o tratamento de câncer, inclusive o melanoma. Os compostos contendo metais de transição representam uma classe de quimioterápicos amplamente empregados nas clínicas como agentes antitumorais e antivirais (ALMEIDA, 2009).

A utilização de complexos metálicos com propriedades antitumorais começou a ser estudada a partir da descoberta da ação antitumoral de cis-diaminodicloroplatina(II), cisplatina, no fim da década de 60 do século XX, por Barnett Rosenberg. As pesquisas utilizando compostos de coordenação foram estimuladas a partir da descoberta da atividade citotóxica de diversos outros complexos de platina e outros metais, tais como gálio e cobre. O complexo diaminodicloroplatina(II) foi descrito pela primeira vez em 1844 por Reiset e, um ano mais tarde, Peyrone descreveu um outro composto com a mesma fórmula molecular. Em 1893, Werner propôs que esses complexos fossem isômeros, sendo o de Reiset a forma trans e o de Peyrone o isômero cis (VIEIRA, 2007).

Para a formação de um composto de coordenação metálico, a molécula precisa possuir sítios doadores de elétrons, pois os metais são receptores de elétrons e atuam como ácidos de Lewis. Um bom exemplo são as bases de Schiff, que possuem átomos de nitrogênio que possuem elétrons livres capazes de formar uma ligação de coordenação com os íons metálicos. As propriedades biológicas das moléculas podem ser alteradas de acordo com a coordenação, devido às mudanças na densidade eletrônica sobre os sítios de ação (PATEL et al., 2012).

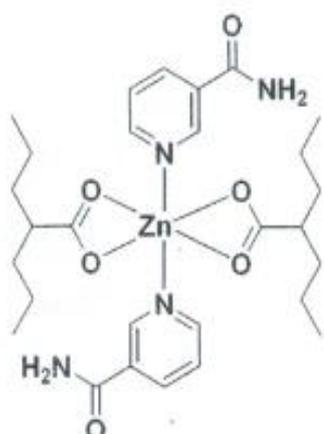
Atualmente, seis complexos de coordenação derivados da platina são aprovados para uso clínico: a cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, nedaplatina, lobaplatina, e a heptaplatina. Embora esses complexos apresentem alta atividade anticâncer, a elevada nefrotoxicidade representa um impasse para a sua utilização, apresentando efeitos colaterais como náusea, vômito, anorexia, ototoxicidade e neurotoxicidade, além do desenvolvimento de resistência ao medicamento, sendo necessário o desenvolvimento de novos complexos de coordenação para serem utilizados no tratamento do câncer (ALMEIDA et al., 2014).

Os complexos de paládio chamam a atenção como potenciais agentes antitumorais, pois o composto Pd(II)-metSO apresenta atividade anticancerígeno. Tiosemecarbazonas estão sendo utilizadas com ligantes de enxofre para sintetizar os

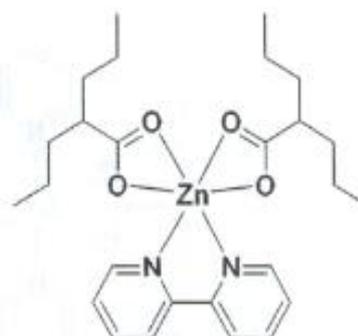
complexos de Pd(II) com o objetivo de serem utilizados como agentes anticâncer. Estes complexos são ativados em uma série de linhagens de células cancerígenas com valores de IC₅₀ similares ao da cisplatina. Dentre esses complexos se destacam o [(Pd(*p*-isoTSCN)(μ -Cl)]₂ e o [(Pd(*p*-isoTSCN₄))] (ALMEIDA, 2014).

Um grande problema das drogas antitumorais atuais é que estas, em sua maioria, são ciclo-celular específicas, de forma que só atuam em células em processo de divisão, entretanto, os tumores sólidos, que representam cerca de 90% das variedades de câncer incidentes nos homens, caracterizam-se por uma divisão celular relativamente lenta, respondendo pouco aos agentes quimioterápicos, mesmo em associação com outras técnicas. Para estes casos, uma estratégia que tem se mostrado bastante promissora envolve a preparação de complexos de metais inertes em estados de oxidação mais elevados, que tornam-se ativos apenas após redução, como, por exemplo, compostos de Pt(IV), Ru(III) E Zn(II) (ALMEIDA, 2014).

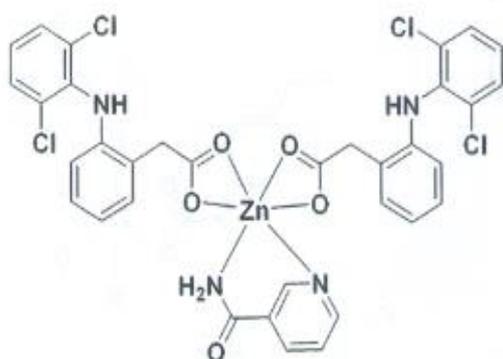
Baseando-se nas premissas descritas acima, neste presente trabalho foram testados os compostos inéditos de coordenação de Zn⁺² com os fármacos anti-inflamatórios não esteriodais diclofenaco e ibuprofeno, PRS22 - Zn(Diclofenaco)₂Nic e PRS40 Zn(Ibuprofeno)₂(Nic)₂ quanto a sua capacidade de antitumoral frente as células de melanoma murino B16F10. A estrutura molecular destes compostos estão demonstradas na Figura abaixo. Além disso, foram testados os compostos PRS01 Zn (Valproato)₂ Bipy e PRS17 Zn (Valproato)₂ (Nic)₂ já descritos na literatura, que constituem complexos de zinco é constituído por dois valproatos, um N doador e uma molécula de água de hidratação para centro do metal, seus complexos demonstraram menor toxicidade como demonstrado por Santos et al (2015).



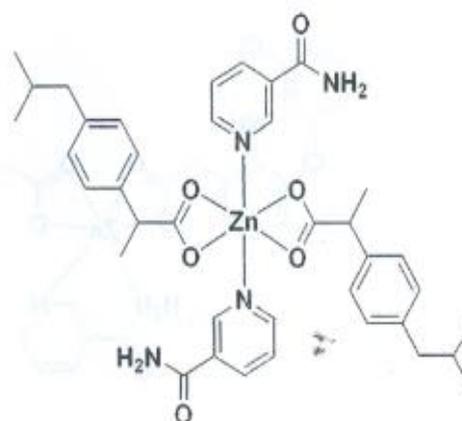
Código: PRS 17
 $\text{Zn}(\text{Valproato})_2(\text{Nic})_2$
 $\text{C}_{28}\text{H}_{42}\text{N}_4\text{O}_6\text{Zn}$
 MW: 596,0460 g/mol



Código: PRS 01
 $\text{Zn}(\text{Valproato})_2\text{Bipy}$
 $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}_4\text{Zn}$
 MW: 507,9800 g/mol



Código: PRS 22
 $\text{Zn}(\text{Diclofenaco})_2\text{Nic}$
 $\text{C}_{34}\text{H}_{26}\text{Cl}_4\text{N}_4\text{O}_5\text{Zn}$
 MW: 777,7850



Código: PRS 40
 $\text{Zn}(\text{Ibuprofeno})_2(\text{Nic})_2$
 $\text{C}_{38}\text{H}_{46}\text{N}_4\text{O}_6\text{Zn}$
 MW: 720,1880

Fonte: cedido por Sidnei Moura e Silva, 2017

Figura 2: Estruturas químicas dos compostos testados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta pesquisa tem caráter qualitativo e quantitativo, onde, investigou-se a atividade antitumoral de compostos de coordenação com metais de transição para o tratamento do melanoma por meio da preparação dos compostos de Zinco, linhagens celulares e manutenção do cultivo celular, viabilidade celular por ensaios de MTT e ensaio de marcação de anexina V-FITC/iodeto de propídio.

Esta dissertação faz parte de um projeto guarda-chuva, intitulado “Busca de novas entidades químicas candidatas a fármacos para o tratamento de câncer – Modelagem molecular, síntese e determinação de atividade biológica, aprovado pelo FAPERGS – Edital Nucleação de Grupos de Pesquisa (2016)”.

4.1 PREPARAÇÃO DOS COMPOSTOS DE ZINCO

Os compostos utilizados neste estudo foram sintetizados pelo laboratório de Produtos Naturais e Sintéticos coordenado pelo Dr. Sidnei Moura e Silva na Universidade de Caxias do Sul. A metodologia de síntese está previamente descrita no artigo de Santos et al (2015).

Os ensaios biológicos foram realizados utilizando compostos liofilizados, que foram pesados e dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente este solvente foi usado como controle com concentração final de 0,1% em cada poço. As soluções estoque foram preparadas e em seguida foram homogeneizadas e estocadas em freezer convencional durante um período de 15 horas. O fármaco cisplatino com concentração de 50 μM foi utilizado como droga controle para os ensaios de viabilidade.

4.2 LINHAGEN CELULARE E MANUTENÇÃO DO CULTIVO CELULAR

Os ensaios com linhagens celulares e manutenção do cultivo celular foram realizados utilizando linhagem tumoral estabelecida, B16-F10 (Melanoma murino). A linhagem foi mantida em temperatura de 37°C, concentração de 5% de CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM L-Gln, 100 IU/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina.

4.3 ENSAIOS DE MTT

O método colorimétrico do MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular após o tratamento com os compostos de Zinco. Este método consiste na medida da atividade de desidrogenase mitocondrial, que é capaz de metabolizar o reagente 3-(4,5-dimetiltiazol)2,5difiltetrazólico (MTT) e transformá-lo em um composto insolúvel e colorido, chamado de formazan.

Os ensaios MTT seguiram a metodologia descrita por Mosman (1983) que se baseia em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Para isso, 2×10^4 células das linhagens B16-F10 foram plaqueadas em microplacas de 96 poços na ausência ou presença dos compostos PRS22 - Zn (Diclofenaco)₂ Nic, PRS40 Zn (Ibuprofeno)₂ (Nic)₂, PRS01 Zn (Valproato)₂ Bipy, PRS17 Zn (Valproato)₂ (Nic)₂ (2,5 – 250 µM) ou cisplatina (50 µM). Em seguida foram incubados em estufa a 37°C em atmosfera com concentração de 5% de CO₂, durante 48 horas.

Finalizado o período de incubação, os poços foram lavados com o objetivo de realizar o controle da cor, em seguida aos poços de cultivo foram adicionados 40 µL de tampão PBS e 10 µL de MTT na concentração de 5mg.mL⁻¹. A incubação com MTT foi realizada durante 3 horas, e após esse período foram acrescentados 50 µL de DMSO.

A densidade óptica (DO) foi quantificada em um espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 570nm e 620nm.

4.4 ENSAIOS DE MARCAÇÃO DE ANEXIA V-FITC/IODETO DE PROPÍDIO

Os ensaios para a detecção de apoptose por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio se baseiam na ligação da anexina V-FITC à fosfatidilserina, na membrana das células que estão começando o processo apoptótico, e na ligação do iodeto de propídeo ao DNA das células no processo final de apoptose.

O kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC (BD Biosciences) / Iodeto de Propídio (PI) foi utilizado de acordo com as instruções do próprio fabricante. Foram plaqueadas 5×10^5 células em microplacas de 12 poços. Em seguida foram incubadas na ausência ou presença de PRS22 - Zn (Diclofenaco)₂ Nic e PRS40 Zn(Ipuprofeno)₂(Nic)₂(250 μ M).

Após a realização do tratamento com os compostos de zinco, as células foram centrifugadas, lavadas com PBS e incubadas em temperatura ambiente durante 15 minutos. Em seguida foi realizada a aquisição dos dados em citômetro de fluxo FACSCalibur II (BD Biosciences), os dados foram analisados no software FlowJo.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os metais são componentes essenciais das células. Eles são frequentemente encontrados em domínios catalíticos de enzimas e estão envolvidos em múltiplos processos biológicos, desde a troca de elétrons até a catálise e papéis estruturais em proteínas. Tais metais incluem o gálio, o zinco, o cobalto, a prata, o vanádio, o estrôncio, o manganês e o cobre, que são necessários para desencadear processos catalíticos (BRUIJNINCX; SADLER, 2008.). Para isso, é importante que haja um equilíbrio entre a necessidade celular e a quantidade dos metais disponível no corpo, em um estado fisiológico normal. Comparativamente, os metais, como níquel, cádmio,

cromo e arsênio, podem induzir carcinogênese e, portanto, são menos benéficos para o corpo.

Essas limitações desencadearam uma busca por compostos à base de metais que apresentam menor toxicidade, maior seletividade e um espectro mais amplo de atividade (FREZZA et al.,2010). Complexos de platina (II), como carboplatina e oxaliplatina, assim como outros análogos, são os produtos dessa busca. Outros complexos metálicos contendo íons como o zinco (II), agentes quelantes de ouro e cobre, receberam considerável interesse como agentes anticâncer (FREZZA et al.,2010.).

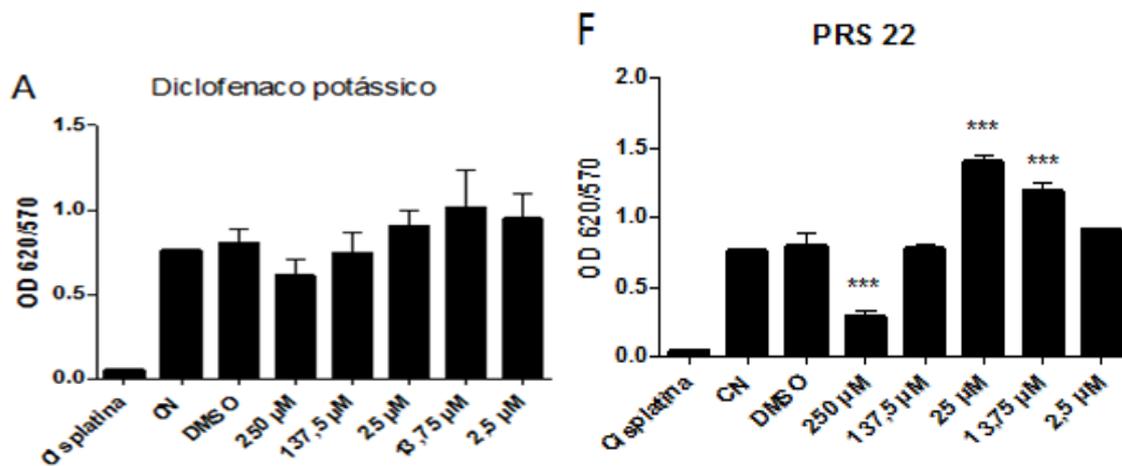
Recentemente, compostos à base de rutênio e de ouro tem recebido grande atenção, devido ao interesse renovado em fornecer uma alternativa à cisplatina, devido às suas propriedades citotóxicas e potenciais anticancerígenas (MONNERET, 2011). Atualmente, tem havido uma crescente demanda por compostos à base de metais no tratamento do câncer. Isto se deve ao efeito citotóxico *in vitro* exibido por compostos metálicos amplamente utilizados. Além disso, a substituição de ligantes e a modificação de estruturas químicas existentes de moléculas conhecidas levaram à síntese de uma ampla gama de compostos baseados em metais, alguns dos quais demonstraram um perfil citotóxico e farmacocinético melhorados.

Uma abordagem baseada no design de drogas citotóxicas também está sendo adotada. Isto envolve a conjugação de compostos metálicos com ácido biliar, esteróides, peptídeos ou açúcares para permitir a entrega direta do fármaco às células cancerígenas, contornando assim alguns desafios farmacocinéticos e citotóxicos (FRANZ, 2013).

Nossos dados demonstram que os compostos organocomplexos com Zinco testados apresentam efeitos de diminuição da viabilidade das células B16F10 de melanoma. Estes efeitos podem ser visualizados nos gráficos F e G da Figura 3. Na concentração de 250 μM os compostos PRS22 e PRS40 apresentam diminuição significativa da viabilidade celular em comparação com o controle negativo (CN) e controle de veículo (DMSO). Além disso, na concentração de 250 μM o ibuprofeno e o diclofenaco não apresentaram este mesmo efeito (Figura 3 gráfico A e B). Estes dados sugerem que o fato do diclofenaco e ibuprofeno estarem complexados com Zinco, PRS22 e PRS40, respectivamente, melhora sua capacidade de diminuição da viabilidade celular. Entretanto em concentrações menores estes compostos aumentam significativamente a viabilidade celular, o que pode ser desanimador

quando se trata de um fármaco antitumoral (Figura 3 gráficos F e G). Quando analisamos a capacidade de morte mediada por apoptose, os compostos PRS22 e PRS40 apresentam um efeito de aumento de morte de 4 vezes em relação ao controle negativo (Figura 4). A frequência de células anexina+iodeto+ que indicam apoptose variam de 9-10% nos grupos tratados com os compostos comparando com 2% no grupo controle (Figura 4).

Os compostos derivados de valproato, PRS01 e PRS 17 não apresentaram efeito de redução de viabilidade celular quando analisado pelo ensaio de MTT (Figura 3 gráficos D e E). Estes resultados são bastante similares ao valproato (Figura 3 gráfico C). No entanto, quando analisamos a presença de morte celular por apoptose, surpreendentemente o composto PRS17 apresentou um efeito de indução de morte de 20 vezes em relação ao controle (Figura 4). Estes dados demonstram que a metodologia de MTT comparado com análise por citometria de fluxo utilizando marcação com anexina e iodeto podem ter resultados bastante discrepantes.



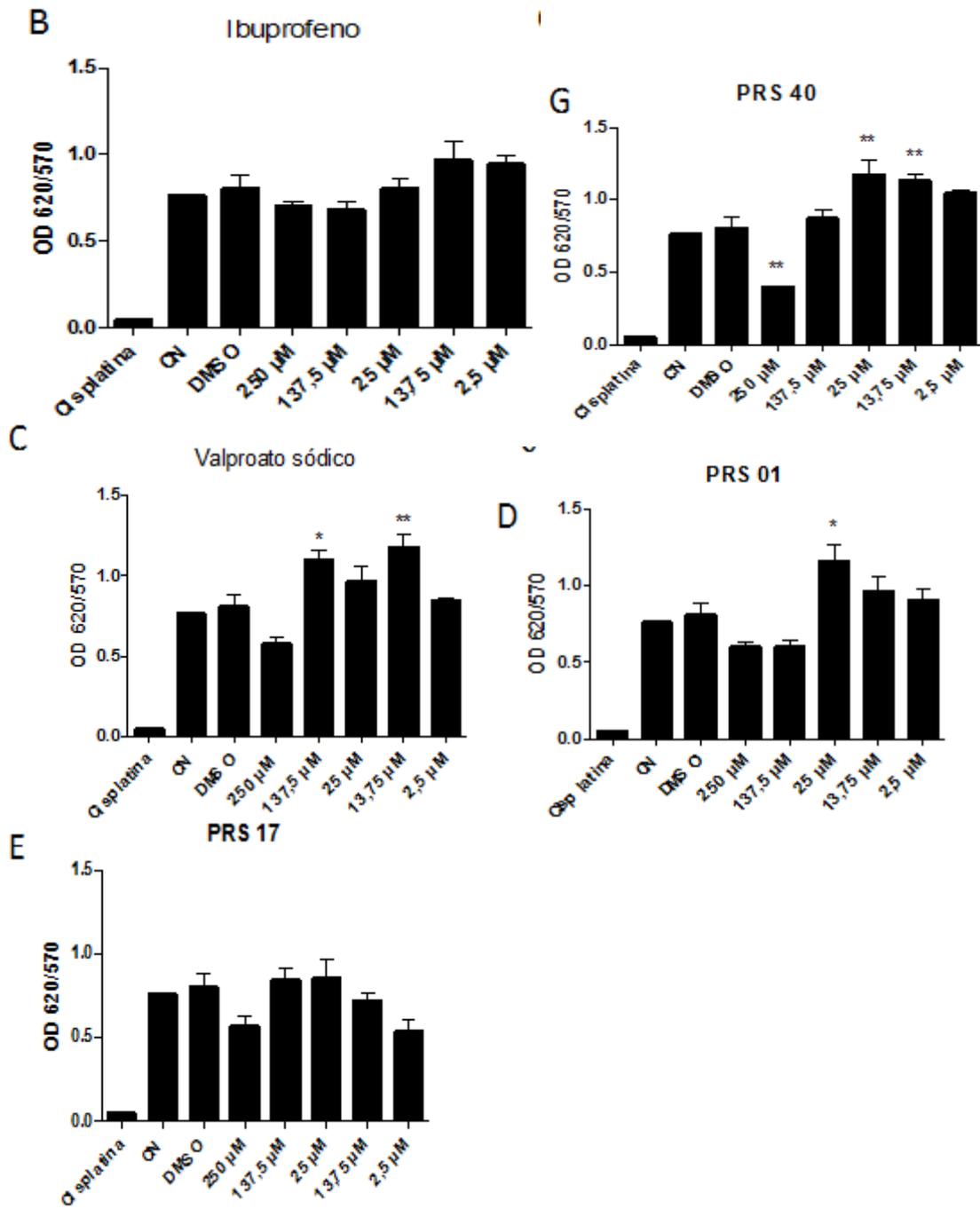


Figura 3: Análise da viabilidade celular utilizando o ensaio de redução do MTT.

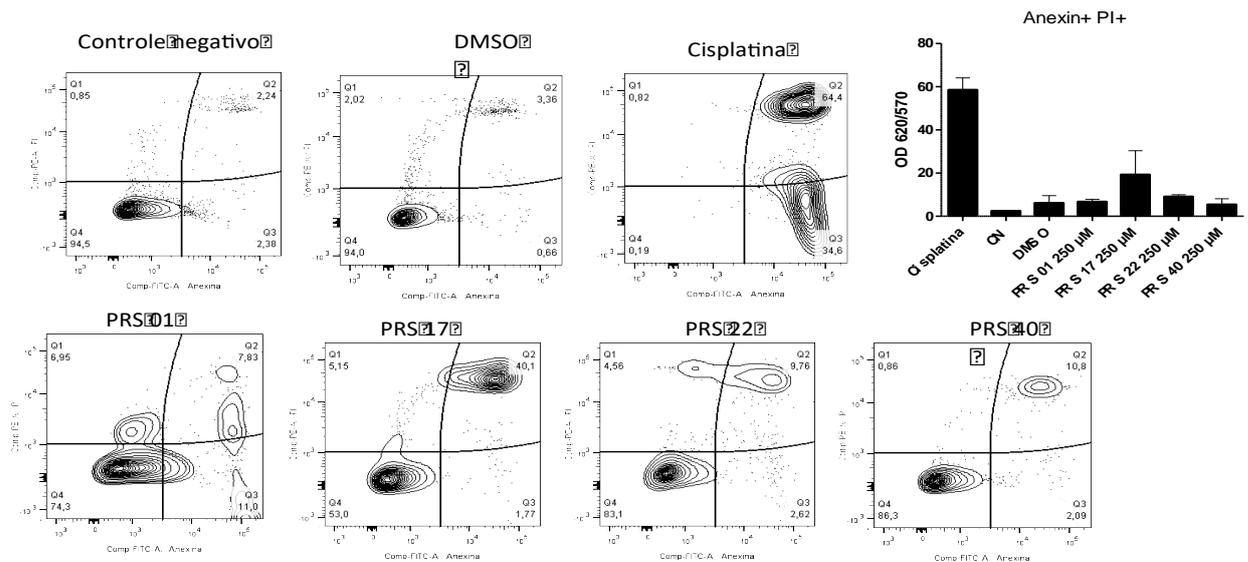


Figura 4: Análise por citometria de fluxo da morte celular.

Um estudo realizado por LEIDGENS (2015) reportou evidências de que o ibuprofeno induz a apoptose de células de glioma humanas, assim como diminui a capacidade de migração destas células, o que pode auxiliar no tratamento deste tipo de câncer.

O tratamento de longo prazo com concentrações recomendadas têm efeito inibitório sobre a divisão e a proliferação celular. Este efeito benéfico é dose-dependente, uma vez que concentrações mais altas de ibuprofeno podem estar relacionada a regiões da ruptura da barreira hematoencefálica.

Segundo CLOND et al. (2013) e FREDRIKSSON et al. (2011) reportaram que o diclofenaco induz a apoptose de hepatócitos inibindo a necrose tumoral, através da sinalização de TNF- α . Ainda que a sinalização de TNF- α não seja o principal contribuinte para a indução de apoptose, o que indica uma ação sinérgica entre o TNF- α e propriedades inibitórias do crescimento celular do diclofenaco.

O Ácido valpróico está sendo estudado clinicamente para tratar câncer, devido a suas propriedades de inibir o crescimento celular, inibir a angiogênese e induzir a diferenciação celular (MICHAELIS et al., 2004).

O Ácido valpróico também inibe a proliferação celular, induzindo a parada do ciclo celular por meio da regulação da expressão da proteína p21 e induz a morte celular quando combinado com outras drogas quimioterápicas (DAS et al., 2007).

Para CHANG et al. (2017) há evidências de que o ácido valpróico, associado à fluvastatina, induz eficazmente a apoptose celular, aumentando a acetilação das histonas H3 e H4.

Este estudo também reportou que o ácido valpróico associado à fluvastatina atuam na proteína p21, que atua como um regulador negativo do ciclo celular através da inibição da atividade do complexo ciclina / CDK2. Esta proteína também tem um papel importante na apoptose celular.

O papel funcional da p21 na parada do ciclo celular e no apoptose depende da localização da mesma na célula: no núcleo, ela promove a parada do ciclo celular, enquanto no citoplasma promove a resistência a apoptose (KOSTER et al. 2010).

Foi reportado por um estudo realizado por Upadhyay, 2016 que o tratamento com ibuprofeno induz a apoptose celular provavelmente devido anormalidades mitocondriais perturbando a atividade proteassomal e promovendo apoptose dependente do tempo de exposição à droga. Foi observado também que viabilidade celular reduzida induzida pelo ibuprofeno foi recuperada pelo uso de antioxidantes. Já foi reportado na literatura que o tratamento com AINEs causa prejuízo na função do proteassomas e gera eventos de estresse oxidativo celular (JANA, 2008).

Além disso, (UPADHYAY et al., 2016.) reportam que o tratamento com ibuprofeno regula a atividade de transcrição do NF- κ B nas células, um fator envolvido na sinalização da apoptose celular, além de causar alterações morfológicas nucleares, como condensação, marginalização ou fragmentação.

Assim, os resultados apresentados neste trabalho estão de acordo com muitos estudos publicados, que indicam que o ibuprofeno e suas moléculas derivadas possuem um potencial terapêutico anti-tumorigênico devido à indução do programa de morte celular em várias células tumorais. Este potencial é dose-dependente, e mais estudos são necessários para atestar a segurança de cada fármaco novo.

Além dos potenciais farmacológicos de drogas como ibuprofeno, valproato e diclofenaco, cada vez mais têm sido testados novos compostos coordenados contendo metais quelados, como alternativas ao tratamento do câncer.

Compostos complexos de Co (II), Ni (II) e Zn (II) e oxoporfirinas foram sintetizados e caracterizados, e suas atividades antitumorais *in vitro* e *in vivo* foram avaliadas, apresentando cito toxicidade contra cinco tipos de células tumorais humanas selecionadas, induzindo significativamente a parada da fase S em células HepG2 em baixa concentração, com o aumento da expressão de Chk1, Chk2, p21,

p27 e p53 e a diminuição da ciclina A e Cdk2. Além disso, estes compostos também induziram a apoptose em células HepG2 através de uma via mitocondrial dependente de caspases e uma via extrínseca associada à proteína Fas.

Também foi verificada a ativação de p53, a produção de ROS, o aumento de Ca^{2+} intracelular, seguido de promoção de perda de $\Delta\psi$ e aumento de razão de Bax / Bcl-2, do citocromo C e da apaf-1 (QIN et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

Considerando a importância da descoberta de novos fármacos antitumorais, capazes de agir de maneira mais efetiva nas células tumorais sem gerar efeito citotóxicos sistêmicos, fica clara a relevância do presente trabalho.

Os compostos gerados a partir do Zn apresentam diferentes efeitos quando analisado pelo ensaio de MTT ou por anexina iodeto. Além disso, apesar de o efeito antitumoral em concentrações maiores ser proeminente, o efeito de indução da proliferação pode ser um problema futuro. Consequentemente, os dados obtidos e apresentados nesta pesquisa mostram o potencial antitumoral dos compostos estudados, ainda que sejam necessários mais estudos acerca das doses mais efetivas, de seu mecanismo de ação e seus efeitos colaterais.

O presente trabalho foi realizado também por uma ampla pesquisa de trabalhos publicados sobre o tema, que colaboraram para os resultados obtidos fornecendo conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no processo de apoptose celular induzida pelos compostos estudados.

Reitera-se o potencial farmacológico das substâncias estudadas e a necessidade de novos e mais robustos testes para melhor entender seu funcionamento.

REFERÊNCIAS

ALBERTI, I. R.; ARAÚJO, L. S.; DUARTE, L. C. Utilização de medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais em hospital de urgência e trauma, Dourados-MS. **Interbio**, v. 7, n. 2, 2013.

ALMEIDA, M. A. P. **Complexos de rutênio contendo aminoácidos, com propriedades citotóxicas em células tumorais**. 2009. 151 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

ALMEIDA, S. M. V.; ALCANTARA, F. F.; BRITO, C. G. X.; SOUZA, G. C. A.; LAFAYETTE, E. A.; SILVA, V. B. R.; CARVALHO, M. S.; LIMA, M. C. A. Compostos coordenados híbridos de platina no tratamento do câncer. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada**, v. 35, n. 3, 2014.

ARAÚJO, A. K. L. **Aspectos morfológicos do processo de cicatrização induzido por *Ouratea sp.*** 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Ceará, 2010.

BARBOSA, F. S. **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea**. 2011. 107 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

BERNARDI, A.; JACQUES-SILVA, M. C. Anti-inflamatórios não-esteróides: usos clássicos e perspectivas no tratamento do câncer. **Informa**, v. 14, n. 11, 2002.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer - INCA. **ABC do Câncer. Abordagens básicas para o controle do câncer**. Ministério da saúde, Rio de Janeiro, 2011.

BRUIJNINCX, Pieter CA; SADLER, Peter J. New trends for metal complexes with anticancer activity. **Current opinion in chemical biology**, v. 12, n. 2, p. 197-206, 2008.

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; SANTOS, F. R. Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances. **Revista Brasileira de anesthesiol**, v. 54, n. 3, 2004.

CASTILHO, I. G.; SOUZA, M. A. A.; LEITE, R. M. S. Foto exposição e fatores de risco para câncer de pele: uma avaliação de hábitos e conhecimentos entre estudantes universitários. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, n. 2, 2010.

CLOND, Morgan A. et al. Reactive oxygen species-activated nanoprodruge of Ibuprofen for targeting traumatic brain injury in mice. **PloS one**, v. 8, n. 4, p. e61819, 2013.

CHANG, Yung-Lung et al. The synergistic effects of valproic acid and fluvastatin on apoptosis induction in glioblastoma multiforme cell lines. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 92, p. 155-163, 2017.

COSTA, G. L. G. **Estudo retrospectivo dos casos de câncer de pele diagnosticados no hospital de câncer de Mato Grosso**. 2017. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Fundação Antônio Prudente, São Paulo, 2017.

COSTA, H. O. **Melanomas extensivo-superficiais regressivos e não-regressivos finos: análise da densidade microvascular utilizando-se os marcadores D2-40 e CD31**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DAS, CHANDRA M. et al. Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (α/β) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. **Journal of neuro-oncology**, v. 85, n. 2, p. 159-170, 2007.

DIMATOS, D. C.; DUARTE, F. O.; MACHADO, R. S.; VIEIRA, V. J.; VASCONCELLOS, Z. A. A.; BINS-ELY, J.; NEVES, R. D. Melanoma cutâneo no Brasil. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 38, n. 1, 2009.

FRANQUILINO, E. Fisiologia da pele e o processo de envelhecimento. **Revista de Negócios da Indústria da Beleza**, n. 9, 2014.

FREDRIKSSON, Lisa et al. Diclofenac inhibits tumor necrosis factor- α - induced nuclear factor- κ B activation causing synergistic hepatocyte apoptosis. **Hepatology**, v. 53, n. 6, p. 2027-2041, 2011.

FREZZA, Michael et al. Novel metals and metal complexes as platforms for cancer therapy. **Current pharmaceutical design**, v. 16, n. 16, p. 1813-1825, 2010.

JANA, N. R.. NSAIDs and apoptosis. **Cellular and molecular life sciences**, v. 65, n. 9, p. 1295-1301, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. Histologia básica. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 11° Ed, 524 p., 2008.

KOSTER, R. et al. Cytoplasmic p21 expression levels determine cisplatin resistance in human testicular cancer. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 10, p. 3594-3605, 2010.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. C. Cyclooxygenase-2 Inhibitors Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs: Current Issues. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, 2002.

MARTÍNEZ, B. M. A.; MARTÍN, F. J. V.; POVEDA, M. D.; VILLAVARDE, R. M. Melanoma. **Medicin**, v. 12, n. 33, 2017.

MICHAELIS, MARTIN et al. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. **Molecular pharmacology**, v. 65, n. 3, p. 520-527, 2004.

MISHRA, H.; MISHRA, P. K.; EKIELSKI, A.; JAGGI, M.; IQBAL, Z.; TALEGAONKAR, S. Melanoma treatment: from conventional to nanotechnology. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 144, 2018.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). **O reumatologista revista: Temas de reumatologia clínica**, v. 9, n. 2, 2008.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods** 16, 55-63. 1983.

MONNERET, C. Platinum anticancer drugs. From serendipity to rational design. In: **Annales pharmaceutiques françaises**. Elsevier Masson, 2011. p. 286-295.

PATEL, K. S.; PATEL, J. C.; DHOLARIYA, H. R.; PATEL, K. D. Multiple heating rate kinetic parameters, thermal, X-ray diffraction studies of newly synthesized octahedral copper complexes based on bromo-coumarins along with their antioxidant, anti-tubercular and antimicrobial activity evaluation. **Spectro chimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v.96, p.468-479, 2012.

QIN, Jiao-Lan et al. Oxoaporphine metal complexes (Co II, Ni II, Zn II) with high antitumor activity by inducing mitochondria-mediated apoptosis and S-phase arrest in HepG2. **Scientific reports**, v. 7, p. 46056, 2017.

RUAN, W.; ZHAI, Y.; YU, K.; WU, C.; XU, Y. Coated microneedles mediated intradermal delivery of octaarginine/BRAF siRNA nanocomplexes for anti-melanoma treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 553, p. 298-309, 2018.

SANTOS, Paulo Roberto dos, et al. Synthesis, structural characterization and previous cytotoxicity assay of Zn(II) complex containing 1,10-phenanthroline and 2,20-bipyridine with valproic acid. **Polyhedron** 90 (2015) 239–244

SCHADENDORF, D.; AKKOOI, A. C. J. V.; BERKING, C.; GRIEWANK, K. G.; GUTZMER, R.; HAUSCHILD, A.; STANG, A.; ROESCH, A.; UGUREL, S. Melanoma. **The Lancet Journal**, v. 392, 2018.

SILVA, C. T. X. **Análise dos fatores epidemiológicos, clínico-patológicos e expressão das proteínas OCT4 e NANOG em amostras de melanoma cutâneo**. 2016. 127 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.

SILVA, D. B. **Utilização de anti-inflamatórios não esteroides no tratamento de neoplasias**. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve, 2013.

UPADHYAY, ARUN et al. Ibuprofen induces mitochondrial-mediated apoptosis through proteasomal dysfunction. **Molecular neurobiology**, v. 53, n. 10, p. 6968-6981, 2016.

VICENTE, A. L. S. A. **Perfil molecular de melanomas cutâneos e de mucosas**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Saúde) – Fundação Pio XII Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, 2016.

VIEIRA, L. M. M. **Síntese e caracterização de complexos de paládio(II), platina(II), zinco(II) e cobre (II) com ligantes do grupo das fluorquinolonas**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2007.

ZINK, B. S. Câncer de pele: A importância do seu diagnóstico, tratamento e prevenção. **Fronteiras da dermatologia**, v. 13, n. 1, 2014.

Fidler IJ. Selection of Successive Tumor Lines for Metastasis. *Nature. New Biololy*, 242:148-149, 1973.

