



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E MODELAGEM
MOLECULAR

Thayanne Macedo Pinheiro

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO OTSSP167 EM LINHAGENS DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO COM AMPLIFICAÇÃO DO GENE *MELK***

Belém-PA

2019

Thayanne Macedo Pinheiro

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DO OTSSP167 EM LINHAGENS DE
ADENOCARCINOMA GÁSTRICO COM AMPLIFICAÇÃO DO GENE *MELK***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno

Belém-PA

2019

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo
com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos
pelo(a) autor(a)**

P654a Pinheiro, Thayanne Macedo
Avaliação do efeito do OTSSP167 em linhagens de
adenocarcinoma gástrico com amplificação do gene MELK /
Thayanne Macedo Pinheiro. — 2019.
70 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da
Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. proteína cinase. 2. pequena molécula inibitória. 3. inibidor de
MELK. 4. medicina de precisão. 5. câncer gástrico.
I. Título.

CDD 616.99406

Thayanne Macedo Pinheiro

Avaliação do efeito do OTSSP167 em linhagens de adenocarcinoma gástrico com amplificação do gene *MELK*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular.

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
Universidade Federal do Pará
Orientadora

Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima
Universidade do Estado do Pará
Membro

Profa. Dra. Bárbara do Nascimento Borges
Universidade Federal do Pará
Membro

Profa. Dra. Laine Celestino Pinto
Universidade Federal do Pará
Suplente

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre incentivaram e apoiaram meus estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por ser essencial em minha vida, por iluminar e dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, Maria e Nonato, que amo incondicionalmente, sempre me motivaram, primaram pela minha educação e sonharam os meus sonhos. Por compreenderem as minhas faltas e momentos de afastamento e reclusão. Agradeço também à minha avó, que sempre me colocou em suas orações, ao meu irmão, tios e primos, que torceram por mim.

Às minhas amigas, Luana Paula, Maria de Lourdes, Mayara e Raymara, que apesar de estarem longe, deram apoio e me fizeram ter otimismo. Agradeço igualmente aos amigos que a faculdade me proporcionou, Vivianne Araújo, Camila Albuquerque, Dayse Minelle, Ana Paula, João Marcos e Juliany, que juntos aprendemos e crescemos profissionalmente, sempre compartilhando as alegrias e os momentos difíceis.

À minha orientadora Profa. Danielle Calcagno, pela competência, profissionalismo e dedicação. Obrigada pela confiança, pelos incentivos e pelas correções que foram fundamentais para a elaboração desse trabalho.

Aos amigos do Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO), Carlos Henrique, Kelly Cristina, Juliana, Fernanda, Elizângela, Ronald, Jéssica, Iago e especialmente à Suzy Pacheco que foi uma grande companheira na realização dos experimentos desse trabalho, sempre presente e abdicando de feriados e fins de semana. Aos demais frequentadores do laboratório: Eliel, Ingrid, Sol, Aline, Susy, Daniele e Taíssa, que contribuíram compartilhando experiências e materiais que foram essenciais para a execução dos experimentos.

À Profa. Vanessa Freitas e à querida Ana Ralph, que abriram as portas do Departamento de Biologia Celular e do Desenvolvimento da USP e nos receberam atenciosamente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, bem como todos os professores e funcionários. À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro. E também a parceria com a UNIFESP e à FAPESP pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Por fim, agradeço a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização desta dissertação, o meu sincero agradecimento.

“O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir”.

(Albert Einstein)

RESUMO

O câncer gástrico é considerado o quinto tipo tumoral mais frequente no mundo, e devido a sua heterogeneidade faz-se necessário a utilização de terapias individualizadas que apresentam menor toxicidade e maior eficácia durante o tratamento. Em um estudo prévio, nosso grupo relatou o aumento do número de cópias do gene *MELK* em aproximadamente 55,9% dos tumores de pacientes com adenocarcinoma gástrico e nas linhagens de célula desse tipo tumoral. Esse gene codifica a proteína *maternal embryonic leucine zipper kinase* (MELK), membro da família serina/treonina cinase, que participa de múltiplos processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, proliferação celular, apoptose, migração celular e outros. O aumento da sua expressão foi observado em diferentes tipos de câncer, incluindo o câncer gástrico. Com isso, o presente estudo avaliou por meio de análises *in silico*, as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas do OTSSP167, sua atividade antineoplásica em linhagens de células de câncer gástrico, ACP03 e AGP01, analisando a viabilidade celular, a interferência desse inibidor na expressão proteica de MELK nas linhagens, a capacidade de invasão e migração das células. Nas análises *in silico*, o OTSSP167 apresentou alta probabilidade de absorção intestinal, toxicidade de grau III e maior escore de atividade para a inibição de cinase. Nos experimentos *in vitro*, o OTSSP167 apresentou atividade citotóxica nas linhagens gástricas, com maior atividade citotóxica contra a ACP03 (CI₅₀=8,5nM). Além disso, esse inibidor conseguiu reduzir a expressão de MELK nas linhagens ACP03 e AGP01 gradativamente de acordo com a concentração do composto. Em relação à capacidade de migração, o OTSSP167 foi capaz de inibir significativamente a migração de células ACP03 tratadas por 12 horas com três diferentes concentrações do composto (4,25nM, 8,5nM e 17nM), mas nas análises de 24 horas houve apenas significância estatística nas concentrações 8,5nM e 17nM do OTSSP167. No entanto, a avaliação de capacidade de invasão das células após o tratamento com OTSSP167 por 48 horas não apresentou resultados estatísticos significantes. Desse modo, os resultados sugerem que OTSSP167 possui atividade antineoplásica em linhagens com amplificação do gene *MELK* e inibi a capacidade de migração celular. Portanto, OTSSP167 apresenta potencial aplicabilidade em futuras terapias, sendo necessário a realização de testes adicionais para delimitar o mecanismo de ação do composto.

Palavras-chave: proteína cinase; pequena molécula inibitória; inibidor de MELK; medicina de precisão; câncer gástrico.

ABSTRACT

Gastric cancer is considered the fifth most common type of tumor in the world, and due to its heterogeneity, it is necessary to use individualized therapies that present less toxicity and greater efficacy during treatment. In a previous study, our group reported an increased copy number of the *MELK* gene in approximately 55.9% of tumors in patients with gastric adenocarcinoma and such tumor cell lines. This gene encodes *maternal embryonic leucine zipper kinase* (MELK) protein, a member of the serine/threonine kinase family, which participates in multiple cellular processes including cell cycle progression, cell proliferation, apoptosis, cell migration, and others. The increased expression has been observed in different cancers, including gastric cancer. Thus, the present study evaluated by *in silico* analysis the pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of OTSSP167, its antineoplastic activity in gastric cancer cell lines ACP03 and AGP01, analyzing cell viability, the interference of this inhibitor in the protein expression of MELK in lineages, the ability of cell invasion and migration. *In silico* analyses, OTSSP167 showed a high probability of intestinal absorption, grade III toxicity and higher activity score for kinase inhibition. *In vitro* experiments, OTSSP167 showed cytotoxic activity in gastric strains, with higher cytotoxic activity against ACP03 (IC₅₀ = 8.5nM). Also, this inhibitor was able to reduce MELK expression in ACP03 and AGP01 strains gradually according to the concentration of the compound. Regarding migration capacity, OTSSP167 was able to significantly inhibit the migration of ACP03 cells treated for 12 hours with three different concentrations of compound (4.25nM, 8.5nM, and 17nM), but in the 24-hour analyzes, there was only significance. OTSSP167 8.5nM and 17nM concentrations. However, the evaluation of cell invasion capacity after treatment with OTSSP167 for 48 hours did not yield significant statistical results. Thus, the results suggest that OTSSP167 has antineoplastic activity in lines with *MELK* gene amplification and inhibits cell migration capacity. Therefore, OTSSP167 has potential applicability in future therapies, requiring additional tests to delimit the mechanism of action of the compound.

Keywords: protein kinase; small inhibitory molecule; MELK inhibitor; precision medicine; gastric cancer.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Estrutura da proteína cinase Src.....	17
Figura 2- Esquema de fosforilação de Thr, Ser e Tyr.....	18
Figura 3- Cascata de sinalização de proteínas cinases.....	20
Figura 4- Dendrograma que representa os oito grupos de proteínas cinases.....	20
Figura 5- Classificação das proteínas cinases.....	21
Figura 6- Ativação da PKA.....	23
Figura 7- Níveis de ciclina em cada etapa do ciclo celular.....	24
Figura 8- Mecanismos que regulam a atividade da cinase AMPK.....	25
Figura 9- Representação da localização e estrutura do gene <i>MELK</i>	26
Figura 10- A interação de MELK com algumas proteínas.....	27
Figura 11- Homologia dos domínios do gene <i>MELK</i> em diferentes espécies.....	29
Figura 12- As fases do ciclo celular.....	30
Figura 13- Estrutura química do OTSSP167.....	37
Figura 14- Representação esquemática da síntese de MELK e ação do inibidor OTSSP167.....	39
Figura 15- Expressão de proteína MELK, α -Tubulina e β -Actina em linhagens de células gástricas e células mamárias.....	51
Figura 16- Fotomicrografia das células ACP03 durante o ensaio de migração.....	54
Gráfico 1- Porcentagem de classes alvos do OTSSP167.....	49
Gráfico 2- Efeito citotóxico do OTSSP167 nas linhagens gástricas AGP01 e ACP03.....	50
Gráfico 3- Avaliação da ação do OTSSP167 sobre a migração de células ACP03.....	54
Gráfico 4- Avaliação da ação do OTSSP167 sobre a invasão de células ACP03.....	55

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1- Ciclinas e CDKs de vertebrados.....	24
Quadro 2- Atividade dos principais inibidores de MELK.....	35
Quadro 3- Valores bioquímicos de IC ₅₀ do OTSSP167 em diferentes cinases.....	38
Quadro 4- Código SMILES do composto.....	47
Quadro 5- Características físico-químicas do composto.....	47
Quadro 6- Predição pelo servidor admetSAR.....	48
Quadro 7- Escore da função biológica do OTSSP167.....	49
Tabela 1- CI ₅₀ do OTSSP167 nas linhagens AGP01 e ACP03 após 72h de tratamento.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2D-PAGE	<i>Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis</i>
ABL	<i>Abelson kinase</i>
aCGH	Hibridização genômica comparativa array
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
ADP	Adenosina difosfato
AKT	Proteína cinase B
AMP	Adenosina monofosfato
AMPC	Monofosfato de adenosina cíclica
AMPK	Proteína serina/treonina cinase ativada por 5'adenosina monofosfato
ASK1	<i>Apoptosis signal regulated kinase 1</i>
ATP	Adenosina trifosfato
ATSP	Área de superfície polar
Bcl-G	<i>B-cell lymphoma gonad</i>
CAMK	<i>Calcium/calmodulin-dependent kinase</i>
CaMKK2	<i>Calcium-calmodulin-dependent kinase kinase 2</i>
CDC25B	M-phase inducer phosphatase 2
CDK	Proteína cinase dependente de ciclina
CG	Câncer gástrico
CGH	Hibridização genômica comparativa
CI ₅₀	Concentração inibitória de 50%
CK1	<i>Casein kinase 1</i>
CNA	Alterações no número de cópia
DBNL	<i>Drebrin-like</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EZH2	<i>Enhancer Of Zeste Homolog 2</i>
FDP	Food and drug administration

FGFR	<i>Fibroblast growth factor receptor</i>
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FLT3	<i>FMS-like tyrosina kinase</i>
FOXM1	<i>Forkhead Box M1</i>
GDP	Guanosina difosfato
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanosina trifosfato
H2O2	Peróxido de hidrogênio
ICKP	<i>International Center for Kinase Profiling</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
KA1	Domínio associado a cinase 1
<i>KCNK9</i>	<i>Potassium Two Pore Domain Channel Subfamily K Member 9</i>
LCH	Laboratório de Citogenética Humana
LKB1	<i>Liver kinase B 1</i>
LMA	Leucemia mieloide aguda
LMC	Leucemia mieloide crônica
MAP-2	Proteína associada a microtúbulo do tipo 2
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MELK	<i>Maternal embryonic leucine zipper kinase</i>
<i>MOS</i>	Proto-oncogene, serina/treonina cinase
MPK38	<i>Murine Protein Kinase 38</i>
MTD	Dose máxima tolerada
<i>MYC</i>	Proto-oncogene, fator de transcrição BHLH
NLR	Número de ligações rotacionáveis
NRTK	Proteína tirosina cinase não receptora
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGFR	<i>Platelet derived growth factor receptor</i>
pEg3	<i>Paternally-Expressed gene 3</i>

PIG-1	Pre-intermoult <i>gene-1</i>
PK	Proteína cinase
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PSMA1	<i>Proteasome subunit alpha type 1</i>
<i>PTK2</i>	Proteína tirosina cinase 2
<i>PTP4A3</i>	Proteína tirosina fosfatase 4A3
<i>RAD54B</i>	RAD54 Homólogo B
RGC	<i>Receptor guanylate cyclase</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RNAi	Ácido ribonucleico de interferência
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RTK	Proteína tirosina cinase receptora
SBF	Soro bovino fetal
Ser	Serina
SH2	<i>Domínios de homologia com Src 2</i>
SH3	<i>Domínios de homologia com Src 3</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Thr	Treonina
TIE	<i>Tyrosine kinase with immunoglobulin-like</i>
TK	Tirosina cinase
TLK	<i>tyrosine kinase-like kinase</i>
Tyr	Tirosina
UBA	Ubiquitina
VEGFR	<i>Vascular endothelial growth factor receptor</i>
<i>WISP</i>	<i>WASP interactor protein</i>
ZPR9	Proteína dedo de zinco 9

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	15
1.2 CÂNCER GÁSTRICO (CG)	16
1.3 PROTEÍNAS CINASES	17
1.3.1 Tirosina Cinases (TK)	22
1.3.2 Serina/Treonina Cinases	22
1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PROTEÍNA MELK.....	26
1.4.1 Ortólogos de MELK em diferentes espécies	28
1.4.2 A relação do MELK com o ciclo celular	30
1.4.3 MELK e câncer	31
1.5 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS	33
1.5.1 Inibidores de MELK	34
1.5.2 OTSSP167	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 OBJETIVO GERAL.....	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1 LINHAGENS DE CÉLULAS E CULTIVO	42
3.2 DROGA	42
3.3 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA DROGA.....	42
3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO POR ALAMAR BLUE.....	43
3.5 WESTERN BLOT.....	44
3.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO POR CICATRIZAÇÃO	44
3.7 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR.....	45
4. RESULTADOS	47
4.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO OTSSP167	47
4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACODINÂMICO DO OTSSP167	49
4.3 CITOTOXICIDADE DO OTSSP167 EM LINHAGENS GÁSTRICAS.....	50
4.4 EXPRESSÃO DE MELK NAS LINHAGENS GÁSTRICAS	51
4.5 POTENCIAL DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS	53
4.6 POTENCIAL DE INVASÃO DAS CÉLULAS	55
5. DISCUSSÃO	56
6. CONCLUSÃO	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

1. INTRODUÇÃO

1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é a segunda principal causa de morte em todo o mundo e foi responsável por 8,8 milhões de mortes em 2015. No Brasil, para o biênio 2018-2019, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2018), os cânceres mais incidentes em homens serão próstata, pulmão, intestino, estômago e cavidade oral. Já a incidência nas mulheres, serão os cânceres de mama, intestino, colo do útero, pulmão, tireoide e estômago serão os principais.

As células tumorais podem promover invasão e metástase, que são eventos que transformam um tumor primário em uma doença sistêmica, metastática e com risco de vida. Durante a cascata de invasão e metástase ocorre a transição epitélio-mesenquimal (TEM), no qual as células perdem suas características epiteliais e adquirem características mesenquimais, isso promove a perda da adesão célula-célula, a perda da polaridade celular e a aquisição de propriedades migratórias e invasivas. A invasão envolve vias de sinalização que controlam a dinâmica citoesquelética nas células tumorais e a comunicação célula-matriz e célula-célula, seguidas pela migração das células tumorais para o tecido adjacente (CHAMBERS e WERB, 2015; NIETO, 2013; YEUNG e YANG, 2017).

Os tumores apresentam heterogeneidade em sua morfologia celular, índice proliferativo, alterações genéticas e resposta terapêutica (VISVADER, 2011). Para uma célula normal evoluir progressivamente para um estado neoplásico, ela precisa adquirir características que fornecem vantagens proliferativas em relação às células vizinhas pelo acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas (HANAHAN e WEINBERG, 2011). Geralmente, essas alterações ocorrem em oncogenes e/ou genes supressores tumorais que codificam proteínas envolvidas em várias atividades celulares que são desreguladas no câncer. Um gene disfuncional pode resultar na produção de níveis anormais de uma proteína crítica (excessiva ou insuficiente), na produção de uma proteína aberrante (com ganho ou perda de função) ou na ausência completa da proteína (IARC, 2008).

Um grande número de mutações, alterações no número de cópias (CNAs) e/ou nível de expressão de genes que codificam proteínas da família cinase foram observados em vários tipos de câncer (ZHANG, YANG e GRAY, 2009). A proteína serina/treonina cinase *maternal embryonic leucine zipper kinase* (MELK) é um membro dessa família, e participa de múltiplos processos celulares, incluindo a progressão do ciclo celular, proliferação celular, apoptose,

processamento de RNA e migração celular (ALACHKAR et al., 2014; DU et al., 2014; GANGULY et al., 2015; JIANG e ZHANG, 2013; NAKANO, 2008).

Nos últimos anos, como a medicina de precisão tem possibilitado o desenvolvimento de pequenas moléculas inibitórias e anticorpos monoclonais para o tratamento de diferentes tipos de tumores, as terapias-alvo para o MELK também vem sendo desenvolvidas. Há estudos com o inibidor de MELK OTSSP167 em ensaios clínicos com pacientes com tumores avançados ou metastáticos e tumores malignos refratários a tratamentos atuais. Dessa forma, o presente estudo pretendeu explorar o papel do inibidor OTSSP167 em linhagens de células de adenocarcinoma gástrico com amplificação do *MELK*. Além da sua atividade biológica, avaliamos também suas propriedades físico-químicas através de metodologias *in silico*, com a ajuda de servidores.

1.2 CÂNCER GÁSTRICO (CG)

Entre os vários tipos de câncer, o CG (CID-1° C16) é o quinto tipo tumoral mais frequente e constitui a terceira maior causa de morte por câncer no mundo (BRAY et al., 2018). No Brasil, estimou-se 13.540 casos novos de CG entre homens e 7.750 nas mulheres para o ano 2018, sendo o segundo mais frequente nas Regiões Norte e Nordeste do país (INCA, 2018).

O CG possui causa multivariada e os principais fatores de risco são: infecção por *Helicobacter pylori*, idade avançada, gênero masculino, dieta rica em alimentos salgados, defumados e em conserva, dieta pobre em frutas e vegetais, tabagismo, associação com outras doenças como metaplasia intestinal, gastrite crônica atrófica, anemia perniciososa, pólipos adenomatosos gástricos, gastrite hipertrófica gigante, histórico familiar de CG e polipose adenomatosa familiar (BRENNER, ROTHENBACHER e ARNDT, 2009; FORMAN e BURLEY, 2006).

O tumor gástrico pode estar presente entre a junção gastroesofágica e o piloro, acometendo diferentes camadas de tecido, como mucosa, submucosa, muscular, subserosa e serosa (KANG et al., 2013). Aproximadamente 95% dos tumores gástricos são adenocarcinomas, tendo origem na mucosa; cerca de 3% são linfomas, atingindo os linfonodos próximos, e poucos casos de leiomiossarcomas, que se inicia em tecidos que dão origem aos músculos e aos ossos (INCA, 2018).

A maioria do tumores sólidos apresenta instabilidade cromossômica, que resulta em ganhos e perdas de partes ou mesmo de cromossomos inteiros, e essas mudanças estruturais dão origem às CNAs exercendo grande influência na expressão gênica (HASTINGS et al.,

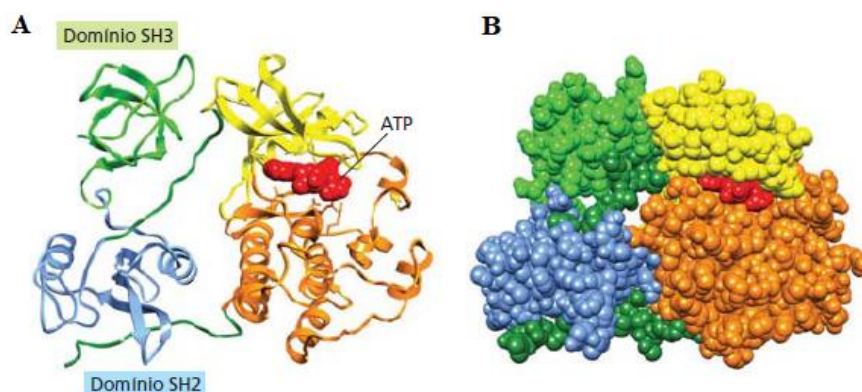
2009). Estudos em CG detectaram várias anormalidades cromossômicas, como por exemplo, ganho no número de cópias no cromossomo 8 (8q24.1), o loco do oncogene *MYC*, sugerindo que essa amplificação é um preditor de agressividade no CG intestinal metastático (BURBANO et al., 2006). Além disso, no mesmo cromossomo foram observados ganhos no número de cópias dos genes *PTK2*, *MOS*, *WISP*, *RAD54B*, *KCNK9* e *PTP4A3*, sugerindo um evento precoce na carcinogênese gástrica (BUFFART et al., 2009; GIGEK et al., 2017; KANG, 2014).

Dentre as alterações genéticas descritas em adenocarcinoma gástrico, o aumento do número de cópias do gene *MELK* foi observado em estudos prévios pelo nosso grupo de pesquisa. Além disso, também foi observado o aumento do número de cópias do mesmo gene em linhagens de células originadas de adenocarcinoma gástrico primário (ACP02 e ACP03) e líquido ascítico (AGP01) (CALCAGNO et al., 2016), sugerindo que o *MELK*, gene responsável pela expressão de uma proteína cinase (PK) homônima, pode ser um potencial gene alvo relacionado com o desenvolvimento do CG.

1.3 PROTEÍNAS CINASES

As PKs são estruturalmente formadas por domínios proteicos que contém de 50-350 aminoácidos que exercem diferentes funções. Esses domínios são resultado do enovelamento de qualquer parte da cadeia polipeptídica que acabam formando uma estrutura compacta e estável. A estrutura das PKs está representada na Figura 1 com quatro domínios: SH2 (*domínios de homologia com Src 2*) e SH3 (*domínios de homologia com Src 3*), ambas com funções reguladoras e os domínios lóbulo-N e lóbulo-C que são responsáveis pela atividade catalítica da proteína (ALBERTS et al., 2017).

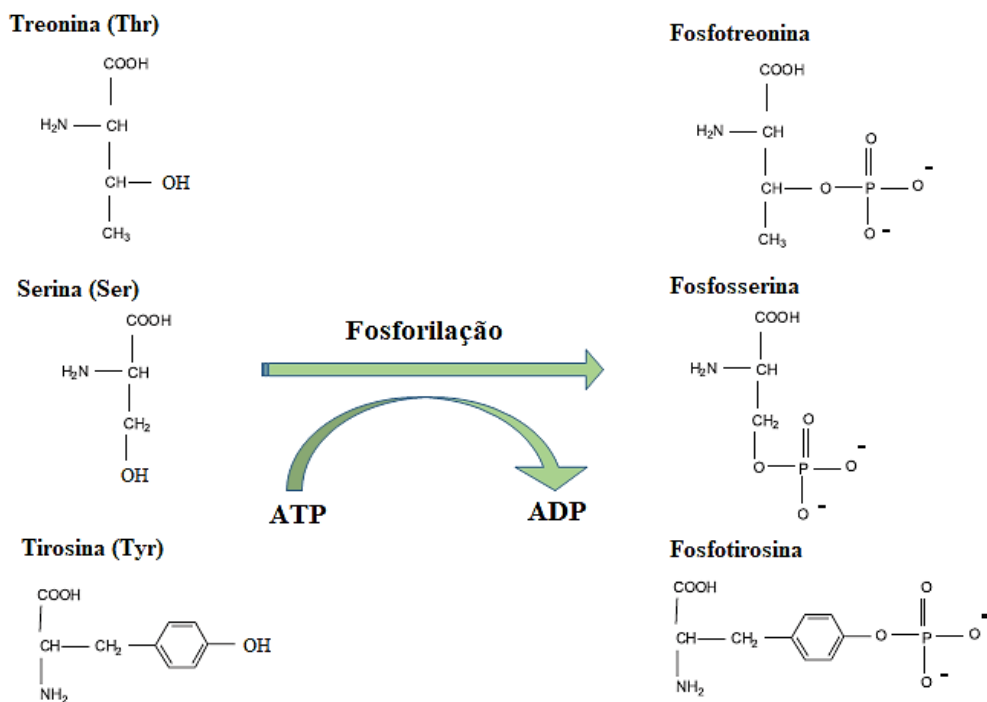
Figura 1- Estrutura da proteína cinase Src. Os domínios SH2 e SH3 possuem funções regulatórias e entre os dois domínios lóbulo-N (em amarelo) e lóbulo-C (em laranja) há o sítio de ligação do ATP. (A) Modelo em fitas da proteína com o substrato ATP em vermelho. (B) Modelo compacto com o substrato ATP em vermelho.



Em geral, as proteínas podem ter sua função regulada e sofrer uma mudança conformacional, por exemplo, na fosforilação, quando um fosfato se liga covalentemente à cadeia lateral de um dos aminoácidos. O grupo fosfato possui duas cargas negativas, e ao se ligar à proteína, pode impedir que novos ligantes se aproximem da superfície da proteína, mudando sua atividade, por conta de um efeito alostérico (ALBERTS et al., 2017). A fosforilação de proteínas desempenha um papel importante na comunicação intercelular, nas respostas fisiológicas, na homeostase e no funcionamento dos sistemas nervoso e imunológico (MANNING et al., 2002).

As PKs são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato de ATP (Adenosina Trifosfato) ou em casos raros de GTP (Guanosina Trifosfato) em resíduos de tirosina (Tyr), treonina (Thr), e serina (Ser), alterando a atividade da proteína-alvo. O processo de fosforilação ocorre nesses aminoácidos porque eles possuem o radical hidroxila (OH) em suas cadeias laterais, o que o leva às condições ideais para a reação de hidrólise do ATP, e liberação do fosfato presente (Figura 2). Essa fosforilação dos resíduos é responsável por estímulos extracelulares e intracelulares, que fornecem mecanismos para controlar a atividade de proteínas (SILVA et al., 2009).

Figura 2- Esquema de fosforilação de Thr, Ser e Tyr. Na hidrólise de ATP, ocorre a transferência do grupo fosfato terminal de uma molécula de ATP para uma hidroxila lateral dos aminoácidos de serina, treonina ou tirosina na proteína-alvo.



Fonte: Adaptado de Silva et al., 2009.

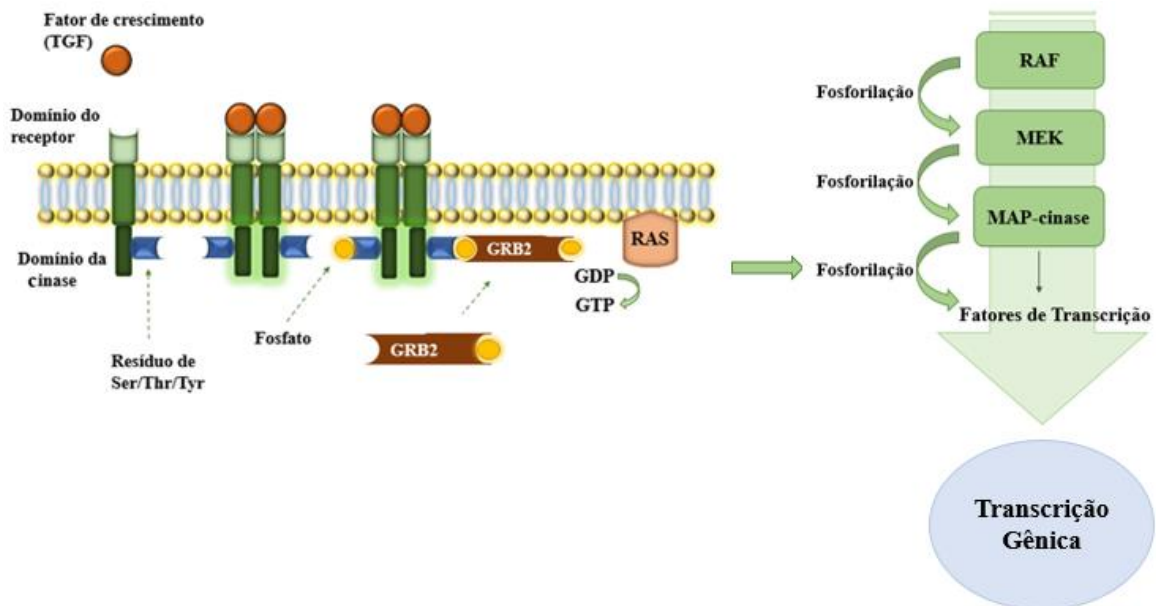
Notadamente, as PKs são essenciais no processo de apoptose, proliferação celular, metabolismo do glicogênio, neurotransmissão e oncogênese. A desregulação ou superexpressão de proteínas cinases está associada a doenças como asma, desordens cardiovasculares, diabetes, doenças do sistema nervoso central, câncer, entre outras (NARAYANA et al., 1999).

O genoma humano possui aproximadamente 518 PKs codificadas e praticamente todos os processos de transdução de sinal são interligados através de uma cascata de transferência de fosfato, demonstrando a importância da atividade das PKs na comunicação celular (ZHANG, YANG e GRAY, 2009).

A produção e a liberação de sinais promotores do crescimento em tecidos normais que induzem o ciclo de crescimento e divisão celular, são controlados para garantir a homeostase do número de células e, portanto, a manutenção da arquitetura e funções teciduais normais. Já em células cancerosas, esses sinais são desregulados e sua ativação é transmitida em grande parte por fatores de crescimento que se ligam a receptores de superfície celular, tipicamente contendo domínios cinases intracelulares com resíduos de Tyr ou Ser/Thr. Estes receptores vão emitir sinais através de vias de sinalização intracelulares ramificadas que regulam a progressão ao longo do ciclo celular, bem como o crescimento celular (Figura 3) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

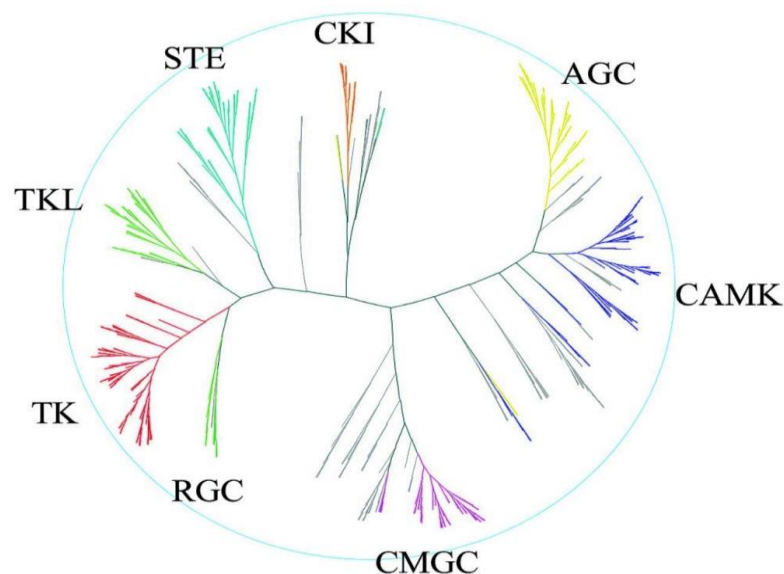
Uma célula possui várias PKs, cada uma responsável pela fosforilação de uma proteína diferente ou um conjunto de proteínas. Essas PKs pertencem a uma grande família de enzimas, no qual cada membro possui diferentes sequências de aminoácidos, o que permite reconhecer as proteínas que devem ser fosforiladas (ALBERTS et al., 2017). De acordo com a sequência dos domínios catalíticos das PKs foi possível construir um dendrograma, que as classificam em dois grupos conforme a similaridade de suas sequências e funções biológicas (Figura 4).

Figura 3- Cascata de sinalização de proteínas cinases. O fator de crescimento TGF (*transforming growth factor*) se liga ao receptor específico de cinase e em seguida, ocorre a dimerização do receptor e a autofosforilação dos resíduos intracelulares de serina, treonina ou tirosina, que se encontram na cauda do receptor. A proteína RAS é ativada através da molécula adaptadora GRB2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) que é fosforilada e se liga ao resíduo da proteína, isso induz RAS a trocar seu GDP por um GTP, ativando-o e iniciando várias etapas de fosforilação de MEK, MAP-cinase e fatores de transcrição que vão induzir a proliferação celular.



Fonte: Adaptado de Favoni et al., 2012 e Rang et al., 2016.

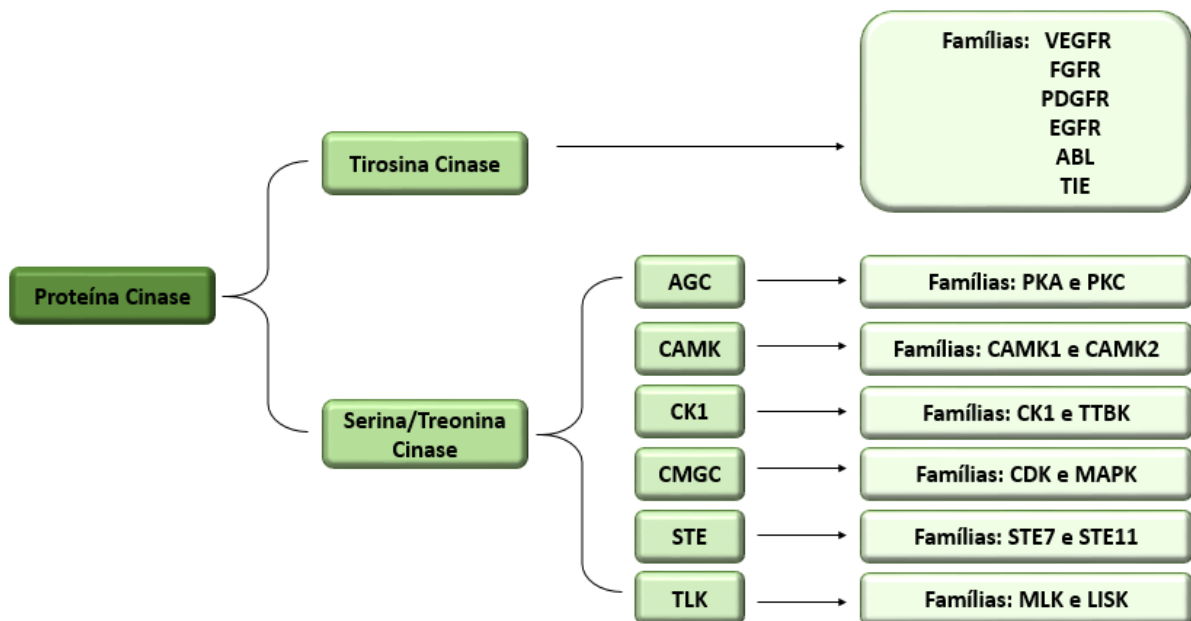
Figura 4- Dendrograma que representa os oito grupos de proteínas cinases: AGC; CAMK (*calcium/calmodulin-dependent kinase*); CMGC; RGC (*receptor guanylate cyclase*); TK; TKL (*tyrosine kinase-like kinase*); STE e CK1.



Fonte: Manning et al., 2002.

As PKs constituem o maior número de proteínas dos seres eucariontes e são divididas em proteínas que fosforilam resíduos de tirosina cinases (TKs) e as que fosforilam resíduos de serina/treonina cinases. Dentre as 518 PKs que são codificadas pelo genoma humano, 90 delas pertencem ao grupo das TKs, 388 ao grupo de serina/treonina cinases que possuem seis subgrupos e 40 ao grupo de cinases atípicas (Figura 5) (GOTINK e VERHEUL, 2010).

Figura 5- Classificação das proteínas cinases. As proteínas cinases apresentam dois grandes grupos: tirosina cinases e serina/treonina cinases. As tirosinas cinases apresentam várias famílias, como VEGFR (*vascular endothelial growth factor receptor*); FGFR (*fibroblast growth factor receptor*); PDGFR (*platelet derived growth factor receptor*); EGFR (*epidermal growth factor receptor*); ABL (*abelson kinase*) e TIE (*tyrosine kinase with immunoglobulin-like*). Já as serina/treonina cinases possuem seis subgrupos: AGC que possui as famílias PKA (*protein kinase A*) e PKC (*protein kinase C*); CAMK (*calcium/calmodulin-dependent kinase*); CK1 (*casein kinase I*); CMGC que contém as famílias CDK (*cyclin-dependent kinase*) e MAPK (*mitogen-activated protein kinase*); STE homologa de levedura *sterile 7* e *sterile 11*; TLK (*tyrosine kinase-like kinase*).



Fonte: Adaptado de Gotink e Verheul, 2010.

Além da classificação de famílias, as TKs podem ser classificadas também em proteínas tirosina cinases receptoras (RTKs) e proteínas tirosina cinases não receptoras (NRTKs). Já as serina/treonina cinases possuem vários grupos de proteínas, entre eles, a proteína cinase A (PKA), proteína cinase dependente de ciclina (CDK) e proteína serina/treonina cinase ativada por AMP (AMPK) (SILVA et al., 2016).

1.3.1 Tirosina Cinases (TK)

Tirosina Cinases Receptoras (RTKs)

São proteínas transmembranas cuja região citoplasmática contém um domínio citosólico C terminal de tirosina cinase, e as regiões extracelulares possuem o domínio N terminal variável, permitindo a ligação de diferentes proteínas com diversas funções (NAGAR, 2007). A ativação da proteína se inicia quando um ligante, como por exemplo, um fator de crescimento, interage com os domínios extracelulares desses receptores que, por sua vez, ativam seus domínios citosólicos cinase, resultando tanto em fosforilação dos próprios receptores como das proteínas-alvo intracelulares que propagam o sinal iniciado pela ligação do ligante (GOTINK e VERHEUL, 2010).

Tirosina Cinases Não Receptoras (NRTKs)

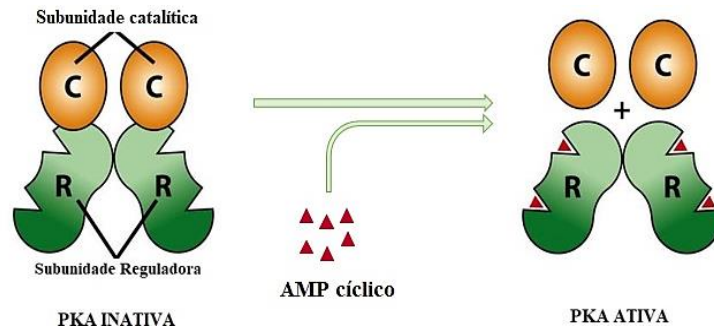
Podem estar presentes tanto no núcleo quanto no citoplasma das células, e são frequentemente associadas a membranas por meio de modificações lipídicas. Geralmente, as NRTKs apresentam um único domínio de tirosina cinase intercalado em vários outros domínios de proteína modulares, incluindo SH2 e SH3, que interagem com os peptídeos contendo fosfotirosina e poliprolina, respectivamente (NAGAR, 2007).

1.3.2 Serina/Treonina Cinases

Proteína Cinase A (PKA)

A PKA é uma proteína tetraédrica que possui duas subunidades catalíticas, as quais estão ligadas a homo ou heterodímeros de subunidades reguladoras. Assim, a ligação de quatro moléculas de AMPc (monofosfato de adenosina cíclica) distribuídas em duas moléculas para cada subunidade reguladora, diminuem a afinidade existente entre as subunidades reguladora e catalítica, levando a dissociação entre ambas e conseqüentemente, a ativação das subunidades catalíticas (Figura 6). Estas subunidades catalíticas podem fosforilar proteínas nos resíduos de Ser e Thr, tais como a MAP-2 (proteína associada a microtúbulo do tipo 2, envolvida com a definição da morfologia celular) (SILVA et al., 2016; TAYLOR et al., 2012).

Figura 6- Ativação da PKA. O AMPc se liga às subunidades reguladoras e induz uma mudança conformacional, causando a dissociação das subunidades catalíticas e ativando sua função.



Fonte: Adaptado de Lodish et al., 2008.

As células de mamíferos possuem, pelo menos, dois tipos de PKA: o tipo I está presente principalmente no citosol, e o tipo II está ligado às membranas plasmática, nuclear e mitocondrial externa e também aos microtúbulos por meio da subunidade reguladora e de proteínas de ancoramento (ALBERTS et al., 2017). Estudos sugerem que o tipo I apresenta um papel antiapoptótico, já o tipo II tem atividade proapoptótica (CROSS et al., 2000).

De modo geral, o papel da PKA na apoptose parece ser inibitório, visto que em alguns tipos de câncer a sua expressão é aumentada e a introdução de RNA *antisense* de PKA diminui a proliferação de linhagens de células neoplásicas (ALPER, HACKER e CHO-CHUNG, 1999).

Proteína Cinase Dependente de Ciclina (CDK)

A CDK tem grande importância para o ciclo de divisão celular, visto que pode ativar e inativar vários mecanismos, como a síntese e a degradação da ciclina. Certamente que o ciclo celular não depende apenas do complexo ciclina-CDK, mas estudos comprovam que um único complexo ciclina-CDK é suficiente para ordenar os eventos do ciclo celular (GÉRARD et al., 2015).

O nível de CDK no ciclo celular mais simples é constante. Já as ciclinas apresentam um ciclo de síntese e de degradação a cada ciclo celular, e essas mudanças cíclicas resultam na formação do complexo ciclina-CDK. Nos vertebrados há quatro tipos de CDKs, como mostra o Quadro 1. As ciclinas e as CDKs possuem ligações permutáveis, permitindo a formação de diferentes complexos ciclina-CDK dentro das células e depois de formados, os dímeros são estáveis e podem durar horas ou segundos (ALBERTS et al., 2017; HOCHEGGER, TAKEDA e HUNT, 2008; KOBAYASHI et al., 1994).

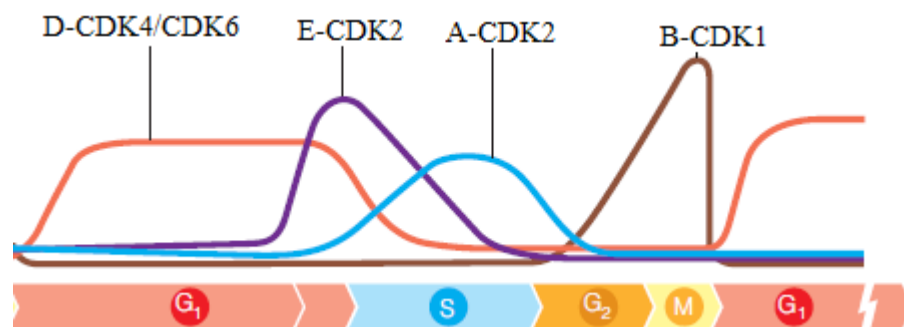
Quadro 1- Ciclinas e CDKs de vertebrados.

Complexo ciclina-CDK	Vertebrados	
	Ciclinas	CDK associada
G1-CDK	Ciclina D	CDK4, CDK6
G1/S-CDK	Ciclina E	CDK2
S-CDK	Ciclina A	CDK2
M-CDK	Ciclina B	CDK1

Fonte: Adaptado de Alberts et al., 2017.

As ciclinas D-CDK4 e D-CDK6 estão presentes principalmente na fase G1 do ciclo, a E-CDK2 é necessária para iniciar a fase S do ciclo celular. Já a ciclina A, ligada a CDK2, é responsável pela continuação da fase S e pela entrada na mitose e a ciclina do tipo B, junto com CDK1, catalisa a entrada na mitose como mostra a Figura 7 (NURSE, 2000).

Figura 7– Níveis de ciclina-CDK em cada etapa do ciclo celular nos vertebrados.



Fonte: Adaptado de Weinberg, 2008.

Além da ciclina ativar a CDK, juntas fosforilam grupos diferentes de substratos protéicos, em cada tempo do ciclo celular podendo induzir efeitos diferentes, já que os complexos ciclina-CDK mudam em cada fase do ciclo (ALBERTS et al., 2017).

Proteína Serina/Treonina Cinase Ativada por AMP (AMPK)

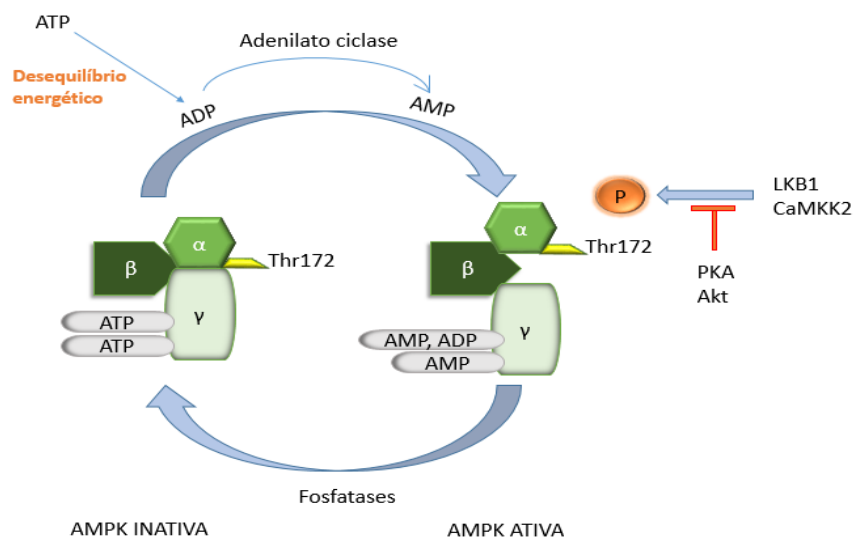
Entre as inúmeras cinases, a AMPK, proteína cinase ativada por AMP (5'adenosina monofosfato) se destaca por ser a componente central de uma via de sinalização que regula a

alternância entre o anabolismo e o catabolismo, assim como muitos outros aspectos da função celular (HARDIE, SCHAFFER e BRUNET, 2016).

A AMPK possui complexos heterotriméricos que apresentam subunidades catalíticas (α) e subunidades reguladoras (β e γ), e ainda possui várias isoformas em humanos ($\alpha 1$, $\alpha 2$; $\beta 1$, $\beta 2$; $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$) que são codificadas por diferentes genes, gerando até 12 combinações heterotriméricas. Esses complexos detectam o estado de energia das células, revelando aumentos nas proporções celulares de AMP/ATP, visto que a reação é catalisada pela adenilato ciclase ($2ADP \rightarrow ATP + AMP$) (HARDIE e HAWLEY, 2001; HARDIE, SCHAFFER e BRUNET, 2016).

A AMPK é ativada por um desequilíbrio energético que reduz a ATP da célula e aumenta AMP, isso acontece principalmente em casos de privação de glicose, hipóxia, isquemia e choque térmico (KEMP et al., 2003). Ocorre a fosforilação do resíduo de treonina (Thr172) localizado na subunidade α da AMPK, promovido pelas cinases LKB 1 (*liver kinase B 1*) e CaMKK2 (*calcium-calmodulin-dependent kinase kinase 2*). Essa atividade pode ser reduzida pela cinase PKA que fosforila a serina Ser173 na subunidade $\alpha 1$ e pela AKT que fosforila a Ser485 de $\alpha 1$ e Ser491 de $\alpha 2$. No processo de desativação da AMPK, proteínas fosfatases promovem a desfosforilação do sítio Thr172 (Figura 8) (DAVIES et al., 1995; DJOUDER et al., 2010; HORMAN et al., 2005; PULINILKUNNIL et al., 2011).

Figura 8- Mecanismos que regulam a atividade da cinase AMPK. AMP e ADP se ligam à subunidade γ da AMPK e facilita a fosforilação do sítio Thr172 localizado na subunidade α , que é ativada pelas cinases LKB e CaMKK2. As proteínas PKA e AKT modulam negativamente para essa fosforilação. A AMPK pode ser desativada por proteínas fosfatases.



Fonte: Adaptado de Qi e Young, 2015.

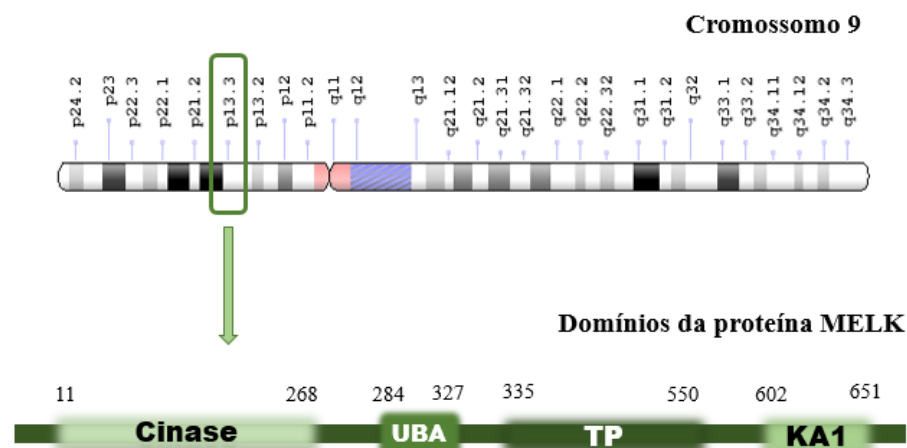
Uma vez ativa, a AMPK restaura a homeostase energética, ativando as vias catabólicas geradoras de ATP e inibindo as vias anabólicas, consumidoras de ATP (HARDIE, 2015).

Manning et al. (2002) catalogaram o complemento de PK do genoma humano, o chamado *Kinome Human*, onde foram identificados vários genes e pseudogenes de PK. Esse estudo ainda indica que 12 PKs (BRSK1, BRSK2, NUA1, NUA2, QIK, QSK, SIK, MARK1, MARK2, MARK3, MARK4 e MELK) estão intimamente relacionadas às subunidades catalíticas de AMPK, portanto, fazendo parte dessa subfamília (LIZCANO et al., 2004; MANNING et al., 2002). Entre essas PKs, destaca-se a proteína MELK, a única que não depende da LBK1 ou da CAMKK2 para ser ativada (LIZCANO et al., 2004). Geralmente, MELK é ativada através da autofosforilação por um mecanismo ainda desconhecido ou pode ser fosforilada por uma CDK, e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK) (BADOUEL et al., 2006; BEULLENS et al., 2005).

1.4 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA PROTEÍNA MELK

A proteína MELK pertence à família AMPK, modula o metabolismo celular através da fosforilação de enzimas metabólicas ou via regulação transcricional (BADOUEL et al., 2010; HEYER et al., 1997; JAGER et al., 2007). A proteína é codificado pelo gene *MELK* que está presente no braço curto do cromossomo 9 (9p13.3), e possui quatro domínios que são apresentados na Figura 9.

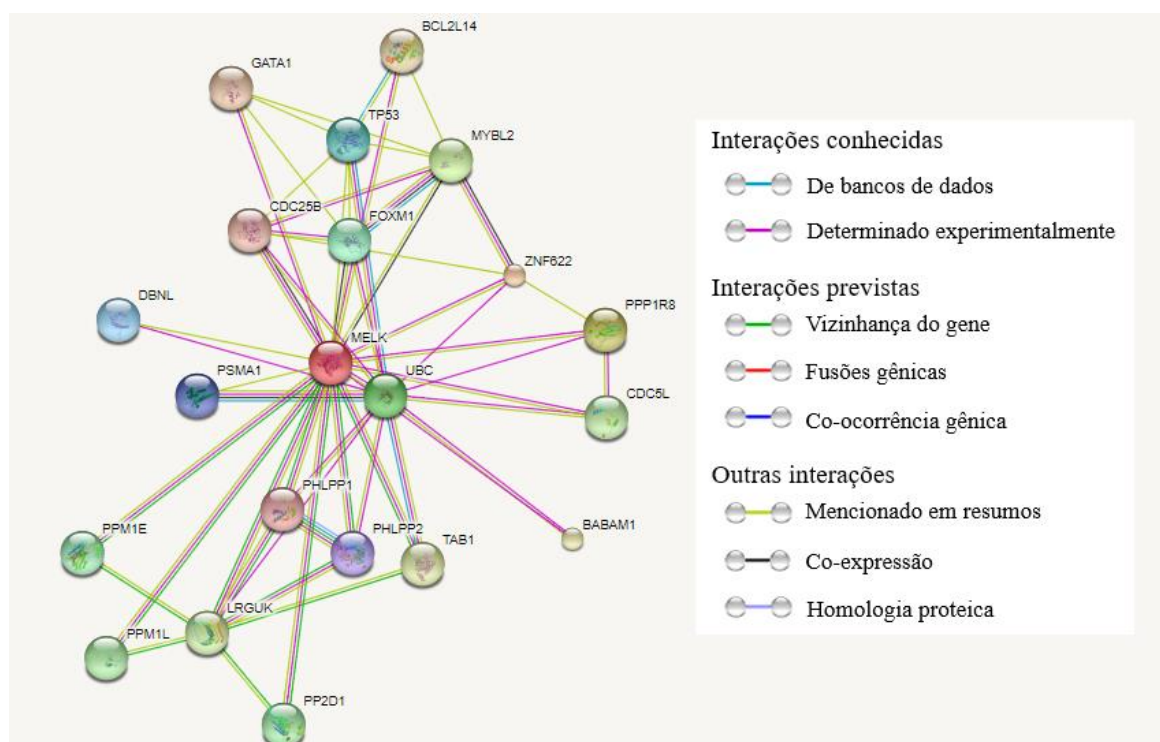
Figura 9- Representação da localização e estrutura de MELK. O gene encontra-se no braço curto do cromossomo 9, na região 9p13.3. No diagrama da estrutura, na região N-terminal se encontra o domínio cinase (11-268), seguido pelo domínio UBA que suporta o dobramento e a atividade do domínio cinase. O domínio rico em treonina-prolina (TP) e o domínio associado a cinase 1 (KA1) possuem funções que ainda não estão bem compreendidas, mas eles podem inibir a atividade da cinase.



MELK desempenha um papel importante em vários processos celulares e biológicos, incluindo renovação celular progenitora neural, apoptose, splicing de RNAm, reparo de DNA, divisão celular assimétrica, proliferação e migração celular (BENSIMON, AEBERSOLD e SHILOH, 2011; CORDES, FRANK e GARRIGA, 2006; JUNG, SEONG e HA, 2008; LIN et al., 2007; NAKANO et al., 2005; VULSTEKE et al., 2004).

Como a MELK está envolvida em muitos processos celulares, ela consegue se ligar a várias outras proteínas e interferir em suas atividades. A plataforma STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins*) mostra a interação direta e/ou indireta da MELK com 20 proteínas que podem ser reguladas por essa cinase (Figura 10).

Figura 10– A interação de MELK com algumas proteínas.



Fonte: Adaptado de Plataforma STRING¹.

Entre essas proteínas, destaca-se a FOXM1 (*Forkhead Box M1*), que é um fator de transcrição que atua em diversos processos de regulação das atividades celulares, inclusive na progressão mitótica de células cancerosas. MELK fosforila e ativa a FOXM1, e juntas se ligam a EZH2 (*Enhancer Of Zeste Homolog 2*), uma proteína responsável por manter a repressão

¹ Disponível em: <http://version10.string-db.org/cgi/network.pl?taskId=73rcJqTf1Irp>

transcricional de certos genes e, esta regulação acaba por resultar em radioresistência das células de glioblastoma (JOSHI et al., 2013).

Além da FOXM1, o MELK pode regular muitas proteínas através da interação e da fosforilação, e com isso, inúmeras vias de sinalização podem ser afetadas. A importância da MELK é destacada devido a sua superexpressão em vários tipos de câncer e a infinidade de interações com diferentes proteínas em cada tipo da doença (JIANG e ZHANG, 2013).

MELK foi descoberta em um ensaio de complexo imune com cinases e que ela tem atividade catalítica de cinase ativa, sugerindo que um produto gênico funcional foi de fato formado nesses tecidos. Adicionalmente, a expressão de MELK foi restrita às células T e macrófagos/monócitos, mas não foi detectada em células B. Nos tecidos adultos normais é difícil detectar MELK, exceto nos testículos e em níveis menores no timo, baço e intestino delgado.(GIL et al., 1997; LIN et al., 2007).

Entretanto, altos níveis de expressão da proteína foram encontrados em CG (LI et al., 2016), câncer de mama (LIN et al., 2007), glioblastoma (MARIE et al., 2008), câncer de próstata (KUNER et al., 2013), tumores cerebrais (NAKANO, 2008) e leucemia mieloide aguda (LMA) (ALACHKAR et al., 2014).

1.4.1 Ortólogos de *MELK* em diferentes espécies

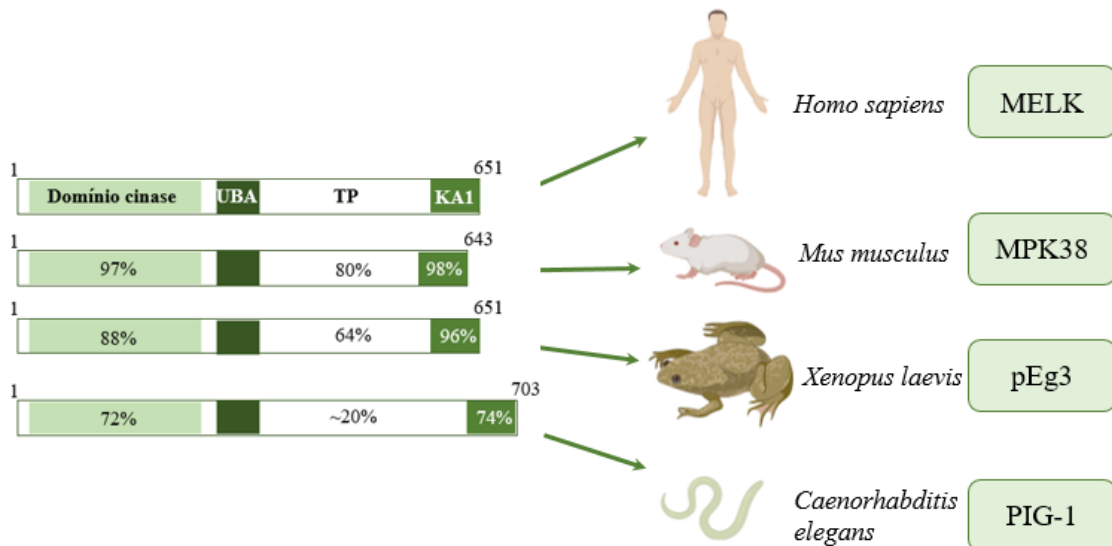
Foi a identificação da estrutura protéica de MELK em humanos que desencadeou os estudos dos ortólogos de MELK em várias outras espécies, já que essa estrutura protéica é altamente conservada em mamíferos e não mamíferos (HEYER et al., 1997).

Cada espécie que apresenta um gene ortólogo de *MELK* também pode ter uma variação do papel funcional da proteína. Apesar das dificuldades de compreender a real função da proteína MELK, a presença dos genes em diferentes espécies é um indicativo da grande importância dessa PK para os seres vivos (GANGULY et al., 2015).

O gene *MELK* está presente em diferentes organismos e tipos celulares, como por exemplo: MPK38 (*Murine Protein Kinase 38*) isolado de biblioteca de células de teratocarcinoma de camundongos; pEg3 (*Paternally-Expressed gene 3*) isolado de biblioteca de células embrionárias de sapos do gênero *Xenopus*; e PIG-1 (*Pre-intermoult gene-1*) gene ortólogo isolado da espécie *Caenorhabditis elegans* (Figura 11) (CHIEN et al., 2013; GIL et al., 1997; LE PAGE et al., 2011).

Além dessas denominações dadas ao *MELK* em diferentes espécies, há alguns estudos que denominam as proteínas destes ortólogos pelo prefixo que se refere à espécie de origem mais o sufixo MELK, por exemplo, quando se trata do gênero *Xenopus*, chama-se de xMELK.

Figura 11– Os domínios essenciais para a atividade de MELK em diferentes espécies. Os números indicam a porcentagem de resíduos homólogos nos diferentes domínios das espécies em comparação com MELK de *Homo sapiens*.



Fonte: Adaptado de Ganguly et al., 2015.

O *MPK38* é o gene ortólogo presente em *Mus musculus*, como ratos e camundongos, e foi ele que levou à descoberta do MELK em humanos. O gene *MPK38* foi isolado e clonado e observou-se que ele codifica uma proteína de 643 aminoácidos, e a sequência de aminoácidos do domínio catalítico dessa proteína possui aproximadamente 60% de identidade de sequência com a família das serina/treonina cinases. A expressão de *MPK38* sugere o importante papel do produto do gene no desenvolvimento e função das células hematopoiéticas (GIL et al., 1997).

O ortólogo *pEg3* está presente em sapos da espécie *Xenopus laevis*, e tem grande importância na fase embrionária dessa espécie, já que durante a divisão celular ele se associa com uma proteína crucial para a citocinese, a anilina, demonstrando que o mecanismo da citocinese muda durante o desenvolvimento inicial do *Xenopus*. E também, a superexpressão de xMELK leva à falha da citocinese e prejudica o acúmulo no sulco de divisão da GTPase RhoA ativada, que é um regulador essencial da citocinese (LE PAGE et al., 2011).

Outro gene ortólogo é o *PIG-1*, presente em nematódeos da espécie *C. elegans*, que está relacionado com a divisão assimétrica de células precursoras de neurônios, os neuroblastos, que gera duas células filhas com diferentes destinos (uma maior que será um precursor neuronal e outra menor que sofrerá apoptose). A *PIG-1* localiza os centrossomos durante as divisões

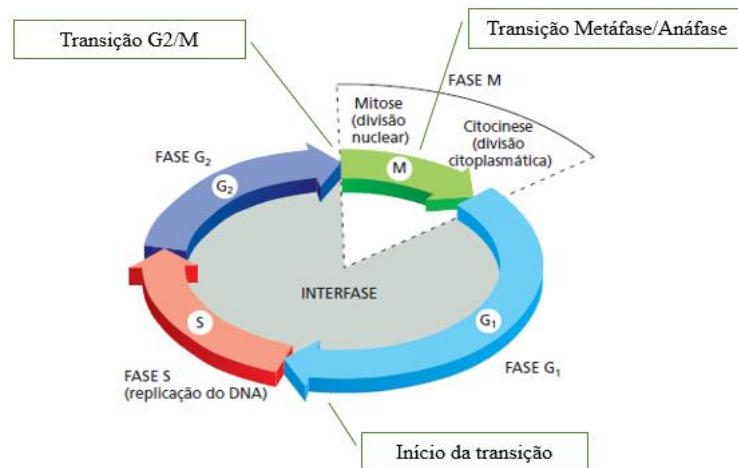
celulares e o complexo PAR-4-STRD-1 estimula a atividade cinase da PIG-1 para promover as divisões de neuroblastos assimétricos e a geração de células-filhas com destinos diferentes (CHIEN et al., 2013).

A partir dos estudos dos ortólogos de *MELK* é possível notar as diversas funções da proteína em diferentes espécies de seres vivos, e a importância desta principalmente para as divisões celulares.

1.4.2 A relação do MELK com o ciclo celular

O ciclo de divisão celular é convencionalmente dividido em quatro fases (G₁, S, G₂ e M) e possui três pontos de transição reguladora: o primeiro é no final de G₁, onde a célula duplica seus cromossomos; o segundo é na transição de G₂/M, onde ocorre o alinhamento de cromossomos no eixo mitótico na metáfase; e o terceiro é a transição entre metáfase e anáfase, onde o sistema de controle estimula a separação das cromátides-irmãs, levando ao fim da mitose e da citocinese. Esse sistema de controle impede o prosseguimento da divisão celular e pode sofrer interferência de algumas cinases (Figura 12) (ALBERTS et al., 2017).

Figura 12- As fases do ciclo celular. G₁ é o intervalo entre as fases M e S, já o intervalo G₂ está entre a fase S e a fase M.



Fonte: Adaptado de Alberts et al., 2017.

Os níveis de regulação e expressão do *MELK* correlacionam-se com outras cinases e enzimas que também estão envolvidas na progressão do ciclo celular (GANGULY et al., 2015). A atividade catalítica de *MELK* está correlacionada com o seu estado de fosforilação e é durante a fase M do ciclo celular que a fosforilação e a atividade de *MELK* são maiores em embriões de *Xenopus* e em culturas de células, como HeLa, células provenientes de câncer cervical (BADOUEL et al., 2006).

A serina/treonina cinase MELK interfere na progressão e proliferação do ciclo celular, e provavelmente sofre interferência da expressão de CDC25B (DAVEZAC et al., 2002; GRAY et al., 2005). Molecularmente, MELK interage e fosforila a Ser323 do CDC25B, induzindo o acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular, como mostra um estudo com linhagem de células epiteliais de osteossarcoma ósseo humano (U2OS) (DAVEZAC et al., 2002). Esse efeito estacionário é neutralizado quando ocorre a superexpressão de CDC25B. Isto levou à conclusão de que MELK está potencialmente envolvido na progressão do ciclo celular, atuando como um regulador negativo da transição G2/M (DAVEZAC et al., 2002).

Experimentos com células de CG demonstraram que a redução da expressão de MELK ou a inibição da atividade dessa cinase aumentaram a parada do ciclo celular e a apoptose em G2/M, inibindo o crescimento de células *in vitro* e *in vivo* (LI et al., 2016).

MELK também regula eventos de transcrição, por exemplo, em células derivadas de fibroblastos embrionários de rim humano (293T), a proteína ZPR9 pode ser fosforilada pelo MPK38 para permitir sua translocação para o núcleo, onde interage com o B-Myb, levando ao aumento da atividade transcricional (SEONG et al., 2002).

Estudos *in vitro* também com células 293T, sugerem que MPK38 estimula a ativação de ASK1, através da interação e fosforilação da Thr838 presente na ASK1. Isso induz a apoptose mediada por H₂O₂ em células renais embrionárias (JUNG, SEONG e HA, 2008). Em contrapartida, MELK também pode ter função anti-apoptótica, já que a superexpressão de MELK diminui a atividade promotora de p53. A inibição de p53 impede a apoptose de células de glioblastoma (GU et al., 2013).

1.4.3 MELK e câncer

Nos últimos anos, MELK emergiu como um alvo importante para a terapia do câncer, já que sua expressão está aumentada em diferentes tipos de câncer com alto índice de proliferação, associada à resistência a quimioterapia e radioterapia, e ao pior prognóstico de pacientes com CG, câncer de mama, glioblastoma, câncer de próstata e LMA (BEKE et al., 2015; GRAY et al., 2005; KUNER et al., 2013; LI et al., 2016; LIU et al., 2006; MARIE et al., 2008; NAKANO, 2008; PICKARD et al., 2009).

MELK é importante em papéis biológicos nas células cancerosas, como a proliferação, a sobrevivência e a metástase (CHUNG et al., 2012; JOSHI et al., 2013). Além disso, o MELK foi identificado como um dos genes comumente expressos em células cancerosas

indiferenciadas, o que pode sugerir um possível papel do mesmo na manutenção e sobrevivência de células-tronco cancerosas (NAKANO, 2008; RHODES et al., 2004).

A análise de um conjunto de dados indicou que MELK estava superexpresso em cérebro fetal, e com menor expressão no cérebro adulto sadio. Ele também foi superexpresso em tumores cerebrais e seus níveis de expressão se correlacionam com a malignidade, com níveis mais altos de expressão em glioblastoma multiforme e meduloblastoma (NAKANO, 2008).

Estudos em glioblastoma mostraram que MELK fosforila a FOXM1, um fator importante de transcrição e regulador principal da mitose em células-tronco cancerosas. A FOXM1 e seus alvos, como a Ciclina B1, estão envolvidos na proliferação através da modulação da progressão do ciclo celular também na LMA (JOSHI et al., 2013; NAKAMURA et al., 2010). Estudos indicam que tanto a fosforilação da proteína FOXM1 quanto a atividade transcricional de *FOXM1* dependem da atividade de MELK (JOSHI et al., 2013).

Nos cânceres de próstata com altos escores de Gleason, a expressão de MELK foi elevada e sua inibição por RNAi sugeriram supostas funções na modificação da cromatina, desenvolvimento embrionário e migração celular. Além disso, MELK foi correlacionado positivamente com genes de progressão do ciclo celular como *UBE2C*, *KIF20A*, *TOP2A*, *AURKB* e *FOXM1* (KUNER et al., 2012).

Em câncer mama, MELK está associado com atividades anti-apoptóticas em linhagens de célula. Essa PK interage com Bcl-G, um membro pró-apoptótico da família Bcl-2, através de sua região amino-terminal. Especificamente, Bcl-G é fosforilado por MELK *in vitro* e a superexpressão de MELK suprime a apoptose induzida por Bcl-G nas células e promove a carcinogênese, resultando na baixa sobrevivência dos pacientes com câncer de mama (GUO, GODZIK e REED, 2001; LIN et al., 2007).

MELK também está superexpresso em linhagens de células e em amostras de tecidos de CG, com maior expressão em tumores avançados do que precoces (LI et al., 2015). Em 2014, Du e colaboradores investigaram os níveis de proteína MELK em 61 amostras de tecidos não tumorais e 78 amostras de tecidos de CG. As taxas positivas de detecção da proteína foram de 37,7% (23/61) nos tecidos não tumorais e 65,4% (51/78) nos tecidos tumorais. Os níveis de proteína ainda foram correlacionados com os parâmetros clinicopatológicos dos pacientes, mostrando que o MELK foi elevado em CG bem diferenciado e do tipo intestinal.

O número expressivo de MELK e de outras cinases nas células cancerosas desperta o interesse de vários grupos de estudo, que tentam compreender a importância dessas proteínas

no desenvolvimento das células. Há também a busca pelo desenvolvimento de fármacos que podem interferir na ação dessas proteínas e influenciar diretamente alguma atividade celular.

1.5 DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS

O processo de desenvolvimento de compostos candidatos à fármacos é demorado e apresenta altos custos. Medicamentos eficazes e seguros apresentam uma boa combinação de propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas, incluindo alta potência, afinidade e seletividade com relação ao seu alvo molecular (SEGALL, 2014).

A farmacocinética avalia o percurso de uma molécula no organismo, iniciando com a administração, seguido dos parâmetros de absorção, distribuição, metabolismo, excreção da droga e de seus metabólitos e toxicidade (ADMET). Já a farmacodinâmica analisa o mecanismo de ação do composto e o efeito dele no organismo (RANG et al., 2016).

Inicialmente as drogas eram descobertas avaliando moléculas sintetizadas por meio de vários testes *in vitro* e *in vivo*, assim eram analisadas suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas. Hoje, o uso de técnicas computacionais ajudam a elucidar o mecanismo de ação das drogas, suas propriedades, interações moleculares e contribuem para o melhoramento do composto (DE RUYCK et al., 2016; WANG e HOU, 2015).

O processo de melhoramento de um composto envolve modificações químicas até ele adquirir propriedades farmacológicas aceitáveis, tais como: maior potência e seletividade, e menor toxicidade (LIMA, 2007). Com a medicina de precisão, as estratégias para o desenvolvimento de fármacos que incluem a redução de tempo, custos e encargos, fazem esses medicamentos seguirem uma via de aprovação acelerada e/ou prioritária pela FDA (*Food and Drug Administration*), visto que o tempo total de desenvolvimento e revisão de um inibidor ou anticorpo monoclonal chega a ser menor (1,7 anos) do que um medicamento comum. Além disso, o paciente tem maior probabilidade de benefício, com maior eficácia e menor toxicidade do medicamento, já que eles são selecionados para o tratamento (COLLINS, 2011; SARVAS et al., 2019; WEIL, 2018).

Em 1997, Lipinski e colaboradores realizaram um estudo com mais de 2000 fármacos, e observaram que algumas propriedades físico-químicas eram necessárias para que as drogas apresentassem boa solubilidade em água e permeabilidade intestinal, características essenciais para a disponibilidade oral. Esse estudo deu origem à regra dos 5 ("*rule of five*"- RO5) que auxilia nas modificações químicas e na busca pelo melhor composto. A RO5 define faixas de parâmetros físico-químicos simples (peso molecular, log P, doadores de ligação de hidrogênio

e aceptores de ligação de hidrogênio) associados a 90% de fármacos ativos por via oral que alcançaram o estado clínico de fase II (LIPINSKI, 2004). Em seguida, Veber e colaboradores (2002) incluíram na regra o número de ligações rotacionáveis (nlr) e a área de superfície polar (ATSP). Estes parâmetros físico-químicos estão associados com solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal aceitáveis e compreendem os primeiros passos na biodisponibilidade oral. Essa regra se aplica a todos os casos, com exceção de vitaminas, antifúngicos e antimicrobianos (CERQUEIRA et al., 2015).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos precisa passar pela etapa de identificação e validação do alvo, sendo necessário conhecer a patologia e suas características moleculares. Os principais alvos são receptores, enzimas, elementos do sistema de expressão gênica ou eventos de cascatas de sinalização intracelular. Para cada alvo, dois tipos de testes são disponibilizados: (I) alto rendimento, baseado na interação com proteínas alvo ou linhagens de células selecionadas, que permitem verificar a afinidade/atividade de vários compostos muito rapidamente e (II) baixo rendimento, realizado a partir de tecidos, órgãos ou animais, nos quais os compostos pré-selecionados são investigados em procedimentos mais detalhados, por semanas ou meses (BRODNIEWICZ e GRYNKIEWICZ, 2010).

Alguns alvos de medicamentos são as proteínas cinases, cuja a desregulação destas desempenha um papel essencial em muitos estádios de doença (LI et al., 2019). Existem 38 inibidores de cinase aprovados pela FDA disponíveis para o tratamento de diferentes doenças, como cânceres, doenças imunológicas, inflamatórias, degenerativas, metabólicas, cardiovasculares e infecciosas, e muitos outros candidatos ainda em desenvolvimento clínico (FERGUSON e GRAY, 2018; FDA, 2019).

Um dos alvos terapêuticos é a cinase MELK, a qual possui vários inibidores, incluindo NVS-MELK8a, HTH-01-091, MELK-T1 e com destaque o OTSSP167, que suprime o crescimento do tumor, agindo provavelmente em células-tronco cancerosas, a partir da inibição da fosforilação de MELK (CHUNG e NAKAMURA, 2013; HUANG et al., 2017).

1.5.1 Inibidores de MELK

A utilização das cinases como alvos de drogas é estimulada por vários fatores: (I) praticamente todo processo de transdução de sinal é conectado através de uma cascata de transferência de fosfato, sugerindo que a inibição da atividade da cinase pode alterar uma resposta fisiológica; (II) apesar de um alto grau de conservação no sítio de ligação do ATP, pequenas moléculas altamente seletivas com propriedades farmacêuticas favoráveis podem ser

desenvolvidas; (III) a inibição da atividade cinase em células normais pode ser tolerada, apresentando uma janela terapêutica para a morte seletiva de células tumorais e (IV) algumas drogas como o Imatinibe, exibem taxas de resposta de até 80% em pacientes com leucemia mieloide crônica (LMC), visto que essa droga é inibidora da tirosina cinase ABL que confere à célula leucêmica alta resistência à morte celular (ZHANG, YANG e GRAY, 2009). Devido à esses fatores, as cinases se tornam alvos atraentes para o desenvolvimento de inibidores eficientes que possam impedir o desenvolvimento de várias doenças, inclusive o câncer.

A busca pelo desenvolvimento de inibidores que suprimem a atividade da cinase alvo é complexa. Elas possuem um sítio de ligação de ATP que é reconhecido como um alvo ideal para terapia farmacológica, e diferenças nos resíduos que revestem sua cavidade de ligação a ATP conferem seletividade de inibidores contra um alvo específico de cinase. Essas proteínas possuem uma conservação estrutural que leva à reação cruzada inesperada, podendo produzir efeitos colaterais inesperados e desfavoráveis (COWAN-JACOB, MÖBITZ e FABBRO, 2009; CRESPO, ZHANG e FERNÁNDEZ, 2008; ZHANG, YANG e GRAY, 2009).

Devido ao papel oncogênico do MELK, muitos estudos foram desenvolvidos para buscar um inibidor altamente seletivo. Entre esses inibidores, encontramos NVS-MELK8a, HTH-01-091, MELK-T1 e OTSSP167 (Quadro 2).

Quadro 2- Atividade dos principais inibidores de MELK.

Inibidor de MELK	CI ₅₀ (nM)	Linhagem	Referência
NVS-MELK8a	110	MDA-MB-468	Touré et al., 2016
	3,680	MCF-7	
HTH-01-091	2,710	MDA-MB-468	Huang et al., 2017
	4,130	MCF-7	
MELK-T1	37	Ba/F3	Johnson et al., 2015
OTSSP167	6,7	A549	Chung et al., 2012
	4,3	T47D	
	2,3	DU4475	
	6,0	22Rv1	
	97	HT1197	

O inibidor NVS-MELK8a foi testado em um painel de 456 cinases (KINOMEscan), com uma concentração de 1µM para avaliar sua seletividade. Além do MELK, essa droga inibiu

apenas sete cinases com mais de 85% de inibição da ligação, o que demonstra grande seletividade. Além disso, quando administrada por via subcutânea em camundongos, a NVS-MELK8a foi bem tolerada e alcançou níveis plasmáticos e tumorais muito elevados. Para determinar se o composto é capaz de inibir MELK em linhagens de células, foram utilizadas as linhagens de câncer de mama MDA-MB-468, uma linhagem basal triplo negativa (receptor de estrogênio negativa, receptor de progesterona negativo e HER2-negativo), que expressa MELK em nível mais alto em comparação à MCF-7, uma linhagem de câncer de mama luminal e receptor de estrogênio positiva. O efeito inibidor de crescimento do NVS-MELK8a foi maior na linhagem MDA-MB-468 do que na MCF-7, sugerindo que o composto exibe uma atividade seletiva direcionada a MELK (TOURÉ et al., 2016).

O HTH-01-091 inibiu sete cinases (PIM 1/2/3, RIPK2, DYRK3, smMLCK e CLK2) além do MELK que estavam no painel ICKP (*International Center for Kinase Profiling*). Usando o ensaio de ligação de filtro radioativo fornecido pelo ICKP, descobriu-se que o HTH-01-091 inibiu a atividade de MELK com um valor de CI_{50} de 15,3nM, em boa concordância com o ensaio enzimático Z'-LYTE, enquanto as cinases potenciais fora do alvo exibiram valores de CI_{50} no intervalo de 42-109nM. Após a confirmação do HTH-01-091 ser um potente inibidor de MELK em ensaios bioquímicos, foi investigado sua atividade em linhagens de câncer de mama avaliando a proliferação em três e sete dias, em ambos o composto apresentou atividade proliferativa fraca para as linhagens MDA-MB-468 e MCF-7 (HUANG et al., 2017).

MELK-T1 foi produto da descoberta de drogas baseada em fragmentos, exibindo uma seletividade impressionante devido a um ligante de dobradiça de carbonila atípico. Um estudo com base no perfil de um painel de 235 cinases, MELK-T1 a 1 μ M conseguiu inibir seis enzimas com mais de 50%, entre elas, apenas MELK e FLT3 tiveram as interações mais potentes. A linhagem celular Ba/F3 acionada por FLT3 mostrou que MELK-T1 inibiu a proliferação na ausência de IL-3 e não mostrou nenhuma atividade na presença de IL-3. Já as células Ba/F3 transfectadas com FGFR1 (*Fibroblast growth factor receptor 1*), FGFR3 (*Fibroblast growth factor receptor 3*) ou KDR, MELK-T1 não inibiu a proliferação, na presença ou na ausência de IL-3, confirmando assim o envolvimento do alvo intracelular e a especificidade para FLT3. Dada demonstração de atividade intracelular, MELK-T1 deve, portanto, ser uma sonda química adequada para elucidar os efeitos fenotípicos celulares decorrentes da inibição de MELK (HUANG et al., 2017; JOHNSON et al., 2015).

Estudos desenvolvidos por Chung e colaboradores (2012), por meio de triagem de alto rendimento para identificação de compostos alvos seguido de estudo intensivo sobre atividade

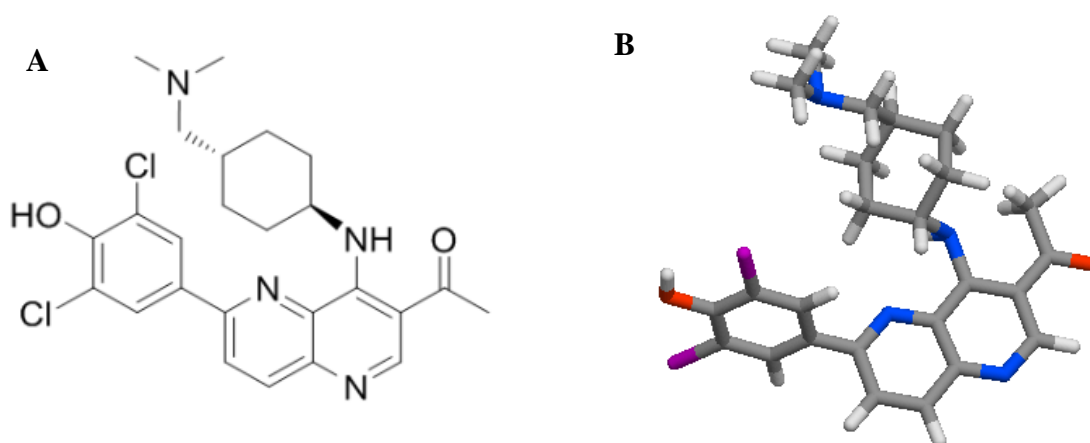
de estrutura, mostraram que o OTSSP167 inibiu efetivamente a atividade de MELK com CI_{50} de 0,41nM. Ensaio antiproliferativo *in vitro* em linhagens de células de câncer de mama (T47D e DU4475), pulmão (A549) e próstata (22Rv1), nas quais MELK se revelou altamente expressa, mostraram valores de CI_{50} de 4,3, 2,3, 6,7 e 6,0nM, respectivamente. Já as células cancerosas de bexiga (HT1197), que a expressão MELK era dificilmente detectável, revelaram um valor de CI_{50} de 97nM, implicando claramente o efeito inibidor do crescimento dependente de MELK deste composto (CHUNG et al., 2012). Atualmente, o OTSSP167 está em quatro ensaios clínicos (NCT01910545, NCT02768519, NCT02795520 e NCT02926690) em cânceres humanos, incluindo tumores sólidos, como o câncer de mama, e neoplasias hematológicas, como a LMA refratária ou recidivante (CLINICAL TRIALS, 2019).

O avanço no desenvolvimento de inibidores de MELK é encorajador, e quando bem caracterizados e seletivos ajudam a explorar melhor as funções biológicas e o impacto terapêutico que pode causar na proteína alvo (TOURÉ et al., 2016).

1.5.2 OTSSP167

O OTSSP167, segundo a IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) é denominada de 1- (6- (3,5-dicloro-4-hidroxifenil) -4 - ((trans-4 - ((dimetilamino) metil) ciclohexil) amino) -1,5-naftiridin-3-il) etanona (Figura 13). A atividade inibitória para o MELK é de $CI_{50}=0,41nM$, a menor em comparação com outros inibidores (CHUNG et al., 2012).

Figura 13– Estruturas do inibidor OTSSP167. (A) Estrutura química do inibidor de MELK. (B) Estrutura 3D do composto.



Fontes: Chung et al., 2012 e Molinspiration, 2019.

O OTSSP167 foi desenvolvido como um inibidor de MELK potente e seletivo com forte atividade antitumoral em cânceres hematológicos e tumores sólidos (ALACHKAR et al., 2014;

CHUNG et al., 2012). Ao contrário da quimioterapia convencional, o uso da dose máxima tolerada (MTD) e a medida do volume do tumor nem sempre são apropriados para a avaliação clínica de drogas moleculares, e para otimizar essa dosagem, devem ser esclarecidos a via molecular e os biomarcadores afetados pela droga (CHUNG et al., 2016; MARSHALL, 2012).

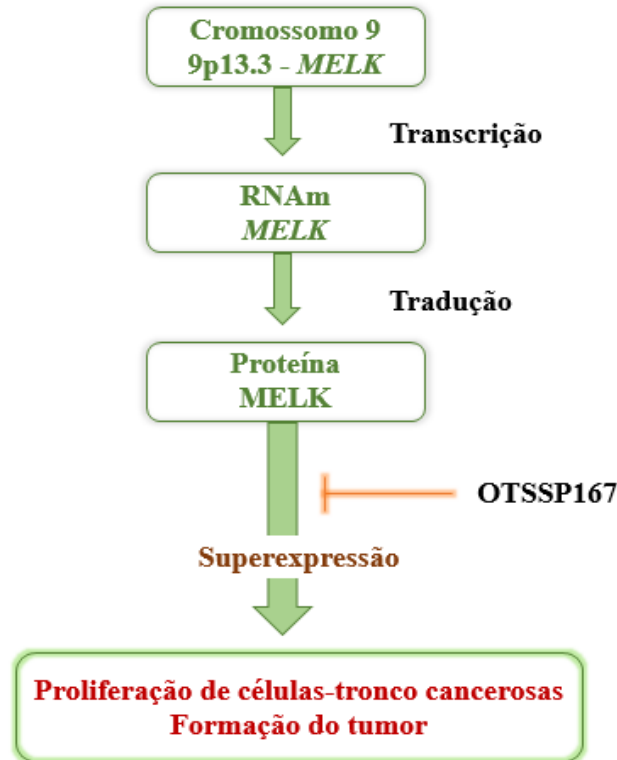
Apesar do OTSSP167 ser um dos inibidores mais potentes para MELK e com eficácia de amplo espectro em modelos *in vivo* e *in vitro*, ele é um inibidor de cinase promíscuo e ainda não tem sua atividade antitumoral bem definida. Por isso, o OTSSP167 também pode interagir com outras proteínas como as cinases CDK7 (*Cyclin-dependent kinase 7*), PIK3CA (*Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*), mTOR (*mammalian target of rapamycin*) e GSK3A (*Glycogen synthase kinase-3 alpha*). Huang e colaboradores (2017), com base no perfil bioquímico das interações do OTSSP167 com as proteínas, testaram a afinidade do inibidor usando os ensaios enzimáticos Z'-LYTE e ADAPTA, observaram que as cinases estudadas apresentaram valores de CI_{50} superior tem ao de inibição de MELK, mostrando que o OTSSP167 tem maior afinidade pela cinase MELK (Quadro 3).

Quadro 3 - Valores bioquímicos de IC_{50} do OTSSP167 em diferentes cinases.

Proteína	CI_{50} (nM)	Referência
MELK	0,5	Huang et al., 2017.
GSK3A	1,6	
mTOR	35,7	
CDK7	49,1	
PIK3CA	66,5	

O inibidor OTSSP167 pode ser administrado via oral devido ao seu alto nível de biodisponibilidade, mas tanto injeção intravenosa quanto a administração oral da droga suprimiram significativamente o crescimento tumoral em modelo de xenoenxerto em camundongos usando células MDA-MB-231 (células de câncer de mama triplo negativo e com MELK positivo), sem detectar toxicidade na dose efetiva. A supressão do crescimento tumoral (provavelmente de células-tronco cancerosas) ocorre através da inibição da fosforilação do substrato da proteína (Figura 14). A droga também suprimiu o crescimento de células de câncer de mama, pulmão, pâncreas e próstata que expressam altos níveis da proteína MELK (CHUNG et al., 2012; CHUNG; NAKAMURA, 2013).

Figura 14 – Representação esquemática da síntese de MELK e ação do inibidor OTSSP167. O gene *MELK* que está presente na região 9p13.3 do cromossomo 9 é transcrito formando uma fita simples de RNA mensageiro, que em seguida, codifica a proteína MELK. A superexpressão dessa proteína induz a proliferação de células-tronco cancerosas e consequente formação de tumor, mas com a ação do OTSSP167 a proteína cinase é inibida e a informação não é levada para o núcleo da célula, logo, não ocorre a divisão celular.



Fonte: Adaptado de Ganguly et al., 2014.

Em estudo com câncer de mama observou-se que o OTSSP167 não afetou o crescimento dos tumores de mama luminal, mas a droga causou uma inibição significativa no crescimento dos tumores de mama basal. Isso indica que o MELK é seletivamente necessário para o crescimento de células de câncer de mama basal, e sugere que a sua inibição pode ser uma abordagem eficaz no tratamento desta doença (WANG et al., 2014).

Outro estudo com câncer de mama mostrou que a inibição do MELK com OTSSP167 anula o “checkpoint” mitótico e interrompe a citocinese. As linhagens de células MCF-7, positivas ao receptor de estrógeno, que foram tratadas somente com DMSO, a maioria alinhou seus cromossomos, entrou em anáfase e prosseguiu para a citocinese. As células MCF-7 bloqueadas na mitose pelo nocodazol (um medicamento despolimerizante de microtúbulos) foram sinalizadas a progredir de forma sincronizada através da mitose após a retirada do nocodazol. Já as células tratadas com OTSSP167 não conseguiram terminar a citocinese, e saíram da mitose sem alinhar os seus cromossomos, sugerindo a anulação do “checkpoint” mitótico (JI et al., 2016).

Li e colaboradores (2016) monitoraram a progressão do ciclo celular, observando que o tratamento com OTSSP167 aumentou a população de células na fase G2/M do ciclo em comparação com o controle (57,88% vs. 9,83% em células BGC823 de adenocarcinoma gástrico e 21,37% vs. 9,83% em células SGC7901).

O MELK é um potencial alvo terapêutico e importante para a LMA, visto que a OTSSP167 induziu a diferenciação mieloide e a apoptose, e diminuiu a migração celular. Isso sugere que o desenvolvimento clínico do OTSSP167 na LMA merece bastante atenção (ALACHKAR et al., 2014).

Estudos com linhagens de células de câncer do colo do útero (C33A, SiHa e HeLa) mostraram que MELK poderia afetar significativamente a proliferação, capacidade de formação de colônias e promover senescência e apoptose dessas células. Dentro de uma certa faixa de concentração (0-40nmol/mL), o aumento na concentração do inibidor OTSSP167 acelerou a taxa de inibição da proliferação dessas linhagens citadas, diminuiu a capacidade de clonagem e promoveu senescência e apoptose celular (WANG et al., 2018).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa descreveu a amplificação de 9p13.3 nas linhagens de células de câncer gástrico ACP03 e AGP01 observada por Hibridização Genômica Comparativa (CGH) e CGH array (aCGH). Além disso, os resultados encontrados foram confirmados por análise de FISH (*fluorescence in situ hybridization*) e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) em tempo real nas linhagens estudadas. Adicionalmente, um aumento do número de cópias do gene *MELK*, localizado na região 9p13.3, foi observado em 55,9% (38/68) das amostras de adenocarcinoma gástrico. A caracterização do aumento do número de cópias em uma pequena região do cromossomo 9 em linhagens de células de adenocarcinoma gástrico revelou *MELK* como um gene alvo candidato que possivelmente está relacionado com o desenvolvimento de câncer gástrico (CALCAGNO et al., 2016).

Nesse sentido, é necessário o desenvolvimento de novas alternativas de tratamento para o câncer, já que as opções disponíveis para o tratamento parecem ter um papel paliativo, na maioria dos casos sem refletir no aumento da taxa de sobrevivência dos pacientes. Por isso, é importante explorar o papel do OTSSP167 em linhagens de células gástricas com amplificação do *MELK*, como AGP01 e ACP03, já que não há estudos em linhagens com amplificação do gene. Este estudo permitirá uma melhor compreensão da etiologia e fisiopatologia da carcinogênese gástrica e a identificação de possíveis alvos, o que pode levar ao diagnóstico precoce, prognóstico e desenvolvimento de uma nova terapia anticancerosa.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o papel de inibição da atividade cinase de MELK por OTSSP167 em linhagens de câncer gástrico com amplificação do gene *MELK*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar de forma teórica os parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos do OTSSP167 por meio de metodologias *in silico*;
- Avaliar o potencial citotóxico de OTSSP167 nas linhagens de adenocarcinoma gástrico AGP01 e ACP03;
- Avaliar a capacidade inibitória do OTSSP167 na migração e invasão celular na linhagem de adenocarcinoma com maior efeito citotóxico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS DE CÉLULAS E CULTIVO

Foram utilizadas linhagens de células de adenocarcinoma gástrico obtidas do fluido ascítico de paciente com adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (AGP01) e do tumor primário de adenocarcinoma gástrico do tipo intestinal (ACP03) estabelecidas no Laboratório de Citogenética Humana (LCH) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará (LEAL et al., 2009).

As células foram cultivadas em garrafas de cultura apropriadas, com os meios de cultura DMEM *high glucose* da Gibco e 10% de soro bovino fetal (SBF), 1% dos antibióticos estreptomicina e penicilina e 1% de anfotericina B, as garrafas foram mantidas em estufa com atmosfera em 5% de CO₂ à 37°C. Suas confluências foram constantemente acompanhadas em microscópio invertido. O meio de cultura foi trocado sempre que os nutrientes foram consumidos. Para os experimentos o meio foi desprezado, as células lavadas com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e tripsinizadas para desprendê-las do fundo da garrafa.

3.2 DROGA

A substância objeto de estudo deste trabalho é o OTSSP167 adquirido da ProbeChem, China. Para os experimentos *in vitro*, o composto foi diluído em DMSO a uma concentração de 250,2µM, seguida da diluição em meio de cultura para a concentração desejada para cada experimento.

3.3 ANÁLISE *IN SILICO* DA DROGA

A estrutura bidimensional (2D) do OTSSP167 foi desenhada no servidor online Molinspiration (*Molinspiration Cheminformatics*, Eslováquia). A partir disso, se obteve o SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) que é o código referente ao composto. Esse mesmo servidor calculou as propriedades físico-químicas, seguindo a Regra de Lipinski e de Veber. De acordo com as observações de Lipinski e colaboradores (1997), as moléculas com boa biodisponibilidade por via oral apresentavam: (i) doadores de ligação de hidrogênio (DLH) ≤ 5 ; (ii) aceptores de ligação de hidrogênio (ALH) ≤ 10 ; peso molecular (PM) ≤ 500 Da; (iv) coeficiente de partição (miLogP) ≤ 5 . Em seguida, Veber e colaboradores (2002), incluíram na regra que o número de ligações rotacionáveis (nlr) deveria ser ≤ 10 e a área de

superfície polar (ATSP) $\leq 140 \text{ \AA}^2$. A partir dos valores de ATSP foi possível calcular a porcentagem de absorção pela fórmula $\% \text{ ABS} = 109 - (0,345 \times \text{ATSP})$ (ZHAO et al., 2002).

O servidor Molinspiration além de avaliar as características físico-químicas de um composto, também consegue prever sua atividade biológica. O composto é avaliado conforme a pontuação dos ligantes e dos inibidores, se o valor for maior que 0,00 o composto é considerado ativo, se o valor estiver entre 0,00 e -0,50 o composto é moderadamente ativo e se for menor que -0,50 é considerado inativo (VERMA, 2012).

A partir do código SMILES foi possível também avaliar as propriedades de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade do OTSSP167, utilizando o servidor admetSAR 2.0 que analisa candidatos à fármacos e produtos químicos ambientais.

Os possíveis alvos terapêuticos do OTSSP167 foram avaliados por meio da predição com o servidor SwissTarget Prediction (*Swiss Institute of Bioinformatic*, Suíça). Esse servidor compara a similaridade dos compostos com uma biblioteca de 280.000 compostos ativos, em mais de 2.000 alvos farmacológicos, em organismos diferentes (GFELLER et al., 2014).

3.4 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO POR ALAMAR BLUE

O ensaio Alamar Blue é designado para medir quantitativamente a proliferação celular, avaliando a viabilidade e a citotoxicidade das células. Através do espectrofotômetro é possível observar a proliferação celular, usando o indicador de óxido redução resazurina (azul e não fluorescente) que é reduzido à resorufina (rosa com altíssima fluorescência em vermelho) pelas células viáveis. Essas alterações de fluorescência do corante permitem identificar a quantidade de células metabolicamente ativas (MOSMANN, 1983; RAMPERSAD, 2012; VEGA-AVILA; PUGSLEY, 2011).

As linhagens de células AGP01 e ACP03 foram semeadas em placas de 96 poços com 5×10^3 células por poço e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Após 24h de espera para aderência, as células foram tratadas com OTSSP167. Foram realizadas diluições seriadas em 7 concentrações diferentes de OTSSP167 diluído em DMSO (1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 250nM) para obtenção da curva (100 μL /poço) e um controle negativo que não foi tratado, em seguida, as placas foram mantidas em estufa. Após um período de incubação de 72h, foi adicionado em cada poço 20 μL de solução de alamar blue (que corresponde a 10% do volume de cada poço) e a placa foi reincubada na estufa por 2 horas e protegida da luz. Em seguida, foi feita a leitura por fluorescência com a placa tampada no espectrofotômetro de placa

a um comprimento de onda de 530nm de excitação e 590nm de emissão para avaliação dos efeitos na proliferação ou citotoxicidade celular.

Para a realização da análise estatística dos dados, foi utilizado o software GraphPad Prism 8.1, calculando uma regressão não-linear do percentual de inibição versus logaritmo das concentrações, obtendo, desta forma, a concentração inibitória com 50% de atividade (CI_{50}) do OTSSP167, sendo admitido um intervalo de confiança de 95% e um coeficiente de determinação maior que 0.9 ($R^2 > 0.9$).

3.5 WESTERN BLOT

A técnica de western blot foi realizada para quantificar a expressão de MELK após o tratamento com OTSSP167. Para isso, foram plaqueadas $0,2 \times 10^6$ de células em placas de 12 poços e mantidas em estufa com 5% de CO_2 a $37^\circ C$ para a adesão das células. Em seguida, foi feito o tratamento com o OTSSP167 nas concentrações estabelecidas e novamente as placas foram mantidas na estufa por 24h e 48h. As proteínas das linhagens tratadas e do grupo sem tratamento foram extraídas utilizando tampão RIPA (Thermo Scientific) e inibidor de protease (Thermo Scientific). Os lisados foram quantificados utilizando o *BCA Protein Assay* (Thermo Scientific) e a curva BSA-Albumina (Bio-Rad) no equipamento *EPOCH™ Bio Teck*. Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Após a corrida das amostras, foi realizada a transferência das proteínas para membrana de nitrocelulose por meio do *Transblot® Semi-dry Transfer Cell*. Essas membranas foram imersas em solução de bloqueio para evitar marcações inespecíficas. Então, as membranas foram incubadas com os anticorpos MELK, anti-rabbit IgG e os endógenos α -tubulina e β -actina diluídos em solução de BSA. Entre uma incubação e outra foram feitas algumas lavagens com tampão TTBS (tampão que contém TBS (tris-buffered saline), água milli-Q e Tween20). As bandas foram visualizadas usando o sistema de detecção de quimioluminescência *DNR Bio Imaging Systems MF-ChemiBIS 3.2* de acordo com as recomendações do fabricante e o software *Gel Capture*. As imagens foram analisadas pelo programa Image J.

3.6 ENSAIO DE MIGRAÇÃO POR CICATRIZAÇÃO

A linhagem celular com maior efeito citotóxico (ACP03) foi cultivada em placas de 12 poços numa densidade de 2×10^5 células por poço e mantida por 24 horas na estufa com atmosfera de 5% de CO_2 a $37^\circ C$ para aderirem. Após esse período foi feito o arranhão com

uma ponteira de 10 μ L no centro de cada poço e então foi realizado o tratamento com OTSSP167 (17nM, 8,5nM e 4,25nM) em triplicata por 24 horas. O comportamento das células foi observado e fotografado no mesmo local no tempo inicial após o risco e no tempo final (0, 6, 12 e 24 horas). O tempo estipulado é baseado no tempo de duplicação da célula em estudo, pois o ideal é que a migração seja observada antes do tempo de duplicação celular, para garantir apenas o efeito inibitório da migração e não do crescimento celular. Os poços foram fotografados em microscópio invertido (EVOS XL®) na objetiva de 100x. As áreas dos arranhões após o tratamento nos diferentes tempos foram quantificadas no programa Image J.

Os dados foram analisados a partir da média e do erro padrão de três experimentos independentes. Para verificar a ocorrência de diferença significativa entre o controle e o tratamento nos diferentes tempos, os dados foram comparados por análise de variância (2way ANOVA) seguida por Teste de Bonferroni, com nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

3.7 ENSAIO DE INVASÃO CELULAR

A capacidade que as células cancerosas têm de invadir o estroma intersticial está ligada à metástase e colonização de tecidos adjacentes ao tumor primário. O ensaio de invasão celular utilizando a câmara de Boyden e o matrigel, mimetiza *in vitro* o processo de invasão do estroma intersticial, processo comum às células do câncer, principalmente na metástase e colonização de tecidos adjacentes, dando um parâmetro do que sugestivamente acontece *in vivo* (ALBINI, IWAMOTO e KLEINMAN, 1987). O matrigel é uma mistura proteica do estroma tumoral de um sarcoma murino, constituído de diversas proteínas de matriz extracelular como os colágenos (KLEINMAN e MARTIN, 2005).

No ensaio de invasão, as células são semeadas com meio sem soro bovino fetal nos insertos recobertos com uma fina camada de matrigel. Abaixo do inserto é adicionado meio com soro bovino fetal a fim de que as células migrem pela quimioatração, atravessando o matrigel e o poro de 8 μ m. Se a substância teste tiver propriedades antimetastáticas, impedirá que as células atravessem a câmara (KRAMER et al., 2013).

Esse teste foi feito em placas de 12 poços, os insertos de 8 μ m (BD Biosciences) foram revestidos com 400 μ L da solução de matrigel (diluído em meio de cultura sem SBF) e solidificado à 37°C *overnight*. A linhagem ACP03 foi semeada com 1mL de meio sem SBF na densidade de 2×10^5 na parte superior em contato com matrigel, enquanto que abaixo da câmara foi adicionado 1mL de meio com SBF. Os tratamentos foram realizados com OTSSP167

(17nM, 8,5nM e 4,25nM), enquanto o controle negativo apenas com o diluente (DMSO) no tempo em que o CI_{50} não foi citotóxico. Ao término do tempo os insertos foram lavados duas vezes com PBS 1x, fixadas com formaldeído 3,7% por 2 minutos, lavados novamente e permeabilizados com metanol 100% por 20 minutos. Em seguida, as células presentes nos insertos foram coradas com Giemsa por 15 minutos. Com auxílio de um swab, o matrigel e as células na parte superior foram removidos do inserto. A contagem das células no inferior da câmara foi realizada no Image J após a captura das imagens pelo microscópio invertido (EVOS XL®). As células presentes na parte inferior do inserto (células que migraram) foram fotografadas em 7 campos aleatórios na objetiva de 20x.

Para verificar a diferença entre os poços tratados e os não tratados, os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey, com nível de significância de 95% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO DO OTSSP167

A partir da estrutura 2D do OTSSP167 (Figura 13), foi possível obter o código SMILES dessa molécula inibidora de MELK (Quadro 4) que foi usado para análises posteriores do seu perfil farmacocinético e farmacodinâmico.

Quadro 4 – Código SMILES do composto

Identificação	SMILES
OTSSP167	<chem>CC(=O)C1=CN=C2C=CC(=NC2=C1NC3CCC(CC3)CN(C)C)C4=CC(=C(C(=C4)Cl)O)Cl</chem>

Para avaliar os parâmetros estruturais do OTSSP167 de acordo com a Regra de Lipinski e Veber, foi utilizado o servidor Molinspiration. O OTSSP167 apresentou um coeficiente de partição maior que o permitido pela regra ($miLogP=5,89$), representando a lipofilia do composto. Entretanto, todas as outras características obedeceram às regras, a área de superfície polar ($ATSP=78,35 \text{ \AA}^2$) do composto ficou abaixo de 140 \AA^2 , logo o cálculo da porcentagem de absorção ($ABS=81,96\%$) também favoreceu uma boa biodisponibilidade do composto. Assim como os parâmetros anteriores, o número de aceptores de ligação de hidrogênio ($ALH=6$), doadores de ligação hidrogênio ($DLH=2$) e número de ligações rotacionáveis ($nlr=6$) também seguiram as regras, sendo que ALH e DLH representam a hidrofilia do composto. Ademais, o peso molecular ($PM=487,43\text{Da}$) obtido está abaixo do valor máximo exigido para moléculas com bom transporte, difusão e absorção no organismo (Quadro 5).

Quadro 5 – Características físico-químicas do composto

Identificação	$miLogP$	$ATSP(\text{\AA}^2)$	$PM(\text{Da})$	ALH	DLH	nlr	Volume	$ABS(\%)$
OTSSP167	5,89	78,35	487,43	6	2	6	426,90	81,96

As propriedades do ADMET foram avaliadas pelo software admetSAR. Com relação à absorção, o OTSSP167 apresentou absorção intestinal humana e penetração na barreira hematoencefálica. A localização celular mais provável do composto é na mitocôndria e foi identificado como substrato (com maior probabilidade) e inibidor da glicoproteína-P, que é uma proteína que está superexpressa na superfície de células tumorais e transporta a droga para a matriz extracelular, mantendo a concentração intracelular de drogas abaixo de um limiar terapêutico (PERSIDIS, 1999). Já na análise de metabolismo, o composto apresentou-se positivo para a promiscuidade inibitória ao CYP, e foi identificado como inibidor dos citocromos CYP 2D6 e CYP 1A2, e como substrato apenas do CYP 3A4. E em relação aos transportadores farmacocinéticos, o OTSSP167 foi inibidor dos polipeptídeos transportadores

de ânions orgânicos 1B1 e 1B3 (OATP1B1 e OATP1B3) e inibidor de bomba exportadora de sais biliares (BSEP). Quanto à toxicidade, o composto apresentou hepatotoxicidade e foi classificado na categoria III, com valor de toxicidade oral aguda de 3,644kg/mol. O composto também mostrou interação com o gene hERG, presença no micronúcleo, toxicidade a crustáceos e peixes. Por fim, não apresentou características de excreção (Quadro 6).

Quadro 6- Predição pelo servidor admetSAR

Característica		OTSSP167	Probabilidade
Absorção			
Absorção intestinal humana		+	0,9910
Permeabilidade à Caco-2		-	0,7366
Penetração da barreira hematoencefálica		+	0,9825
Distribuição			
Localização subcelular		Mitocôndria	0,6762
Substrato da glicoproteína-p		+	0,7114
Inibição da glicoproteína-p		+	0,6054
Metabolismo			
Promiscuidade de inibição das CYP		+	0,5575
Citocromo	CYP450 2C9 (substrato)	-	0,5742
	CYP450 2C9 (inibidor)	-	0,7465
	CYP450 2D6 (substrato)	-	0,7319
	CYP450 2D6 (inibidor)	+	0,6468
	CYP450 3A4 (substrato)	+	0,6877
	CYP450 3A4 (inibidor)	-	0,6119
	CYP450 1A2 (inibidor)	+	0,5845
	CYP450 2C19 (inibidor)	-	0,5190
Transportadores farmacocinéticos	OATP2B1 (inibidor)	-	1,0000
	OATP1B1 (inibidor)	+	0,8825
	OATP1B3 (inibidor)	+	0,9356
	MATE1 (inibidor)	-	0,7200
	OCT2 (inibidor)	-	0,5500
	BSEP (inibidor)	+	0,9814
Toxicidade			
Toxicidade de órgãos	Hepatotoxicidade	+	0,7750
	Toxicidade oral aguda	III	0,5301
	Irritação ocular	-	0,9676
	Corrosão ocular	-	0,9881
Toxicidade genômica	Mutagenese AMES	-	0,6500
	Carcinogenicidade (binário)	-	0,8143
	Ensaio de micronúcleo	+	0,8200
	Inibição do gene hERG	+	0,8398
Eco-toxicidade	Toxicidade a crustáceos	+	0,5349
	Toxicidade a abelha	-	0,7787
	Toxicidade a peixes	+	0,9467
	Biodegradação	-	0,9000

4.2 AVALIAÇÃO DO PERFIL FARMACODINÂMICO DO OTSSP167

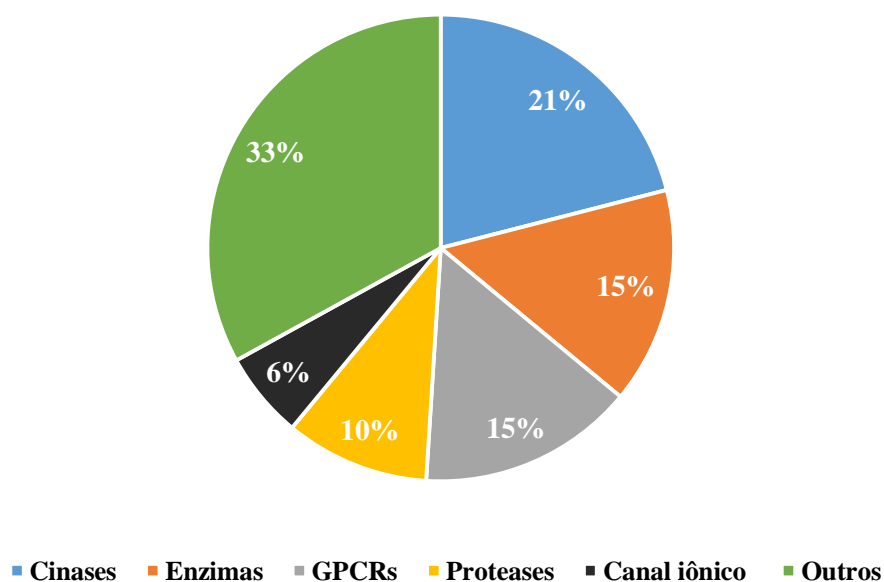
O servidor Molinspiration também consegue prever a atividade biológica do OTSSP167. Logo, o inibidor de MELK é ativo para os ligantes de GPCR (Receptor acoplado à proteína G) e modulador de canal iônico. Além disso, o OTSSP167 também se mostrou ativo para inibição enzimática e de cinase, onde apresentou o maior escore de atividade (Quadro 7). Predizendo assim, que o OTSSP167 se caracteriza como inibidor de cinase, o ponto principal explorado pelo nosso trabalho.

Quadro 7- Escore da função biológica do OTSSP167

Identificação	Ligante			Inibidor		
	GPCR	Canal Iônico	Receptor Nuclear	Protease	Enzima	Cinase
OTSSP167	0,18	0,19	-0,04	-0,07	0,20	0,30

Os alvos do OTSSP167 foram encontrados pelo servidor SwissTarget Prediction e foram agrupados de acordo com suas classes, conforme o Gráfico 1.

Gráfico 1 – Porcentagem de classes alvos do OTSSP167



De acordo com o servidor, 21% dos alvos pertencem à família das cinases, 15% são classificados como enzimas e também GPCRs, 10% são proteases e 6% ligantes de canal iônico. Essa predição de ligantes corrobora com os dados do servidor Molinspiration que caracterizou o OTSSP167 como ativo para a inibição de cinases e enzimas.

4.3 CITOTOXICIDADE DO OTSSP167 EM LINHAGENS GÁSTRICAS

O ensaio de Alamar Blue foi realizado para analisar a viabilidade das duas linhagens de células, AGP01 e ACP03, e determinar as concentrações ideais do OTSSP167 para ambas as linhagens. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 1, utilizou-se a regressão não-linear para obtenção da CI_{50} considerando um intervalo de confiança de 95%.

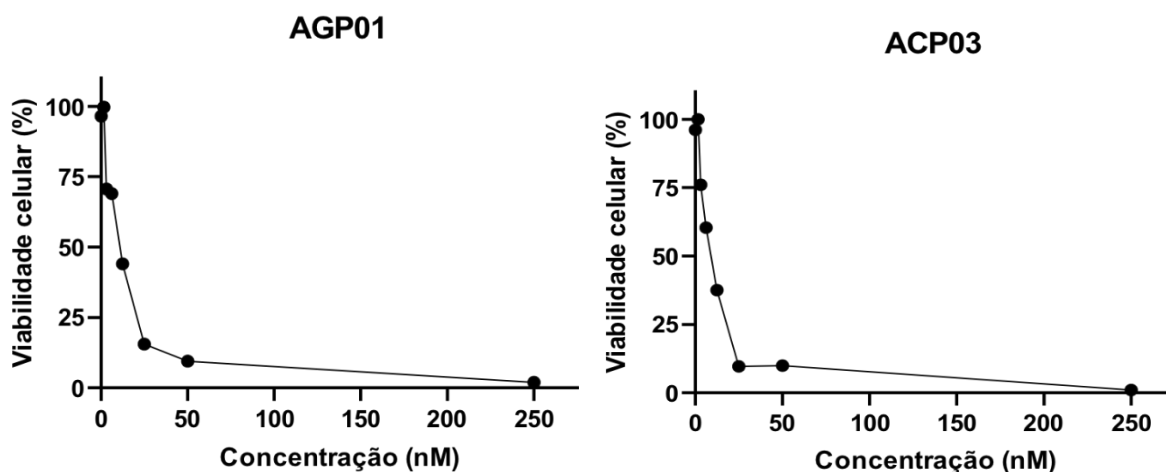
Tabela 1- CI_{50} do OTSSP167 nas linhagens AGP01 e ACP03 após 72h de tratamento.

OTSSP167			
Linhagem celular	R^2	CI_{50} (nM)	IC 95% (nM)
AGP01	0,9497	9,60	8,064-11,43
ACP03	0,9147	8,50	6,781-10,64

Os dados revelaram que o OTSSP167 apresentou potencial citotóxico nas duas linhagens de células testadas, com valores de CI_{50} de 9,6nM em AGP01 e de 8,5nM em ACP03. De acordo com esses resultados, pode-se observar que o inibidor se mostrou mais citotóxico para a ACP03 e menos citotóxico à AGP01, visto que sua atividade foi maior quando comparado com a linhagem AGP01.

O gráfico 2 apresenta a diminuição da viabilidade celular nas diferentes concentrações da droga para cada linhagem testada. Na concentração 12,5nM de OTSSP167, o percentual de células viáveis foi de 37,53% em ACP03 enquanto em AGP01 foi de 44,07%. Evidenciando que a mesma concentração de OTSSP167 conseguiu inibir a viabilidade de um número maior de células em ACP03.

Gráfico 2- Curva do percentual de proliferação celular após 72 horas de tratamento com o OTSSP167 nas linhagens AGP01 e ACP03. Cada ponto equivale a média de três replicatas.

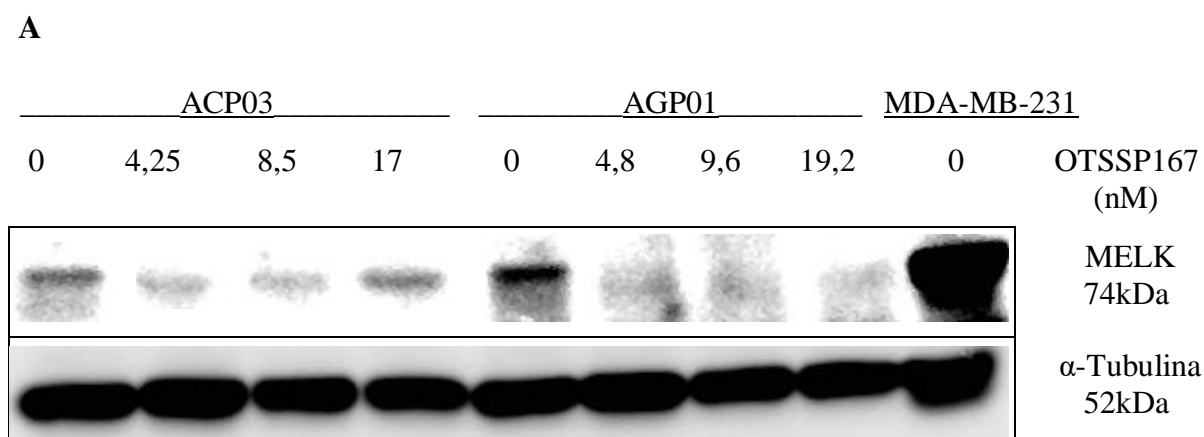


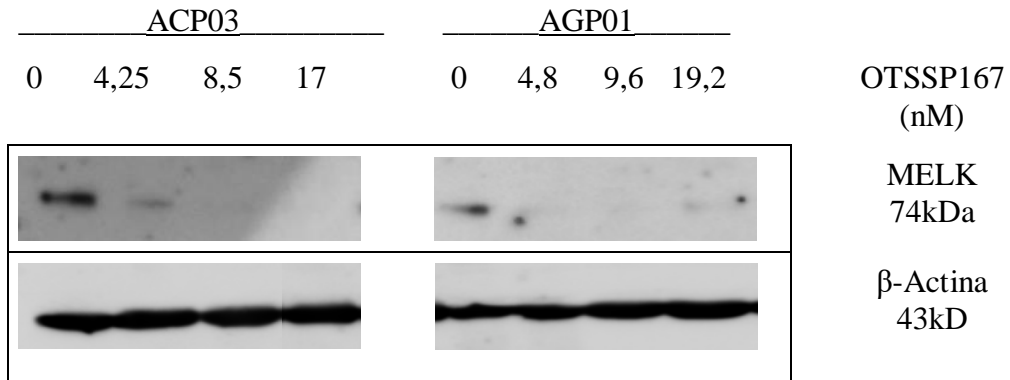
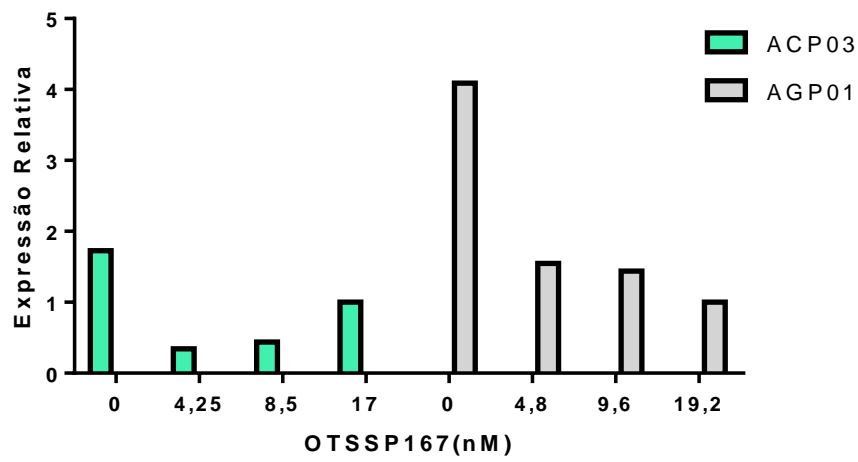
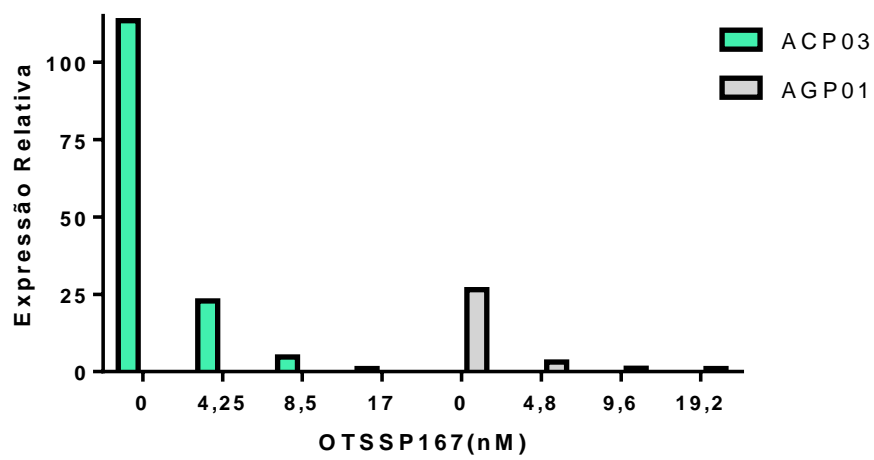
A partir dos dados do teste de citotoxicidade, escolheu-se para dar continuidade a este trabalho a linhagem ACP03, por apresentar maior sensibilidade ao composto testado quando comparada à linhagem AGP01. Além disso, a partir do valor da CI_{50} em ACP03 (8,5nM), foram definidas as concentrações utilizadas nos ensaios posteriores, sendo estas 4,25nM (metade da CI_{50}), 8,5nM (CI_{50}) e 17nM (dobro da CI_{50}).

4.4 EXPRESSÃO DE MELK NAS LINHAGENS GÁSTRICAS

Analisamos o nível de expressão da proteína MELK nas linhagens gástricas (ACP03 e AGP01) e na linhagem de câncer de mama (MDA-MB-231) pela técnica Western Blot. A linhagem MDA-MB-231 foi utilizada como controle, visto que estudos anteriores mostraram que esta apresenta alta expressão da proteína MELK (LI et al., 2018). Para investigar se o OTSSP167 modifica diretamente a expressão de MELK nas linhagens de adenocarcinoma gástrico, os níveis dessa proteína foram quantificados após o tratamento de 24 e 48 horas em diferentes concentrações do inibidor (Figura 15).

Figura 15- Expressão de proteína MELK, α -Tubulina e β -Actina em linhagens de células gástricas e células mamárias. **A)** Detecção da proteína MELK mensurada por western blot nas linhagens ACP03, AGP01 e MDA-MB-231 após 24 horas de tratamento com o OTSSP167. **B)** Detecção da proteína MELK nas linhagens ACP03 e AGP01 após 48 horas tratadas com OTSSP167. **C)** Níveis de proteína MELK em células de adenocarcinoma gástrico após o tratamento com OTSSP167, em diferentes concentrações por 24 horas. **D)** Expressão de proteína MELK em células de adenocarcinoma gástrico após 48 horas de tratamento com diferentes concentrações de OTSSP167.



B**C****Expressão de MELK após 24 horas de tratamento****D****Expressão de MELK após 48 horas de tratamento**

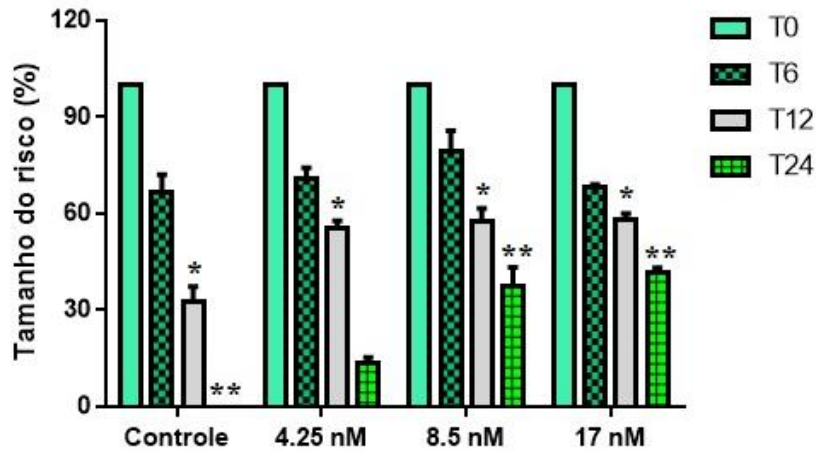
A comparação entre o controle e as células tratadas por 24h em diferentes concentrações demonstraram que o OTSSP167 regula negativamente a proteína MELK nas linhagens ACP03 e AGP01, uma vez que diminuiu os níveis dessa proteína em ambas (Figura 14A). A linhagem AGP01 demonstrou diminuição do nível proteico de acordo com o aumento da concentração da droga. Entretanto, a linhagem ACP03 apresentou um aumento da proteína quando tratada com 17nM de OTSSP167, mostrando níveis superiores de proteína MELK em relação aos tratamentos com 4,25 e 8,5nM (Figura 14B).

No tempo de 48 horas, ambas as linhagens gástricas mostraram uma redução na expressão de proteína MELK à medida em que se aumentou a concentração do OTSSP167. O gráfico D ratifica por meio da expressão relativa que o nível proteico dessa cinase reduziu significativamente nas linhagens ACP03 e AGP01.

4.5 POTENCIAL DE MIGRAÇÃO DAS CÉLULAS

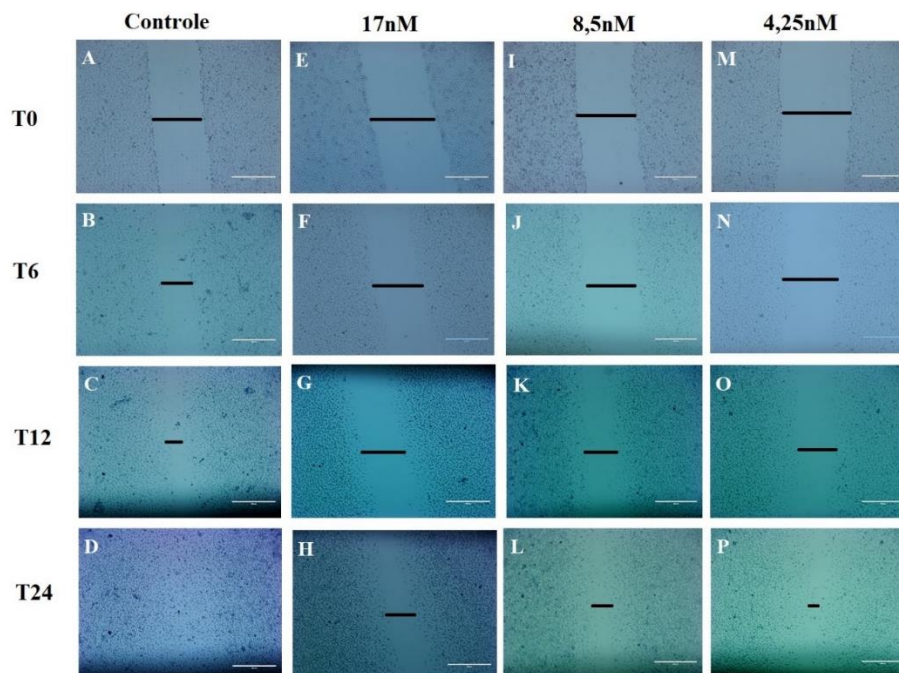
A habilidade do OTSSP167 em modular a migração celular foi verificada por meio do ensaio *wound healing*. A linhagem gástrica ACP03 foi plaqueada e após atingir confluência foi feito um arranhão no centro de cada poço. A placa apresentava controle negativo e o grupo tratado com OTSSP167 (4,25, 8,5 e 17nM). A migração celular foi determinada medindo a largura do arranhão nos tempos de 0, 6, 12 e 24 horas após a incubação com o composto. No gráfico 3 estão os valores de distâncias de migração das células ACP03 expressos em porcentagem. Nossos resultados mostram que o OTSSP167, no tempo de 12 horas, foi capaz de inibir a migração de 55,33% das células tratadas com a concentração de 4,25nM do composto, 57,66% das células tratadas com 8,5nM e 58% das células tratadas com o dobro da CI_{50} , esses resultados garantiram significância quando comparados ao controle negativo. Já nas análises de 24 horas, o composto inibiu 13,66% das células tratadas com metade da CI_{50} o que não garantiu a significância, mas o controle que não apresentou distância entre as células mostrou-se estatisticamente significativo quando comparado com as células tratadas com 8,5nM (inibição de 37,33% das células) e células ACP03 tratadas com 17nM do OTSSP167 apresentaram inibição de migração de 41,66%.

Gráfico 3– Avaliação da ação do OTSSP167 sobre a migração de células ACP03. Os valores estão expressos em porcentagem em relação ao controle. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 3 experimentos independentes. * $p < 0,001$ comparado com o controle negativo e ** $p < 0,0001$ comparado com o controle utilizando 2way ANOVA seguido de teste de Bonferroni.



Durante o tratamento com o OTSSP167 foi possível observar que as células do controle negativo conseguiram migrar para o risco e fechá-lo completamente com o passar do tempo (Figura 16– A, B, C e D). Já nas células ACP03 tratadas com OTSSP167, houve uma diminuição da migração em todos os grupos, podendo ainda ser observado que o espaço entre as células tratadas com 17nM do composto (Figura 16– E, F, G e H) são maiores do que as tratadas com a menor contração 4,25nM (Figura 16– M, N, O e P).

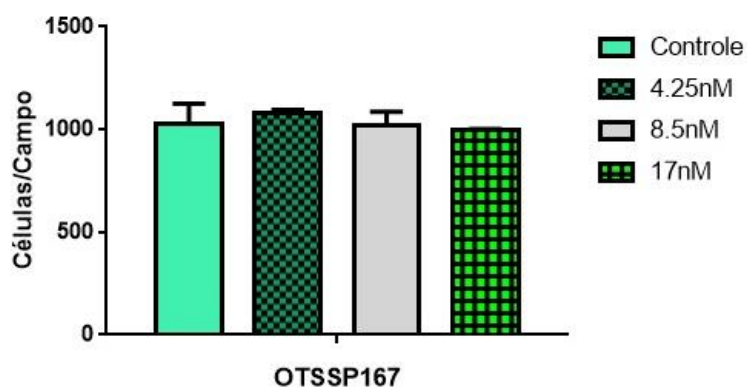
Figura 16– Fotomicrografia das células ACP03 durante o ensaio de migração. As células foram observadas em quatro tempos (0, 6, 12 e 24 horas), apresentando controle negativo, células tratadas com OTSSP167 com valores da CI_{50} , o dobro e a metade.



4.6 POTENCIAL DE INVASÃO DAS CÉLULAS

De acordo com os resultados mostrados no Gráfico 4, observou-se que o composto inibiu 0,37% de células tratadas com 8,5nM e 3,16% de células tratadas com 17nM do OTSSP167, porém esses resultados não foram estatisticamente significantes quando comparados ao controle.

Gráfico 4- Avaliação da ação do OTSSP167 sobre a invasão de células ACP03. Os valores são expressos em números de células por campo. As barras representam a média \pm erro padrão da média de 3 experimentos independentes, considerando 7 campos de cada experimento. Os dados foram comparados por análise de variância (ANOVA) seguido por teste de Tukey.



5. DISCUSSÃO

Por décadas, a busca por medicamentos baseados na quimioterapia citotóxica para combater o câncer mostrou que apesar dessas moléculas atingirem rapidamente células mitóticas, incluindo células cancerosas e normais, muitos pacientes sofriam com as toxicidades clássicas, como sintomas gastrointestinais (FRANCIA et al., 2018). Atualmente, novas abordagens terapêuticas estão sendo desenvolvidas como combinação de drogas e procedimentos que são designados a atingir células cancerosas primárias e metastáticas (WIDMER et al., 2014). E uma dessas terapias direcionadas são os inibidores de pequenas moléculas, por exemplo, os inibidores de cinases (AMER, 2014).

O benefício clínico dos medicamentos de uso oral depende, em grande parte, da exposição ótima aos medicamentos em termos de concentrações plasmáticas. Isso pode sofrer interferência de fatores como variabilidade de cada paciente na absorção, distribuição e metabolismo, diferenças genéticas ou demográficas entre indivíduos ou anomalias anatômicas ou pós-operatórias do trato gastrointestinal. Além disso, outros fatores específicos, como adesão, interações e dietas medicamentosas ou influências ambientais também podem afetar a exposição ao medicamento, comprometendo potencialmente a resposta adequada (JOSEPHS et al., 2013; THOMAS-SCHOEMANN et al., 2014; VON MEHREN e WIDMER, 2011). Os parâmetros estruturais da RO5 são relevantes para a predição teórica do perfil de biodisponibilidade oral dos compostos e está associada à absorção e à permeabilidade de possíveis fármacos. Contudo, o OTSSP167 violou apenas a regra do coeficiente de partição (miLogP) que apresentou um resultado maior que o esperado, portanto, não deve apresentar problemas com a biodisponibilidade oral.

Quanto aos parâmetros de ADMET, o OTSSP167 mostrou ações de absorção, distribuição, metabolismo e toxicidade. Quanto à absorção, observou-se que o OTSSP167 foi positivo para a absorção intestinal e penetração na barreira hematoencefálica. No sistema nervoso central as células capilares não possuem poros e apresentam pouca atividade transcitótica. Para que os fármacos atravessem a barreira hematoencefálica, precisam se difundir transcelularmente, ou seja, penetrar as membranas luminal e basal do endotélio e isso exige propriedades físico-químicas específicas desses fármacos (DANEMAN e PRAT, 2015).

Com relação à absorção intestinal, um estudo utilizando um método inovador de espectrometria de massa em tandem por cromatografia em fase líquida (LC-MS/MS) e validado de acordo com a FDA, monitorou o perfil farmacocinético do OTSSP167 em camundongos por

24 horas após a ingestão oral na dose de 5 mg/kg. Após 1-2 horas da ingestão oral, a concentração máxima estava elevada e a meia-vida estava apropriada, sugerindo que o OTSSP167 é facilmente absorvido pelo intestino e não extensivamente metabolizado em camundongos. A meia-vida média de 2h45min e o volume aparente de distribuição de 635mL/kg mostraram que o OTSSP167 foi distribuído nos tecidos do corpo, o que pode ser atribuído à relativa estabilidade metabólica, às interações hidrofóbicas e de carga do OTSSP167, o que explica sua interação potencial com os fosfolípídios de carga negativa nos tecidos e, portanto, uma boa ligação (YONG et al., 2018). Assim como nos camundongos testados, a capacidade do OTSSP167 ser positivo para absorção intestinal em humanos apresenta alta probabilidade (99,1%) como mostra as análises *in silico* do servidor admetSAR.

No processo de distribuição de fármacos foi avaliado a glicoproteína-p, proveniente do gene *ABCBI*, é uma bomba de efluxo ATP-dependente que transporta fármacos e xenobióticos para a parte externa das células e geralmente é expressa em células do fígado, intestino, cérebro e placenta. A expressão diferenciada da glicoproteína-p indica seu papel de proteção e desintoxicação do organismo contra os xenobióticos, evitando o acúmulo de moléculas dentro das células (DEAN, HAMON e CHIMINI, 2001; RAPPOSELLI et al., 2012). O OTSSP167 apresentou papel dual, como substrato (71,14%) e inibidor (60,54%), com maior probabilidade de atuar como substrato da glicoproteína-p.

Na avaliação do metabolismo, o OTSSP167 mostrou promiscuidade de inibição das CYP, que são enzimas que desempenham um papel predominante no metabolismo de substâncias cancerígenas e medicamentos que atenuam o crescimento do câncer. Assim, inibidores das enzimas CYP podem potencialmente servir como agentes anticancerosos (WAHLANG et al., 2015). Entre as enzimas avaliadas, o OTSSP167 foi classificado como substrato da CYP 3A4 e como inibidor das CYP 2D6 e CYP 1A2. Acredita-se que a enzima CYP 3A4 esteja envolvida no metabolismo de aproximadamente metade dos medicamentos que são utilizados atualmente (MEUNIER, DE VISSER e SHAIK, 2004). Já em relação aos transportadores farmacocinéticos, o OTSSP167 apresentou atividade inibitória para OATP1B1 e OATP1B3. Esses transportadores são expressos na membrana basolateral do fígado e medeiam o influxo de compostos endógenos (hormônios e sais biliares) e também de drogas anticancerosas, alterando os parâmetros farmacocinéticos desses compostos (GIACOMINI et al., 2010). O transportador BSEP também é inibido pelo OTSSP167, ele é predominante na membrana canalicular do fígado, que é voltada para a bile, e atua como um transportador de efluxo, que transporta os compostos dos hepatócitos para a bile, para manter baixo o nível das

drogas nas células do fígado (STIEGER, 2010). A inibição do transportador BSEP pelo OTSSP167 pode estar correlacionado com a alta probabilidade de hepatotoxicidade (77,5%) calculada pelo servidor admetSAR.

Um experimento *in vivo* com xenoenxerto em camundongos mostrou que o crescimento do tumor foi significativamente suprimido no grupo tratado com OTSSP167 do modelo inoculado com células de câncer de pulmão A549 de maneira dependente da dose. Já o modelo inoculado com células de câncer de mama MDA-MB-231 o efeito de supressão do tumor não foi tão evidente. Os tecidos tumorais dos camundongos inoculados com células A549 foram coletados para análises de alterações celulares e moleculares ocasionadas pelo OTSSP167, e a coloração Hematoxilina-Eosina revelou necrose central maciça, mesmo em um período inicial após o tratamento (dia 4), e essas áreas necróticas tornaram-se maiores à medida que se aumentava a dose do OTSSP167 (2, 12 e 25mg/kg), sugerindo que inicialmente o composto induz alterações intratumorais precoces sem redução no volume do tumor. A administração de OTSSP167 foi bem tolerada no modelo xenoenxerto sem toxicidade significativa e perda de peso corporal (CHUNG et al., 2016). Nas análises *in silico*, o OTSSP167 foi classificado como categoria III para a toxicidade oral aguda, com probabilidade de 53,01%, logo possui valor de dose letal (DL₅₀) superior a 500 mg/kg e inferior a 5000 mg/kg. Quanto à toxicidade genômica o OTSSP167 não apresentou toxicidade pelo teste AMES e não foi classificado como carcinogênico. Porém, o OTSSP167 foi positivo para o ensaio de micronúcleo e inibição do gene *hERG*, que codifica proteínas que estão envolvidas na repolarização do potencial de ação cardíaca, cuja função reduzida do hERG pode aumentar os potenciais de ação ventricular e provocar arritmias (LAMOTHE et al., 2016). O servidor também mostrou que o OTSSP167 foi positivo para toxicidade em crustáceos e com maior probabilidade em peixes.

As análises *in silico* do servidor Molinspiration também conseguiram avaliar o perfil farmacodinâmico do OTSSP167, mostrando que o inibidor é ativo e possui maior escore de inibição para as cinases. Isso corrobora com os estudos de Chung e colaboradores (2012) que mostraram papel inibidor seletivo e efetivo de OTSSP167 na cinase MELK. Além disso, para verificar o mecanismo molecular deste inibidor, foi confirmado por espectrometria de massa, a identificação de novos substratos de MELK, os pontos DBNL (*drebrin-like*) e PSMA1 (*proteasome subunit alpha type 1*). Em seguida, foi realizado o ensaio de cinase *in vitro* com esses dois substratos para confirmar o efeito inibidor da fosforilação do composto. A adição do OTSSP167 no ensaio suprimiu significativamente os níveis de fosforilação de DBNL e

PSMA1, fortalecendo ainda mais o efeito inibitório deste composto na atividade da cinase MELK (CHUNG et al., 2012).

Tendo em vista a importância farmacológica do inibidor OTSSP167, no presente trabalho foi avaliada a atividade citotóxica do composto em linhagens de células de câncer gástrico, ACP03 e AGP01, que apresentaram valores de CI_{50} de 8,5 e 9,6nM respectivamente, considerados baixos quando comparados a outras linhagens descritas na literatura. Diversos trabalhos indicam a atividade citotóxica do OTSSP167 em diferentes linhagens de células. No estudo de Li e colaboradores (2016) que também utilizaram linhagem de câncer gástrico pouco diferenciado, a BGC823, e células de adenocarcinoma gástrico, a SGC7901, mostraram que o OTSSP167 suprimiu acentuadamente a proliferação dessas células de maneira dependente da dose, apresentando valor de CI_{50} 25nM para ambas as linhagens, sendo mais que dobro do valor encontrado em nosso experimento.

Estudos *in vitro* com 11 linhagens de células de neuroblastoma, classificou tais linhagens como tumorigênicas tipo N neuronal (SK-N-DZ, LA1-55n, SH-SY5Y, NMB, SK-N-BE2, LAN-5, SMS-KCNR e NBL-W-N) e não tumorigênicas tipo S aderentes ao substrato (LA1-5s, SHEP e NBL-W-S), sendo que as tumorigênicas apresentavam altos níveis de expressão da proteína MELK. O CI_{50} do OTSSP167 foi inferior a 9nM para todas as linhagens de células tumorigênicas do tipo N testadas. No entanto, as células do tipo S que apresentaram baixa expressão de MELK foram mais resistentes ao OTSSP167 com CI_{50} variando de 25 a 44nM. Logo, baixas concentrações de OTSSP167 inibiram a proliferação de células de neuroblastoma com alta expressão de MELK (CHLENSKI et al., 2019). Já os estudos com linhagens de câncer de pulmão de pequenas células (SBC3, DMS114, H446 e H82) tratadas com OTSSP167 nas concentrações de 10 e 20nM por 48 horas, detectaram que o inibidor também reduziu o nível de proteína MELK nessas linhagens (INOUE et al., 2016). Sabendo que a proteína MELK tem um papel importante no crescimento celular, realizamos Western blot em dois tempos (24 e 48 horas) com esta proteína. Os resultados mostram que de modo geral, houve uma diminuição da expressão de MELK na AGP01 após 24 horas de tratamento e em ambas as linhagens depois de 48 horas de tratamento com o OTSSP167. Houve uma pequena variação na expressão de MELK apenas na linhagem ACP03 após 24 horas de tratamento. No trabalho de Chlenski e colaboradores (2019) a linhagem tumorigênica de neuroblastoma NMB também apresentou uma variação na expressão de MELK após 24 horas de tratamento com OTSSP167.

MELK foi associado ao envolvimento linfonodal e metástase à distância, mostrando que a redução da expressão do gene *MELK* em câncer gástrico suprimiu a migração e a invasão *in vitro* e *in vivo* e alterou significativamente os marcadores da TEM (regulação positiva da E-caderina; regulação negativa da N-caderina, Vimentina e Snail) (LI et al., 2016). Du e colaboradores (2014) mostraram que células SGC7901 com alta expressão de MELK foram tratadas OTSSP167 (1 μ M), e em pouco tempo, entre 1 e 2 horas, observou-se além da redução da expressão da proteína, o inibidor também foi capaz de suprimir significativamente a migração e invasão celular na linhagem SGC7901. O mesmo resultado foi observado em células de leucemia mieloide aguda, THP-1, tratadas com 100nM de OTSSP167 por 6 horas, o que inibiu a migração dessas células em direção ao agente quimioatraente SDF-1 (Fator-1 derivado de célula estromal) (ALACHKAR et al., 2014). Nos nossos experimentos, foi observado que o OTSSP167 foi capaz de inibir a migração de células ACP03 tratadas por 12 e 24 horas com as concentrações 8,5nM e 17nM do composto, garantindo resultados significativos quando comparados ao controle negativo. Ainda no tempo de 12 horas, houve significância estatística quando o controle foi comparado com às células tratadas com 4,25nM do OTSSP167. Já no ensaio de invasão celular, nossos resultados não foram estatisticamente significantes.

6. CONCLUSÃO

Avaliar a seletividade e especificidade de um inibidor de cinase é um grande desafio para a pesquisa. Atualmente, vários estudos buscam geralmente determinar a distribuição dos compostos no organismo, monitorar o alvo específico deles e as interações moleculares. Nossos resultados fornecem informações *in silico* do OTSSP167 e do mecanismo de ação desse composto em linhagens gástricas que já possuem amplificação do gene *MELK*, concluindo que:

- De acordo com as características físico-químicas do OTSSP167, a maioria dos parâmetros analisados seguiram as regras de Lipinski e Veber, considerando o composto com bom transporte, difusão e absorção no organismo. Já na análise dos parâmetros de ADMET, o OTSSP167 apresentou maior probabilidade de absorção intestinal humana e apresentou hepatotoxicidade;
- Com relação ao perfil farmacodinâmico, o OTSSP167 apresentou o maior escore de atividade para a inibição de cinase;
- As células ACP03 são mais sensíveis ao tratamento com OTSSP167 em relação às células AGP01;
- OTSSP167 inibiu a expressão de MELK nas linhagens de adenocarcinoma gástrico, sendo mais eficaz no tratamento de 48 horas;
- OTSSP167 foi capaz de inibir a migração de células ACP03, mas não apresentou efeito na capacidade de invasão dessas células.

O presente estudo contribuiu para o conhecimento mais aprofundado do mecanismo de ação do OTSSP167 de forma a promover sua utilização futura na terapia do câncer. Além disso, é importante testar novos métodos para monitorar a ação do composto em outros meios, visto que ele pode apresentar outros alvos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALACHKAR, H. et al. Preclinical efficacy of maternal embryonic leucine-zipper kinase (MELK) inhibition in acute myeloid leukemia. **Oncotarget**, v. 5, n. 23, 2014.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6° ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

ALBINI, A.; IWAMOTO, Y.; KLEINMAN, H. K. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. **Cancer Research**, v. 47, n. 12, p. 3239–3245, 1987.

ALPER, O.; HACKER, N. F.; CHO-CHUNG, Y. S. Protein kinase A-Ialpha subunit-directed antisense inhibition of ovarian cancer cell growth: crosstalk with tyrosine kinase signaling pathway. **Oncogene**, v. 18, n. 35, p. 4999–5004, 1999.

AMER, M. H. Gene therapy for cancer: present status and future perspective. **Molecular and Cellular Therapies**, v. 2, n. 1, p. 27, 2014.

BADOUEL, C. et al. M-phase MELK activity is regulated by MPF and MAPK. **Cell Cycle**, v. 5, n. 8, p. 883–889, 2006.

BADOUEL, C. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase is stabilized in mitosis by phosphorylation and is partially degraded upon mitotic exit. **Experimental Cell Research**, v. 316, p. 2166–2173, 2010.

BEKE, L. et al. MELK-T1, a small-molecule inhibitor of protein kinase MELK, decreases DNA-damage tolerance in proliferating cancer cells. **Bioscience Reports**, v. 35, n. 6, p. e00267–e00267, 2015.

BENSIMON, A.; AEBERSOLD, R.; SHILOH, Y. Beyond ATM: the protein kinase landscape of the DNA damage response. **FEBS Lett.**, v. 585, p. 1625–1639, 2011.

BEULLENS, M. et al. Substrate specificity and activity regulation of protein kinase MELK. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 40003–40011, 2005.

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.

BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D.; ARNDT, V. Epidemiology of stomach cancer. **Methods in Molecular Biology**, p. 467–477, 2009.

BRESSMANN, T. **Self-inflicted cosmetic tongue split: A case report**. [s.l: s.n.]. v. 70

BRODNIEWICZ, T.; GRYNKIEWICZ, G. Mini Review Preclinical Drug Development. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 67, n. 6, p. 578–585, 2010.

BUFFART, T. E. et al. High resolution analysis of DNA copy-number aberrations of chromosomes 8, 13, and 20 in gastric cancers. **Virchows Archiv**, v. 455, n. 3, p. 213–223, 2009.

BURBANO, R. R. et al. C-MYC locus amplification as metastasis predictor in intestinal-type gastric adenocarcinomas: CGH study in Brazil. **Anticancer Research**, v. 26, n. 4 B, p. 2909–2914, 2006.

CALCAGNO, D. Q. et al. Identification of IL11RA and MELK amplification in gastric cancer by comprehensive genomic profiling of gastric cancer cell lines. **World Journal of Gastroenterology**, v. 22, n. 43, p. 9506–9514, 2016.

CERQUEIRA, N. M. F. S. A. et al. Receptor-based virtual screening protocol for drug discovery. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 582, n. June, p. 56–67, 2015.

CHAMBERS, A. F.; WERB, Z. Invasion and metastasis—recent advances and future challenges. **Journal of Molecular Medicine**, v. 93, n. 4, p. 361–368, 2015.

CHIEN, S. C. et al. Caenorhabditis elegans PIG-1/MELK acts in a conserved PAR-4/LKB1 polarity pathway to promote asymmetric neuroblast divisions. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 897–909, 2013.

CHLENSKI, A. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK), a potential therapeutic target for neuroblastoma. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 3, p. 507–516, 2019.

CHUNG, S. et al. Development of an orally-administrative MELK-targeting inhibitor that suppresses the growth of various types of human cancer ABSTRACT : **Oncotarget**, v. 3, n. 12, p. 1629–1640, 2012.

CHUNG, S. et al. Preclinical evaluation of biomarkers associated with antitumor activity of MELK inhibitor. **Oncotarget**, v. 7, n. 14, p. 18171–18182, 2016.

CHUNG, S.; NAKAMURA, Y. MELK inhibitor, novel molecular targeted therapeutics for human cancer stem cells. **Cell Cycle**, v. 12, n. 11, p. 1655–1656, 2013.

CLINICALTRIALS.GOV. **Clinical Trials**. Disponível em: <<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=&term=ots167&cntry1=&state1=%0A&recrs=>>>. Acesso em: 5 jun. 2019.

COLLINS, F. S. Reengineering Translational Science : **Sci Transl Med**, v. 3, n. 90, p. 1–6, 2011.

CORDES, S.; FRANK, C. A.; GARRIGA, G. The C. elegans MELK ortholog PIG-1 regulates cell size asymmetry and daughter cell fate in asymmetric neuroblast divisions. **Development**, v. 133, p. 2747–2756, 2006.

COWAN-JACOB, S. W.; MÖBITZ, H.; FABBRO, D. Structural biology contributions to tyrosine kinase drug discovery. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 2, p. 280–287, 2009.

CRESPO, A.; ZHANG, X.; FERNÁNDEZ, A. Redesigning kinase inhibitors to enhance specificity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 16, p. 4890–4898, 2008.

CROSS, T. G. et al. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p. 34–41, 2000.

DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood-Brain Barrier. **Cold Spring Harb Perspect Bio**, v. 7, p. 1–23, 2015.

DAVEZAC, N. et al. Human pEg3 kinase associates with and phosphorylates CDC25B

phosphatase: A potential role for pEg3 in cell cycle regulation. **Oncogene**, v. 21, n. 50, p. 7630–7641, 2002.

DAVIES, S. P. et al. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C and native bovine protein phosphatase-2Ac. **FEBS Lett.**, p. 421–425, 1995.

DE RUYCK, J. et al. Molecular docking as a popular tool in drug design, an in silico travel. **Advances and Applications in Bioinformatics and Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2016.

DEAN, M.; HAMON, Y.; CHIMINI, G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. **Journal of Lipid Research**, v. 42, n. 7, p. 1007–1017, 2001.

DJOUDER, N. et al. PKA phosphorylates and inactivates AMPKa to promote efficient lipolysis. **The EMBO Journal**, v. 29, p. 469–481, 2010.

DU, T. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase enhances gastric cancer progression via the FAK/Paxillin pathway. **Molecular Cancer**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2014.

FAVONI, R. E. et al. Preclinical studies identify novel targeted pharmacological strategies for treatment of human malignant pleural mesothelioma. **British Journal of Pharmacology**, v. 166, n. 2, p. 532–553, 2012.

FERGUSON, F. M.; GRAY, N. S. Kinase inhibitors: The road ahead. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, n. 5, p. 353–376, 2018.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **FDA**. Disponível em: < <https://www.fda.gov/>>. Acesso em: 21 Agost. 2019.

FORMAN, D.; BURLEY, V. J. Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. **Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology**, v. 20, n. 4, p. 633–649, 2006.

FRANCIA, R. et al. Pharmacological profile and Pharmacogenomics of anti-cancer drugs used for targeted therapy. **Current Cancer Drug Targets**, v. 18, n. 5, p. 499–511, 2018.

GANGULY, R. et al. MELK—a conserved kinase: functions, signaling, cancer, and controversy. **Clinical and Translational Medicine**, v. 4, n. 1, p. 11, 2015.

GÉRARD, C. et al. Cell Cycle Control by a Minimal Cdk Network. **PLoS Computational Biology**, v. 11, n. 2, p. 1–27, 2015.

GFELLER, D. et al. SwissTargetPrediction: A web server for target prediction of bioactive small molecules. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. W1, p. 32–38, 2014.

GHR. **Genetics Home Reference**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/chromosome/9#idiogram>>.

GIACOMINI, K. M. et al. Membrane transporters in drug development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 3, p. 215–236, 2010.

GIGEKEK, C. O. et al. Genetic variants in gastric cancer: Risks and clinical implications.

Experimental and Molecular Pathology, v. 103, n. 1, p. 101–111, 2017.

GIL, M. et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a novel protein serine/threonine kinase predominantly expressed in hematopoietic cells. **Gene**, v. 195, p. 295–301, 1997.

GOTINK, K. J.; VERHEUL, H. M. W. Anti-angiogenic tyrosine kinase inhibitors: what is their mechanism of action? **Angiogenesis**, v. 13, n. 1, p. 1–14, 2010.

GRAY, D. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase/ murine protein serine-threonine kinase 38 is a promising therapeutic target for multiple cancers. **Cancer Research**, v. 65, p. 9751–9761, 2005.

GU, C. et al. Tumor-specific activation of the C-JUN/MELK pathway regulates glioma stem cell growth in a p53-dependent manner. **Stem Cells**, v. 31, n. 5, p. 870–881, 2013.

GUO, B.; GODZIK, A.; REED, J. C. Bcl-G, a Novel Pro-apoptotic Member of the Bcl-2 Family. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 4, p. 2780–2785, 2001.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation Douglas. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARDIE, D. G. Molecular pathways: Is AMPK a friend or a foe in cancer? **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 17, p. 3836–3840, 2015.

HARDIE, D. G.; HAWLEY, S. A. AMP-activated protein kinase: The energy charge hypothesis revisited. **BioEssays**, v. 23, n. 12, p. 1112–1119, 2001.

HARDIE, D. G.; SCHAFFER, B. E.; BRUNET, A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs. **Trends in Cell Biology**, v. 26, n. 3, p. 190–201, 2016.

HASTINGS, P. J. et al. Mechanisms of change in gene copy number. **Nature Reviews Genetics**, v. 10, n. 8, p. 551–564, 2009.

HEYER, B. S. et al. New member of the snf1/ampk kinase family, melk, is expressed in the mouse egg and preimplantation embryo. **Molecular Reproduction and Development**, v. 47, p. 148–156, 1997.

HOCHEGGER, H.; TAKEDA, S.; HUNT, T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: Does one fit all? **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 11, p. 910–916, 2008.

HORMAN, S. et al. Insulin Antagonizes Ischemia-induced Thr172 Phosphorylation of AMP-activated Protein Kinase α -Subunits in Heart via Hierarchical Phosphorylation of Ser485/491. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, p. 5335–5340, 2005.

HUANG, H. T. et al. MELK is not necessary for the proliferation of basal-like breast cancer cells. **eLife**, v. 6, p. 1–29, 2017.

IARC. **International Agency for Research on Cancer**. Disponível em:

<https://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/wcr_2008_5.pdf>. Acesso em: 22 jul. 2018.

INCA. **Instituto Nacional do Câncer**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/>>. Acesso

em: 23 jul. 2018.

INOUE, H. et al. Effective growth-suppressive activity of maternal embryonic leucine-zipper kinase (MELK) inhibitor against small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 13621–13633, 2016.

IUPAC. **International Union of Pure and Applied Chemistry**. Disponível em: <<https://iupac.org/>>. Acesso em: 13 jun. 2019.

JAGER, S. et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 29, p. 12017–12022, 2007.

JI, W. et al. OTSSP167 Abrogates Mitotic Checkpoint through Inhibiting Multiple Mitotic Kinases. **PLoS one**, v. 11, n. 4, p. e0153518, 2016.

JIANG, P.; ZHANG, D. Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK): A novel regulator in cell cycle control, embryonic development, and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 21551–21560, 2013.

JOHNSON, C. N. et al. Fragment-based discovery of type i inhibitors of maternal embryonic leucine zipper kinase. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 25–30, 2015.

JOSEPHS, D. H. et al. Clinical pharmacokinetics of tyrosine kinase inhibitors: Implications for therapeutic drug monitoring. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 35, n. 5, p. 562–587, 2013.

JOSHI, K. et al. MELK-dependent FOXM1 phosphorylation is essential for proliferation of glioma stem cells. **Stem Cells**, v. 31, n. 6, p. 1051–1063, 2013.

JUNG, H.; SEONG, H.-A.; HA, H. Murine protein serine/threonine kinase 38 activates apoptosis signal-regulating kinase 1 via Thr838 phosphorylation. **Journal the Biology Chemistry**, v. 283, p. 34541–34553, 2008.

KANG, H. C. et al. Beyond the GIST: Mesenchymal Tumors of the Stomach. **RadioGraphics**, v. 33, n. 6, p. 1673–1690, 2013.

KANG, J. U. Chromosome 8q as the most frequent target for amplification in early gastric carcinoma. **Oncology Letters**, v. 7, n. 4, p. 1139–1143, 2014.

KEMP, B. E. et al. AMP-activated protein kinase, super metabolic regulator. **Biochemical Society Transactions**, v. 31, n. 1, p. 162–168, 2003.

KLEINMAN, H. K.; MARTIN, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. **Seminars in Cancer Biology**, v. 15, n. 5 SPEC. ISS., p. 378–386, 2005.

KOBAYASHI, H. et al. Cyclin a and cyclin B dissociate from p34cdc2 with half-times of 4 and 15 h, respectively, regardless of the phase of the cell cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 46, p. 29153–29160, 1994.

KRAMER, N. et al. In vitro cell migration and invasion assays. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 752, n. 1, p. 10–24, 2013.

KUNER, R. et al. The maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) is upregulated in high-grade prostate cancer. **Journal of Molecular Medicine**, v. 91, n. 2, p. 237–248, 2012.

KUNER, R. et al. The maternal embryonic leucine zipper kinase (melk) is upregulated in high-grade prostate cancer. **journal of Molecular Medicine**, v. 91, p. 237–248, 2013.

LAMOTHE, S. M. et al. The Human Ether-a-go-go-related Gene (hERG) potassium channel represents an unusual target for protease-mediated damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 39, p. 20387–20401, 2016.

LE PAGE, Y. et al. A functional analysis of MELK in cell division reveals a transition in the mode of cytokinesis during *Xenopus* development. **Journal of Cell Science**, v. 124, n. 6, p. 958–968, 2011.

LEAL, M. F. et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85–91, 2009.

LI et al. A Systematic Review of Recently Reported Marine Derived Natural Product Kinase Inhibitors. **Marine Drugs**, v. 17, n. 9, p. 493, 2019.

LI, G. et al. MELK as a potential target to control cell proliferation in triple-negative breast cancer MDA-MB-231 cells. **Oncology Letters**, v. 15, p. 9934-9940, 2018.

LI, S. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase serves as a poor prognosis marker and therapeutic target in gastric cancer. **Oncotarget**, v. 7, n. 5, p. 6266–80, 2016.

LIMA, L. M. Química medicinal moderna: Desafios e contribuição Brasileira. **Quimica Nova**, v. 30, n. 6, p. 1456–1468, 2007.

LIN, M. L. et al. Involvement of maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) in mammary carcinogenesis through interaction with Bcl-G, a pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. **Breast Cancer Research**, v. 9, p. R17, 2007.

LIPINSKI, C. A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 4–17, 1997.

LIPINSKI, C. A. Lead- and drug-like compounds: The rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337–341, 2004.

LIU, G. et al. Analysis of gene expression and chemoresistance of cd133+ cancer stem cells in glioblastoma. **Molecular Cancer**, v. 5, p. 67, 2006.

LIZCANO, J. M. et al. LKB1 is a master kinase that activates 13 kinases of the AMPK subfamily, including MARK/PAR-1. **EMBO Journal**, v. 23, n. 4, p. 833–843, 2004.

LODISH, H. et al. **Molecular cell biology**. 6° ed. [s.l.] W. H. Freeman and Company, 2008.

MANNING, G. et al. The protein kinase complement of the human genome. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1912–1934, 2002.

MARIE, S. K. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase transcript abundance correlates with malignancy grade in human astrocytomas. **Inst J Cancer**, v. 122, p. 807–815, 2008.

- MARSHALL, J. L. Maximum-tolerated dose, optimum biologic dose, or optimum clinical value: Dosing determination of cancer therapies. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 23, p. 2815–2816, 2012.
- MEUNIER, B.; DE VISSER, S. P.; SHAIK, S. Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9, p. 3947–3980, 2004.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NAGAR, B. c-Abl tyrosine kinase and inhibition by the cancer drug imatinib (Gleevec/STI-571). **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 6 Suppl 1, p. 1518S-1523S; discussion 1548S, 2007.
- NAKAMURA, S. et al. The FOXM1 transcriptional factor promotes the proliferation of leukemia cells through modulation of cell cycle progression in acute myeloid leukemia. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 11, p. 2012–2021, 2010.
- NAKANO, I. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase (MELK) regulates multipotent neural progenitor proliferation. **Cell Biology**, v. 170, n. 3, p. 413–427, 2005.
- NAKANO, I. ET AL. Maternal embryonic leucine zipper kinase is a key regulator of the proliferation of malignant brain tumors, including brain tumor stem cells. **Journal of neuroscience research**, v. 86, n. June 2007, p. 48–60, 2008.
- NARAYANA, N. et al. Crystal structure of the potent natural product inhibitor balanol in complex with the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. **Biochemistry**, v. 38, p. 2367–2376, 1999.
- NIETO, M. A. Epithelial plasticity: A common theme in embryonic and cancer cells. **Science**, v. 342, n. 6159, 2013.
- NURSE, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 71–78, 2000.
- OMS. **World Health Organization**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 21 jul. 2018.
- PERSIDIS, A. Cancer multidrug resistance. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 1, p. 94–95, 1999.
- PICKARD, M. R. et al. Dysregulated expression of Fau and MELK is associated with poor prognosis in breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 11, n. 4, p. 1–8, 2009.
- PULINILKUNNIL, T. et al. Adrenergic Regulation of AMP-activated Protein Kinase in Brown Adipose Tissue in Vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 8798–8809, 2011.
- QI, D.; YOUNG, L. H. AMPK: Energy sensor and survival mechanism in the ischemic heart. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 26, n. 8, p. 422–429, 2015.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic

function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors (Switzerland)**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 2012.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 8° ed. [s.l: s.n.].

RAPPOSELLI, S. et al. Development of classification models for identifying “true” P-glycoprotein (P-gp) inhibitors through inhibition, ATPase activation and monolayer efflux assays. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 6, p. 6924–6943, 2012.

RHODES, D. R. et al. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 25, p. 9309–9314, 2004.

SARVAS, H. R. R. et al. Impact of Precision Medicine on Efficiencies of Novel Drug Development in Cancer. **J Natl Cancer Ins**, 2019.

SEGALL, M. Advances in multiparameter optimization methods for de novo drug design. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 9, n. 7, p. 803–817, 2014.

SEONG, H.-A. et al. Phosphorylation of a novel zinc-finger-like protein, ZPR9, by murine protein serine/threonine kinase 38 (MPK38). **The Biochemical journal**, v. 361, n. Pt 3, p. 597–604, 2002.

SILVA, B. et al. Proteínas quinases: características estruturais e inibidores químicos. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 453–462, 2009.

SILVA, M. P. et al. Biomateriais e suas atividades sobre proteínas quinases : características químicas e funcionais Biomaterials and their activities on protein kinases : chemical and functional characteristics. p. 16–23, 2016.

STIEGER, B. Role of the bile salt export pump, BSEP, in acquired forms of cholestasis. **Drug Metabolism Reviews**, v. 42, n. 3, p. 437–445, 2010.

TAYLOR, S. S. et al. Assembly of allosteric macromolecular switches: lessons from PKA. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 13, n. 10, p. 646–658, 2012.

THOMAS-SCHOEMANN, A. et al. Drug interactions with solid tumour-targeted therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 89, n. 1, p. 179–196, 2014.

TOURÉ, B. B. et al. Toward the Validation of Maternal Embryonic Leucine Zipper Kinase: Discovery, Optimization of Highly Potent and Selective Inhibitors, and Preliminary Biology Insight. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 59, n. 10, p. 4711–4723, 2016.

VEBER, D. F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615–2623, 2002.

VEGA-AVILA, E.; PUGSLEY, M. K. An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 54, n. March 2014, p. 10–4, 2011.

VERMA, A. Lead finding from *Phyllanthus debelis* with hepatoprotective potentials. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 3 SUPPL., p. S1735–S1737, 2012.

VISVADER, J. E. Cells of origin in cancer. **Nature**, v. 469, n. 7330, p. 314–322, 2011.

VON MEHREN, M.; WIDMER, N. Correlations between imatinib pharmacokinetics, pharmacodynamics, adherence, and clinical response in advanced metastatic gastrointestinal stromal tumor (GIST): An emerging role for drug blood level testing? **Cancer Treatment Reviews**, v. 37, n. 4, p. 291–299, 2011.

VULSTEKE, V. et al. Inhibition of spliceosome assembly by the cell cycle-regulated protein kinase MELK and involvement of splicing factor NIPP1. **Journal the Biology Chemistry**, v. 279, p. 8642–8647, 2004.

WAHLANG, B. et al. **Role of Cytochrome P450 Monooxygenase in Carcinogen and Chemotherapeutic Drug Metabolism**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 74

WANG, J. et al. Maternal embryonic leucine zipper kinase: A novel biomarker and a potential therapeutic target of cervical cancer. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 11, p. 5665–5678, 2018.

WANG, J.; HOU, T. Advances in computationally modeling human oral bioavailability. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 86, p. 11–16, 2015.

WANG, Y. et al. MELK is an oncogenic kinase essential for mitotic progression in basal-like breast cancer cells. **eLife**, v. 2014, n. 3, p. 1–27, 2014.

WEIL, A. R. Precision medicine. **Health Affairs**, v. 37, n. 5, p. 687, 2018.

WEINBERG, R. A. **A biologia do câncer**. 1° ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WIDMER, N. et al. Review of therapeutic drug monitoring of anticancer drugs part two - Targeted therapies. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 12, p. 2020–2036, 2014.

YEUNG, K. T.; YANG, J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Molecular oncology**, v. 11, n. 1, p. 28–39, 2017.

YONG, W.-P. et al. Validation of a LC-MS/MS Method for Quantitative Analysis of MELK Inhibitor OTS167 in Mouse Serum: Application to a Pharmacokinetic Study. p. 1–25, 2018.

ZHANG, J.; YANG, P. L.; GRAY, N. S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. **Nature Reviews Cancer**, v. 9, n. 1, p. 28–39, 2009.

ZHAO, Y. H. et al. Rate-Limited Steps of Human Oral Absorption and QSAR Studies. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 10, p. 1446–1457, 2002.