

# **(Tio)barbituratos inibidores do CD36 com potencial terapêutico no cancro da próstata**

**Diogo Nascimento Ferreira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Ciências Biomédicas**  
(2<sup>o</sup> ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Samuel Martins Silvestre  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Doutora Sílvia Socorro  
Co-orientador: Mestre João Serrano

Versão final corrigida após provas públicas

**Dezembro de 2022**

**Folha em branco**

## **Declaração de Integridade**

Eu, Diogo Nascimento Ferreira, que abaixo assino, estudante com o número de inscrição M10249 de/o Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências da Saúde, declaro ter desenvolvido o presente trabalho e elaborado o presente texto em total consonância com o **Código de Integridades da Universidade da Beira Interior**.

Mais concretamente afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de Fraude Académica, e que aqui declaro conhecer, que em particular atendi à exigida referenciação de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, e assumindo assim na íntegra as responsabilidades da autoria.

Universidade da Beira Interior, Covilhã 09 / 12 / 2022

*Diogo Nascimento Ferreira*

**Folha em branco**

# Agradecimentos

A escrita de uma dissertação de mestrado constitui uma etapa exigente e rigorosa que se tornaria impossível sem o apoio de várias entidades.

Primeiramente tenho de agradecer ao professor Doutor Samuel Silvestre por ter aceitado a orientação desta dissertação. Agradeço a afabilidade, o tempo dispensado e a liberdade facultada para tomar o meu tempo na escrita desta dissertação.

À minha co-orientadora professora Doutora Sílvia Socorro, pelas sugestões que prontamente prestou, as quais muito contribuíram para o aperfeiçoamento deste trabalho de dissertação.

Ao meu co-orientador Mestre João Serrano, que me ajudou bastante na minha etapa inicial desta fase onde ainda não me sentia confortável e confiante no trabalho laboratorial relativo à química orgânica. Obrigado pela paciência, motivação e direcionamento.

À Doutora Cátia Vaz, pela sua contribuição na elaboração do meu trabalho prático e pela disponibilidade para discutir as minhas dúvidas.

Ao meu colega Samuel Dinis que sempre se mostrou pronto para me ajudar na minha integração no grupo e esclarecimento de dúvidas relativamente a procedimentos experimentais.

Às minhas colegas, Lara Fonseca e Mariana Feijó, pela ajuda e providenciamento das culturas celulares.

Agradeço também a todos os meus outros colegas com quem partilhei as instalações da universidade.

Por último, tenho que agradecer ao projeto ProMETAB pelo financiamento: ProMETAB” - Fatores extrínsecos na modulação do metabolismo da próstata: aplicações na prevenção, diagnóstico e tratamento do cancro (POCI-01-0145-FEDER-029114), cofinanciado na sua componente de Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do Programa Operacional Competitividade e Internacionalização (POCI), e na sua componente nacional pela Fundação para a

Ciência e a Tecnologia, I. P., Investigador responsável: Sílvia Socorro; Co-Investigador responsável: Cátia Vaz.

**Folha em branco**

# Resumo

O cancro da próstata (CP) é o segundo cancro mais frequentemente diagnosticado na população masculina a nível mundial, e o quinto com maior taxa de mortalidade. Numa fase inicial da doença, as células do CP são descritas como sendo dependentes da ação de androgénios para o seu crescimento e proliferação. Desta forma, quando o CP é diagnosticado nesta fase, a terapia de privação androgénica, que tem por base a redução dos níveis de androgénios circulantes, é usualmente indicada. No entanto, a administração contínua desta terapia leva a que eventualmente as células do CP se tornem resistentes à mesma, e assim se desenvolva uma forma mais letal da doença, para a qual não existe uma terapia eficaz. A capacidade das células cancerígenas em reprogramarem o seu metabolismo tem sido destacada como uma das principais características do cancro associadas à progressão da doença e metastização. No caso do CP, as formas avançadas da doença caracterizam-se por serem mais dependentes do metabolismo glicolítico e lipídico. O *cluster* de diferenciação 36 (CD36) é uma proteína associada ao metabolismo lipídico, sendo responsável pelo transporte de ácidos gordos (AG) de cadeia longa através da membrana celular. Foi observado que esta proteína tende a estar sobre-expressa no CP e, que deste modo, provoca um aumento do influxo lipídico através da membrana celular. De facto, os AG representam uma matéria-prima essencial para sustentar o crescimento e desenvolvimento das células cancerígenas, uma vez que estes fazem parte da base estrutural das membranas, para além de funcionarem como segundos mensageiros da sinalização celular e como fonte de energia. Neste trabalho de dissertação procedeu-se à síntese e caracterização de ácidos (tio)barbitúricos *N1,N3*-disubstituídos acoplados em C5 com o ácido esteárico, um AG de cadeia longa saturada com 18 carbonos, como potenciais inibidores do CD36. No total, foram sintetizados 6 novos compostos na forma do seu sal sódico, com rendimentos bons a muito bons (56% a 95%). Posteriormente, foi realizado o estudo *in vitro* de determinação da atividade antiproliferativa e de inibição do influxo lipídico dos vários sais sintetizados em células da próstata humana. Foram utilizadas células da próstata não-neoplásicas (PNT1A) e neoplásicas (LNCaP e PC3). Nos estudos de viabilidade celular foi observado que os derivados *N1,N3*-difeníl- e *N1,N3*-dimetiltiobarbituratos apresentam seletividade para as células LNCaP e que o tiobarbiturato funcionalizado com o ácido esteárico apresenta seletividade para as células PC3. Os estudos de *screening* de inibição do influxo lipídico permitiram verificar que o derivado *N1,N3*-dimetiltiobarbiturato é aquele que apresenta uma maior inibição. Contudo, é necessário um estudo mais aprofundado para entender o

verdadeiro potencial destes compostos na inibição do CD36, e na relação desta inibição com a acção antiproliferativa em linhas celulares prostáticas tumorais.

## **Palavras-chave**

(Tio)barbituratos; Cancro da próstata; CD36; Viabilidade celular; Influxo lipídico

**Folha em branco**

# Abstract

Prostate cancer (PCa) is the second most frequently diagnosed cancer in the male population worldwide, and the fifth with the highest mortality rate. At an early stage of the disease, PCa cells growth and proliferation are described as being dependent on the action of androgens. Thus, when PCa is diagnosed at this stage, the androgen deprivation therapy, which is based on the reduction of androgen levels in the body, is usually indicated. However, the continuous administration of this therapy eventually leads to the PCa cells to become resistant to it, and thus developing a more lethal form of disease, for which there is no effective therapy. The ability of cancer cells to reprogram their metabolism has been identified as one of the main hallmarks of cancer associated with progression of disease and metastization. PCa advanced forms of disease are known to be dependent on glycolytic and lipid metabolism. The cluster of differentiation 36 (CD36) is a protein associated with lipid metabolism, and is responsible for the transportation of long-chain fatty acids (FA) across the cell membrane. However, it has already been observed that this protein tends to be over-expressed in PCa and, thus, causes an increase in lipid influx across the cell membrane. In fact, FA represent an essential raw material to support the growth and development of cancer cells, since they are part of the structural basis of the membranes, in addition to functioning as second messengers of cell signaling and as a source of energy. This dissertation aimed to synthesize and characterize *N1,N3*-disubstituted (thio)barbituric acids coupled at C5 with stearic acid, a saturated long-chain FA with 18 carbons, as potential inhibitors of CD36. In total, 6 new compounds were synthesized in the form of their sodium salts, with good to very good yields (56% to 95%). Subsequently, an *in vitro* study was carried out to determine the antiproliferative activity and inhibition of the lipid influx of the various synthesized salts in human prostate cells. In this work, non-neoplastic (PNT1A) and neoplastic (LNCaP and PC3) prostate cells were used. In the cell viability studies, it was observed that the derivatives *N1,N3*-diphenyl- and *N1,N3*-dimethylthiobarbiturates present selectivity for LNCaP cells and that the thiobarbiturate functionalized with stearic acid presents selectivity for PC3 cells. The lipid influx inhibition screening studies showed that the derivative *N1,N3*-dimethylthiobarbiturate is the one that presents a greater inhibition. However, further studies are needed to understand the true potential of these compounds to inhibit CD36, and the relationship of this inhibition to the antiproliferative action in prostate tumor cell lines.

# Keywords

(Tio)barbiturates; Prostate Cancer; CD36; Cell Viability; Lipidic Uptake

**Folha em branco**

# Índice

<b>Capítulo 1 – Introdução</b>	1
1.1 - A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos	1
1.2 - (Tio)barbituratos	4
1.3 - Visão geral da anatomia e fisiologia da próstata	7
1.4 - Notas gerais sobre o cancro da próstata	9
1.4.1 - Epidemiologia	9
1.4.2 - Fatores de risco	9
1.4.3 - Diagnóstico	10
1.4.4 - Principais abordagens terapêuticas em uso e em estudo	12
1.5 - Bases do desenvolvimento do cancro da próstata	13
1.6 - Alterações metabólicas no cancro da próstata	15
1.7 - Metabolismo dos ácidos gordos	18
1.7.1 - Caracterização físico-química e nomenclatura dos ácidos gordos	19
1.7.2 - Biossíntese de ácidos gordos	20
1.7.3 - Absorção de ácidos gordos	22
1.7.4 - Alongamento e insaturação dos ácidos gordos	23
1.7.5 - Oxidação de ácidos gordos	24
1.8 - Relação entre o CD36, reprogramação metabólica e cancro da próstata	25
<b>Capítulo 2 – Objetivos</b>	30
<b>Capítulo 3 – Parte experimental</b>	32
3.1 - Síntese química e caracterização estrutural	32
3.1.1 - Equipamento e bases da caracterização estrutural	32
3.1.2 - Síntese de precursores	33
3.1.2.1 - 1,3-Difenilureia (3a)	33
3.1.2.2 - Ácido 1,3-difenilbarbitúrico (5a)	34
3.1.2.3 - Ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (5b)	34
3.1.2.4 - Ácido 1,3-dimetiltiobarbitúrico (5c)	35
3.1.3 - Síntese dos produtos 8a-f	35
3.1.3.1 - Acilação em C5 a partir do ácido esteárico (preparação dos compostos 8a-d)	35

3.1.3.1.1 - 1,3-Difenil-5-estearoilpirimidina-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-triona (8a)	36
3.1.3.1.2 - 1,3-Difenil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-diona (8b)	37
3.1.3.1.3 - 1,3-Dimetil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-diona (8c)	37
3.1.3.1.4 - 1,3-Dietil-5-estearoil-2-tioxodi hidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-diona (8d)	38
3.1.3.2 - Acilação em C5 a partir do cloreto de estearóilo estearóilo (preparação dos compostos 8e-f)	38
3.1.3.2.1 - 5-Estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-diona (8e)	39
3.1.3.2.2 - 5-Estearoilpirimidina-2,4,6(1 <i>H</i> ,3 <i>H</i> ,5 <i>H</i> )-triona (8f)	39
3.1.4 - Preparação dos sais de sódio 9a-f	40
3.1.4.1 - 2,6-Dioxo-1,3-difenil-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9a)	40
3.1.4.2 - 6-Oxo-1,3-difenil-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9b)	41
3.1.4.3 - 1,3-Dimetil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9c)	41
3.1.4.4 - 1,3-Dietil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9d)	42
3.1.4.5 - 6-Oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9e)	42
3.1.4.6 - 2,6-Dioxo-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9f)	43
3.2 - Avaliação da atividade biológica	44
3.2.1 - Materiais e métodos	44
3.2.1.1 - Linhas celulares	44
3.2.1.2 - Meios de cultura	44
3.2.1.3 - Manutenção das culturas celulares	45
3.2.1.4 - Tripsinização	45
3.2.1.5 - Contagem de células	45
3.2.1.6 - Preparação das soluções de compostos	45
3.2.1.7 - Ensaio de viabilidade celular	45
3.2.1.8 - Ensaio de influxo lipídico	47
3.2.1.9 - Análise estatística	48

<b>Capítulo 4 – Discussão de resultados</b>	50
4.1 - Síntese química e caracterização estrutural	50
4.1.1 - Precursores	51
4.1.2 - Produtos	52
4.1.3 - Sais	54
4.2 - Avaliação da atividade biológica	55
4.2.1 - Avaliação biológica - <i>Screening</i>	55
4.2.2 - Avaliação biológica - IC <sub>50</sub>	58
4.2.2.1 - Sal 9a	58
4.2.2.2 - Sal 9b	58
4.2.2.3 - Sal 9c	58
4.2.2.4 - Sal 9d	59
4.2.2.5 - Sal 9e	59
4.2.2.6 - Sal 9f	59
4.2.3 - Ensaio de influxo lipídico	63
<b>Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas futuras</b>	67
<b>Capítulo 6 – Referências</b>	69

**Folha em branco**

# Lista de Figuras

<b>Figura 1:</b> Estágios do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.	2
<b>Figura 2:</b> Classes de alvos terapêuticos. Adaptado de Folis. <sup>12</sup>	4
<b>Figura 3:</b> Exemplos de alguns compostos usados no séc. XX com ação farmacológica sedativo-hipnótica, anestésica e anticonvulsiva.	6
<b>Figura 4:</b> Representação esquemática de um corte sagital da cavidade pélvica masculina. Adaptado de Jones <i>et al.</i> <sup>24</sup>	7
<b>Figura 5:</b> Zonas da próstata. Adaptado de Wang <i>et al.</i> <sup>26</sup>	8
<b>Figura 6:</b> Fases de desenvolvimento do cancro da próstata. Adaptado de Saraon <i>et al.</i> <sup>61</sup>	14
<b>Figura 7:</b> Representação de um glicerofosfolípido. Adaptado de Koolman <i>et al.</i> <sup>90</sup>	20
<b>Figura 8:</b> Complexo multienzimático da FASN. Adaptado de Murray <i>et al.</i> <sup>96</sup>	21
<b>Figura 9:</b> Síntese de ácidos gordos através da FASN.	22
<b>Figura 10:</b> Síntese de ácidos gordos pelas células. Adaptado de Tumanov <i>et al.</i> <sup>94</sup>	23
<b>Figura 11:</b> Reprogramação metabólica envolvida na transformação maligna das células prostáticas. Adaptado de Uo <i>et al.</i> <sup>74</sup>	27
<b>Figura 12:</b> Estrutura química dos inibidores AP 5055 e AP 5258. Adaptado de Geloan <i>et al.</i> <sup>106</sup>	28
<b>Figura 13:</b> Síntese de 1,3-difenil-5-estearoilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (8a).	36
<b>Figura 14:</b> Síntese de 1,3-difenil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8b).	37
<b>Figura 15:</b> Síntese de 1,3-dimetil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8c).	37
<b>Figura 16:</b> Síntese de 1,3-dietil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8d).	38
<b>Figura 17:</b> Síntese de 5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8e).	39
<b>Figura 18:</b> Síntese de 5-estearoilpirimidina-2,4,6(1H,3H,5H)-triona (8f).	39
<b>Figura 19:</b> Síntese de 2,6-dioxo-1,3-difenil-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9a).	40

<b>Figura 20:</b> Síntese de 6-oxo-1,3-difenil-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra- hidropirimidin-4-olato de sódio (9b).	41
<b>Figura 21:</b> Síntese de 1,3-dimetil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra- hidropirimidin-4-olato de sódio (9c).	41
<b>Figura 22:</b> Síntese de 1,3-dietil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra- hidropirimidin-4-olato de sódio (9d).	42
<b>Figura 23:</b> Síntese de 6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra- hidropirimidin-4-olato de sódio (9e).	43
<b>Figura 24:</b> Síntese de 2,6-dioxo-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4- olato de sódio (9f).	43
<b>Figura 25:</b> Redução do MTT em formazano por ação da succinato desidrogenase.	46
<b>Figura 26:</b> Bodipy. R- ácido gordo pretendido anexado.	47
<b>Figura 27:</b> Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9a, 9b, 9c, a concentrações de 10µM e 50µM	56
<b>Figura 28:</b> Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9d, 9e, 9f, a concentrações de 10µM e 50µM	57
<b>Figura 29:</b> Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9a e 9b, a concentrações de 1µM, 5µM, 10µM, 50µM, 100µM e 200µM.	60
<b>Figura 30:</b> Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9c e 9d, a concentrações de 1µM, 5µM, 10µM, 50µM, 100µM e 200µM.	61
<b>Figura 31:</b> Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9e e 9f, a concentrações de 1µM, 5µM, 10µM, 50µM, 100µM e 200µM.	62
<b>Figura 32:</b> Influxo lipídico das células LNCaP e PC3 quando submetidas ao estímulo do sal 9a-f, a concentrações de 1µM, e do SSO a concentrações de 1 µM e 25 µM.	64

**Folha em branco**

# Lista de Tabelas

<b>Tabela 1:</b> Visão geral de ensaios clínicos com fármacos direcionados ao recetor CD36. Adaptado de Pardo <i>et al.</i> <sup>90</sup>	28
<b>Tabela 2:</b> Rendimentos obtidos e esperados para os precursores sintetizados.	52
<b>Tabela 3:</b> Picos característicos dos precursores sintetizados.	52
<b>Tabela 4:</b> Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os produtos sintetizados.	53
<b>Tabela 5:</b> Picos característicos dos produtos sintetizados.	54
<b>Tabela 6:</b> Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os sais sintetizados.	54
<b>Tabela 7:</b> Valores das médias das viabilidades celulares e desvios padrões obtidos.	57
<b>Tabela 8:</b> Valores de IC <sub>50</sub> obtidos assim como o coeficiente de correlação.	63
<b>Tabela 9:</b> Valores das médias do influxo lipídico e desvios padrão obtidos.	65

**Folha em branco**

# Lista de Esquemas

<b>Esquema 1:</b> Síntese de ácido barbitúrico em 1864. Adaptado de López-muñoz <i>et al.</i> <sup>13</sup>	4
<b>Esquema 2:</b> Síntese de ácido barbitúrico a partir da ureia e malonato de dietilo. Adaptado de S. Furniss <i>et al.</i> <sup>14</sup>	5
<b>Esquema 3:</b> Síntese de 1,3-difenilureia (3a).	33
<b>Esquema 4:</b> Síntese de ácido 1,3-difenilbarbitúrico (5a).	34
<b>Esquema 5:</b> Síntese de ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (5b).	34
<b>Esquema 6:</b> Síntese de ácido 1,3-dimetiltiobarbitúrico (5c).	35
<b>Esquema 7:</b> Síntese por acilação em C5 a partir do ácido esteárico (8a-d)	36
<b>Esquema 8:</b> Síntese por acilação em C5 a partir do cloreto de estearoílo.	38
<b>Esquema 9:</b> Síntese dos produtos 9a-f sob a forma de sal de sódio.	40
<b>Esquema 10:</b> Esquema global de todas as reações efetuadas.	50

**Folha em branco**

# Lista de Acrónimos

1,3BPG	<i>D</i> -1,3-bisfosfoglicerato
2PG	2-fosfoglicerato
3PG	3-fosfoglicerato
ACC	Acetil-CoA carboxilase
Ac-CoA	Acetilcoenzima A
ACLY	ATP citrato liase
ACP	Proteína transportadora de acila
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ADP	Adenosina difosfato
AG	Ácidos gordos
AIP	Atrofia inflamatória proliferativa
AKT	Proteína quinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Do inglês, <i>AMP-activated protein kinase</i>
AR	Do inglês, <i>Androgen receptor</i>
ARE	Do inglês, <i>Androgen Responsive Elements</i>
AT	Acetil-transacetilase
ATP	Adenosina trifosfato
ccf	Cromatografia em camada fina
CD36	<i>Cluster</i> de diferenciação 36
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CP	Cancro da próstata
CPRC	Cancro da próstata resistente à castração
CPTI	Carnitina acil-transferase I
CPTII	Carnitina acil-transferase II
CS	Citrato sintase
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
DHT	Di-hidrotestosterona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	Dimetilsulfóxido hexadeuterado
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ECACC	European Collection of Authenticated Cell Cultures
EMA	Do inglês, <i>European Medicines Agency</i>
ESI	Do inglês, <i>electrospray ionization</i>
F-1,6-P	Frutose 1,6-bifosfatase
F-6-P	Frutose-6-fosfato
FA	Do inglês, <i>Fatty Acids</i>
FAES	Sistema de alongamento de ácidos gordos
FASN	Do inglês, <i>Fatty acid synthase</i>
FBS	Soro fetal bovino
FDA	Do inglês, <i>Food and Drug Administration</i>
FSH	Do inglês, <i>Follicle-stimulating hormone</i>
FTIR	Do inglês, <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>

G3P	<i>D</i> -gliceraldeído-3-fosfato
G-6-P	Glicose-6-fosfato
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GAPD	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GDH	Do inglês, <i>Glutamate Dehydrogenase</i>
GHBG	Do inglês, <i>Sex Hormone Binding Globulin</i>
GLS	Glutaminase
GLUT	Do inglês, <i>Glucose Transporter</i>
GnRH	Do inglês, <i>Gonadotropin-releasing hormone</i>
HBP	Hiperplasia benigna da próstata
HIF-1	Do inglês, <i>Hypoxia-Inducible Factor</i>
HQ	Hexoquinase
HRMS	Do inglês, high-resolution mass spectrometry
HSL	Lipase sensível a hormonas
IC <sub>50</sub>	Metade da concentração inibitória máxima
IDH	Índice de desenvolvimento humano
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LDH	Do inglês, <i>Lactate Dehydrogenase</i>
LH	Do inglês, <i>Luteinizing hormone</i>
LKB1	Quinase hepática B1
IPSA	PSA livre
m	Múltiplo
MAT	Malonil-transacetilase
MCT	Do inglês, <i>Monocarboxylate transporters</i>
mTOR	Do inglês, <i>mammalian target of rapamycin</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida
NDA	Do inglês, <i>New drug application</i>
nH	Intensidade relativa
OXPHOS	Do inglês, <i>Oxidative Phosphorylation</i>
p	Quinteto
p.f	Pontos de fusão
PAP	Fosfatase ácida prostática humana
PCa	Do inglês, <i>Prostate Cancer</i>
PCA3	Do inglês, <i>Prostate cancer antigen 3</i>
PDH	Do inglês, <i>Piruvate Dehydrogenase</i>
PDHA	Fosfato de dihidroxiacetona
PDQ	Piruvato desidrogenase quinase
PEP	Fosfofenolpiruvato
PFQ-1	Fosfofrutoquinase-1
PGI	Fosfoglicose isomerase
PGM	Fosfoglicerato mutase
PGQ	Fosfoglicerato quinase
Phi	Exame do Índice de saúde da próstata
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PIN	Do inglês, <i>Prostatic Intraepithelial Neoplasia</i>
PIP2	Fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
PIP3	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato
ppm	Partes por milhão

proPSA	Isoforma de PSA (proenzima com dois aminoácidos residuais)
PSA	Do inglês, <i>Prostate-specific antigen</i>
<i>PTEN</i>	Do inglês, <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
q	Quarteto
QSAR	Do inglês, <i>Quantitative structure-activity relationship</i>
RMN <sup>13</sup> C	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN <sup>1</sup> H	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton
ROS	Do inglês, <i>Reactive oxygen species</i>
s	Singleto
SCO2	Citocromo c oxidase 2
SD	Do inglês, <i>Standard deviation</i>
shRNA	Shortpin RNA
SSO	Do inglês, <i>sulfosuccinimidyl oleate</i>
t	Tripleto
TIGAR	Regulador de glicólise e apoptose induzida por TP53
TPA	Terapia de privação androgénica
TPI	Triose-fosfato isomerase
tPSA	PSA total
TR	Exame de toque retal
TRUS	Do inglês, <i>Transrectal ultrasound</i>
ZC	Zona central
ZEFA	Zona do estroma fibromuscular anterior
ZP	Zona periférica
ZT	Zona de transição
α-KG	α-cetoglutarato
δ	Desvio-químico
η	Rendimento reacional
ν <sub>máx</sub>	Frequência máxima de cada banda de absorção

**Folha em branco**

# Capítulo 1 – Introdução

O presente capítulo tem como objetivo inicial fazer uma breve introdução ao desenvolvimento de fármacos, e aos (tio)barbituratos funcionalizados em C5. Na secção 1.1 é referida sucintamente a história do desenvolvimento de fármacos desde a antiguidade até aos dias de hoje, e a descrição de estudos necessários nas diferentes fases de avaliação pré-clínica e clínica para posterior aprovação e comercialização. Na secção 1.2 são desenvolvidos alguns aspetos sobre a história, a importância e a relevância terapêutica dos barbituratos funcionalizados em C5.

Numa segunda parte da introdução, na secção 1.3, é feita uma breve contextualização da anatomia e fisiologia da próstata. Nas secções seguintes são efetuadas algumas reflexões sobre o conhecimento do que é o cancro da próstata e como se desenvolve e, posteriormente, são explorados com mais ênfase os detalhes da reprogramação metabólica existente no cancro da próstata e as vias envolvidas.

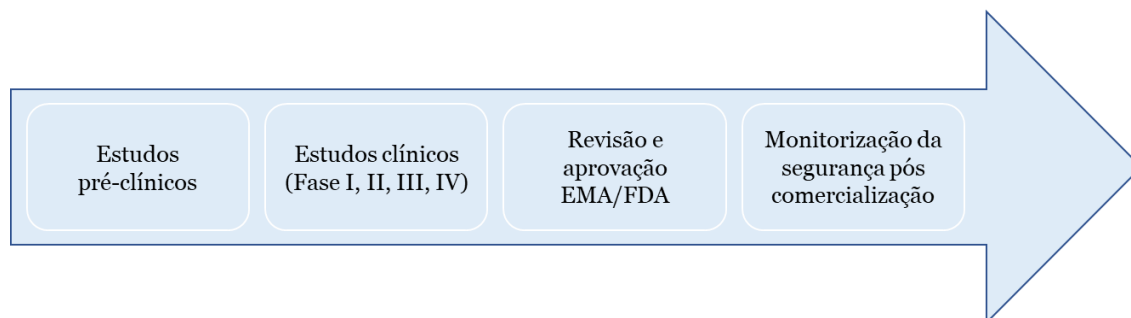
Numa terceira parte é sistematizado o conhecimento bioquímico da estrutura e função dos ácidos gordos como substratos no metabolismo lipídico e as vias metabólicas.

Por fim, faz-se uma análise final onde é conjugada toda a informação descrita até ao momento relacionada com o tema de investigação central da presente dissertação e as atividades desenvolvidas.

## **1.1 - A descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos**

A ideia de desenvolvimento de um novo fármaco, nomeadamente a partir de uma substância bioativa natural encontrada nos organismos terrestres e marinhos, geralmente, tem início aquando da descoberta de um alvo biológico disfuncional (ex.: recetor, enzima, proteína, gene). Este pode desencadear um processo patológico, sendo que se desenvolvem estudos com o intuito de conceber um método de interferência na atividade desse alvo biológico e, conseqüentemente, o melhoramento da qualidade de vida do paciente. Este desenvolvimento tem, frequentemente, a finalidade de conceber um novo fármaco ou então o melhoramento das soluções já presentes no mercado, em termos de eficiência, potência, segurança, tolerabilidade ou conveniência.<sup>1</sup>

Atualmente, a criação de um novo fármaco é um processo complexo e longo ao invés das abordagens mais clássicas. Nos tempos antigos, os princípios ativos eram extraídos principalmente de plantas, e o seu efeito terá sido determinado provavelmente através da observação da reação humana ou de outros animais à aplicação dos produtos que os continham.<sup>2</sup> Neste contexto e por exemplo, em 1694, o francês Pierre Pomet publicou o livro “*Histoire Générale des Drogues*”, onde descreveu as plantas e as suas propriedades, e ainda hoje, o seu livro é visto como referência.<sup>3</sup> Nos primórdios do que seria mais tarde a indústria farmacêutica moderna, por volta do século XIX, deu-se início ao isolamento e caracterização da estrutura de constituintes ativos dos produtos naturais, tornando possível a descoberta de cada vez mais princípios ativos, assim como a sua avaliação e síntese em larga escala.<sup>2</sup> Exemplos disso são: a morfina, um analgésico bastante comum nos dias de hoje e que é isolada da papoila do ópio<sup>4,5</sup>; a reserpina, um anti-hipertensivo isolado da planta *Rauwolfia serpentina*<sup>4,6</sup>; a efedrina, isolada em 1887, que serviu de base para o desenvolvimento de agentes antiasmáticos, como o salbutamol e salmeterol.<sup>4</sup> Na atualidade, para que haja a introdução de um novo fármaco no mercado são necessários, desde a identificação do alvo até a sua conceção, desenvolvimento, aprovação e comercialização, à cerca de 12 a 15anos, para além de um custo dispendioso (**Figura 1**).<sup>7</sup>



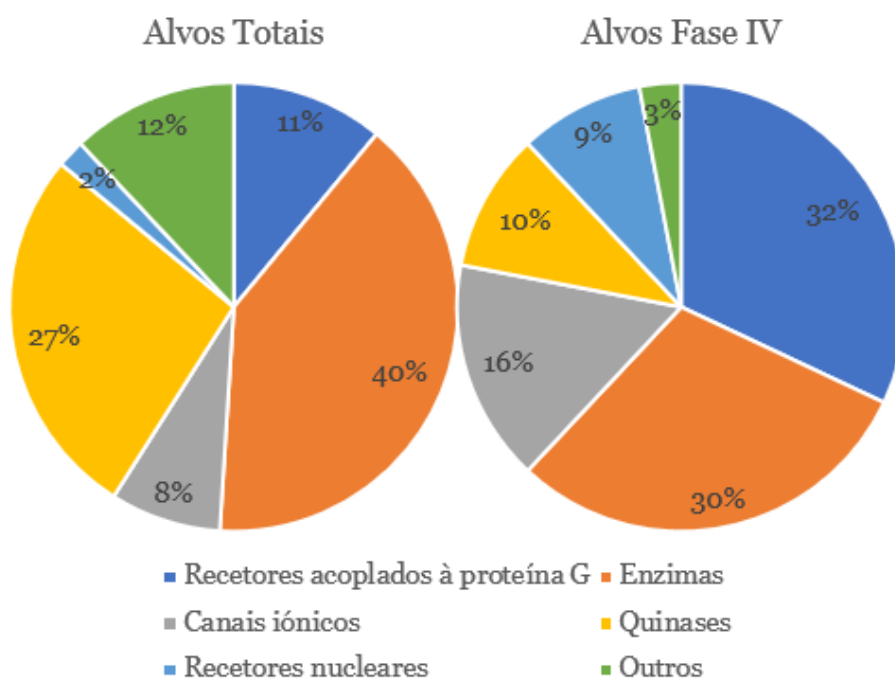
**Figura 1:** Estágios do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. EMA (do inglês, *European Medicines Agency*) e FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*).

Nos estudos pré-clínicos, como já referido brevemente acima, é importante o estudo e análise de uma patologia e as lacunas das técnicas terapêuticas já existentes. Seguidamente, é levantada uma hipótese e identificados e desenhados compostos com potencial interesse terapêutico. É essencial que se consiga suportar este conhecimento adquirido também através do uso de ferramentas computacionais para estudos *in silico*, designadamente por *docking* molecular e previsão de propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET). No *docking* molecular, a interação entre as moléculas e o alvo é prevista, e os resultados são frequentemente apresentados sob a forma de energia de ligação envolvida nesta interação. Portanto, a molécula que apresentar menor energia de ligação será aquela que terá maior afinidade

e facilidade de se ligar ao alvo. Já a previsão de propriedades ADMET permite identificar rapidamente propriedades farmacocinéticas relevantes e de toxicidade. O estudo de relações estrutura-atividade quantitativas (QSAR, do inglês *Quantitative structure-activity relationship*) também pode ser fundamental no desenvolvimento de novos fármacos. Assim, o uso de ferramentas computacionais é uma grande valia, permitindo fazer um *screening* geral *in silico*, fazendo-se uma primeira seleção de quais dos compostos idealizados serão potencialmente os mais eficazes para objetivo terapêutico pretendido. Para além disso, possibilita um aperfeiçoamento de certos compostos, e o descarte de outros não promissores, sem a necessidade de realizar experimentação *in vivo* e/ou *in vitro*.<sup>8,9</sup>

Depois de selecionados, otimizados e obtidos os compostos em questão, são realizados estudos *in vivo* e/ou *in vitro* em animais, órgãos, tecidos isolados, culturas celulares humanas ou de animais, culturas bacterianas, etc., de modo a obter dados relativos a aspetos farmacodinâmicos, sendo determinadas, por exemplo, relações dose-efeito, duração de ação e perfil de efeitos adversos. São também realizados estudos toxicológicos para verificar a segurança destes compostos, e estudos farmacocinéticos, para avaliação do modo de absorção, distribuição e formas de metabolização e de excreção. Os estudos clínicos são constituídos por um conjunto de ensaios em quatro fases executados em humanos. Na fase I, os ensaios são realizados num número reduzido de voluntários saudáveis, com a finalidade de confirmar a biodisponibilidade, toxicidade, e os efeitos do fármaco em função da dose. Na fase II, são selecionados um número reduzido de indivíduos doentes e elaborados ensaios de curta duração para verificar a eficácia e a toxicidade do fármaco. A fase III é constituída por ensaios semelhantes aos elaborados na fase II, mas neste caso serão ensaios com maior número de participantes e duração mais prolongada. Nesta fase é feita a comparação estatística dos resultados obtidos com os estudos com placebo e com o medicamento-controlo de atividade semelhante, o que permite estabelecer a menor dose eficaz e segura. Na fase IV, uma fase que depende da aprovação de entidades reguladoras como a EMA (do inglês, *European Medicines Agency*) e a FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*). A EMA e a FDA são organizações responsáveis pela supervisão e regulamentação de medicamentos em estudo para potencial aprovação e comercialização. Após a fase III, os responsáveis podem preencher e submeter um NDA (do inglês, *New drug application*), onde têm de estar descritos todos os resultados até à data, e a informação relevante para posterior revisão. Após aprovação, o medicamento pode ser comercializado, mas sempre sob supervisionamento, pois apesar de todos os passos rigorosos até este momento, a informação sobre a segurança deste medicamento

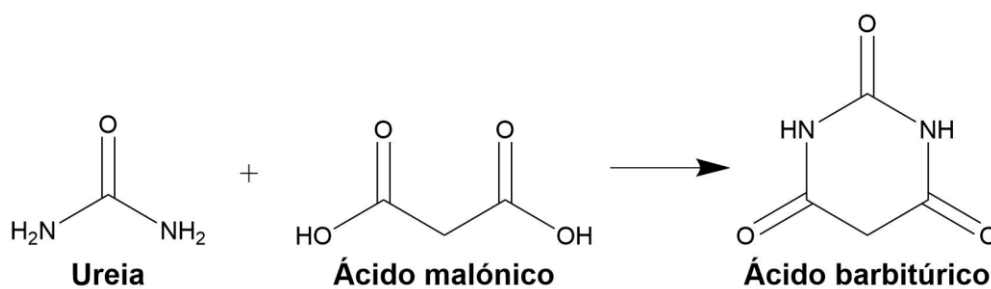
só pode ser totalmente entendida após meses ou até anos no mercado<sup>10,11</sup>. O esforço coletivo de empresas farmacêuticas durante décadas na seleção de alvos adequados, permitiu a identificação de frações do proteoma moduláveis, que se pensa ser constituído por volta de 600 a 1500 proteínas (**Figura 2**). Desta forma, tentativas de desenvolvimento de novos fármacos com suporte genómico e proteómico tendem a obter maiores taxas de sucesso.<sup>12</sup>



**Figura 2:** Classes de alvos terapêuticos. Adaptado de Folis.<sup>12</sup>

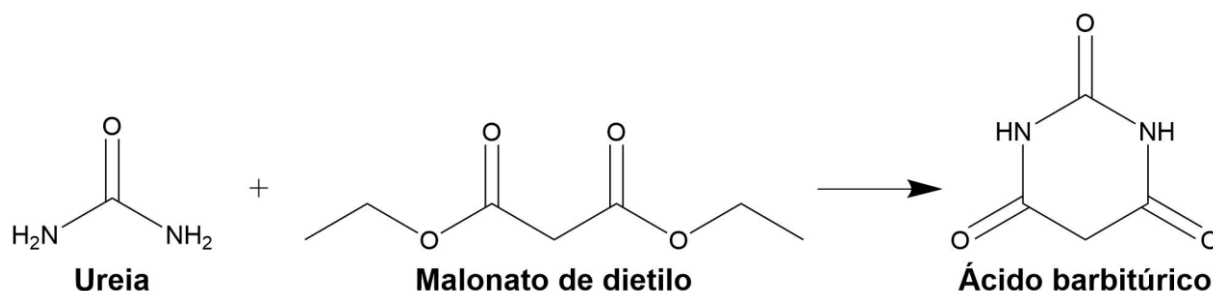
## 1.2 – (Tio)barbituratos

Sintetizado pela primeira vez em 1864 pelo químico alemão Adolf Von Baeyer, prémio Nobel da Química em 1905, o ácido barbitúrico foi obtido através da condensação da ureia com ácido malónico (**Esquema 1**).<sup>13</sup>



**Esquema 1:** Síntese de ácido barbitúrico em 1864. Adaptado de López-muñoz *et al.*<sup>13</sup>

Desde então, várias outras metodologias foram desenvolvidas para o melhoramento da reação original. Assim, a reação mais adotada nos dias de hoje para a síntese de ácido barbitúrico passa pela condensação do malonato de dietilo com a ureia, na presença de etóxido de sódio em etanol anidro, para promover a reação e o aumento do rendimento (**Esquema 2**).<sup>14</sup>

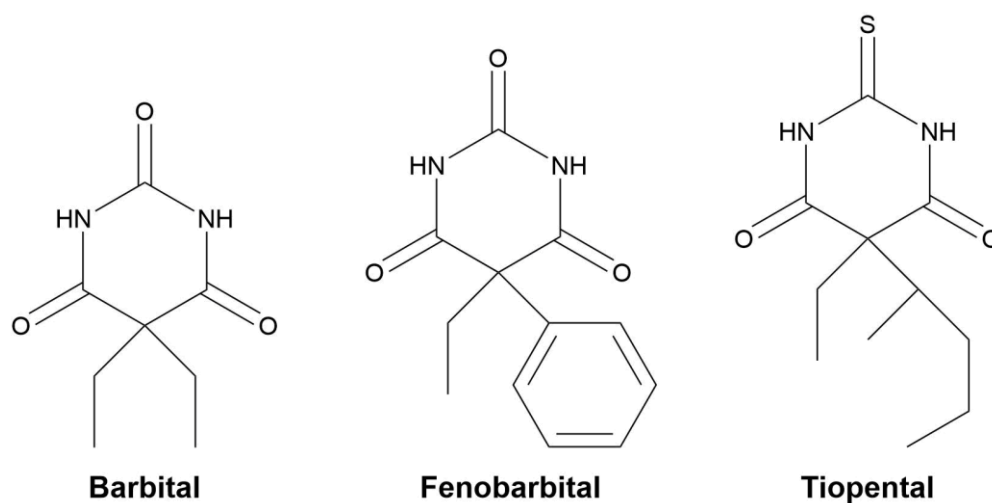


**Esquema 2:** Síntese de ácido barbitúrico a partir da ureia e malonato de dietilo. Adaptado de S. Furniss *et al.*<sup>14</sup>

A síntese do ácido barbitúrico e de compostos análogos desencadeou uma série de descobertas de compostos deste grupo com aplicações medicinais. Pelo menos até meados do século XX, por meio de pequenas modificações à estrutura química da molécula original, foram descobertos e sintetizados cerca de 2500 novos compostos deste grupo, sendo alguns deles mais tarde descritos pelas suas capacidades sedativo-hipnóticas, anestésicas e anticonvulsivantes.<sup>13,15</sup> O principal mecanismo de ação dos barbituratos é a inibição de vias neuronais no sistema nervoso central por estímulo de recetores do neurotransmissor inibitório ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA, do inglês, *Gamma-aminobutyric acid*). Quando o GABA se liga ao recetor GABA<sub>A</sub>, este canal iônico abre-se e dá-se o influxo de iões cloreto para o neurónio. Consequentemente, há uma hiperpolarização, ou seja, um aumento da carga negativa no interior celular e alteração da voltagem nas células cerebrais, tornando-as menos capazes de despolarização e transmissão de impulsos nervosos.<sup>16,17</sup>

A introdução de barbituratos em uso clínico deu-se em 1904, quando o ácido 5,5-dietil-barbitúrico, mais conhecido por barbital, ou Veronal (nome comercial) (**Figura 3**), foi lançado no mercado, permitindo a pacientes com distúrbios psiquiátricos e neurológicos intratáveis na época pudessem receber um tratamento farmacológico.<sup>13</sup> Subsequentemente, deu-se o desenvolvimento do fenobarbital, ou Luminal (nome comercial) (**Figura 3**), em 1911. Este composto teve maior sucesso no mercado que o seu antecessor, sendo ainda hoje usado no tratamento da epilepsia.<sup>13,15,17</sup>

Para além das alterações da cadeia lateral da posição 5, modificações na posição 2 também deram origem a novos derivados, como é exemplo do tiopental (**Figura 3**).<sup>17</sup>



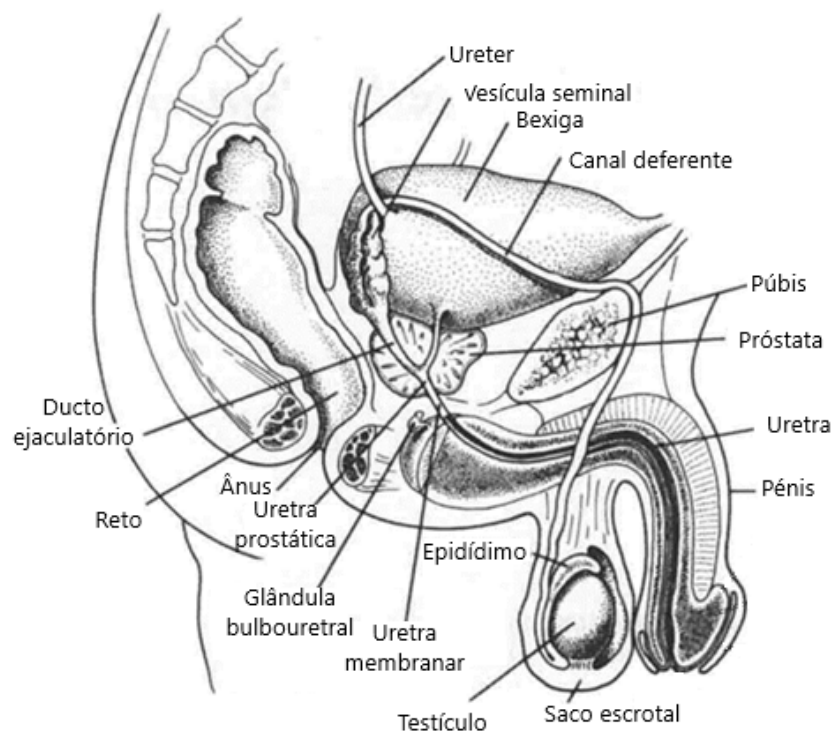
**Figura 3:** Exemplos de alguns compostos usados no séc. XX com ação farmacológica sedativo-hipnótica, anestésica e anticonvulsiva.

Além dos usos clássicos acima descritos, mais recentemente, os barbituratos têm vindo a ser objeto de estudo devido a novas aplicações terapêuticas. O ácido barbitúrico em si não tem atividade biológica, apenas demonstra propriedades farmacológicas caso contenha grupos ligados ao carbono na posição 5 (C5). Neste contexto, a presença de um grupo metileno ácido em C5 do ácido barbitúrico permite que esta molécula sofra facilmente reações de condensação, designadamente, com aldeídos. Os barbituratos são considerados compostos lipofílicos devido à sua estrutura principal, e esta propriedade é muito condicionada em função da natureza dos substituintes na posição 5. Neste âmbito, a lipofilia tende a aumentar proporcionalmente com o tamanho da cadeia carbonada em C5. Alguns estudos, como é o caso de Laxmi *et al*<sup>18</sup> e Xue *et al*,<sup>19</sup> já confirmaram a capacidade antitumoral de vários compostos derivados de barbituratos em células do cancro da próstata (CP).

Neste trabalho, a reação explorada foi a introdução de um grupo acilo de um ácido gordo em C5, sendo os compostos resultantes denominados por 5-acilbarbituratos. Num estudo anterior e semelhante a este constatou-se que o ácido gordo mais citotóxico foi o ácido esteárico.<sup>20</sup> Assim, neste trabalho, a reação de acilação do (tio)barbiturato fez-se com este ácido, combinando-se esta modificação com diferentes características estruturais em N1, C2 e N3, para verificar a sua influência na bioatividade destes compostos.

### 1.3 - Visão geral da anatomia e fisiologia da próstata

A próstata é a maior glândula acessória do trato reprodutor masculino tendo normalmente um peso de aproximadamente 20g e, num indivíduo saudável, é muitas vezes descrita como possuindo a forma e tamanho semelhantes aos de uma noz.<sup>21,22</sup> Anatomicamente, a próstata situa-se entre o diafragma pélvico e a cavidade peritoneal, posteriormente à porção inferior da sínfise púbica, abaixo da bexiga, anteriormente ao reto e em volta da porção proximal da uretra (uretra prostática) e dos dois ductos ejaculatórios (**Figura 4**).<sup>21,23</sup>

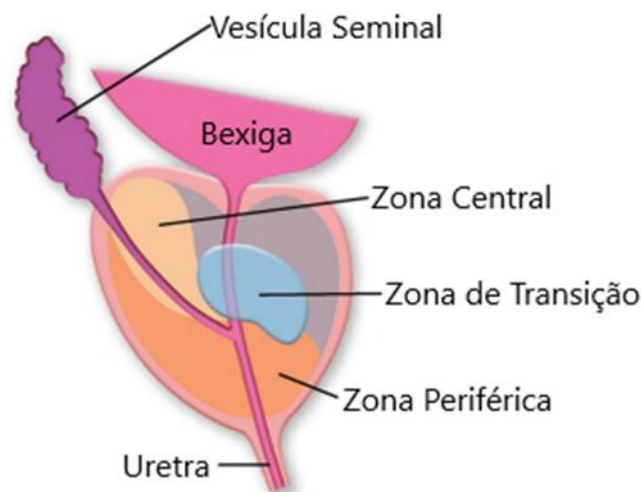


**Figura 4:** Representação esquemática de um corte sagital da cavidade pélvica masculina. Adaptado de Jones *et al.*<sup>24</sup>

Alguns modelos foram propostos ao longo dos anos para caracterizar a divisão anatômica da próstata mas o modelo atualmente adotado é o de McNeal, de 1981, que divide a próstata em quatro zonas distinguíveis ao nível da sua origem embriológica, histologia, funções biológicas e suscetibilidade a doenças (**Figura 5**): a zona periférica (ZP), que é constituída por cerca de 70% do tecido glandular prostático total, e por isso, a zona mais suscetível a carcinomas; a zona de transição (ZT), que representa 5% da próstata em jovens adultos, mas tende a aumentar devido ao envelhecimento, fenómeno chamado de hiperplasia benigna da próstata (HBP); a zona central (ZC),

constituída por cerca de 25% de todo o tecido prostático; e a zona do estroma fibromuscular anterior (ZEFA) que constitui o tecido não glandular formado por músculo e fibras.<sup>21,25</sup>

A próstata pode ser então descrita como um conjunto de diferentes tipos de componentes histológicos, incluindo a componente glandular de células epiteliais e a componente do estroma fibromuscular envolvente, formando algo semelhante a uma cápsula. As artérias ilíacas internas e plexos nervosos são responsáveis pelo suprimento das necessidades arteriais e nervosas, respetivamente. Ao nível celular, o epitélio prostático é constituído por quatro tipos de células: células epiteliais (na sua maioria são células luminais responsáveis pela produção de substâncias e secreções prostáticas, como o antígeno prostático específico (PSA, do inglês *Prostate-specific antigen*) que pode funcionar também como marcador para o cancro da próstata quando está em níveis elevados na corrente sanguínea), células estaminais, células basais e células neuroendócrinas (promovem o crescimento da próstata).<sup>23,25</sup>



**Figura 5:** Zonas da próstata. Adaptado de Wang *et al.*<sup>26</sup>

A homeostasia entre todos estes componentes descritos é fundamental para assegurar a atividade prostática, que é importante na constituição do sémen e na motilidade dos espermatozoides. As secreções prostáticas compõem até 33% do plasma seminal, e têm como papel fornecer glicoproteínas, nutrientes, enzimas de coagulação e fatores alcalinizantes, de modo a garantir a sustentabilidade das necessidades essenciais dos espermatozoides, e protegê-los do ambiente ácido do sistema reprodutor feminino, respetivamente. As células epiteliais da próstata produzem também outros fatores como ácido cítrico e enzimas proteolíticas necessárias para o bom funcionamento e sobrevivência do espermatozoide no sistema reprodutor masculino e feminino.<sup>24</sup>

## **1.4 - Notas gerais sobre o cancro da próstata**

### **1.4.1 - Epidemiologia**

Atualmente, o CP é o segundo cancro mais frequentemente diagnosticado na população masculina a nível mundial, e o quinto com maior taxa de mortalidade.<sup>27,28</sup> Dados do *Global Cancer Observatory*, relativos a 2020, mostram que cerca de 1,4 Milhões de homens foram diagnosticados com CP, enquanto que aproximadamente 375 mil destes acabaram por falecer, sendo esta doença mais predominante em zonas com maior índice de desenvolvimento humano (IDH), como a Oceânia, seguida pela América do Norte e depois Europa, e menos predominante na Ásia e Norte de Africa. Esta discrepância pode ser justificada pela prática frequente de realização de testes PSA que foi adotada maioritariamente em países desenvolvidos, a partir de 1990, o que permitiu um maior número de diagnósticos.<sup>28,29</sup> Para além disso, existe também uma associação entre as origens étnicas e a incidência de CP. De facto, homens com origens africanas e das Caraíbas têm maiores taxas de incidência e mortalidade de CP em comparação a pessoas de etnia caucasiana ou asiática.<sup>30</sup>

Em Portugal, no mesmo ano, foram contabilizados 6759 casos e 1917 mortes. Num estudo realizado em 2017, foram projetados os possíveis números relativos à incidência e mortalidade de CP em Portugal no ano de 2020 e anos seguintes. O conhecimento adquirido desde 1998 permitiu estabelecer uma previsão geral da incidência do cancro que estaria de acordo com uma tendência de aumento na ordem dos 1,8%/ano, com exceção da região norte que teve um decréscimo de 3,2%/ano. É de salientar também neste estudo o decréscimo das taxas gerais de incidência e mortalidade em 2,2%/ano desde 2006.<sup>31</sup> No entanto, nesta altura não se poderia prever o impacto da COVID-19, nomeadamente em relação ao funcionamento de estabelecimentos de saúde, o que resultou em atrasos no diagnóstico e tratamento que levaram a uma queda de curto prazo na incidência do CP, seguida por um aumento nos níveis da doença em estágio avançado e, consequentemente, da mortalidade.<sup>32,33</sup>

### **1.4.2 - Fatores de risco**

O CP é uma doença altamente heterogénea, cujas causas e fatores, apesar de não serem totalmente compreendidos podem ser separados em dois grupos, os fatores genéticos e os fatores epigenéticos. O fator mais impactante é a idade. De facto, o risco aumenta principalmente em homens após os 50 anos e a sua incidência tende a aumentar exponencialmente com o avançar da idade.<sup>27</sup> As origens étnicas podem também

contribuir para uma maior predisposição ao CP, como foi referido anteriormente, onde foi observado maior prevalência em homens com ascendência africana e das Caraíbas.<sup>30</sup>

Fatores genéticos podem favorecer o aumento do risco do CP, principalmente para homens com familiares próximos afetados pela doença. Neste contexto, o risco aumenta com a multiplicidade de familiares afetados e a sua prematuridade.<sup>34,35</sup> Alguns genes já foram identificados como potenciais intervenientes na suscetibilidade à doença como por exemplo *BRCA1*, *BRCA2*, *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *ATM* e *PMS2* que são responsáveis pela produção de proteínas reparadoras de ácido desoxirribonucleico (DNA) danificado, e *PTEN* (do inglês, *Phosphatase and tensin homolog*), *NKX3-1*, *CDKN1B*, que têm função supressora tumoral.<sup>36,37</sup>

O refluxo urinário pode causar irritações que levam à inflamação da próstata e, conseqüentemente, ao desenvolvimento do CP. Infecções urinárias derivadas de microrganismos como a *Escherichia coli* e *Cutibacterium acnes*, e infecções transmitidas pela atividade sexual por microrganismos como a *Neisseria gonorrhoeae* e *Chlamydia trachomatis*, podem também desencadear inflamação.<sup>38</sup> A migração de macrófagos para estas zonas e a libertação de espécies reativas de oxigénio (ROS, do inglês, *Reactive oxygen species*) por estes, têm a função de auxiliar a eliminação dos agentes patogénicos. Porém, em casos em que existe défice de mecanismos de defesa celular, como atividade de enzimas antioxidantes, alterações nos mecanismos de reparação do DNA e resistência à apoptose, pode haver um excesso de stress oxidativo que provoca dano no DNA e proliferação exacerbada de DNA substituto, que quando subjogado às mesmas condições adversas de stress oxidativo pode levar a uma acumulação de mutações.<sup>39</sup>

Por fim, a dieta e o estilo de vida podem também ser impactantes na formação do CP. Uma dieta rica em calorias, gorduras saturadas e trans, e hidratos de carbono refinados está associada ao aumento do risco de CP. Por outro lado, a escolha preferencial de vegetais, frutas, peixes e produtos integrais, podem exercer efeitos terapêuticos. A obesidade e atividade física também estão correlacionadas, assim como o consumo de álcool e o tabagismo.<sup>40</sup>

### **1.4.3 - Diagnóstico**

O CP pode ser assintomático nos estágios iniciais da doença. Porém, os doentes podem manifestar alguns sintomas obstrutivos, como fluxo urinário deficiente e, micção prolongada, retenção urinária parcial, noctúria e até disfunção erétil e hematuria.<sup>30,41</sup> O

CP é tradicionalmente diagnosticado através de um exame de toque retal (TR) juntamente com análise sanguínea do PSA, podendo fazer-se, se se justificar, uma biópsia guiada por ecografia transretal (TRUS, do inglês *Transrectal ultrasound*).<sup>42</sup> Porém, a palpação da próstata via exame TR tem as suas limitações e nem sempre comprova a existência de CP. Adicionalmente, grande parte dos pacientes com suspeita de CP devido à deteção dos níveis elevados de PSA não apresenta irregularidades ou nódulos na próstata.<sup>43</sup> O PSA é uma glicoproteína que é secretada pela próstata e depois eliminada durante a ejaculação, estando em níveis baixos na corrente sanguínea. Porém, quando a homeostase celular da próstata está comprometida, como acontece em casos de inflamação crónica ou cancro, o PSA passa em maiores quantidades para o estroma fibromuscular anterior e para a corrente sanguínea.<sup>44</sup> Quando os níveis plasmáticos de PSA são superiores a 4 ng/mL é considerada a hipótese de o paciente ter a doença.<sup>42</sup> Porém, este teste nem sempre é viável uma vez que níveis elevados deste podem derivar de HBP, que é frequente em homens com idade avançada, e é caracterizada pelo aumento do volume da próstata, e conseqüentemente compressão da uretra e bloqueio do fluxo urinário, causando infeções urinárias e inflamações.<sup>41</sup> O primeiro biomarcador sérico usado para diagnosticar o CP foi a fosfatase ácida prostática humana (PAP). Todavia, nos dias de hoje é quase sempre usado o marcador PSA, por ter uma eficiência maior que a PAP na avaliação de CP e HBP.<sup>45</sup> Para tentar colmatar as limitações destas análises, é importante o uso de testes serológicos complementares de rastreio antes de se partir para o exame TRUS. O exame do Índice de saúde da próstata (Phi) envolve uma fórmula matemática que combina os resultados de três análises ao sangue: PSA total (tPSA), PSA livre (IPSA) e proPSA, uma isoforma de PSA que é uma proenzima com dois aminoácidos residuais.<sup>42,46</sup> Uma alternativa a este é o exame ‘*4k score*’, em que, à semelhança do exame Phi, também se faz um cálculo com os padrões tPSA e IPSA, juntamente com a PSA intacta e a calicreína-2.<sup>42,47</sup> Podem também ser feitos testes de deteção do gene 3 do cancro da próstata (PCA3, do inglês, *Prostate cancer antigen 3*) que normalmente surge na urina em pacientes com CP.<sup>48</sup> De acordo com os resultados de rastreio, o médico pode aconselhar o uso de metodologias mais sofisticadas como a TRUS ou outras técnicas de imagiologia. No entanto, ainda existem preocupações relativamente ao uso de metodologias mais invasivas, pois ainda não é possível determinar com certeza a existência de CP com exames de rastreio, o que pode eventualmente levar a biópsias desnecessárias e a tratamentos capazes de causar efeitos colaterais indesejáveis.<sup>49</sup> Avanços recentes em tecnologias não invasivas, como a ressonância magnética, levaram a um aumento da sua prescrição em conjunto com exame TRUS. Apesar de as biópsias serem precisas, estas são demoradas, dispendiosas e limitadas a centros especializados.<sup>42</sup>

#### 1.4.4 - Principais abordagens terapêuticas em uso e em estudo

O tratamento do CP depende do estágio da doença. Tradicionalmente, num estágio inicial e dependendo da evolução da doença, cirurgia, radioterapia e terapia de privação androgénica (TPA) são os procedimentos terapêuticos padrão. Para os pacientes num estágio mais avançado de CP, quimioterapia citotóxica, radiofármacos e imunoterapia são usados.

A TPA baseia-se na redução dos níveis de androgénios através da orquiectomia (remoção cirúrgica testicular), ou do uso de fármacos, como antiandrogénios, inibidores da biossíntese de androgénios e agonistas e antagonistas do recetor da hormona libertadora de gonadotrofina (GnRH, do inglês, *Gonadotropin-releasing hormone*).<sup>50</sup>

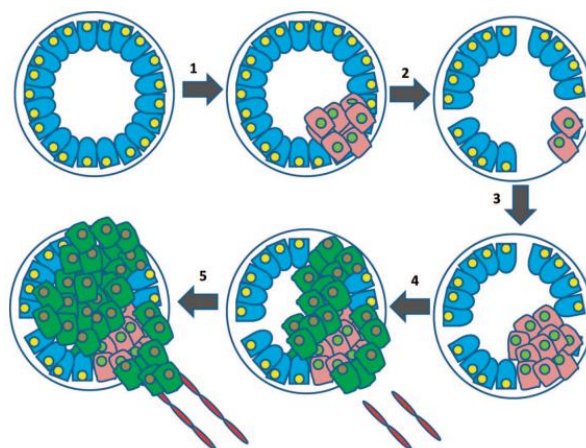
Os antiandrogénios, como a enzalutamida e a apalutamida, são antagonistas não esteroides do recetor de androgénios (AR, do inglês *androgen receptor*), e impedindo a ligação hormona-recetor ou a sua interação com o DNA e suprimindo assim os efeitos de estímulo do crescimento das células do CP pela testosterona e di-hidrotestosterona (DHT).<sup>50,51</sup> Os inibidores da biossíntese de androgénios, incluem o acetato de abiraterona, que inibe irreversivelmente a CYP17A1, uma 17- $\alpha$  hidroxilase e 17-20 liase da família do citocromo P450, que converte pregnanos em androstanos.<sup>50</sup> A GnRH é libertada pelo hipotálamo e estimula a hipófise a secretar as hormonas folículo estimulante (FSH, do inglês *Follicle-stimulating hormone*) e luteinizante (LH, do inglês, *Luteinizing Hormone*). A LH atua principalmente nas células de *Leydig* presentes nos testículos, estimulando-as a sintetizar testosterona, enquanto a FSH promove a espermatogénese via estimulação das células de Sertoli.<sup>24</sup> Agonistas da GnRH como a Goserrelina, Leuprorelina e Triptorelina, por interferência nos mecanismos de retroalimentação, inibem a produção de testosterona.<sup>52</sup> Antagonistas da GnRH como o Degarelix e Abarelix, bloqueiam a libertação de GnRH e consequentemente a secreção de LH que leva a uma diminuição dos níveis de testosterona.<sup>50,53</sup>

Na terapia citotóxica, os taxanos como Paclitaxel, Docetaxel e Cabazitaxel, são antimitóticos usados como inibidores da divisão celular e, consequentemente, da proliferação tumoral.<sup>54</sup> Como já referido acima, outros agentes são também usados, designadamente o Sipuleucel-T, um agente imunológico que estimula uma resposta imune contra a PAP, um antígeno expresso no CP.<sup>55</sup>

## 1.5 - Bases do desenvolvimento do cancro da próstata

Como já mencionado acima, a próstata pode sofrer inflamação que pode causar lesões e alterações morfológicas ao seu epitélio. O estágio inicial desta ocorrência é denominado como atrofia inflamatória proliferativa (AIP). Nesta condição, as células dividem-se rapidamente e sofrem mutações. A Neoplasia intraepitelial prostática (PIN, do inglês *Prostatic Intraepithelial Neoplasia*), que deriva do estado hiperproliferativo, caracteriza-se pela disrupção da camada basal e das células secretoras. Neste contexto, e resultante do desenvolvimento, as lesões *High-grade* PIN podem ser considerados como estágios precursores do CP.<sup>56,57</sup> O estágio inicial do desenvolvimento de CP é modulado por androgénios circulantes e, por isso, diz-se ser sensível aos androgénios. A testosterona circula no sangue acoplada a proteínas transportadoras como a globulina ligadora de hormonas sexuais (SHBG, do inglês *Sex Hormone Binding Globulin*) e a albumina. Quando a testosterona chega às células prostáticas, é convertida em DHT pela enzima 5 $\alpha$ -redutase. A DHT apresenta maior afinidade para o AR que para a testosterona.<sup>58,59</sup> Quando o AR está livre no citoplasma, encontra-se associado a proteínas de choque térmico e outras chaperonas. No momento em que os androgénios se ligam ao recetor, este altera a sua conformação por dissociação das chaperonas e sofre dimerização e translocação para o núcleo.<sup>59</sup> Os dímeros dos complexos hormona-recetor ligam-se aos elementos de resposta aos androgénios (ARE, do inglês *Androgen Responsive Elements*) nos genes-alvo clássicos dos androgénios e que, com a ajuda de proteínas co-reguladoras, permitem modular a transcrição génica por ação coativadora ou correpressora através da remodelação da cromatina e modificações das histonas. Assim, este mecanismo, por alteração do padrão de expressão genética é responsável por regular o proliferação e apoptose das células da próstata.<sup>59</sup>

Devido a esta dependência de androgénios, foram desenvolvidas TPA, as quais têm sido as modalidades clássicas de tratamento mais adotadas num estágio inicial do CP.<sup>60</sup> No entanto, ao longo da evolução do cancro, algumas células adaptam-se e adquirem resistência a um ambiente pobre em androgénios e mantêm o seu crescimento independentemente da administração da TPA. Este fenómeno resulta normalmente numa forma letal de CP chamada cancro da próstata resistente à castração (CPRC), para a qual a TPA se torna ineficiente (**Figura 6**).<sup>61</sup>



**Figura 6:** Fases de desenvolvimento do cancro da próstata: 1 - Processo carcinogénico começa em células que proliferam fora de controlo. 2 - Numa fase inicial de CP dependente de androgénios, a TPA é eficaz no combate ao desenvolvimento dos tumores. 3 - Algumas células adquirem resistência ao tratamento de TPA e continuam a proliferar. 4 - As células agora são totalmente independentes de androgénios circulantes, e as suas mutações resultam no aumento da angiogénese. 5 - Nesta fase o cancro prostático metastiza através da circulação sanguínea. Adaptado de Saraon *et al.*<sup>61</sup>

Existem várias vias que explicam a aquisição de resistência à TPA por parte das células cancerígenas:

- Via hipersensível: Baixos níveis de androgénios, devido à TPA, levam a que subconjuntos de células dentro deste microambiente desenvolvam resistência por aumento da síntese e da sensibilidade do AR. De facto, a amplificação do AR já foi documentada em cerca de 30% de pacientes após tratamento por TPA, enquanto que este fenómeno não foi evidenciado em tumores primários pré-ablação androgénica. Assim, células com elevada expressão do AR ganham a capacidade de proliferar ainda que com concentrações baixas de androgénios, e dando origem ao crescimento de células resistentes à castração. Alternativamente, mutações tumorais envolvendo a substituição de valina por leucina no codão 89 resultam no aumento da atividade da enzima 5 $\alpha$ -redutase e, conseqüentemente, nos níveis de DHT intraprostáticos, o que promove o crescimento tumoral apesar dos níveis baixos de testosterona circulante.<sup>62,63</sup>

- Via Promísqua: As substituições nas sequências de aminoácidos nas regiões codificantes do gene AR são observadas com menos frequência do que as amplificações do mesmo. Contudo, estas mutações diminuem a especificidade e seletividade do AR para os ligantes naturais, possibilitando a sua ativação por androgénios adrenais, progesterona, cortisol, cortisona, 17 $\beta$ -estradiol e, até por antagonistas de androgénios, como a hidroxiflutamida, bicalutamida e enzalutamida, permitindo a atividade de transcrição e desenvolvimento do CP.<sup>63,64</sup>

- Via *Outlaw*: É caracterizada pela ativação de AR na ausência da influência de androgénios, através de mecanismos independentes do ligante. Estudos já demonstraram que ligantes ativadores do recetor tirosina quinase, como o fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1, fator de crescimento de queratinócitos e fator de crescimento epidérmico, podem ativar o AR.<sup>64</sup>

- Via *Bypass*: A terapia de ablação de androgénios desencadeia uma resposta inflamatória por parte das células mortas. Fatores pró-inflamatórios produzidos por estas células influenciam linfócitos B a produzirem toxinas que promovem a sobrevivência das células cancerígenas independentemente da ativação do AR.<sup>64</sup>

- Via *Lurker cell*: Assume que existem inicialmente células cancerígenas independentes de androgénios (provavelmente células tumorais progenitoras CD44+/CD133+), que são selecionadas e proliferam mesmo após o início da TPA.<sup>65</sup>

## **1.6 - Alterações metabólicas no cancro da próstata**

A proliferação celular descontrolada é uma característica preponderante no desenvolvimento de tumores, no que o CP não é exceção. Em 1920, Otto Warburg observou que as células tumorais exibem um grande aumento da absorção e consumo de glicose traduzido na produção de lactato por via anaeróbica, o que acontece mesmo em situações aeróbicas, em detrimento da oxidação do piruvato resultante da glicólise por da via de fosforilação oxidativa mitocondrial (OXPHOS, do inglês *Oxidative Phosphorylation*), fenómeno a que se chamou efeito Warburg. Assim, pôde-se concluir que as células cancerígenas têm a capacidade de reprogramar o seu metabolismo glicolítico a vias alternativas, de modo a suprir as suas necessidades energéticas. O uso desta via glicolítica é energeticamente desfavorável em termos de adenosina trifosfato (ATP) produzido, mas fornece às células cancerígenas precursores que auxiliam a proliferação e assim, fornecem uma vantagem seletiva para se adaptarem e prosperarem em ambientes hostis.<sup>66-68</sup>

O metabolismo celular envolve processos bioquímicos complexos através dos quais nutrientes específicos são consumidos. Hidratos de carbonos, AG e aminoácidos são a principal fonte de nutrientes para a homeostase energética e síntese macromolecular. Eles são o principal constituinte das principais vias metabólicas que podem ser classificadas como anabólicas ou catabólicas.<sup>67</sup>

A glicólise envolve uma série de reações que culminam na síntese de duas moléculas de piruvato. Esta ocorre no citoplasma das células e pode ser dividida em duas fases, a fase que requer energia e a fase que gera energia, e pode ser descrita em vários passos. As proteínas GLUT1 e GLUT3 são as principais isoformas de transportadores de glicose (GLUT, do inglês *Glucose Transporter*) associadas a células cancerígenas, as quais dão início à via glicolítica através do transporte de glicose para o interior da célula.<sup>68</sup> Depois, a glicose é fosforilada em glicose-6-fosfato (G-6-P) através de uma molécula de ATP, pela ação da enzima hexoquinase (HQ). A G-6-P é convertida, numa reação reversível, em frutose-6-fosfato (F-6-P), pela ação da enzima fosfoglicose isomerase (PGI). A F-6-P, por sua vez, é fosforilada em frutose 1,6-bifosfato (F-1,6-P), através da ação da enzima fosfofrutoquinase-1 (PFQ-1). Através da enzima aldolase, dá-se a clivagem da F-1,6-P em dois isómeros, o *D*-gliceraldeído-3-fosfato (G3P) e a fosfato de dihidroxiacetona (PDHA). A molécula de PDHA é convertida pela enzima triose-fosfato isomerase (TPI) numa segunda molécula de G3P.<sup>69</sup>

A segunda etapa glicolítica é caracterizada pela geração de ATP. Nesta, uma molécula de G3P é oxidada pela enzima gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPD) a *D*-1,3-bisfosfoglicerato (1,3BPG). Um dos grupos fosfato de 1,3BPG é transferido para uma molécula de adenosina difosfato (ADP) pela enzima fosfoglicerato quinase (PGQ), formando-se uma molécula de 3-fosfoglicerato (3PG), e gera-se uma molécula de ATP. A 3PG é depois isomerizada pela enzima fosfoglicerato mutase (PGM) em 2-fosfoglicerato (2PG), a qual é desidratada em fosfofenolpiruvato (PEP). Através da enzima piruvato quinase, o PEP perde o seu fosfato que será doado a uma segunda molécula de ADP para formar ATP e piruvato.<sup>69</sup>

O piruvato sintetizado pode seguir várias vias metabólicas. Em células cancerígenas, o piruvato é convertido preferencialmente em lactato pela lactato desidrogenase (LDH, do inglês *Lactate Dehydrogenase*). Dentro da célula, condições alcalinas são essenciais para manter a proliferação através da glicólise e, por isso, o lactato produzido em excesso pode ser tóxico e tem de ser exportado para o espaço extracelular por transportadores de monocarboxilatos (MCT, do inglês *Monocarboxylate transporters*). Isto contribui para a acidificação do microambiente envolvente, o que promove a angiogénese e a metastização.<sup>70,71</sup> Na via aeróbica, o piruvato pode ser convertido em acetilcoenzima A (Ac-CoA) na mitocôndria através da enzima piruvato desidrogenase (PDH, do inglês *Piruvate Dehydrogenase*) e originar mais energia sobre a forma de ATP. A Ac-CoA pode também ser convertida em citrato pela citrato sintase (CS), que iniciará o ciclo de Krebs e gerar mais energia ou então auxiliar a síntese de AG.<sup>69</sup>

A glutamina circulante é convertida em glutamato pela glutaminase (GLS). O glutamato é depois convertido pelo glutamato desidrogenase (GDH, do inglês *Glutamate Dehydrogenase*) num precursor do ciclo de Krebs, o  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG). Esta via pode também produzir Ac-CoA por carboxilação do  $\alpha$ -KG em citrato, e depois a clivagem do citrato em Ac-CoA.<sup>72</sup> A via da glutamina tem o propósito de auxiliar a síntese de ácidos gordos. Estes são essenciais para as células cancerígenas na biossíntese de novas membranas.<sup>73</sup>

Como já referido antes, os androgénios e os seus recetores são determinantes no processo de desenvolvimento do CP. Após a ativação do AR, este tem a capacidade de controlar proteínas e genes responsáveis pela regulação da proliferação. Inúmeros estudos têm demonstrado a relação destes genes com vias de sinalização responsáveis pelas adaptações metabólicas de células cancerígenas,<sup>74</sup> apontando os androgénios como importantes reguladores metabólicos envolvidos na progressão do CP.<sup>75,76</sup>

- Via de sinalização fosfoinositídeo 3-quinase (PI3K): Normalmente, esta via é ativada quando genes supressores de tumor, como o *PTEN*, sofrem deleções por mutações. A via PI3K, quando ativada, provoca a fosforilação do fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP<sub>2</sub>) presente na membrana em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP<sub>3</sub>). O *PTEN* inibe a sinalização PI3K por conversão do PIP<sub>3</sub> de volta a PIP<sub>2</sub>.<sup>77</sup> PIP<sub>3</sub> tem a capacidade de ativar a proteína quinase B (AKT) que regula e estimula o influxo de glicose na célula e enzimas glicolíticas a produzirem ATP, de modo a certificar que as células têm o essencial para sua proliferação e sobrevivência.<sup>78</sup> Para além disso, a ativação da AKT também estimula a proteína alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR, do inglês *mammalian target of rapamycin*) que ativa a sintase de ácidos gordos (FASN, do inglês *Fatty acid synthase*) e, conseqüentemente, a síntese de AG.<sup>79</sup>

- Vias dependentes da sinalização pelo fator induzível por hipóxia-1 (HIF-1, do inglês *Hypoxia-Inducible Factor*) e MYC: Em condições fisiológicas o suprimento das necessidades de oxigénio é bem regulado, mas, em situações patológicas a disponibilidade de oxigénio proveniente do sangue para as células cancerígenas em elevada proliferação pode ser limitada. Assim, as células tumorais sobrevivem por adaptação às baixas concentrações de oxigénio ou por aumento da vascularização, ou ambos.<sup>80</sup> Sob baixos níveis de oxigénio, o HIF-1 estimula a expressão de reguladores do metabolismo glicolítico, como os GLUT1 e GLUT3, as enzimas HQ e LDH.<sup>81</sup> Para além disso, o HIF-1 ativa a piruvato desidrogenase quinase (PDQ) que inativa a PDH e, conseqüentemente, a conversão do piruvato em Ac-CoA na mitocôndria, reforçando a dependência do metabolismo glicolítico.<sup>82</sup> Assim, a hipoxia é caracterizada pela

instabilidade genética, angiogénese e resistência a tratamentos.<sup>80</sup> O MYC também é expresso em células cancerígenas e é importante na progressão do CP, pois promove o metabolismo da glutamina e dos lípidos.<sup>83</sup>

- A proteína quinase ativada por AMP (AMPK, do inglês *AMP-activated protein kinase*) é um sensor dos níveis de nucleotídeos de adenosina intracelular e é ativado quando existe o aumento do desequilíbrio da relação entre as concentrações de adenosina monofosfato (AMP) e ATP. Em resposta a este fenómeno, a AMPK promove vias catabólicas para gerar mais ATP e inibe as vias anabólicas que consomem ATP.<sup>84,85</sup> A quinase hepática B1 (LKB1) é uma supressora de tumor que fosforila e ativa a AMPK em caso de défice metabólico, regulando assim negativamente a proliferação e metabolismo da glicose e lípidos das células cancerígenas. Mutações ao nível da LKB1 provocam a desregulação desta via e, conseqüentemente, suportam a via HIF-1 e mTOR na produção de energia via metabolismo glicolítico e lipídico.<sup>85</sup>

- A p53 é uma proteína supressora de tumores que responde ao stress celular e ativa a transcrição de genes que levam à reconstrução da célula danificada ou à sua eliminação por apoptose. A p53 é também um regulador metabólico, uma vez que ativa a expressão de HQ e, conseqüentemente, a síntese de G-6-P. No entanto, também estimula o regulador de glicólise e apoptose induzida por TP53 (TIGAR), que diminui a expressão de F-2,6-P e os níveis de ROS, protegendo assim as células da apoptose derivada do stress oxidativo.<sup>86,87</sup> Por outro lado, a p53 pode também promover a fosforilação oxidativa por ativação do citocromo c oxidase 2 (SCO2), ou ativação de *PTEN*, inibindo a via PI3K.<sup>87</sup> Assim, nas situações onde existe a perda de função da p53, a replicação irrefreável do DNA danificado conduz a uma alta taxa de mutações e a uma produção de células que tendem a tornar-se cancerígenas e o TIGAR não é regulado e a glicólise aumenta.<sup>86-88</sup>

## **1.7 - Metabolismo dos ácidos gordos**

Os lípidos podem ser divididos em oito categorias principais e podem ser segmentados em classes e subclasses: AG, glicerolípidos, glicerofosfolípidos, esfingolípidos (glicerofosfolípidos e alguns esfingolípidos pertencem ao grupo dos fosfolípidos), sacarolípidos e policetídeos, esteróides e terpenos. Estes compostos têm funções biológicas importantes, como a atuação como componentes estruturais das membranas celulares, fornecimento e armazenamento de energia, síntese hormonal e participação em vias de sinalização.<sup>89</sup> Eles são apolares, visto que são formados principalmente por ligações carbono-hidrogénio, o que lhes confere uma característica hidrofóbica, ou seja,

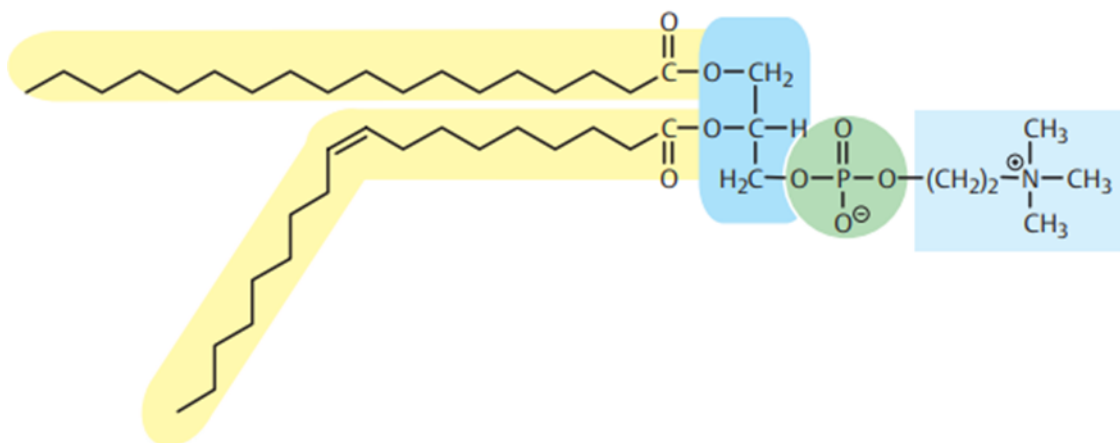
não se dissolvem em água, mas sim dissolvem preferencialmente em solventes orgânicos. Os triglicerídeos são usados primordialmente para o armazenamento de energia e os fosfolípidos constituem a membrana celular.<sup>89,90,91</sup> Dentro do grupo dos lípidos, os AG constituem um foco importante da presente dissertação e são desenvolvidos nas subsecções seguintes.

### **1.7.1 - Caracterização físico-química e nomenclatura dos ácidos**

Os AG são constituídos por cadeias longas de hidrocarbonetos que contêm um grupo metilo (CH<sub>3</sub>) numa extremidade e um ácido carboxílico (-COOH) na outra extremidade, o qual lhes confere alguma polaridade. A sua nomenclatura tem por base o comprimento, o grau de saturação, e a posição e configuração das ligações duplas na sua cadeia. Quando a cadeia de hidrocarbonetos não apresenta ligações duplas entre os seus carbonos, o ácido gordo diz-se ser saturado. No caso de haver uma ou mais ligações covalentes duplas, o ácido gordo denomina-se por insaturado ou poli-insaturado respetivamente. A dupla ligação do AG pode ter duas configurações, a configuração *cis* e a configuração *trans*. A configuração *cis* acontece quando a cadeia de carbonos está do mesmo lado da ligação covalente planar, causando o seu dobramento. Como resultado, estes ácidos gordos não se conseguem compactar firmemente e, portanto, tendem a estar sob a forma de óleo à temperatura ambiente. Por outro lado, na configuração *trans*, a cadeia de carbonos está em lados opostos, sendo que a cadeia é linear e compacta, e pelo que à temperatura ambiente é favorecido o estado sólido.<sup>90,91</sup>

Outras biomoléculas importantes no organismo que contêm AG são os triglicerídeos e os fosfolípidos. Os triglicerídeos são formados por uma molécula de glicerol e três moléculas de ácidos gordos. O glicerol é um composto orgânico com 3 carbonos e 3 grupos hidroxilo (OH). Cada ácido gordo liga a um dos 3 grupos hidroxilo do glicerol formando uma ligação éster. Os triglicerídeos são mais apolares já que na sua biossíntese o ácido carboxílico passa a existir na forma de éster. No entanto, por hidrólise forma-se novamente a molécula de glicerol e os AG.<sup>90,91</sup>

Por seu lado, os fosfolipídios são compostos por um grupo fosfato, uma molécula de glicerol, e duas cadeias de ácidos gordos, um saturado e outro insaturado. Eles têm uma cabeça polar e dois caudas apolares, conferindo uma característica útil de segmentação de espaços na bicamada fosfolipídica. A formação de um glicerofosfolípido dá-se quando ao grupo fosfato se liga uma molécula polar, como por exemplo a colina (**Figura 7**).<sup>90,91</sup>

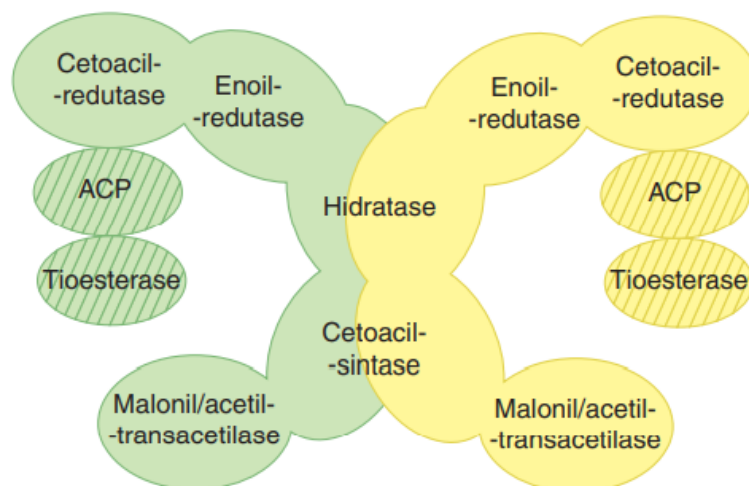


**Figura 7:** Representação de um glicerofosfolípido. Da esquerda para a direita: Dois ácidos gordos, um saturado e um monoinsaturado (de cima para baixo); glicerol; grupo fosfato e grupo colina. Adaptado de Koolman *et al.*<sup>90</sup>

### 1.7.2 - Biossíntese de ácidos gordos

O glicogénio e os triglicerídeos são as duas principais formas de armazenamento de energia no corpo. Os triglicerídeos conseguem fornecer maior quantidade de energia, por isso, o corpo humano recorre a estes para armazenar energia de forma mais eficiente. Por seu lado, o glicogénio é usado como uma importante fonte de energia do cérebro.<sup>92,93</sup> Como já referido, os triglicerídeos são moléculas hidrofóbicas compostas por um esqueleto de glicerol e três ácidos gordos. Os hidratos de carbono ou proteínas ingeridos fornecem a glicose e os aminoácidos que podem ser transformados na mitocôndria em Ac-CoA, material de partida para a biossíntese de ácidos gordos. A síntese de novo ocorre no citoplasma das células do fígado ou do tecido adiposo, mas a Ac-CoA que é produzida na mitocôndria é incapaz de atravessar a sua membrana para o citoplasma. Assim, a citrato sintase combina Ac-CoA e oxaloacetato para formar citrato, que consegue mover-se para citoplasma. Aqui, a ATP citrato liase (ACL<sub>Y</sub>) reverte a reação anterior e forma novamente a Ac-CoA e o oxaloacetato. Cada molécula de Ac-CoA contém dois carbonos, e para criar um ácido gordo saturado de 16 carbonos, 2 carbonos são adicionados de cada vez a partir de malonil-CoA para construir a cadeia.<sup>94,95</sup> Para formar uma molécula de malonil-CoA, um grupo carboxilato de carboxibiotina é doado a uma molécula de Ac-CoA por ação da enzima Ac-CoA carboxilase (ACC) e um ATP. A ACC representa a etapa limitante da síntese de ácidos gordos. Esta enzima é inibida pelo glucagon, epinefrina, ácido palmítico e a via AMPK, e é ativada pela insulina e citrato. A FASN permite a síntese de ácidos gordos através de moléculas de Ac-CoA e malonil-CoA. A FASN funciona como um dímero onde cada subunidade idêntica contém sete domínios catalíticos. FASN tem dois compartimentos

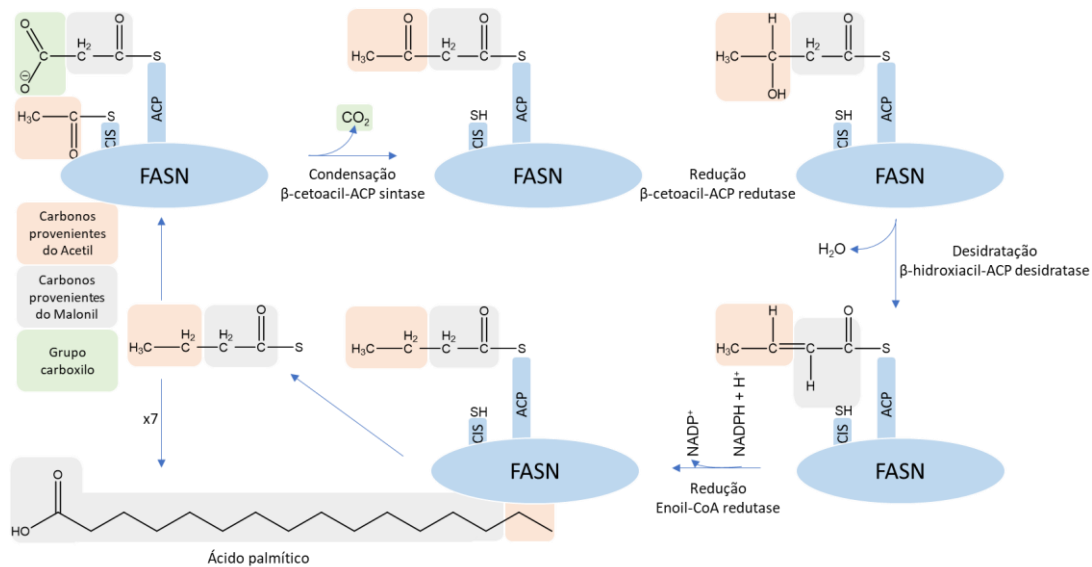
principais, onde reações de transferência e condensação ocorrem no compartimento inferior, enquanto que as modificações da cadeia em crescimento ocorrem no compartimento superior. A proteína transportadora de acilo (ACP) e tioesterase estão associadas a este complexo. A ACP é constituída por um grupo fosfopanteteína (vitamina B5) e a tioesterase é constituída por um grupo cisteína (**Figura 8**).<sup>95,96</sup>



**Figura 8:** Complexo multienzimático da FASN. O complexo é um dímero constituído de dois monómeros polipeptídicos idênticos, em que seis enzimas e a proteína transportadora de acilo (ACP) estão ligadas na estrutura primária da sequência ilustrada. Adaptado de Murray *et al.*<sup>96</sup>

O processo de síntese de novo (**Figura 9**) começa com a enzima acetil-transacetilase (AT) que liga o primeiro Ac-CoA à ACP e liberta a CoA. Em seguida, os dois carbonos remanescentes são transferidos para o grupo cisteína por ação da acil-transacetilase, deixando ACP livre. Pela ação da enzima malonil-transacetilase (MAT), a malonil-CoA liga-se a ACP e liberta CoA. Os dois carbonos originários da Ac-CoA são transferidos e condensados com os carbonos do malonilo presentes na ACP pela enzima cetoacil sintase, por uma reação de descarboxilação do malonilo, formando acetocetilo. Esta molécula resultante precisa de ser transformada numa cadeia de hidrocarbonetos saturada por um conjunto de reações de desidratação e redução. A enzima  $\beta$ -cetoacil-ACP-redutase reduz o grupo carbonilo num grupo hidroxilo por ação de eletrões doados pela nicotinamida adenina dinucleótido fosfato na forma reduzida (NADPH), formando  $\beta$ -hidroxibutirilo. Este composto sofre a ação da  $\beta$ -hidroxiacil-ACP-desidratase que remove uma molécula de água e cria um grupo enoil, que contém uma ligação dupla entre os dois carbonos, formando crotonilo. A enzima enoil-redutase reduz a ligação dupla a uma ligação simples por ação de NADPH, formando Butirilo. A cadeia saturada com 4 carbonos resultante é transferida pela acil-transacetilase para o grupo cisteína libertando a ACP que agora pode receber outra molécula de malonil-CoA e repetir o ciclo até ser sintetizado um ácido gordo de 16 carbonos. No fim deste ciclo, a

tioesterase cliva e liberta o ácido palmítico da FASN. Para completar este processo, são necessárias 8 moléculas de Ac-CoA, 1 para iniciar a cadeia e outros 7 para gerar malonil-CoA, 14 NADPH e 7 ATP. <sup>95,96</sup>



**Figura 9:** Síntese de ácidos gordos através da FASN.

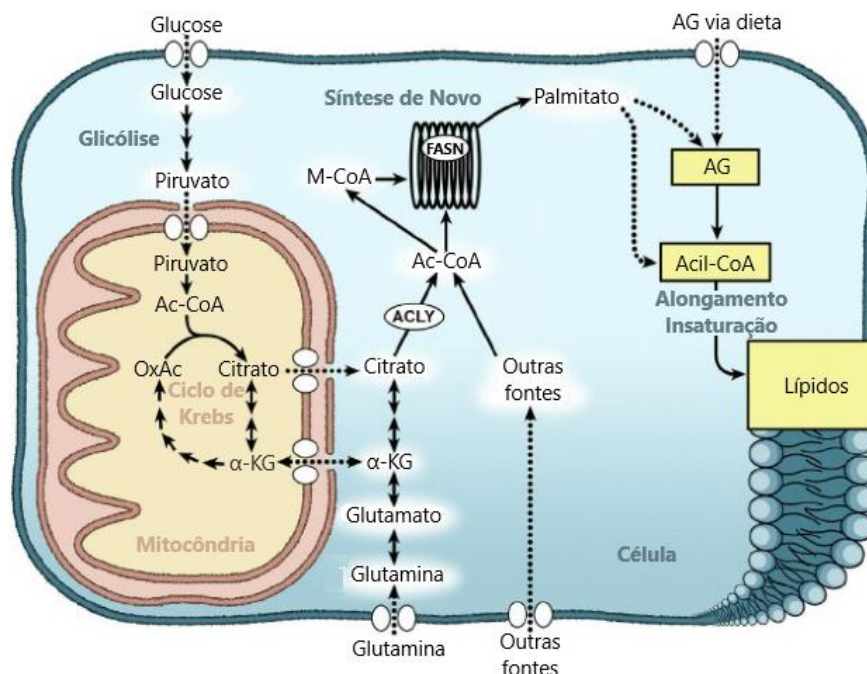
### 1.7.3 - Absorção de ácidos gordos

Os ácidos gordos podem ser sintetizados *de novo*, como já referido acima, ou então obtidos a partir da dieta. Os lípidos ingeridos pela dieta estão maioritariamente sob a forma de triglicerídeos, embora também existam ésteres de colesterol e fosfolípidos, entre outras substâncias. A lipase lingual, uma enzima libertada pelas glândulas serosas da base da língua, e a lipase gástrica, produzida pelo estômago, quebram as ligações éster dos triglicerídeos. No entanto, a sua ação não é a um nível muito substancial, sendo que a digestão completa destes compostos se dá no intestino delgado, pela ação de sais biliares e lipases pancreáticas. Os sais biliares emulsionam lípidos, atuando como detergentes que decompõem grandes glóbulos de lípidos em pequenas micelas e facilitam a ação das lipases pancreáticas, que convertem os triglicerídeos em ácidos gordos e glicerol. As micelas têm a capacidade de se fundir com as membranas das células do epitélio intestinal, os enterócitos. No retículo endoplasmático liso destas células, os ácidos gordos e o glicerol recombinam-se novamente para formar triglicerídeos. No retículo endoplasmático rugoso, estes triglicerídeos são empacotados com o colesterol em quilomicrons. Os quilomicrons abandonam os enterócitos e entram nos capilares linfáticos, e depois nos vasos sanguíneos, tendo como destino final o músculo esquelético e tecido adiposo. Nestes tecidos, a lipase lipoproteica cliva os triglicerídeos em ácidos gordos e glicerol, para serem transportados pelo sangue até às células alvo. Estes ácidos gordos podem ser metabolizados para obtenção de energia,

para funcionarem como constituintes da membrana, ou, no caso do tecido adiposo, para armazenamento da energia através da síntese de triglicerídeos.<sup>93</sup>

#### 1.7.4 - Alongamento e insaturação dos ácidos gordos

Os ácidos gordos sintetizados pela FASN ou derivados da dieta podem sofrer alongações e insaturações para a formação de ácidos gordos de cadeia mais longa e insaturada. No retículo endoplasmático liso, estes ácidos gordos podem ser alongados pelo sistema de alongamento de ácidos gordos (FAES) através da adição de mais carbonos provenientes do malonil-CoA num sistema de reações semelhantes ao que acontece em FASN: condensação, redução, desidratação e segunda redução, mas efetuados por diferentes enzimas. As insaturases são oxidases que agem sobre a cadeia de hidrocarbonetos com a ajuda de NADH, do citocromo B5 e O<sub>2</sub>. O corpo humano não tem a capacidade de sintetizar todas as combinações possíveis de ácidos gordos de cadeia muito longa porque não tem as insaturases necessárias para introduzir ligações duplas em átomos de carbono para além de C-9, e por isso, certos ácidos gordos apenas podem ser obtidos pela dieta, sendo assim denominados como ácidos gordos essenciais, como por exemplo o ácido linoleico e  $\alpha$ -linolénico.<sup>93</sup> Estas reações de alongação e insaturação não ocorrem em ácidos gordos livres, mas sim em ácidos gordos já presentes em fosfolípidos para formar a membrana plasmática (**Figura 10**).<sup>97</sup>



**Figura 10:** Síntese de ácidos gordos pelas células. Glicose, glutamina e outros substratos são precursores para a produção de Ac-CoA, que por sua vez, é doadora de dois carbonos para a síntese de ácidos gordos. O ácido palmítico resultante é submetido a reações de alongamento e dessaturação para produzir uma

variedade de ácidos gordos que são necessários para o funcionamento celular adequado. OxAc: Oxaloacetato, M-CoA: Malonil-CoA. Adaptado de Tumanov *et al.*<sup>94</sup>

### 1.7.5 - Oxidação de ácidos gordos

Os triglicerídeos armazenados no tecido adiposo também podem ser clivados nas suas unidades constituintes, o glicerol e ácidos gordos, pela lipase sensível a hormonas (HSL). Quando os níveis de glicose no sangue estão baixos, o pâncreas secreta glucagon, que estimula a HSL. Os AG são transportados pela albumina na circulação sanguínea e atingem os diferentes tecidos alvo através do recetor CD36.<sup>98</sup> Dentro da célula, a acil-CoA sintetase adiciona CoA no terminal do ácido gordo para o ativar, processo que necessita duas moléculas de ATP.<sup>99</sup> Este ácido gordo é incapaz de atravessar a membrana da mitocôndria, e por isso, necessita da enzima carnitina acil-transferase I (CPTI) que substitui a molécula de CoA por uma carnitina, permitindo a entrada do ácido gordo na mitocôndria. Dentro da mitocôndria, a carnitina acil-transferase II (CPTII) reverte a carnitina de volta a CoA, permitindo o início da  $\beta$ -oxidação.<sup>93</sup> As modificações enzimáticas que ocorrem na oxidação dos ácidos gordos acontecem no carbono 2 e 3 da cadeia também chamados de carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  respetivamente. Cada um desses carbonos entra na oxidação dos AG com dois hidrogénios ligados a si. A acil-CoA desidrogenase remove um hidrogénio do carbono  $\alpha$  e  $\beta$  e doa-os a FAD, que é reduzida a FADH<sub>2</sub>. O grupo acil-CoA é então convertido a enoil-CoA. Na segunda etapa, a enzima enoil-CoA hidratase transfere o grupo hidroxilo ao carbono  $\beta$  formando  $\beta$ -hidroxiacil-CoA. Numa terceira etapa, a  $\beta$ -hidroxiacil desidrogenase remove dois hidrogénios do carbono  $\beta$  e transfere um para NAD<sup>+</sup> formando NADH e  $\beta$ -cetoacil-CoA. Por fim, a  $\beta$ -cetoacil-CoA cliva os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$  da cadeia de ácido gordo formando uma molécula de Ac-CoA livre. A cadeia restante do ácido gordo entra num novo ciclo de clivagem.<sup>93</sup> Por cada ciclo, uma molécula de NADH, FADH<sub>2</sub> e Ac-CoA são produzidas. Cada molécula de Ac-CoA formada entra no ciclo de krebs onde origina mais três moléculas de NADH, uma de FADH<sub>2</sub> e um ATP. NADH e FADH<sub>2</sub> entram na cadeia de transportadora de eletrões para formar 2.5 moléculas e 1.5 molécula de ATP, respetivamente. Assim, cada molécula de Ac-CoA produzida por  $\beta$ -oxidação, consegue gerar 14 ATP.<sup>93</sup>

O processo de  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos com número ímpar de carbonos é idêntico até ao momento em que sobra um fragmento composto por 3 carbonos, chamado de propionil-CoA. Neste caso, esta cadeia sofre a ação de 3 enzimas. A propionil-CoA carboxilase adiciona um grupo carboxilo, por ação de 1 ATP, biotina e CO<sub>2</sub>, produzindo metilmalonil-CoA. De seguida, a enzima metilmalonil-CoA mutase reorganiza os

cabonos do metilmalonil-CoA para formar succinil-CoA com a ajuda de vitamina B12 como cofator. A succinil-CoA pode entrar no ciclo de krebs. A  $\beta$ -oxidação de ácidos gordos insaturados é semelhante ao que acontece nos ácidos gordos saturados, com apenas duas enzimas adicionais, uma isomerase e uma redutase, que são necessárias para degradar uma ampla gama de AG insaturados. No caso de cadeias de AG muito longas, a  $\beta$ -oxidação já não se pode dar na mitocôndria, mas sim no peroxissoma. A  $\beta$ -oxidação no peroxissoma funciona da mesma maneira que a oxidação mitocondrial, mas com enzimas diferentes. A função deste organelo é degradar a cadeia longa numa mais pequena para que possa ser oxidada na mitocôndria.<sup>93</sup>

## **1.8 - Relação entre o CD36, reprogramação metabólica e cancro da próstata**

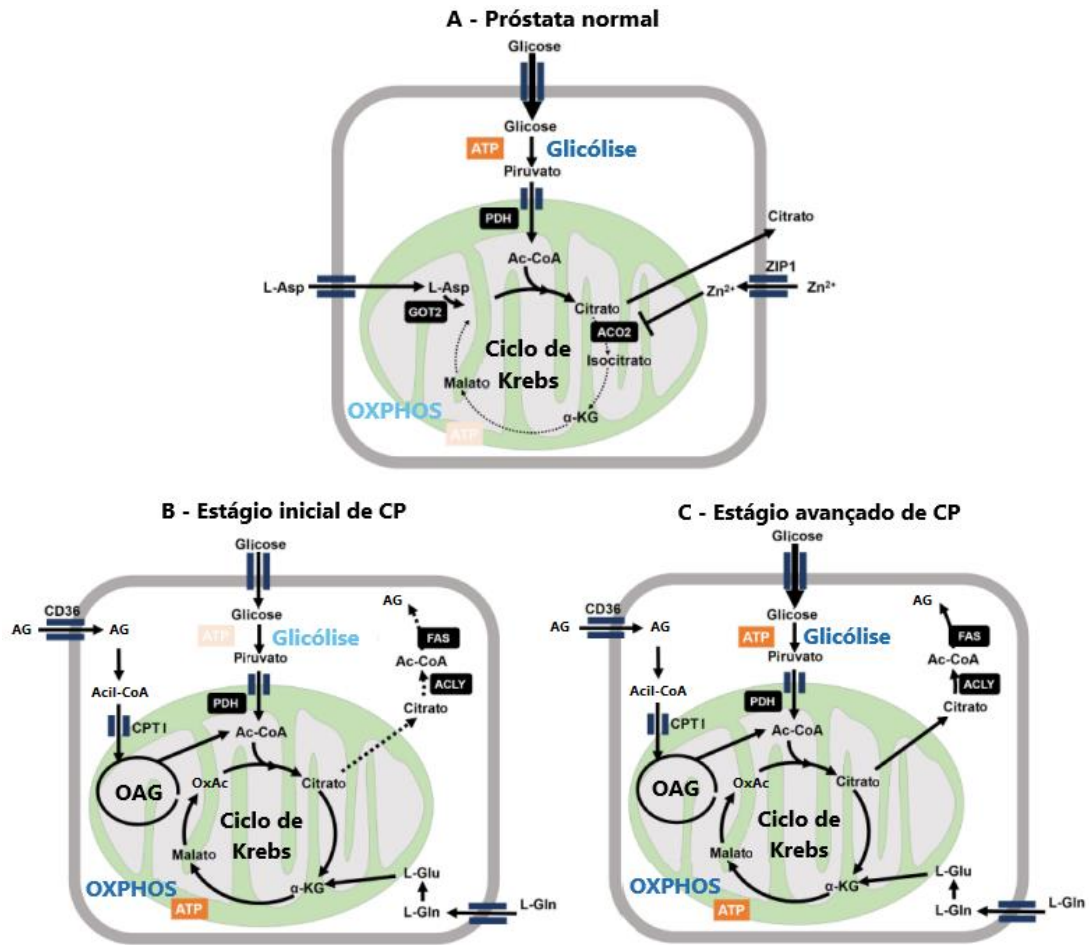
Como descrito anteriormente, para satisfazerem as suas necessidades energéticas, as células cancerígenas apresentam elevadas taxas de glicólise, ao invés da OXPHOS, uma adaptação metabólica conhecida como efeito Warburg. Apesar da glicólise ser menos eficiente em termos de geração de ATP, esta permite sintetizar precursores que suportam o desenvolvimento tumoral.<sup>66-68</sup> Por outro lado, o lactato produzido e a consequente acidificação do ambiente tumoral promovem a angiogénese e a metastização.<sup>100</sup> No entanto, no caso mais específico do CP, a glicólise não é considerada como um biomarcador nos casos primários de CP, mas apenas nos estágios mais avançados, onde se observa um aumento da atividade glicolítica para estimular a proliferação e migração celular.<sup>75,101</sup>

Os processos metabólicos da próstata saudável são únicos e estão adaptados para cumprir a sua função principal de servir como glândula acessória do sistema reprodutor masculino. Este órgão é responsável pela produção de fluído prostático, que é composto por altos níveis de citrato assim como enzimas de zinco, lípidos, enzimas caliceínas e PSA. A próstata saudável procura reter altos níveis de zinco através da mediação de transportadores específicos: ZIP1-4 e ZnT1-10, que controlam a entrada e saída de zinco, respetivamente. Altos níveis de zinco inibem a enzima aconitase, que é responsável pela transformação de citrato em isocitrato no ciclo de Krebs, razão pela qual se diz apresentarem um ciclo de Krebs truncado. A sinalização via AR aumenta a disponibilidade de substratos de Ac-CoA e oxaloacetato, que são necessários à produção de citrato. A PDH estimula a produção de Ac-CoA por uma reação de descarboxilação do piruvato, e o oxaloacetato é derivado do aspartato por uma reação de transaminação do glutamato. Assim, na próstata normal a atividade mitocondrial é

existente, mas limitada, quer na oxidação, quer na síntese de AG, enquanto que a glicólise aeróbica é o método metabólico preferencial (**Figura 11**).<sup>101</sup>

O evento inicial que leva ao aparecimento de células cancerígenas tem sido também associado à diminuição acentuada dos níveis de zinco, derivado de perdas dos seus transportadores, o que resulta na reativação da aconitase e na restauração do ciclo de Krebs. Consequentemente, o citrato é oxidado para produzir energia ou então é transportado para o citoplasma, onde é transformado em Ac-CoA para servir de base para a síntese de AG. Assim, a fase inicial de CP caracteriza-se por uma reprogramação metabólica, onde a atividade de síntese e oxidação de AG é aumentada e a atividade glicolítica diminui. A capacidade das células de CP em aumentar o influxo de AG, síntese *de novo*, síntese de fosfolípidos, oxidação de AG e armazenamento de energia em corpos lipídicos já foi descrita como um mecanismo relevante para sustentar o crescimento e desenvolvimento de CP. Entretanto, num estágio mais avançado de CP, é observado o efeito de Warburg, por estimulação de células glicolíticas por parte de adipócitos.<sup>101</sup> Ainda assim, esta fase ainda é descrita pela manutenção dos níveis de síntese de novo e oxidação AG regulados por AR (**Figura 11**).<sup>101</sup>

O recetor CD36 é um transportador responsável pelo influxo de ácidos gordos de cadeia longa na célula. Na célula, os lipídios são componentes importantes porque funcionam como segundos mensageiros da sinalização para além de serem a base da estrutura membranar e fonte de energia.<sup>102</sup> O CD36 é expresso nas células prostáticas e é importante para processos de metabolismo lipídico, inflamação e angiogénese.<sup>103</sup> Assim, a inibição do influxo de AG através da inibição de CD36 tem sido associada a uma redução do crescimento tumoral e severidade de CP.<sup>104</sup> Embora haja uma relação entre a absorção de AG e a progressão do CP, diferentes tipos de AG podem desencadear diferentes efeitos: o aumento da absorção de ácido oleico e ácido palmítico tende a aumentar a proliferação celular, no entanto, o excesso de palmitato causa stress oxidativo e provoca apoptose.<sup>105</sup>

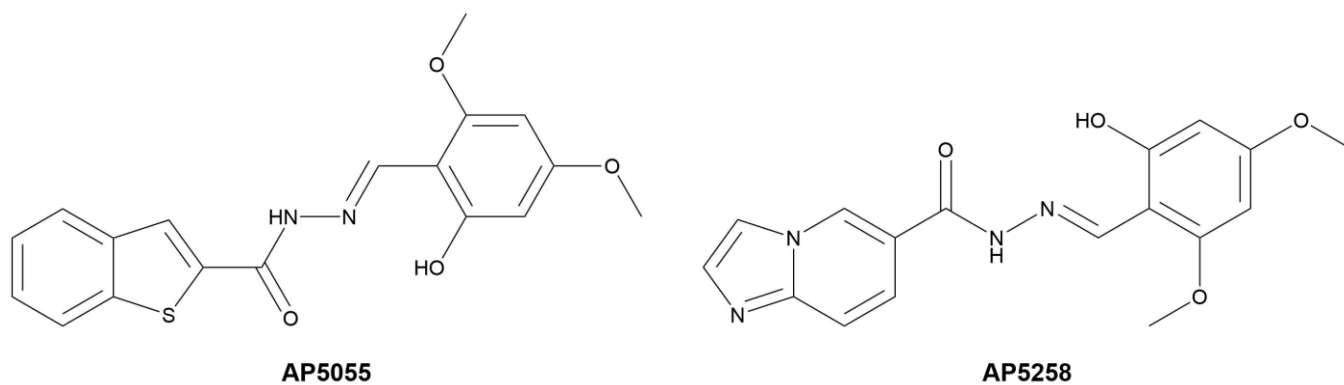


**Figura 11:** Reprogramação metabólica envolvida na transformação maligna das células prostáticas. A) Células epiteliais saudáveis expressam o transportador de zinco (ZIP1) que contribui para a inibição da aconitase e a retenção de citrato. Conseqüentemente o ciclo de Krebs é inibido. A transformação da Ac-CoA com oxaloacetato (OxAc) para formar citrato é estimulada. Assim, do ponto de vista bioenergético, a célula prostática normal é sustentada pela glicólise aeróbica. B) Diminuição dos níveis de zinco devido a depleção de ZIP1, o que leva à restauração do ciclo de Krebs. Ácidos gordos entram na célula via CD36 seguido pela entrada na mitocôndria mediada pela cartinina acil-transferase I (CPTI) para servirem de substratos para a β-oxidação (OAG, oxidação de ácidos gordos). C) PCa avançado promove a glicólise. Este estágio é caracterizado pela ativação de várias vias de fonte de energia. Adaptado de Uo *et al.*<sup>74</sup>

Como já referido, o estudo da inibição da atividade do CD36 pode levar à descoberta de uma nova terapia para o CP. No entanto, é importante frisar que, apesar das crescentes evidências, pouco progresso foi feito na tradução dos avanços para os ensaios clínicos (Tabela 1).<sup>101</sup> No entanto, alguns compostos já foram demarcados como agentes inibidores de atividade do CD36, como é o caso dos compostos denominados AP5055 e AP5258 (Figura 12).<sup>106</sup> Neste trabalho de dissertação, um dos inibidores do influxo de AG por CD36 que foi explorado foi o oleato de sulfosucinimidilo (SSO, do inglês *sulfosuccinimidyl oleate*).<sup>107</sup>

**Tabela 1:** Visão geral de ensaios clínicos com fármacos direcionados ao recetor CD36. Adaptado de Pardo *et al.*<sup>101</sup>

Alvo	Fármaco	Ensaio clínico	Pacientes	Estado	Resultado	Identificador
CD36	VT1021	Fase I	116	Ativo	Não publicado	NCT03364400
	CVX-045		40	Completado		NCT00879554
	ABT-510		45			NCT00586092



**Figura 12:** Estrutura química dos inibidores AP 5055 e AP 5258. Adaptado de Geloan *et al.*<sup>106</sup>

**Folha em branco**

## Capítulo 2 – Objetivos

Esta dissertação teve como objetivos fazer a:

- síntese e caracterização estrutural de (tio)barbituratos *N1,N3*-disubstituídos, acoplados em C5 a uma molécula de ácido esteárico com potencial interesse biológico para o desenvolvimento de inibidores de CD36;
- avaliação através de estudos *in vitro* da atividade antiproliferativa dos vários compostos sintetizados, em linhas celulares de próstata humana (neoplásicas e não neoplásicas);
- avaliação *in vitro*, em várias culturas de linhas celulares da próstata, do efeito da inibição do influxo de lípidos pelos vários compostos sintetizados, usando AG fluorescentes (Bodipy C16).

**Folha em branco**

# Capítulo 3 – Parte experimental

## 3.1 - Síntese química e caracterização estrutural

Este capítulo está subdividido em várias secções relacionadas com a primeira parte experimental de síntese química e caracterização estrutural.

Na secção 3.1.1 são descritos os equipamentos utilizados e a forma de estruturação dos resultados obtidos.

Nas secções 3.1.2, 3.1.3 e 3.1.4 são descritos os procedimentos reacionais para a síntese dos precursores, assim como dos produtos finais, e os respetivos sais. Simultaneamente, além da determinação do rendimento reacional ( $\eta$ , em %), também foi feita a caracterização destes compostos por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de protão (RMN  $^1\text{H}$ ). Adicionalmente, na secção 3.1.3, os produtos finais foram caracterizados de acordo com os seus pontos de fusão (p.f). Na secção 3.1.4, os produtos finais na forma de sal foram caracterizados de acordo com o seu p.f, por espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e carbono-13 (RMN  $^{13}\text{C}$ ), de infravermelhos por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier-transform infrared spectroscopy*), e espetrometria de massas de alta resolução (HRMN, do inglês, *high-resolution mass spectrometry*).

### 3.1.1 - Equipamento e bases da caracterização estrutural

Os reagentes e solventes utilizados foram adquiridos a firmas comerciais e foram utilizados sem qualquer purificação adicional, à exceção do diclorometano (DCM), que foi seco antes de cada utilização por destilação sob pentóxido de fósforo. As reações de síntese realizadas foram seguidas por cromatografia em camada fina (ccf), através de placas de alumínio revestidas por sílica gel (Macherey-Nagel 60G/UV254) com 0,2 mm de espessura. Como eluente foi usado DCM ou uma mistura de DCM e metanol, numa proporção volumétrica variável. As placas foram observadas sob luz ultravioleta com comprimento de onda de 254 nm após eluição e secagem.

Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram obtidos através do espectrofotómetro Brüker Avance III 400 Mhz. Na realização destes espectros foram utilizados como solventes o dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- $d_6$ ) ou o clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Os resultados foram tratados no *software* MestReNova 14.1.0. Os espetros RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foram realizados a 400.13 Mhz e 100.62 Mhz, respetivamente. Os resultados dos

espectros RMN  $^1\text{H}$  foram descritos da seguinte ordem: Solvente; desvio químico ( $\delta$ ) em partes por milhão (ppm); multiplicidade do sinal [singlete (s), duplete (d), tripleto (t), quarteto (q), quinteto (p) ou multiplete (m)]; constante de acoplamento ( $J$ , em Hz); intensidade relativa (nH, como número de prótons). Os resultados dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  foram descritos da seguinte ordem: solvente;  $\delta$  em ppm. Os solventes foram utilizados como padrão interno: os picos de DMSO- $d_6$  são observados a  $\delta = 2,50$  ppm e  $\delta = 39,52$  ppm, em RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente, e o pico de  $\text{CDCl}_3$  em  $\delta = 7,26$  ppm, em RMN  $^1\text{H}$ .

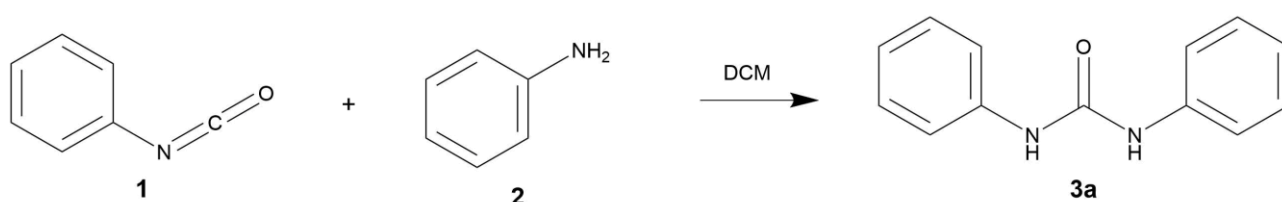
Os p.f foram determinados em tubos capilares abertos através do aparelho de medição de pontos de fusão Büchi B-540.

Os espectros FTIR foram obtidos pelo espectrômetro Thermo Fisher Scientific Nicolet iS10: smart iTR e tratados no *software* Omnic 8.2. Estes espectros foram adquiridos entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$  por refletância total atenuada, com 32 scans e uma resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . Os resultados foram posteriormente analisados e descritos de acordo com a frequência máxima de cada banda de absorção ( $\nu_{\text{máx}}$  em  $\text{cm}^{-1}$ ).

Os espectros de massas de alta resolução (HRMS), foram obtidos pela técnica ESI (do inglês, *electrospray ionization*) pelo *Servicio de análisis elemental, cromatografía y masas* da Universidade de Salamanca, Espanha.

### 3.1.2 - Síntese de precursores

#### 3.1.2.1 - 1,3-Difenilureia (3a)

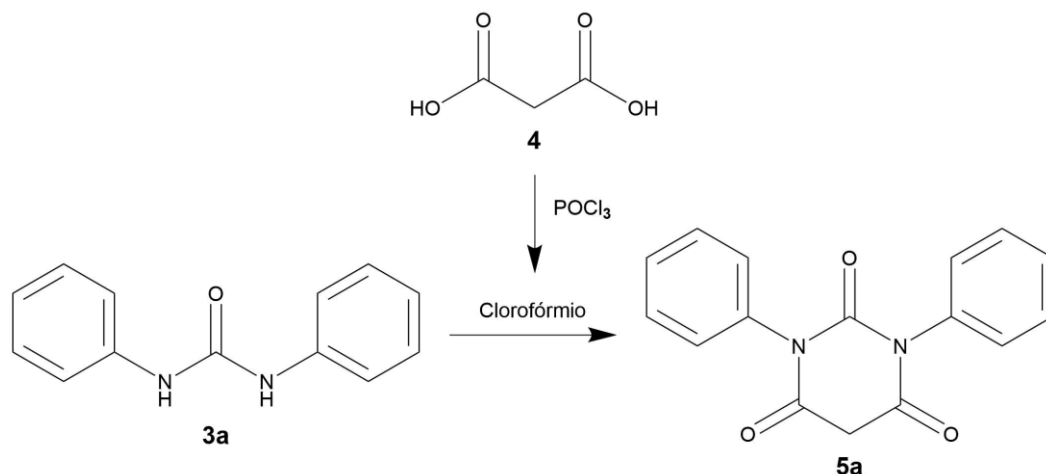


**Esquema 3:** Síntese de 1,3-difenilureia (3a).

A uma solução de fenilisotiocianato (**1**, 1eq, 4,55  $\mu\text{mol}$ , 500  $\mu\text{L}$ ) em DCM (10 mL), arrefecida em banho de gelo e em agitação constante, foi adicionada gota-a-gota uma solução de anilina (**2**, 1eq, 4,55  $\mu\text{mol}$ , 414  $\mu\text{L}$ ) em DCM (5 mL). Depois, a reação manteve-se à temperatura ambiente, assim como está descrito em Lu *et al.*<sup>108</sup> A reação foi acompanhada por ccf [eluyente: DCM: metanol (4:1, v:v)]. Uma vez completa, ao fim de 4 horas, o produto **3a** foi filtrado e lavado com éter dietílico. Cristais brancos;

rendimento 93%;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 8,65 (s, 2H), 7,45 (d,  $J = 7,5$  Hz, 4H), 7,28 (t,  $J = 7,5$  Hz, 4H), 6,96 (t,  $J = 7,3$  Hz, 2H).

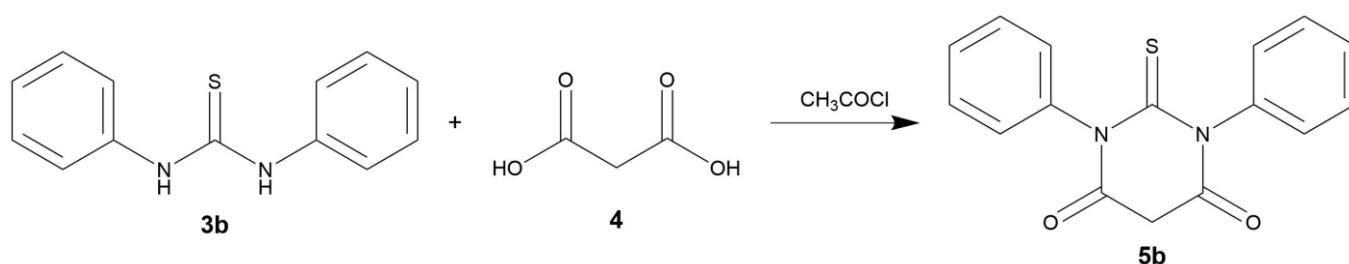
### 3.1.2.2 - Ácido 1,3-difenilbarbitúrico (5a)



**Esquema 4:** Síntese de ácido 1,3-difenilbarbitúrico (5a).

Ao ácido malónico (4, 1eq, 3 mmol, 0,312 g) em banho de gelo e sob agitação foi adicionado gota-a-gota uma solução de cloreto de fosforilo (6eq, 18 mmol, 1,68 mL). Após este passo, a reação foi mantida à temperatura ambiente até a reação completar ao fim de 1 hora. Em seguida, o excesso de solvente foi removido através do evaporador rotativo, e o produto resultante foi adicionado a uma outra solução de 1,3-difenilureia (3a, 1eq, 3 mmol, 0,637 g) em clorofórmio (10 mL), em agitação e em refluxo. A reação foi acompanhada por ccf [eluente: DCM], até se completar, ao fim de 17 horas. Posteriormente, o solvente foi removido por evaporação, e foi adicionada água fria (10 mL), deixando-se no frigorífico até ao dia seguinte. O sólido obtido foi filtrado e lavado com água, seco e posteriormente recristalizado de etanol. Esta reação foi adaptada de Serrano *et al.*<sup>109</sup> O produto pretendido foi obtido sob a forma de cristais amarelados; rendimento 26%;  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,44 – 7,34 (m, 6H), 7,16 (d,  $J = 6,8$  Hz, 4H), 3,92 (s, 2H).

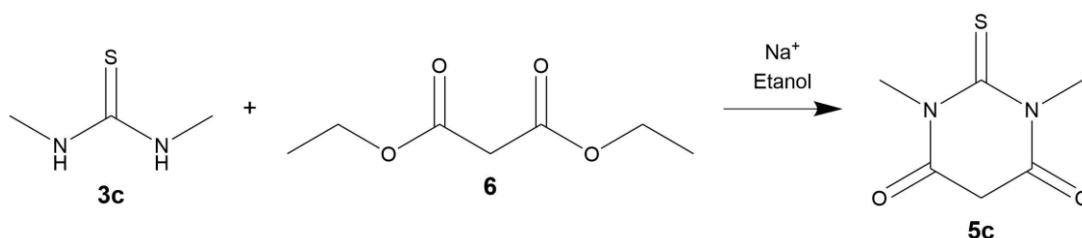
### 3.1.2.3 - Ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (5b)



**Esquema 5:** Síntese de ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (5b).

O ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**5b**) foi obtido através da reação entre a 1,3-difeniltiourea (**3b**, 1eq, 8,77 mmol, 2 g) e o ácido malônico (**4**, 1,3eq, 11 mmol, 1,186 g) em cloreto de acetilo (3eq, 26,3 mmol, 1,875 mL) a 40 °C. A reação foi acompanhada por ccf [eluente: DCM: metanol (9:1, v:v)], até estar completa, ao fim de aproximadamente 4 horas. O produto sólido foi filtrado e lavado com água fria, seco e depois recristalizado de ácido acético, de acordo com Serrano *et al.*<sup>109</sup> Cristais agulha amarelado; rendimento 78%; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,47-7,36 (m, 6H), 7,14 (d, *J* = 7,5 Hz, 4H), 4,03 (s, 2H).

#### 3.1.2.4 - Ácido 1,3-dimetiltiobarbitúrico (5c)

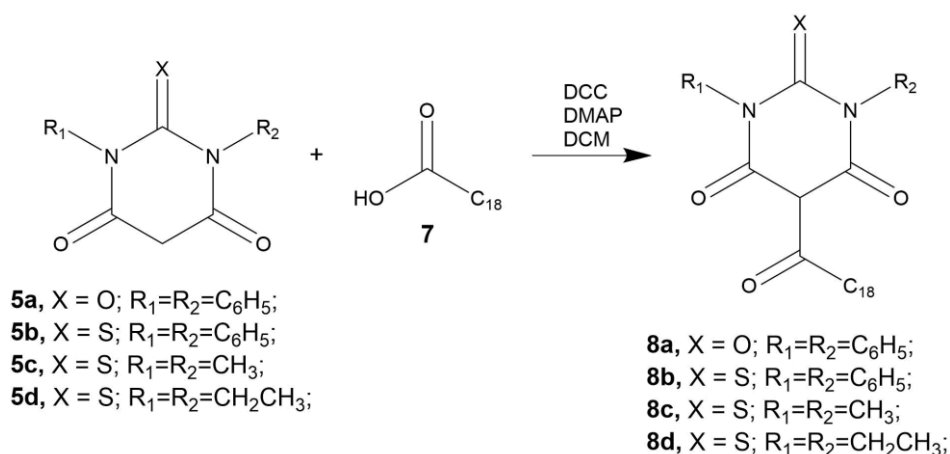


**Esquema 6:** Síntese de ácido 1,3-dimetiltiobarbitúrico (5c).

A 1,3-dimetilureia (**3c**, 1eq, 9,598mmol, 1g) e o malonato de dietilo (**6**, 2eq, 19,20 mmol, 2,92 mL) foram adicionados a uma solução de sódio (2eq, 19,20 mmol, 0,4412 g) em etanol (10 mL), em agitação. A mistura foi colocada em refluxo e a reação foi seguida por ccf [eluente: DCM: metanol (4:1, v:v)], até estar completa, ao fim de 48 horas. Seguidamente, o etanol foi removido no evaporador rotativo e foi adicionada água fria (10 mL). A mistura obtida foi depois acidificada com a adição gota-a-gota de HCl 37% até se obter pH próximo de 5. O sólido obtido foi filtrado e lavado com éter de petróleo, e depois seco e recristalizado de etanol. Adaptado de Serrano *et al.*<sup>109</sup> Cor amarela; rendimento 41%; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 3,71 (s, 2H), 3,60 (s, 6H).

### 3.1.3 - Síntese dos produtos 8a-f

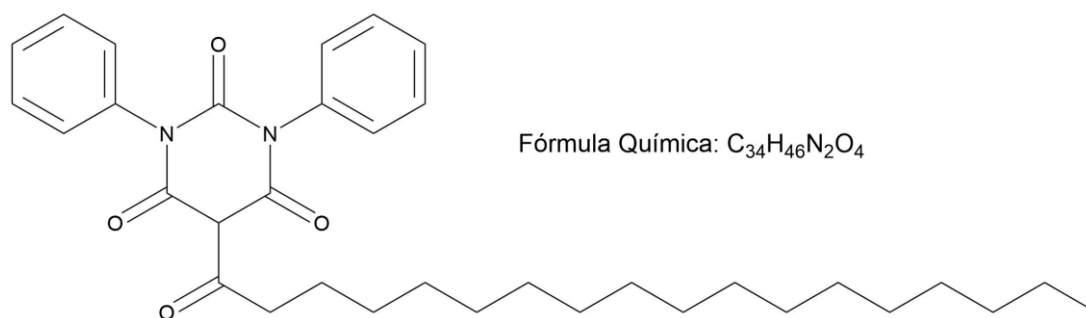
#### 3.1.3.1 - Acilação em C5 a partir do ácido esteárico (preparação dos compostos 8a-d)



**Esquema 7:** Síntese dos produtos por acilação em C<sub>5</sub> a partir do ácido esteárico (8a-d).

Os passos desta reação foram adaptados de Jeong *et al.*<sup>110</sup> A uma solução de ácido esteárico (**7**, 1eq) em DCM seco (10 mL) foi adicionada *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC, 1,2eq), ácido (tio)barbitúrico **5a-d** (1,2eq) e 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 0,2eq), à temperatura ambiente. A reação foi acompanhada por ccf [eluente: DCM: metanol (4:1, v:v)]. Após a reação estar completa, ao fim de 4 horas, foi adicionada água (1 mL), e a reação foi colocada em agitação por mais 15 minutos e o sólido resultante foi filtrado e lavado com DCM. O filtrado foi lavado numa ampola de decantação com HCl 5% (15 mL) e, posteriormente, com água (15 mL). A fase orgânica foi seca sob sulfato de sódio anidro e evaporada à secura. Ao crude obtido foi adicionado éter dietílico e o sólido precipitado foi isolado. O filtrado foi novamente evaporado e recristalizado de *n*-hexano, obtendo-se assim os seguintes produtos:

### 3.1.3.1.1 - 1,3-Difenil-5-estearoilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (8a)

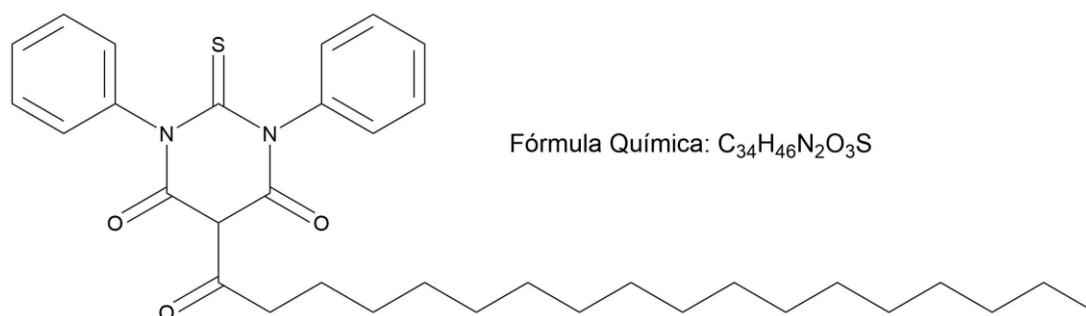


**Figura 13:** Síntese de 1,3-difenil-5-estearoilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (8a).

Obtido a partir do ácido 1,3-difenilbarbitúrico comercial (**5a**, 0,7135 mmol, 200 mg) e do ácido esteárico (**7a**, 0,5946 mmol, 169 mg); rendimento 74%; p.f: 68-70 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 7,47 – 7,34 (m, 6H), 7,28 – 7,18 (m, 4H), 3,10 (t, *J* = 7,6

Hz, 2H), 1,64 (p,  $J = 7,7, 7,1$  Hz, 2H), 1,37 – 1,25 (m, 2H), 1,25 – 1,04 (m, 26H), 0,81 (t,  $J = 6,7$  Hz, 3H).

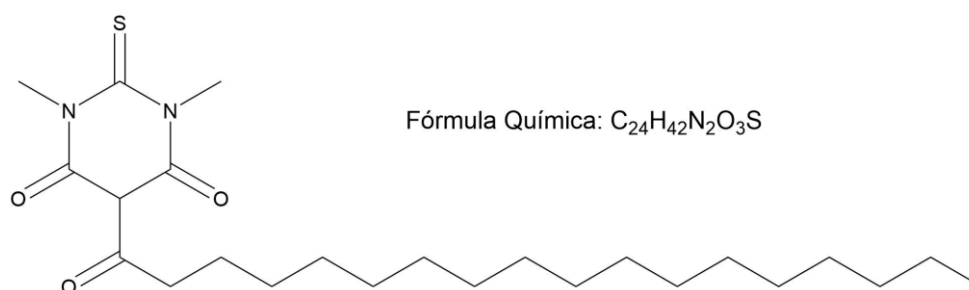
### 3.1.3.1.2 - 1,3-Difenil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (8b)



**Figura 14:** Síntese de 1,3-difenil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (8b).

Obtido a partir do ácido 1,3-difeniltiobarbitúrico (**5b**, 1 mmol, 296,34 mg) e do ácido esteárico (**7b**, 0,833 mmol, 236,97 mg); rendimento 42%; p.f: 82-85 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 7,36 (t,  $J = 7,6$  Hz, 4H), 7,26 (t,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 7,13 (d,  $J = 7,8$  Hz, 4H), 2,70 (t,  $J = 7,7$  Hz, 2H), 1,46 (p,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 1,28 – 1,19 (m, 28H), 0,85 (t,  $J = 6,9$  Hz, 3H).

### 3.1.3.1.3 - 1,3-Dimetil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (8c)



**Figura 15:** Síntese de 1,3-dimetil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (8c).

Obtido a partir do ácido 1,3-dimetiltiobarbitúrico (**5c**, 1 mmol, 172,14 mg) e do ácido esteárico (**7c**, 1 mmol, 236,97 mg); rendimento 27%; p.f: 52-53 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 3,76 (s, 3H), 3,73 (s, 3H), 3,15 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,69 (p,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,40 (p,  $J = 7,5$  Hz, 2H), 1,33 – 1,21 (m, 26H), 0,88 (t,  $J = 7,0$  Hz, 3H).

### 3.1.3.1.4 - 1,3-Dietil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8d)

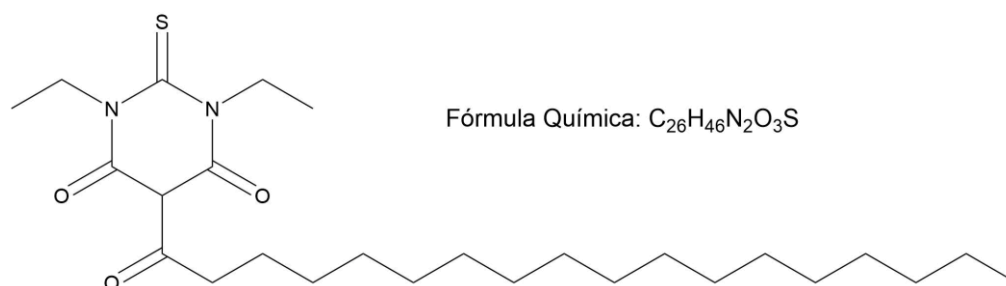
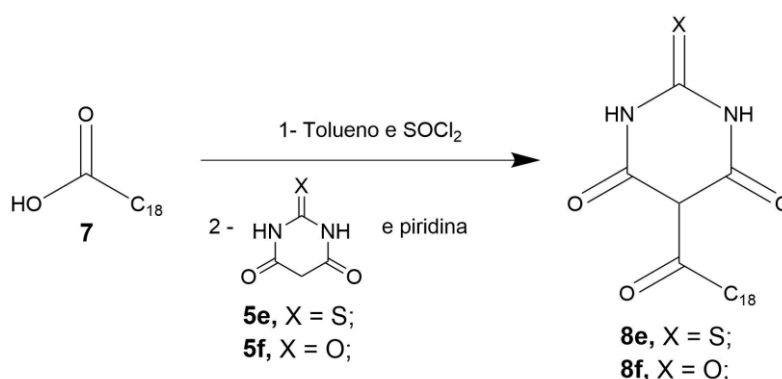


Figura 16: Síntese de 1,3-dietil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1H,5H)-diona (8d).

Obtido a partir do ácido 1,3-dietiltiobarbitúrico (**5d**, 1 mmol, 200,256 mg) e do ácido esteárico (**7a**, 0,833 mmol, 236,97 mg); rendimento 65%; p.f: 130-135 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 4,60 – 4,47 (m, 4H), 3,13 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,69 (p, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,41 (p, *J* = 7,2 Hz, 2H), 1,32 – 1,22 (m, 32H), 0,87 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H).

### 3.1.3.2 - Acilação em C5 a partir do cloreto de estearoílo (preparação dos compostos 8e-f)

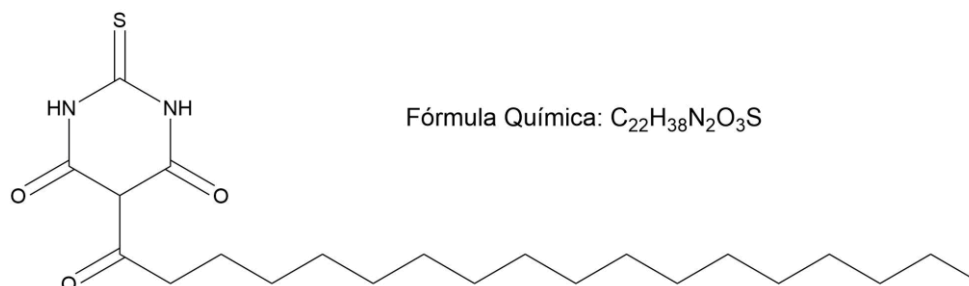


Esquema 8: Síntese por acilação em C5 a partir do cloreto de estearoílo.

Por adaptação do método descrito por Nutaitis *et al*,<sup>111</sup> primeiramente, a uma solução em agitação de ácido esteárico (**7**, 1eq) em tolueno (2,5 mL) foi adicionado cloreto de tionilo (100 µL) gota a gota. Esta solução foi mantida em refluxo a 120 °C até a reação estar completa ao fim de aproximadamente 4 horas. Quando terminada, o excesso de solvente foi removido através do evaporador rotativo. Posteriormente, esta solução foi adicionada gota-a-gota a uma solução de ácido (tio)barbitúrico **5e-f** (1eq) obtido comercialmente em piridina (2 mL), em agitação e à temperatura ambiente, durante aproximadamente 18 horas. A reação foi acompanhada por ccf [eluyente: DCM: metanol (4:1, v:v)]. Após o termo da reação, foi adicionada água fria à solução e esta foi acidificada com HCl 6M, com arrefecimento em banho de gelo, até pH 1. O sólido

obtido foi filtrado e lavado com metanol e depois seco, obtendo-se os seguintes produtos:

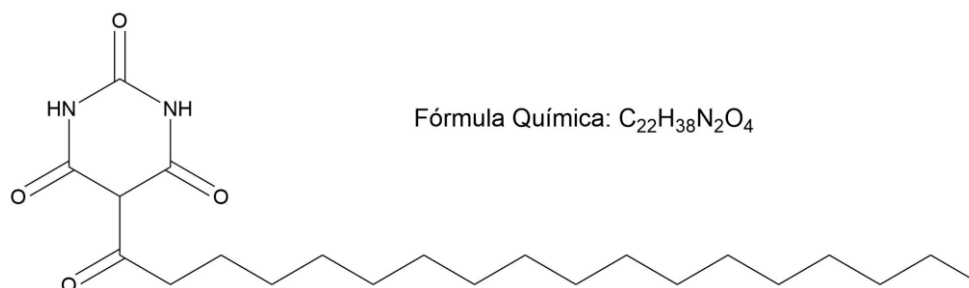
### 3.1.3.2.1 - 5-Estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (8e)



**Figura 17:** Síntese de 5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (8e).

Obtido a partir do ácido esteárico (7, 1 mmol, 284,48 mg) e do ácido tiobarbitúrico (5e, 1 mmol, 144,15 mg); rendimento 32%; p.f: 172-173 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 12,56 (s, 2H), 3,00 (t, *J* = 7,8 Hz, 2H), 1,56 (p, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,36 – 1,15 (m, 28H), 0,86 (t, *J* = 6,2 Hz, 3H).

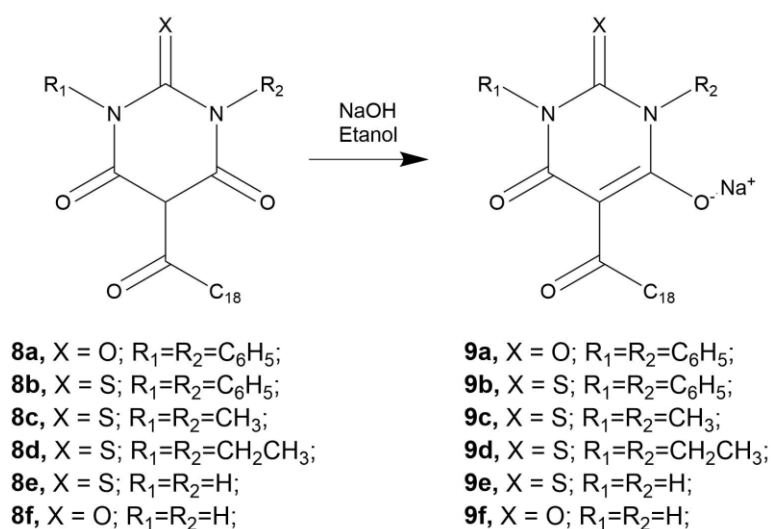
### 3.1.3.2.2 - 5-Estearoilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (8f)



**Figura 18:** Síntese de 5-estearoilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (8f).

Obtido a partir do ácido esteárico (7, 1 mmol, 284,48 mg) e do ácido barbitúrico (5f, 1 mmol, 128,09 mg); rendimento 44%; p.f: 169-170 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 11,82 (s, 1H), 11,04 (s, 1H), 3,01 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,57 (p, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,33 – 1,21 (m, 28H), 0,85 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H).

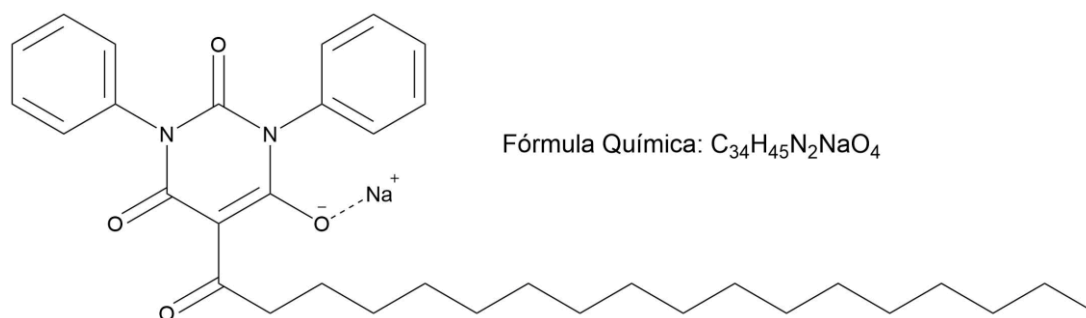
### 3.1.4 - Preparação dos sais de sódio 9a-f



**Esquema 9:** Síntese dos produtos 9a-f sob a forma de sal de sódio.

Juntou-se uma solução dos produtos **8a-f** (1eq), etanol (0,5 mL) com uma solução aquosa de hidróxido de sódio 20% (1,2eq), e a mistura resultante foi colocada em agitação constante à temperatura ambiente, até se verificar a total evaporação do etanol. O sólido obtido foi isolado, lavado com água fria e seco, obtendo-se produtos **9a-f**, sob a forma de sais de sódio:

#### 3.1.4.1 - 2,6-Dioxo-1,3-difenil-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9a)

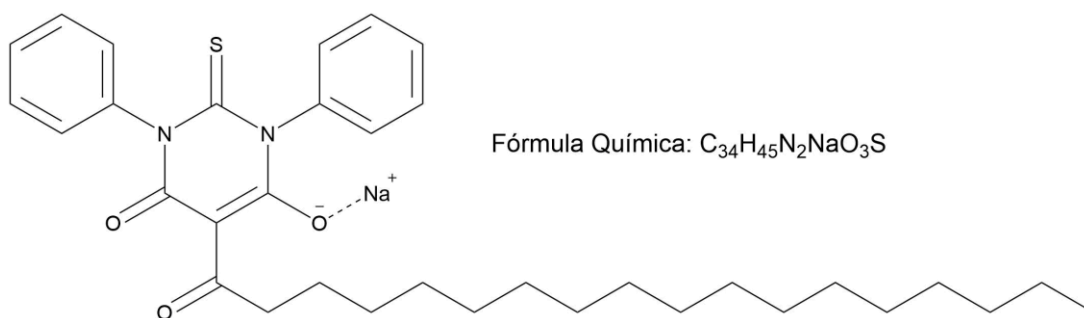


**Figura 19:** Síntese de 2,6-dioxo-1,3-difenil-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9a).

Obtido a partir de 1,3-difenil-5-estearoilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**8a**, 0,27456 mmol, 150 mg) e hidróxido de sódio (0,32947 mmol, 0,26 mL); rendimento 77%; p.f: 265-267 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 7,39 (t, *J* = 7,5 Hz, 4H), 7,31 (t, *J* = 7,3 Hz, 2H), 7,19 (d, *J* = 7,2 Hz, 4H), 2,73 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,48 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,32 – 1,21 (m, 28H), 0,86 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H); <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 197,98, 163,50, 151,19, 137,59, 129,74, 128,30, 127,05, 95,08, 43,27, 31,32,

29,36, 29,20, 29,12, 29,09, 29,07, 29,04, 28,74, 25,34, 22,13, 13,98; FTIR  $\nu_{\text{máx}}$ : 2981, 2915, 2850, 1706, 1628, 1563, 1491, 1426, 1385, 1251, 1158, 1072, 950, 784, 754, 715, 692, 617. HMRS (ESI)  $m/z$ :  $(M^+-Na)^-$  calculado para  $C_{34}H_{45}N_2O_4$  545,3385  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , encontrado 545,3391  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

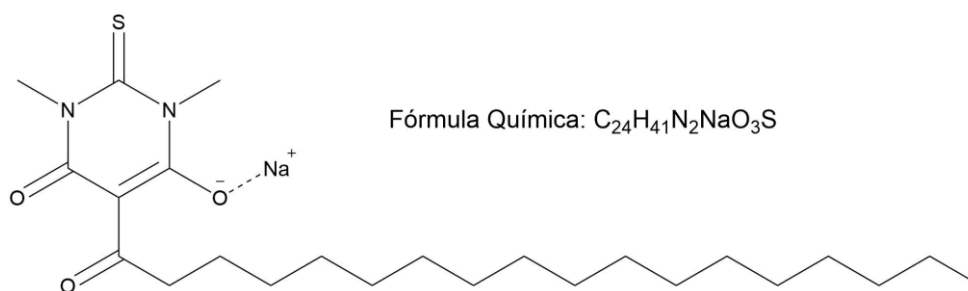
### 3.1.4.2 - 6-Oxo-1,3-difenil-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9b)



**Figura 20:** Síntese de 6-oxo-1,3-difenil-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9b).

Obtido a partir de 1,3-difenil-5-estearoil-2-tioxi-dihidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**8b**, 0,302 mmol, 170 mg) e hidróxido de sódio (0,3624 mmol, 0,28992 mL); rendimento 56%; p.f: 245-247 °C;  $^1\text{H}$  RMN (600 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,36 (t,  $J = 7,6$  Hz, 4H), 7,26 (t,  $J = 7,4$  Hz, 2H), 7,12 (d,  $J = 7,7$  Hz, 4H), 2,70 (t,  $J = 7,6$  Hz, 2H), 1,46 (p,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,33 – 1,15 (m, 28H), 0,85 (t,  $J = 6,8$  Hz, 3H);  $^{13}\text{C}$  RMN (151 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ )  $\delta$  (ppm): 198,18, 198,16, 178,78, 161,79, 141,86, 129,53, 129,22, 128,68, 128,34, 126,80, 97,57, 43,23, 31,28, 29,19, 29,11, 29,06, 29,03, 29,02, 28,99, 28,69, 25,01, 22,08, 13,93; FTIR  $\nu_{\text{máx}}$ : 2921, 2851, 1622, 1567, 1489, 1454, 1386, 1318, 1258, 748, 721, 691; HMRS (ESI)  $m/z$ :  $(M^+-Na)^-$  calculado para  $C_{34}H_{45}N_2O_3S$  561,3156  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ , encontrado 561,3160  $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ .

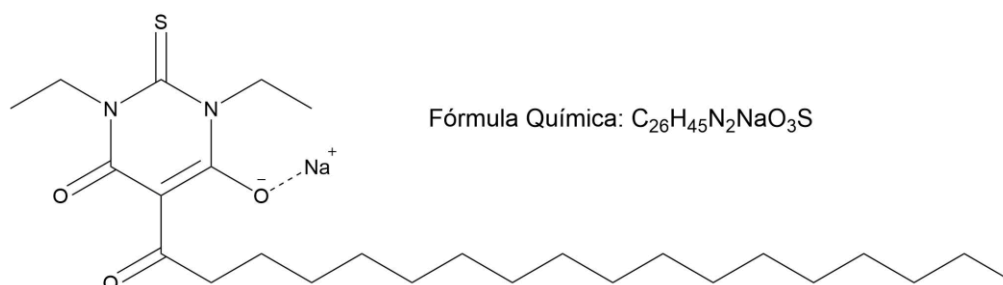
### 3.1.4.3 - 1,3-Dimetil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9c)



**Figura 21:** Síntese de 1,3-dimetil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9c).

Obtido a partir do 1,3-dimetil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**8c**, 0,2263 mmol, 99,2 mg) e hidróxido de sódio (0,2716 mmol, 0,2173 mL); rendimento 73%; p.f: 220-222 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,53 (s, 6H), 2,73 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 2,50 (p, *J* = 1,9 Hz, 2H), 1,45 (p, *J* = 7,3 Hz, 2H), 1,29 – 1,16 (m, 26H), 0,84 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H). <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 198,96, 177,42, 161,19, 97,21, 43,43, 34,61, 31,36, 29,24, 29,17, 29,12, 29,10, 29,08, 28,78, 25,17, 22,17, 14,01; FTIR  $\nu_{\text{máx}}$ : 2981, 2955, 2916, 2850, 1652, 1591, 1550, 1527, 1428, 1399, 1360, 1238, 1158, 1105, 956, 785, 715; HMRS (ESI) m/z: (M<sup>+</sup>-Na)<sup>-</sup> calculado para C<sub>24</sub>H<sub>41</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S 437,2843 g.mol<sup>-1</sup>, encontrado: 437,2847 g.mol<sup>-1</sup>.

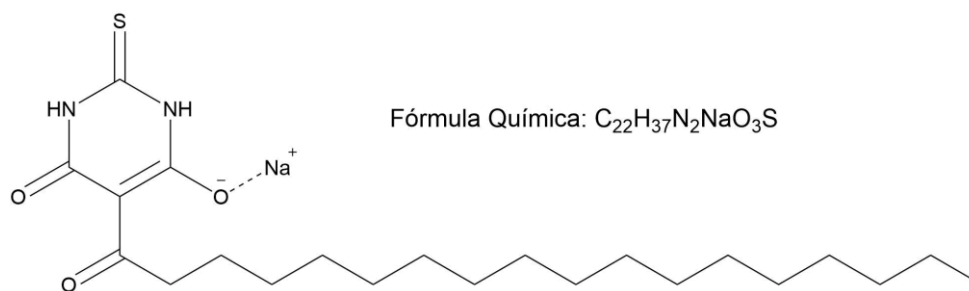
#### 3.1.4.4 - 1,3-Dietil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9d)



**Figura 22:** Síntese de 1,3-dietil-6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9d).

Obtido a partir do 1,3-dietil-5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**8d**, 0,543 mmol, 253,7 mg) e hidróxido de sódio (0,652 mmol, 0,523 mL); rendimento 84%; p.f: 191-194 °C; <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 4,38 (q, *J* = 6,9 Hz, 4H), 2,72 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,44 (t, *J* = 7,4 Hz, 2H), 1,29 – 1,18 (m, 28H), 1,12 (t, *J* = 6,9 Hz, 6H), 0,84 (t, *J* = 6,7 Hz, 3H); <sup>13</sup>C RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 199,01, 176,25, 160,62, 97,48, 43,45, 41,51, 31,35, 29,19, 29,13, 29,10, 29,08, 29,06, 28,76, 25,12, 22,15, 14,00, 12,65; FTIR  $\nu_{\text{máx}}$ : 2922, 2851, 1647, 1602, 1405, 1382, 1259, 1106, 838, 788; HMRS (ESI) m/z: (M<sup>+</sup>-Na)<sup>-</sup> calculado para C<sub>26</sub>H<sub>45</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S 565,3156 g.mol<sup>-1</sup>, encontrado 565,3158 g.mol<sup>-1</sup>.

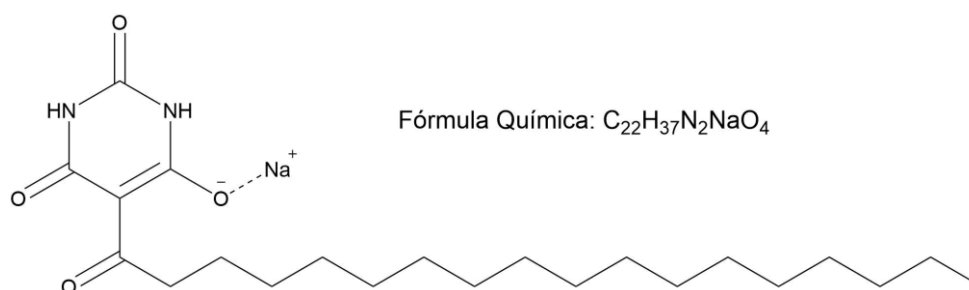
#### 3.1.4.5 - 6-Oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9e)



**Figura 23:** Síntese de 6-oxo-5-estearoil-2-tioxo-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9e).

Obtido a partir do 5-estearoil-2-tioxodi-hidropirimidina-4,6(1*H*,5*H*)-diona (**8e**, 0,1461 mmol, 60 mg) e hidróxido de sódio (0,1753 mmol, 0,1402 mL); rendimento 95%; p.f: 330-331 °C;  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 10,84 (s, 2H), 2,71 (t, *J* = 7,5 Hz, 2H), 1,43 (p, *J* = 7,1 Hz, 2H), 1,30 – 1,13 (m, 28H), 0,84 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H);  $^{13}C$  RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 197,96, 174,72, 163,32, 97,01, 43,12, 31,34, 29,29, 29,22, 29,13, 29,10, 29,08, 29,05, 28,75, 25,16, 22,14, 13,99; FTIR  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3659, 3482, 3100, 2981, 2914, 2850, 1671, 1630, 1573, 1549, 1472, 1426, 1409, 1251, 1208, 1190, 1159, 948, 785, 715, 606; HMRS (ESI) *m/z*: ( $M^+Na$ )<sup>-</sup> calculado para  $C_{22}H_{37}N_2O_3S$  409,2530 g.mol<sup>-1</sup>, encontrado 409,2534 g.mol<sup>-1</sup>.

### 3.1.4.6 - 2,6-Dioxo-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9f)



**Figura 24:** Síntese de 2,6-dioxo-5-estearoil-1,2,3,6-tetra-hidropirimidin-4-olato de sódio (9f).

Obtido a partir do 5-estearoilpirimidina-2,4,6(1*H*,3*H*,5*H*)-triona (**8f**, 0,2535 mmol, 100 mg) e hidróxido de sódio (0,3042 mmol, 0,243 mL); rendimento 94%; p.f: 375-377 °C;  $^1H$  RMN (400 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 9,48 (s, 2H), 2,73 (t, *J* = 7,6 Hz, 2H), 1,48 – 1,40 (m, 2H), 1,24 (s, 28H), 0,86 (t, *J* = 6,6 Hz, 3H);  $^{13}C$  RMN (101 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 197,33, 165,65, 150,80, 94,59, 42,79, 31,31, 29,38, 29,23, 29,13, 29,11, 29,08, 29,06, 29,03, 28,73, 25,41, 22,12, 13,97; FTIR  $\nu_{m\acute{a}x}$ : 3658, 3173, 2981, 2914, 2850, 1735, 1630, 1564, 1472, 1451, 1409, 1249, 1082, 966, 784, 771, 759, 714, 675, 604; HMRS (ESI) *m/z*: ( $M^+Na$ )<sup>-</sup> calculado para  $C_{22}H_{37}N_2O_4$  393,2759 g.mol<sup>-1</sup>, encontrado 393,2762 g.mol<sup>-1</sup>.

## **3.2 - Avaliação da atividade biológica**

Este capítulo está subdividido em várias secções relacionadas com a segunda parte experimental de avaliação da atividade biológica e influxo lipídico.

Na secção 3.2.1 são descritos os materiais, métodos e técnicas utilizados para se proceder à parte experimental.

### **3.2.1 - Materiais e métodos**

#### **3.2.1.1 - Linhas celulares**

Neste estudo foram usadas três linhas celulares de próstata humana: a linha celular não neoplásica PNT1A, originária do epitélio da próstata, e duas linhas celulares cancerígenas, LNCaP e PC3. A linha celular LNCaP é derivada da metástase de um gânglio linfático e é responsiva a androgénios, enquanto que a linha celular PC3 é derivada da metástase óssea de um adenocarcinoma indiferenciado de grau IV, e é considerada como não responsiva a androgénios. Deste modo, as culturas celulares LNCaP e PC3 são largamente utilizadas como modelos *in vitro* representativos dos diferentes estágios da doença, respetivamente, um estágio inicial do CP sensível a androgénios, e uma fase mais avançada resistente à castração. As linhas celulares foram adquiridas da *European Collection of Authenticated Cell Cultures* (ECACC, Salisburia, Reino Unido).

#### **3.2.1.2 - Meios de cultura**

O meio de cultura completo, RPMI 1640 com vermelho de fenol (Sigma Aldrich), foi preparado juntamente com bicarbonato de sódio e água MiliQ. O pH foi ajustado com a ajuda de um potenciómetro com uma solução de HCl 5M até pH 7,3. Após a preparação do meio, este foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Sigma Aldrich) e 1% de penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich), e esterilizado por filtração com o auxílio do sistema de vácuo.

Foi também preparado o meio simples RPMI 8755 sem vermelho de fenol, à semelhança do meio com vermelho de fenol, mas sem FBS e antibiótico.

Um terceiro meio foi preparado a partir do meio RPMI 8755, sem vermelho de fenol, suplementado com 1% de soro desprovido de lípidos, preparado no laboratório.

### **3.2.1.3 – Manutenção das culturas celulares**

As linhas celulares prostáticas foram mantidas em frascos de cultura em meio de cultura RPMI 1640, com vermelho de fenol numa incubadora humidificada a 37°C, numa atmosfera equilibrada com 5% de CO<sub>2</sub>.

### **3.2.1.4 - Tripsinização**

Quando as culturas atingiram cerca de 80% de confluência, recorreu-se à tripsinização. Este processo envolve a remoção do meio presente na cultura e a adição à mesma de uma solução de tripsina previamente aquecida até os 37°C. Depois, o frasco de cultura é colocado na estufa durante 5 minutos, para permitir que as células se soltem da base do mesmo. Seguidamente, adiciona-se meio RPMI completo com vermelho de fenol e a suspensão é centrifugada a 1500RPM durante 5 minutos. De seguida, o sobrenadante é descartado e o *pellet* é ressuspensionado com novo meio de cultura completo. Esta suspensão celular pode ser novamente semeada num frasco de cultura ou então utilizada para a realização de ensaios de estudo.

### **3.2.1.5 - Contagem de células**

Da suspensão celular anterior homogeneizada, 10µl da solução e 10µl de solução de azul triptano são adicionadas a um tubo *ependorf*. Este conteúdo é depois aplicado numa câmara de *Neubauer* para se proceder à contagem celular.

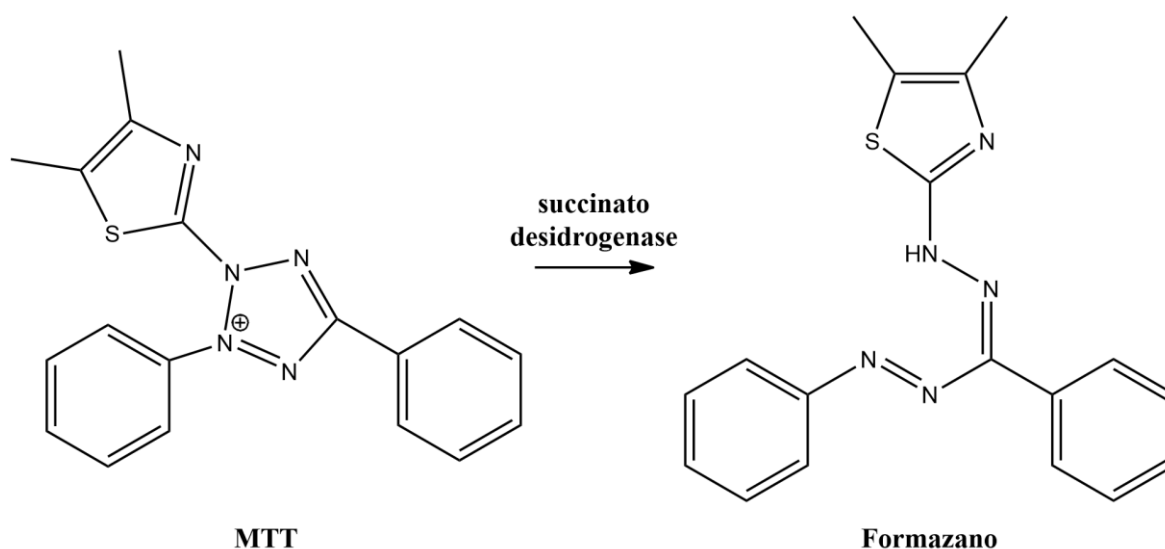
### **3.2.1.6 - Preparação das soluções de compostos**

Todos os compostos sintetizados foram dissolvidos em DMSO numa concentração de 10 mM e armazenados no congelador. A partir desta solução mãe, várias diluições foram preparadas com o respetivo meio de cultura antes de cada ensaio.

### **3.2.1.7 - Ensaio de viabilidade celular**

Existe uma variedade de métodos de quantificação da viabilidade celular, sendo o mais comum o método MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) por ser um método sensível e de fácil execução. Este é um método calorimétrico caracterizado pela redução do sal de tetrazólio de cor amarela em cristais roxos de formazano devido à succinato desidrogenase (**Figura 25**), uma enzima redutora que intervém no ciclo de krebs e na cadeia respiratória, ou seja, no metabolismo aeróbico das mitocôndrias de células viáveis. Estes cristais de formazano são insolúveis em

soluções aquosas e por isso devem ser dissolvidos em solventes orgânicos, como o dimetilsulfóxido (DMSO), para permitir a quantificação da sua absorvância por espectrofotometria visível com comprimento de onda de 570nm.<sup>112</sup>

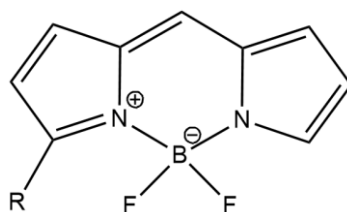


**Figura 25:** Redução do MTT em formazano por ação da succinato desidrogenase.

Para avaliar o efeito dos compostos sintetizados na proliferação celular, o ensaio MTT foi realizado 24 horas após a exposição das linhas celulares aos sais. O ensaio MTT foi realizado em 3 passos. No passo 1 foram semeadas em placas de 96 poços as células PNT1A (490.000 células/placa), LNCaP (1.400.000 células/placa) e PC3 (490.000 células/placa) com 100 µL de meio de cultura completo e depois incubadas por 24 horas. No passo 2, deu-se a aplicação do estímulo: para os ensaios de *screening* foram utilizadas as concentrações dos sais a 10 µM e 50 µM, enquanto para o estudo das curvas de concentração-resposta, para a análise da metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>), foram utilizadas as concentrações dos sais a 1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM e 200 µM, em meio de cultura completo e depois incubadas por 24 horas. No controlo negativo não foi aplicado o estímulo, e no controlo positivo foi aplicado uma solução de DMSO a 10%. No passo 3, após a exposição aos compostos, deu-se a aplicação do MTT, em meio simples sem vermelho de fenol. Após a incubação durante 4 horas a solução foi removida e uma solução de 100 µL de DMSO foi adicionada para dissolver os cristais de formazano obtendo-se uma solução de cor roxa. A absorvância foi depois medida usando o espectrofotómetro de absorção de microplacas xMark™ (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), a 570nm.

### 3.2.1.8 - Ensaio de influxo lipídico

O metabolismo celular envolve uma rede vital de vias para se atingir a homeostasia, e alterações a estas vias podem ser determinantes para desenvolver uma série de problemas. O uso de lípidos como fonte de nutrientes é de particular importância para o CP e, por isso, o estudo destas dependências metabólicas é relevante para idealizar uma estratégia terapêutica. O desenvolvimento de técnicas de imagem analíticas baseadas na detecção de marcadores fluorescentes levou ao descobrimento de marcadores com diferentes características e amplas aplicações que apoiam também o desenvolvimento de novos fármacos para restringir a absorção desses AG.<sup>113,114</sup> Neste âmbito, é de referir que o uso de técnicas de fluorescência traz uma série de vantagens em relação às técnicas colorimétricas, por serem mais sensíveis e seletivas. O 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indaceno, ou BODIPY (**Figura 26**), tem a característica de não ser polar e, portanto, fixa-se mais facilmente às bicamadas lipídicas. Além disso, tem uma forte banda de absorção na região azul-verde do espectro visível e um alto rendimento quântico de fluorescência e coeficiente de absorvidade molar, e por isso é adequado para a microscopia de fluorescência confocal.<sup>115</sup> Portanto, os AG marcados com BODIPY são marcadores eficazes para o estudo do metabolismo de lípidios.<sup>113,114</sup>



**Figura 26:** Bodipy. R- ácido gordo pretendido anexado.

O ensaio de avaliação do influxo lipídico foi feito em três passos. No passo 1 foram semeadas em placas de 96 poços as células PNT1A (490.000 células/placa), LNCaP (1.400.000 células/placa) e PC3 (490.000 células/placa) com 100  $\mu$ L de meio de cultura completo e depois incubadas por 24 horas. No passo 2, deu-se a aplicação do estímulo: para o ensaio de *screening* foi utilizado uma solução de 1  $\mu$ M de cada sal, e soluções de SSO em concentrações de 1  $\mu$ M e 25  $\mu$ M, em meio simples, sem vermelho de fenol, suplementado com 1% de soro desprovido de lípidos, e depois, as células foram incubadas por 24 horas. No controlo negativo não foi aplicado o estímulo. No passo 3 foi aplicada uma solução de Hoechst 3334 (ThermoFisher, 5  $\mu$ g/mL) e Bodipy C16, em meio simples sem vermelho de fenol, e deu-se a incubação durante 30 minutos. No controlo positivo não foi aplicado o Bodipy. Após esta incubação, as

células foram lavadas com meio simples e a fluorescência foi observada a 350-461nm, e 485-528nm para o Hoechst e Bodipy, respetivamente.

### **3.2.1.9 - Análise estatística**

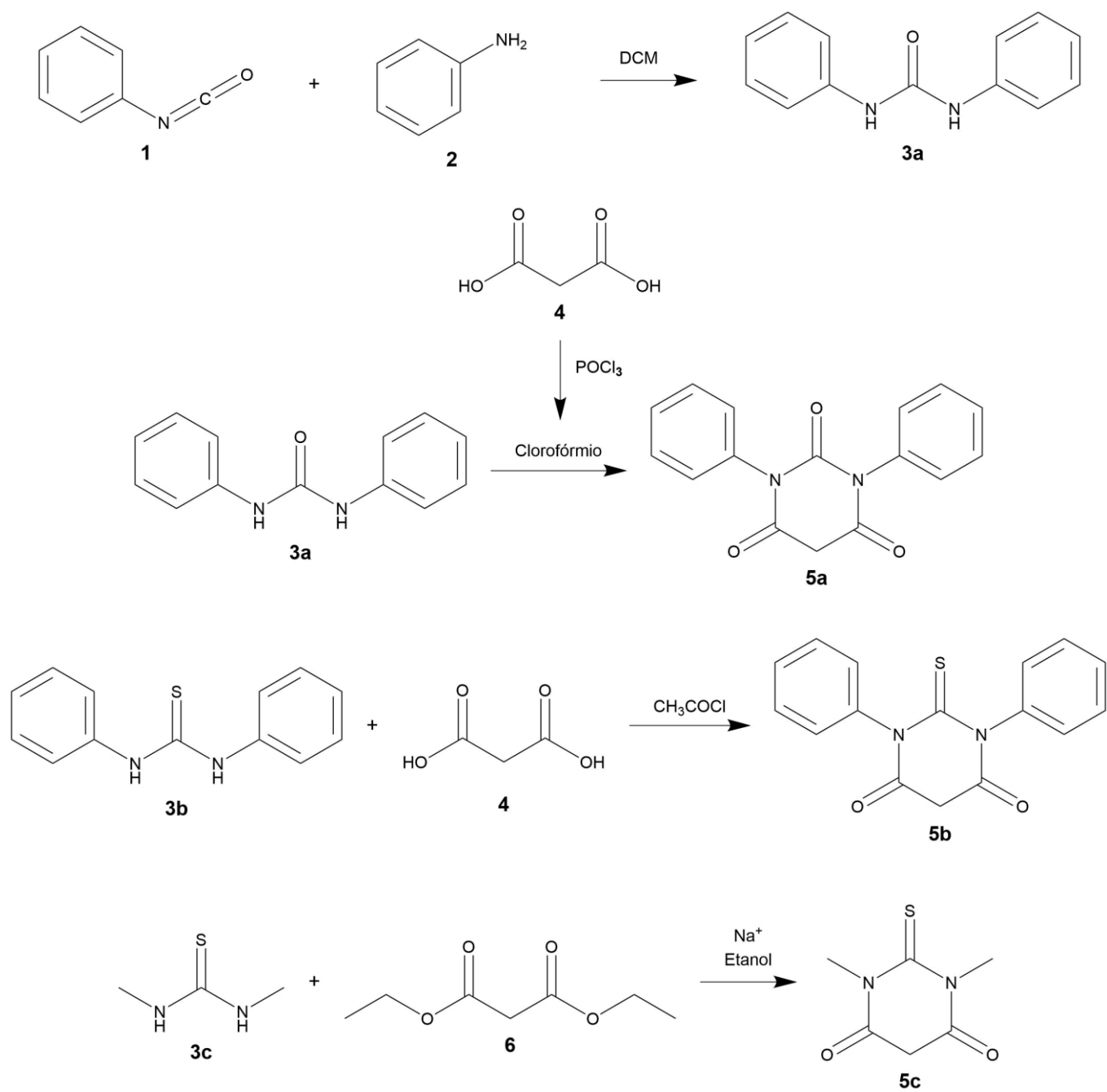
Os resultados obtidos foram tratados no programa de *software* Graphpad Prism v8.0.1. A significância estatística entre os diferentes grupos foi analisada pelo teste *t-Student* com correção 2way ANOVA. As diferenças significativas foram tidas em conta para valores de  $p < 0,05$ . Os valores experimentais estão apresentados sob a forma da média  $\pm$  desvio padrão. Os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos através da curva dose-resposta por cálculos de ajustamento sigmóide.

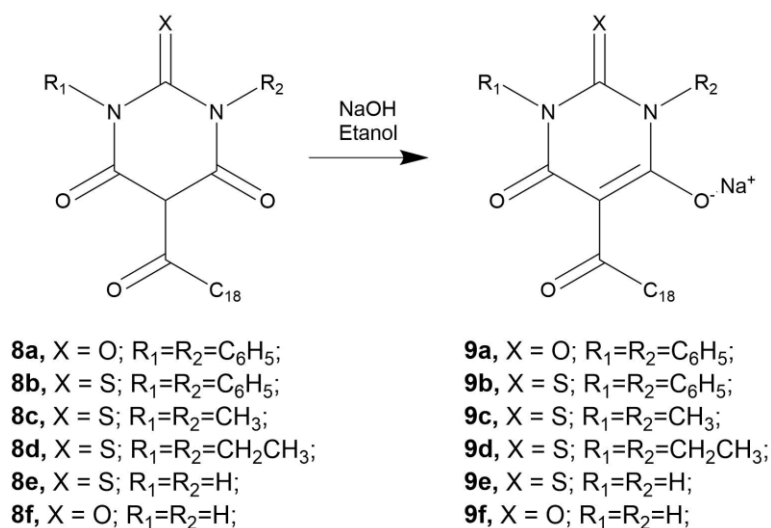
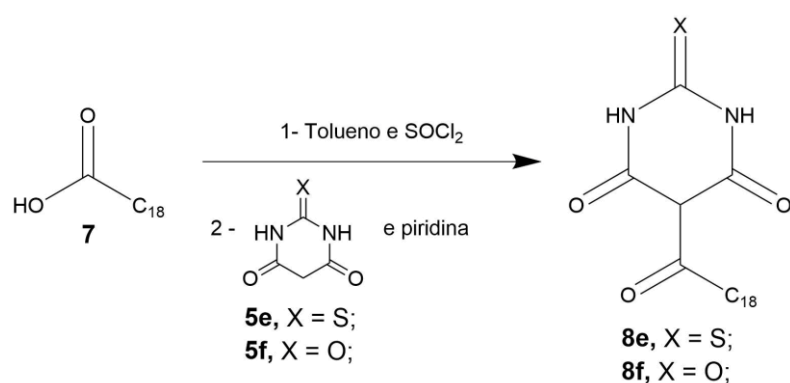
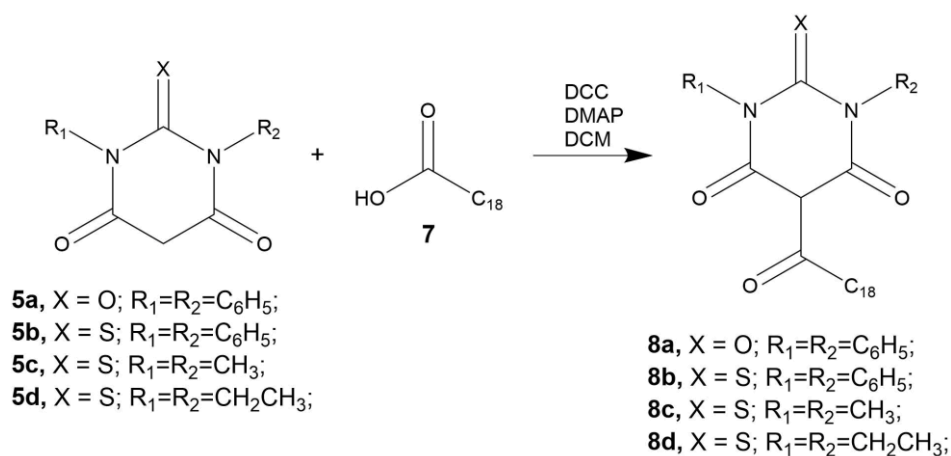
**Folha em branco**

# Capítulo 4 – Discussão de resultados

## 4.1 - Síntese química e caracterização estrutural

A síntese química efetuada está resumida no **esquema 10**, e serão apresentados os principais resultados associados e discussão dos mesmos seguidamente.





**Esquema 10:** Esquema global de todas as reações efetuadas.

#### 4.1.1 - Precursores

Os rendimentos dos precursores obtidos variaram bastante, entre rendimentos bons e muito bons (>78%, **tabela 2**) e rendimentos menos bons (<41%, **tabela 2**). O rendimento do produto **3a** era de esperar que fosse muito alto tal como já foi

amplamente descrito na literatura<sup>108</sup>. Este precursor foi sintetizado para servir de reagente na síntese do barbiturato **5a**. O rendimento deste precursor **5a**, foi inferior ao esperado (rendimento obtido 26%, rendimento esperado 65%). Neste caso, a reação foi efetuada sob refluxo, ao contrário daquilo que estava descrito na literatura.<sup>109</sup> O facto de ter sido recolhido apenas o sólido da primeira cristalização e subsequente filtração (mais puro), poderá justificar o rendimento baixo. Por outro lado, o precursor **5b** foi obtido com um bom rendimento (78%). Mais uma vez, a ligeira diminuição do rendimento relativamente ao esperado pode ser justificado pelo facto de apenas ter sido considerado o produto derivado da primeira cristalização e filtração, para se obter um maior nível de pureza. Para a síntese do precursor **5c**, foi adaptada uma reação descrita na literatura<sup>109</sup> direcionada à síntese do ácido 1-feniltiobarbitúrico e não do ácido 1,3-dimetiltiobarbitúrico. Assim, este método de síntese terá sido aplicado pela primeira vez para obter este produto, podendo necessitar de otimizações para se obter melhores rendimentos.

**Tabela 2:** Rendimentos obtidos e esperados para os precursores sintetizados.

Precursor	<b>3a</b>	<b>5a</b>	<b>5b</b>	<b>5c</b>
<b>Rendimento obtido</b>	93%	26%	78%	41%
<b>Rendimento esperado</b>	95% <sup>108</sup>	65% <sup>109</sup>	95% <sup>109</sup>	-

Os espectros RMN <sup>1</sup>H destes precursores apresentam todas as bandas de protões que se estaria à espera. Na 1,3-difenilureia (**3a**), os protões da ligação N-H aparecem como um singlete a  $\delta = 8,65$  ppm (**Tabela 3**). Este pico já não aparece no ácido 1,3-difenilbarbitúrico (**5a**), comprovando que a reação de síntese deste composto ocorreu (**Tabela 3**). Nos precursores **5a**, **5b** e **5c** foi verificado a presença de um singlete em  $\delta = 3,92$ ,  $4,03$  e  $3,60$  ppm, respetivamente (**Tabela 3**). Este pico é referente aos 2 hidrogénios do CH<sub>2</sub> presente no C5.

**Tabela 3:** Picos característicos dos precursores sintetizados.

Precursor	N-H	5 - CH <sub>2</sub>		
	<b>3a</b>	<b>5a</b>	<b>5b</b>	<b>5c</b>
<b>Desvio químico</b>	8.65 ppm	3.92 ppm	4.03 ppm	3.60 ppm

#### 4.1.2 - Produtos

De acordo com a informação de que dispomos, os produtos **8a-f** foram sintetizados pela primeira vez e, assim, não existe a caracterização destes descrita na literatura. O método de síntese para os produtos **8a-d** foi o mesmo, e os rendimentos obtidos

variaram bastante. Estas variações provavelmente devem-se à natureza dos substituintes dos ácidos (tio)barbitúricos. Por exemplo, a substituição do oxigénio em C2 por um enxofre leva a uma diminuição do rendimento (**Tabela 4**). De facto, e por exemplo, o rendimento do produto **8a** foi 74%, enquanto que para o equivalente com enxofre (**8b**) foi 42%. Além disso, os produtos com grupos fenilo apresentaram melhores rendimentos dos que os que têm grupos metilo. Para os produtos **8e-f**, foi necessário um outro método de síntese pois não foi possível sintetizar estes através do método anterior, uma vez que os ácidos (tio)barbitúricos, respetivos produtos e o subproduto das reações com DCC, a ciclohexilureia, são insolúveis em diclorometano, e assim é impossível separar eficazmente o produto pretendido.

Os rendimentos obtidos podiam ter sido ligeiramente superiores caso se considerasse o produto obtido das cristalizações e respetivas filtrações das águas mães resultantes da primeira cristalização. No entanto, os pontos de fusão medidos encontram-se dentro de um intervalo de temperatura pequeno, o que indica o seu alto nível de pureza. Os produtos **8e-f**, derivados do ácido barbitúrico e tiobarbitúrico, não contendo substituintes ligados ao azoto apresentaram pontos de fusão mais elevados (**Tabela 4**).

**Tabela 4:** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os produtos sintetizados.

<b>Produto</b>	<b>8a</b>	<b>8b</b>	<b>8c</b>	<b>8d</b>	<b>8e</b>	<b>8f</b>
<b>Rendimento obtido</b>	74%	42%	27%	65%	32%	44%
<b>Ponto de fusão</b>	68-70°C	82-85°C	52-53°C	130-135°C	172-173°C	169-170°C

Em todos os espectros de RMN  $^1\text{H}$ , foi evidenciada a presença de um multipeto entre  $\delta = 1,36 - 1,04$  ppm (**Tabela 5**) respeitante aos hidrogénios da maioria da cadeia carbonada ( $\text{CH}_2$ ) do ácido gordo. Com um desvio químico inferior a este, a  $\delta = 0,88 - 0,81$  ppm (**Tabela 5**), aparece um tripleto que representa o  $\text{CH}_3$  que está presente no término do ácido gordo. Adicionalmente, também foi evidenciada a presença de um tripleto entre  $\delta = 3,15 - 2,70$  ppm (**Tabela 5**), e um quinteto entre  $\delta = 1,69 - 1,46$  ppm (**Tabela 5**), que representam os carbonos 2 e 3 da cadeia carbonada do ácido gordo, respetivamente. Assim, terão sido obtidos os ácidos (tio)barbitúricos 1,3-dissubstituídos ligados ao ácido gordo.

**Tabela 5:** Picos característicos dos produtos sintetizados.

Produto	(C2) - CH <sub>2</sub>	(C3) - CH <sub>2</sub>	(C4-C17) - CH <sub>2</sub>	(C18) - CH <sub>3</sub>
<b>8a</b>	3,10 ppm	1,64 ppm	1,25-1,04 ppm	0,81 ppm
<b>8b</b>	2,70 ppm	1,46 ppm	1,28-1,19 ppm	0,85 ppm
<b>8c</b>	3,15 ppm	1,69 ppm	1,33-1,21 ppm	0,88 ppm
<b>8d</b>	3,13 ppm	1,69 ppm	1,32-1,22 ppm	0,87 ppm
<b>8e</b>	3,00 ppm	1,56 ppm	1,36-1,15 ppm	0,86 ppm
<b>8f</b>	3,01 ppm	1,57 ppm	1,33-1,21 ppm	0,85 ppm

### 4.1.3 - Sais

Todos os sais **9a-f**, foram obtidos pelo mesmo método. O rendimento destas reações foi, em geral, muito bom (77%, 56%, 73%, 84%, 95%, 94%, para **9a-f**, respetivamente, **tabela 6**). Foi observado também que na transformação dos produtos não ionizados nos seus sais sódicos o ponto de fusão aumentou substancialmente. Estes pontos de fusão encontram-se dentro de um intervalo pequeno o que indica uma elevada pureza. Através da análise dos espectros de massa de alta resolução, denotou-se que todas as massas moleculares esperadas coincidem com as massas moleculares obtidas experimentalmente. Relativamente aos espectros de RMN <sup>1</sup>H, não é possível discriminar alterações substanciais à posição dos picos, integração e multiplicidade, relativamente aos espectros dos produtos não ionizados. Relativamente aos espectros de RMN <sup>13</sup>C, verificou-se uma maior concentração de picos em  $\delta \sim 40\text{ppm}$ , que representam a cadeia carbonada do ácido gordo, e a  $\delta \sim 198\text{ppm}$  o grupo carbonilo característico do ácido gordo.

**Tabela 6:** Rendimentos e pontos de fusão obtidos para os sais sintetizados.

Sal	<b>9a</b>	<b>9b</b>	<b>9c</b>	<b>9d</b>	<b>9e</b>	<b>9f</b>
<b>Rendimento obtido</b>	77%	56%	73%	84%	95%	94%
<b>Ponto de fusão</b>	265 - 267°C	245 - 247°C	220 - 222°C	191 - 194°C	330 - 331°C	375 - 377°C

Relativamente aos espectros de FTIR, é de salientar a presença de bandas características das amidas (N-H) de **9e-f** entre 3150 e 3660 cm<sup>-1</sup>, as bandas dos alcanos do ácido gordo (-CH<sub>2</sub> e -CH<sub>3</sub>) em entre 2850 e 3000 cm<sup>-1</sup>, e sinal do carbonilo (C=O) entre 1640 e 1700 cm<sup>-1</sup>.

## 4.2 - Avaliação da atividade biológica

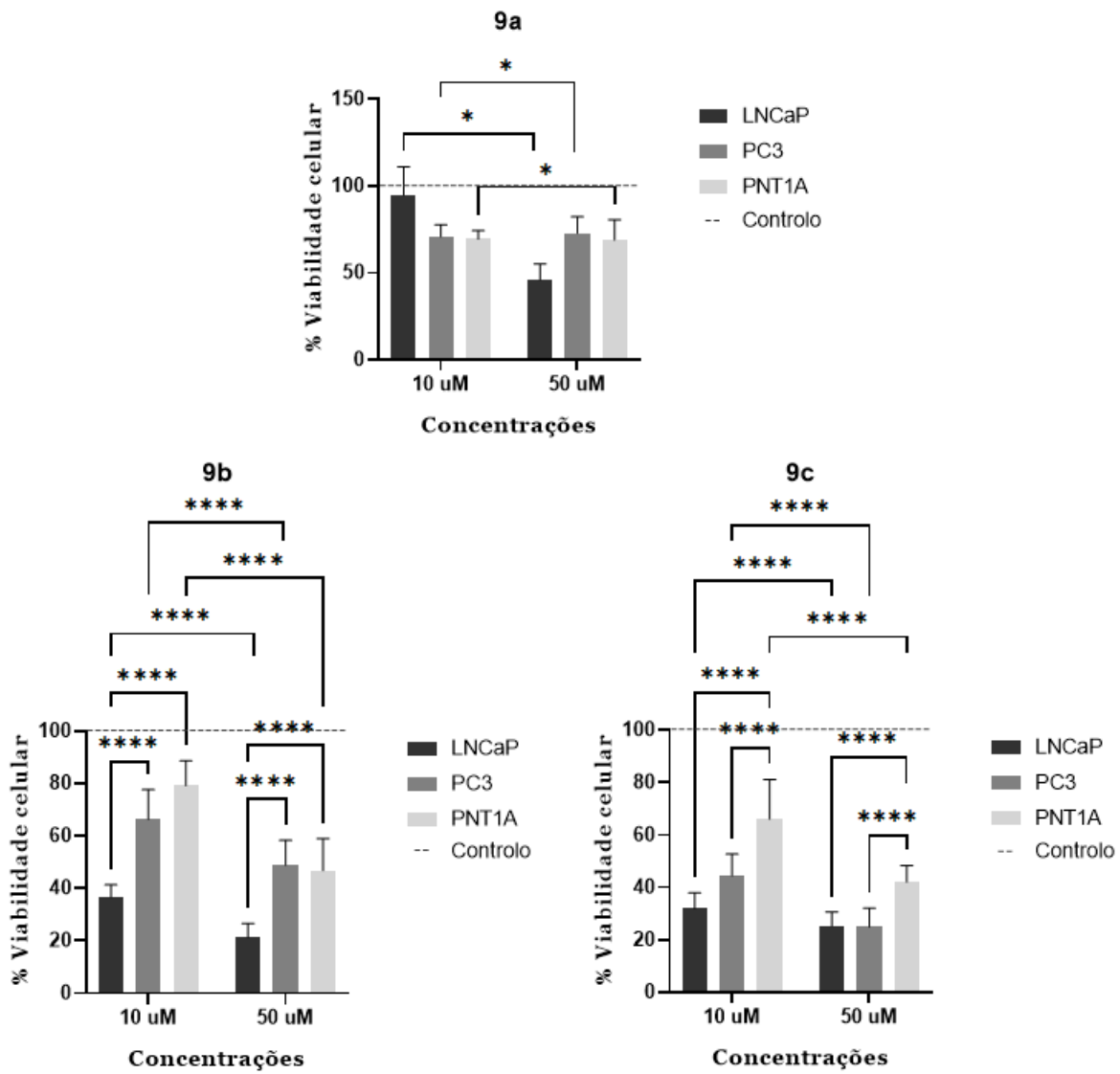
### 4.2.1 - Avaliação biológica - *Screening*

Após a síntese de compostos derivados dos ácidos (tio)barbitúricos, foram realizados ensaios MTT para avaliar o efeito destes na proliferação das células da próstata: PNT1A, LNCaP e PC3. Inicialmente foi realizado um *screening* destes compostos a concentrações de 10  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$ , para se ter uma ideia de como as células se comportariam na presença destes compostos. A citotoxicidade destes sais foi avaliada segundo a percentagem da viabilidade celular relativamente ao grupo controlo (100%) constituído por células que não foram submetidas ao estímulo dos sais e ao controlo positivo. Regra geral, foi verificado em todos os ensaios elaborados que havia uma diminuição da viabilidade de todas as linhas celulares com o aumento da concentração do sal.

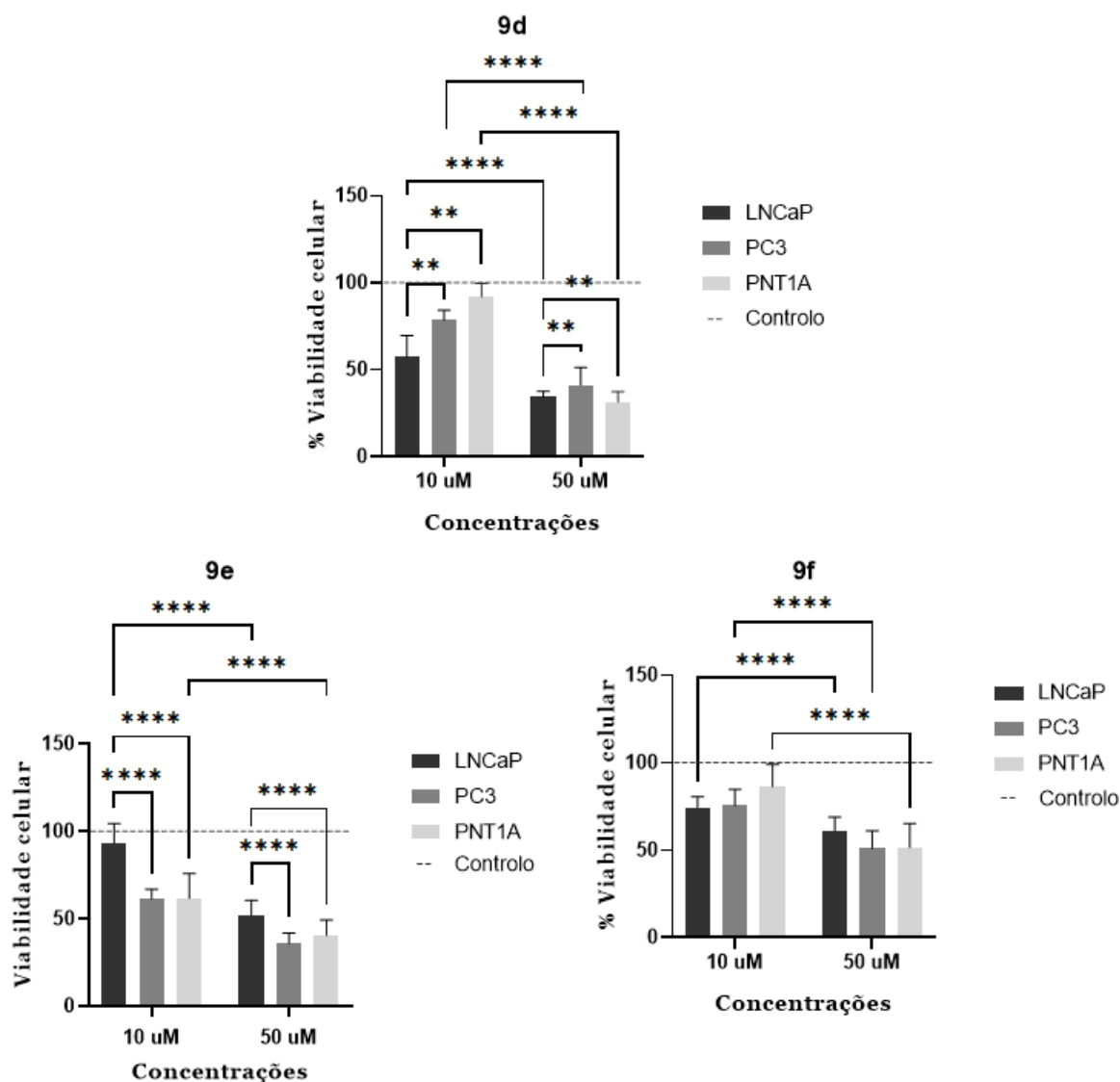
De acordo com as **figuras 27 e 28**, e a **tabela 7**, com o aumento da concentração de 10 para 50  $\mu\text{M}$ , as células LNCaP sofreram uma diminuição mais acentuada da viabilidade celular quando foram tratadas com o sal **9a** (94,74% para 46,08%), seguido do sal **9e** (93,55% para 52,17%), do **9f** (74,59% para 61,33%) e **9d** (57,72% para 34,35%). Nos sais **9b e 9c**, a concentrações de 10 $\mu\text{M}$ , já se observa uma percentagem de viabilidade de apenas 36,66% e 31,93%, respetivamente, o que significa que estes sais parecem ter uma maior potência inibitória para estas células.

Para as células PC3, a diminuição da viabilidade com o aumento da concentração de 10 para 50  $\mu\text{M}$  foi mais acentuada para o sal **9d** (78,62% para 41,37%), seguido de **9e** (61,53% para 35,91%), **9f** (75,57% para 50,94%) e **9b** (66,29% para 48,82%). O aumento da concentração do sal **9a** de 10 para 50  $\mu\text{M}$  não revelou ter influência na viabilidade celular. O sal **9c** foi aquele que apresentou uma maior potência inibitória uma vez que a concentração 10  $\mu\text{M}$  já apresentava uma % de inibição de 44,48%.

Finalmente, para as células PNT1A, verificou-se que o sal **9d** foi aquele que apresentou uma maior diminuição da viabilidade celular (92% para 31,46%) com o aumento da concentração no *screening*, seguido do composto **9b** (76,36% para 49,80%), **9f** (87,07% para 51,58%), **9e** (67,69% para 45,77%) e **9c** (64,25% para 44,04%). Para o sal **9a**, o aumento da concentração até 50  $\mu\text{M}$ , não levou a alterações significativas na viabilidade celular.



**Figura 27:** Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando tratadas com os sais 9a, 9b e 9c durante 24 horas, nas concentrações de 10 e 50 $\mu$ M. Os resultados estão expressos em % relativamente ao grupo controlo. As barras de erro representam o desvio padrão (SD, do inglês, *Standard deviation*) (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).



**Figura 28:** Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando tratadas com os sais 9d, 9e e 9f durante 24 horas, nas concentrações de 10 e 50μM. Os resultados estão expressos em % relativamente ao grupo controlo. As barras de erro representam o desvio padrão (SD, do inglês, *Standard deviation*) (\* p<0,05; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001).

**Tabela 7:** Valores das médias das viabilidades celulares e desvios padrões obtidos.

Célula	LNCaP		PC3		PNT1A	
	10μM	50μM	10μM	50μM	10μM	50μM
<b>9a</b>	94,74 ± 15,19	46,08 ± 8,35	70,79 ± 6,16	72,76 ± 8,54	68,03 ± 3,72	68,28 ± 12,89
<b>9b</b>	36,66 ± 4,33	21,29 ± 4,91	66,29 ± 10,85	48,82 ± 9,07	76,36 ± 8,30	49,80 ± 11,73
<b>9c</b>	31,93 ± 5,64	25,27 ± 4,98	44,48 ± 7,69	24,98 ± 6,71	64,25 ± 14,28	44,04 ± 3,38
<b>9d</b>	57,72 ± 11,17	34,35 ± 3,12	78,62 ± 5,29	41,37 ± 9,66	92,00 ± 7,24	31,46 ± 5,70
<b>9e</b>	93,55 ± 10,31	52,17 ± 7,86	61,53 ± 5,22	35,91 ± 5,74	67,69 ± 11,45	45,77 ± 5,13
<b>9f</b>	74,59 ± 5,62	61,33 ± 7,10	75,57 ± 8,68	50,94 ± 9,35	87,07 ± 9,68	51,58 ± 12,81

#### **4.2.2 - Avaliação biológica - IC<sub>50</sub>**

Seguidamente, para completar os estudos de viabilidade celular, foram elaborados estudos de curvas concentração-resposta (IC<sub>50</sub>) (**Figuras 29, 30 e 31**). Apesar de terem sido efetuados ensaios de *screening*, dados os resultados obtidos nestes primeiros estudos e pelo facto de não serem muitos compostos a testar, decidiu-se determinar o IC<sub>50</sub> para todos os sais. O procedimento destes ensaios foi igual aos ensaios de *screening*, com a diferença que, neste caso, foram avaliadas mais concentrações de cada um dos sais (1 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM). Sais com índice de seletividade superior a dois foram considerados como tendo potencial seletivo significativo, assim como está descrito em Paiva *et al.*<sup>116</sup>

##### **4.2.2.1 - Sal 9a**

Concentrações de 1µM, 5µM e 10µM do sal **9a**, não surtiram efeito significativo sobre a proliferação celular das células LNCaP. No entanto, a 50µM já se observou uma diminuição significativa da mesma. Relativamente às células PC3 e PNT1A o gráfico do IC<sub>50</sub> sugere uma diminuição gradual, e não significativa, respetivamente, da viabilidade celular até 50 µM, a partir da qual a viabilidade começa a diminuir mais severamente. As concentrações IC<sub>50</sub> calculadas foram 43,84, 51,90 e 63,34 µM para as células LNCaP, PC3 e PNT1A, respetivamente. Assim, este composto não demonstra uma seletividade significativa para os diferentes estágios das células de CP.

##### **4.2.2.2 - Sal 9b**

A partir de concentrações de 1µM já se verificou uma diminuição da viabilidade celular acentuada para as células LNCaP, enquanto que para as células PC3 houve uma diminuição mais gradual da viabilidade. Para as células PNT1A, também se verificou-se uma diminuição gradual até 10 µM, e uma diminuição mais acentuada a partir desta concentração. As concentrações IC<sub>50</sub> calculadas foram 7,05, 39,73 e 31,12 µM para as células LNCaP, PC3 e PNT1A, respetivamente. Assim, este composto mostra uma seletividade para as células LNCaP, uma vez que tem um índice de seletividade de 4,41.

##### **4.2.2.3 - Sal 9c**

Para as células LNCaP e PC3, a 1 µM já se observou uma diminuição da % da viabilidade celular em 68,11% e 50,49%, respetivamente. As células PNT1A tiveram uma diminuição mais acentuada a partir dos 5µM. As concentrações IC<sub>50</sub> calculadas foram 1,43, 27,32 e 10,31 µM para as células LNCaP, PC3 e PNT1A, respetivamente.

Assim, este composto mostra uma seletividade para as células LNCaP, uma vez que tem um índice de seletividade de 7,21.

#### **4.2.2.4 - Sal 9d**

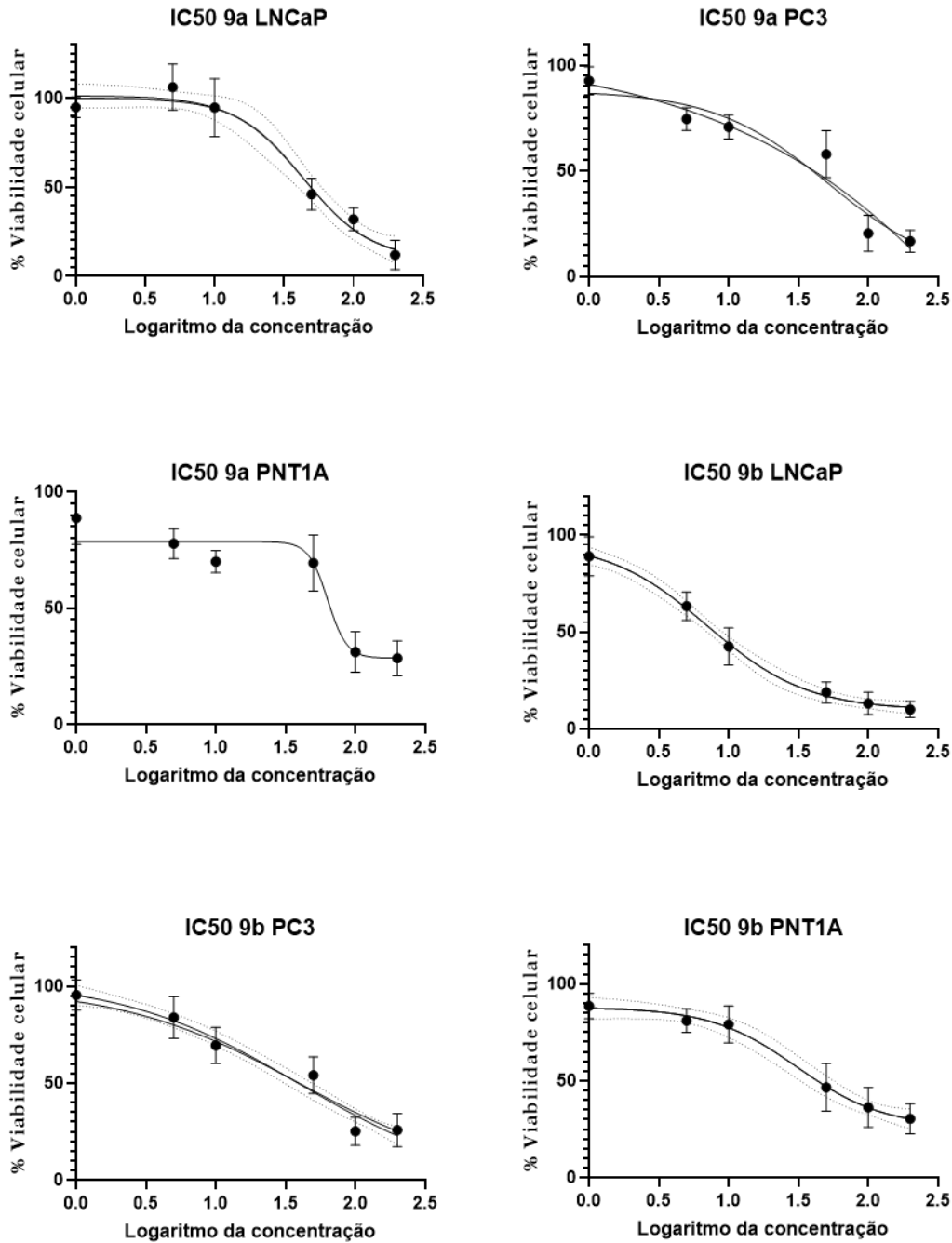
Para este sal, foi observado para todas as culturas celulares a mesmo delineamento de resultados, uma vez que a diminuição da viabilidade celular teve maior acentuação a partir de 10  $\mu\text{M}$ , embora mais abrupto nas células PNT1A. As concentrações  $\text{IC}_{50}$  calculadas foram 22,94, 22,17 e 23,80  $\mu\text{M}$  para as células LNCaP, PC3 e PNT1A, respetivamente. Assim, este sal não apresenta seletividade para as células cancerígenas.

#### **4.2.2.5 - Sal 9e**

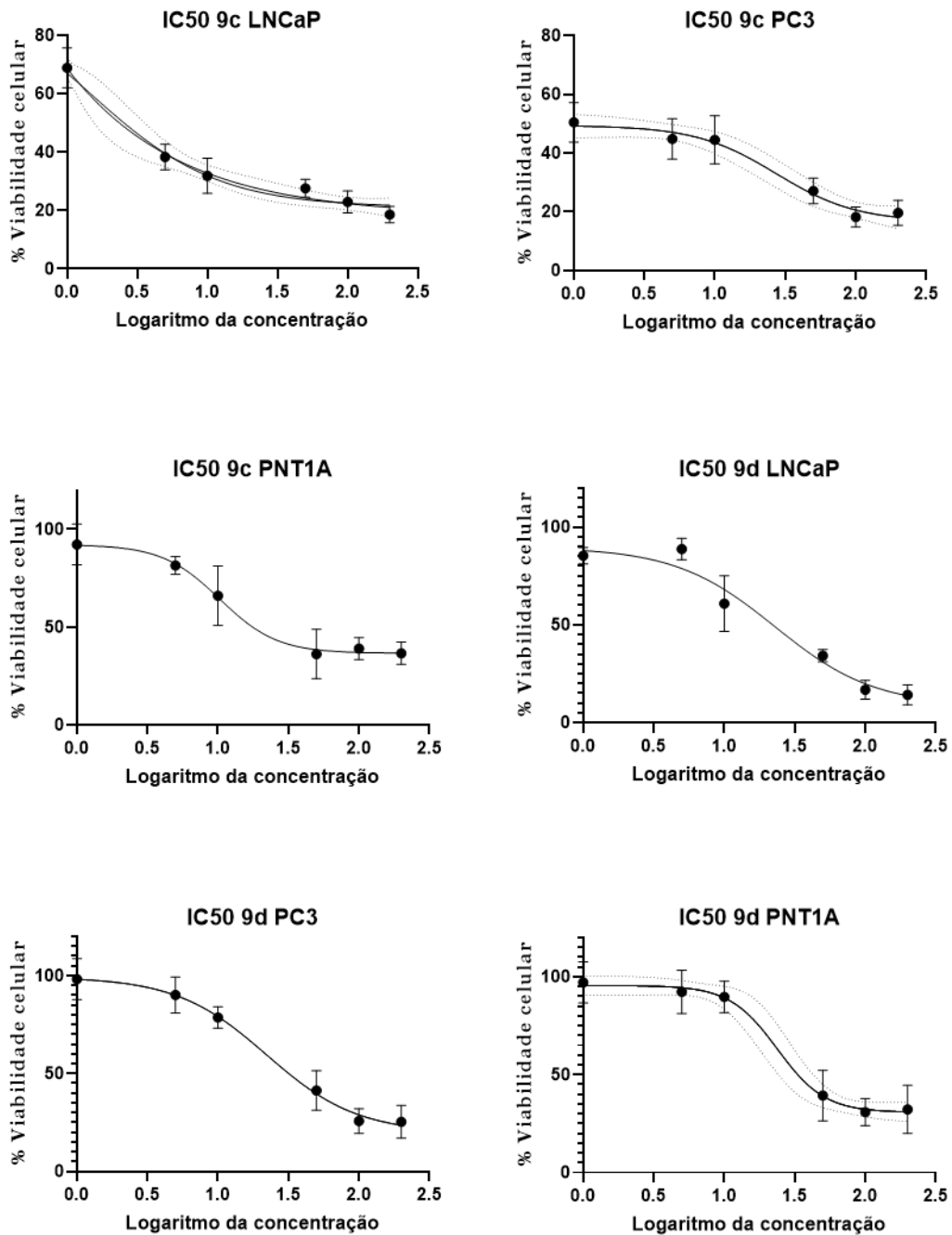
Para as células LNCaP e PNT1A foi verificado uma diminuição significativa da viabilidade celular a partir de 10  $\mu\text{M}$ , enquanto que para as células PC3, a partir de 1  $\mu\text{M}$ , já houve uma diminuição significativa da viabilidade. As concentrações  $\text{IC}_{50}$  calculadas foram 43,43, 11,69 e 37,36  $\mu\text{M}$  para as células LNCaP, PC3 e PNT1A, respetivamente. Assim, este sal apresenta seletividade para a cultura celular PC3, uma vez que tem um índice de seletividade de 3,20.

#### **4.2.2.6 - Sal 9f**

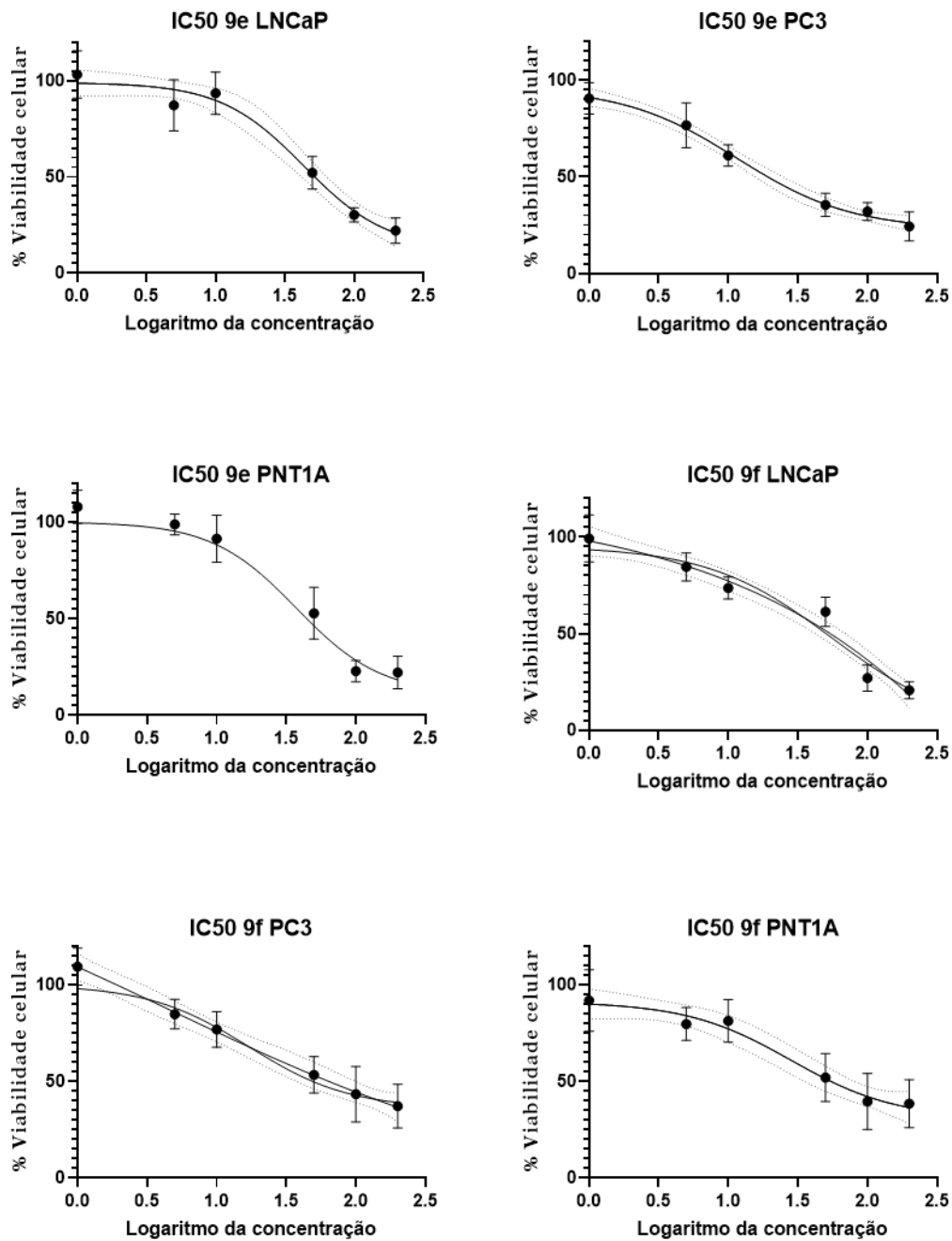
Para as células LNCaP foi verificado uma diminuição mais acentuada a partir de 50  $\mu\text{M}$ , enquanto que para as células PC3 e PNT1A este fenómeno denotou-se a partir de 10  $\mu\text{M}$ . As concentrações  $\text{IC}_{50}$  calculadas foram 55,98, 17,04 e 28,25  $\mu\text{M}$  para as células LNCaP, PC3 e PNT1A, respetivamente. Assim, este sal não apresenta seletividade para as células de CP.



**Figura 29:** Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9a e 9b, a concentrações de 1µM, 5µM, 10µM, 50µM, 100µM e 200µM. Os resultados obtidos permitiram obter a concentração destes sais que diminuem a viabilidade celular em 50% (IC<sub>50</sub>).



**Figura 30:** Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9c e 9d, a concentrações de  $1\mu\text{M}$ ,  $5\mu\text{M}$ ,  $10\mu\text{M}$ ,  $50\mu\text{M}$ ,  $100\mu\text{M}$  e  $200\mu\text{M}$ . Os resultados obtidos permitiram obter a concentração destes sais que diminuem a viabilidade celular em 50% ( $\text{IC}_{50}$ ).



**Figura 31:** Viabilidade celular das células LNCaP, PC3 e PNT1A, quando submetidas ao estímulo do sal 9e e 9f, a concentrações de 1 $\mu$ M, 5 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M e 200 $\mu$ M. Os resultados obtidos permitiram obter a concentração destes sais que diminuem a viabilidade celular em 50% (IC<sub>50</sub>).

**Tabela 8:** Valores de IC<sub>50</sub> obtidos assim como o coeficiente de correlação.

Célula	LNCaP		PC3		PNT1A	
	IC <sub>50</sub> (μM)	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	R <sup>2</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)	R <sup>2</sup>
<b>9a</b>	43,84	0,91	51,9	0,88	63,34	0,83
<b>9b</b>	7,05	0,94	39,73	0,87	31,12	0,88
<b>9c</b>	1,43	0,92	27,32	0,83	10,31	0,85
<b>9d</b>	22,94	0,93	22,17	0,93	23,8	0,89
<b>9e</b>	43,43	0,91	11,69	0,92	37,36	0,91
<b>9f</b>	55,98	0,89	17,04	0,84	28,25	0,74

Para concluir, foi observado que para a cultura celular LNCaP, a presença de um enxofre na posição C2 ao invés de um oxigênio, ofereceu uma maior citotoxicidade. Similarmente, em C1 e C3, a presença de grupos difenil apresentam maior citotoxicidade, seguido dos grupos dimetil, dietil e grupos com o hidrogênio.

Para a cultura celular PC3, o enxofre em C2 apresentam maior citotoxicidade do que o oxigênio. Nas ligações C1 e C3, os grupos hidrogênio apresentam maior citotoxicidade, seguidos dos grupos dietil, dimetil e difenil.

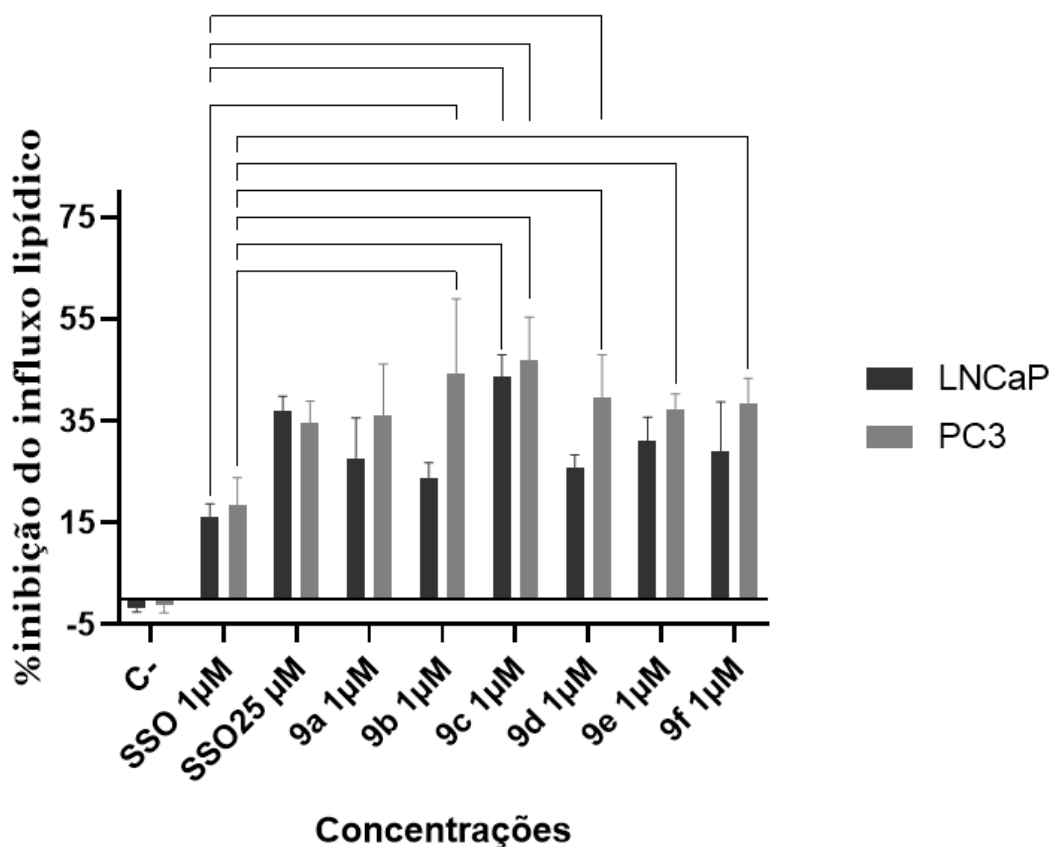
Para a cultura celular PNT1A, não foi possível determinar uma relação direta entre as estruturas presentes e a citotoxicidade.

#### **4.2.3 - Ensaio de influxo lipídico**

Após os ensaios de análise da viabilidade celular por MTT, foram elaborados ensaios de avaliação da capacidade dos sais sintetizados inibirem o influxo de lípidos para a célula através da atividade do CD36. Neste caso, foi realizado um *screening* com concentrações 1 μM dos sais sintetizados comparativamente com o inibidor de CD36 disponível comercialmente, o SSO,<sup>107</sup> usado nas concentrações 1 μM e 25 μM. O *screening* dos sais a 1 μM permite uma comparação direta com os resultados obtidos do SSO a 1 μM. Assim, poder-se-á ter uma ideia de como se comportarão os sais a 25 μM.

Segundo os resultados descritos na **tabela 9**, foi evidenciado efetivamente que os sais sintetizados provocam uma diminuição do influxo lipídico nas células cancerígenas LNCaP e PC3. O SSO já foi identificado como um inibidor de CD36 e conseqüentemente do influxo lipídico.<sup>107</sup> O estudo do efeito do SSO a 25 μM no influxo lipídico foi levado a cabo uma vez que já foi descrito na literatura que a esta concentração, foi observada uma diminuição de 50% (IC<sub>50</sub>) do influxo de lipoproteínas de baixa densidade oxidadas através do CD36 por macrófagos.<sup>107</sup> De acordo com os

resultados descritos na **tabela 8** e **tabela 9**, não foi possível estabelecer uma relação direta entre o IC<sub>50</sub> da viabilidade celular e a inibição do influxo lipídico a 1  $\mu$ M. No entanto, todos os sais sintetizados apresentam maior capacidade inibitória do que o SSO. De facto, nas células LNCaP, o sal **9c** apresenta maior taxa inibitória (43,73%) seguido por **9e** (31,17%), **9f** (29,02%), **9a** (27,20%), **9d** (25,90%) e por fim **9b** (23,86%). Para as células PC3, o sal **9c**, apresenta maior capacidade inibitória (46,89), seguido de **9b** (44,42%), **9d** (39,70%), **9f** (38,41%), **9e** (37,16%) e por fim **9a** (36,22%).



**Figura 32:** Influxo lipídico nas células LNCaP e PC3 quando tratadas com os sais 9a-f, nas concentrações de 1  $\mu$ M, ou com o SSO (1  $\mu$ M e 25  $\mu$ M). Os resultados estão expressos em % relativamente ao grupo controlo. As barras de erro representam o desvio padrão (SD, do inglês, *Standard deviation*). A significância estatística indicada pelas linhas acima das barras é  $p < 0,0001$ .

**Tabela 9:** Valores das médias do influxo lipídico e desvios padrão obtidos.

<b>Célula</b>	<b>LNCaP</b>	<b>PC3</b>
<b>Sal</b>	<b>Inibição do fluxo lipídico (%)</b>	
<b>9a (1µM)</b>	27,70 ± 6,85	36,22 ± 9,34
<b>9b (1µM)</b>	23,86 ± 2,54	44,42 ± 13,67
<b>9c (1µM)</b>	43,73 ± 3,65	46,89 ± 7,97
<b>9d (1µM)</b>	25,90 ± 2,11	39,70 ± 7,71
<b>9e (1µM)</b>	31,17 ± 4,00	37,16 ± 2,92
<b>9f (1µM)</b>	29,02 ± 8,40	38,41 ± 4,59
<b>SSO (1µM)</b>	16,24 ± 2,13	18,43 ± 5,07
<b>SSO (25µM)</b>	37,00 ± 2,52	34,73 ± 3,88

Comparativamente, um estudo onde culturas celulares PC3 e LNCaP transfectadas com *shortpin* RNA (shRNA), de modo a inibir o CD36, verificou-se uma diminuição do influxo lipídico em 35% e aproximadamente 20% para as culturas PC3 e LNCaP, respetivamente,<sup>104</sup> o que apoia o interesse do potencial inibitório dos compostos sintetizados.

**Folha em branco**

## Capítulo 5 – Conclusões e perspectivas futuras

O objetivo geral desta dissertação foi o desenvolvimento de uma série de compostos derivados de ácidos (tio)barbitúricos *N1,N3*-disubstituídos acoplados em C5 a uma molécula do ácido gordo de cadeia saturada com 18 carbonos, o ácido esteárico, e o estudo dos seus potenciais efeitos terapêuticos no tratamento do CP.

O efeito dos compostos sintetizados foi avaliado em 3 linhas celulares de próstata humana, a linha celular não neoplásica PNT1A, a linha celular neoplásica LNCaP que é responsiva a androgénios e que, por isso, é representativa de uma situação de estágio inicial do CP, e a linha celular neoplásica PC3, que não é responsiva a androgénios e, assim, é representativa de uma situação de estágio avançado do CP.

Desta forma, foram realizados ensaios de avaliação da atividade antiproliferativa dos compostos sintetizados, onde foi observado que os sais **9b** e **9c** reduziram significativamente a proliferação celular apresentando seletividade para a linha celular LNCaP, e que o sal **9e** apresentou seletividade significativa para a linha celular PC3. Foram também realizados estudos do influxo lipídico com base na análise da incorporação do AG fluorescente Bodipy C16. Foi observado que todos os compostos sintetizados apresentaram significativa capacidade inibitória da incorporação do Bodipy C16, especialmente o sal **9c**, que foi aquele que apresentou maior inibição, comparativamente com o SSO, um inibidor de CD36 já estudado na literatura.<sup>107</sup>

No entanto, a inibição de CD36 pode levar as células cancerígenas a procurarem um método alternativo para adquirirem AG, como a biossíntese *de novo*, por ativação de FASN e as enzimas relacionadas com a mesma. Assim a inibição combinada de CD36 e FASN pode fornecer uma diminuição tumoral mais eficaz e promissora.<sup>104</sup> Ao mesmo tempo, a inibição de FASN pode levar à adoção de um mecanismo compensatório, onde células cancerígenas aumentam a expressão de CD36 para melhorar a disponibilidade de ácidos gordos.<sup>117</sup>

Assim, foram sintetizados compostos que têm potencial terapêutico para um estágio inicial e avançado do CP e que poderão avançar para estudos futuros, de forma a aprofundar o conhecimento do seu potencial terapêutico e dos seus mecanismos de ação. Desta forma, seria interessante desenvolver um pouco mais o estudo da inibição destes compostos no influxo lipídico, assim como a interação destes com outras proteínas que interagem bioquimicamente com o metabolismo dos ácidos gordos.

**Folha em branco**

## Capítulo 6 – Referências

1. Mohs RC, Greig NH. Drug discovery and development: Role of basic biological research. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv.* 2017;3(4):651-657. doi:10.1016/j.trci.2017.10.005
2. Ng R. History of drug discovery and development. In: *Drugs: From Discovery to Approval.* 2nd Ed. (Wiley-Blackwell); 2009:391-397.
3. Sherman S. The exotic world of Pierre Pomet's. *A Compleat History of Druggs. Endeavour.* 2004;28(4):156-160. doi:10.1016/j.endeavour.2004.09.002
4. Cragg GM, Newman DJ. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. *Pure Appl Chem.* 2005;77(1):7-24. doi:10.1351/pac200577010007
5. Brook K, Bennett J, Desai SP. The Chemical History of Morphine: An 8000-year Journey, from Resin to de-novo Synthesis. *J Anesth Hist.* 2017;3(2):50-55. doi:10.1016/j.janh.2017.02.001
6. Lobay D. Rauwolfia in the Treatment of Hypertension. *Integr Med.* 2015;14(3):40-46.
7. Hughes JP, Rees S, Kalindjian SB, et al. Principles of early drug discovery. *Br J Pharmacol.* 2011;162(6):1239-1249. doi:10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x
8. Gupta M, Sharma R, Kumar A. Docking techniques in pharmacology: How much promising? *Comput Biol Chem.* 2018;76:210-217. doi:10.1016/j.compbiolchem.2018.06.005
9. Pires DE V, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem.* 2015;58(9):4066-4072. doi:10.1021/acs.jmedchem.5b00104
10. Lombardino JG, Lowe III JA. The role of the medicinal chemist in drug discovery - Then and now. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3:853-862. doi:10.1038/nrd1523

11. BD Amol, RD Jayprabha, VW Hrushikesh, et al. The Stages of Drug Discovery and Development Process. *Asian J Pharm Res Dev.* 2019;7(6):62-67. doi:10.22270/ajprd.v7i6.616
12. Follis AV. Centrality of drug targets in protein networks. *BMC Bioinformatics.* 2021;22(527):1-29. doi:10.1186/s12859-021-04342-x
13. López-muñoz F, Ucha-udabe R. The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2005;1(4):329-343.
14. S. Furniss B, J. Hannaford A, W. G. S, R. Tatchell A. *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry.* 5th Ed. (Pearson); 1989.
15. Cozanitis DA. One hundred years of barbiturates and their saint. *J R Soc Med.* 2004;97(12):594-598. doi:10.1258/jrsm.97.12.594
16. Mathers DA, Wan X, Puil E. Barbiturate activation and modulation of GABAA receptors in neocortex. *Neuropharmacology.* 2007;52(4):1160-1168. doi:10.1016/j.neuropharm.2006.12.004
17. Lemke TL, Williams DA. Sedative-Hypnotics. In: Foye's Principles of Medicinal Chemistry. 7th Ed. (Lippincott Williams and Wilkins); 2013:485-507.
18. Laxmi SV, Rajitha G, Rajitha B, Rao AJ. Photochemical synthesis and anticancer activity of barbituric acid, thiobarbituric acid, thiosemicarbazide, and isoniazid linked to 2-phenyl indole derivatives. *J Chem Biol.* 2015;9(2):57-63. doi:10.1007/s12154-015-0148-y
19. Xue M, Xu M, Lu W, et al. Synthesis, activity evaluation, and docking analysis of barbituric acid aryl hydrazone derivatives as barbituric acid aryl hydrazone derivatives as RSK2 inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2013;28(4):747-752. doi:10.3109/14756366.2012.681651
20. Ruivo SD. Desenvolvimento de fármacos inibidores de CD36 com potencial terapêutico no cancro da próstata. 2021. Dissertação de mestrado em Bioquímica na UBI
21. Bhavsar A, Verma S. Anatomic Imaging of the Prostate. *BioMed Res I.* 2014;2014(728539). doi:10.1155/2014/728539

22. Alshahrani S, McGill J, Agarwal A. Prostatitis and male infertility. *J Reprod Immunol.* 2013;100(1):30-36. doi:10.1016/j.jri.2013.05.004
23. Ali M, Johnson IP, Hobson J, Mohammadi B, Khan F. Anatomy of the Pelvic Plexus and Innervation of the prostate Gland. *Clin Anat.* 2004;17(2):123-129. doi:10.1002/ca.10187
24. Jones RE, Lopez KH. The Male Reproductive System. In: *Human Reproductive Biology.* 3rd Ed. (Academic Press); 2006:98. doi:10.1016/C2009-0-02024-8
25. Selman SH. The McNeal Prostate: A Review. *Urology.* 2011;78(6):1224-1228. doi:10.1016/j.urology.2011.07.1395
26. Wang G, Zhao D, Spring DJ, Depinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev.* 2018;32(17-18):1105-1140. doi:10.1101/gad.315739.118.GENES
27. Rawla P. Epidemiology of Prostate Cancer. *World J Oncol.* 2019;10(2):63-89. doi:10.14740/wjon1191
28. Giona S. The Epidemiology of Prostate Cancer. In: *Prostate Cancer.* (Exon Publications); 2021:1-15. doi:10.36255/exonpublications.prostatecancer.epidemiology.2021
29. Wang L, Lu B, He M, Wang Y, Wang Z, Du L. Prostate Cancer Incidence and Mortality: Global Status and Temporal Trends in 89 Countries From 2000 to 2019. *Front Public Heal.* 2022;10(811044). doi:10.3389/fpubh.2022.811044
30. Merriel SWD, Funston G, Hamilton W. Prostate Cancer in Primary Care. *Adv Ther.* 2018;35(9):1285-1294. doi:10.1007/s12325-018-0766-1
31. Pina F, Castro C, Ferro A, Bento MJ, Lunet N. Prostate cancer incidence and mortality in Portugal: trends, projections and regional differences. *Eur J Cancer Prev.* 2017;26(5):404-410. doi:10.1097/CEJ.000000000000285
32. Yabroff KR, Wu X, Negoita S, et al. Association of the COVID-19 Pandemic With Patterns of Statewide Cancer Services. *J Natl Cancer Inst.* 2021;114(6):907-909. doi:10.1093/jnci/djab122
33. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J Clin.* 2022;72(1):7-33. doi:10.3322/caac.21708

34. Bratt O, Drevin L, Akre O, Garmo H, Stattin P. Family History and Probability of Prostate Cancer, Differentiated by Risk Category: A Nationwide Population-Based Study. *J Natl Cancer Inst.* 2016;108(10):1-7. doi:10.1093/jnci/djw110
35. Barber L, Gerke T, Markt SC, et al. Family history of breast or prostate cancer and prostate cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2018;24(23):5910-5917. doi:10.1158/1078-0432.CCR-18-0370
36. Cozar JM, Robles-Fernandez I, Martinez-Gonzalez LJ, et al. Genetic markers a landscape in prostate cancer. *Mutat Res Mutat Res.* 2018;775:1-10. doi:10.1016/j.mrrev.2017.11.004
37. Sharma M, Yang Z, Miyamoto H. Loss of DNA mismatch repair proteins in prostate cancer. *Med.* 2020;99(19):e20124. doi:10.1097/MD.00000000000020124
38. Stark T, Livas L, Kyprianou N. Inflammation in prostate cancer progression and therapeutic targeting. *Transl Androl Urol.* 2014;4(4):455-463. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2015.04.12
39. Klein EA, Casey G, Silverman R. Genetic susceptibility and oxidative stress in prostate cancer: Integrated model with implications for prevention. *Urology.* 2006;68(6):1145-1151. doi:10.1016/j.urology.2006.08.1074
40. Oczkowski M, Dziendzikowska K, Pasternak-winiarska A, Włodarek D, Gromadzka-ostrowska J. Dietary Factors and Prostate Cancer Development, Progression, and Reduction. *Nutrients.* 2021;13(2):496. doi:10.3390/nu13020496
41. Roehrborn CG. Benign Prostatic Hyperplasia: An Overview. *Rev Urol.* 2005;7 Suppl 9(Suppl 9):S3-S14.
42. Descotes J. Diagnosis of prostate cancer. *Asian J Urol.* 2019;6(2):129-136. doi:10.1016/j.ajur.2018.11.007
43. Jones D, Friend C, Dreher A, Allgar V, Macleod U. The diagnostic test accuracy of rectal examination for prostate cancer diagnosis in symptomatic patients: a systematic review. *BMC Fam Pract.* 2018;19(1):79. doi:10.1186/s12875-018-0765-y
44. Malley KJO, Eisermann K, Pascal LE, et al. Proteomic analysis of patient tissue reveals PSA protein in the stroma of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 2015;74(8):892-900. doi:10.1002/pros.22807.Proteomic

45. Shih W, Collins J, Mitchell B, Wierzbinski B. Serum PSA and PAP measurements discriminating patients with prostate carcinoma from patients with nodular hyperplasia. *J Natl Med Assoc.* 1994;86(9):667-670.
46. Loeb S, Catalona WJ. The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. *Ther Adv Urol.* 2014;6(2):74-77. doi:10.1177/1756287213513488
47. Punnen S, Pavan N, Parekh DJ. Finding the Wolf in Sheep's Clothing: The 4Kscore Is a Novel Blood Test That Can Accurately Identify the Risk of Aggressive Prostate Cancer. *Rev Urol.* 2015;17(1):3-13. doi:10.3909/riu0668
48. Cui Y, Cao W, Li Q, et al. Evaluation of prostate cancer antigen 3 for detecting prostate cancer: a systematic review and meta-analysis. *Sci Reports.* 2016;6(25776). doi:10.1038/srep25776
49. J.Catalona W. Prostate Cancer Screening. *Med Clin North Am.* 2018;102(2):199-214. doi:10.1016/j.mcna.2017.11.001
50. Nevedomskaya E, Baumgart SJ, Haendler B. Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery. *Int J Mol Sci.* 2018;19(5):1359. doi:10.3390/ijms19051359
51. Lanz C, Bennamoun M, Macek P, Cathelineau X, Sanchez-salas R. The importance of antiandrogen in prostate cancer treatment. *Ann Transl Med.* 2019;7(Suppl 8):S362. doi:10.21037/atm.2019.09.53
52. Fontana F, Marzagalli M, Marelli MM, Moretti RM, Limonta P, Raimondi M. Gonadotropin-Releasing Hormone Receptors in Prostate Cancer: Molecular Aspects and Biological Functions. *Interna.* 2020;24(24):9511. doi:10.3390/ijms21249511
53. Boccon-gibod L, Meulen E Van Der, Persson B. An update on the use of gonadotropin-releasing hormone antagonists in prostate cancer. *Ther Adv Urol.* 2011;3(3):127-140. doi:10.1177/1756287211414457
54. Bumbaca B, Li W. Taxane resistance in castration-resistant prostate cancer: mechanisms and therapeutic strategies. *Acta Pharm Sin B.* 2018;8(4):518-529. doi:10.1016/j.apsb.2018.04.007

55. Handy CE, Antonarakis ES. Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. *Futur Oncol.* 2018;14(10):907-917. doi:10.2217/fon-2017-0531
56. Karan D, Dubey S. From Inflammation to Prostate Cancer: The Role of Inflammasomes. *Adv Urol.* 2016;2016(3140372). doi:10.1155/2016/3140372
57. Fernandes GDG, Pedrina B, De Faria Lainetti P, et al. Morphological and Molecular Characterization of Proliferative Inflammatory Atrophy in Canine Prostatic Samples. *Cancers (Basel).* 2021;13(8):1887. doi:10.3390/cancers13081887
58. Askew EB, Gampe RT, Stanley TB, Faggart JL, Wilson EM. Modulation of Androgen Receptor Activation Function 2 by Testosterone and Dihydrotestosterone. *J Biol Chem.* 2007;282(35):25801-25816. doi:10.1074/jbc.M703268200
59. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev.* 2016;37(1):3-15.
60. Sharifi N. Mechanisms of Androgen Receptor Activation in Castration-Resistant Prostate Cancer. *Endocrinology.* 2013;154(11):4010-4017. doi:10.1210/en.2013-1466
61. Saraon P, Jarvi K, Diamandis EP. Molecular Alterations during Progression of Prostate Cancer to Androgen Independence. *Clin Chem.* 2011;57(10):1366-1375. doi:10.1373/clinchem.2011.165977
62. Chandrasekar T, Yang JC, Gao AC, Evans CP. Mechanisms of resistance in castration-resistant prostate cancer (CRPC). *Transl Androl Urol.* 2015;4(3):365-380. doi:10.3978/j.issn.2223-4683.2015.05.02
63. Santer FR, Erb HHH, Mcneill R V. Therapy escape mechanisms in the malignant prostate. *Semin Cancer Biol.* 2015;35:133-144. doi:10.1016/j.semcancer.2015.08.005
64. Tan MHE, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin.* 2015;36(1):3-23. doi:10.1038/aps.2014.18
65. Nemes A, Tomuleasa C, Kacso G. The androgen receptor remains a key player in metastatic hormone-refractory prostate cancer. Implications for new treatments. *J BUON.* 2014;19(2):357-364.

66. Chetta P, Zadra G. Metabolic reprogramming as an emerging mechanism of resistance to endocrine therapies in prostate cancer. *Cancer Drug Resist.* 2021;4(1):143-162. doi:10.20517/cdr.2020.54
67. Ahmad F, Cherukuri MK, Choyke PL. Metabolic reprogramming in prostate cancer. *Br J Cancer.* 2021;125:1185-1196. doi:10.1038/s41416-021-01435-5
68. Gonzalez-menendez P, Hevia D, Mayo JC, Sainz RM. The dark side of glucose transporters in prostate cancer: Are they a new feature to characterize carcinomas? *Int J Cancer.* 2018;142(12):2414-2424. doi:10.1002/ijc.31165
69. Vasudevan D., S S, Vaidyanathan K. Major Metabolic Pathways of Glucose. In: *Textbook of Biochemistry - For Medical Students.* 6th Ed. (Jaypee Brothers Medical Publishers); 2011:90-112.
70. Boussadia Z, Lamberti J, Mattei F, et al. Acidic microenvironment plays a key role in human melanoma progression through a sustained exosome mediated transfer of clinically relevant metastatic molecules. *J Exp Clin Cancer Res.* 2018;37(1):245. doi:10.1186/s13046-018-0915-z
71. Pereira-Nunes A, Simões-Sousa S, Pinheiro C, Miranda-Gonçalves V, Granja S, Baltazar F. Targeting lactate production and efflux in prostate cancer. *BBA - Mol Basis Dis.* 2020;1866(11):165894. doi:10.1016/j.bbadis.2020.165894
72. Yang C, Ko B, Hensley CT, et al. Glutamine Oxidation Maintains the TCA Cycle and Cell Survival during Impaired Mitochondrial Pyruvate Transport. *Mol Cell.* 2014;56(3):414-424. doi:10.1016/j.molcel.2014.09.025
73. Deep G, Schlaepfer IR. Aberrant Lipid Metabolism Promotes Prostate Cancer: Role in Cell Survival under Hypoxia and Extracellular Vesicles Biogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7):1061. doi:10.3390/ijms17071061
74. Uo T, Sprenger CC, Plymate SR. Androgen Receptor Signaling and Metabolic and Cellular Plasticity During Progression to Castration Resistant Prostate Cancer. *Front Oncol.* 2020;10(580617). doi:10.3389/fonc.2020.580617
75. Vaz C V, Alves MG, Marques R, et al. The International Journal of Biochemistry Androgen-responsive and nonresponsive prostate cancer cells present a distinct

glycolytic metabolism profile. *Int J Biochem Cell Biol.* 2012;44(11):2077-2084. doi:10.1016/j.biocel.2012.08.013

76. Massie CE, Lynch A, Ramos-montoya A, et al. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *EMBO J.* 2011;30(13):2719-2733. doi:10.1038/emboj.2011.158

77. Shorning BY, Dass MS, Smalley MJ, Pearson HB. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer : At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *Int J Mol Sci.* 2020;21(12):4507. doi:10.3390/ijms21124507

78. Hoxhaj G, Manning BD, Diseases C. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. *Nat Rev Cancer.* 2020;20(2):74-88. doi:10.1038/s41568-019-0216-7

79. Bruning U, Morales-rodriguez F, Kalucka J, et al. Impairment of Angiogenesis by Fatty Acid Synthase Inhibition Involves mTOR Malonylation. *Cell Metab.* 2018;28(6):866-880. doi:10.1016/j.cmet.2018.07.019

80. Kimbro KS, Simons JW. Hypoxia-inducible factor-1 in human breast and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2006;13(3):739-749. doi:10.1677/erc.1.00728

81. Huang M, Du H, Zhang L, Che H, Liang C. The association of HIF-1  $\alpha$  expression with clinicopathological significance in prostate cancer : a meta-analysis. *Cancer Manag Res.* 2018;10:2809-2816. doi:10.2147/CMAR.S161762

82. Kim J, Tchernyshyov I, Semenza GL, Dang C V. HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: A metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 2006;3(3):177-185. doi:10.1016/j.cmet.2006.02.002

83. Yoshida GJ. Beyond the Warburg Effect: N-Myc Contributes to Metabolic Reprogramming in Cancer Cells. *Front Oncol.* 2020;10(701):1-8. doi:10.3389/fonc.2020.00791

84. Mihaylova MM, Shaw RJ. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat Cell Biol.* 2012;13(9):1016-1023. doi:10.1038/ncb2329

85. Moldogazieva NT, Mokhosoev IM, Terentiev AA. Metabolic Heterogeneity of Cancer Cells: An Interplay between HIF-1, GLUTs, and AMPK. *Cancers (Basel)*. 2020;12(4):862. doi:10.3390/cancers12040862
86. Bensaad K, Tsuruta A, Selak MA, et al. TIGAR, a p53-Inducible Regulator of Glycolysis and Apoptosis. *Cell*. 2006;126(1):107-120. doi:10.1016/j.cell.2006.05.036
87. Puzio-kuter AM. The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes Cancer*. 2011;2(4):385-391. doi:10.1177/1947601911409738
88. Bray Hopkin Johnson A, Raff Roberts Walter L. O Ciclo da Divisão Celular. In: *Fundamentos Da Biologia Celular*. 3a Edição (Artmed); 2011:609-645.
89. Fahy E, Cotter D, Sud M, Subramaniam S. Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1811(11):637-647. doi:10.1016/j.bbaliip.2011.06.009
90. Koolman J, Roehm K-H. Biomolecules - Lipids. In: *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd Ed. (Thieme); 2005:46-57.
91. Mattaini K. What molecules make up all living things? - Lipids. In: *Introduction to Molecular and Cell Biology*. ; 2020:162-178.
92. Bartee L, Anderson C. Metabolism of molecules other than glucose. In: *General Biology I: Survey of Cellular Biology*. ; 2018:167-169.
93. M. Berg J, L. Tymoczko J, Stryer L. Fatty Acid Metabolism. In: *Biochemistry*. 5th Ed. (W. H. Freeman); 2002:898-933.
94. Tumanov S, Bulusu V, Kamphorst JJ. Analysis of Fatty Acid Metabolism Using Stable Isotope Tracers and Mass Spectrometry. *Methods Enzymol*. 2015;561:197-217. doi:10.1016/bs.mie.2015.05.017
95. L. Tymoczko J, M. Berg J, Stryer L. Fatty Acid Synthesis. In: *Biochemistry: A Short Course*. 2nd Ed. (W. H. Freeman); 2011:481-495.
96. Murray RK, Bender DA, Botham KM, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA. Biossíntese dos Ácidos Gordos e Eicosanoides. In: *Bioquímica Ilustrada de Harper*. 29a Edição (AMGH Editora); 2014:216-228.

97. Robichaud P, Munganyiki JE, Boilard E, Surette ME. Polyunsaturated fatty acid elongation and desaturation in activated human T-cells: ELOVL5 is the key elongase. *J Lipid Res.* 2018;59(12):2383-2396. doi:10.1194/jlr.M090050
98. Kraemer FB, Shen W. Hormone-sensitive lipase: control of intracellular tri-(di-)acylglycerol and cholesteryl ester hydrolysis. *J Lipid Res.* 2002;43(10):1585-1594. doi:10.1194/jlr.R200009-JLR200
99. Weimar JD, Dirusso CC, Delio R, Black PN. Functional Role of Fatty Acyl-Coenzyme A Synthetase in the Transmembrane Movement and Activation of Exogenous Long-chain Fatty Acids. *J Biol Chem.* 2002;277(33):29369-29376. doi:10.1074/jbc.M107022200
100. Bok R, Lee J, Sriram R, et al. The Role of Lactate Metabolism in Prostate Cancer Progression and Metastases Revealed by Dual-Agent Hyperpolarized <sup>13</sup>C MRSI. *Cancers (Basel).* 2019;11(2):257. doi:10.3390/cancers11020257
101. Pardo JC, Porras VR De, Gil J, Font A, Puig-domingo M, Jordà M. Lipid Metabolism and Epigenetics Crosstalk in Prostate Cancer. *Nutrients.* 2022;14(4):851. doi:10.3390/nu14040851
102. Enciu A, Radu E, Popescu ID, Hinescu ME, Ceafalan LC. Targeting CD36 as Biomarker for Metastasis Prognostic: How Far from Translation into Clinical Practice? *Biomed Res Int.* 2018;2018(7801202). doi:10.1155/2018/7801202
103. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. Multiligand receptors CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001;108(6):785-791. doi:10.1172/JCI200114006
104. Watt MJ, Clark AK, Selth LA, et al. Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci Transl Med.* 2019;11(478):eaau5758. doi:10.1126/scitranslmed.aau5758
105. Xu H, Chen Y, Gu M, et al. Fatty Acid Metabolism Reprogramming in Advanced Prostate Cancer. *Metabolites.* 2021;11(11):765. doi:10.3390/metabo11110765
106. Geloën A, Helin L, Geeraert B, Malaud E, Holvoet P, Marguerie G. CD36 Inhibitors Reduce Postprandial Hypertriglyceridemia and Protect against Diabetic

Dyslipidemia and Atherosclerosis. PLoS One. 2012;7(5):e37633. doi:10.1371/journal.pone.0037633

107. Kuda O, Pietka TA, Demianova Z, et al. Sulfo-N-succinimidyl Oleate (SSO) Inhibits Fatty Acid Uptake and Signaling for Intracellular Calcium via Binding CD36 Lysine 164. J Biol Chem. 2013;288(22):15547-15555. doi:10.1074/jbc.M113.473298

108. Lu A, Wang Z, Zhou Z, Chen J, Wang Q. Application of “Hydrogen Bonding Interaction” in New Drug Development: Design, Synthesis, Antiviral Activity, and SARs of Thiourea Derivatives. J Agric Food Chemistry. 2015;63(5):1378-1384. doi:10.1021/jf505355r

109. Serrano JL, Soeiro PF, Reis MA, Boto REF, Silvestre S, Almeida P. Synthesis and process optimization of symmetric and unsymmetric barbiturates C5-coupled with 2,1-benzisoxazoles. Mol Divers. 2020;24(1):155-166. doi:10.1007/s11030-019-09937-4

110. Jeong Y-C, Moloney MG. Antibacterial Barbituric Acid Analogues Inspired from Natural 3-Acyltetramic Acids; Synthesis, Tautomerism and Structure and Physicochemical Property-Antibacterial Activity Relationships. Molecules. 2015;20(3):3582-3627. doi:10.3390/molecules20033582

111. Nutaitis CF, Schultz RA, Obaza J, Smith FX. Reduction of Isopropylidene Acylmalonates, 5-Acylbarbituric Acids, and 3-Acyl-4-hydroxycoumarins to the Corresponding Alkyl Derivatives by Sodium Cyanoborohydride-Acetic Acid. J Org Chem. 1980;45(23):4606-4608. doi:10.1021/jo01311a011

112. Stockert JC, Blázquez-castro A, Canete M, Horobin RW, Villanueva Á. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochem. 2012;114(8):785-796. doi:10.1016/j.acthis.2012.01.006

113. Madonna MC, Duer JE, Lee J V, et al. In vivo optical metabolic imaging of long-chain fatty acid uptake in orthotopic models of triple negative breast cancer. Cancers (Basel). 2021;13(1):148. doi:10.3390/cancers13010148

114. Çetindere S. Photophysics of BODIPY Dyes: Recent Advances. In: Photophysics, Photochemical and Substitution Reactions - Recent Advances. IntechOpen; 2020. doi:10.5772/intechopen.92609

115. Thumser AE, Storch J. Characterization of a BODIPY-labeled fluorescent fatty acid analogue. Binding to fatty acid-binding proteins, intracellular localization, and metabolism. *Mol Cell Biochem.* 2007;299(1-2):67-73. doi:10.1007/s11010-005-9041-2
116. Paiva YG De, Silva TL, Cardoso MFC, et al. Relationship between Electrochemical Parameters, Cytotoxicity Data against Cancer Cells of 3-Thio-Substituted Nor-Beta-Lapachone Derivatives. Implications for Cancer Therapy. *J Braz Chem Soc.* 2019;30(3):1-15. doi:10.21577/0103-5053.20180248
117. Drury J, Rychahou PG, He D, et al. Inhibition of Fatty Acid Synthase Upregulates Expression of CD36 to Sustain Proliferation of Colorectal Cancer Cells. *Front Oncol.* 2020;10(1185). doi:10.3389/fonc.2020.01185