



Universidade Federal do Rio Grande – FURG
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas:
Fisiologia Animal Comparada



Efeito da adição de cadeias graxas ao monastrol em células de melanoma

Dissertação submetida como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal comparada, da Universidade Federal do Rio Grande – FURG, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Paula de Souza Votto do Instituto de Ciências Biológicas.

Biól. Milene Medeiros de Moraes

Rio Grande
2015

“You are never too old to set another goal
or to dream a new dream.”

C.S. Lewis

Agradecimentos

Aos meus pais, Antonio e Angela, por todo o apoio e dedicação para que eu conseguisse concluir o mestrado, sempre dispostos a me levar para o furg em qualquer hora. E principalmente por acreditarem que eu conseguiria acabar. Amo vocês!!!

A minha irmã, Raquel, por ser minha melhor amiga e a melhor irmã que eu poderia pedir, mesmo tendo horas que queremos nos matar, hahaha. Por estar sempre me incentivando e torcendo por mim, e estar sempre disposta a me ajudar quando eu estava cansada e precisando de conselhos ou simplesmente de alguém para me escutar reclamar. Pelos livros fantásticos que me indicou e me viciou ☺, te amo!!!

A minha família, por sempre me apoiarem e torcerem por mim.

A Anahy, Fernanda, Priscila e Regina, girls eu amo vocês!!!!!! Não sei como explicar o que seria de mim se não tivesse conhecido vocês, vocês me deram força para montar meus milhões de experimentos, sempre me ajudando a pipetar milhares de placas, conversando e me acalmando quando eu queria matar todo mundo ou jogar tudo para o alto e desistir. As nossas conversas sobre séries, filmes, nossos bichinhos ou simplesmente super aleatórias, pelas horas de conversas no whats, que às vezes nem temos tempo de responder uma pergunta, porque já tem 10 outras, pelas idas ao croassonho, amigo secreto no subway, pelos almoços na furg, e pelas caronas para ir para casa. Uma das melhores coisas que aconteceu no mestrado foi conhecer e ficar amiga de vocês. Amo muito vocês!!!!!!

A Tábata e Laís, por estar me acompanhando nessa jornada desde a graduação e por me darem apoio para entrar no mestrado e concluir ele, por dividirmos duas grandes paixões, Harry Potter e gatos!!!! hahaha E a Bruna, pelas conversas e incentivo.

Ao pessoal da salinha 2, em especial a Geny, por ser essa pessoa carinhosa e amiga e que estou morrendo de saudades, pelos mates, conversas, onde todo mundo se mete nas conversas dos outros, e até pelas brigas ☺, pelos amigos secretos em qualquer festa, só para nos juntarmos e rirmos bastante.

A minha orientadora, Ana, por estarem sempre me ajudando e ensinando, e por me dar a oportunidade de continuar trabalhando com cultura celular e melanoma.

Aos grupo do laboratório: Anahy, Priscila, Simone, Fernanda L., Renata, Maiara, Aline, Michele, Ana, Daza, Márcio, Marta, Robert e todos os outros por sempre me ajudarem e ensinarem, trocarem ideias e conversas.

A banca, Juliana e Eduardo, por terem aceitado avaliar e colaborar com este trabalho.

Aos meus Protetores, por toda a proteção que sempre me deram e por mandar anjos para me auxiliarem neste importante caminho.

OBRIGADA!!!

“Óh meu Pai, não deixe nunca eu perder a minha fé,
A fé me salva, me protege, me levanta,
me guia pelos caminhos onde se colhe o que se planta.”

Sumário

Resumo Geral	6
1. Introdução Geral	7
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo Geral	13
2.2. Objetivos Específicos	13
2. Artigo	14
Abstract.....	15
1. Introduction.....	16
2. Material and Methods	17
2.1. Cell Culture	17
2.2. Synthesis of compounds	17
2.3. Cells treatments	18
2.4. Cell viability.....	18
2.5. Quantitative analysis of apoptosis and necrosis.....	18
2.6. Statistical analysis	19
3. Results and Discussion	19
3.1. Cell Viability	19
3.2. Apoptosis and/or Necrosis	24
4. Conclusions.....	27
Acknowledgements.....	27
References	27
5. Discussão Geral	31
6. Referências	35

Resumo Geral

O melanoma é o tipo de câncer da pele mais perigoso devido à formação de metástases. Essa neoplasia pode ser tratada por quimioterapia, radioterapia e cirurgia, entretanto, tratamentos alternativos estão sendo pesquisados. As 3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPM) estão sendo estudadas como um possível tratamento devido as suas propriedades terapêuticas e farmacológicas. Um derivado desse grupo de moléculas, o monastrol, apresentou atividade antimitótica, ao inibir a cinesina mitótica Eg5, uma proteína motora associada à microtúbulos necessária para a formação do fuso mitótico, parando o ciclo celular durante a mitose, levando a célula a sofrer apoptose. Estudos tem mostrado um efeito antiproliferativo aumentado do monastrol com modificações estruturais na sua cadeia em variados tipos celulares. Portanto, este trabalho teve como objetivo estudar o efeito da inserção do ácido palmítico ou ácido oleico ao monastrol na linhagem celular de melanoma B16F10. Para isso testes de viabilidade por MTT foram realizados. As células foram tratadas com monastrol, monastrol palmítico ou monastrol oleico por 0h, 24h, 48h e 72h, e foi observado um efeito citotóxico para o monastrol palmítico e oleico após 24h, e um efeito de inibição de proliferação para o monastrol na linhagem B16F10, enquanto a linhagem não tumoral, melan-a, mostrou-se mais sensível às três moléculas testadas, exceto para a menor concentração de monastrol oleico testada. Foi avaliada a capacidade desses compostos induzirem apoptose e/ou necrose, e foi observado que a partir de 24h o monastrol induz apoptose. Para o monastrol palmítico e oleico não foi possível quantificar apoptose e/ou necrose, devido ao fato que após 3h as células perdiam a adesão à placa. Neste momento estas células ainda emitiam fluorescência relativa a células viáveis, indicando um possível efeito do monastrol palmítico e oleico nas proteínas de adesão encontradas na membrana celular. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos de ação do monastrol palmítico e oleico, bem como é possível sugerir o estudo destas moléculas em outros tipos celulares.

1. Introdução Geral

O câncer é a principal causa de morte em países em desenvolvimento e a segunda maior em países desenvolvidos (Jemal *et al.*, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde, no ano de 2030, o número de casos incidentes de câncer pode ser de 27 milhões, ocasionando 17 milhões de mortes (WHO, 2014). Para o Brasil, as estimativas para o biênio 2014/2015 foram de cerca de 576 mil casos novos de câncer (INCA, 2014).

Com relação à incidência de câncer da pele, o melanoma, representa apenas 4% dos casos, contudo é considerado o mais grave devido à grande possibilidade de ocorrer metástases. A ocorrência do câncer da pele aumentou nas últimas décadas, incluindo os tipos melanoma e não melanoma, sendo que cerca de 132.000 casos de melanoma ocorrem no mundo todos os anos e entre 2 e 3 milhões de câncer não melanoma (WHO, 2014). No Brasil foram previstos para 2014/2015, 5.980 casos de melanoma, sendo cerca de 2.960 em homens e 2.930 em mulheres. Destes, para o Rio Grande do Sul (RS) foram estimados para homens 410 e para mulheres 390, fazendo com que o RS ocupe o 2º lugar entre os estados de maior incidência de novos casos (INCA, 2014).

Os dados citados acima são bastante alarmantes, entretanto o câncer é controlável em 75% dos casos e, se descoberto precocemente, pode ser curado. Além das ferramentas convencionais para o tratamento do câncer, que incluem a quimioterapia, a radioterapia e a cirurgia, outras alternativas têm sido propostas para prevenção e tratamento de neoplasias, como a utilização de produtos naturais na prática quimioterápica. Em alguns países, remédios de ervas tradicionais são frequentemente utilizados junto com agentes quimioterápicos convencionais (Fong *et al.*, 2007). Outra substância utilizada em combinação com drogas de terapia oncológica é o ácido graxo poliinsaturado ômega-3 (n-3 PUFAs) que apresenta efeito pró-apoptótico em linhagens celulares de adenocarcinoma de cólon humano (Calviello *et al.*, 2005).

Entre as substâncias estudadas estão às moléculas sintéticas 3,4-diidropirimidin-2(1H)-onas (DHPM) (Figura 1a), devido as suas propriedades terapêuticas e farmacológicas (Kappe, 2000), como anticarcinogênica, antihipertensiva e moduladora de canais de cálcio (Atwal *et al.*, 1991; Rovnyak, 1992; Kappe, 1998; Jauk *et al.*, 2000). O composto baseado na 1,4-

diidropirimidinona, monastrol, identificado por Mayer (Figura 1b), foi identificado como uma molécula com potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento do câncer, pois tem atividade antimitótica, sendo capaz de inibir a cinesina mitótica Eg5, (Mayer *et al.*, 1999).

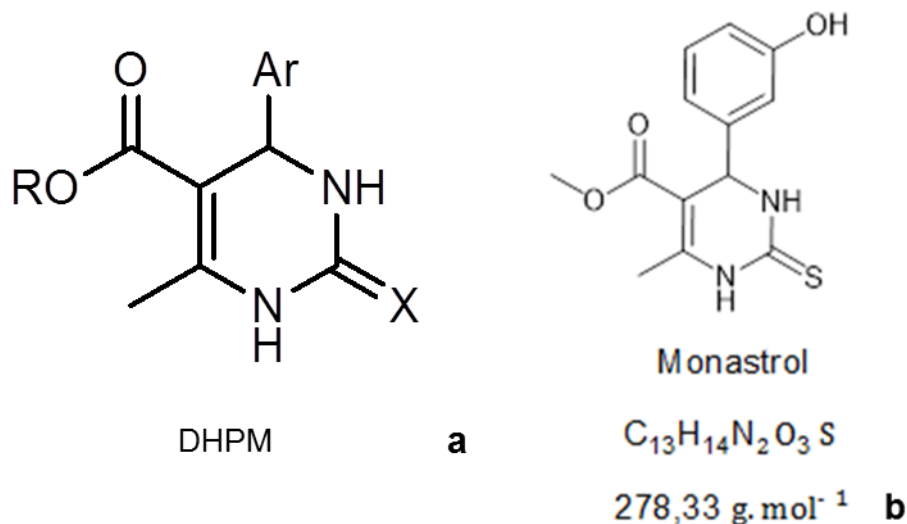


Figura 1: Diidropirimidinona (DHPM) (a); monastrol (b).

Vários compostos naturais e sintéticos que perturbam a dinâmica dos microtúbulos, e, portanto, bloqueiam ou alteram a mitose, se provaram clinicamente eficazes para o tratamento de muitos cânceres (Wood *et al.*, 2001). A instabilidade dinâmica é uma propriedade essencial e indispensável de microtúbulos, evidente principalmente durante a montagem do eixo bipolar e segregação de cromossomos na mitose (Bhalla, 2003). O monastrol é a primeira molécula permeável na célula conhecida que inibe a mitose sem atacar a tubulina, e estudos bioquímicos mostraram que o monastrol é um inibidor alostérico das proteínas relacionadas à família cinesina-5 (Mayer *et al.*, 1999; Sakowicz *et al.*, 2004), envolvidas nas funções mitóticas essenciais (Kashina *et al.*, 1997; Walczak e Mitchison, 1996).

A atividade do monastrol é baseada na inibição específica e reversível da motilidade da cinesina mitótica Eg5 (Figura 2), uma proteína motora associada à microtúbulos necessária para a formação do fuso bipolar (Figura 3a) durante a mitose (Cochran *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 1999).

Cinesinas são as menores e mais abundantes nanomotoras em células e a única proteína motora canônica que é encontrada em todos os eucariontes. Assim como a dineína e a miosina, estas proteínas hidrolisam ATP e convertem energia

química em energia mecânica. Isso permite o transporte e o movimento ao longo do citoesqueleto. Entre suas diferentes isoformas (>16) a família Cinesina-5 (BimC/Eg5/N-2/Kif11) foi a primeira a ser identificada como essencial para a mitose (Wickstead & Gull, 2006).

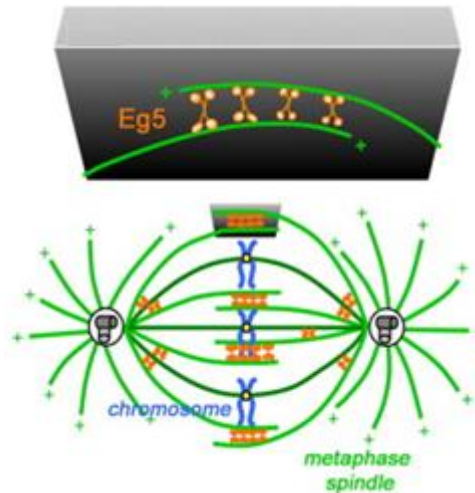


Figura 2: Função da cinesina mitótica. Extraído de Wojcik *et al.*, 2013.

Assim, o monastrol ocasiona uma parada no ciclo celular durante a mitose através da formação de fusos monoastrais (Figura 3b), os quais são compostos por uma matriz radial de microtúbulos rodeados por um anel de cromossomos (Brier *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 1999). Quando a parada da mitose é imposta por um tempo prolongado, a célula sofre apoptose. Como o efeito em longo prazo da inibição da função da Eg5 em células humanas ainda não foi caracterizado, o seu potencial anticâncer ainda não foi analisado (Sawin *et al.*, 1992; Sawin & Mitchison, 1995; Leizerman *et al.*, 2004).

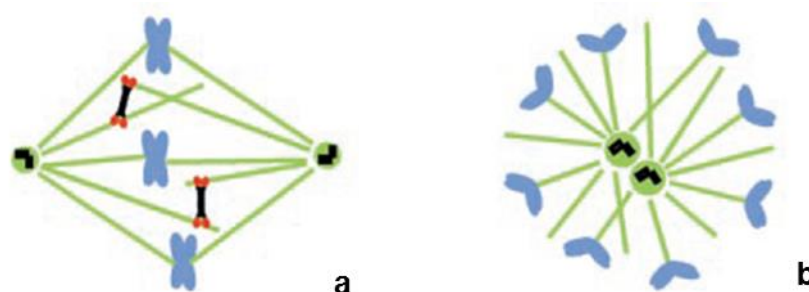


Figura 3: Fuso bipolar (a); fuso monoastral (b). Extraído de Mayer *et al.*, 1999.

Duan e colaboradores (2015) em seu estudo com *Escherichia coli* transformadas, sugerem outro possível alvo do monastrol, a proteína centrin, uma proteína pequena ligante ao cálcio, que tem um papel importante na duplicação e separação do centrossomo. Centrossomos estão frequentemente amplificados em células de câncer. Um número maior deles pode dar origem a fusos multipolares durante a mitose, levando a formação de aneuploidia nas células filhas (Srsen e Merdes, 2006).

Muitos estudos têm sido dedicados a mostrar o mecanismo de ação do monastrol como um inibidor mitótico do ciclo celular (Kapoor *et al.*, 2000; DeBonis *et al.*, 2003; Cochran & Gilbert, 2005), entretanto, existem poucos exemplos relacionados à atividade antitumoral. Um exemplo é de Leizerman e colaboradores (2004), onde foram estudados os efeitos do monastrol comparando-os com os efeitos do taxol nas linhagens celulares humanas AGS (adenocarcinoma gástrico) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon), igualmente sensíveis ao taxol, um medicamento quimioterápico que inibe a dinâmica dos microtúbulos. Neste estudo foi verificada uma maior sensibilidade das células AGS ao monastrol.

Estas informações envolvendo o monastrol incentivaram a modificação da sua estrutura e posterior avaliação da sua atividade antiproliferativa. Um exemplo é o trabalho de Russowsky *et al.* (2006), no qual as DHPM, incluindo o monastrol, o oxo-monastrol e os tio-análogos foram analisados frente a várias linhagens celulares de câncer. O monastrol e oxo-monastrol apresentaram atividade antiproliferativa nas linhagens tumorais humanas UACC.62 (pele do tipo melanoma), MCF-7 (mama), OVCAR03 (ovário), PC0 3 (próstata), HT-29 (cólon), 786-0 (renal) e NCI-ADR (mama). Na concentração de 250 µg/mL, o monastrol apresentou atividade citotóxica (redução do número inicial de células após 48h) nas linhagens de melanoma e de células renais. Na mesma concentração, o oxo-monastrol apresentou apenas atividade citostática (inibição da proliferação do número de células inicial após 48h), e o tio-análogo DHPM foi um agente citotóxico mais potente contra as linhagens de melanoma, renal, mama, ovário e cólon do que o monastrol (Russowsky *et al.*, 2006).

Sashidhara e colaboradores (2013) investigaram o efeito da hibridização do monastrol com a cumarina, um inibidor da proliferação de células de câncer de mama, sugerindo que o híbrido cumarina–monastrol possui potencial como uma

nova classe de agentes seletivos para o tratamento deste câncer, embora os mecanismos de ação deste híbrido ainda permaneçam sob investigação. Segundo estes autores, embora o monastrol já apresente efeitos significativos, sua atividade antimitótica não é muito alta, e, portanto o desenvolvimento de análogos do monastrol mais potentes, específicos e permeáveis às células, com maior inibição de cinesinas e propriedades antiproliferativas aumentadas tem sido estudado com resultados encorajadores.

Nos últimos anos, a estratégia de hibridização molecular emergiu como uma nova abordagem que envolve a conglomeração de dois ou mais farmacóforos. Este termo define a subunidade estrutural ou fragmento molecular responsável pela resposta farmacológica ou efeito terapêutico de um fármaco, que é responsável pelo reconhecimento molecular primário do fármaco pelo sítio alvo-terapêutico. O conhecimento dessa região possibilita o planejamento de drogas sintéticas, em uma estrutura molecular para desenvolver moléculas híbridas multifuncionais, as quais tem atividade biológica múltipla, perfil seletivo modificado, diferente ou duplo modo de ação e/ou efeitos colaterais indesejados reduzidos devido à mistura de dois farmacóforos em uma molécula (Sandhu *et al.*, 2014).

Neste sentido, é interessante avaliar o efeito de outras modificações estruturais no monastrol, como a inserção de cadeias graxas à molécula, visando o possível aumento da sua lipofilicidade. Considerando, assim, a necessidade de entendimento do mecanismo de ação de novos fármacos que possam ser efetivos contra o melanoma, comparando os efeitos do monastrol e do monastrol ligado a cadeias graxas derivadas do ácido palmítico (Figura 3a) e do ácido oleico (Figura 3b) em células de melanoma.

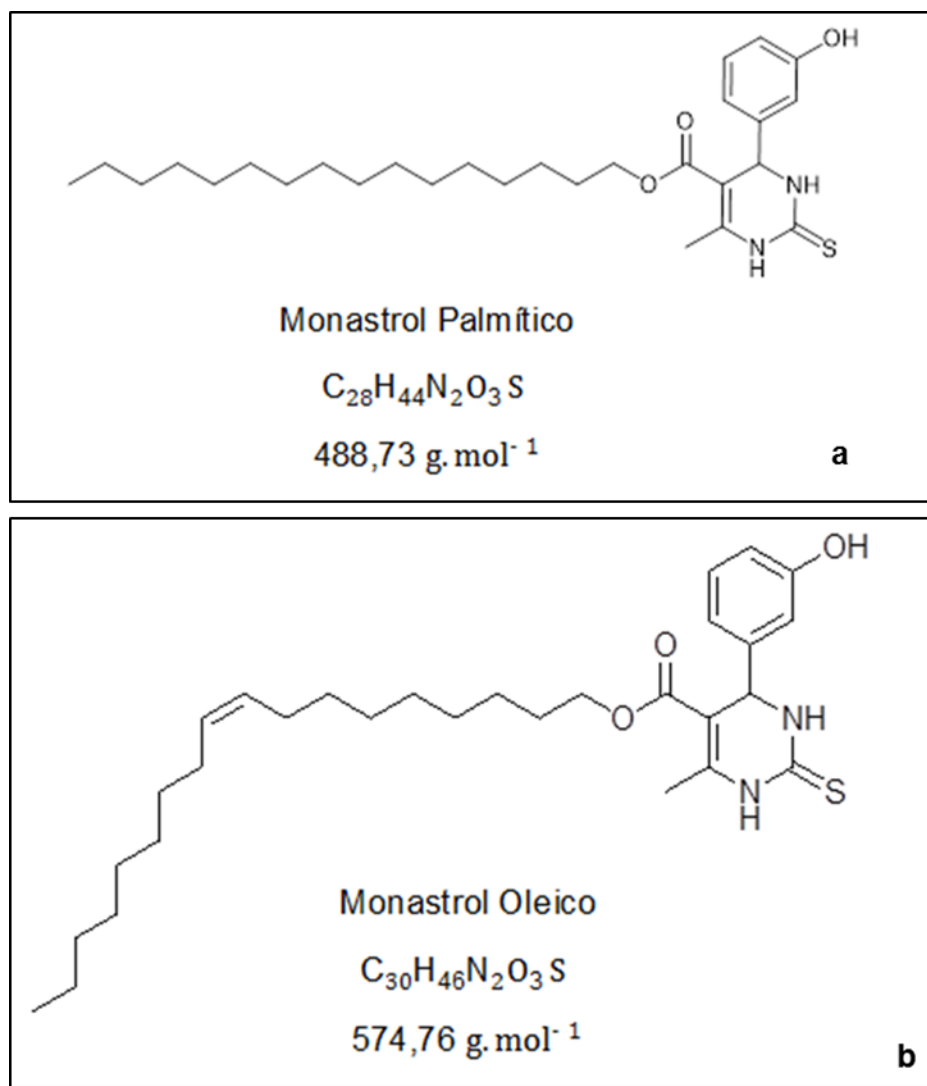


Figura 3: monastrol palmítico (a); monastrol oleico (b).

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Estudar o efeito da adição de cadeias graxas, palmítica e oleica, à molécula de monastrol na linhagem celular de melanoma B16F10, investigando os processos celulares envolvidos, bem como avaliar seu possível potencial citotóxico em melanócitos não tumorais.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a sensibilidade da linhagem celular B16F10 exposta a diferentes concentrações de monastrol;
- ✓ Avaliar o efeito destas mesmas concentrações de monastrol palmítico e monastrol oleico na linhagem celular B16F10;
- ✓ Avaliar a capacidade do monastrol, do monastrol palmítico e do monastrol oleico na indução de apoptose e/ou necrose na linhagem celular B16F10;
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do monastrol, do monastrol palmítico e do monastrol oleico em melanócitos não tumorais da linhagem celular melan-a.

2. Artigo

Artigo a ser submetidos á revista *European Journal Of Medicinal Chemistry*

Structural modification in monastrol increases its cytotoxic effect

Milene Medeiros de Moraes¹, Tamara Germani Marinho², Luciana Almeida Piovesan², Marcelo Gonçalves Montes D'Oca², Ana Paula de Souza Votto^{1*}

1 Laboratório de Cultura Celular, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas – Fisiologia Animal Comparada, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica, Escola de Química e Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil

E-mail adress:

milene.medeiros.de.moraes@hotmail.com (Milene Medeiros de Moraes);

tamgmarinho@yahoo.com.br (Tamara Germani Marinho);

lpiovesan@gmail.com (Luciana Almeida Piovesan);

dqmdoca@furg.br (Marcelo Gonçalves Montes D'Oca);

anavotto@yahoo.com.br (Ana Paula de Souza Votto).

*Corresponding author e-mail: anavotto@yahoo.com.br (Ana Paula de Souza Votto)

Phone/Fax: +55 53 32935192/ + 55 53 32336848

Adress: Instituto de Ciências Biológicas -Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Rio Grande, RS, Brazil

Zip Code: 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil

Abstract

Melanoma is the most dangerous type of skin cancer due to the occurrence of metastases. This tumor can be treated by chemotherapy, radiotherapy and surgery; however, alternative therapies are being investigated. The 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones (DHPM) have been studied as a possible treatment because of their therapeutic and pharmacological properties. A derivative of this group of molecules, monastrol, shows antimetabolic activity by inhibiting the mitotic kinesin Eg5, a motor protein associated to microtubules, required for the formation of the mitotic spindle, arresting the cell in mitosis, leading to apoptosis. Studies have shown an increased antiproliferative effect of monastrol with structural changes in its chain in several cell types. Therefore, this research aimed to study the effect of the insertion of palmitic acid or oleic acid to monastrol in the melanoma cell line B16F10. To this end, MTT viability assays were performed. Cells were treated with monastrol, palmitic monastrol or oleic monastrol for 0h, 24h, 48h and 72h, and a cytotoxic effect was observed for palmitic and oleic monastrol after 24 hours, and a proliferation inhibition effect for monastrol, in comparison, the non-tumor cell line melan-a, was more sensitive to the three molecules tested, except for the lowest tested concentration of oleic monastrol. The ability of these compounds to induce apoptosis and/or necrosis was measured, and it was observed that monastrol induces apoptosis as of 24h. It was not possible to quantify apoptosis and/or necrosis for palmitic and oleic monastrol, since there were no adhered cells on the well 3 hours after treatment. At this time these cells still emitted fluorescence indicating viable cells, suggesting a possible effect of palmitic and oleic monastrol in the adhesion proteins found in the cell membrane. More studies are needed to elucidate the palmitic and oleic monastrol mechanisms of action and can suggest the study of these molecules in other cell types.

Keywords: palmitic acid; oleic acid; hybrid molecules; melanoma.

1. Introduction

Melanoma is the most serious skin cancer due to the possibility of metastasis occurrence (WHO, 2014). The treatments include chemotherapy, radiotherapy and surgery. In addition to these conventional treatments, new treatments are being studied, such as synthetic molecules (Kappe, 2000). The 3,4-dihydropyrimidin-2(1H)-ones (DHPM) were synthetically created and showed therapeutic and pharmacological properties, such as anticarcinogenic, antihypertensive and calcium channel modulator (Kappe, 2000; Atwal *et al.*, 1991; Rovnyak, 1992; Kappe, 1998; Jauk *et al.*, 2000). Among these molecules, the 1,4-dihydropyrimidine-based compound monastrol was identified as a molecule with potential for development of new drugs for cancer treatment as it shows mitotic activity, being capable of inhibiting the mitotic kinesin Eg5 (Mayer *et al.* 1999).

Monastrol is a reversible, cell-permeable, small molecule that selectively inhibits the mitotic kinesin Eg5, without attacking tubulin, its activity is based on the specific and reversible inhibition of motility of the mitotic kinesin Eg5, a motor protein microtubule associated required for bipolar spindle formation during mitosis (Cochran *et al.*, 2005; Mayer *et al.*, 1999). Monastrol causes a cell cycle arrest in mitosis by forming monoastral spindles, which are comprised of a radial array of microtubules surrounded by a ring chromosome (Brier *et al.*, 2004; Peters *et al.*, 2006; Mayer *et al.*, 1999).

Sashidhara *et al.* (2013) investigated the effect of hybridization of monastrol with coumarin, an inhibitor of breast cancer cell proliferation, suggesting that the hybrid coumarin-monastrol has potential as a new class of selective agents for the treatment of this cancer, although this hybrid mechanism of action still remain under investigation. According to these authors, while monastrol have a significant effect, its antimitotic activity is not very high, and therefore the development of more potent analogs of monastrol, specific and permeable to cells, with increased inhibition of kinesins and increased antiproliferative properties has been studied with encouraging results.

In recent years, molecular hybridization strategy has emerged as a new approach that involves the clustering of two or more pharmacophores. This term defines the subunit molecular or fragment responsible for the pharmacological response or therapeutic effect of a drug, which is responsible for the molecular recognition primary drug for therapeutic target site. The knowledge of this area

enables the planning of synthetic drugs in a molecular structure to develop multifunctional hybrid molecules which have multiple biological activities and modified selective profile, different or dual mode of action and/or reduced undesirable side effects due to mixture of two pharmacophores in one molecule (Sandhu *et al.*, 2014).

In this sense, it is interesting to assess the effect of structural changes in monastrol, such as inserting fatty acids to the molecule. This study investigated the insertion of palmitic acid and oleic acid to monastrol in melanoma cell line B16F10 and in non-tumoral melanocyte cell line melan-a.

2. Material and Methods

2.1. Cell Culture

Murine melanoma cell line, B16F10, was obtained from Rio de Janeiro Cell Bank, and murine melanocyte cell line, melan-a, was obtained from Laboratory of Experimental Oncology from Institute of Cancer of the São Paulo State - ICESP. Both cell lines were maintained in Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM)(Gibco BRL) supplemented with sodium bicarbonate (0.2 g/L), L-glutamine (0.3 g/L), Hepes (3 g/L) (Vetec Química, LTDA), 10% fetal bovine serum (Gibco BRL), 1% antibiotic and antimycotic – streptomycin (100 µg/mL), penicillin (100 U/mL) and amphotericin B (0,25 µg/mL) – (Gibco BRL) in cell culture flasks at 37 °C. The melan-a cells were maintained with 200 nM of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) – (Sigma) for induction of mitotic activity.

2.2. Synthesis of compounds

Monastrol, palmitic monastrol and oleic monastrol were synthesized by Laboratório Kolbe de Síntese Orgânica. The DHPM-fatty acids were synthesized using the Biginelli multicomponent reaction between a β -ketoester, aromatic aldehydes and urea or thiourea in the presence of a catalytic amount (10 mol%) of InCl_3 in MeCN. Reactions with 4-dimethylaminebenzaldehyde gave best results with 20mol% catalyst because of the low reactivity of this aldehyde. All compounds were obtained as pure solids after crystallization from acetonitrile. Palmitic acid and oleic acid were obtained from Sigma. The molecules and acids were diluted in ethanol.

2.3. Cells treatments

The cells were trypsinized, centrifuged, suspended in supplemented DMEM medium, seeded in 96-well (B16F10 = 10^5 cells/mL and melan-a = 2×10^5 cells/mL), cultured for one day for adhesion and then treated with each molecule until 72h. The control cells received the same volume of solvent of the highest concentrations of compounds (0.5% of ethanol). For melan-a cell line, PMA was removed during the experiments.

2.4. Cell viability

The viability of B16F10 and melan-a was measured by MTT (3-(4,5--2-yl)-2,5-ditetrazolium bromide) – (Sigma) assay, in 0h, 24h, 48h and 72h after treatment with monastrol, palmitic monastrol, oleic monastrol, palmitic acid, oleic acid, monastrol + palmitic acid or monastrol + oleic acid in the following concentrations 20 μ M, 80 μ M, 140 μ M and 200 μ M. Palmitic monastrol and oleic monastrol were also tested 12h after treatment. At the end of each incubation time molecule-containing medium was removed, and the cells were washed once with PBS and incubated for 3h with 20 μ L of MTT (5 mg/ml) dissolved in 200 μ L of DMEM medium, at 37 °C. After 3h, the medium containing MTT was removed and the formazan crystals were dissolved in 200 μ L of dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma). The absorbance values were recorded at 490 nm on a multiwell plate reader (ELX 800 Universal Microplate Reader, Bio-TEK).

2.5. Quantitative analysis of apoptosis and necrosis

The evaluation of apoptosis and necrosis was realized according to Ribble *et al.* (2005) modified, with the addition of 2 μ L of work solution composed by PBS, with 100 μ g/mL of acridine orange and 100 μ g/mL of ethidium bromide after the treatment of B16F10 (10^4 cells) for 24h, 48h and 72h with 80 μ M and 140 μ M of monastrol, and for 0h, 3h and 6h with the same concentrations of palmitic monastrol or oleic monastrol. The analysis was performed from areas captured from the well plate (20X) with epifluorescence microscope (Olympus IX81). All cells were analyzed and the data were expressed in percentage related to total cells number visualized on the captured area. The cells were classified according Kosmider *et al.* (2004) modified, as following: those showing green fluorescence cytoplasm and green nucleus were considered viable cells; those presenting orange nucleus with fragmented chromatin

were considered apoptotic and those with uniformly orange-stained nucleus were considered necrotic.

2.6. Statistical analysis

Each experiment was repeated at least three independent times using five replicates samples. The results were expressed as means \pm SEs. Significant differences among groups were analyzed using one-way ANOVA followed by post-hoc comparisons (Tukey's test). Normality and homoscedasticity were tested. Statistical significance was accepted at $p < 0.05$.

3. Results and Discussion

3.1. Cell Viability

To investigate B16F10 cells proliferation effects by monastrol, palmitic monastrol and oleic monastrol the MTT viability assay was performed. The assay demonstrated that monastrol, after 48h exposure, inhibits cell growth in 80 μ M, 140 μ M and 200 μ M concentrations (Fig 1a).

Peters *et al.* (2006) tested monastrol in LS180 cell line, human colon adenocarcinoma, and he found that monastrol shows a time and concentration dependent effect on glycoprotein P (Pgp) mRNA expression, an efflux pump responsible for chemotherapeutic extrusion from multidrug resistant (MDR) cells. Chemotherapy field exhibits great advances, but there are still two major problems associated with cytostatic treatment: severe side effects, such as neurotoxicity, and the development of multidrug resistance. B16F10 cell line is extremely resistant and, when *in vivo*, causes an extremely aggressive tumor. The discovery of the kinesin Eg5 inhibitors which specifically target mitotic spindle assembly, like monastrol, may be an opportunity to develop antitumor drugs with less side effects and the potential to overcome multidrug resistance.

Leizerman *et al.* (2004), found that at 50 μ M, after 72h, monastrol inhibited cell growth in AGS (human gastric adenocarcinoma) cell line, but HT29 (human colon adenocarcinoma) cell growth was only inhibited in high concentrations, 150 μ M, showing that AGS is more sensible to monastrol. For AGS cell line cell arrest caused by monastrol in 24h was reversible, but not in 48h, since after monastrol removal most of the cells stayed arrested in G2/M cycle, and the number of cells

containing sub-G1 DNA content increased, indicating that cells irreversibly arrested in G2/M cycle by monastrol started apoptosis process. On HT29 after 48h the cycle arrest was partly reversible, consistent with less sensibility.

In melan-a cell line monastrol inhibited growth after 24h, showing a higher effect when compared with B16F10, in 80 μM , 140 μM and 200 μM concentrations (Fig 2a).

In relation to the structural modification of monastrol, palmitic and oleic monastrol were cytotoxic after 24h exposure in 80 μM , 140 μM and 200 μM concentrations and were capable of inhibit cell growth in 20 μM after 72h and 48h respectively for B16F10 cells (Fig 1b, c).

Sashidhara *et al.* (2013) tested coumarin-monastrol hybrids in different cells lines, MCF-7, T47D, MDA-MB-231(breast cancer), A549 (lung cancer), PC-3, DU-145 (human prostate), HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma), NIH3T3 (murine embryonic fibroblast), HEK-293 (human kidney) and isolated primary mouse skin fibroblasts. Theirs results showed that one of the coumarin-monastrol hybrids, coumarin-thiodihydropyrimidone with tertiary butyl group on the benzene ring of coumarin segment, significantly inhibited the proliferation of MCF-7, T47D and MDA-MB-231 breast cancer cell lines at all concentrations (2.5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM) in a time dependent manner. Additionally, there was no activity (inactive) in the noncancer cells (NIH/3T3, HEK-293 and isolated primary mouse skin fibroblasts). However, this hybrid did not show significant anticancer activity in the other cancer cells.

For melan-a cell line, palmitic and oleic monastrol also were cytotoxic after 24h of exposure in the same concentrations that to B16F10. However both the molecules inhibited cell growth in 20 μM only after 72h, differently from B16F10 cell line, in which oleic monastrol inhibited cell growth already in 48h, showing that at least in this structural modification melan-a was less sensible than B16F10 (Fig 2b, c).

In order to verify the efficiency of chemical modification of monastrol (construction of the new molecule) experiments were conducted only with palmitic and oleic acids, as well as the combination of each with monastrol. Palmitic acid showed no effect in B16F10 cell line (Fig 1d), and oleic acid inhibited cell growth after 48h in all concentrations (Fig 1e), differently from Sousa Andrade *et al.* (2005)

results, where, for B16F10, at 200 μ M palmitic acid induced loss of membrane integrity after 24h, and oleic acid had no effect on cell viability. However, for S91 murine melanoma cell line, 200 μ M of oleic acid caused loss of membrane integrity and DNA fragmentation after 24h treatment, and palmitic acid showed no effect. For human melanoma cell lines, SK-Mel 23 and SK-Mel 28, palmitic acid caused loss of membrane integrity after 48h and DNA fragmentation after 24h and 48h treatment, respectively. Oleic acid had no effect in human melanoma cell lines. Hawkins *et al.* (1998) showed that micromolar concentrations of fatty acids are toxic to cancer cells both *in vitro* and *in vivo*, however our study showed no cytotoxicity for both acids, only inhibited growth for oleic acid.

For non-tumoral melanocyte cell line, we found that palmitic acid had no effect (Fig 2d) and oleic acid inhibited cell growth in all concentrations after 72h treatment (Fig 2e), showing that melan-a is more resistant than B16F10. However, several studies have demonstrated the toxic effect of palmitic acid, as a result of apoptosis or necrosis, on normal cells, such as pancreatic islets (Cnop *et al.*, 2001), rat cardiomyocytes (Sparagna *et al.*, 2000; Ostrander *et al.*, 2001), and granulotic cells (Mu *et al.*, 2001).

The combination between monastrol and palmitic acid or monastrol and oleic acid, for B16F10 (Fig 1f, g) and melan-a (Fig 2f, g) showed only the effect of monastrol, or in the combination with oleic acid, showed the sum of the effects, indicating that the enhanced effect in palmitic and oleic monastrol is the result of the modification of monastrol structure, and not the combination of monastrol and fatty acids.

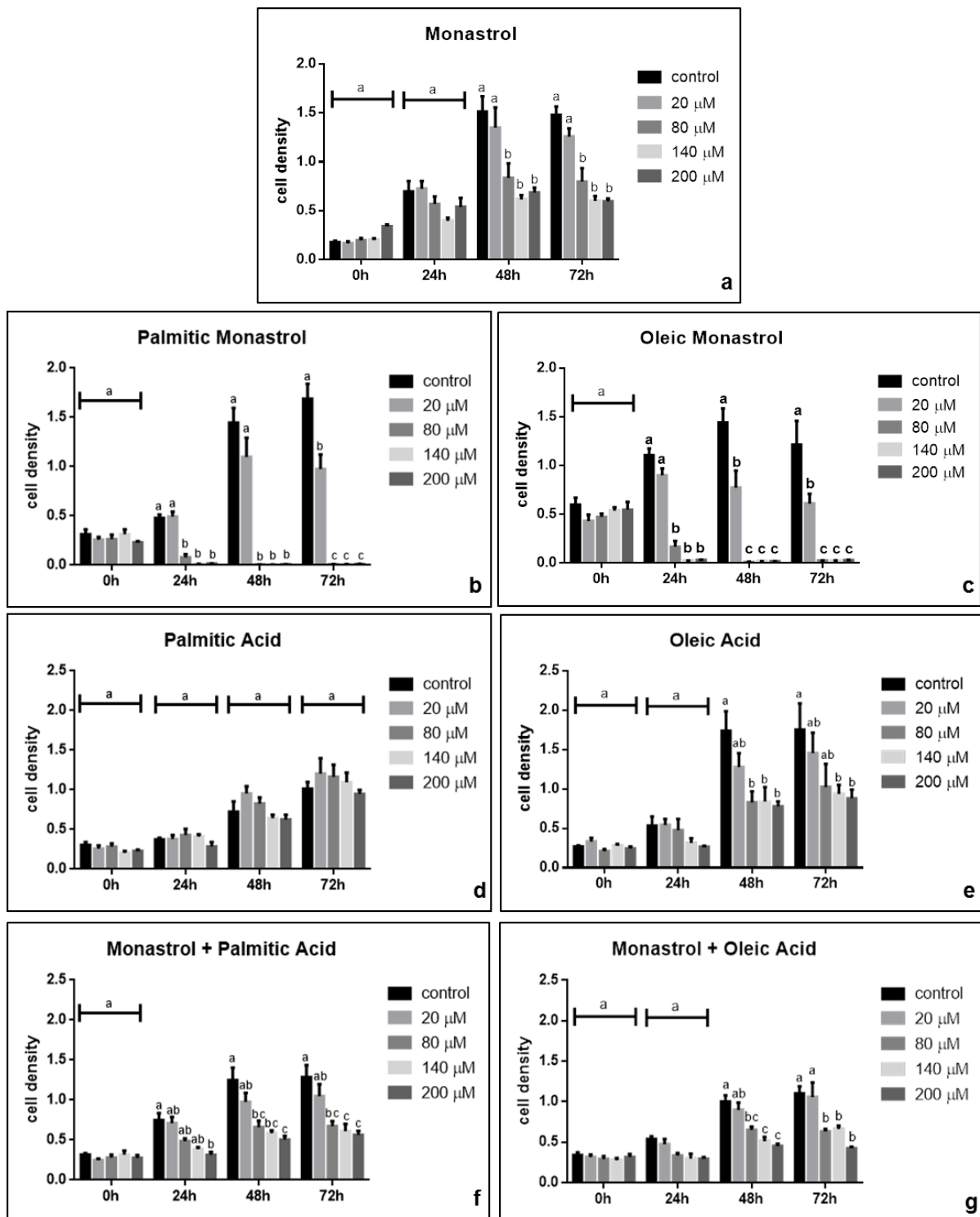


Figure 1: Cell proliferation, measured by MTT assay. B16F10 cells were treated with different concentrations of monastrol (a), palmitic monastrol (b), oleic monastrol (c), palmitic acid (d), oleic acid (e), monastrol + palmitic acid (f) and monastrol + oleic acid (g) at 0h, 24h, 48h and 72h. Data are expressed as mean \pm SE. Similar letters indicate absence of significant differences in each time ($p > 0.05$).

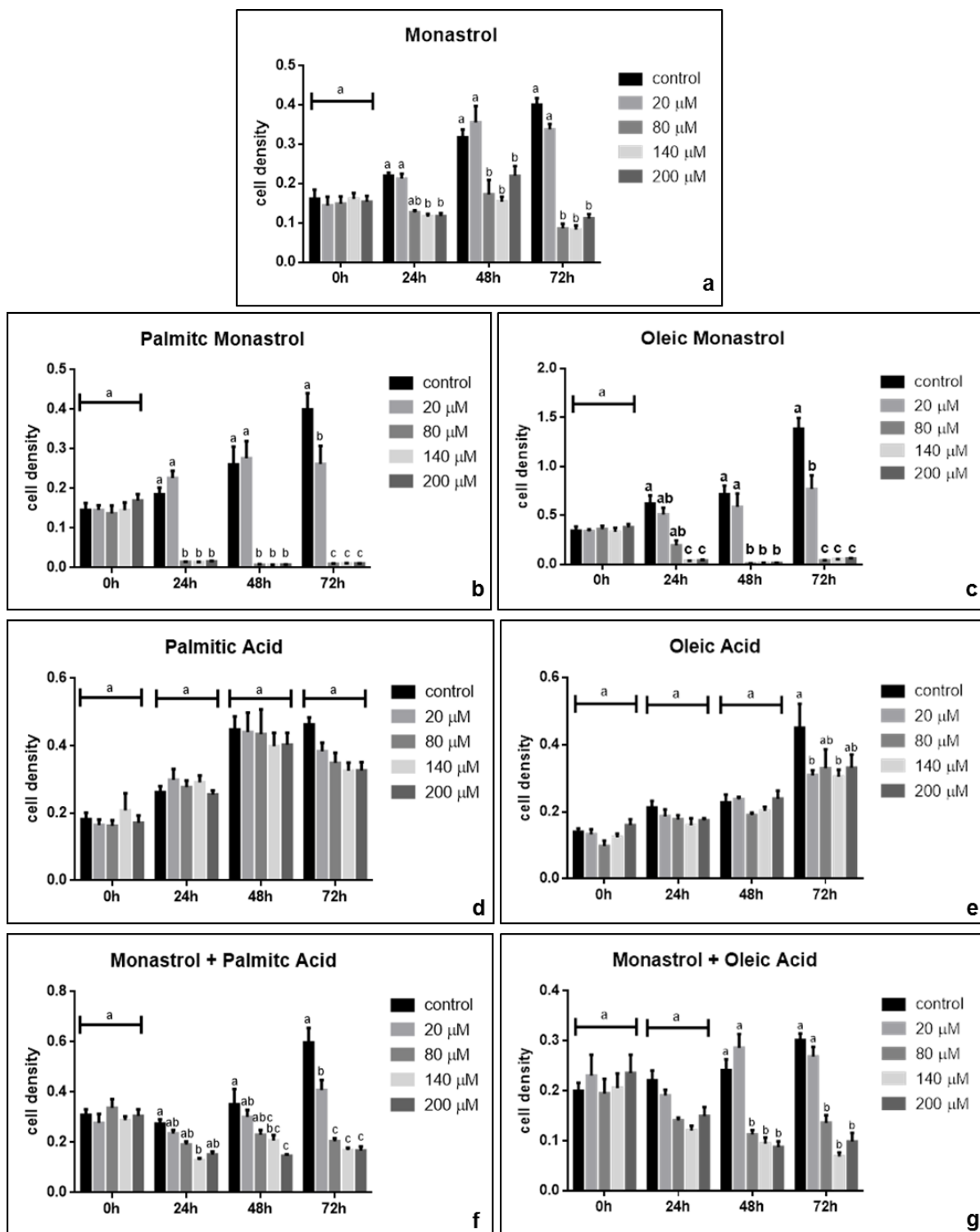


Figure 2: Cell proliferation, measured by MTT assay. Melan-a cells were treated with different concentrations of monastrol (a), palmitic monastrol (b), oleic monastrol (c), palmitic acid (d), oleic acid (e), monastrol + palmitic acid (f) and monastrol + oleic acid (g) at 0h, 24h, 48h and 72h. Data are expressed as mean \pm SE. Similar letters indicate absence of significant differences in each time ($p > 0.05$).

3.2. Apoptosis and/or Necrosis

Monastrol caused apoptosis in B16F10 cells after 24h exposure, for 80 μ M and 140 μ M. In the same time, no necrosis was found. In 48h and 72h, there was an increase in apoptosis for 140 μ M and necrosis was found, but it was only significantly different from control in 72h (Fig 3). Leizerman *et al.* (2004) found 50% of cells in apoptosis after 48h treatment with 100 μ M of monastrol, in AGS cell line, and 20% in Ht29 cells. And Sashidhara *et al.* (2013) have reported that coumarin–monastrol hybrid induce apoptosis in primary and metastatic breast cancer cell lines.

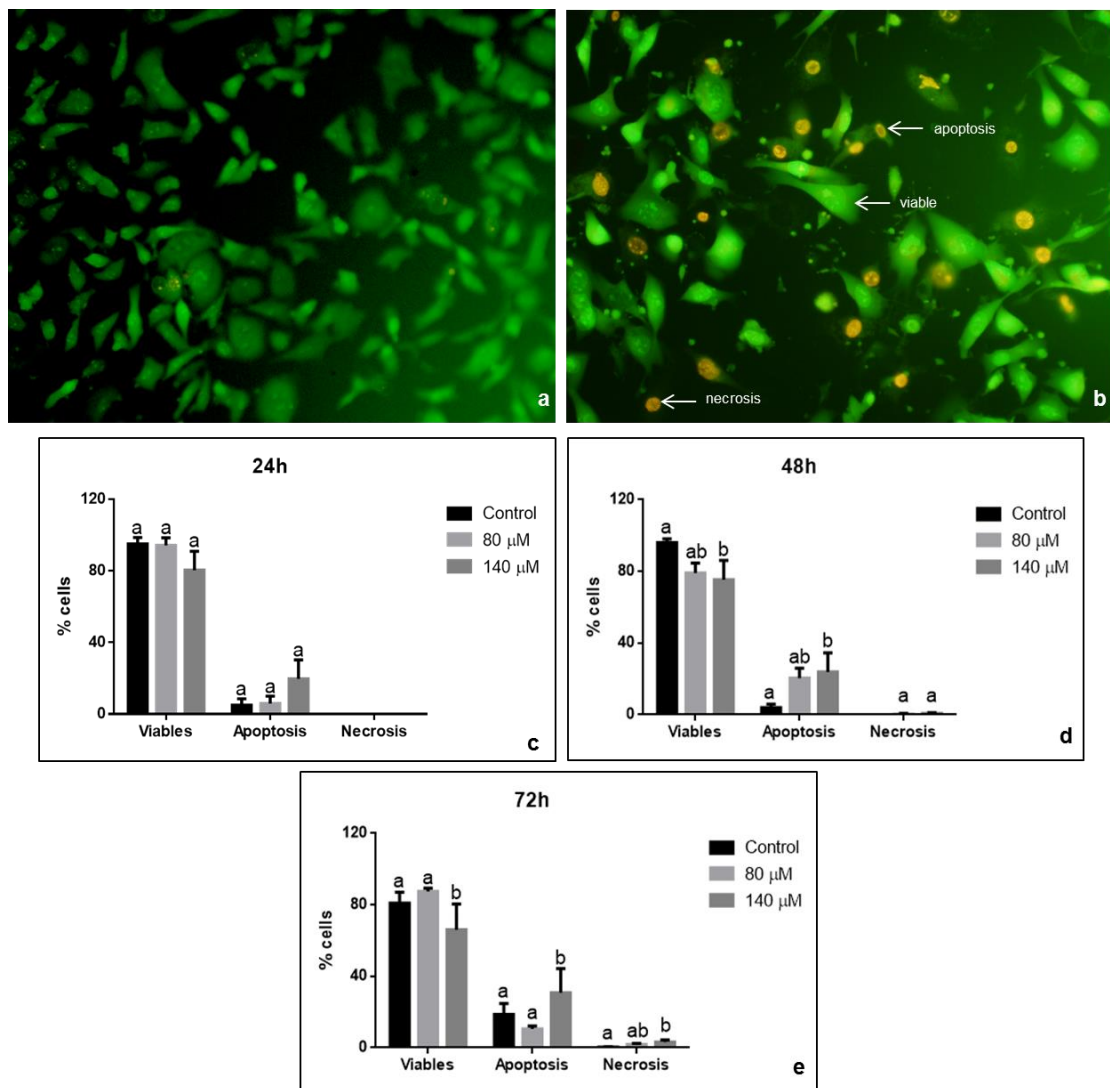


Figure 3: Visual field of cells in the control group demonstrating viable cells (a) and cells treated with 140 μ M of monastrol after 72h of exposure (b), showing viable cells, in apoptosis or necrosis captured by fluorescence microscopy. Percentage of viable, apoptotic and necrotic B16F10 cells 24h (c), 48h (d) and 72h (e) after treatment with 80 μ M and 140 μ M of monastrol from the visual field captured by fluorescence microscopy. Data are expressed as mean \pm SE. Similar letters indicate absence of significant differences in each group ($p > 0.05$).

However in our present study, for palmitic and oleic monastrol it wasn't possible to quantify apoptotic cells, because after 24h there was no more cells attached in the well. For this reason, we quantified apoptosis and necrosis at 0h, 3h and 6h after exposure to 80 μ M (data not shown) and 140 μ M of palmitic and oleic monastrol (Fig 4). Immediately after treatment with both concentrations there it was observed only viable cells, but after 3h the cells started detaching from the well, however, they still emitted green fluorescence, indicating viable cells. This effect suggests that palmitic and oleic monastrol might affect the adhesion proteins found in the cell membrane.

Cell adhesion to the extracellular matrix (ECM) plays an essential role in regulation of fundamental cellular processes, such as cell survival, proliferation and migration. Disruption in these cellular processes is involved in initiation and/or progression of various diseases. Integrin, a family of cell adhesion molecules, serves as a key determinant for adhesion-dependent cell regulation (Matsunaga *et al.*, 2014).

Velasco-Velázquez *et al.* (2003) analyzed the effects of 4-hydroxycoumarin (4-HC), one minor biotransformation product of coumarin, and found the 4-HC produced a concentration dependent reduction in the adhesion of B16F10 cells to ECM proteins. Their experiments described selective effects of 4-HC on metastatic melanoma cells on several parameters: cytoskeleton stability, adhesion to components of the ECM, motility, and phosphorylation on tyrosine residues. Efficient adhesion to ECM needs, besides integrin activation, adequate spatial organization of the cytoskeleton (Schoenwaelder and Burridge, 1999; Pawlak and Helfmann, 2001) and cytoskeletal contractility (Ingber, 2003; Zamir *et al.*, 1999) for the recruitment of signaling molecules.

In short, this results leads us to conclude that by modifying the molecular structure of monastrol its effect was also modified, indicating a change in its mechanism of action.

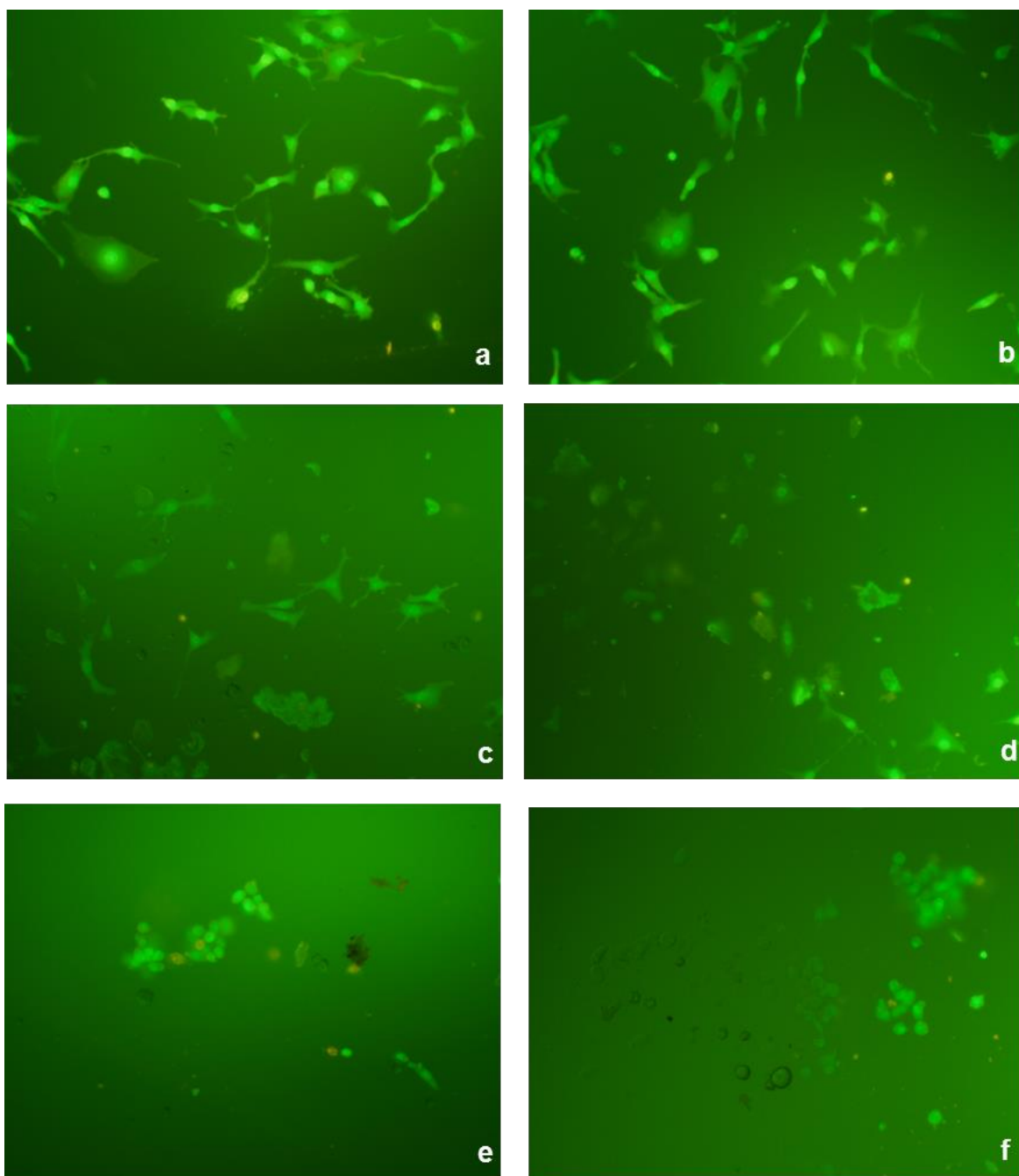


Figure 4: Visual field of cells treated with palmitic monastrol (a, c, e) and oleic monastrol (b, d, f) after 0h, 3h and 6h after exposure with 140 μ M, respectively, captured by fluorescence microscopy.

4. Conclusions

In short, monastrol inhibits cell growth in B16F10 and melan-a cell lines, but melan-a was more sensitive than B16F10. The structural modifications are shown to be effective, since palmitic and oleic monastrol were cytotoxic for both cell lines. This effectiveness is reinforced by the fact that when only the effect of palmitic and oleic acids were tested, no cytotoxic effect was observed. Unfortunately, these changes were not only effective for melanoma cells, since non-tumor cells were also sensitive, except for the lowest tested concentration of oleic monastrol, that caused inhibition of proliferation in the melanoma cells in less time than in non-tumoral melanocytes. For apoptosis and/or necrosis, monastrol caused apoptosis after 24h exposure. And in 48h and 72h, there was an increase in apoptosis for 140 μM and necrosis was found. However, palmitic and oleic monastrol showed a different effect, after 3h treatment cells detached from the well, indicating that they might affect the adhesion proteins found in the cell membrane. More studies must be developed to elucidate the mechanisms involved in this process, as well as the possibility to study the effects of these new molecules in other cell lines.

Acknowledgements

This work was financed by Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Ministério da Educação and Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas: Fisiologia Animal Comparada, FURG.

References

1. Atwal, K.S., Swanson, B. N., Unger, S. E., Floyd, D. M., Moreland, S., Hedberg, A., O'Reilly, B. C., 1991. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3.1 3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertensive agents. *J Med Chem*; 34, 806.
2. Brier, S., Lemaire, D., DeBonis, S., Forest, E., Kozielski, F., 2004. Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Biochem*; 43:13072–13082.

3. Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L., Pipeleers, D. G., 2001. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50:1771–1777.
4. Cochran, J. C., Gatial, J. E., Kapoor, T. M., Gilbert, S.P., 2005. Monastrol Inhibition of the Mitotic Kinesin Eg5. *J Biol Chem*; 280:12658–12667.
5. Hawkins, R.A, Sangster, M.J., Arends, M.J., 1998. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves Na oxidative mechanism. *J Pathol*; 185-1:61–70.
6. Ingber, D. E., 2003. Transegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* 116:1397–1408.
7. Jauk, B., Pernat, T., Kappe, C. O., 2000. Design and Synthesis of a Conformationally Rigid Mimic of the Dihydropyrimidine Calcium Channel Modulator SQ 32,926. *Molecules*; 5, 227–239.
8. Kappe C. O., 1998. 4-Aryldihydropyrimidines via the Biginelli condensation: Aza-analogs of nifedipine-type calcium. *Molecules*; 3, 1–30.
9. Kappe, C. O., 2000. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type - a literature survey. *Eur J Med Chem*; 35: 1043–1052.
10. Kosmider, B., Zyner, E., Osiecka, R., Ochocki, J., 2004. Induction of apoptosis and necrosis in A549 cells by the *cis*-Pt(II) complex of 3-aminoflavone in comparison with *cis*-DDP. *Mutat Res*; 563: 61-70.
11. Leizerman, R., Avunie-Masala, M., Elkbets, M., Fich, A., Gheber, L., 2004. Differential effects of monastrol in two human cell lines. *L Cell Mol Life Sci*; 61:2060–2070.
12. Matsunaga, T., Iyoda, T., Fukai, F., 2014. Chapter 12 – Adhesion-dependent cell Regulation via Adhesion molecule, integrin: Therapeutic application of integrin activation-modulating factors. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*; 243–260.
13. Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. I., Mitchison, T. J., 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*; 268, 971–974.
14. Mu, Y. M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C. H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, K., Nawata, H., 2001. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology* 142 (8): 3590–3597.

15. Ostrander, D. B., Sparagna, G. C., Amoscato, A. A., McMillin, J. B., Dowhan, W., 2001. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* 41 (12): 38061–38067.
16. Pawlak, G., Helfmann, D. M., 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*; 11:41–47.
17. Peters, T., Lindenmaier, H., Haefeli, W. E., Weiss, J., 2006. Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. *Arch Pharmacol*; 372:291–299.
18. Ribble, D., Goldstein, N. B., Norris, D. A., Shellman, Y. G., 2005. A simple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates. *BMC Biotechnol*; 5: 12.
19. Rovnyak, G. C., Atwal, K. S., Hedberg, A., Kimball, S. D., Moreland, S., Gougoutas, J. Z., O'Reilly, B. C., Schwartz, J., Malley, M. F., 1992. Dihydropyrimidine Calcium Channel Blockers. 4. Basic 3-Substituted-4-aryl-1,4-dihydropyrimidine-5-carboxylic Acid Esters. Potent Antihypertensive Agents. *J Med Chem*; 35: 3254.
20. Sandhu, S., Bansal, Y., Silakari, O., Bansal, G., 2014. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorgan Med Chem*; 22: 3806–3814.
21. Sashidhara, K. V., Avula, S. R., Sharma, K., Palnati, G. R., Bathula, S. R., 2013. Discovery of coumarin–monastrol hybrid as potential antibreast tumor-specific agent. *Eur J Med Chem*; 60:120-127.
22. Schoenwaelder, S. M., Burrige, K., 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*; 11:274–286.
23. Sousa Andrade, L. N., Lima, T. M., Curi, R., Castrucci, A. M. L., 2005. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicology in Vitro* 19:553–560.
24. Sparagna, G., Hickson-Bick, D., Buja, L., McMillin, J., 2000. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2124–H2132.
25. Velasco-Velázquez, M. A., Agramonte-Hevia, J., Barrera, D., Jiménez-Orozco, A., García-Mondragón, M. J., Mendoza-Patiño, N., Landa, A., Juan Mandoki, J., 2003. 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16–F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Lett* 198:179–186.

26. World Health Organization (WHO), site <http://www.who.int/en/>, accessed in November 25, 2014.
27. Zamir, E., Kats, B., Aota, S., Yamada, K., Geiger, B., Kam, Z., 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesion. *J Cell Sci* 112:1655–1669.

5. Discussão Geral

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito da adição de cadeias graxas ao monastrol, na linhagem celular de melanoma B16F10, e a sensibilidade da linhagem de melanócitos normais melan-a aos mesmos compostos. Para investigar o efeito do monastrol, monastrol palmítico e monastrol oleico na proliferação celular da B16F10 foram realizados testes de viabilidade por MTT. Esse teste mostrou que o monastrol, após 48h de tratamento, inibe a proliferação celular nas concentrações de 80 μM , 140 μM e 200 μM .

Peters e colaboradores (2006) testaram o monastrol em uma linhagem de adenocarcinoma de cólon humano, e descobriram que o monastrol tem um efeito tempo e concentração dependente na expressão do mRNA da glicoproteína P (Pgp), uma bomba de efluxo responsável pela extrusão quimioterápica pelas células resistentes a múltiplas drogas (MDR). O campo da quimioterapia apresenta muitos avanços, mas ainda tem dois grandes problemas associados com tratamento citostático: efeitos colaterais severos, como neurotoxicidade, e o desenvolvimento de resistência a múltiplas drogas. A linhagem celular B16F10 é muito resistente e *in vivo* forma um tumor muito agressivo. O descobrimento de inibidores da cinesina Eg5 que tem como alvo específico a formação do fuso mitótico, como o monastrol, pode ser uma oportunidade de desenvolver drogas antitumorais com efeitos colaterais menores e com potencial de superar a resistência a múltiplas drogas.

Leizerman e colaboradores (2004) descobriram que na concentração de 50 μM , após 72h, monastrol inibe a proliferação celular na linhagem AGS, adenocarcinoma gástrico humano, mas na linhagem HT29, adenocarcinoma de cólon humano, a inibição foi apenas induzida em altas concentrações, como 150 μM , indicando que a AGS é mais sensível ao monastrol. Nessa mesma linhagem, a parada celular causada pelo monastrol após 24h foi reversível, mas não em 48h, onde mesmo após a remoção do monastrol a maioria das células ficou parada na fase G2/M, e o número de células contendo sub-G1 DNA aumentou, indicando que as células irreversivelmente paradas no ciclo G2/M pelo monastrol entram em apoptose. Na linhagem Ht29 após 48h, a parada no ciclo foi parcialmente reversível, consistente com uma menor sensibilidade.

Na linhagem melan-a, o monastrol inibiu proliferação após 24h, mostrando um efeito maior quando comparado a B16F10, nas concentrações de 80 μM , 140 μM e 200 μM .

Em relação à mudança estrutural do monastrol, o monastrol palmítico e o monastrol oleico foram citotóxicos após 24h de exposição nas concentrações de 80 μM , 140 μM e 200 μM e inibiram a proliferação celular em 20 μM após 72h e 48h, respectivamente, na linhagem celular B16F10.

Sashidhara e colaboradores (2013) testaram cumarina-monastrol híbridos em diferentes linhagens celulares, MCF-7, T47D, MDA-MB-231 (câncer de mama), A549 (câncer de pulmão), PC-3, DU-145 (câncer de próstata), HepG2 (carcinoma do fígado humano), NIH3T3 (fibroblasto embrionário murino), HEK-293 (fígado humano) e fibroblastos primários isolados de pele de rato. Seus resultados mostraram que um dos híbridos, cumarina-tiodiidropirimidinona com grupo terciário butil no anel de benzeno do segmento da cumarina, inibiu significativamente a proliferação das linhagens de câncer de mama, MCF-7, T47D, MDA-MB-231, em todas as concentrações testadas (2,5 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM) dependente do tempo. Adicionalmente, não houve atividade nas linhagens normais. Entretanto, esse híbrido não apresentou efeito antitumoral significativos nas outras linhagens cancerígenas.

Na linhagem melan-a, o monastrol palmítico e o monastrol oleico foram citotóxicos após 24h, nas mesmas concentrações que para a B16F10. Entretanto, as duas moléculas inibiram a proliferação celular em 20 μM somente após 72h, diferentemente da linhagem B16F10, na qual o monastrol oleico inibiu a proliferação já em 48h, indicando que pelo menos para esta modificação estrutural do monastrol a linhagem celular melan-a foi menos sensível quando comparada a linhagem celular B16F10.

Para podermos verificar a eficiência da modificação química do monastrol (construção da nova molécula) foram realizados testes apenas com os ácidos palmítico e oleico, assim como a combinação de cada um com o monastrol. O ácido palmítico não apresentou nenhum efeito na B16F10, e o ácido oleico inibiu proliferação em todas as concentrações após 48h, diferente do encontrados por Souza Andrade e colaboradores (2005), onde, para a B16F10, o ácido palmítico em concentração de 200 μM induz perda da integridade da membrana após 24h, e o

ácido oleico não apresenta nenhum efeito na viabilidade celular. Entretanto, na linhagem de melanoma murinho S91, 200 μM de ácido oleico causou perda na integridade da membrana e fragmentação do DNA após 24h, e o ácido palmítico não apresentou nenhum efeito. Para linhagens de melanoma humano, SK-Mel 23 e SK-Mel 28, o ácido palmítico causou perda na integridade da membrana após 48h e fragmentação do DNA após 24h, respectivamente, o ácido oleico não apresentou nenhum efeito nas linhagens humanas. Hawkins e colaboradores (1998) mostraram que concentrações micromolares de ácidos graxos são tóxicas para células de câncer *in vitro* e *in vivo*, mas nosso estudo não encontrou citotoxicidade para nenhum dos ácidos, apenas inibição de proliferação para o ácido oleico.

Na linhagem celular não tumoral, o ácido palmítico não apresentou efeito, e o ácido oleico apresentou efeito de inibição de proliferação após 72h em todas as concentrações, mostrando que a linhagem celular melan-a é mais resistente ao ácido oleico quando comparada à linhagem tumoral. Vários estudos demonstraram um efeito tóxico do ácido palmítico, como apoptose ou necrose, em células normais como ilhotas pancreáticas (Cnop *et al.*, 2001), cardiomiócitos de ratos (Sparagna *et al.*, 2000; Ostrander *et al.*, 2001), e células granulosas (Mu *et al.*, 2001).

A combinação entre monastrol e ácido palmítico ou monastrol e ácido oleico, para B16F10 e melan-a, mostraram apenas o efeito do monastrol, ou, na combinação com ácido oleico, mostrou a soma dos efeitos, indicando que o efeito aumentado do monastrol palmítico e oleico é realmente o resultado da modificação na estrutura do monastrol, e não da combinação do monastrol com os ácidos graxos.

O monastrol foi capaz de causar apoptose a partir de 24h de exposição, para as concentrações de 80 μM e 140 μM , e nenhuma necrose foi encontrada nesse tempo. Em 48h e 72h houve um aumento na apoptose e foi encontrada necrose, mas só foi significativa em 72h. Leizerman e colaboradores (2004) encontram na linhagem AGS 50% das células em apoptose e na linhagem HT29 20% das células em apoptose após 48h, com a concentração de 100 μM de monastrol. E Sashidhara e colaboradores (2013) encontraram que o híbrido cumarina-monastrol induz apoptose em linhagens primárias e metastáticas de câncer de mama.

Entretanto no presente estudo, para o monastrol palmítico e oleico não foi possível quantificar células em apoptose, porque após 24h de exposição não havia

mais células aderidas na placa. Por esse motivo, realizamos o teste de apoptose e/ou necrose nos tempos de 0h, 3h e 6h nas concentrações de 80 μM e 140 μM . Imediatamente após tratamento havia apenas células viáveis, mas a partir de 3h as células começaram a perder a aderência, entretanto, elas ainda emitiam fluorescência verde, indicando células viáveis. Esse efeito sugere que o monastrol palmítico e o monastrol oleico podem afetar as proteínas de adesão encontradas na membrana celular.

A adesão celular à matriz extracelular (ECM) desempenha um papel essencial na regulação de processos celulares fundamentais, tais como a sobrevivência celular, a proliferação e a migração. A interrupção desses processos celulares está envolvida na iniciação e/ou progressão de várias doenças. Integrinas, uma família de moléculas de adesão celular, serve como um fator determinante para a regulação celular dependente de adesão (Matsunaga *et al.*, 2014).

Velasco-Velázquez e colaboradores (2003) analisaram o efeito da 4-hidroxicumarina (4-HC), um produto da biotransformação menor de cumarina, e descobriram que a 4-HC produz uma redução na adesão das células B16F10 as proteínas da matriz dependente da concentração. Seus experimentos descreveram um efeito seletivo da 4-HC em células de melanoma metastáticas em diversos parâmetros: estabilidade do citoesqueleto, adesão dos componentes da matriz extracelular, motilidade e fosforilação dos resíduos de tirosina. Uma adesão eficiente à matriz extracelular necessita, além da ativação da integrina, organização espacial do citoesqueleto (Schoenwaelder and Burridge, 1999; Pawlak and Helfmann, 2001) e contratilidade do citoesqueleto (Ingber, 2003; Zamir *et al.*, 1999) para o recrutamento das moléculas sinalizadoras.

Em resumo, esse resultado nos leva a concluir que ao modificar a estrutura molecular do monastrol seu efeito também foi modificado, indicando uma modificação no seu mecanismo de ação.

6. Referências

1. Atwal, K.S., Swanson, B. N., Unger, S. E., Floyd, D. M., Moreland, S., Hedberg, A., O'Reilly, B. C., 1991. Dihydropyrimidine calcium channel blockers. 3.1 3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic acid esters as orally effective antihypertensive agents. *J Med Chem*;34, 806.
2. Bhalla, K., 2003. Microtubule-targeted anticancer agents and apoptosis. *Oncogene*; 22:9075-86.
3. Brier, S., Lemaire, D., DeBonis, S., Forest, E., Kozielski, F., 2004. Identification of the protein binding region of S-trityl-L-cysteine, a new potent inhibitor of the mitotic kinesin Eg5. *Biochem*; 43:13072-13082.
4. Calviello, G., Di Nicuolo, F., Serini, S., Piccioni, E., Boninsegna, A., Maggiano, N., Ranelletti, F. O., Palozza, P., 2005. Docosahexaenoic acid enhances the susceptibility of human colorectal cancer cells to 5-fluorouracil. *Cancer Chemother Pharmacol*; 55: 12-20.
5. Cnop, M., Hannaert, J. C., Hoorens, A., Eizirik, D. L., Pipeleers, D. G., 2001. Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation. *Diabetes* 50:1771-1777.
6. Cochran, J. C., Gatial, J. E., Kapoor, T. M., Gilbert, S.P., 2005. Monastrol Inhibition of the Mitotic Kinesin Eg5. *J. Biol Chem*; 280:12658-12667.
7. Cochran, J. C., Gilbert, S. P., 2005. ATPase mechanism of Eg5 in the absence of microtubules: insight into microtubule activation and allosteric inhibition by monastrol. *Biochem*; 44:16633-16648
8. DeBonis, S., Simorre, J.-P., Crevel I., Lebeau, L., Skoufias, D. A., Blangy, A., Ebel, C., Gans, P., Cross, R., Hackney, D. D., Wade, R. H., Kozielski, F., 2003. Interaction of the mitotic inhibitor monastrol with human kinesin Eg5. *Biochem*; 42:338-349.
9. Duan, L., Wang, T-Q., Bian, W., Liu, W., Sun, Y., Yang, B-S., 2015. Centrin: Another target of monastrol, an inhibitor of mitotic spindle. *Spectrochim Acta A*; 137: 1086-1091.
10. Fong, W-F., Wang, C., Zhu, G-Y., Leung, C-H., Yang, M-S., Cheung H-Y., 2007. Reversal of multidrug resistance in cancer cells by *Rhizoma Alismatis* extract. *Phytomed*; 14: 160-165.

11. Hawkins, R.A, Sangster, M.J., Arends, M.J., 1998. Apoptotic death of pancreatic cancer cells induced by polyunsaturated fatty acids varies with double bond number and involves Na oxidative mechanism. *J Pathol*; 185-1:61–70.
- Ingber, D. E., 2003. Transegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J Cell Sci* 116:1397–1408.
12. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Brasil), 2014. Estimativa 2014 – Incidência de Câncer no Brasil. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2014; 60(1):63.
13. Jauk, B., Pernat, T., Kappe, C. O., 2000. Design and Synthesis of a Conformationally Rigid Mimic of the Dihydropyrimidine Calcium Channel Modulator SQ 32,926. *Molecules*; 5, 227–239.
14. Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E., Forman, D., 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*; 61: 69-90.
15. Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., Mitchison, T. J., 2000. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J Cell Biol*; 150:975–988.
16. Kappe C. O., 1998. 4-Aryldihydropyrimidines via the Biginelli condensation: Aza-analogs of nifedipine-type calcium. *Molecules*; 3, 1–30.
17. Kappe, C. O., 2000. Biologically active dihydropyrimidones of the Biginelli-type - a literature survey. *Eur J Med Chem*; 35: 1043–1052.
18. Kashina, A. S., Rogers, G. C., Scholey, J. M., 1997. The bimC family of kinesins: essential bipolar mitotic motors driving centrosome separation. *Biochim Biophys Acta*; 1357: 257–271.
19. Leizerman, R., Avunie-Masala, M., Elkbets, M., Fich, A., Gheber, L., 2004. Differential effects of monastrol in two human cell lines. *L Cell Mol Life Sci*; 61:2060–2070.
20. Matsunaga, T., Iyoda, T., Fukai, F., 2014. Chapter 12 – Adhesion-dependent cell Regulation via Adhesion molecule, integrin: Therapeutic application of integrin activation-modulating factors. *Colloid and Interface Science in Pharmaceutical Research and Development*; 243–260.
21. Mayer, T. U., Kapoor, T. M., Haggarty, S. J., King, R. W., Schreiber, S. I., Mitchison, T. J., 1999. Small molecule inhibitor of mitotic spindle bipolarity identified in a phenotype-based screen. *Science*; 268, 971–974.

22. Mu, Y. M., Yanase, T., Nishi, Y., Tanaka, A., Saito, M., Jin, C. H., Mukasa, C., Okabe, T., Nomura, M., Goto, K., Nawata, H., 2001. Saturated FFAs, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis in human granulosa cells. *Endocrinology* 142 (8): 3590–3597.
23. Ostrander, D. B., Sparagna, G. C., Amoscato, A. A., McMillin, J. B., Dowhan, W., 2001. Decreased cardiolipin synthesis corresponds with cytochrome c release in palmitate-induced cardiomyocyte apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 41 (12): 38061–38067.
24. Pawlak, G., Helfmann, D. M., 2001. Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev*; 11:41–47.
25. Peters, T., Lindenmaier, H., Haefeli, W. E., Weiss, J., 2006. Interaction of the mitotic kinesin Eg5 inhibitor monastrol with P-glycoprotein. *Arch Pharmacol*; 372:291–299.
26. Rovnyak, G. C., Atwal, K. S., Hedberg, A., Kimball, S. D., Moreland, S., Gougoutas, J. Z., O'Reilly, B. C., Schwartz, J., Malley, M. F., 1992. Dihydropyrimidine Calcium Channel Blockers. 4. Basic 3-Substituted-4-aryl-1,4-dihydropyrimidine-5-carboxylic Acid Esters. Potent Antihypertensive Agents. *J Med Chem*; 35: 3254.
27. Russowsky, D., Canto, R. F. S., Sanches, S. A. A., D'Oca, M. G. M., Fátima, A., Pilli, R. A., Kohn, L. K., Antônio, M. A., Carvalho, J. E., 2006. Synthesis and differential antiproliferative activity of Biginelli compounds against cancer cell lines: Monastrol, oxo-monastrol and oxygenated analogues. *Bioorg Chem*; 34: 173–182.
28. Sakowicz, R., Finer, J. T., Beraud, C., Crompton, A., Lewis, E., Fritsch, A., Lee, Y., Mak, J., Moody, R., Turincio, R., Chabala, J. C., Gonzales, P., Roth, S., Weitman, S., Wood, K. W., 2004. Antitumor Activity of a Kinesin Inhibitor. *Cancer Res*; 64:3276-3280.
29. Sandhu, S., Bansal, Y., Silakari, O., Bansal, G., 2014. Coumarin hybrids as novel therapeutic agents. *Bioorgan Med Chem*; 22: 3806–3814.
30. Sashidhara, K. V., Avula, S. R., Sharma, K., Palnati, G. R., Bathula, S. R., 2013. Discovery of coumarin–monastrol hybrid as potential antibreast tumor-specific agent. *Eur J Med Chem*; 60:120-127.

31. Sawin, K. E., LeGuellec, K., Philippe, M., and Mitchison, T. J., 1992. Mitotic spindle organization by a plus-end-directed microtubule motor. *Nature*; 359:540–543.
32. Sawin, K. E., Mitchison, T. J., 1995. Mutations in the kinesin-like protein Eg5 disrupting localization to the mitotic spindle. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 92:4289–4293.
33. Schoenwaelder, S. M., Burridge, K., 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol*; 11:274–286.
34. Srsen, V., Merdes, A., 2006. The centrosome and cell proliferation. *Cell Div*; 1: 26–30.
35. Sousa Andrade, L. N., Lima, T. M., Curi, R., Castrucci, A. M. L., 2005. Toxicity of fatty acids on murine and human melanoma cell lines. *Toxicology in Vitro* 19:553–560.
36. Sparagna, G., Hickson-Bick, D., Buja, L., McMillin, J., 2000. A metabolic role for mitochondria in palmitate-induced cardiac myocyte apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279, H2124–H2132.
37. Velasco-Velázquez, M. A., Agramonte-Hevia, J., Barrera, D., Jiménez-Orozco, A., García-Mondragón, M. J., Mendoza-Patiño, N., Landa, A., Juan Mandoki, J., 2003. 4-Hydroxycoumarin disorganizes the actin cytoskeleton in B16–F10 melanoma cells but not in B82 fibroblasts, decreasing their adhesion to extracellular matrix proteins and motility. *Cancer Lett* 198:179–186.
38. Walczak, C. E. and Mitchison, T. J., 1996. Kinesin-related proteins at mitotic spindle poles: function and regulation. *Cell*; 85: 943–946.
39. Wickstead, B., and Gull, K., 2006. A “holistic” kinesin phylogeny reveals new kinesin families and predicts protein functions. *Mol Biol Cell* 17:1734–1743.
40. Wood, K. W., Cornwell, W. D., Jackson, J. R., 2001. Past and future of the mitotic spindle as an oncology target. *Curr Opin Pharmacol*; 1:370 –7.
41. Wojcik, E. J., Buckley, R. S., Richard, R. S., Liu, L., Huckaba, T. M., Kim, S., 2013. Kinesin-5: Cross-bridging mechanism to targeted clinical therapy. *Gene* 531(2):133-149.
42. World Health Organization (WHO), site <http://www.who.int/en/>, acessado em 25 de novembro de 2014.
43. Zamir, E., Kats, B., Aota, S., Yamada, K., Geiger, B., Kam, Z., 1999. Molecular diversity of cell-matrix adhesion. *J Cell Sci* 112:1655–1669.