

## RESSALVA

Atendendo solicitação da autora,  
o texto completo desta tese será  
disponibilizado somente a partir  
de 20/02/2022



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

Daiane Bertholin Anselmo

**Potencial Antitumoral e Antimetastático de Híbridos Moleculares  
Curcumina-Cinamaldeído: Estudos Celulares e Moleculares**

São José do Rio Preto  
2020

Daiane Bertholin Anselmo

**Potencial Antitumoral e Antimetastático de Híbridos Moleculares  
Curcumina-Cinamaldeído: Estudos Celulares e Moleculares**

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

Financiadora: CAPES

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini

Coorientador: Prof. Dr. Mozart de Azevedo Marins

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marília de Freitas Calmon

São José do Rio Preto  
2020

A618p                      Anselmo, Daiane Bertholin

                                    Potencial antitumoral e antimetastático de híbridos moleculares  
curcumina-cinamaldeído: Estudos celulares e moleculares / Daiane Bertholin  
Anselmo. -- São José do Rio Preto, 2020

                                    136 f. : il., tabs., fotos

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

                                    Orientadora: Luis Octávio Regasini

                                    Coorientadora: Mozart de Azevedo Marins e Marília de Freitas Calmon

                                    1. Câncer. 2. Metástase. 3. Apoptose. 4. Curcumina. 5. Chalcona. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências  
Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Daiane Bertholin Anselmo

**Potencial Antitumoral e Antimetastático de Híbridos Moleculares  
Curcumina-Cinamaldeído: Estudos Celulares e Moleculares**

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

Financiadora: CAPES

**Comissão Examinadora**

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Crispim Tavares  
UNIFRAN – Universidade de Franca

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rejane Maira Góes  
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Lúcia Fachin Saltoratto  
UNAERP – Universidade de Ribeirão Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Christiane Pienna Soares  
UNESP - Câmpus de Araraquara

São José do Rio Preto  
20 de fevereiro de 2020

Dedico este trabalho  
ao meu marido Emerson,  
meus pais Valter e Leonise,  
e ao meu irmão Daniel, com carinho.  
E por fim, dedico a minha cunhada Elisângela, saudades eternas.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida, saúde, força, conquistas e todos os ensinamentos e experiência de vida durante esta jornada.

À minha família, especialmente ao meu marido Emerson, por sempre estar comigo nesta caminhada, tanto em São José do Rio Preto, Ribeirão Preto e até no Canadá. Em especial também aos meus pais e meu irmão, por sempre me incentivarem, me darem força, suporte e mostrarem o quanto a educação é importante. Obrigada família pelo amor, apoio, ajuda e paciência. Amo vocês!

Ao meu orientador Prof. Dr. Luis Octávio Regasini, por toda a orientação, ajuda, paciência, amizade, conselhos e ensinamentos durante esses quatro anos. Obrigada por ter me mostrado os melhores caminhos e por confiar em mim e no meu trabalho mesmo eu estando longe, principalmente no fim do doutorado, agradeço pela ajuda e por ter me apoiado com minha ida ao Canadá! Ao meu coorientador Prof. Dr. Mozart Marins, por ter me recebido tão bem no Laboratório GMB da UNAERP de Ribeirão Preto, me ajudou em tudo o que foi necessário com os experimentos e também com minha ida ao Canadá. Obrigada por confiar em mim esta grande oportunidade de experiência internacional, por todo conhecimento, paciência e amizade! À minha coorientadora Profa. Dra. Marília de Freitas Calmon, por todo conhecimento transmitido e paciência em me ensinar a trabalhar com cultivo celular e ter disponibilizado junto à Profa. Dra. Paula Rahal, o laboratório de estudos genômicos (GENOMA) para que eu realizasse meus primeiros experimentos.

À Dra. Tairine Zara, por sua grande amizade, ajuda e união em nossos primeiros passos no trabalho com cultivo celular no Genoma. Agradeço também a todo o pessoal do Genoma pela ajuda, ensinamentos e amizade, em especial Me. Tamara Carvalho, Me. Francielly Cristina, Me. Maria Letícia, Me. Carina Machado, Me. Lucas Carvalho, Dayla Geraldini, Me. Guilherme Campos, Dra. Cintia Bittar, Me. Ana Emília, Bianca Godoy, Rafael Beltrão, Me. Rafael Rahal e Dra. Ana Braga.

Ao Dr. Gabriel por toda ajuda nos experimentos e ensinamentos com biologia celular e molecular no Grupo de Genética Molecular e Bioinformática (GMB), além de sua amizade e paciência. Agradeço a todo o pessoal do laboratório GMB por toda a ajuda, paciência e amizade. Por todos os momentos que passamos juntos, em especial a Me. Viviane Seba, Dra. Tatiana Takahasi, Me. Mariana Romani, Me. Gabriela Segura, Me. Bruna Baruco, Tayná Bernardes, Felipe Nishimura, Me. Monise Petrucelli, Carol, Vanessa Borges, Sthefanie,

Alessandra, Gabriela e Dra. Tamires Bitencourt. Agradeço também a Profa. Dra. Ana Lúcia Fachin, por me acolher também ao grupo GMB, por toda amizade, ensinamentos e auxílio com os experimentos.

Ao Me. Carlos Polaquini do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ) por toda amizade, ajuda, paciência e ensinamentos com minhas primeiras reações químicas.

À Dra. Mariana Bastos do LAQ que também sempre esteve disposta a me ajudar com minhas dúvidas de química e estatística. Obrigada por toda sua amizade e companherismo durante esses anos.

À Dra. Ana Nazaré, Dra. Mariana Bastos, Me. Carlos Polaquini e Caroline Sprengel (LAQ) por poder participar e me aventurar junto a vocês nos concursos de inovação e empreendedorismo.

À todos do LAQ em especial a Me. Beatriz Carvalho, Me. Gabriela Ayusso, Me. Guilherme Torrezan, Me. Leticia Ribeiro, Me. Thaíse Borges, Ricardo Bertani e Me. Mayara Garcia. Obrigada pessoal do LAQ por todo trabalho em equipe, ajuda, ensinamentos, conversas e amizade.

Ao Prof. Dr. Jonathan Dimmock por ter me recebido em seu laboratório de química na Universidade de Saskatchewan (U of S) no Canadá. Agradeço por toda sua paciência e seus grandes ensinamentos durante os quatro meses do qual aprendi muito, foi uma experiência incrível tanto profissional como pessoal. Agradeço também a todos do laboratório de química da U of S, Dr. Alireza Doroudi, Dr. Umashankar Das, Dra. Swagatika Das, Dra. Aruna Chhikara e Sukanya Pati.

À todos os professores e funcionários da UNESP/IBILCE – São José do Rio Preto, agradeço também ao programa de pós-graduação em Microbiologia do instituto.

À banca examinadora pelo tempo, disponibilidade e grande contribuição com meu trabalho.

Aos meus amigos de Potirendaba Me. Aline Coimbra, Anderson Mélo, Wesley Marques, Juliane Pavezi, Diego Pereira, Marta Tavares, e aos do IBILCE, Dra. Natália Righetti, Me. Diego Monteiro que me apoiaram e ajudaram a tornar esta fase mais leve.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram com meu trabalho e/ou minha formação profissional e pessoal.

À PROPG (Pró-Reitoria de Pós-Graduação) pelos auxílios financeiros.

À bolsa prêmio ELAP (Emerging Leaders in the Americas Program) que foi essencial para meu intercâmbio na U of S - Canadá.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelos auxílios concedidos ao laboratório.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço a CAPES pela bolsa, que foi essencial para a realização deste trabalho.

*“A mente que se abre a uma nova ideia, jamais  
voltará ao seu tamanho original.”  
(Albert Einstein)*

## RESUMO

O câncer é caracterizado por uma proliferação celular descontrolada, desencadeada por diversas mutações genéticas, fatores epigenéticos e ambientais. Apesar dos avanços terapêuticos, esta doença continua a ser responsável por índices de mortalidade elevados em todo o mundo, que é agravado pela grande resistência aos fármacos. Desta forma, se faz necessária a busca por novas substâncias potentes, seletivas e capazes de agir sobre células tumorais resistentes. Os produtos naturais têm despertado interesse científico devido suas inúmeras bioatividades. Dentre estes, a curcumina, isolada dos rizomas de *Curcuma longa* (popularmente conhecida como açafrão), o cinamaldeído, responsável pelo odor e sabor da canela (*Cinnamomum* sp.) e as chalconas, flavonoides abundantes em frutas, legumes e plantas, possuem potentes atividades antitumorais contra diversos tipos de câncer. O objetivo deste trabalho foi: a) avaliar a capacidade de inibição da proliferação celular de doze híbridos moleculares de curcumina-cinamaldeído contra células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, câncer de colo do útero C33, HeLa, SiHa e CaSki e câncer de vulva A431; b) selecionar o híbrido mais ativo e investigar os possíveis mecanismos celulares e moleculares em linhagens de osteossarcoma U2OS (p53 selvagem) e SAOS (p53 ausente). Pelo ensaio de MTT foi observado que os híbridos foram mais potentes que o cinamaldeído, sendo que híbridos hidroxilados foram mais ativos do que os híbridos metoxilados. O híbrido **5a** apresentou maior potência antiproliferativa contra as células avaliadas de câncer feminino exceto para MCF-7, com valores de  $CI_{50}$  variando de 2,7 a 36,5  $\mu$ M. O híbrido **5a** demonstrou maior potência que a curcumina contra as células CaSki, SiHa, C33 e A431, exibiu uma maior seletividade que a curcumina, quando ambas foram testadas contra queratinócitos (HaCaT), além de ter demonstrado mais estável do que curcumina e cinamaldeído sob condições fisiológicas. Ensaio clonogênicos indicaram que **5a** foi capaz de inibir a formação de colônias da linhagem A431, após 15 dias de tratamento. O híbrido **5a** foi mais ativo contra células de osteossarcoma U2OS ( $CI_{50}$  = 22,4  $\mu$ M) quando comparado às células SAOS ( $CI_{50}$  = 45,0  $\mu$ M), sugerindo que a proteína p53 pode ser o seu alvo molecular. O híbrido **5a** demonstrou boa atividade na inibição da migração e invasão de células U2OS por meio dos ensaios de *wound-healing* e *transwell*, respectivamente. Pela técnica de zimografia, o híbrido **5a** indicou que efeitos sobre a migração e invasão pode estar relacionada com a diminuição da atividade da metaloproteinase de matriz 2 (MMP-2). A análise de *Western Blot* evidenciou a

capacidade de **5a** em induzir a expressão das proteínas p53 e DNAJB1 (Heat shock protein 40). Essa indução pode contribuir na atividade de p53, visto que Hsp40 estabiliza a conformação da proteína p53. As análises de citometria de fluxo indicaram que a inibição da viabilidade celular por **5a** está relacionada com a indução de morte por apoptose, na qual p53 também pode estar envolvida. O estudo do potencial antitumoral e antimetastático de híbridos moleculares curcumina-cinamaldeídos é inédito na literatura, sendo o primeiro que avaliou a atividade de **5a** em níveis celulares e moleculares.

**Palavras-chave:** câncer, p53, apoptose, curcumina, cinamaldeído, chalcona

## ABSTRACT

Cancer is characterized by uncontrolled cell proliferation, triggered by several genetic mutations. Despite the therapeutic advances, this disease continues to be responsible for high mortality rates worldwide. This fact is aggravated by high drug resistance and combination therapy. Thus, it is necessary to search for new substances potent, selective and able to act on tumor cells resistant. Natural products have aroused scientific interest due to their innumerable bioavailabilities. Among these, curcumin, isolated from *Curcuma longa* rhizomes (popularly known as saffron) and cinnamaldehyde, responsible for the cinnamon odor and flavor (*Cinnamomum* sp.) and chalcones, flavonoids abundant in fruits, vegetables and plants, have potent anti-tumor activities against various cancers. The objective of this study was: a) evaluate the ability of inhibit cell proliferation of twelve curcumin-cinnamaldehyde molecular hybrids against MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells, C33, HeLa, SiHa and CaSki cervical cancer and A431 vulvar cancer; b) select the most active hybrid and investigate possible cellular and molecular mechanisms in osteosarcoma cell lines U2OS (p53 wild) and SAOS (p53 null). By the MTT assay it was observed that the hybrids were more potent than the cinnamaldehyde, with hydroxyl hybrids being more active than the methoxylated hybrids. Hybrid **5a** presented higher antiproliferative potency against the cells evaluated for women cancer except for MCF-7, with  $IC_{50}$  values ranging from 2,7 to 36,5  $\mu$ M. Hybrid **5a** demonstrated higher potency than curcumin against CaSki, SiHa, C33 and A431 cells, and exhibited higher selectivity than curcumin when both were tested against keratinocytes (HaCaT), besides has show more stable than curcumin and cinnamaldehyde under physiological conditions. Clonogenic assays indicated that **5a** was able to inhibit the colonies formation of A431 line after 15 days of treatment. Hybrid **5a** was more active against U2OS osteosarcoma cells ( $IC_{50} = 22,4 \mu$ M) when compared to SAOS cells ( $IC_{50} = 45,0 \mu$ M), suggesting that the p53 protein may be its molecular target. Hybrid **5a** demonstrated good activity in inhibiting the migration and invasion of U2OS cells by the *wound-healing* and *transwell* assays, respectively. By the zymography technique, hybrid **5a** indicated that effects on migration and invasion may be related to decreased matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) activity. *Western Blot* analysis demonstrated the ability of **5a** to induce the expression of p53 and DNAJB1 (Heat shock protein 40). This induction may contribute to p53 activity, since Hsp40 stabilizes the conformation of the p53 protein. Flow cytometric analysis indicated that

inhibition of cell viability by **5a** is related to the induction of apoptosis death, in which p53 may also be involved. The study of the antitumor and antimetastatic potential of curcumin-cinnamaldehyde molecular hybrids is unprecedented in the literature, being the first to evaluate the activity of **5a** at cellular and molecular levels.

**Keywords:** cancer, p53, apoptosis, curcumin, cinnamaldehyde, chalcone

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Capítulo I

|                                                                                                                           |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Tipos de câncer mais comuns em mulheres previstos no ano de 2018, exceto pele não-melanoma (INCA, 2019a). ..... | 23 |
| Figura 2. Estrutura da curcumina .....                                                                                    | 35 |
| Figura 3. Estrutura do análogo de curcumina (CH-5) .....                                                                  | 37 |
| Figura 4. Híbrido de curcumina-resveratrol .....                                                                          | 38 |
| Figura 5. Estrutura química do cinamaldeído.....                                                                          | 38 |
| Figura 6. Estrutura química do 2-hidroxicinamaldeído e 2-benzoiloxicinamaldeído .....                                     | 40 |
| Figura 7. Estrutura química dos derivados de ácido acetilsalicílico baseados no cinamaldeído .....                        | 40 |
| Figura 8. Núcleo chalcônico.....                                                                                          | 41 |
| Figura 9. 2'-fluor-4'-aminochalcona e 3'-piridil-4'-aminochalcona .....                                                   | 43 |
| Figura 10. Híbrido de antraquinona e chalcona.....                                                                        | 43 |
| Figura 11. 4'-amino-1'-naftil-chalcona e 4'-amino-4'-metil-1'-naftil-chalcona.....                                        | 43 |
| Figura 12. 4'-hidroxi-chalcona e 2'-hidroxi-5'-flúor-chalcona .....                                                       | 44 |

### Capítulo II

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Scheme 1 Design of curcumin-cinnamaldehyde hybrids (CCHs) of series I and II.....                                                                     | 68 |
| Scheme 2. Synthesis of CCHs of series I and II.....                                                                                                   | 72 |
| Figure 1. Qualitative and quantitative data of inhibitory effect of hybrid 5a on cell colony formation of A431 and HaCaT lines.....                   | 77 |
| Figure 2. Chemical stability of hybrid 5a and parent compounds (pH 7.4) by monitoring the decrease in their maximum absorbance at 37 °C for 24 h..... | 78 |
| Figure S 1. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound 1a (600 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....                                                  | 94 |
| Figure S 2. <sup>13</sup> C NMR spectrum of compound 1a (150 MHz, DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) .....                                                 | 94 |
| Figure S 3. <sup>1</sup> H NMR spectrum of compound 2a (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....                                                             | 95 |

|                                                                                              |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure S 4. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 2a (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....     | 95  |
| Figure S 5. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 3a (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....        | 96  |
| Figure S 6. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 3a (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....     | 96  |
| Figure S 7. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 4a (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) .....     | 97  |
| Figure S 8. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 4a (150 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) .....  | 97  |
| Figure S 9. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 5a (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) .....     | 98  |
| Figure S 10. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 5a (150 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) ..... | 98  |
| Figure S 11. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 6a (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....       | 99  |
| Figure S 12. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 6a (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....    | 99  |
| Figure S 13. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 1b (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) .....    | 100 |
| Figure S 14. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 1b (150 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) ..... | 100 |
| Figure S 15. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 2b (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....       | 101 |
| Figure S 16. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 2b (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....    | 101 |
| Figure S 17. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 3b (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....       | 102 |
| Figure S 18. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 3b (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....    | 102 |
| Figure S 19. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 4b (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) .....    | 103 |
| Figure S 20. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 4b (150 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) ..... | 103 |
| Figure S 21. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 5b (600 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) .....    | 104 |
| Figure S 22. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 5b (150 MHz, $\text{DMSO-d}_6$ ) ..... | 104 |
| Figure S 23. $^1\text{H}$ NMR spectrum of compound 6b (600 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....       | 105 |
| Figure S 24. $^{13}\text{C}$ NMR spectrum of compound 6b (150 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....    | 105 |

### Capítulo III

|                                                                                                                                                                                                                                |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Figure 1. Structure of 3'-hydroxychalcone (3HC) .....                                                                                                                                                                          | 110 |
| <b>Figure 2.</b> Analysis of apoptosis and necrosis induction in U2OS cells treated with DMSO (0.1%), <b>3HC</b> and curcumin at the $\text{IC}_{50}$ concentrations (22.4 and 23.3 $\mu\text{M}$ respectively) for 24 h. .... | 117 |
| Figure 3. 3HC inhibited cell migration and invasion in U2OS cells. ....                                                                                                                                                        | 118 |
| Figure 4. 3HC decrease activity of MMP-2 in U2OS cells. ....                                                                                                                                                                   | 122 |
| Figure 5. 3HC increases the expression of p53, and DNAJB1 proteins in U2OS cells. ....                                                                                                                                         | 124 |

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo II

|                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 1. Antiproliferative activity of parent compounds and CCHs expressed as IC <sub>50</sub> values (in µM).....                                                      | 73 |
| Table 2. IC <sub>50</sub> values (in µM) of parent compounds and hybrid 5a against A431 and HaCaT cell lines and respective selectivity index (SI) <sup>[a]</sup> ..... | 76 |

### Capítulo III

|                                                                                                                                                             |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>Table 1.</b> Antiproliferative activity of <b>3HC</b> against U2OS and Saos-2 cell lines expressed as IC <sub>50</sub> values (in µM <sup>1</sup> )..... | 114 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C: graus Celsius

μL: microlitros

μM: micromolar

A431: carcinoma escamoso de vulva

ABC: do inglês *ATP-Binding Cassette*

AIF: do inglês *Apoptosis-Inducing Factor*

ANOVA: do inglês *Analysis of Variance*

Apaf-1: do inglês *Apoptotic protease activating fator 1*

ARE: do inglês *Antioxidant Response Element*

ATCC: do inglês *American Type Culture Collection*

ATP: do inglês *Adenosine-5'-triphosphate*

BAD: do inglês *Bcl-2-associated death promoter*

BAK: do inglês *Bcl-2 homologous antagonist/killer*

BAX: do inglês *BCL2-associated X*

Bcl-2: do inglês *B-cell lymphoma protein-2*

Bcl-xl: do inglês *B-cell lymphoma-extra large*

BH3: ou BID, do inglês *Interacting Domain Death Agonist*

BID: do inglês *BH3 Interacting Domain Death Agonist*

BRCA1: do inglês *Breast Cancer 1*

BRCA2: do inglês *Breast Cancer 2*

C33: células de carcinoma cervical humano

CaSki: células de carcinoma cervical humano

Caspases: do inglês *Cysteine-dependent aspartate-specific proteases*

CCHs: do inglês *curcumin-cinnamaldehyde hybrids*

CMC: do inglês *Comprehensive Medicinal Chemistry*

DMEM: do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: do inglês *Deoxyribonucleic acid*

DNAJ: member of the heat shock protein 40 family (Hsp40)

E6: HPV early oncogene

E7: HPV early oncogene

EGFR: do inglês *Receptor Epidermal Growth Factor*  
EMT: do inglês *epithelial-mesenchymal transition*  
EROs: espécies reativas de oxigênio  
FADD: do inglês *Fas Associated Via Death Domain*  
FAS: do inglês *Apoptosis-Mediating Surface Antigen*  
FBS: do inglês *fetal bovine serum*  
FDA: do inglês *Food and Drug Administration*  
FITC: do inglês *Fluorescein isothiocyanate*  
G1: fase pós-mitótica do ciclo celular  
G2: fase pré-mitótica do ciclo celular  
GRAS: do inglês *Generally Recognized as Safe*  
HaCaT: queratinócito humano imortalizada (não-tumorigênica)  
HBA: do inglês *hydrogen bond acceptors*  
HBD: do inglês *hydrogen bond donors*  
HeLa: células de adenocarcinoma cervical  
HER2: do inglês *Human Epidermal growth factor Receptor 2*  
HIF: do inglês *Hypoxia Inducible Factor*  
HPV: do inglês *Human Papillomavirus*  
Hsp: do inglês *heat shock proteins*  
IC<sub>50</sub>: Inhibitory concentration 50%  
INCA: Instituto Nacional do Câncer  
IS: índice de seletividade  
IUPAC: do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*  
Keap1: do inglês *Kelch-like ECH – associated protein 1*  
log  $P_{o/w}$ : do inglês *logarithm partition coefficient octanol/water*  
M: fase mitose do ciclo celular  
MCF-7: células de adenocarcinoma de mama humano  
Mcl-1: do inglês *Induced myeloid leukemia cell differentiation protein*  
MDA-MB-231: células de adenocarcinoma de mama humano  
MDM2: do inglês *Murine double minute type 2*  
mg: miligrama  
mIC<sub>50</sub>: média da concentração inibitória 50%  
mL: mililitro

mM: milimolar

MMPs: do inglês *matrix metalloproteinases*

MTT: 3- [4,5-dimethyl-thiazol-2-yl] -2,5-diphenyltetrazolium bromide

MW: do inglês *molecular weight*

nm: nanomolar

NMR: do inglês *Nuclear Magnetic Resonance*

NOXA: ou PMAIP1, do inglês *Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1*

Nrf2: do inglês *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*

NROBT: do inglês *number of rotatable bonds*

OS: Osteossarcoma

p53: proteína 53

p53AIP1: do inglês *Protein p53 Regulated Apoptosis Inducing Protein 1*

PAGE: do inglês *polyacrylamide gel electrophoresis*

PBS: tampão fosfato salina

P-gp: do inglês *P-glycoprotein*

PUMA: do inglês *p53 Up-Regulated Modulator Of Apoptosis*

RB: Retinoblastoma

RE: Receptor de Estrogênio

RIPA: do inglês *radioimmunoprecipitation*

RP: Receptor de Progesterona

rpm: rotação por minuto

S: fase de síntese do ciclo celular

SAOS-2: células de osteossarcoma humano (p53 ausente)

SD: do inglês *standard deviation*

SDS: do inglês *sodium dodecyl sulphate*

SDS-PAGE: do inglês *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SiHa: célula de carcinoma cervical humano

SMAC: do inglês *Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspase*

STAT3: do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*

TBST: do inglês *Tris-buffered saline, 0.1% Tween 20*

TNBC: do inglês *Triple-Negative Breast Cancer*

TNF: do inglês *Tumor Necrosis Factor*

TP53: do inglês *Tumor Protein P53*

TRADD: do inglês *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-Associated DEATH Domain Protein*

TRAIL-R: do inglês *TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor*

TRIS/HCl: do inglês *Tris-Hydrochloride*

U2OS: células de osteossarcoma humano (p53 selvagem)

## SUMÁRIO

|                                                                                                |        |
|------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| <i>CAPÍTULO I – CONSIDERAÇÕES GERAIS E LITERATURA</i> .....                                    | 21     |
| 1. INTRODUÇÃO.....                                                                             | 22     |
| 1.1 CÂNCER.....                                                                                | 22     |
| 1.2 CÂNCER FEMININO .....                                                                      | 23     |
| 1.2.1 CÂNCER DE MAMA.....                                                                      | 24     |
| 1.2.2 HPV E CARCINOGENESE .....                                                                | 25     |
| 1.3 OSTEOSARCOMA .....                                                                         | 27     |
| 1.4 METÁSTASE.....                                                                             | 29     |
| 1.4.1 METALOPROTEINASES DE MATRIZ .....                                                        | 30     |
| 1.5 APOPTOSE.....                                                                              | 31     |
| 1.6 PROTEÍNA P53 .....                                                                         | 32     |
| 1.7 PROTEÍNA HSP40 .....                                                                       | 33     |
| 1.8 CURCUMINA E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL .....                                                | 34     |
| 1.9 CINAMALDEÍDO E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL .....                                             | 38     |
| 1.10 CHALCONAS E SUA ATIVIDADE ANTITUMORAL .....                                               | 41     |
| 2. JUSTIFICATIVAS.....                                                                         | 45     |
| 3. OBJETIVOS .....                                                                             | 46     |
| 3.1 OBJETIVOS GERAIS .....                                                                     | 46     |
| 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                                                | 46     |
| 4. REFERÊNCIAS .....                                                                           | 48     |
| <br><i>CAPÍTULO II</i> .....                                                                   | <br>65 |
| 5. ARTIGO CIENTÍFICO                                                                           |        |
| CURCUMIN-CINNAMALDEHYDE HYBRIDS AS ANTIPROLIFERATIVE AGENTS<br>AGAINST WOMEN CANCER CELLS..... | 66     |

|                                                                                                                                                                                       |         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 5.1. INTRODUCTION.....                                                                                                                                                                | 67      |
| 5.2. MATERIAL AND METHODS.....                                                                                                                                                        | 69      |
| 5.2.1 SYNTHESIS OF CURCUMIN-CINNMALDEHYDE HYBRIDS (CCHS) 1A – 6A AND 1B – 6B .....                                                                                                    | 69      |
| 5.2.2 CELLS AND THEIR CULTURE .....                                                                                                                                                   | 69      |
| 5.2.3 MTT ASSAY.....                                                                                                                                                                  | 69      |
| 5.2.4 CLONOGENIC FORMATION ASSAY .....                                                                                                                                                | 70      |
| 5.2.5 STATISTICAL ANALYSES.....                                                                                                                                                       | 70      |
| 5.2.6 CHEMICAL STABILITY ASSAY .....                                                                                                                                                  | 71      |
| 5.2.7 DRUG-LIKENESS PROPERTIES .....                                                                                                                                                  | 71      |
| 5.3. RESULTS AND DISCUSSION.....                                                                                                                                                      | 71      |
| 5.4. CONCLUSIONS .....                                                                                                                                                                | 79      |
| 5.5. ACKNOWLEDGEMENTS .....                                                                                                                                                           | 80      |
| 5.6. REFERENCES .....                                                                                                                                                                 | 81      |
| 5.7. SUPPLEMENTARY MATERIAL .....                                                                                                                                                     | 86      |
| 5.7.1. SPECTROSCOPY DATA ANALYSES.....                                                                                                                                                | 86      |
| 5.8. REFERENCES .....                                                                                                                                                                 | 92      |
| <br><i>CAPÍTULO III</i> .....                                                                                                                                                         | <br>106 |
| 6. ARTIGO CIENTÍFICO                                                                                                                                                                  |         |
| PRO-APOPTOTIC ACTIVITY, INHIBITION OF MIGRATION AND INVASION OF 3'-HYDROXYCHALCONE (3HC) IN HUMAN OSTEOSARCOMA CELLS ARE RELATED WITH THE INDUCTION OF P53 AND HSP40 EXPRESSION ..... | 107     |
| 6.1. INTRODUCTION.....                                                                                                                                                                | 108     |
| 6.2. MATERIALS AND METHODS .....                                                                                                                                                      | 109     |
| 6.2.1 SYNTHESIS OF 3'-HYDROXYCHALCONE (3HC).....                                                                                                                                      | 109     |
| 6.2.2 CELL CULTURE.....                                                                                                                                                               | 110     |

|                                                                                    |         |
|------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 6.2.3 CELL VIABILITY ASSAY .....                                                   | 110     |
| 6.2.4 APOPTOSIS ASSAY .....                                                        | 111     |
| 6.2.5 WOUND-HEALING ASSAY .....                                                    | 111     |
| 6.2.6 TRANSWELL ASSAY .....                                                        | 112     |
| 6.2.7 GELATIN ZYMOGRAPHY .....                                                     | 112     |
| 6.2.8 WESTERN BLOT .....                                                           | 113     |
| 6.2.9 STATISTICAL ANALYSIS .....                                                   | 114     |
| 6.3. RESULTS AND DISCUSSION .....                                                  | 114     |
| 6.3.1. 3HC INHIBITS CELL VIABILITY OF OSTEOSARCOMA CELL LINES .....                | 114     |
| 6.3.2. INHIBITION OF CELL VIABILITY BY 3HC RESULTS IN INDUCTION OF APOPTOSIS ..... | 115     |
| 6.3.3. 3HC DECREASES U2OS CELL MIGRATION AND INVASION .....                        | 117     |
| 6.3.4. 3HC REDUCES ACTIVITY OF MMP-2 IN U2OS CELL .....                            | 121     |
| 6.3.5. 3HC INCREASES P53 AND DNAJB1/HSP40 PROTEIN LEVELS IN U2OS CELL .....        | 123     |
| 6.4. CONCLUSIONS .....                                                             | 125     |
| 6.5. ACKNOWLEDGEMENTS .....                                                        | 125     |
| 6.6. REFERENCES .....                                                              | 126     |
| <br><i>CAPÍTULO IV</i> .....                                                       | <br>130 |
| 7. CONCLUSÕES .....                                                                | 131     |
| <br><i>APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS</i> .....                                   | <br>133 |

## ***Capítulo I – Considerações gerais e literatura***

---

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1 Câncer**

O câncer é definido como uma proliferação celular anormal, com elevado desenvolvimento e que não responde aos sinais de controle de divisão e morte celular. Esta proliferação descontrolada resulta de várias mutações no DNA das células, acarretando alterações de genes, que são responsáveis por codificarem mecanismos de bloqueio da divisão celular. Desta forma, estas células mutadas podem invadir os tecidos próximos ou distantes e até se dispersar para outros órgãos, desenvolvendo tumores secundários (ALBERTS et al., 2017; OPAS, 2019; TEWARI et al., 2019).

Esta doença é a segunda principal causa de morte no mundo, sendo considerada como um grande problema de saúde pública, gerando um alto e significativo impacto econômico (OPAS, 2019). De acordo com as últimas estimativas de incidência e mortalidade divulgadas pela GLOBOCAN, o câncer aumentou para 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes em 2018, respectivamente. Os tipos mais comuns são o câncer de pulmão, mama, colorretal, próstata, câncer de pele não-melanoma e estômago. Os tipos que causam mais mortes são o câncer de pulmão, colorretal, estômago, fígado e mama (IARC, 2019; OPAS, 2019).

Aproximadamente um terço das mortes por câncer é devido ao estilo de vida, incluindo ausência de atividade física, dieta não saudável com baixa ingestão de frutas e vegetais e uso contínuo de álcool e tabaco (OPAS, 2019). Em torno de 70% das mortes por câncer são referentes à população de países de baixo e médio desenvolvimento. Deste total, 22% dos óbitos por câncer são devido a infecções virais, como hepatite e papilomavírus humano (HPV), principalmente devido ao diagnóstico e tratamento tardio e/ou inacessíveis (OPAS, 2019; INCA, 2019a).

No Brasil, em 2018, foram estimados 559.371 mil novos casos de câncer e 243.588 mil casos de morte (GLOBOCAN, 2019). Sendo os mais frequentes com exceção do câncer de pele não-melanoma: próstata, mama, colorretal, pulmão, estômago e colo uterino. Para 2019, estimaram-se 600 mil novos casos, com uma maior incidência no estado de São Paulo (INCA, 2019a). Estes dados nos mostram que ainda há muito a ser realizado para lidar com o aumento do número de casos e morte por câncer, incluindo ações profiláticas, melhorias em vários setores da saúde pública, detecção precoce e tratamentos inovadores e eficientes.

## 1.2 Câncer feminino

O câncer prejudica a qualidade de vida em variadas formas, principalmente em mulheres. Em todo o mundo, mais de dois milhões de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama ou de colo uterino anualmente. Contudo, o seu estilo de vida pode influenciar no desenvolvimento desses cânceres (GINSBURG et al., 2017; HANSON et al., 2019). A ocorrência e mortalidade de câncer são maiores no sexo feminino (TEWARI et al., 2019), no mundo, em 2018, a estimativa de incidência foi de cerca de 8,6 milhões, mortalidade: 4,1 milhões e número de casos prevalentes em cinco anos são de 22,8 milhões. Sendo que os tipos mais incidentes são o câncer de mama, colorretal, pulmão, cervical e tireoide (GLOBOCAN, 2020). No Brasil, a estimativa realizada pelo INCA ilustrada abaixo (Figura 1), mostra os dez tipos de câncer mais incidentes nas mulheres no ano de 2018, exceto pele não-melanoma (INCA, 2019a).

**Figura 1.** Tipos de câncer mais comuns em mulheres previstos no ano de 2018, exceto pele não-melanoma (INCA, 2019a).

|                                                                                                        | Localização Primária        | Casos  | %     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|--------|-------|
| <b>Mulheres</b><br> | Mama Feminina               | 59.700 | 29,5% |
|                                                                                                        | Cólon e Reto                | 18.980 | 9,4%  |
|                                                                                                        | Colo do Útero               | 16.370 | 8,1%  |
|                                                                                                        | Traqueia, Brônquio e Pulmão | 12.530 | 6,2%  |
|                                                                                                        | Glândula Tireoide           | 8.040  | 4,0%  |
|                                                                                                        | Estômago                    | 7.750  | 3,8%  |
|                                                                                                        | Corpo do Útero              | 6.600  | 3,3%  |
|                                                                                                        | Ovário                      | 6.150  | 3,0%  |
|                                                                                                        | Sistema Nervoso Central     | 5.510  | 2,7%  |
|                                                                                                        | Leucemias                   | 4.860  | 2,4%  |

**Fonte:** <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>

Além do desafio do combate de uma doença tão grave e com altos índices de mortalidade prematura, a mulher é afetada pela baixa autoestima durante e após o tratamento, acarretando problemas psicosociais (GINSBURG et al., 2017; INCA, 2019b; INCA, 2019e). No início do tratamento, há a alopecia devido aos efeitos adversos da quimioterapia ou radioterapia (TEWARI et al., 2019). Em muitos casos de câncer de mama, a cirurgia para retirada do tumor ou mastectomia são necessárias. Em alguns casos de câncer cervical ou

uterino é premente uma histerectomia, que é a remoção do útero e até ovários dependendo da severidade do câncer, resultando na infertilidade feminina (CARR, 2018; INCA, 2019d).

Todos estes fatores acometem as mulheres, não apenas sua saúde física como também mental. Neste contexto, a reconstrução mamária é relevante para minimizar os danos físicos e emocionais do tratamento (INCA, 2019e).

### 1.2.1 Câncer de mama

O câncer de mama é o maior causador de mortes por câncer na população feminina (15%), bem como o mais incidente (24,2%) (IARC, 2019). No Brasil, foram estimados 59.700 (29,5%) novos casos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019. Com exceção do câncer de pele não-melanoma, o câncer de mama é o mais incidente em quase todas as regiões do Brasil (INCA, 2019a).

Este câncer compreende vários perfis moleculares, sendo classificado por suas características histológicas como, receptor de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) e o triplo negativo (TNBC), o qual é caracterizado pela ausência ou baixa expressão dos receptores ER, PR e HER2, sendo este, o tipo mais grave, pois não há terapia direcionada (HOUSSAMI et al., 2012; PROVENZANO et al., 2018).

O risco do câncer de mama possui várias causas, tais como: início da menstruação antes dos 12 anos de idade, menopausa após os 55 anos, mulheres que não tiveram filhos, primeira gravidez depois dos 30 anos, uso de alguns anticoncepcionais orais, reposição hormonal na menopausa por mais de 5 anos, exposição frequente à radiação ionizante, consumo de bebidas alcoólicas, dietas hipercalóricas, sedentarismo, histórico familiar de câncer de mama e ovário, fatores genéticos e hereditários, bem como mutações em genes de alto risco (BRCA1 e BRCA2) (INCA, 2019e).

A identificação da doença pode ser realizada nos estágios iniciais por meio de sinais e sintomas como caroço no local, pele da mama avermelhada ou retraída, pequenos nódulos nas axilas ou no pescoço e alterações e/ou saída de líquido pelos mamilos. Para melhor diagnóstico é necessário realizar exames de imagem como mamografia, ultrassonografia e ressonância magnética. No entanto, quando há indícios de malignidade é necessária a confirmação por meio da biópsia (INCA, 2019b; INCA, 2019e).

O tratamento atual consiste em cirurgia, radioterapia e quimioterapia conduzida individualmente ou de maneira conjunta, mas o resultado positivo não é garantido, havendo

efeitos adversos severos. Hormonioterápicos como tamoxifeno e anastrozol são empregados, da mesma forma que o anticorpo monoclonal trastuzumabe, que atinge antígenos da célula tumoral (INCA, 2019b).

Na quimioterapia, a doxorubicina é comumente utilizada, havendo restrições por seus efeitos cardiotóxicos e resistência, dificultam a eficiência do tratamento (PUGAZHENDHI et al., 2018). Antraciclina e/ou taxanos são administrados no tratamento adjuvante em casos de câncer operável (INCA, 2019b).

### 1.2.2 HPV e Carcinogênese

O papiloma é uma doença silenciosa provocada pelo HPV (Human Papiloma Virus), sendo transmitida sexualmente. O HPV infecta células epiteliais por meio de lesões microscópicas no epitélio e seu genoma viral integra-se ao genoma do hospedeiro. A inserção do genoma viral aumenta a expressão dos oncogenes E6 e E7 responsáveis pelo estado imortalizado das células cervicais e sua malignidade. Esta doença é a mais comum dos últimos tempos, sendo o principal agente causador do câncer de colo uterino (TEYMOURI et al., 2017; OYERVIDES-MUÑOZ et al., 2018; INCA, 2019a).

Este câncer ocupa o quarto lugar tanto na incidência (6,6%) quanto na mortalidade (7,5%) em todo o mundo (IARC, 2019). No Brasil, foram estimados 16.370 casos novos de câncer cervical para cada ano do biênio 2018-2019, sendo o terceiro mais incidente sem considerar os tumores de pele não-melanoma, com maior predominância na região Norte, onde é a quarta causa de morte de mulheres por câncer (INCA, 2019a; INCA, 2019c).

A infecção das células pelo HPV produz partículas virais a quais iniciam o desenvolvimento de lesões de baixo e alto grau. Assim, o HPV é classificado em subtipos, onde o HPV 6 e 11 são considerados de baixo risco, causando proliferação epitelial benigna e o aparecimento de verrugas genitais. Os subtipos de alto risco como HPV 16 e 18 possuem potencial maligno associados diretamente ao desenvolvimento do tumor e são responsáveis por cerca de 70% dos casos de câncer cervical (OYERVIDES-MUÑOZ et al., 2018; INCA, 2019c). Os riscos para este tipo de câncer são mais elevados quando há um início precoce da atividade sexual e principalmente com vários parceiros, sendo diretamente relacionada ao tabagismo e uso prolongado de anticoncepcionais orais (INCA, 2019c).

O câncer cervical também está correlacionado com o câncer de vulva. O câncer vulvar é uma neoplasia ginecológica incomun que surge das vias mediadas pelo HPV e independentes de HPV (ARALDI et al., 2018; WEINBERG; GOMEZ-MARTINEZ, 2019).

Estimativas realizadas pela GLOBOCAN em 2018 mostraram 44.235 novos casos de câncer de vulva e 15.222 mortes no mundo. No Brasil, as estimativas mostraram 1.748 casos e 578 mortes (GLOBOCAN, 2019).

O carcinoma de células escamosas é o tipo histológico mais comum de câncer vulvar sendo responsável por quase 90% dos casos. O câncer de vulva associada ao HPV tem morfologia basaloide e verrucosa, sendo encontrado em mulheres mais jovens. Os subtipos HPV 6, 7, 8 e 16 estão relacionados com mais de 77% dos casos de lesão intraepitelial escamosa de alto grau, enquanto que os subtipos HPV 18 e 33 estão associados a 2,6% e 11% destes casos, respectivamente. O câncer vulvar não relacionado ao HPV acontece com maior frequência em mulheres mais velhas e vem sendo associado ao líquen escleroso, uma lesão mucocutânea crônico-inflamatória, normalmente encontrada na pele genital, na qual as pacientes desenvolvem um prurido, podem sentir dor, disfunção miccional, sexual e sangramento. A sobrevida global das pacientes com câncer vulvar em 5 anos é de 71% (ARALDI et al., 2018; WEINBERG; GOMEZ-MARTINEZ, 2019).

A prevenção pode ser realizada com o uso de preservativos, contudo esta ação protege parcialmente da transmissão pelo HPV, pois também podem decorrer do contato com a pele da vulva, região perineal, perianal e bolsa escrotal (INCA, 2019c). Atualmente, há três vacinas disponíveis contra o HPV, a Cervarix<sup>®</sup> produzida pela GlaxoSmithKline<sup>®</sup>, que é uma vacina bivalente capaz de proteger contra os subtipos do HPV 16 e 18; a Gardasil<sup>®</sup> fabricada pela Merck<sup>®</sup>, é uma vacina quadrivalente que confere imunidade contra os dois tipos de HPV de alto risco (HPV 16 e 18) e dois de baixo risco (HPV 6 e 11), associados a verrugas genitais e por último a vacina nonavalente da Merck<sup>®</sup> Gardasil 9<sup>®</sup> e tem como alvo os subtipos HPV 6, 11, 16, 18, 31, 33, 45, 52 e 58. A quadrivalente e nonavalente se mostraram eficientes na prevenção da lesão intraepitelial escamosa de alto grau. As vacinas bivalente e quadrivalente foram aprovadas em 2009 e 2006, respectivamente, para mulheres entre 9 e 26 anos (ARALDI et al., 2018; LAURENT et al, 2018; WEINBERG; GOMEZ-MARTINEZ, 2019). No entanto, de acordo com o Ministério da Saúde o grupo etário alvo da vacina é de 9 a 14 anos para meninas e de 11 a 14 anos para meninos, pois a vacina é mais eficaz se usada antes do início da vida sexual (INCA, 2019c).

A vacinação e a realização de exames preventivos como Papanicolau e ultrassom são as principais ações contra o câncer de colo do útero. As mulheres acima de 25 anos devem realizar anualmente o exame de Papanicolau mesmo vacinadas, pois há mais de 200 subtipos de HPV descritos, e os tipos de vacina não protegem contra todos os tipos oncogênicos. Caso

forem detectadas células anormais no exame de Papanicolau, é necessário realizar uma biópsia para confirmação do diagnóstico (ARALDI et al., 2018; INCA, 2019c).

Os sintomas do câncer cervical, podem não aparecer na fase inicial, porém nos casos mais avançados, pode apresentar sangramento vaginal irregular ou após a relação sexual, secreção vaginal anormal e dor abdominal associada a infecções urinárias ou intestinais, dores nas costas e nas pernas, fadiga, perda de peso e apetite. Quando diagnosticado na fase inicial, as chances de cura são de 100% (INCA, 2019c; WHO, 2019)

Os tratamentos utilizados contra este câncer são a histerectomia radical, exenterações, radioterapia e quimioterapia. Além do elevado custo econômico, os tratamentos causam sofrimento e afetam significativamente a qualidade de vida das mulheres (GAFFNEY et al., 2018). Nos serviços de saúde são empregados o ácido tricloroacético, podofilina, eletrocauterização, exérese cirúrgica e crioterapia, de acordo com a prescrição médica para cada caso de câncer cervical (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Para pacientes com verrugas genitais externas ou câncer vulvar, é muito utilizado o fármaco imiquimode de uso tópico, e sua ação melhorara a resposta imune contra o vírus, mostrando uma redução da carga de HPV com taxas de resposta parcial e completa de 80% e 50% respectivamente. Cidofovir é outro fármaco tópico comumente usado que demonstrou eficácia semelhante ao imiquimod. O 5-Fluourouracila tem demonstrado ação eficaz, no entanto, seu uso tem sido limitado devido aos efeitos adversos maiores do que imiquimod e cidofovir (WEINBERG; GOMEZ-MARTINEZ, 2019)

Uma revisão sobre a terapia para o câncer cervical indicou que o tratamento com radioterapia e quimioterapia à base de cisplatina mostrou um grande aumento na sobrevida de mulheres com câncer em estágio avançado. No entanto devido a sua toxicidade, a cisplatina foi substituída pela carboplatina, com efeitos antineoplásicos semelhantes, porém menos tóxica ao paciente. A adição de bevacizumab em combinação com cisplatina e paclitaxel ou topotecan e paclitaxel, ocasiona no aumento de sobrevida global de 3 a 7 meses quando comparado a quimioterapia isolada. Apesar da melhora na sobrevida dos pacientes, este tratamento ainda possui baixa eficácia e alta toxicidade, por isso há uma busca urgente de novos fármacos mais seletivos com o objetivo de aumentar ainda mais o tempo e a qualidade de vida das pacientes (GAFFNEY et al., 2018).

### **1.3 Osteossarcoma**

O osteossarcoma (OS) é uma neoplasia óssea rara, mais comum entre crianças, adolescentes e jovens adultos, sendo que 60% dos casos ocorrem principalmente entre 10 e 20 anos de idade, e com maior incidência no sexo masculino (KANSARA et al., 2014; INCA, 2019f).

Pelo fato do OS ser uma doença esporádica e não ter demonstrado anormalidades genéticas específicas para auxiliar como um marcador no diagnóstico, uma maior predisposição a esta doença é ocasionada quando há mutações nos genes supressores de tumor Retinoblastoma (Rb) e Proteína de Tumor p53 (TP53) (WANG, 2005; KANSARA et al., 2014; INCA, 2019f). De modo geral, p53 é inativado no OS por mutações pontuais, perda alélica ou rearranjos gênicos (WANG, 2005). As mutações no gene RB são descritas em 70% dos OS, a perda deste gene é desfavorável devido ao seu papel importante no controle do ciclo celular. Casos de retinoblastoma bilateral pela associação com anomalias no gene RB, estão associados a uma maior predisposição ao OS (WANG, 2005; INCA, 2019f).

A doença de OS possui um mau prognóstico devido ao seu alto grau de malignidade, acomete principalmente os ossos longos na região da metáfise, como fêmur, tíbia e região proximal do úmero. Seus sintomas mais prevalentes são as dores que podem interromper as atividades diárias nos estágios mais avançados (KANSARA et al., 2014; INCA, 2019f).

Para o diagnóstico do OS, primeiramente é realizada uma radiografia que deve ser confirmado com ressonância magnética nuclear e biópsia, realizada por meio de cirurgia ou por punção com agulha, para assim determinar o tratamento, na qual a terapia adjuvante e neoadjuvante são utilizadas, que inclui ressecção cirúrgica associada à quimioterapia com cisplatina, doxorubicina, metotrexato e ifosfamida, isoladamente ou em combinação. Alguns métodos cirúrgicos podem levar a preservação do membro, com utilização de endopróteses ou de enxerto ósseo, contudo em alguns casos pode ser necessária a amputação ou mesmo desarticulação (JAFFE; PURI; GELDERBLOM, 2013; INCA, 2019f).

Apesar da eficácia da quimioterapia atual utilizada, este tipo de tumor apresenta uma alta predisposição para invasão local e metástase. A inibição da metástase é uma das principais estratégias de terapia do OS, uma vez que o desenvolvimento de doença metastática devido à resistência aos fármacos mostra menores chances de sucesso no tratamento, diminui a taxa de sobrevida em longo prazo destes pacientes para aproximadamente 20% a 30% e continua a ser a causa mais importante de morte por esse tipo de câncer, principalmente porque o pulmão é o local mais comum de metástase de OS e geralmente levam à morte em um ano (LI et al., 2015a; ANDERSON, 2016; INCA, 2019f).

Além disso, também há os efeitos colaterais consideráveis que limitam as concentrações de tais fármacos utilizadas na quimioterapia, que incluem cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, neurotoxicidade e indução de neoplasia secundária, sendo que estes fatores também afetam os efeitos anticâncer desejáveis (ANDERSON, 2016).

Desta forma, mesmo com os avanços no tratamento devido à árdua pesquisa no setor de oncologia, ainda há uma grande busca pela identificação de novos medicamentos com toxicidade reduzida, efeitos anti-metastáticos e mais eficazes de forma que atinja o alvo necessário contra esta doença, pois o OS permanece como uma das principais causas de morte entre as patologias associadas aos ossos (SILVA et al., 2016; LIMA et al., 2018; SEBA et al., 2018).

#### **1.4 Metástase**

A metástase é um processo complexo, sendo caracterizado pela capacidade invasiva das células tumorais. Este processo envolve várias etapas, na qual as células se separam do tumor primário, aderem e invadem a membrana basal, migram para locais adjacentes ou distantes por meio da circulação linfática e sanguínea, deixam o sistema vascular, aderem e proliferam em outro órgão e por fim desenvolvem um tumor secundário (SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013; ANDERSON, 2016; OPAS, 2019).

O potencial metastático tem sido relacionado ao processo de transição epitélio-mesenquimal, na qual, em carcinomas de origem epitelial, as células tumorais sofrem alterações em seu transcriptoma, que controlam modificações bioquímicas e morfológicas e tem sido visto como um processo binário com duas populações celulares distintas, onde as células perdem suas características epiteliais pela perda das proteínas *E*-caderina e adquirem as características mesenquimais pelo ganho da expressão das proteínas vimentina e *N*-caderina. (PASTUSHENKO; BLANPAIN, 2018). Já em tumores originados de tecidos mesenquimais, como sarcomas ósseos e de tecidos moles, este processo ainda é pouco claro e podem estar relacionados a um comportamento clínico desfavorável. Dependendo do seu histiótipo, podem transferir o seu fenótipo através de processos relacionados à transição epitélio-mesenquimal e transição mesenquimal-epitelial, o que pode contribuir para sua progressão e agressividade (SANNINO et al., 2017).

O aumento da capacidade da célula desencadear metástase está diretamente relacionado a estes processos por meio da regulação dessas proteínas citadas acima. Essas

alterações aumentam a capacidade das células tumorais em migrar, invadir, causar metástase e adquirir resistência à terapia (PASTUSHENKO; BLANPAIN, 2018).

No entanto, a transição epitélio-mesenquimal não tem sido elucidada completamente, mas sabe-se que uma alta expressão gênica de vimentina, *N*-caderina, Slug e  $\beta$ -catenina estão relacionados a este processo (ECCLES; WELCH, 2007; SEBA et al., 2018). Com base nisso, alguns grupos de pesquisas têm trabalhado para identificar substâncias de baixa massa molecular como agentes anti-metastáticos por meio da ativação da proteína p53, que pode reverter a transição epitélio-mesenquimal, reduzindo a migração e a invasão celular (ZAWACKA-PANKAU; SELIVANOVA, 2015; SILVA et al., 2016; LIMA et al., 2018; SEBA et al., 2018). Desta forma, a busca por fármacos que possam atuar na p53 são de grande interesse no objetivo de diminuir a metástase (SEYFRIED; HUYSENTRUYT, 2013; LIMA et al., 2018; SEBA et al., 2018).

#### 1.4.1 Metaloproteinases de matriz

As metaloproteinases de matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de zinco que contribuem para a capacidade das células tumorais degradarem todos os componentes da matriz extracelular devido a atividade proteolítica. Fisiologicamente, este mecanismo é importante para a manutenção e renovação dos tecidos, no entanto, com a desregulação desse processo e superexpressão das MMPs há o desenvolvimento de células cancerígenas que migram e invadem o sistema linfático e vascular e se espalham para locais distantes do tumor primário (PITTAYAPRUEK et al., 2016).

Várias proteínas são responsáveis pela degradação da matriz extracelular, até agora, mais de 20 MMPs foram descritas. Segundo suas estruturas e funções, podem ser classificadas em: collagenases 1, 2, 3 (MMP-1, 8 e 13, respectivamente), estromelisinases 1 e 2 (MMP-3 e 10), gelatinases (MMP-2 e 9) e MMPs tipo membrana como, MMP-14, 15, 16, 17, 24 e 25. A MMP-2 é a mais importante entre as MMPs devido a sua capacidade em degradar diferentes tipos de colágenos. Além de ser a MMP mais expressa, também é encontrada na maioria dos tecidos e células (NAGASE; VISSE; MURPHY, 2006; PITTAYAPRUEK et al., 2016). Estudos têm relatado sua alta expressão em vários tipos de câncer e sua associação no aumento da metástase, sendo também comprovada sua relação a um mau prognóstico (LUO; LIANG; ZHANG, 2009; NOH et al., 2011). Em estudos relacionados ao OS, foi comprovado o envolvimento de MMP-2 na migração e invasão

(BJORNLAND et al., 2005; JIN et al., 2013; LEI et al., 2015), associada com metástase pulmonar e menor sobrevida (LI et al., 2014; ZHANG et al., 2015). Por esta razão, o bloqueio da ação de MMP-2 torna-se um alvo relevante na tentativa de controle da progressão tumoral e da metástase (LIMA et al., 2018; SEBA et al., 2018; SILVA et al., 2018a).

## 1.5 Apoptose

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada rigidamente regulado, para a manutenção do equilíbrio fisiológico entre a proliferação e morte celular. Considerado como um processo evolutivo essencial para a eliminação de células danificadas, em excesso ou cancerígenas (HUTT et al., 2015; KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015; KNIGHT et al., 2019). Desta forma, a apoptose pode ser eficaz no bloqueio da progressão do câncer, atuando como uma barreira natural (ADAMS; CORY, 2007).

A via apoptótica é um conjunto de reações bioquímicas que exige energia, sendo caracterizada também por induzir alterações morfológicas muitas das quais devido a ativação de caspases, tais como: formação de vesículas, redução de volume da célula, fragmentação nuclear e condensação da cromatina, fragmentação do DNA e proteínas, bem como modificações da superfície da membrana, que permitem que a célula apoptótica seja reconhecida e fagocitada (KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015).

Existem duas principais vias apoptóticas, a via intrínseca, que é desencadeada por estímulos externos envolvendo a ativação de BH3-proteínas, levando à permeabilização da membrana externa mitocondrial via canais Bax que ativa SMAC (Second Mitochondria-Derived Activator Of Caspase) o que leva à liberação do citocromo c, que induz a formação do apoptossoma, formado por sete unidades de caspase-9, o que irá ativar as caspases 3 ou 7 ocasionando a apoptose. A via extrínseca é ativada após estímulos dos receptores da família do fator de necrose tumoral (TNF), incluindo o receptor Fas (primeiro sinal de apoptose), TNF-alfa (fator de necrose tumoral) e TRAIL (ligando indutor de apoptose associado ao TNF). Após ligação e oligomerização do ligante, os domínios de morte (FADD e TRADD) são recrutados, eles associam-se a caspase-8 que é clivada e liberada no citoplasma, ativando assim as caspases executoras 3, 6 e 7, levando à apoptose. As vias intrínsecas e extrínsecas resultam na ativação de caspases (proteases de cisteína aspartato-específica) fundamentais para a apoptose, que são responsáveis pela clivagem de proteínas essenciais, em última

análise conduzindo à destruição celular (HUTT, 2015; KNIGHT et al., 2019; GRILO; MANTALARIS, 2019).

A desregulação da via apoptótica, contribui para o desenvolvimento do câncer e resistência à terapia (KOFF; RAMACHANDIRAN; BERNAL-MIZRACHI, 2015). Esta resistência também pode ser causada pela superexpressão de proto-oncogenes (CROCE, 2008) e pela redução da expressão de genes supressores de tumor (ZAHREDDINE; BORDEN, 2013).

## **1.6 Proteína p53**

O fator de transcrição p53 conhecido como “guardião do genoma” é uma proteína supressora de tumores (NIAZI et al., 2018). Ela regula várias funções biológicas como, preservação da integridade genômica contra danos no DNA, indução de parada do ciclo celular para o reparo de quebras da fita de DNA, controle da proliferação, migração, invasão e indução de apoptose (NIAZI et al., 2018; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

A ativação da p53 pode levar à sobrevivência ou morte celular, dependendo dos níveis de estresse. Baixos níveis de estresse ou dano desencadeiam a ativação de p53 para induzir parada do ciclo celular durante a fase de transição de G1 a S para o reparo do DNA e sobrevivência celular. Em contraste, altos níveis de estresse ou lesões difíceis de serem revertidas resultam na ativação da p53 que sinaliza às células para se isolarem e sofrerem autodestruição por meio da apoptose, que garante que as células não passem o DNA errôneo para suas células progênicas (NIAZI et al., 2018; KANG; KROEMER; TANG, 2019).

Pela via intrínseca, quando ativada pelos sinais de estresse celular, a p53 regula os fatores de transcrição pró-apoptóticos, como Puma, Bax, Bak, Noxa, Bad, Bid, p53AIP1, APAF1 entre outros, mantendo a expressão basal do fator indutor de apoptose (AIF) reprimindo a expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1. Posteriormente, a p53 se liga diretamente a esses membros pró-apoptóticos e se transloca rapidamente para a mitocôndria, aumentando a permeabilização da membrana externa mitocondrial, desencadeando a morte celular pela liberação do citocromo c e ativação da cascata de caspases (WANG et al., 2014; KANG; KROEMER; TANG, 2019; YAMADA; YOSHIDA, 2019).

De acordo com os estudos de Seba e colaboradores, a p53 exibe papel na regulação da transição epitelial-mesenquimal. Sua ativação pode promover a reversão das células

mesenquimais para epiteliais e a consequente redução da migração e invasão (SEBA et al., 2018). Em muitos tipos de câncer, a p53 encontra-se mutada ou deletada, inativando suas funções antitumorais e antimetastáticas (KANG; KROEMER; TANG, 2019; YAMADA; YOSHIDA, 2019). Nesse contexto, a inativação da p53 possui grande relação com OS e consequente metástase pulmonar (LIU et al., 2000; LIU, KANG; 2017). No entanto, pesquisas mostraram que sua ativação inibiu a migração e invasão *in vitro* e diminuiu o crescimento e metástase pulmonar *in vivo* no OS (NAKASE et al., 2005; SONG et al., 2015).

Devido a estes problemas, muitos estudos têm focado na identificação de genes alvo do p53 que possam retomar sua função supressora de tumor (SILVA et al., 2018b; KANG; KROEMER; TANG, 2019; YAMADA; YOSHIDA, 2019). Como muitas substâncias de baixa massa molecular como chalconas, curcumina e seus híbridos, atuam na ativação de p53 vale a pena investigar o mecanismo molecular pelo qual é regulada (SILVA et al., 2016; LIMA et al., 2018; SEBA et al., 2018; SILVA et al., 2018a). Desta forma, a restauração de p53 pode ser uma abordagem terapêutica para o OS e outros tipos de câncer, visto que o controle de p53 nas células é rigidamente regulado por vários fatores, incluindo exportadores nucleares e proteínas chaperonas que possivelmente controlam seu mecanismo de translocação (SEBA et al., 2018; SILVA et al., 2018b).

## **1.7 Proteína Hsp40**

As proteínas de choque térmico (Hsp) conhecidas como chaperonas moleculares, constituem uma grande família de proteínas envolvidas no enovelamento de proteínas cuja expressão é induzida por choque térmico ou outro tipo de estresse. De todas as principais famílias de Hsp, a Hsp40 tem o maior número de membros, que são classificadas em três subclasses de DNAJ: DNAJA, DNAJB e DNAJC (WU et al., 2017b). As Hsp40 são co-chaperonas que estimulam a atividade de hidrólise de ATP da Hsp70 e regulam o dobramento, desnaturação, translocação e degradação de proteínas. Devido aos poucos estudos relacionados a Hsp40, não são conhecidos os mecanismos moleculares e seu papel no câncer. No entanto investigações recentes indicaram uma relação positiva entre Hsp40 e p53 (WU et al., 2017b; SILVA et al., 2018b).

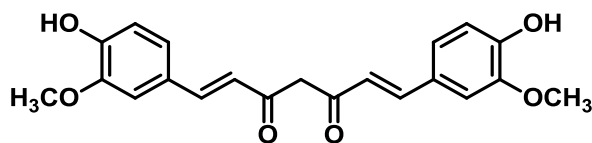
Foi identificado que a Hsp40 se liga a p53 regulando sua conformação e estabilidade (HIRAKI et al., 2015; SILVA et al., 2018b). Desta forma, a indução de Hsp40 está envolvida na ativação da p53, na qual DNAJB1 (membro da família Hsp40) inibe a ubiquitinação

mediada pelo MDM2 e degradação do p53 e contribui para a ativação de p53 nas células cancerígenas (QI et al., 2014). Além disso, a maior indução de Hsp40 está relacionada ao aumento da atividade de caspase-3, já quando silenciada a atividade da caspase diminui (SILVA et al., 2018b). Outros dados específicos de membros da família Hsp40 como a DNAJA3 mostraram sua interação direta com Hsp70 e p53 e sua indução da apoptose via intrínseca em células de câncer de mama MCF-7 (TRINH; ELWI; KIM, 2010) além da capacidade em suprimir o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço *in vivo* (CHEN et al., 2009). DNAJA3 regula a angiogênese ao desestabilizar o fator 1 induzível por hipóxia (HIF-1) em células de câncer de colo uterino (BAE et al., 2005). O silenciamento de Hsp40 em células de OS, apresentou maior crescimento celular e diminuição da apoptose, o que mostra sua importância na supressão tumoral (EDWARDS; MÜNGER, 2004). A proteína DNAJB4, apresentou atividade supressora de tumor e indução da atividade de caspase-3, sua expressão inibiu a proliferação, crescimento, migração, invasão e diminui a progressão do ciclo celular de células de câncer de pulmão (TSAI et al., 2006; LIN et al., 2010). A alta expressão de DNAJB6 reduz a malignidade tumoral, crescimento e ocasiona a reversão parcial da transição epitélio-mesenquimal em células de câncer de mama *in vivo* (MITRA et al., 2008; MITRA et al., 2010). A DNAJC25 é uma proteína supressora de tumor, sua alta expressão reduz o número de colônias de células de câncer hepático e aumenta o nível de apoptose (LIU et al., 2012). De acordo com os dados apresentados, a Hsp40 é um alvo molecular relevante para os estudos contra a tumorigênese (SILVA et al., 2018b)

## 1.8 Curcumina e sua atividade antitumoral

A curcumina (Figura 2) é uma substância de cor amarela isolada de rizomas de *Curcuma longa* (Zingiberaceae), popularmente conhecida como açafrão-da-terra ou turmerico. Sua fórmula química de acordo com a IUPAC é [(1*E*, 6*E*)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona] (SALEHI et al., 2019).

**Figura 2.** Estrutura da curcumina



**Fonte:** autor

O açafrão-da-terra vem sendo utilizado por séculos com fins terapêuticos no Sudeste Asiático, devido aos seus múltiplos efeitos farmacológicos (SALEHI et al., 2019), sendo presente na culinária mundial. A curcumina é considerada pela FDA como GRAS (Geralmente Reconhecido como Seguro) (GUPTA et al., 2012), pois em quantidades elevadas é bem tolerada. Uma revisão sobre o potencial terapêutico *in vivo* da curcumina revelou seus efeitos nos sistemas gastrointestinal, respiratório e cardiovascular, e efeitos anti-inflamatórios, antidiabéticos, hepatoprotetores, neuroprotetores, quimiotetores, antineoplásicos, antialérgicos e antimicóticos (SALEHI et al., 2019).

Estudos mostraram que a curcumina inibiu o desenvolvimento de células tumorais de pulmão, colorretal, gástrico (FANG et al., 2013), mama (SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 2019), cervical (WANG et al., 2016; PAULRAJ et al., 2015), vulva (WU; LU; CUI, 2015), ovário (GOU et al., 2015) e osteossarcoma (LIMA et al., 2018). Além disso, induziu a apoptose e parada do ciclo celular de células tumorais de ovário (GOU et al., 2015) e ocasionou morte celular por apoptose em células de OS (LIMA et al., 2018). Yallapu e colaboradores relataram que a curcumina foi efetiva contra células de câncer de mama e ovário, apresentando inibição da proliferação e formação de colônias, além da indução de apoptose (YALLAPU et al., 2010). A inibição da migração, invasão e metástase foram relatadas contra células de câncer de pulmão, por meio da ativação da proteína DNAJB4 da família Hsp40 (CHEN et al., 2008). Maher e colaboradores mostraram que a curcumina foi eficaz contra as células tumorais SiHa e HeLa, infectadas com HPV-16 e HPV-18, respectivamente, além de induzir apoptose, regular genes supressores de tumor (p53 e Rb) e diminuir a expressão dos oncogenes E6 e E7 (MAHER et al., 2011).

Uma revisão sobre produtos naturais e seus alvos biológicos, indicou que a atividade da curcumina é correlacionada com a presença da cetona  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada (GERSCH et al., 2012). Esse grupo é muito comum em algumas substâncias que possuem atividade antitumoral, pois podem atuar como aceptores de Michael, reagindo com biomoléculas (WANG et al., 2018). Li e colaboradores estudaram a ação de análogos de curcumina e

demonstraram que a atividade contra células não-pequenas de pulmão foram dependentes do aceptor de Michael (LI et al., 2015b). Desta forma, esta funcionalidade parece ser interessante para o planejamento de novas substâncias antitumorais (WANG et al., 2018).

A bioatividade da curcumina vem sendo associada às propriedades sequestradoras de radicais livres (ou antioxidantes) e a vários mecanismos moleculares, como a modulação da expressão do fator de transcrição p53 e seus genes-alvo (LIN, 2007). Também foi relatado que a curcumina pode ativar os receptores de aril hidrocarbonetos (AhR) que exibe uma atividade semelhante ao supressor de tumor. A curcumina realiza uma translocação nuclear de AhR seguida pelo aumento da expressão de citocromo P450 (KUMAR et al., 2016; SAFE et al., 2018). Além disso, a curcumina é um potencial agente anticâncer por inibição da angiogênese mediada por HIF-1 $\alpha$ . Foi demonstrado que a curcumina diminui a expressão de HIF-1 $\alpha$  que ocasiona, por exemplo, o aumento do processo EMT, da invasão e do comportamento metastático (BAHRAMI et al., 2018).

A curcumina pode inibir a atividade de várias proteínas relacionadas a resistências do câncer, como a glicoproteína-p (P-gp) (LI et al., 2010; LI et al., 2011; REVALDE et al., 2015). Estas proteínas transmembrana atuam como bombas de efluxo de fármacos, reduzindo ativamente os níveis intracelulares de fármacos. Dessa forma, são necessárias doses progressivamente maiores de fármacos antineoplásicos que conseqüentemente aumentam o risco de toxicidade (NABEKURA, 2010). A inibição de bombas de efluxo pela curcumina é um fato muito importante, visto que mais de 70% dos pacientes com câncer de ovário, são resistentes à terapia com taxanos (YALLAPU; JAGGI; CHAUHAN, 2010). Foi identificado que este mecanismo de resistência é devido à expulsão do fármaco pela expressão de glicoproteína-p (P-gp) e outros transportadores ABC em células tumorais (LI et al., 2010).

A multirresistência na quimioterapia do câncer é um fenômeno em que as células tumorais não respondem ao tratamento com múltiplos fármacos antineoplásicos de diferentes estruturas e mecanismos de ação. É a principal causa de falha da quimioterapia, sendo a razão da elevada taxa de mortalidade, especialmente em estágio avançado e cânceres metastáticos (BAGULEY, 2010; GILLET; GOTTESMAN, 2010).

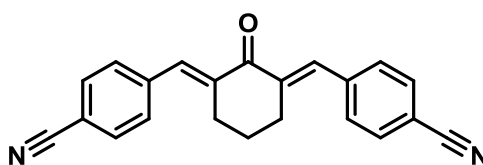
A toxicidade e a resistência dos antineoplásicos têm despertado interesse dos pesquisadores no desenvolvimento de antitumorais inovadores. Uma das estratégias empregadas no desenvolvimento de fármacos é a hibridação molecular baseada em produtos naturais. Essa ferramenta consiste na união de dois farmacóforos em uma única estrutura, o que resulta em uma melhor eficácia com ação em múltiplos alvos, redução de efeitos adversos

e resistência. Dentre os produtos naturais mais estudados para o tratamento do câncer, a curcumina é o que tem exibido ação *in vivo* (CHOUDHARY et al., 2018; TEWARI et al., 2019).

Apesar de sua eficácia terapêutica, a curcumina possui baixa biodisponibilidade, a qual está associada à sua baixa solubilidade em água e metabolismo de primeira passagem (SALEHI et al., 2019). Este fato levou à busca de análogos obtidos por modificações estruturais, conduzindo a uma maior potência e biodisponibilidade (LIMA et al., 2018; SILVA et al., 2018a).

Paulraj e colaboradores relataram que análogos de curcumina 1,5-bis(2-hidroxifenil)-1,4-pentadieno-3-ona (MS17) e 1,5-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,4-pentadieno-3-ona (MS13) foram mais potentes que a curcumina contra células de câncer cervical CaSki e HeLa, linhagens positivas para HPV 16 e 18 respectivamente, induzindo a morte celular por apoptose (PAULRAJ et al., 2015). Outro estudo avaliou o análogo de curcumina CH-5 (Figura 3) contra células de osteossarcoma U2OS, MG-63 e Saos-2 onde CH-5 mostrou-se mais ativo que a curcumina, controlando a expressão do fator de transcrição p53. Este mesmo análogo se mostrou eficaz no tratamento de células de câncer gástrico HGC-27, induzindo a morte celular por apoptose e reduzindo a migração e invasão das células tumorais (LIMA et al., 2018).

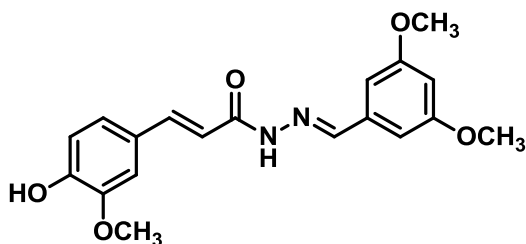
**Figura 3.** Estrutura do análogo de curcumina (CH-5)



**Fonte:** autor

Silva e colaboradores sintetizaram uma série de híbridos de curcumina-resveratrol e avaliaram seu potencial contra células de câncer de mama (MCF-7), o híbrido mais ativo (Figura 4) apresentou um valor de  $CI_{50}$  de 19,09  $\mu$ M sendo mais potente que a curcumina, resveratrol ou curcumina combinada com resveratrol, levando ao bloqueio do ciclo celular no início da mitose e, posteriormente, apoptose (SILVA et al., 2018c).

**Figura 4.** Híbrido de curcumina-resveratrol



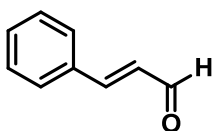
**Fonte:** autor

Os efeitos antineoplásicos da curcumina, seus análogos e híbridos, podem estar envolvidos nas vias regulatórias transcricionais responsáveis pela regulação dos genes relacionados à tumorigênese, angiogênese, metástase, invasão, proliferação e apoptose (LIN, 2007; SHISHODIA, 2013).

### 1.9 Cinamaldeído e sua atividade antitumoral

O cinamaldeído (obtido de espécies de *Cinnamomum*) é uma substância constituinte de 50% a 70% do óleo essencial da casca das “canelas”, as quais vêm sendo utilizada há milhares de anos para fins medicinais e culinários (HONG et al., 2016, POLAQUINI et al., 2017). É uma substância classificada e aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) como GRAS (geralmente reconhecido como seguro) (FABRA et al., 2016). Sua estrutura química (Figura 5) é de natureza fenilpropanoídica, formada por um aldeído aromático  $\alpha,\beta$ -insaturado (POLAQUINI et al., 2017).

**Figura 5.** Estrutura química do cinamaldeído



**Fonte:** autor

A ação do cinamaldeído tem sido amplamente estudada em diversas áreas, revelando seus efeitos antidiabéticos, antidepressivos, antivirais, anti-inflamatórios, antiosteoporóticos e

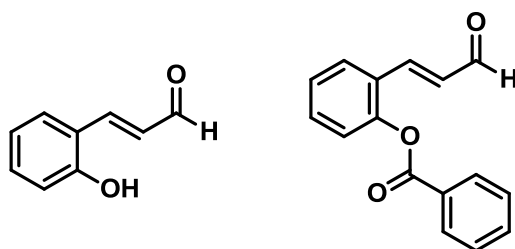
antineoplásicos (HONG et al., 2016). Suas atividades antitumorais têm sido exploradas contra linhagens tumorigênicas de pulmão (WU et al., 2017a), mama (RAD et al., 2015), câncer colorretal (LU; OBIANOM; AI, 2018), bucal (YU et al., 2019), osteossarcoma, cervical, pele e neuroblastoma (SINGH et al., 2009). Os extratos e óleos essenciais da canela apresentaram efeito antialérgico, antimicrobiano, antioxidante, antiangiogênico, antimutagênico e anti-Alzheimer. Estes dados são interessantes, visto que o componente principal dos extratos e óleos essenciais da canela é o cinamaldeído. Além disso, os extratos de canela reduziram significativamente a migração de células de câncer de colo uterino (SiHa) e induziram apoptose, aumentando as concentrações de cálcio intracelular, ocasionando a alteração do potencial de membrana mitocondrial (HAMIDPOUR et al., 2015; HONG et al., 2016).

A atividade do cinamaldeído tem sido descrita na regulação da invasão, metástase e no efeito antiproliferativo pela inibição da ciclina D1 em vários tipos de tumores (HONG et al., 2016; WU et al., 2017a). Rad e colaboradores demonstraram em seus estudos sobre câncer de mama, que a ação do cinamaldeído está relacionada à morte celular por apoptose mediada pela ativação da caspase-8 (RAD et al., 2015). Outro estudo mostrou sua capacidade em inibir a proliferação celular de câncer cervical (HeLa) pela indução da parada do ciclo celular na fase S (LARASATI et al., 2014). Um estudo de revisão indicou que sua inibição da proliferação tumoral pode ocorrer pela indução da apoptose por espécies reativas de oxigênio (EROs) em células de leucemia HL-60 e ativação de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 em células de hepatoma humano (HONG et al., 2016). No entanto, o cinamaldeído possui instabilidade química devido à sua alta reatividade relacionada à presença do grupo aldoxila (aldeído) (LOPACHIN; GAVIN, 2014; HONG et al., 2016; POLAQUINI et al., 2017).

Para superar essa limitação, o estudo com análogos e híbridos do cinamaldeído tem sido de grande interesse para as extensivas pesquisas de muitos cientistas da área da química medicinal. Uma pesquisa de revisão mostrou que substâncias derivadas do cinamaldeído são candidatos para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos como, por exemplo, o derivado 2-hidroxicinamaldeído (Figura 6). Este derivado apresentou efeitos antiproliferativos contra células tumorigênicas e induziu a apoptose em células de câncer de cólon ao diminuir a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2, aumentando a expressão da proteína Bax e induzindo a translocação citoplasmática do citocromo c. Outros relatos mostraram que baixas concentrações (10  $\mu$ M) dos derivados 2-hidroxicinamaldeído e 2-benzoiloxicinamaldeído (Figura 6) induzem a apoptose em células de câncer de mama MDA-MB-231 p53-mutante e

câncer de colorretal SW620 por induzir o acúmulo de EROs e ativação de caspase-3, sugerindo que o cinamaldeído induz a apoptose via caspase-3 de modo independente de p53. A ação conjunta de polifenóis e cinamaldeído desencadearam a parada do ciclo celular na fase G2/M e morte celular por apoptose em células de câncer de ovário resistentes à cisplatina (HONG et al., 2016).

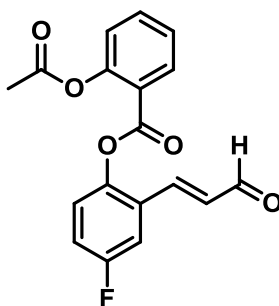
**Figura 6.** Estrutura química do 2-hidroxicinamaldeído e 2-benzoiloxicinamaldeído



**Fonte:** autor

Outros trabalhos descreveram que derivados de ácido acetilsalicílico baseados na estrutura do cinamaldeído apresentaram atividade contra linhagens HCT-8 de câncer de colorretal. A avaliação biológica indicou que a substância mais ativa (Figura 7) exibiu um aumento de mais de 10 vezes na atividade antiproliferativa em comparação às substâncias de origem natural e baixa toxicidade nas células não-tumorigênicas, além disso, induziu a parada do ciclo celular e apoptose, mostrando que derivados de cinamaldeído são promissores agentes para o desenvolvimento de fármacos antineoplásicos inovadores (LU; OBIANOM; AI, 2018).

**Figura 7.** Estrutura química dos derivados de ácido acetilsalicílico baseados no cinamaldeído

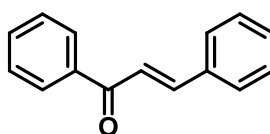


**Fonte:** autor

### 1.10 Chalconas e sua atividade antitumoral

As chalconas são substâncias que pertencem à família dos flavonoides que são presentes em frutas, legumes e plantas (JANDIAL et al., 2014; MIRZAEI; EMAMI, 2016). Sua estrutura é composta por dois anéis benzênicos unidos por uma ponte cetônica  $\alpha,\beta$ -insaturada (Figura 8) (MIRZAEI; EMAMI, 2016).

**Figura 8.** Núcleo chalcônico



**Fonte:** autor

A síntese de chalconas ou seu isolamento a partir de fontes naturais estão sendo investigadas em todo o mundo para o desenvolvimento de medicamentos mais potentes e eficientes para o tratamento de diversas doenças (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014). Revisões sobre a atividade biológica das chalconas mostraram seus efeitos anti-inflamatórios, antifúngicos, anti-*Leishmania*, antiproliferativos, antimaláricos, antimicrobianos, antiprotozoários, anti-HIV e antidiabéticos (SINGH; ANAND; KUMAR, 2014; MIRZAEI; EMAMI, 2016).

Diversos estudos mostraram que as chalconas inibiram o desenvolvimento de células tumorais de fígado, ovário (BHAT et al., 2005), próstata (BHAT et al., 2005; SYAM et al., 2012), pulmão (BHAT et al., 2005; SYAM et al., 2012), colorretal (BHAT et al., 2005; SYAM et al., 2012; IFTIKHAR et al., 2017), cervical (BHAT et al., 2005; MARQUES et al., 2019), vulva (MARQUES et al., 2019), mama (SYAM et al., 2012; BORTOLOTTTO et al., 2017; IFTIKHAR et al., 2017; MARQUES et al., 2019) e osteossarcoma (SILVA et al., 2016). Além disso, a *trans*-chalcona (Figura 8) aumentou o nível de EROs ocasionando a morte de células de câncer de mama (MCF-7) por apoptose, por vias intrínsecas e extrínsecas, pois também aumentou a atividade das caspases-7, -8 e -9 (SYAM et al., 2012). Bortolotto e colaboradores também realizaram estudos com as células MCF-7, na qual, a *trans*-chalcona ocasionou a parada do ciclo celular na fase G1 e induziu apoptose mediado pela via intrínseca, pela inibição de Bcl-2 e indução de Bax (BORTOLOTTTO et al., 2017).

Estudos de Silva e colaboradores mostraram que a *trans*-chalcona inibiu o crescimento de células cancerígenas de OS (U2OS), mediado pela indução de apoptose dependente da caspase, além de regular genes envolvidos na migração e invasão celular (SILVA et al., 2016). Outro trabalho deste mesmo autor mostrou que a *trans*-chalcona induziu a expressão de p53, além do gene Hsp40 nas células de OS (U2OS), que está envolvido na estabilidade e ativação da p53, bloqueando sua ubiquitinação mediada por MDM2 através da interação com MDM2 (SILVA et al., 2018b).

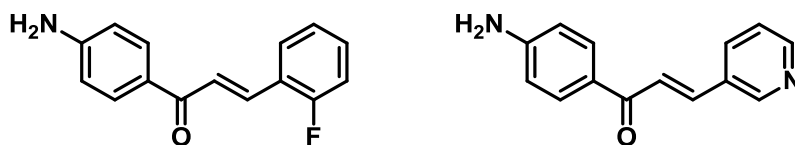
Uma revisão sobre a farmacologia das chalconas mostrou que suas estruturas simples e versáteis exibiram atividade anticâncer por morte celular apoptótica por meio de interação com alvos moleculares como MDM2 / p53, tubulina e STAT3 (MENEZES; DIEDERICH, 2019). Outros dados sugerem que as chalconas também têm como alvo, várias vias de sinalização de câncer, como a via proteossômica, o ciclo celular, a apoptose, os receptores e os transportadores de resistência a múltiplos fármacos (JANDIAL et al., 2014).

O potencial anticâncer das chalconas também está associada à sua capacidade de ligação à tubulina e propriedade alquilante, bem como possíveis interações com várias proteínas envolvidas na apoptose e proliferação celular (MIRZAEI; EMAMI, 2016). Também foi relatado que seu mecanismo de ação pode ser via porção carbonila  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturada como aceitador de Michael, tioredoxina redutase, via Keap1-Nrf2-ARE e inibição da formação de microtúbulos (MENEZES; DIEDERICH, 2019).

No entanto, vários estudos mostram que a estrutura da chalcona pode ser facilmente modificada para potencializar sua ação biológica, como por exemplo, pela adição de uma grande variedade de grupos funcionais como arilos, halogênios, hidroxilas, grupos carboxílicos, benzenos etc (JANDIAL et al., 2014). Além disso, os substituintes metoxi e hidroxí são importantes na atividade antitubulina e citotóxica das chalconas (MIRZAEI; EMAMI, 2016).

Santos e colaboradores relataram que as chalconas 2'-flúor-4'-aminochalcona e 3'-piridil-4'-aminochalcona (Figura 9) foram ativas contra as linhagens de células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231, induziram a morte celular por apoptose em ambas as linhagens e aumentaram a expressão da proteína pró-apoptótica p53 na linhagem MCF-7. Estas chalconas ainda foram capazes de inibir a proliferação celular mesmo em condições de acidose, demonstrando serem substâncias promissoras para o tratamento do câncer de mama (SANTOS et al., 2019).

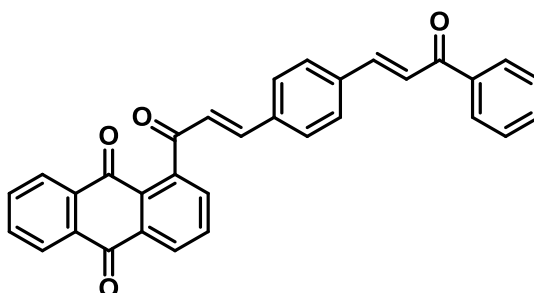
**Figura 9.** 2'-fluor-4'-aminochalcona e 3'-piridil-4'-aminochalcona



Fonte: autor

Markovic e colaboradores mostraram que híbridos de antraquinona e chalcona (Figura 10) tiveram efeito citotóxico seletivo contra as células de câncer cervical (HeLa), por meio da indução de apoptose dependente de caspase (MARKOVIC et al., 2015).

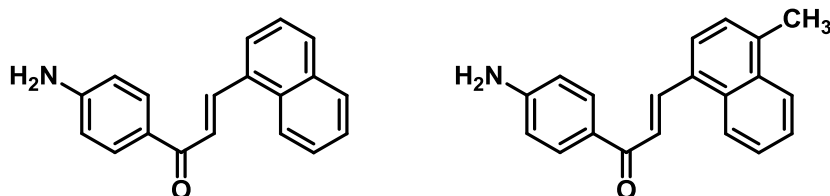
**Figura 10.** Híbrido de antraquinona e chalcona



Fonte: autor

Outro estudo com aminochalconas realizado por Seba e colaboradores, mostraram que as 4'-amino-1'-naftil-chalcona e 4'-amino-4'-metil-1'-naftil-chalcona (Figura 11) apresentaram baixa capacidade de inibir a viabilidade das células de OS (U2OS e SAOS-2), no entanto, diminuíram a migração, invasão, atividade da MMP-2 e regularam genes envolvidos na EMT, além de induzir a expressão de p53 que pode estar relacionada aos efeitos anti-metastáticos (SEBA et al., 2018).

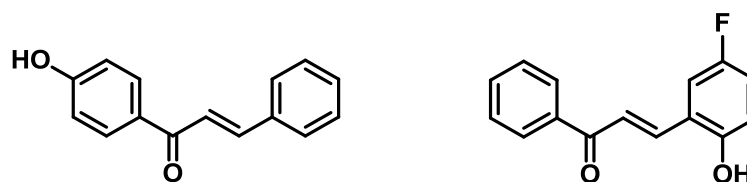
**Figura 11.** 4'-amino-1'-naftil-chalcona e 4'-amino-4'-metil-1'-naftil-chalcona



Fonte: autor

Silva e colaboradores analisaram o efeito da 4'-hidroxi-chalcona (Figura 12) contra células cancerígenas de OS (U2OS) que suprimiu a proteína Sp1 e induziu p53 (SILVA et al., 2016). Este mesmo autor mostrou que a 2'-hidroxi-5'-flúor-chalcona (Figura 12) induziu a expressão de p53, além do gene Hsp40 nas células de OS (U2OS). Além disso, 2-hidroxi-5-flúor chalcona exibiu a maior atividade da caspase quando comparado a *trans*-chalcona (SILVA et al., 2018b).

**Figura 12.** 4'-hidroxi-chalcona e 2'-hidroxi-5'-flúor-chalcona



**Fonte:** autor

## 6.6. REFERENCES

- Anderson, M.E. Update on survival in osteosarcoma. *Orthop. Clin. North Am.* **2016**, *47*, 283-292. [doi: 10.1016/j.ocl.2015.08.022]
- Bjornland, K.; Flatmark, K.; Pettersen, S.; Aasen, A.O.; Fodstad, O.; Maelandsmo, G.M. Matrix metalloproteinases participate in osteosarcoma invasion. *J. Surg. Res.* **2005**, *127*, 151–156. [doi: 10.1016/j.jss.2004.12.016]
- Bortolotto, L.F.B.; Barbosa, F.R.; Silva, G.; Bitencourt, T.A.; Beleboni, R.O.; Baek, S.J.; Marins, M.; Fachin, A.L. Cytotoxicity of *trans*-chalcone and licochalcone A against breast cancer cells is due to apoptosis induction and cell cycle arrest. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *85*, 425–433. [doi: 10.1016/j.biopha.2016.11.047]
- Dong, N.; Liu, X.; Zhao, T.; Wang, L.; Li, H.; Zhang, S.; Li, X.; Bai, X.; Zhang, Y.; Yang, B. Apoptosis-inducing effects and growth inhibitory of a novel chalcone, in human hepatic cancer cells and lung cancer cells. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *105*, 195-203. [doi: 10.1016/j.biopha.2018.05.126]
- Grilo, A.; Mantalaris, A. Apoptosis: A mammalian cell bioprocessing perspective. *Biotechnol. Adv.* **2019**, *37*, 459-475. [doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.012]
- Hiraki, M.; Hwang, S.; Cao, S.; Ramadhar, T.R.; Byun, S.; Yoon, K.W.; Lee, J.H.; Chu, K.; Gurkar, A.U.; Kolev, V.; Zhang, J.; Namba, T.; Murphy, M.E.; Newman, D.J.; Mandinova, A.; Clardy, J.; Lee, S.W. Small-molecule reactivation of mutant p53 to wild-type-like p53 through the p53-Hsp40 regulatory axis. *Chem. Biol.* **2015**, *22*, 1206–1216. [doi: 10.1016/j.chembiol.2015.07.016]
- Hsieh, M.; Chang, L.; Hung, H.; Lin, H.; Shih, M.; Tsai, C.; Kuo, S.; Lee, K. New bis (hydroxymethyl) alkanoate curcuminoid derivatives exhibit activity against triple-negative breast cancer *in vitro* and *in vivo*. *Eur. J. Med. Chem.* **2017**, *131*, 141–151. [doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.006]
- Iftikhar, S.; Khan, S.; Bilal, A.; Manzoor, S.; Abdullah, M.; Emwas, A.H.; Sioud, S.; Gao, X.; Chotana, G.A.; Faisal, A.; Saleem, R.S.Z. Synthesis and evaluation of modified chalcone based p53 stabilizing agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2017**, *27*, 4101-4106. [doi: 10.1016/j.bmcl.2017.07.042]
- INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Tipos de câncer - Osteossarcoma - versão para profissionais de saúde. Available online: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-infantojuvenil/osteossarcoma/profissional-de-saude> (accessed on 27 December 2019).

Iqbal, B.; Ghildiyal, A.; Sahabjada; Singh, S.; Arshad, M.; Mahdi, A.A.; Tiwari, S. Antiproliferative and apoptotic effect of curcumin and TRAIL (TNF related apoptosis inducing ligand) in chronic myeloid leukaemic cells. *J. Clin. Diagn. Res.* **2016**, *10*, XC01-XC05. [doi: 10.7860/JCDR/2016/18507.7579]

Jaffe, N.; Puri, A.; Gelderblom, H. Osteosarcoma: evolution of treatment paradigms. *Sarcoma* **2013**, *2013*, 1-7. [doi.org/10.1155/2013/203531]

Jandial, D.D.; Blair, C.A.; Zhang, S.; Krill, L.S.; Zhang, Y.; Zi, X. Molecular targeted approaches to cancer therapy and prevention using chalcones. *Curr. Cancer Drug Targets* **2014**, *14*, 181–200. [doi: 10.2174/1568009614666140122160515]

Jin, J.; Cai, L.; Liu, Z.M.; Zhou, X.S. miRNA-218 inhibits osteosarcoma cell migration and invasion by down-regulating of TIAM1, MMP2 and MMP9. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **2013**, *14*, 3681–3684. [doi: 10.7314/apjcp.2013.14.6.3681]

Kansara, M.; Teng, M.W.; Smyth, M.J.; Thomas, D.M. Translational biology of osteosarcoma. *Nat. Rev. Cancer* **2014**, *14*, 722-735. [doi: 10.1038/nrc3838]

Koff, J.L.; Ramachandiran, S.; Bernal-Mizrachi, L. A time to kill: targeting apoptosis in cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 2942-2955. [doi: 10.3390/ijms16022942]

Lei, P.; He, H.; Hu, Y.; Liao, Z. Small interfering RNA-induced silencing of galectin-3 inhibits the malignant phenotypes of osteosarcoma *in vitro*. *Mol. Med. Rep.* **2015**, *12*, 6316–6322. [doi: 10.3892/mmr.2015.4165]

Li, H.; Zhang, K.; Liu, L.H.; Ouyang, Y.; Bu, J.; Guo, H.B.; Xiao, T. A systematic review of matrix metalloproteinase 9 as a biomarker of survival in patients with osteosarcoma. *Tumour Biol.* **2014**, *35*, 5487–5491. [doi: 10.1007/s13277-014-1717-3]

Li, S.; Sun, W.; Wang, H.; Zuo, D.; Hua, Y.; Cai, Z. Research progress on the multidrug resistance mechanisms of osteosarcoma chemotherapy and reversal. *Tumor Biol.* **2015**, *36*, 1329–1338. [doi: 10.1007/s13277-015-3181-0]

Lima, F.T.; Seba, V.; Silva, G.; Torrezan, G.S.; Polaquini, C.R.; Pinhanelli, V.C.; Baek, S.J.; Fachin, A.L.; Regasini, L.O.; Marins, M. The curcumin analog CH-5 exerts anticancer effects in human osteosarcoma cells via modulation of transcription factors p53/sp1. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, e1909. [doi: 10.3390/ijms19071909]

Liu, G.; McDonnell, T.J.; Luna, R.M.O.; Kapoor, M.; Mims, B.; El-Naggar, A.K.; Lozano, G. High metastatic potential in mice inheriting a targeted p53 missense mutation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 4174–4179. [doi: 10.1073/pnas.97.8.4174]

Liu, D.D.; Kang, Y. Ets2 anchors the prometastatic function of mutant p53 in osteosarcoma. *Genes Dev.* **2017**, *31*, 1823–1824. [doi: 10.1101/gad.307439.117]

Mai, C.W.; Yaeghoobi, M.; Abd-Rahman, N.; Kang, Y.B.; Pichika, M.R. Chalcones with electron-withdrawing and electron-donating substituents: anticancer activity against TRAIL resistant cancer cells, structure–activity relationship analysis and regulation of apoptotic proteins. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *77*, 378–387. [doi: 10.1016/j.ejmech.2014.03.002]

Markovic, V.; Debeljak, N.; Stanojkovic, T.; Kolundzija, B.; Sladic, D.; Vujcic, M.; Janovic, B.; Tanic, N.; Perovic, M.; Tesic, V.; Antic, J.; Joksovic, M.D. Anthraquinone–chalcone hybrids: synthesis, preliminary antiproliferative evaluation and DNA-interaction studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *89*, 401–410. [doi: 10.1016/j.ejmech.2014.10.055]

Marques, B.C.; Santos, M.B.; Anselmo, D.B.; Monteiro, D.A.; Gomes, E.; Saiki, M.F.C.; Rahal, P.; Rosalen, P.L.; Sardi, J.C.O.; Regasini, L.O. Methoxychalcones: effect of methoxyl group toward antifungal, antibacterial and antiproliferative activities. *Med. Chem.* **2019**, *15*, 1. [doi: 10.2174/1573406415666190724145158]

Mirzaei, H.; Emami, S. Recent advances of cytotoxic chalconoids targeting tubulin polymerization: Synthesis and biological activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2016**, *121*, 610–639. [doi: 10.1016/j.ejmech.2016.05.067]

Nelson, K. M.; Dahlin, J. L.; Bisson, J.; Graham, J.; Pauli, G.F.; Walters, M.A. The essential medicinal chemistry of curcumin: miniperspective. *J. Med. Chem.* **2017**, *60*, 1620–1637. [doi: 10.1021/acs.jmedchem.6b00975]

Niazi, S.; Purohit, M.; Niazi, J.H. Role of p53 circuitry in tumorigenesis: A brief review. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *158*, 7–24. [doi: 10.1016/j.ejmech.2018.08.099]

Pittayapruuek, P.; Meephansan, J.; Prapapan, O.; Komine, M.; Ohtsuki, M. Role of matrix metalloproteinases in photoaging and photocarcinogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, 868. [doi: 10.3390/ijms17060868]

Pugazhendhi, A.; Edison, T.N.J.I.; Velmurugan, B.K.; Jacob, J.A.; Karuppusamy, I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. *Life sciences* **2018**, *200*, 26–30. [doi: 10.1016/j.lfs.2018.03.023]

Santos, M.B.; Anselmo, D.B.; Oliveira, J.G.; Jardim-Perassi, B.V.; Monteiro, D.A.; Silva, G.; Gomes, E.; Fachin, A.L.; Marins, M.; Zuccari, D.A.P.C.; Regasini, L.O. Antiproliferative activity and p53 upregulation effects of chalcones on human breast cancer cells. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2019**, *34*, 1093–1099. [doi: 10.1080/14756366.2019.1615485]

- Seba, V.; Silva, G.; Santos, M.B.; Baek, S.J.; França, S.C.; Fachin, A.L.; Regasini, L.O.; Marins, M. Chalcone derivatives 4'-amino-1-naphthyl-chalcone (D14) and 4'-amino-4-methyl-1-naphthyl-chalcone (D15) suppress migration and invasion of osteosarcoma cells mediated by p53 regulating EMT-related genes. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2838. [doi: 10.3390/ijms19092838]
- Seyfried, T.N.; Huysentruyt, L.C. On the origin of cancer metastasis. *Crit. Rev. Oncog.* **2013**, *18*, 43-73. [doi: 10.1615/critrevoncog.v18.i1-2.40]
- Silva, G.; Marins, M.; Fachin, A.L.; Lee, S.; Baek, S.J. Anti-cancer activity of *trans*-chalcone in osteosarcoma: involvement of sp1 and p53. *Mol. Carcinog.* **2016**, *55*, 1438–1448. [doi: 10.1002/mc.22386]
- Silva, G.; Marins, M.; Chaichanasak, N.; Yoon, Y.; Fachin, A.L.; Pinhanelli, V.C.; Regasini, L.O.; Santos, M.B.; Ayusso, G.M.; Marques, B.C.; Wu, W.W.; Phue, J.; Shen, R.; Baek, S.J. *Trans*-chalcone increases p53 activity via DNAJB1/HSP40 induction and CRM1 inhibition. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0202263. [doi: doi.org/10.1371/journal.pone.0202263]
- Silva, G.; Lima, F.T.; Seba, V.; Lourenço, A.L. M.; Lucas, T.G.; Andrade, B.V.; Torrezan, G.S.; Polaquini, C.R.; Garcia, M.E.; Couto, L.B.; Bestetti, R.B.; França, S.C.; Fachin, A.L.; Regasini, L.O.; Marins, M. Curcumin analog CH-5 suppresses the proliferation, migration, and invasion of the human gastric cancer cell line HGC-27. *Molecules* **2018b**, *23*, e279. [doi: 10.3390/molecules23020279]
- Singh, P.; Anand, A.; Kumar, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *85*, 758–777. [doi: 10.1016/j.ejmech.2014.08.033]
- Wang, J.; Yun, D.; Yao, J.; Fu, W.; Huang, F.; Chen, L.; Wei, T.; Yu, C.; Xu, H.; Zhou, X.; Huang, Y.; Wu, J.; Qiu, P.; Li, W. Design, synthesis and QSAR study of novel isatin analogues inspired Michael acceptor as potential anticancer compounds. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, *144*, 493-503. [doi: 10.1016/j.ejmech.2017.12.043]
- Yamada, K.; Yoshida, K. Mechanical insights into the regulation of programmed cell death by p53 via mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2019**, *1866*, 839-848. [doi: 10.1016/j.bbamcr.2019.02.009]
- Yue, P.Y.; Leung, E.P.; Mak, N.K.; Wong, R.N. A simplified method for quantifying cell migration/wound healing in 96-well plates. *J. Biomol. Screen.* **2010**, *15*, 427-33. [doi: 10.1177/1087057110361772]
- Zhang, M.; Zhang, X. Association of MMP-2 expression and prognosis in osteosarcoma patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 14965–14970. [doi not available]

## ***Capítulo IV***

---

## 7. Conclusões

### Capítulo II

Os híbridos de curcumina-cinamaldeído da série I foram agentes antiproliferativos mais potentes que a série II;

Os dados indicaram que uma ligação dupla carbono-carbono foi mais relevante para a atividade antiproliferativa do que duas ligações duplas carbono-carbono;

De modo geral, os híbridos foram mais potentes que o cinamaldeído;

Híbridos contendo grupos hidroxilados foram mais ativos que os metoxilados;

O híbrido **5a** apresentou a maior potência em inibir a proliferação celular de todas as células avaliadas de câncer feminino com exceção da linhagem MCF-7, com valores de  $IC_{50}$  variando de 2.7 a 36.5  $\mu M$ ;

**5a** demonstrou maior potência que a curcumina contra as células CaSki, SiHa, C33 e A431, além de ter exibido um maior IS (8.5) que a curcumina (0.7);

**5a** inibiu a formação de colônias da célula (A431) em que apresentou maior atividade ( $IC_{50} = 2.7 \mu M$ );

**5a** demonstrou ser uma substância estável sob condições fisiológicas, ao contrário da curcumina e cinamaldeído;

Uma breve investigação *in silico* corroborou as propriedades farmacocinéticas e *drug-likeness* de **5a**;

### Capítulo III

Nas linhagens de osteossarcoma, **3HC (5a)** foi mais potente contra a linhagem U2OS ( $IC_{50} = 22.4 \mu M$ ) quando comparado a SAOS-2 ( $IC_{50} = 45.0 \mu M$ ), sugerindo que a proteína p53 pode ser o seu alvo molecular;

O efeito antiproliferativo de **3HC** foi mediado pela indução de apoptose;

**3HC** reduziu a migração, invasão celular e atividade da metaloproteinase MMP-2;

**3HC** induziu a expressão de p53 e DNAJB1 (Hsp40), essa indução pode contribuir na atividade de p53, importante para a apoptose, visto que Hsp40 estabiliza a conformação da proteína p53;

Estes dados destacam a importância da hibridação molecular e da presença de grupos hidroxilados para potencializar a ação em alvos moleculares antitumorais, na qual corroboram o potencial da curcumina e cinamaldeído como iniciais protótipos privilegiados para o desenvolvimento de novos híbridos com atividade pró-apoptóticas e inibição da migração e invasão.