

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,
o texto completo desta tese será
disponibilizado somente a partir
de 25/07/2021



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Mariana Bastos dos Santos

**Híbridos Chalcona-Inibidores de Histona Desacetilase como Agentes
Antiproliferativos: Síntese e Avaliação em Células de Mama e em Histona
Desacetilases**

São José do Rio Preto
2019

Mariana Bastos dos Santos

**Híbridos Chalcona-Inibidores de Histona Desacetilase como Agentes
Antiproliferativos: Síntese e Avaliação em Células de Mama e em Histona
Desacetilases**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc. 2016/00580-5

Orientador: Prof. Dr. Luis Octavio Regasini
Coorientadora: Profa. Dra. Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

São José do Rio Preto
2019

S237h

Santos, Mariana Bastos dos

Híbridos chalcona-inibidores de Histona Desacetilase como agentes antiproliferativos : Síntese e avaliação em células de mama e em Histona Desacetilases / Mariana Bastos dos Santos. -- São José do Rio Preto, 2019

159 f. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientador: Luis Octavio Regasini

Coorientadora: Debora Aparecida Pires de Campos Zuccari

1. Chalcona. 2. Câncer de mama. 3. HDAC. 4. Inibidor de HDAC. 5. Híbridos moleculares. I. Título.

Mariana Bastos dos Santos

**Híbridos Chalcona-Inibidores de Histona Desacetilase como Agentes
Antiproliferativos: Síntese e Avaliação em Células de Mama e em Histona
Desacetilases**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química, junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: FAPESP – Proc.: 2016/00580-5

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octavio Regasini
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto - Ibilce
Orientador

Profa. Dra. Maria Luiza Zeraik
UEL - Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Jean Leandro dos Santos
UNESP - Câmpus de Araraquara - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Marcio José Tiera
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto - Ibilce

Profa. Dra. Iêda Aparecida Pastre Fertoni
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto - Ibilce

São José do Rio Preto
25 de julho de 2019

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) do Departamento de Química e Ciências Ambientais do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Unesp, Câmpus São José do Rio Preto, no Laboratório de Investigação Molecular no Câncer (LIMC) do Departamento de Biologia Molecular, da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - Famerp. Contando com parceria do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática da Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP e do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos - Lapdesf da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp de Araraquara.

Fomento: Bolsa de doutorado – FAPESP nº 2016/00580-5

Dedico aos meus pais, Antonio Paulo e Maria Elisa, ao meu irmão Gustavo, ao meu
companheiro Osvaldo, e às minhas avós Adélia e Iraci, com carinho.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, conquistas e força em todos os momentos da realização desse trabalho.

À minha família, em especial à minha mãe Maria Elisa e meu pai Antonio Paulo, por sempre me incentivarem, pelo exemplo de conduta que são para mim, pelo apoio incondicional, pelo amor que me manteve firme em meu propósito. Ao meu irmão Gustavo, que sempre me incentivou, apoiou e caminhou comigo. Ao Osvaldo pelo incentivo, amizade, cumplicidade, compreensão, paciência, e apoio incondicionais. Às minhas avós Adélia e Iraci por me ensinarem diariamente o que é ser forte e ter a doçura de viver com amor. Todos vocês foram imprescindíveis para que eu chegasse até aqui, vocês são o meu porto, eu amo vocês! Obrigada por tudo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Octavio, por confiar a mim a realização deste trabalho, pela orientação, ensinamentos, disponibilidade de tempo e do laboratório, pela parceria ao longo desses seis anos. À minha coorientadora Profa. Dra. Débora Zuccari, por ter me recebido tão bem, por sempre me ajudar, e por ter colocado seu laboratório à minha disposição, pela confiança, parceria e ensinamentos.

À Dra. Bruna Jardim-Perassi por ter me ensinado a fazer os experimentos de citotoxicidade e por ter me acompanhado, à Me. Jéssica Oliveira por ter me acompanhado e me auxiliado no cultivo das células, pela paciência e parceria.

Ao Prof. Dr. Mozart Marins pela parceria ao longo desses anos, por ter nos ajudado em diversos experimentos biológicos, pela grande contribuição, pelas conversas, conselhos e ensinamentos. À Me Daiane Anselmo pela amizade, parceria e ajuda com a realização dos experimentos de Western Blot e citometria de fluxo em Ribeirão Preto.

À todos que passaram pelo atual Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) e antigo Laboratório de Química Verde e Medicinal (LQVM) durante esses seis anos, em especial à Me Beatriz Carvalho Marques, Me. Gabriela Miranda Ayusso, Ricardo André Zucato Bertani, que me ajudaram muito, e me ensinaram muito mais do que imaginam; também à Me. Mayara Aparecida Rocha Garcia, Me. Daiane Bertholin Anselmo, Me. Carlos Roberto Polaquini, Me. Ana Carolina Nazaré, Caroline Sprengel Lima, Me Guilherme Torrezan, à todos vocês pela ajuda, amizade, companheirismo, conversas, desabafos, e pelos desafios que enfrentamos juntos, muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Terry Van Raay da Universidade de Guelph - Canadá, que sempre foi muito receptivo e muito nos auxiliou. À Dra. Flávia Lopes, pois também sempre foi muito pronta, e me ajudou em tudo que precisei.

Ao Prof. Dr. Jean dos Santos por ter me recebido em seu laboratório, pelas discussões, pelo grande auxílio e realização dos experimentos de modelagem molecular. À Me Aline Pavan que me auxiliou no laboratório, me ensinou e realizou os experimentos de modelagem molecular comigo.

À Profa. Dra. Eleni Gomes por ter cedido o equipamento de HPLC e ao Me. Diego Alves Monteiro por realizar as análises de cromatografia.

Aos técnicos dos equipamentos de Ressonância Magnética Nuclear, Dr. Fábio Rogério de Moraes, do Centro de Inovação Biomolecular; Dr. Nivaldo Boralle e Dra. Lucinéia Vizzotto Marconcini de Araraquara. Aos técnicos do laboratório didático, Eliani Nobuco Ikeguchi Ohira, Claudinei Antonio Nobile, Daniela Corrêa de Oliveira Lisboa e Jucilene Conceição de Souza que sempre prontos e me auxiliaram em alguns experimentos. Ao André Luis Domingues que sempre pronto nos ajuda muito. À todos os professores e funcionários da Unesp - Ibilce - São José do Rio Preto.

Às minhas amigas Me. Isabela Constantino, Me. Anna Carolina Alves, Carla Tukamoto, Bruna Borges, Nathália Bongiorno, e à todos amigos que também me ajudaram, por estarem sempre comigo, me incentivarem e fazerem com que tudo fosse mais leve.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa e suporte financeiro (Processo FAPESP: 2016/00580-5), sem os quais a realização deste trabalho não seria possível. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001, pela bolsa durante o mestrado e auxílios ao laboratório.

"[...] A cola se dissolve
e todo seu conteúdo [...]
jorra sobre o tapete,
qual mito desmontado.
Amanhã recomeço."

Carlos Drummond de Andrade (1998)

"Não entendo.

Isso é tão vasto que ultrapassa qualquer entender.

Entender é sempre limitado.

Mas não entender pode não ter fronteiras.

Sinto que sou muito mais completa quando não entendo.

Não entender, do modo como falo, é um dom. [...]

Só que de vez em quando vem a inquietação: quero entender um pouco.

Não demais: mas pelo menos entender que não entendo."

Clarice Lispector (1999)

RESUMO

Câncer de mama é o câncer que mais acomete mulheres no mundo. Os tratamentos atuais têm demonstrado resistência e taxas de reincidência, de acordo com cada subtipo da doença, portanto a busca por novas substâncias capazes de atuar contra essas neoplasias se torna premente. No presente trabalho objetivou-se a síntese de chalconas, híbridos chalconas-inibidores de Histona Desacetilases (HDAC) e análogos, bem como a avaliação biológica dessas substâncias para o câncer de mama por ensaios celulares, moleculares e enzimáticos. No segundo capítulo discorre-se da síntese de 20 aminochalconas pela condensação de Claisen-Schmidt com rendimentos variando de 30 a 96 %. Essas substâncias foram avaliadas contra as linhagens de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. As cinco substâncias mais ativas contra cada linhagem tiveram seus valores de CI_{50} determinados, destacando-se as substâncias **11** ((*E*)-2-flúor-4'-aminochalcona) e **17** ((*E*)-3-piridil-4'-aminochalcona), que foram as mais ativas contra ambas linhagens com valores de CI_{50} de $13,2 \pm 3,5$ e $15,7 \pm 5,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, contra MCF-7, e de $33,9 \pm 7,1$ e $34,7 \pm 5,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente, contra MDA-MB-231. Essas chalconas induziram a morte celular por apoptose em ambas linhagens, e aumentaram a expressão da proteína pró-apoptótica p53 na linhagem MCF-7. As chalconas **11** e **17** foram ainda capazes inibir a proliferação celular mesmo em condições de acidose, demonstrando serem substâncias promissoras para o tratamento de câncer de mama. No capítulo III foi planejada e realizada a síntese de dois novos híbridos chalcona-inibidor de HDAC, utilizando subunidades de chalconas, dos fármacos belinostato e entinostato, bem como, de análogos sulfonamídicos, com rendimentos variando de 14 a 83 %. Essas substâncias foram testadas contra cinco isoformas de HDAC (HDAC1, 2, 4, 6 e 11) a $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. A substância **23a** foi o híbrido mais potente, e seu análogo **27c** a substância mais potente triada, exibindo valores de CI_{50} de 3,6 e $0,15 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, contra HDAC2. O análogo sulfonamídico **27c** foi tão potente quanto o inibidor de HDAC, ácido hidroxâmico suberoilânilda (SAHA). O híbrido **23a** demonstrou ser classe I-seletivo, enquanto **27c** foi ativa contra as classes I e II. As substâncias **23a** e **27c** tiveram a atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) avaliadas e exibiram valores de CI_{50} que variaram de $9,10 \pm 2,5$ a $10,51 \pm 1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Portanto, o trabalho realizado conduziu a substâncias potentes inibidoras de HDAC e antiproliferativas contra o câncer de mama.

Palavras-chave: chalconas, câncer de mama, p53, inibidor de HDAC, híbridos

ABSTRACT

Breast cancer is the type of cancer more incident in women worldwide. Current treatments have demonstrated resistance and recurrence rate, according to each subtype of disease, therefore the search for new compounds capable to act against these neoplasms becomes urgent. In the present work it was aimed the synthesis of chalcones, chalcone-HDAC inhibitors hybrids and analogues, as well as, biological evaluation of these compounds to breast cancer by cellular, molecular and enzymatic assays. In the second chapter is discussed the synthesis of 20 aminochalcones by Claisen-Schmidt condensation in yields ranging from 30 to 96 %. These compounds were evaluated against breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. The five most active compounds against each line had their IC_{50} values determined, highlighting **11** ((*E*)-2-fluoro-4'-aminochalcone) and **17** ((*E*)-3-pyridil-4'-aminochalcone) were the most active compounds against both cell lines with IC_{50} value of 13.2 ± 3.5 and $15.7 \pm 5.9 \mu\text{mol L}^{-1}$ respectively, against MCF-7, and of 33.9 ± 7.1 and $34.7 \pm 5.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ against MDA-MB-231. These chalcones induced apoptosis death on both lines, and upregulated the p53 pro-apoptotic protein expression on MCF-7 cells. Chalcones **11** and **17** were capable to inhibit cell proliferation even in acidosis condition, demonstrating to be promising compounds to breast cancer treatment. In the chapter III it was designed and synthesized two new chalcone-HDAC inhibitor hybrids, using chalcones, belinostat and entinostat subunits, as well as sulfonamidic analogues, in yields ranging from 14 to 83 %. These compounds were tested against five HDAC isoforms (HDAC1, 2, 4, 6 and 11) at $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Compound **23a** was the most potent hybrid, and analogue **27c** was the most potent compound, showing IC_{50} values of $3.6 \pm 0.15 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively, against HDAC2. Sulfonamidic analogue **27c** was as potent as the HDAC inhibitor suberanilohydroxamic acid (SAHA). Hybrid **23a** demonstrated to be class I-selective, and **27c** was active against class I and II. Compounds **23a** and **27c** had their antiproliferative activity against breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231) evaluated and exhibited IC_{50} values ranging from 9.10 ± 2.5 to $10.51 \pm 1.0 \mu\text{mol L}^{-1}$. Therefore, the work has led to potent HDAC-inhibitors compounds and antiproliferative against breast cancer.

Keywords: chalcones, breast cancer, p53, HDAC-inhibitor, hybrids

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

Figura 1. Fármacos utilizados para o tratamento do câncer de mama	24
Figura 2. Subunidades farmacofóricas do vorinostato (SAHA).....	29
Figura 3. Inibidores de Histona Desacetilases.....	30
Figura 4. Núcleo chalcônico.....	31
Figura 5. Chalconas citotóxicas.....	32
Figura 6. Planejamento do Híbrido CUDC-101	33
Figura 7. Planejamento do híbrido SAHA-tamoxifeno	34
Figura 8. Planejamento do híbrido teofilina-chalcona.....	34

Capítulo II

Figure 1. Percentage of metabolically viable cells (%MVC) under acidosis. a) treatments with selected chalcones 11 and 17 against MCF-7 line; b) treatments with selected chalcones 11 and 17 against MDA-MB-231 line.....	61
Figure 2. Pro-apoptotic activity of selected chalcones 11 and 17 toward MCF-7 (a) and MDA-MB-231 (b) cells.....	62
Figure 3. Effect of selected chalcones 11 and 17 on Sp1 and p53 proteins expression in MCF-7 cell line.....	63
Figure S.1. UV-vis spectrum of chalcone 1 from HPLC-DAD experiment.....	75
Figure S.2. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 1 , MeOH:H ₂ O (3:1)	75
Figure S.3. UV-vis spectrum of chalcone 2 from HPLC-DAD experiment.....	76
Figure S.4. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 2 , MeOH:H ₂ O (3:1)	76
Figure S.5. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 3	77
Figure S.6. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 3	77
Figure S.7. UV-vis spectrum of chalcone 3 from HPLC-DAD experiment.....	78
Figure S.8. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 3 , MeOH:H ₂ O (3:1)	78
Figure S.9. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 4	79
Figure S.10. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 4	79
Figure S.11. UV-vis spectrum of chalcone 4 from HPLC-DAD experiment.....	80

Figure S.12. HPLC-DAD spectrum of chalcone 4 , MeOH:H ₂ O (3:1).....	80
Figure S.13. UV-vis spectrum of chalcone 5 from HPLC-DAD experiment.....	81
Figure S.14. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 5 , MeOH:H ₂ O (3:1)	81
Figure S.15. UV-vis spectrum of chalcone 6 from HPLC-DAD experiment.....	82
Figure S.16. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 6 , MeOH:H ₂ O (3:1)	82
Figure S.17. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 7	83
Figure S.18. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 7	83
Figure S.19. UV-vis spectrum of chalcone 7 from HPLC-DAD experiment.....	84
Figure S.20. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 7 , MeOH:H ₂ O (3:1)	84
Figure S.21. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 8	85
Figure S.22. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 8	85
Figure S.23. UV-vis spectrum of chalcone 8 from HPLC-DAD experiment.....	86
Figure S.24. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 8 , MeOH:H ₂ O (3:1)	86
Figure S.25. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 9	87
Figure S.26. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 9	87
Figure S.27. UV-vis spectrum of chalcone 9 from HPLC-DAD experiment.....	88
Figure S.28. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 9 , MeOH:H ₂ O (3:1)	88
Figure S.29. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 10	89
Figure S.30. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 10	89
Figure S.31. UV-vis spectrum of chalcone 10 from HPLC-DAD experiment.....	90
Figure S.32. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 10 , MeOH:H ₂ O (3:1)	90
Figure S.33. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 11	91
Figure S.34. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 11	91
Figure S.35. UV-vis spectrum of chalcone 11 from HPLC-DAD experiment.....	92
Figure S.36. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 11 , MeOH:H ₂ O (3:1)	92
Figure S.37. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 12	93
Figure S.38. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 12	93
Figure S.39. UV-vis spectrum of chalcone 12 from HPLC-DAD experiment.....	94
Figure S.40. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 12 , MeOH:H ₂ O (3:1)	94
Figure S.41. UV-vis spectrum of chalcone 13 from HPLC-DAD experiment.....	95
Figure S.42. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 13 , MeOH:H ₂ O (3:1)	95
Figure S.43. UV-vis spectrum of chalcone 14 from HPLC-DAD experiment.....	96

Figure S.44. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 14 , MeOH:H ₂ O (3:1)	96
Figure S.45. UV-vis spectrum of chalcone 15 from HPLC-DAD experiment.....	97
Figure S.46. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 15 , MeOH:H ₂ O (3:1)	97
Figure S.47. UV-vis spectrum of chalcone 16 from HPLC-DAD experiment.....	98
Figure S.48. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 16 , MeOH:H ₂ O (3:1)	98
Figure S.49. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 17	99
Figure S.50. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 17	99
Figure S.51. UV-vis spectrum of chalcone 17 from HPLC-DAD experiment.....	100
Figure S.52. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 17 , MeOH:H ₂ O (3:1)	100
Figure S.53. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 18	101
Figure S.54. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 18	101
Figure S.55. UV-vis spectrum of chalcone 18 from HPLC-DAD experiment.....	102
Figure S.56. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 18 , MeOH:H ₂ O (3:1)	102
Figure S.57. UV-vis spectrum of chalcone 19 from HPLC-DAD experiment.....	103
Figure S.58. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 19 , MeOH:H ₂ O (3:1)	103
Figure S.59. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of chalcone 20	104
Figure S.60. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of chalcone 20	104
Figure S.61. UV-vis spectrum of chalcone 20 from HPLC-DAD experiment.....	105
Figure S.62. HPLC-DAD chromatogram of chalcone 20 , MeOH:H ₂ O (3:1)	105

Capítulo III

Figure 1. Interactions of compounds 23a , 23b , 25 and 27c with HDAC2.....	119
Figure 2. Images of Hybrids 23a , 23b and analogues (25 and 27c) superposed with 20Y (cyan)	121
Figure SM.1. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of compound 21	141
Figure SM.2. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) of compound 21	141
Figure SM.3. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of compound 22a	142
Figure SM.4. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 150 MHz) da substância 22a	142
Figure SM.5. ¹ H NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of compound 22b	143
Figure SM.6. ¹³ C NMR spectrum (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of compound 22b	143
Figure SM.7. ¹ H NMR spectrum (Acetone- <i>d</i> ₆ , 600 MHz) of compound 23a	144

Figure SM.8.	^{13}C NMR spectrum (Acetone- d_6 , 150 MHz) of compound 23a	144
Figure SM.9.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 23b	145
Figure SM.10.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 23b	145
Figure SM.11.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 24a	146
Figure SM.12.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 150 MHz) of compound 24a	146
Figure SM.13.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 24b	147
Figure SM.14.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 150 MHz) of compound 24b	147
Figure SM.15.	^1H NMR spectrum (acetona- d_6 , 600 MHz) of compound 25	148
Figure SM.16.	^{13}C NMR spectrum (acetona- d_6 , 150 MHz) of compound 25	148
Figure SM.17.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 26a	149
Figure SM.18.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 150 MHz) of compound 26a	149
Figure SM.19.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 26b	150
Figure SM.20.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 150 MHz) of compound 26b	150
Figure SM.21.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 27a	151
Figure SM.22.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 150 MHz) of compound 27a	151
Figure SM.23.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 27b	152
Figure SM.24.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 150 MHz) of compound 27b	152
Figure SM.25.	^1H NMR spectrum (DMSO- d_6 , 600 MHz) of compound 27c	153
Figure SM.26.	^{13}C NMR spectrum (DMSO- d_6 , 150 MHz) of compound 27c	153
Figure SM.27.	HSQC spectrum of compound 27c	154
Figure SM.28.	Magnification of the HSQC spectrum da of compound 27c	154
Figure SM.29.	HMBC spectrum of compound 27c	155
Figure SM.30.	Magnification of the HMBC spectrum da of compound 27c	155
Figure SM.31.	Mass spectrum of compound 27c	156

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Table 1. Percentage of metabolically viable cells (%MVC) treated with chalcones 1–20 (at 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$) and IC_{50} values (in $\mu\text{mol L}^{-1}$) of selected chalcones.....	64
--	----

Capítulo III

Table 1. Percentages of HDAC inhibition at 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$	115
Table 2. IC_{50} of selected compounds against HDAC2.....	116
Table 3. Compounds IC_{50} ($\mu\text{mol L}^{-1}$) values against breast cancer cells	117
Table 4. Docking score of compounds against HDAC2	118
Table 5. Aminoacids interactions of the docking assays.....	120
Table 6. Parameters of Lipinski's and Veber's Rules.....	122

LISTA DE ESQUEMAS

Capítulo II

Scheme 1. Claisen-Schmidt reaction for synthesis of chalcones 1–20	60
--	----

Capítulo III

Scheme 1. Design of chalcone-HDAC inhibitor hybrids	112
Scheme 2. Synthesis of chalcone-HDAC inhibitors hybrids 23a and 23b	113
Scheme 3. Synthesis of analogues 25 , 27a–27c	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

br s - *broad singlet* - singlete largo

CI₅₀ - (IC₅₀) concentração capaz de inibir 50% de viabilidade celular

d - dubleto

DCM - diclorometano

dd - duplo dubleto

ddd - duplo duplo dubleto

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMF - *N,N*-dimetilformamida

DMSO-*d*₆ - dimetilsulfóxido hexadeuterado

DNA - ácido desoxirribonucleico

EDAC - cloridrato de *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilcarbodiimida

ER - *Estrogen Receptor* - Receptor de estrógeno

HAT - histona acetil-transferase

HDAC - histona desacetilase

HER2 - *human epidermal growth factor 2*

Hex - hexano

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

HOBt - 1-hidroxibenzotriazol

HSQC - *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

J - constante de acoplamento

m - multiplete

MCF-7 - Michigan Cancer Foundation 7 - linhagem de câncer de mama receptor de estrógeno positivo

MDA-MB-231 - M.D. Anderson - Metastasis Breast Cancer - linhagem de câncer de mama triplo negativa

MeOH - metanol

MES - ácido 4-morfolinoetanossulfônico

miR - micro RNA

MTT - 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide - brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

OPD - *o*-phenylenediamine - *o*-fenilenodiamina

pHe - pH do meio extracelular

pHi - pH do meio intracelular

PR - *Progesterone Receptor* - Receptor de progesterona

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

s - singleto

SAHA - ácido hidroxâmico suberoilânida, vorinostato

t - tripleto

ta - temperatura ambiente

TNBC - *triple negative breast cancer*

TSA - tricostatina A

UV-vis - ultravioleta-visível

δ - deslocamento químico

δ_C - deslocamento químico de ^{13}C

δ_H - deslocamento químico de ^1H

SUMÁRIO

1. CAPÍTULO I - Introdução e Revisão Bibliográfica, Objetivos e Referências.....	21
1.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.2. OBJETIVOS	35
1.3. REFERÊNCIAS	36
2. CAPÍTULO II - Artigo: Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells.....	43
2.1. INTRODUCTION	47
2.2. MATERIALS AND METHODS	48
2.3. RESULTS AND DISCUSSION.....	50
2.4. CONCLUSIONS	54
2.5. REFERENCES	55
3. CAPÍTULO III - Manuscrito: Synthesis of new antiproliferative agents and HDAC-inhibitors against breast cancer cells.....	108
3.1. Introduction	111
3.2. Results and Discussion.....	112
3.3. Materials and Methods.....	123
3.4. Conclusion.....	130
3.5. References	131
4. CAPÍTULO IV - Conclusões e Perspectivas.....	158
4.1. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS.....	159

Capítulo I

1. Capítulo I

1.1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1. Câncer e Câncer de mama

Câncer é o conjunto de doenças também denominadas neoplasias, as quais são caracterizadas por um crescimento celular invasivo e descontrolado. A carcinogênese ocorre em células que sofrem distúrbios homeostáticos. Os agentes carcinogênicos podem ser físicos, químicos e biológicos, estando correlacionados principalmente a mudanças moleculares, incluindo alterações nos ácidos nucleicos e proteínas (SARKAR et al., 2013).

As neoplasias podem ser classificadas segundo sua origem embrionária, histológica bem como do estágio clínico de desenvolvimento (HASSANPOUR & DEHGHANI, 2017). Os tratamentos convencionais para os diversos tipos de câncer são definidos pelas classificações das doenças e envolvem cirurgias, terapias hormonais, terapias antiangiogênicas, radioterapia, imunoterapia e quimioterapia clássica com agentes citotóxicos/antiproliferativos (BARNES et al., 2017).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o câncer é a principal causa de morte no mundo, sendo responsável por 9,6 milhões em 2018. Nesse mesmo ano, entre os 18,1 milhões de novos casos, os tipos de câncer mais diagnosticados foram de pulmão e mama (BRAY et al., 2018). No Brasil, estima-se uma incidência de 324 mil novos casos de câncer em mulheres e 310 mil em homens entre os anos de 2018 e 2019 (INCA, 2017).

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete as mulheres em todo o mundo, sendo estimado como responsável por 626.679 mortes entre os 2,08 milhões de casos no ano de 2018 (BRAY et al., 2018). Em 2018 estimou-se a ocorrência de 59.700 novos casos de câncer de mama feminina no Brasil (INCA, 2017).

O câncer de mama compreende um grupo de doenças com características morfológicas e de comportamentos clínicos diferentes (GOLDHIRSCH et al., 2011). A presença de receptores de membranas nas células malignas permite classificar essa neoplasia em três subtipos: (i) HR positivo (*hormone receptor*): apresentam células com expressão dos receptores de estrogênio (ER) ou receptores de progesterona (PR); (ii) HER2 (*human epidermal growth factor 2*): apresentam células com receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; (iii) TNBC (*triple negative breast cancer*) as células que não possuem os receptores HER2, ER ou PR (EISNER & LUOH, 2011).

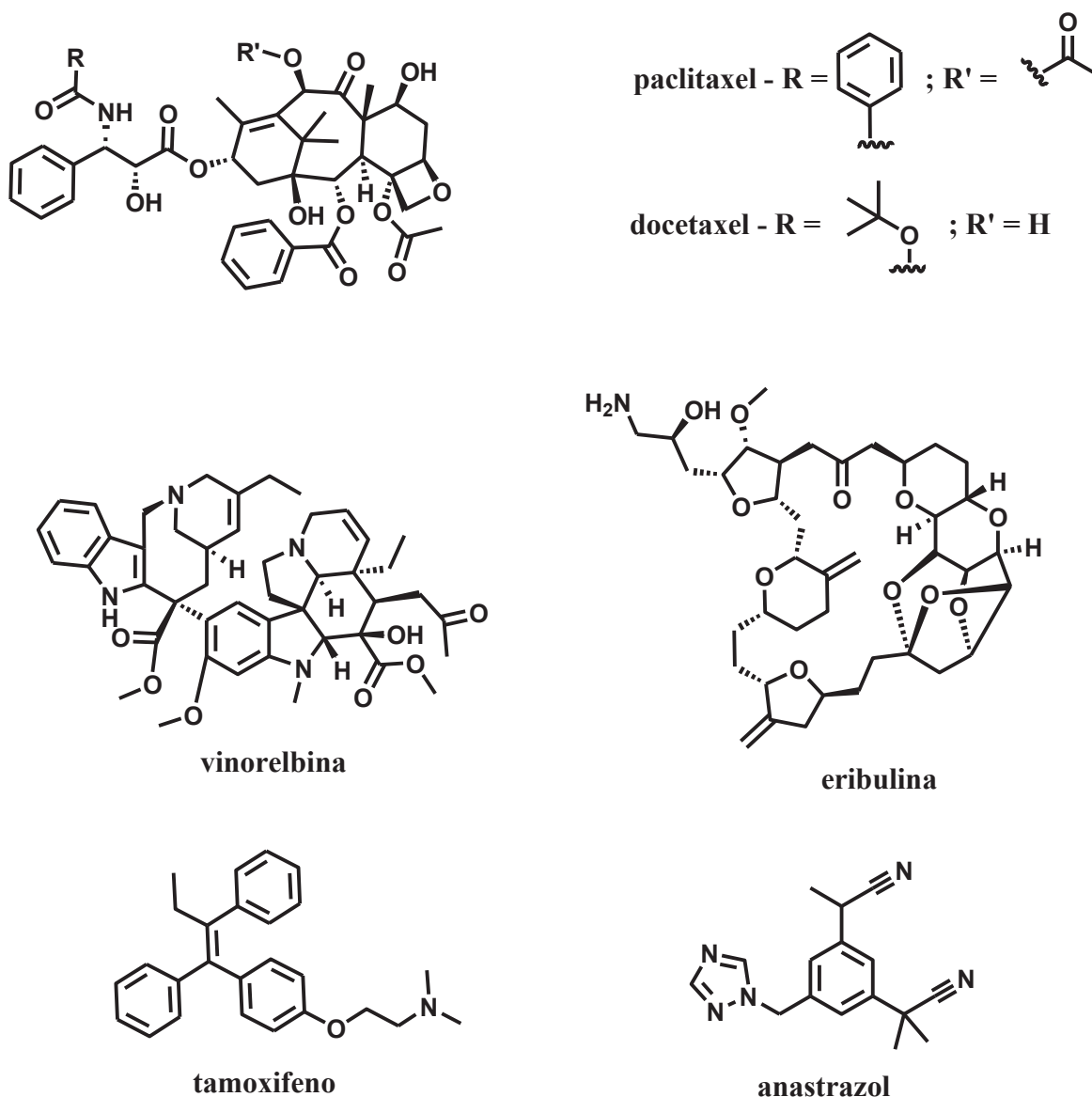
A carcinogênese de mama envolve estágios fisiológicos que resultam em células malignas invasivas, os estágios da doença são classificados em três principais: iniciação, progressão e metástase (GATENBY et al., 2007).

O tratamento para o câncer de mama é sistêmico e se baseia nos seus subtipos, incluindo a quimioterapia adjuvante, a qual abrange taxanos como paclitaxel e docetaxel (Figura 1, p. 24), vinorelbina e eribulina, fármacos que são utilizados atualmente, principalmente para o tipo TNBC. Para o subtipo ER a terapia se baseia principalmente no uso de moduladores de receptores de estrogênio, como tamoxifeno, e inibidores de aromatase, como o anastrozol (Figura 1, p. 24), que antagonizam os receptores de estrogênio, esse tipo de ação farmacológica pode culminar em resistência endócrina. Para o tipo HER2, o tratamento envolve a administração de trastuzumab, um anticorpo monoclonal, como agente adjuvante (GOLDHIRSCH et al., 2011).

O subtipo de câncer de mama TNBC é o de difícil tratamento, pois não há terapia molecular dirigida, culminando na maioria das ocorrências de mortes de pacientes até o quinto ano após início do tratamento, e com recorrência da doença entre o primeiro e terceiro ano (FEDELE; ORLANDO; CINIERI, 2017). Sulaiman e coautores demonstraram que para o subtipo TNBC invasivo a co-supressão de proteínas histona desacetilases (HDAC) e Wingless/Integrate (Wnt) permite que as células-tronco tumorais (CTT) do tipo TNBC sejam convertidas a apenas células tumorais TNBC, demonstrando assim que essa pode ser uma abordagem molecular efetiva no tratamento desse subtipo de neoplasia de mama (SULAIMAN et al., 2016; GARMPS et al., 2017). Essa abordagem é corroborada pelo fato de que nas linhagens de câncer de mama subtipo TNBC ocorre aumento da expressão das HDAC 1–3 e 5–8, mais exacerbada do que nas linhagens receptor de estrogênio positivo, de forma inversamente proporcional à expressão dos receptores ER e PR (SULAIMAN et al., 2018).

Nesse contexto, Tate e coautores (2012) demonstraram ação do inibidor de histona desacetilase (HDAC) panobinostat: a) na hiperacetilação das histonas H3 e H4 de células TNBC; b) citotoxicidade contra células TNBC das linhagens MDA-MB-157 e 231 em ensaios de viabilidade celular; e c) atividade *in vivo*, demonstrando capacidade de diminuição do volume tumoral de 3 a 4 vezes sem apresentar toxicidade em camundongos (TATE et al., 2012).

Figura 1. Fármacos utilizados para o tratamento do câncer de mama



FONTE: autora

1.1.2. Microambiente Tumoral e Acidose no Câncer de Mama

O surgimento e desenvolvimento dos tumores, conhecido como tumorigênese, é um processo complexo e dinâmico, e pode ser dividido em três estágios principais: iniciação, progressão e metástase. Esses estágios estão diretamente correlacionados com o microambiente tumoral, o qual é composto por matriz extracelular e células estromais (WANG et al., 2017).

Nas células tumorigênicas, como forma de adaptação a pouca demanda de nutrientes e de manutenção das elevadas taxas de proliferação, ocorre o efeito Warburg. Este consiste no metabolismo distinto de glicose entre as células tumorigênicas e não-

tumorigênicas, de forma que as tumorigênicas metabolizam prioritariamente *via* fermentativa com produção de lactato, do que *via* fosforilação oxidativa mitocondrial (VANDER HEIDEN; CANTLEY; THOMPSON, 2009). Consequentemente, no microambiente tumoral, a produção de lactato e de prótons promove a diminuição do pH extracelular (pHe), uma vez que o lactato e os hidrogênios são secretados (XU et al., 2013; DAMAGHI; WOJTKOWIAK; GILLIES, 2013).

Em tecidos não-tumorais, os valores de pH intracelular (pHi) tendem a ser similares ou mais baixos do que do meio extracelular (pHe). Nas células tumorais, o pHi é mais alto (7,3 – 7,5) do que o pHe (6,8 – 7,3) (MCINTYRE & HARRIS, 2016; DAMAGHI; WOJTKOWIAK; GILLIES, 2013; HASHIM et al., 2011). O mecanismo de controle do pHi das células pode envolver tampões e várias proteínas, incluindo anidrases carbônicas, que são responsáveis pelo transporte de CO₂, e prótons, contribuindo para a secreção de lactato para o meio extracelular. Destaca-se que as anidrase carbônicas estão superexpressas nas células tumorigênicas (XU et al., 2013).

A mudança de pH na massa tumoral em relação aos tecidos normais caracteriza o processo de acidose no microambiente tumoral, um dos estados fisiológicos prévios à metástase tumoral no câncer de mama (GATENBY et al., 2007; HASHIM et al., 2011).

1.1.3. Fator de Transcrição p53 e sua Relação com Câncer de Mama

Fatores de transcrição são proteínas que se ligam ao DNA de eucariotos durante o processo de transcrição, permitindo a interação entre uma enzima RNA-polimerase e o material genético, são proteínas que regulam a quantidade de RNA mensageiro produzida pela célula (LATCHMAN, 1997).

A p53 é uma proteína tetramérica que possui 393 resíduos de aminoácidos em cada subunidade e apresenta um domínio de ligação ao DNA (JOERGER & FERSHT, 2010). Fisiologicamente, é um fator de transcrição que regula diretamente a transcrição de genes de RNA-polimerase II, e indiretamente, a expressão de outros tipos de RNA-polimerases. Para desenvolver sua função biológica, p53 pode recrutar enzimas modificadoras de histona tais como as HDAC, enzimas remodelantes de cromatina e subunidades de complexos mediadores. É uma proteína com efeito supressor de tumores, podendo induzir a senescência celular, parada do ciclo celular, bem como apoptose, tendo sua expressão diminuída em diversos tipos de câncer (BECKERMAN & PRIVES, 2010).

O gene *TP53* codifica a p53, e pode sofrer mutações em diversos tipos de câncer. Contudo, no câncer de mama essa mutação é menos acentuada ocorrendo em apenas em 30 % dos casos, sendo correlacionada diretamente com os subtipos da doença. Nos subtipos de câncer de mama que expressam os receptores de estrógeno (ER), ocorre a expressão de p53 selvagem. Nos subtipos que não expressam receptor de estrógeno (subtipos HER2 ou TNBC), a p53 ocorre na sua forma mutada (BERTHEAU et al., 2013).

No câncer de mama receptor de estrógeno positivo (ER), a expressão de p53 tem sido correlacionada a um fenótipo de senescência dos genes *TP53*, e consequente aumento da proliferação, devido ao efeito antagônico que os receptores de estrógeno podem ter na indução de apoptose *via* p53. Esse efeito tem sido correlacionado à resistência ao tratamento realizado com fármacos indutores de apoptose, como a doxorrubicina (SAYEED et al., 2007; BERTHEAU et al., 2013). No entanto, Bailey e coautores demonstraram que a inibição total dos receptores de estrógeno pelo fármaco antagonista fulvestranto, associada aos indutores de apoptose *via* p53 culminam em quimioterapia eficaz (BAILEY et al., 2012).

1.1.4. Fator de Transcrição Sp1 e sua Relação com Câncer de Mama

A proteína de especificidade 1 - Sp1 (*Specificity Protein 1*) pertence à família multigene Sp. Fisiologicamente, é um fator de transcrição ubíquo e apresenta 785 aminoácidos. Destes aminoácidos, 164 são serina ou treonina, sendo sítios reativos a acetilações, glicosilações e fosforilações, as quais regulam sua estabilidade e ação. Em sua estrutura ocorre um domínio de ligação ao DNA formado por dedos de zinco, o qual se liga a regiões do DNA conhecidas como caixas GC. Essa proteína pode ter ação ativadora ou repressora do processo transcricional (DENIAUD et al., 2009, BEISHLINE & AZIZKHAN-CLIFFORRD, 2015).

Sp1 está correlacionada a diversos processos celulares, tais como: proliferação, diferenciação e apoptose. A superexpressão de Sp1 é relatada em diversos tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Beishline e coautores indicam que Sp1 como um alvo nos processos de carcinogênese pode não ser adequado, pois a mesma está correlacionada a diversos processos celulares complexos, e demonstraram a necessidade de validação da mesma como alvo terapêutico. Ainda assim, Sp1 é caracterizada como um marcador para diversos tipos de câncer (BEISHLINE & AZIZKHAN-CLIFFORRD, 2015).

Wang e coautores relataram a expressão de Sp1 no câncer de mama, como um marcador relacionado a prognóstico negativo, e estágio clínico da doença, bem como, indicaram a participação de Sp1 em processos de invasão e metástase do câncer de mama (WANG et al., 2007). Além disso Sp1 tem sido reportado por se ligar a uma extremidade da proteína histona desacetilase 2 (HDAC2), promovendo o silenciamento transcricional do gene *hTERT* que codifica a enzima telomerase, uma das enzimas correlacionadas à carcinogênese (WON; YIM; KIM, 2002)

1.1.5. Histonas Desacetilases (HDAC)

As histonas são proteínas globulares e nucleares, as quais interagem por ligações iônicas com os grupos fosfato do DNA, por meio de seus resíduos de lisina, constituindo assim os nucleossomos da cromatina (ECKSCHLAGER et al., 2017).

Processos epigenéticos correspondem às mudanças de caráter reversível na cromatina, principalmente nas histonas, não promovendo alteração na estrutura da sequência do DNA. As cadeias laterais dos resíduos de lisina histônicas são suscetíveis a diversas reações regulatórias dos processos epigenéticos, tais como: acetilação, metilação e fosforilação (DELCUVE; KHAN; DAVIE, 2012). A acetilação das histonas está correlacionada à ativação da transcrição de genes, enquanto que a desacetilação, à condensação da cromatina e à repressão da transcrição. As enzimas responsáveis pela acetilação e desacetilação das histonas são as Histona-Acetil-Transferases (HAT), e Histona-Desacetilases (HDAC), respectivamente (CECCACCI & MINUCCI, 2016).

As proteínas HDAC são subdivididas em quatro classes, de acordo com sua dependência de cofator e similaridade na sequência de aminoácidos, bem como em duas famílias: tradicional e sirtuínas (SETO, 2014). As classes de HDAC são: (classe I) HDAC 1, 2, 3 e 8; (classe IIa) HDAC 4, 5, 7; (classe IIb) HDAC 6 e 10; e (classe IV) HDAC 11. As classes I, IIa, IIb e IV são zinco-dependentes para atividade hidrolítica. A classe I é presente no núcleo e as classes IIa, IIb e IV podem ser encontradas no núcleo ou citoplasma. A classe III de HDAC é composta pela família de proteínas sirtuínas (SIRT 1–7) que são dependentes de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD), sendo encontradas no núcleo, citoplasma e nas mitocôndrias. No entanto, o interesse pelas sirtuínas ainda é pouco explorado (DAMASKOS et al., 2017; HABERLAND; MONTGOMERY; OLSON, 2009).

A superexpressão de HDAC das classes I, II e IV tem sido correlacionada com doenças como: câncer e disfunções neurodegenerativas (FALKENBERG & JOHNSTONE, 2014). A superexpressão da HDAC 2 (classe I) tem sido reportada na doença de Alzheimer, tendo sua ação na supressão de genes responsáveis pela função cognitiva e de neuroplasticidade, enquanto que HDAC (classe IIa) têm sua relevância na doença de Parkinson, e a HDAC 6 (classe IIb) na regulação do humor (CHUANG et al., 2009).

Em diversos tipos de câncer tais como: linfoma cutâneo de células T, carcinomas colorretal, hepatocelular, de próstata e de mama, as HDACs são superexpressas e correlacionadas ao processo de carcinogênese (WEICHERT, 2009).

A abordagem epigenética no tratamento antineoplásico envolve a inibição das HDAC, visando a manutenção das histonas acetiladas, permitindo a expressão de genes que conduzam à apoptose das células malignas. Sendo, portanto consideradas alvos para o tratamento antineoplásico (CECCACCI & MINUCCI, 2016).

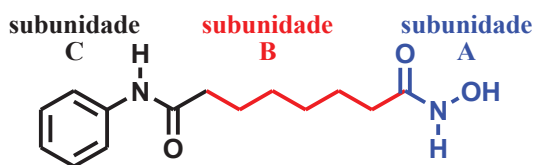
No câncer de mama ocorre superexpressão da atividade das HDACs. Shan e colaboradores (2017) demonstraram que ocorre superexpressão do gene *HDAC2* em células de câncer de mama, enquanto que Ververis e colaboradores demonstraram superexpressão da classe I (SHAN et al., 2017; VERVERIS & KARAGIANNIS, 2012). Muller descreveu que as HDACs 2 e 3 são altamente expressas nos subgrupos de câncer de mama, e destacou a superexpressão das HDACs da classe I (MULLER et al., 2013).

1.1.6. Inibidores de Histona-Desacetilases

Os inibidores de HDAC compõem uma classe promissora de antineoplásicos. Em 2006, o vorinostato ou SAHA (ácido hidroxâmico suberoilânilida, Figura 2, p. 29) foi o primeiro inibidor de HDAC aprovado pela *Food and Drug Administration* (FDA), para tratamento de linfoma cutâneo de células T. É um fármaco administrado por via oral, e inibe as HDACs 1 e 3 (BEHERA; JAYAPRAKASH; SINHA, 2015).

Mottamal e coautores (2015) demonstraram que as regiões farmacofóricas de inibidores de HDACs das classes I, II e IV, tais como o vorinostato (SAHA, Figura 2, p. 29), são compostas pelas subunidades: **A** (representada em azul) uma região com capacidade quelatogênica responsável pela interação com o zinco; **B** (representada em vermelho) um espaçador hidrofóbico; e **C** (representada em preto) uma região de superfície de domínio, que promove o bloqueio estérico para o substrato ao sítio catalítico (MOTTAMAL et al., 2015).

Figura 2. Subunidades farmacofóricas do vorinostato (SAHA)

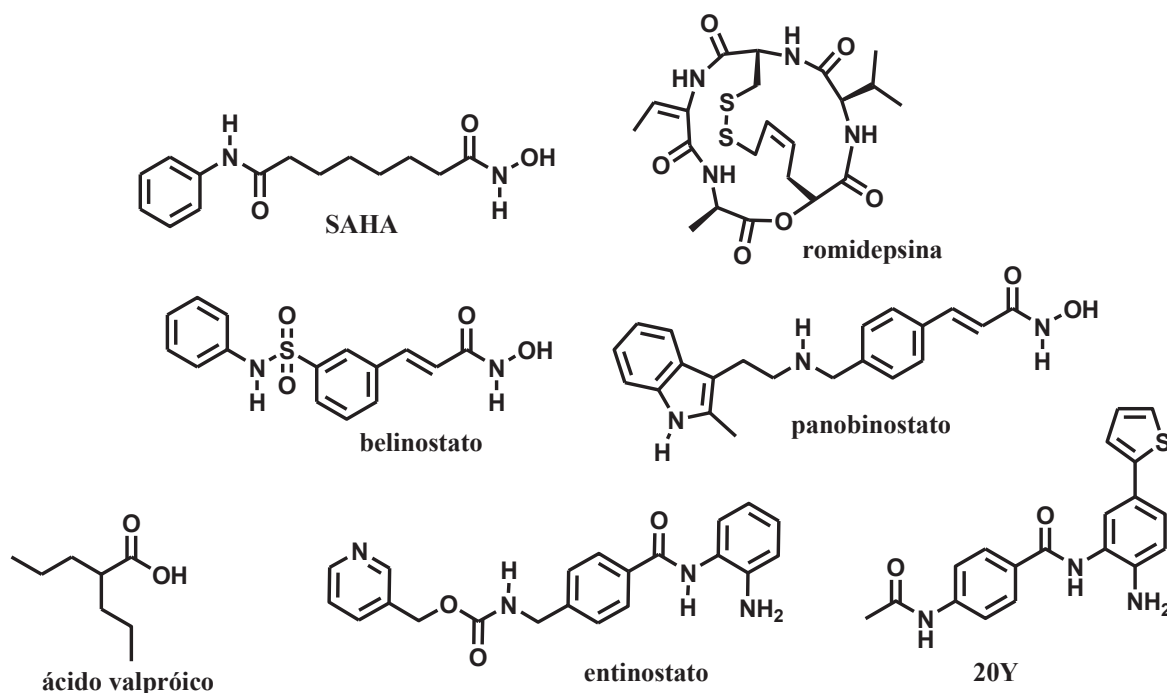


FONTE: autora

A romidepsina (Figura 3, p. 30), foi aprovada em 2009 para tratamento de linfoma cutâneo de células T, devido a sua ação inibitória sobre as HDACs 1 e 2. Em 2014, foi aprovado o belinostato (Figura 3, p. 30) para tratamento de linfoma de células T periférico, por via intravenosa, um inibidor das HDACs 3 e 4. O panobinostato (Figura 3, p. 30) inibe as HDACs 3 e 4, e foi aprovado em 2015 para tratamento de mieloma múltiplo por administração por via oral (FDA, 2017).

Os inibidores de HDAC (Figura 3, p. 30) podem ser classificados de acordo com sua estrutura química em; **(i) hidroxamatos**: vorinostato (SAHA), belinostato, panobinostato; **(ii) peptídeos cíclicos**: romidepsin; **(iii) ácidos graxos**: ácido valpróico e **(iv) benzamidas**: entinostato, **20Y** (BEHERA; JAYAPRAKASH; SINHA, 2015; SHARMA et al., 2015; LAUFFER et al., 2013).

Figura 3. Inibidores de Histona Desacetilases



FONTE: autora

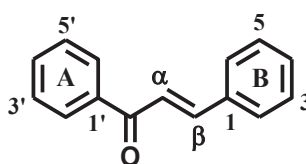
Benzamidas vem sendo considerada uma classe preferencial frente aos ácidos hidroxâmicos, quando avaliados quanto à estabilidade metabólica (BEHERA JAYAPRAKASH; SINHA, 2015). O inibidor de HDAC pertencente à classe das benzamidas, entinostato, encontra-se em estudos clínicos de fase III para tratamento de câncer de mama do tipo HR, localmente avançado ou em estágio metastático, como alternativa para a resistência endócrina aos tratamentos hormonais (YERUVA et al., 2018). Lauffer, e coautores desenvolveram uma nova benzamida, a substância **20Y**, com potente inibição contra HDAC2 e com tempo de meia vida maior do que o entinostato (LAUFFER et al., 2013).

Os inibidores de HDAC também são classificados de acordo com sua atuação inibitória, inibidores pan-HDAC são substâncias capazes de inibir as classes I, II e IV de HDAC, ou seja, substâncias não-seletivas para isoformas de HDAC zinco-dependentes (BEHERA; JAYAPRAKASH; SINHA, 2015). A maioria dos ácidos hidroxâmicos são inibidores pan-HDAC, enquanto que inibidores benzamídicos são seletivos para as classes I ou II (CECCACCI & MINUCCI, 2016; KHAN et al., 2008).

1.1.7. Chalconas

Chalconas são substâncias compostas por duas fenilas (anéis A e B), unidas por uma ponte cetônica α,β -insaturada (Figura 4, p. 31). São substâncias exploradas e privilegiadas pela Química Medicinal por serem de síntese simples e apresentarem um amplo espectro de bioatividades, tais como: antifúngica (WANG et al., 2016), antibacteriana (MARLIYANA; SYAH; MUJAHIDIN, 2017), antiviral (GAN et al., 2017), antioxidante (LAHSASNI; AL KORBI; ALJABER, 2014; ZHUANG et al., 2017).

Figura 4. Núcleo chalcônico



FONTE: autora

A atividade citotóxica das chalconas vem sendo investigada devido à capacidade de atuação em diversos alvos moleculares relacionados à carcinogênese, tais como: proteassoma, p53, 5α -redutase, aromatases, sirtuína-1 e via Wnt/ β -catenina (MAHAPATRA; BHARTI; ASATI, 2015; IFTIKHAR et al., 2017).

Mai e co-autores (2014) demonstraram que a 2'-aminochalcona (Figura 5, p. 32) exibiu atividade contra linhagens de câncer, entre elas a linhagem de mama, receptor de estrogênio positivo (MCF-7), com valor de CI_{50} de $5,42 \mu\text{mol L}^{-1}$. Adicionalmente, a 2'-aminochalcona demonstrou atividade pró-apoptótica, atuando sobre as caspases 3 e 8 (MAI et al., 2014).

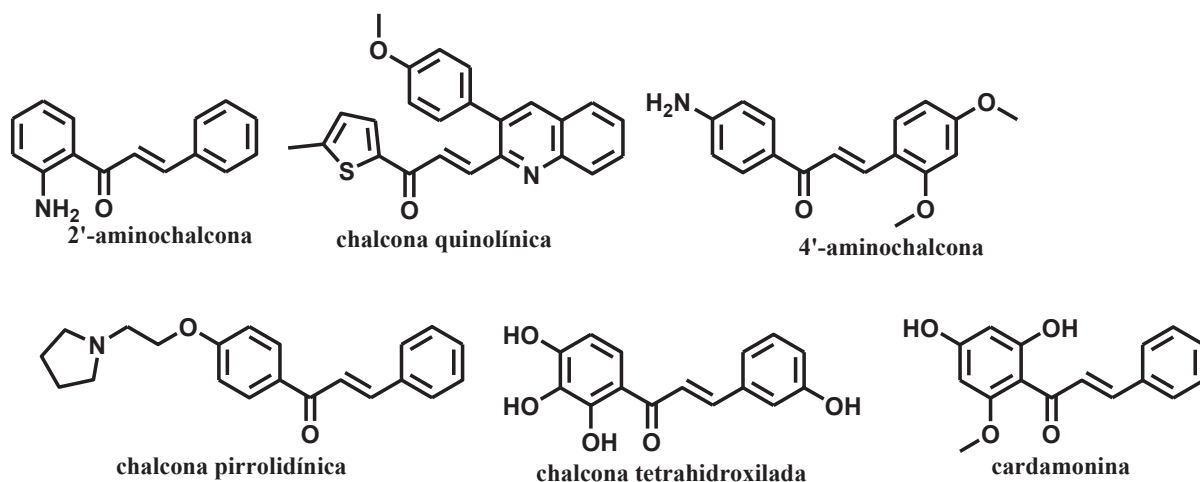
Tseng e coautores (2013) demonstraram que a chalcona quinolílica (Figura 5, p.32) foi tóxica contra linhagem de mama MDA-MB-231, com valor de CI_{50} de $0,41 \mu\text{mol L}^{-1}$, bem como não se mostrou tóxica para a linhagem de células não-tumorigênicas de mama H184B5F5/M10, sendo indutora de apoptose, via ativação de caspase-3 (TSENG et al., 2013).

A 4'-aminochalcona (Figura 5, p. 32) foi ativa contra as linhagens de células de carcinoma de ovário humano ES-2 e Hey-A8, segundo Su e co-autores (2017), demonstrando supressão do gene *C-MYC*, um oncogene envolvido na regulação do ciclo celular, diferenciação, metabolismo, crescimento celular, apoptose (SU et al., 2017).

Mokale e coautores (2015) reportaram que a chalcona pirrolidínica (Figura 5, p. 32) foi efetiva contra a linhagem MCF-7, devido ao estudo por modelagem molecular de possíveis interações com receptores de estrógeno (MOKALE et al., 2015).

A chalcona tetrahidroxilada foi reportada por Kahyo e colaboradores (2008), como inibidora da atividade de sirtuína-1 sobre p53, promovendo aumento de p53 acetilada endógena, suprimindo assim a proliferação celular (KAHYO et al., 2008).

Figura 5. Chalconas citotóxicas



FONTE: autora

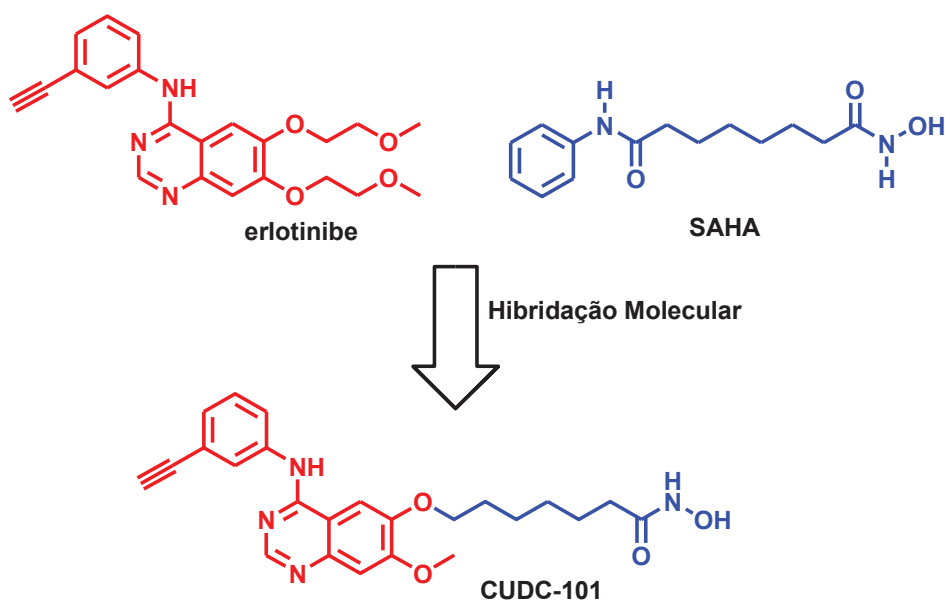
Cho e colaboradores (2009) reportaram que a cardamonina (Figura 5, p. 32), foi capaz de inibir a pigmentação de melanócitos devido ao bloqueio da via Wnt/ β -catenina e degradação da β -catenina (CHO et al., 2009). Shrivastava e coautores (2017) demonstraram que a cardamonina foi tóxica para MDA-MB-231, devido à inibição específica da sinalização canônica via Wnt3a, sendo capaz de inibir a transição epitélio-mesenquimal (SHRIVASTAVA et al., 2017).

1.1.8. Hibridação Molecular

A hibridação molecular é uma ferramenta da química medicinal empregada no planejamento de substâncias farmacologicamente ativas. Consiste na união de subunidades estruturais de duas ou mais substâncias bioativas, para obtenção de um híbrido, com características farmacocinéticas e farmacodinâmicas otimizadas em relação às substâncias parentais (FRAGA, 2009).

A hibridação molecular tem sido utilizada para o desenvolvimento de novos fármacos, principalmente antineoplásicos. Lai e coautores (2010) empregaram a hibridação molecular entre subunidades farmacofóricas do erlotinibe, um inibidor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e HER2, com uma subunidade do inibidor de HDAC, vorinostato (**SAHA**), permitindo a obtenção do híbrido CUDC-101 (Figura 6, p. 33). O híbrido apresentou atividade citotóxica potente contra mais de 15 tipos de células de câncer, incluindo linhagens de mama, sendo mais potente do que seus precursores **SAHA** e erlotinib, e com capacidade de inibição multi-alvos: HDAC, EGFR e HER2 (LAI et al., 2010). CUDC-101 é um atual candidato a fármaco, em estudos clínicos de fase I para tratamento das neoplasias da cabeça e pescoço, gástricas, fígado e mama.

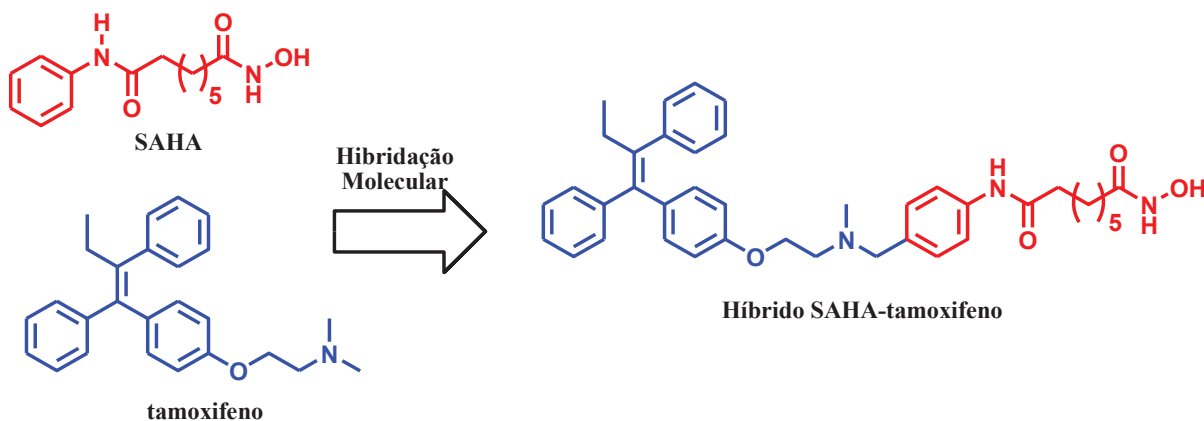
Figura 6. Planejamento do Híbrido CUDC-101



FONTE: autora

Gryder e coautores (2013) empregaram a hibridação molecular entre o tamoxifeno, um fármaco antagonista de receptores alfa de estrógeno (ER- α), e o SAHA, um inibidor de HDAC, permitindo a obtenção de um híbrido SAHA-tamoxifeno (Figura 7, p. 34) com atividade antiproliferativa em células de mama semelhante ao do SAHA, e com capacidade de inibição de ER- α semelhante ao do tamoxifeno (GRYDER et al., 2013). Desse modo, a hibridação molecular utilizando inibidores de HDAC para tratamento do câncer de mama tem se mostrado como uma abordagem efetiva.

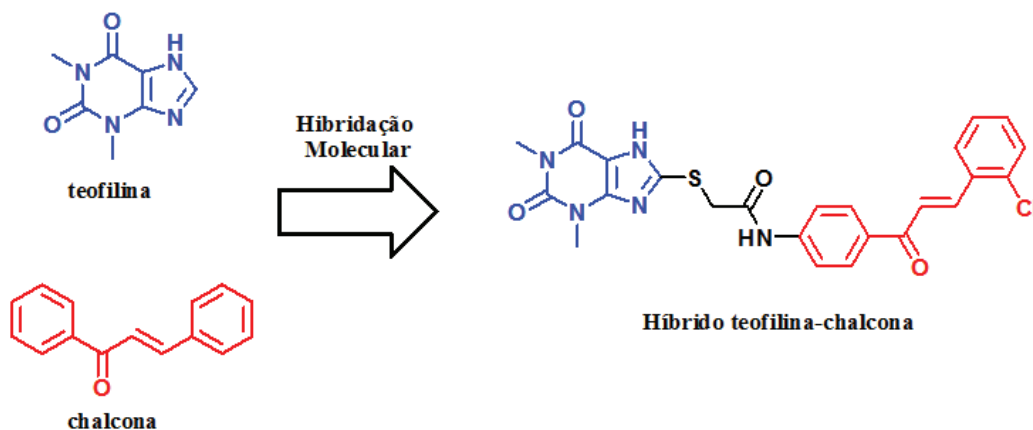
Figura 7. Planejamento do híbrido SAHA-tamoxifeno



FONTE: autora

Abou-Zied e colaboradores empregaram a hibridação entre chalconas e xantinas com estruturas baseadas na teofilina (Figura 8, p. 34), para desenvolvimento de uma série de híbridos, os quais tiveram atividade antiproliferativa potente e pró-apoptótica contra células de câncer, incluindo células de câncer de mama (MCF-7), bem como demonstraram atividade inibitória de EGFR (ABOU-ZIED et al., 2019).

Figura 8. Planejamento do híbrido teofilina-chalcona



FONTE: autora

against HDAC2. We found the analogue **27c** was active against HDAC1, 2, 4 and 6, and it was a potent inhibitor of HDAC2, with IC₅₀ value similar to SAHA.

Antiproliferative assays demonstrated **23a** was more active than the chalcone precursor against breast cancer cells (MCF-7 and MDA-MB-231), and that the analogue **27c** also demonstrated antiproliferative activity against these cells.

Docking studies with HDAC2 protein structure demonstrated that hybrids and analogues aligns near to the co-crystallized compound **20Y**, and interacts with similar aminoacids.

3.5. References

- [1] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R.L. Siegel, L.A. Torre, A. Jemal, Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries, *CA-Cancer J. Clin.* 68 (2018) 394–424. doi:10.3322/caac.21492.
- [2] A.G. Waks, E.P. Winer, Breast Cancer Treatment: A Review, *JAMA.* 321 (2019) 288. doi:10.1001/jama.2018.19323.
- [3] M. Chavez-MacGregor, E.A. Mittendorf, C.A. Clarke, D.Y. Lichtensztajn, K.K. Hunt, S.H. Giordano, Incorporating Tumor Characteristics to the American Joint Committee on Cancer Breast Cancer Staging System, *Oncologist.* 22 (2017) 1292–1300. doi:10.1634/theoncologist.2017-0116.
- [4] J.N. Mills, A.C. Rutkovsky, A. Giordano, Mechanisms of resistance in estrogen receptor positive breast cancer: overcoming resistance to tamoxifen/aromatase inhibitors, *Curr. Opin. Pharmacol.* 41 (2018) 59–65. doi:10.1016/j.coph.2018.04.009.
- [5] C. Yam, S.A. Mani, S.L. Moulder, Targeting the Molecular Subtypes of Triple Negative Breast Cancer: Understanding the Diversity to Progress the Field, *Oncologist.* 22 (2017) 1086–1093. doi:10.1634/theoncologist.2017-0095.
- [6] A. Dalmases, I. Gonzalez-Navarrete, S. Menendez, O. Arpí, J.M. Coromines, S. Servitja, I. Tusquets, C. Chamizo, R. Rincón, L. Espinosa, A. Bigas, P. Eroles, J. Furriol, A. Lluch, A. Rovira, J. Albanell, F. Rojo, Deficiency in p53 is required for doxorubicin induced transcriptional activation of NF- κ B target genes in human breast cancer, *Oncotarget.* 5 (2014). doi:10.18632/oncotarget.1556.

- [7] K.J. Falkenberg, R.W. Johnstone, Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders, *Nat. Rev. Drug Discov.* 13 (2014) 673–691. doi:10.1038/nrd4360.
- [8] M. Haberland, R.L. Montgomery, E.N. Olson, The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy, *Nat. Rev. Genet.* 10 (2009) 32–42. doi:10.1038/nrg2485.
- [9] K. Ververis, T.C. Karagiannis, An atlas of histone deacetylase expression in breast cancer: fluorescence methodology for comparative semi-quantitative analysis, *Am. J. Transl. Res.* 4 (2012) 24–43.
- [10] B.M. Müller, L. Jana, A. Kasajima, A. Lehmann, J. Prinzler, J. Budczies, K.-J. Winzer, M. Dietel, W. Weichert, C. Denkert, Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer - overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression, *BMC Cancer.* 13 (2013) 215. doi:10.1186/1471-2407-13-215.
- [11] H. Zhao, Z. Yu, L. Zhao, M. He, J. Ren, H. Wu, Q. Chen, W. Yao, M. Wei, HDAC2 overexpression is a poor prognostic factor of breast cancer patients with increased multidrug resistance-associated protein expression who received anthracyclines therapy, *JPN J. Clin. Oncol.* 46 (2016) 893–902. doi:10.1093/jjco/hyw096.
- [12] E. Ceccacci, S. Minucci, Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: lessons from leukaemia, *Brit. J. Cancer.* 114 (2016) 605–611. doi:10.1038/bjc.2016.36.
- [13] M. Terranova-Barberio, S. Thomas, N. Ali, N. Pawlowska, J. Park, G. Krings, M.D. Rosenblum, A. Budillon, P.N. Munster, HDAC inhibition potentiates immunotherapy in triple negative breast cancer, *Oncotarget.* 8 (2017). doi:10.18632/oncotarget.23169.
- [14] M.B. dos Santos, D. Bertholin Anselmo, J.G. de Oliveira, B.V. Jardim-Perassi, D. Alves Monteiro, G. Silva, E. Gomes, A. Lucia Fachin, M. Marins, D.A.P. de Campos Zuccari, L. Octavio Regasini, Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells, *J. Enzym. Inhib. Med. Ch.* 34 (2019) 1093–1099. doi:10.1080/14756366.2019.1615485.

- [15] G. Silva, M. Marins, N. Chaichanasak, Y. Yoon, A.L. Fachin, V.C. Pinhanelli, L.O. Regasini, M.B. dos Santos, G.M. Ayusso, B. de C. Marques, W.W. Wu, J.-N. Phue, R.-F. Shen, S.J. Baek, Trans-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition, *PLOS ONE*. 13 (2018) e0202263. doi:10.1371/journal.pone.0202263.
- [16] S. Iftikhar, S. Khan, A. Bilal, S. Manzoor, M. Abdullah, A.-H. Emwas, S. Sioud, X. Gao, G.A. Chotana, A. Faisal, R.S.Z. Saleem, Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 27 (2017) 4101–4106. doi:10.1016/j.bmcl.2017.07.042.
- [17] D.D. Jandial, C.A. Blair, S. Zhang, L.S. Krill, Y.-B. Zhang, X. Zi, Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones, *Curr. Cancer Drug Tar.* 14 (2014) 181–200.
- [18] Y. Zhang, B. Srinivasan, C. Xing, J. Lü, A new chalcone derivative (E)-3-(4-methoxyphenyl)-2-methyl-1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)prop-2-en-1-one suppresses prostate cancer involving p53-mediated cell cycle arrests and apoptosis, *Anticancer Res.* 32 (2012) 3689–3698.
- [19] A. Sulaiman, B. Sulaiman, L. Khouri, S. McGarry, C. Nessim, A. Arnaout, X. Li, C. Addison, J. Dimitroulakos, L. Wang, Both bulk and cancer stem cell subpopulations in triple-negative breast cancer are susceptible to Wnt, HDAC, and ER α coinhibition, *FEBS Lett.* 590 (2016) 4606–4616. doi:10.1002/1873-3468.12496.
- [20] N. Garmpis, C. Damaskos, A. Garmpi, E. Kalampokas, T. Kalampokas, E. Spartalis, A. Daskalopoulou, S. Valsami, M. Kontos, A. Nonni, K. Kontzoglou, D. Perrea, N. Nikiteas D. Dimitroulis Histone Deacetylases as New Therapeutic Targets in Triple-negative Breast Cancer: Progress and Promises, *Cancer Genom. Proteom.* 14 (2017). doi:10.21873/cgp.20041.
- [21] C. Damaskos, S. Valsami, M. Kontos, E. Spartalis, T. Kalampokas, E. Kalampokas, A. Athanasiou, D. Moris, A. Daskalopoulou, S. Davakis, G. Tsourouflis, K. Kontzoglou, D. Perrea, N. Nikiteas, D. Dimitroulis, Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer, *Anticancer Res.* 37 (2017) 35–46. doi:10.21873/anticancer.11286.

- [22] H.A. Abou-Zied, B.G.M. Youssif, M.F.A. Mohamed, A.M. Hayallah, M. Abdel-Aziz, EGFR inhibitors and apoptotic inducers: Design, synthesis, anticancer activity and docking studies of novel xanthine derivatives carrying chalcone moiety as hybrid molecules, *Bioorg. Chem.* 89 (2019) 102997. doi:10.1016/j.bioorg.2019.102997.
- [22] S.-Y. Seo, Multi-targeted hybrids based on HDAC inhibitors for anti-cancer drug discovery, *Arch. Pharm. Res.* 35 (2012) 197–200. doi:10.1007/s12272-012-0221-9.
- [24] M. Mottamal, S. Zheng, T. Huang, G. Wang, Histone Deacetylase Inhibitors in Clinical Studies as Templates for New Anticancer Agents, *Molecules.* 20 (2015) 3898–3941. doi:10.3390/molecules20033898.
- [25] V.Raja. Solomon, H. Lee, Anti-breast cancer activity of heteroaryl chalcone derivatives, *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 66 (2012) 213–220. doi:10.1016/j.biopha.2011.11.013.
- [26] C.J. Chou, D. Herman, J.M. Gottesfeld, Pimelic Diphenylamide 106 Is a Slow, Tight-binding Inhibitor of Class I Histone Deacetylases, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 35402–35409. doi:10.1074/jbc.M807045200.
- [27]. S.M., . H.P.S., . S.D.G., . N.S.H.N.M., Synthesis and Characterization of Some Chalcone Derivatives, *Trends Appl. Sci. Res.* 2 (2007) 52–56. doi:10.3923/tasr.2007.52.56.
- [28] J.P. Parker, H. Nimir, D.M. Griffith, B. Duff, A.J. Chubb, M.P. Brennan, M.P. Morgan, D.A. Egan, C.J. Marmion, A novel platinum complex of the histone deacetylase inhibitor belinostat: Rational design, development and in vitro cytotoxicity, *J. Inorg. Biochem.* 124 (2013) 70–77. doi:10.1016/j.jinorgbio.2013.03.011.
- [29] N.S. Chao, L. Shagan, B. Dina, A. Aike, B. Isa, Synthesis and Tyrosinase Activity of Novel Chalcone Derivatives, *Chemical Journal of Chinese Universities.* 35 (2014) 1204–1211.
- [30] M. Kortelainen, A. Suhonen, A. Hamza, I. Pápai, E. Nauha, S. Yliniemelä-Sipari, M. Nissinen, P.M. Pihko, Folding Patterns in a Family of Oligoamide Foldamers, *Chem. Eur. J.* 21 (2015) 9493–9504. doi:10.1002/chem.201406521.

- [31] T.R. Hoye, H. Zhao, A Method for Easily Determining Coupling Constant Values: An Addendum to “A Practical Guide to First-Order Multiplet Analysis in ^1H NMR Spectroscopy,” *J. Org. Chem.* 67 (2002) 4014–4016. doi:10.1021/jo001139v.
- [32] P.W. Finn, M. Bandara, C. Butcher, A. Finn, R. Hollinshead, N. Khan, N. Law, S. Murthy, R. Romero, C. Watkins, V. Andrianov, R.M. Bokaldere, K. Dikovska, V. Gailite, E. Loza, I. Piskunova, I. Starchenkov, M. Vorona, I. Kalvinsh, Novel Sulfonamide Derivatives as Inhibitors of Histone Deacetylase, *Helv. Chim. Acta.* 88 (2005) 1630–1657. doi:10.1002/hlca.200590129.
- [33] E. Adiguzel, F. Yilmaz, M. Emirik, M. Ozil, Synthesis and characterization of two new hydroxamic acids derivatives and their metal complexes. An investigation on the keto/enol, E/Z and hydroxamate/hydroximate forms, *J. Mol. Struct.* 1127 (2017) 403–412. doi:10.1016/j.molstruc.2016.07.081.
- [34] G.E. Hawkes, K. Herwig, J.D. Roberts, Nuclear magnetic resonance spectroscopy. Use of carbon-13 spectra to establish configurations of oximes, *J. Org. Chem.* 39 (1974) 1017–1028. doi:10.1021/jo00922a001.
- [35] G. Giannini, M. Marzi, R. Pezzi, T. Brunetti, G. Battistuzzi, M.D. Marzo, W. Cabri, L. Vesci, C. Pisano, N-Hydroxy-(4-oxime)-cinnamide: A versatile scaffold for the synthesis of novel histone deacetylase (HDAC) inhibitors, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 2346–2349. doi:10.1016/j.bmcl.2009.02.029.
- [36] C.B. Botta, W. Cabri, E. Cini, L. De Cesare, C. Fattorusso, G. Giannini, M. Persico, A. Petrella, F. Rondinelli, M. Rodriguez, A. Russo, M. Taddei, Oxime Amides as a Novel Zinc Binding Group in Histone Deacetylase Inhibitors: Synthesis, Biological Activity, and Computational Evaluation, *J. Med. Chem.* 54 (2011) 2165–2182. doi:10.1021/jm101373a.
- [37] M. Gottlicher, Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells, *EMBO J.* 20 (2001) 6969–6978. doi:10.1093/emboj/20.24.6969.
- [38] T. Eckschlager, J. Plch, M. Stiborova, J. Hrabeta, Histone Deacetylase Inhibitors as Anticancer Drugs, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1414. doi:10.3390/ijms18071414.

- [39] G. Bouchain, D. Delorme, Novel hydroxamate and anilide derivatives as potent histone deacetylase inhibitors: synthesis and antiproliferative evaluation, *Curr. Med. Chem.* 10 (2003) 2359–2372.
- [40] W. Shan, Y. Jiang, H. Yu, Q. Huang, L. Liu, X. Guo, L. Li, Q. Mi, K. Zhang, Z. Yang, HDAC2 overexpression correlates with aggressive clinicopathological features and DNA-damage response pathway of breast cancer, *Am. J. Cancer Res.* 7 (2017) 1213–1226.
- [41] B.E.L. Lauffer, R. Mintzer, R. Fong, S. Mukund, C. Tam, I. Zilberleyb, B. Flicke, A. Ritscher, G. Fedorowicz, R. Vallero, D.F. Ortwine, J. Gunzner, Z. Modrusan, L. Neumann, C.M. Koth, P.J. Lupardus, J.S. Kaminker, C.E. Heise, P. Steiner, Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitor Kinetic Rate Constants Correlate with Cellular Histone Acetylation but Not Transcription and Cell Viability, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 26926–26943. doi:10.1074/jbc.M113.490706.
- [42] H.W. Thompson, R. Mera, C. Prasad, The Analysis of Variance (ANOVA), *Nutr. Neurosci.* 2 (1999) 43–55. doi:10.1080/1028415X.1999.11747262.
- [43] V.K. Jain, A.V. Chavan, S.S. Mahajan, Design, Synthesis and in vitro cytotoxicity studies of novel sulfonamides, *Der Pharmacia Sinica.* 6 (2015) 28–35.
- [44] E. Harder, W. Damm, J. Maple, C. Wu, M. Reboul, J.Y. Xiang, L. Wang, D. Lupyan, M.K. Dahlgren, J.L. Knight, J.W. Kaus, D.S. Cerutti, G. Krilov, W.L. Jorgensen, R. Abel, R.A. Friesner, OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins, *J. Chem. Theory Comput.* 12 (2016) 281–296. doi:10.1021/acs.jctc.5b00864.
- [45] R.A. Friesner, J.L. Banks, R.B. Murphy, T.A. Halgren, J.J. Klicic, D.T. Mainz, M.P. Repasky, E.H. Knoll, M. Shelley, J.K. Perry, D.E. Shaw, P. Francis, P.S. Shenkin, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 1. Method and Assessment of Docking Accuracy, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1739–1749. doi:10.1021/jm0306430.
- [46] T.A. Halgren, R.B. Murphy, R.A. Friesner, H.S. Beard, L.L. Frye, W.T. Pollard, J.L. Banks, Glide: A New Approach for Rapid, Accurate Docking and Scoring. 2. Enrichment Factors in Database Screening, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 1750–1759. doi:10.1021/jm030644s.

- [47] J. Kirchmair, P. Markt, S. Distinto, G. Wolber, T. Langer, Evaluation of the performance of 3D virtual screening protocols: RMSD comparisons, enrichment assessments, and decoy selection—What can we learn from earlier mistakes?, *J. Comp. Aid. Mol. Des.* 22 (2008) 213–228. doi:10.1007/s10822-007-9163-6.
- [48] J.M. Kalita, S.K. Ghosh, S. Sahu, M. Dutta, A Statistical Analysis to Find Out an Appropriate Docking Method, *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 8 (2015) 158–160.
- [49] T. Tuntland, B. Ethell, T. Kosaka, F. Blasco, R.X. Zang, M. Jain, T. Gould, K. Hoffmaster, Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery and development at Novartis Institute of Biomedical Research, *Front. Pharmacol.* 5 (2014). doi:10.3389/fphar.2014.00174.
- [50] C.A. Lipinski, Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution, *Drug Discov. Today Technol.* 1 (2004) 337–341. doi:10.1016/j.ddtec.2004.11.007.
- [51] C.A. Lipinski, F. Lombardo, B.W. Dominy, P.J. Feeney, Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings, *Adv. Drug Deliver. Rev.* 23 (1997) 3–25. doi:10.1016/S0169-409X(96)00423-1.
- [52] D.F. Veber, S.R. Johnson, H.-Y. Cheng, B.R. Smith, K.W. Ward, K.D. Kopple, Molecular Properties That Influence the Oral Bioavailability of Drug Candidates, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2615–2623. doi:10.1021/jm020017n.
- [53] Molinspiration Chemoinformatics. Available online: <http://www.molinspiration.com/> (accessed on November 9th, 2018).
- [54] P. Ertl, B. Rohde, P. Selzer, Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties, *J. Med. Chem.* 43 (2000) 3714–3717. doi:10.1021/jm000942e.
- [55] PreAdmet. Available online: <<https://preadmet.bmdrc.kr/adme/>> (Accessed on January 2019).
- [56] S. Yee, In vitro permeability across Caco-2 cells (colonic) can predict in vivo (small intestinal) absorption in man—fact or myth, *Pharm. Res.* 14 (1997) 763–766.

- [57] Z.-Q. Ning, Z.-B. Li, M.J. Newman, S. Shan, X.-H. Wang, D.-S. Pan, J. Zhang, M. Dong, X. Du, X.-P. Lu, Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity, *Cancer Chemother Pharmacol.* 69 (2012) 901–909. doi:10.1007/s00280-011-1766-x.
- [58] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods.* 65 (1983) 55–63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4.
- [59] A. Carlesso, C. Chintha, A.M. Gorman, A. Samali, L.A. Eriksson, Merits and pitfalls of conventional and covalent docking in identifying new hydroxyl aryl aldehyde like compounds as human IRE1 inhibitors, *Sci. Rep-UK.* 9 (2019). doi:10.1038/s41598-019-39939-z.

Capítulo IV

4. Capítulo IV

4.1. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Foi realizada a síntese de 20 aminochalconas, as quais tiveram suas estruturas confirmadas por RMN de ^1H e ^{13}C . Essas substâncias foram ensaiadas à $20\ \mu\text{mol L}^{-1}$ contra as linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231. As substâncias **11** e **17** foram as mais ativas contra as duas linhagens com valores de CI_{50} de $13,2 \pm 3,5$ a $37,4 \pm 5,2\ \mu\text{mol L}^{-1}$. Além disso, demonstraram ser capazes de manter a atividade antiproliferativa contra essas células mesmo em condição de acidose. Essas chalconas induziram a morte celular por apoptose, e superexpressaram a proteína pró-apoptótica p53 na linhagem MCF-7.

Foram planejados e sintetizados dois novos híbridos chalcona-inibidor de HDAC, e quatro análogos com rendimentos variando de 14 a 83 %. Essas substâncias foram avaliadas contra 5 isoformas de HDAC (HDAC1, 2, 4, 6 e 11) a $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$. O híbrido **23a** e seu análogo **27c** exibiram CI_{50} de 3,6 e $0,15\ \mu\text{mol L}^{-1}$ contra HDAC2. As substâncias **23a** e **27c** tiveram a atividade antiproliferativa contra células de câncer de mama (MCF-7 e MDA-MB-231) avaliada e exibiram valores de CI_{50} que variaram de $9,10 \pm 2,5\ \mu\text{mol L}^{-1}$ a $10,51 \pm 1,0\ \mu\text{mol L}^{-1}$, sendo que **23a** demonstrou ser mais ativo do que sua chalcona precursora contra as duas linhagens. Estudos de modelagem molecular demonstraram que os híbridos e o análogo **27c** posicionam-se próximos ao inibidor co-cristalizado **20Y**.

O presente trabalho conduziu a substâncias antiproliferativas e potentes inibidoras de HDAC. Estudos sobre o tipo de morte induzido pelo híbrido (**23a**) e análogos (**25**, **27a–27c**) em células de câncer de mama, assim como a ação dessas substâncias em linhagem de células de mama não tumorigênicas (MCF-10A) serão realizados.