



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

***SCREENING* DE PEQUENAS MOLÉCULAS POTENCIAIS
INIBIDORAS DA p38 δ MAPK COMO ESTRATÉGIA PARA A BUSCA
DE UM NOVO TRATAMENTO PARA CÂNCER DE MAMA**

Débora Bublitz Anton

Lajeado, setembro de 2020

Débora Bublitz Anton

**SCREENING DE PEQUENAS MOLÉCULAS POTENCIAIS
INIBIDORAS DA p38 δ MAPK COMO ESTRATÉGIA PARA A BUSCA
DE UM NOVO TRATAMENTO PARA CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari – Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Márcia Inês Goetttert

Coorientador: Dr. Luís Fernando Saraiva
Macedo Timmers

Lajeado, setembro de 2020

Débora Bublitz Anton

**SCREENING DE PEQUENAS MOLÉCULAS POTENCIAIS
INIBIDORAS DA p38 δ MAPK COMO ESTRATÉGIA PARA A BUSCA
DE UM NOVO TRATAMENTO PARA CÂNCER DE MAMA**

A Banca examinadora abaixo aprova a Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari - Univates, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na área de concentração Biotecnologia em Saúde.

Dr^a. Márcia Inês Goetttert - Orientadora
Universidade do Vale do Taquari - Univates

Dr. Luís Fernando Saraiva Macedo Timmers –
Coorientador
Universidade do Vale do Taquari - Univates

Dr. Ivan Cunha Bustamante Filho
Universidade do Vale do Taquari - Univates

Dr. Rodrigo Gay Ducati
Universidade do Vale do Taquari - Univates

Dr^a. Fernanda Bueno Morrone
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande
do Sul - PUCRS

Lajeado, 15 de setembro de 2020

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo suporte, carinho e incentivo. Sem vocês eu não seria quem eu sou hoje.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Márcia Inês Goettert pela oportunidade, confiança e ensinamentos durante esses anos do mestrado, mas principalmente por acreditar no meu potencial.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Luís Fernando Timmers por todos ensinamentos e auxílio com a parte de bioinformática. Com certeza essa colaboração enriqueceu esta pesquisa.

A todos os colegas do laboratório de Cultura de Células, pelos ensinamentos, trocas de ideias e ajuda com os experimentos que foram importantes para eu conduzir esta pesquisa.

Aos colegas de mestrado que eu tive a oportunidade de conhecer pela amizade, convívio e discussões durante as aulas e a todos professores pelos ensinamentos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa caminhada, o meu muito obrigada.

RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres e a principal causa de morte relacionada ao câncer nas mulheres do mundo todo. Os principais tratamentos para essa doença, como a quimioterapia, radioterapia e cirurgia, podem apresentar diversos efeitos colaterais e não serem eficazes em estágios avançados da doença quando existem altas chances de metástase. Pequenas moléculas que atuam em alvos específicos de vias de sinalização que podem estar desreguladas no câncer como, por exemplo, a via p38 MAPK, estão sendo estudadas para a terapêutica antineoplásica e são alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos mais seletivos. Visto que no câncer de mama o aumento da expressão da isoforma p38 δ está relacionado com progressão do tumor e metástases, e visando a carência de inibidores específicos de p38 δ , este estudo teve como primeiro objetivo identificar, por meio de um *screening* virtual, pequenas moléculas com potencial de inibir p38 δ . Posteriormente, o objetivo foi avaliar o potencial antitumoral da molécula selecionada na linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7. As estruturas 3D da p38 δ na sua forma ativa (DFG-in) e inativa (DFG-out) foram selecionadas do banco de dados PDB. Candidatos a ligantes foram selecionados após revisão na literatura e suas estruturas foram obtidas do banco de dados PubChem. O *screening* virtual indicou a Hipericina como a molécula de maior afinidade pela p38 δ ativa, sendo assim, um candidato a inibidor da enzima p38 δ . A viabilidade e proliferação de células MCF-7 foram determinadas após diferentes tratamentos com Hipericina por 24, 48 e 72 horas, através do ensaio de MTT e clonogênico, respectivamente. Entretanto, nesses ensaios a Hipericina não demonstrou ter atividade antitumoral na MCF-7. Visto que a Hipericina não apresentou a citotoxicidade esperada, a molécula PIT97 foi escolhida para ser estudada quanto ao seu potencial antitumoral *in vitro* e como uma possível molécula candidata ao tratamento do câncer de mama. As linhagens MCF-7 e de macrófagos murino RAW 264.7 foram tratadas com diferentes concentrações do PIT97 e a viabilidade celular foi avaliada após 48 e 72 horas, através do ensaio de MTT. A proliferação de células MCF-7 tratadas com PIT97 por 72 horas foi avaliada pelo ensaio clonogênico. Os resultados obtidos demonstraram redução da viabilidade da MCF-7 após o tratamento com o PIT97 por 48 e 72 horas, enquanto que na linhagem RAW 264.7 baixas concentrações da molécula (0,1 μ M e 0,01 μ M) não foram tóxicas. Além disso, foi demonstrado que o PIT97 não só atua a curto prazo na linhagem MCF-7, mas continua tendo efeitos citotóxicos a longo prazo. Desta forma, a molécula PIT97 possui potencial como molécula candidata e como alternativa terapêutica mais seletiva para o câncer de mama. Consequentemente, estudos serão realizados visando elucidar e compreender o mecanismo pelo qual a molécula exerce seu efeito.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer de mama. p38 δ MAPK. Pequenas moléculas. Hipericina

ABSTRACT

Breast cancer is the most frequent neoplasm among women and the leading cause of cancer-related death in women worldwide. Treatments for this disease, such as chemotherapy, radiotherapy, and surgery, can display several side effects. Moreover, these treatments may not be effective in advanced stages of the disease when there are high chances of metastasis. Small molecules that act on specific targets of unregulated signaling pathways in cancer, such as p38 MAPK pathway, are being studied for antineoplastic therapy and are promising targets of selective new drugs. Since in breast cancer the increase of p38 δ isoform expression is related to tumor progression and metastasis, and aiming the lack of specific p38 δ inhibitors, this study aimed to identify, through a virtual screening, small molecules with potential to inhibit p38 δ . Subsequently, the aim was evaluating the antitumor potential of the selected molecule in human breast adenocarcinoma MCF-7 cell line. p38 δ 3D structures of in its active (DFG-in) and inactive (DFG-out) form were selected from the PDB database. Ligands candidates were selected after a literature review and their structures were obtained from PubChem database. The virtual screening indicated Hypericin as the molecule with the highest affinity for active p38 δ , thus this molecule is a candidate for p38 δ inhibitor. Viability and proliferation of MCF-7 cells were determined after different treatments with Hypericin for 24, 48 and 72 hours, through the MTT and clonogenic assays, respectively. However, in these assays Hypericin not demonstrated antitumor activity in MCF-7. Since Hypericin did not present the expected cytotoxicity, the PIT97 molecule was chosen to be studied for its antitumor potential in vitro and as a possible candidate molecule for the treatment of breast cancer. MCF-7 and murine macrophages RAW 264.7 cell lines were treated with different concentrations of PIT97 and cell viability was evaluated after 48 and 72 hours, through MTT assay. Proliferation of MCF-7 cells treated with PIT97 for 72 hours was evaluated by the clonogenic assay. The results revealed a reduction in MCF-7 viability after treatment with PIT97 for 48 and 72 hours, while in RAW 264.7 low concentrations of the molecule (0.1 μ M and 0.01 μ M) were nontoxic. Furthermore, PIT97 not only acts in the short term in MCF-7 cell line, but also have long-term cytotoxic effects. Thus, PIT97 has potential as a candidate molecule, and as a more selective therapeutic alternative for breast cancer. Consequently, studies will be carried out in order to elucidate and understand the mechanism by which the molecule acts.

KEYWORDS: Breast cancer. p38 δ MAPK. Small molecules. Hypericin

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa da energia de ligação de cada ligante associado a proteína p38 δ DFG-out.....	44
Tabela 2 - Estimativa da energia de ligação de cada ligante associado a proteína p38 δ DFG-in.....	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Características do câncer.....	16
Figura 2. Etapas da carcinogênese.....	18
Figura 3. Distribuição dos casos e mortes para os cinco tipos de cânceres mais comuns em 2018 para ambos os sexos.	19
Figura 4. Esquema ilustrativo das vias de sinalização MAPKs.....	22
Figura 5. Mecanismo e funções da via de sinalização p38 MAPK.....	25
Figura 6. Papeis antagonistas da isoforma p38 δ nas células tumorais.....	28
Figura 7. Expressão da proteína p38 δ nos diferentes tipos de câncer.....	29
Figura 8. Representação das conformações que o motivo DFG pode adotar na proteína p38 δ : DFG-in e DFG-out.....	32
Figura 9. Estrutura da proteína p38 δ (MAPK13) e comparação com a sua estrutura na forma ativada (MAPK13/pTpY)	33

Figura 10. Representação das duas conformações que o motivo DFG pode adotar.....	34
Figura 11. Ligantes selecionados para o <i>screening</i> virtual.....	38
Figura 12. Esquema resumo da metodologia utilizada.....	39
Figura 13. Resultado do <i>docking</i> molecular da molécula Hipericina com a p38δ na conformação DFG-in.....	45
Figura 14. Representação 2D das interações entre a molécula Hipericina e p38δ (DFG-in.....	46
Figura 15. Inibição da atividade enzimática de p38δ pela Hipericina e por três inibidores conhecidos de outras proteínas quinases.....	47
Figura 16. Avaliação do potencial citotóxico da Hipericina em células MCF-7.....	48
Figura 17. Avaliação da proliferação celular das células MCF-7 tratadas com Hipericina por 72 horas.....	49
Figura 18. Avaliação da proliferação celular das células MCF-7 tratadas com Hipericina por 72 horas.....	49
Figura 19. Avaliação do potencial citotóxico da Hipericina em associação com o antioxidante N-Acetilcisteína em 72 horas de tratamento.....	50
Figura 20. Estrutura química da molécula PIT97.....	51
Figura 21. Avaliação do potencial citotóxico do PIT97 em 48 horas.....	52
Figura 22. Avaliação do potencial citotóxico do PIT97 em 72 horas	53
Figura 23. Avaliação da proliferação celular das células MCF-7 tratadas com PIT97 por 72 horas.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP - Adenosina trifosfato

DMEM – Meio *Eagle* modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

IC₅₀ - Concentração inibitória mínima

IL-6 - Interleucina 6

INCA - Instituto Nacional do Câncer

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*)

MKK – MAP quinase quinase

MTT - Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (do inglês *3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PDB – Banco de dados de proteína (do inglês *Protein Data Bank*)

RMSD - Desvio da raiz quadrada média (do inglês *Root Mean Square deviation*)

SBF - Soro bovino fetal

TNF- α - Fator de necrose tumoral α

WHO – Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Objetivos.....	13
1.1.1	Objetivo Geral	13
1.1.2	Objetivos específicos.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Câncer	15
2.2	Câncer de mama.....	19
2.3	Via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK).....	22
2.3.1	p38 MAPK.....	23
2.3.2	A isoforma p38 δ MAPK.....	26
2.4	Tratamentos para o câncer de mama.....	29
2.5	Estrutura das proteínas p38 MAPKs.....	30
2.6	Pequenas moléculas inibidoras de p38 MAPK.....	33
2.7	<i>Screening</i> virtual de pequenas moléculas para identificação de inibidores específicos de p38 δ	35
3	MATERIAIS E MÉTODOS	37
3.1	<i>Screening</i> virtual para identificação de pequenas moléculas inibidoras de p38 δ	37
3.2	Compostos e Reagentes	39
3.3	Linhagem celular e cultura de células.....	40
3.4	Análise de viabilidade celular – Ensaio MTT	40
3.5	Análise de proliferação celular – Ensaio Clonogênico	41
3.6	Análises estatísticas	42
4	RESULTADOS	43
4.1	Composto com potencial ação inibitória da p38 δ	43

4.2	Efeitos da Hipericina na viabilidade e proliferação da linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7	47
4.3	Avaliação da viabilidade de células MCF-7 tratadas com o antioxidante N-Acetilcisteína (NAC) e Hipericina.....	50
4.4	Composto com atividade antitumoral na linhagem MCF-7 e seu potencial de uso para o tratamento seletivo do câncer de mama	50
5	DISCUSSÃO.....	54
6	CONCLUSÃO	59
7	REFERÊNCIAS	61

1 INTRODUÇÃO

À medida que a população mundial e a expectativa de vida aumentam, o perfil de mortalidade e morbidade sofrem alterações. Enquanto que a ocorrência de doenças infecciosas diminui, a ocorrência de doenças crônicas, entre elas doenças cardiovasculares e câncer, tendem a aumentar conforme a população aumenta sua expectativa de vida (OMRAN, 2005). O câncer, doença caracterizada pelo crescimento anormal das células, pode ser considerado atualmente um dos maiores problemas de saúde para diversos países (SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016).

A mais recente estimativa mundial, promovida pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) da Organização Mundial da Saúde, aponta que em 2018 ocorreram no mundo 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes devido ao câncer (BRAY *et al.*, 2018). Entre eles, o câncer de mama é o câncer mais incidente na população feminina brasileira e mundial (BRAY *et al.*, 2018; INCA, 2019). Em 2018, foram estimados cerca de 2 milhões de novos casos de câncer de mama no mundo, sendo que no ano de 2025 esse número poderá chegar a 2,4 milhões de casos (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018). A estimativa para o Brasil, no biênio 2020-2022, aponta a ocorrência de 66 mil casos novos de câncer de mama por ano (INCA, 2019).

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento terem aumentado as chances de cura e mantido uma certa estabilidade nas taxas de mortalidade, ainda um número expressivo de mulheres morre devido ao câncer de mama (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2012). Em 2018, foi estimado, entre as mulheres do mundo todo, cerca de 626 mil mortes devido ao câncer de mama e estima-se que esse número chegará a cerca de 733 mil, em 2025 (BRAY *et al.*, 2018; FERLAY *et al.*, 2018). O elevado número de mortes devido a essa doença está relacionado principalmente com o diagnóstico tardio, sua reincidência e altas chances de metástase em estágios avançados do tumor (HUGHES *et al.*, 2015; SCHIAVON *et al.*, 2015). Além disso, os principais tratamentos utilizados no câncer de mama, entre eles a quimioterapia,

radioterapia e cirurgia, podem apresentar diversos efeitos colaterais e tendem a ser eficazes apenas sobre os tumores primários, sem efeitos sobre células tumorais em tecidos distantes e nas metástases (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010; STEEG; THEODORESCU, 2008). Desta maneira, é necessária a identificação de novos fármacos para o tratamento do câncer de mama que atuem de forma mais específica nas células tumorais, assim como impeçam a formação de metástases.

A via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos p38 (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) está relacionada a vários processos biológicos, tendo um papel importante na proliferação, desenvolvimento, inflamação, diferenciação e sobrevivência celular (ZHANG; LIU, 2002). Em câncer de mama, foi identificado que o aumento da expressão da isoforma p38 δ está relacionado com progressão e metástase do tumor (WADA *et al.*, 2017). Além disso, a expressão recombinante de p38 δ em células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 aumentou a produção de interleucina-6, a qual já foi associada com crescimento do tumor e metástase (DETHLEFSEN; HØJFELDT; HOJMAN, 2013; KITATANI *et al.*, 2009). Assim, p38 δ surgiu como um potencial alvo de moléculas mais seletivas para o tratamento do câncer de mama, as quais poderiam atuar tanto no tumor primário, quanto nas lesões metastáticas.

Visto que as terapias para o câncer de mama metastático são oferecidas apenas para melhorar os sintomas, retardar a progressão da doença, melhorar a qualidade de vida e prolongar a sobrevida (O'SHAUGHNESSY, 2005), é de extrema importância buscar novos agentes terapêuticos para o tratamento do câncer de mama que possam não só impedir a progressão da doença, mas também diminuir o número de lesões metastáticas e apresentar menos efeitos colaterais. Além disso, novos marcadores de prognóstico para identificar pacientes que possuem alto risco de desenvolver metástases são necessários para possibilitar que os tratamentos sejam individualizados para cada paciente. Nesse contexto, tem-se a proteína p38 δ , a qual pode não só servir como um possível alvo farmacológico do câncer de mama metastático, mas também pode ser estudada como um possível marcador de prognóstico da doença.

Na investigação de novas moléculas têm se investido muito em estudos com pequenas moléculas inibidoras de p38 MAPK (ABDELHAFEZ *et al.*, 2019; HALLER *et al.*, 2020; KARCHER; LAUFER, 2009; SHAHLAEI; DOOSTI, 2016), já que muitos tumores geralmente possuem alterações nessas vias de sinalização (KIM; CHOI, 2010; PLOTNIKOV

et al., 2011). Pequenas moléculas que possam agir de forma mais seletiva em alvos das vias de sinalização que levam ao câncer, ativando ou inativando proteínas com papel-chave, possuem potencial para serem utilizadas como fármacos no tratamento desta enfermidade (BAUDINO, 2015; KARCHER; LAUFER, 2009; MENG; HUANG, 2018; SANTARPIA; LIPPMAN; EL-NAGGAR, 2012). Dessa forma, pequenas moléculas inibidoras de p38 δ são candidatas ao tratamento do câncer de mama, porém poucos estudos foram realizados para investigar moléculas que sejam inibidoras seletivas da isoforma p38 δ .

Visando a carência de inibidores seletivos, este estudo foi realizado a fim de identificar, a partir de um *screening* virtual, pequenas moléculas que apresentassem alta afinidade com sítios ativos da isoforma p38 δ e que pudessem atuar como potenciais inibidores dessa proteína. Para propor um tratamento mais seletivo para o câncer de mama, pequenas moléculas foram testadas *in vitro* quanto ao seu potencial antitumoral na linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, sendo essas moléculas a Hipericina, selecionada pelo *screening* virtual, e o PIT97, que recentemente foi identificado como uma molécula candidata ao tratamento do câncer de mama (HEIDER *et al.*, 2019). A possibilidade de controlar a proliferação e morte celular pela inibição de uma proteína em específico oferece a oportunidade de utilizar terapias alvo no tratamento do câncer de mama, uma alternativa válida ao tratamento convencional.

Com esse estudo espera-se auxiliar na identificação e caracterização de uma nova molécula candidata a novo fármaco para o tratamento do câncer de mama, a qual possua menos efeitos colaterais indesejáveis por ser seletivo a um alvo específico. A busca por inibidores seletivos de p38 δ pode fornecer um ponto de partida para elucidar mecanismos relacionados a outras doenças as quais também possuem expressão elevada dessa proteína. Além disso, a avaliação *in vitro* do potencial antitumoral do PIT97 poderá auxiliar na futura caracterização de um novo fármaco para o tratamento do câncer de mama.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Identificar pequenas moléculas inibidoras de p38 δ MAPK por meio de um *screening* virtual e avaliar o potencial antitumoral da molécula de maior afinidade com a proteína em modelo celular *in vitro* de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, a fim de propor uma nova molécula candidata como tratamento mais seletivo para o câncer de mama.

1.1.2 Objetivos específicos

- i. Identificar pequenas moléculas inibidoras seletivas de p38 δ por meio de um *screening* virtual, utilizando o *docking* molecular;
- ii. Avaliar a viabilidade de células MCF-7 após o tratamento de 24 e 48 horas com diferentes concentrações da molécula selecionada (Hipericina), através do ensaio MTT;
- iii. Avaliar a proliferação de células MCF-7 após o tratamento com diferentes concentrações da molécula selecionada (Hipericina), através do ensaio clonogênico;
- iv. Avaliar a viabilidade e proliferação de células MCF-7 após o tratamento de 48 e 72 horas com a molécula PIT97, através do ensaio de MTT e clonogênico, respectivamente;
- v. Avaliar a viabilidade de células da linhagem de macrófagos murino RAW 264.7 após o tratamento de 48 e 72 horas com a molécula PIT97, através do ensaio de MTT, de forma a avaliar a citotoxicidade da molécula em uma linhagem não-tumoral.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Câncer

Câncer é o nome dado para um conjunto de doenças caracterizadas por alterações genéticas que levam ao crescimento das células de forma anormal e que podem se manifestar em quase todos tecidos do corpo humano. O aumento do número de casos de câncer está relacionado a vários fatores, entre eles, o crescimento demográfico, o envelhecimento da população e à evolução da frequência dos fatores de risco como tabagismo, obesidade, sedentarismo e alimentação desequilibrada (WHO, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), apesar dos avanços na prevenção, diagnóstico e tratamento do câncer, muitos países ainda não têm acesso a esses novos recursos. Em países com baixos ou médios índices de desenvolvimento humano (IDH), o câncer pode ser diagnosticado muito tarde, o tratamento é caro ou inacessível e serviços paliativos não estão disponíveis (WHO, 2020).

Embora cada câncer possa ter origens e evoluções diferentes, todos eles compartilham algumas características que são adquiridas pelas células tumorais. Essas características incluem: a capacidade de sustentar sinais de proliferação celular, ignorar os sinais inibitórios do crescimento, resistir a morte celular, replicar-se sem limites, induzir a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), invadir outros tecidos e promover metástases (FIGURA 1) (HANAHA; WEINBERG, 2000, 2011). Recentemente, foram atribuídas outras características para o câncer: capacidade de evitar destruição pelo sistema imune, promover inflamação, desregular o metabolismo energético de modo a estimular o crescimento e promover instabilidade do genoma, acumulando mutações que conferem vantagens adaptativas (FIGURA 1) (HANAHA; WEINBERG, 2011). Juntas, essas características auxiliam na criação do microambiente tumoral, o qual favorece a

sobrevivência, multiplicação e disseminação das células tumorais (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

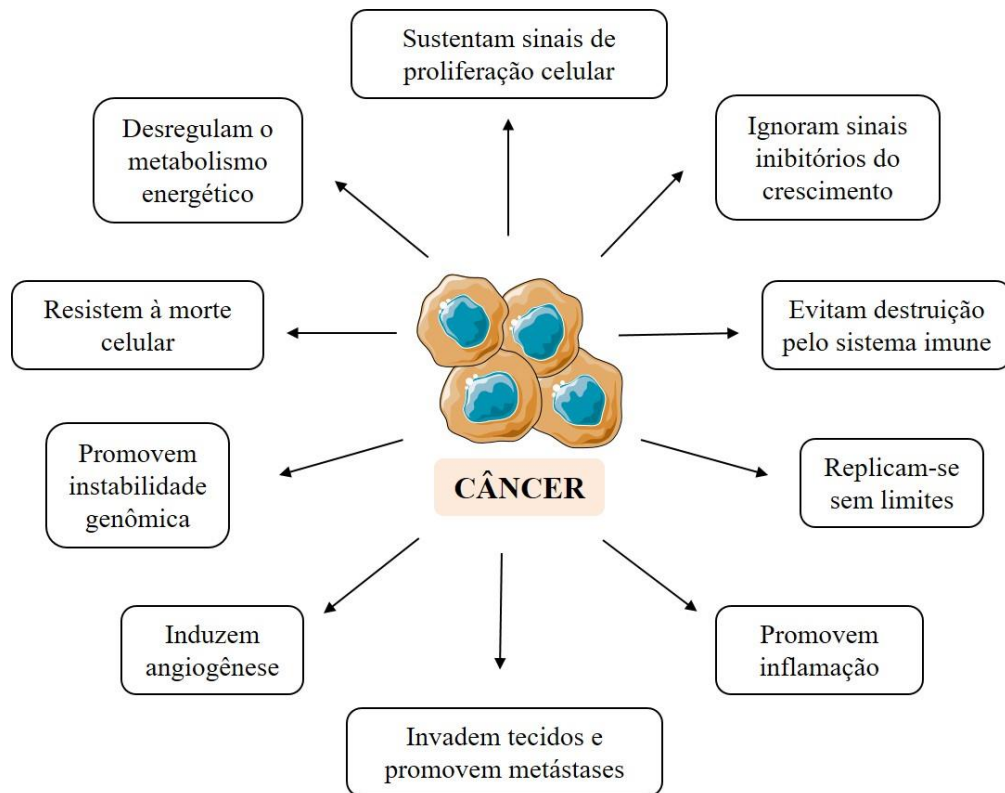


Figura 1. Características do câncer. Fonte: adaptado de HANAHAN; WEINBERG, 2011; *Servier Medical Art*, Creative Commons Attribution 3.0, disponível em <https://smart.servier.com>.

A divisão celular é um evento que ocorre a todo momento nas células de um organismo adulto normal. Embora existam diversos mecanismos que regulam cada fase da divisão celular, erros podem ocorrer durante o processo (BERTRAM, 2001; DIXON; KOPRAS, 2004). Quando danos ou lesões ao DNA ocorrem, rotas que regulam mecanismos de reparo do DNA são ativadas, de modo a prevenir a transmissão de cromossomos danificados ou incompletamente replicados para células filhas (BRANZEI; FOIANI, 2008). As células que passam pelo ponto de checagem podem: (1) retornar a progressão do ciclo celular após os danos serem reparados, (2) sofrerem parada permanente do ciclo celular ou (3) serem destinadas a apoptose, processo de morte celular programada que elimina células com lesões no DNA irreparáveis (SANCAR *et al.*, 2004). Qualquer defeito nesses mecanismos de reparo permitem a passagem de células mutadas pelo ciclo, o que por sua vez leva ao acúmulo de erros no DNA de células filhas, causando instabilidade genômica e aumentando o risco do surgimento do câncer (DIXON; KOPRAS, 2004; VERMEULEN; VAN BOCKSTAELE; BERNEMAN, 2003).

As alterações genéticas que levam à formação do tumor maligno são geralmente ocasionadas por mutações em genes específicos de uma célula, como os proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes reparadores de DNA ou em qualquer outro gene que controle diretamente ou indiretamente a proliferação celular (DIXON; KOPRAS, 2004; FOSTER, 2008; LEE; MULLER, 2010; WEINBERG, 1994). Os proto-oncogenes são genes normais que estimulam a proliferação celular, enquanto que suas formas mutadas e ativas são chamadas de oncogenes. Já os genes supressores de tumor são genes que mantêm a proliferação sob controle restringindo o crescimento celular, podendo estimular a morte celular para manter as células em equilíbrio (DIXON; KOPRAS, 2004; WEINBERG, 1994). Através da ativação da expressão de proto-oncogenes e inativação de genes supressores de tumores, as células tumorais conseguem modificar a expressão de diversos outros genes, alterando vias de sinalização que controlam os mecanismos de proliferação e/ou morte celular (ROY; SAIKIA, 2016).

O câncer pode ter origem em uma única célula que sofre uma mutação. Entretanto, é necessária uma série cumulativa de alterações genéticas para que ela se torne uma célula neoplásica (BERTRAM, 2001; WILLIAMS, 2001). O processo pelo qual uma célula normal se transforma em uma célula neoplásica é denominado carcinogênese. Esse processo ocorre em várias etapas até chegar ao tumor maligno, podendo ser dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão (FIGURA 2) (BERTRAM, 2001; GRISHAM; KAUFMANN; KAUFMAN, 1983; OLIVEIRA *et al.*, 2007). Na fase de iniciação ocorrem danos no DNA de uma célula normal, resultando em mutações que afetam os genes supressores de tumores, proto-oncogenes ou outros genes reguladores do crescimento (DIXON; KOPRAS, 2004; SANTELLA *et al.*, 2005). Caso os erros dessa célula não forem reparados, ele passará a ser permanente no momento em que a célula replicar o seu DNA e promover a divisão celular, dando origem a célula neoplásica (WILLIAMS, 2001). Entretanto, caso não seja estimulada a sofrer proliferação e caso não ocorram outras mutações oncogênicas para perturbar o equilíbrio celular, a célula neoplásica pode permanecer inofensiva (WILLIAMS, 2001).

Quando a célula neoplásica entra na fase de promoção, ocorre o estímulo à proliferação celular devido à desregulação de vias de sinalização que normalmente controlam esse processo. A expansão do número de células pode ocorrer tanto pelo aumento da proliferação celular, como pela redução da apoptose, resultando no surgimento do tumor (BERTRAM, 2001). Por último, na fase de progressão, a proliferação celular ocorre mesmo sem a presença de um estímulo, causando multiplicação descontrolada e irreversível das

células mutadas (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Essa última fase é caracterizada por diversas mudanças em características bioquímicas, metabólicas e morfológicas das células que não só causam instabilidade genética e rápido crescimento, mas também podem induzir a angiogênese, invasão de tecidos vizinhos e desenvolvimento de metástases em sítios distantes do tumor primário (OLIVEIRA *et al.*, 2007; VINCENT; GATENBY, 2008; WILLIAMS, 2001). As mudanças sucessivas nas características e comportamento das células neoplásicas dão origem a uma população de células cada vez mais malignas, levando a formação do câncer e evoluindo até o surgimento das manifestações clínicas.

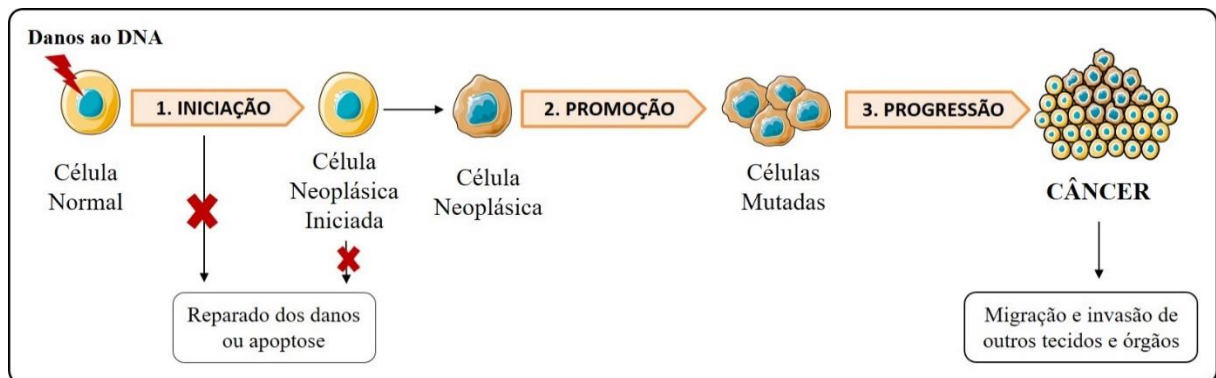


Figura 2. Etapas da carcinogênese. Fonte: da autora, 2020. Imagens Servier Medical Art, Creative Commons Attribution 3.0, disponível em <https://smart.servier.com>.

O câncer é atualmente um dos principais problemas de saúde pública no mundo. A estimativa mundial de 2018 aponta que ocorreram no mundo 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes devido ao câncer (FIGURA 3) (BRAY *et al.*, 2018). No Brasil estima-se para cada ano do triênio 2020-2022 a ocorrência de 625 mil casos novos de câncer, sendo o câncer de próstata o mais comum entre os homens (29,2%) e o câncer de mama (29,7%) entre as mulheres (exceto o câncer de pele não melanoma) (INCA, 2019). Esses dados demonstram o quanto o câncer é alarmante e motivo de preocupação a nível mundial. Além disso, reforçam não só a necessidade de ações para impedir que essa doença continue afetando tantos indivíduos, mas também de novas formas de tratamento que possam diminuir os índices de mortalidade.

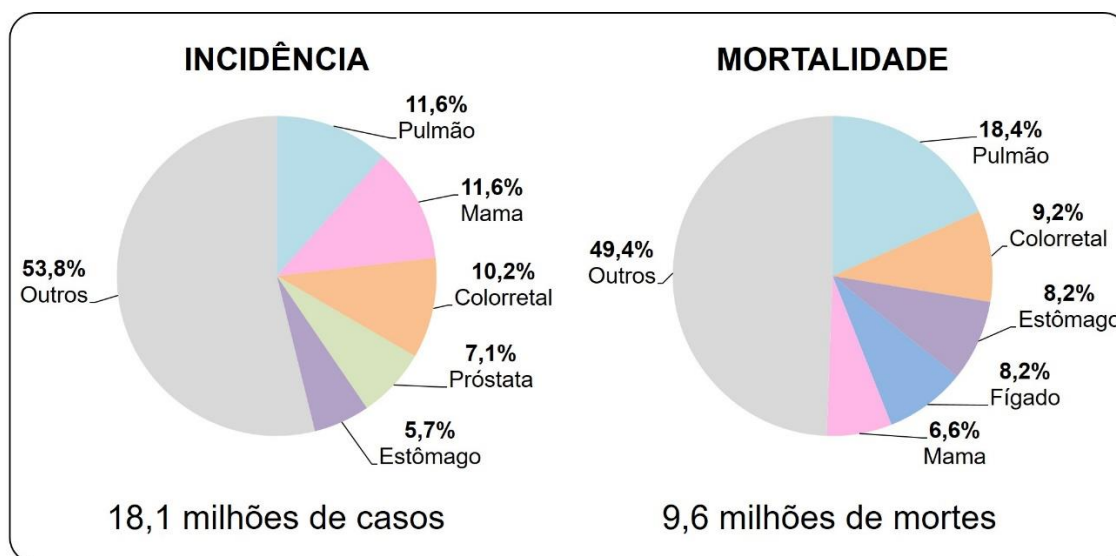


Figura 3. Distribuição dos casos e mortes para os cinco tipos de cânceres mais comuns em 2018 para ambos os sexos. Os valores representam a proporção do total do número de casos e mortes, em porcentagem. Foram estimados no total 18,1 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes por câncer. Câncer de pele não melanoma está incluído na categoria outros. Fonte: adaptado de FERLAY *et al.*, 2018.

2.2 Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença na qual células dos tecidos mamários se multiplicam de forma anormal, sendo que a maioria deles começa nos lóbulos (glândulas produtoras de leite) ou nos ductos que conectam os lóbulos ao mamilo (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019; BRAY *et al.*, 2018). Dentre os diversos tipos de neoplasias malignas, o câncer de mama se destaca entre as mulheres do mundo todo em virtude de suas altas taxas de incidência e mortalidade (BRAY *et al.*, 2018).

O rastreamento e diagnóstico precoce são importantes para o câncer de mama, visto que a detecção em estágios iniciais da doença aumenta as chances de o tratamento ser bem sucedido (DESANTIS *et al.*, 2019; MILLER *et al.*, 2019; SHAMSI; PIRAYESH ISLAMIAN, 2017). O diagnóstico precoce tem como objetivo identificar sinais e sintomas iniciais do câncer de mama, por meio da conscientização da população e de profissionais capacitados a avaliar casos suspeitos, enquanto o rastreamento é uma estratégia baseada na realização de testes como mamografia, ressonância magnética, ultrassom e autoexame das mamas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2015; WANG, 2017). A detecção precoce, aliada a um tratamento adequado, poderia reduzir a longo prazo as taxas de mortalidade por câncer de mama (WANG, 2017).

No momento do diagnóstico, o câncer de mama pode ser classificado em estágios que irão indicar o tamanho, a localização e a extensão do tumor. O primeiro estágio é 0, no qual o tumor é restrito a um local da mama (*in situ*). Esse é um estágio não invasivo do câncer de mama, que indica que as células tumorais estão presentes somente naquele local da mama onde as células se originaram e não há evidências de invasão dessas células em outros tecidos (AKRAM *et al.*, 2017). Após o estágio 0, os estágios variam de I a IV, sendo que quanto maior o estágio no momento do diagnóstico, mais avançada está a doença. Nos estágios I e II o câncer de mama está em estágios iniciais da doença (tumor invasivo em estágio inicial), enquanto no estágio III o tumor está localmente avançado, ou seja, as células tumorais já se espalharam para outros tecidos da mama (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010). No estágio IV, o estágio mais avançado da doença, o tumor já se encontra espalhado por outros órgãos no momento do diagnóstico, conhecido também por câncer de mama metastático (MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010).

A formação de metástases envolve uma série de etapas e se inicia durante a carcinogênese quando células tumorais perdem suas propriedades de aderência com outras células ou com constituintes da matriz extracelular e se desprendem do tumor primário (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2000). Essas células conseguem então migrar inicialmente para tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de vasos linfáticos ou sanguíneos, através dos quais se disseminam para órgãos distantes de onde o tumor se iniciou (CHAFFER; WEINBERG, 2011; HA; FARAJI; HUNTER, 2013; STEEG; THEODORESCU, 2008). Nos locais nos quais as células tumorais chegam, elas irão formar novas colônias de células malignas que, ao se proliferarem, darão origem às lesões metastáticas clinicamente detectáveis (GUPTA; MASSAGUÉ, 2006; LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017).

Devido à natureza complexa das metástases, terapias convencionais para tratamento do câncer em pacientes já com metástases não são muito eficazes (HA; FARAJI; HUNTER, 2013; WAN; PANTEL; KANG, 2013). Sabe-se que a taxa de sobrevivência entre as mulheres diagnosticadas com câncer de mama no estágio IV é muito menor do que a de mulheres diagnosticadas nos estágios I, II ou III (DESANTIS *et al.*, 2019; MILLER *et al.*, 2019). Entretanto, no momento do diagnóstico, poucas são as mulheres que logo de início apresentarão o câncer de mama em estágio IV (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019). No entanto, as metástases podem surgir após a recorrência de um tumor que inicialmente foi diagnosticado como tumor invasivo localizado. Quase 30% das mulheres diagnosticadas em

estágios iniciais do câncer de mama eventualmente desenvolverão a doença recorrente avançada ou doença metastática (O'SHAUGHNESSY, 2005; REDIG; MCALLISTER, 2013). Pacientes com o tumor localizado, as quais passam pelo procedimento de ressecção tumoral primária bem sucedida e terapia adjuvante, apresentam um risco elevado de desenvolver em algum momento da vida o câncer de mama metastático (KIMBUNG; LOMAN; HEDENFALK, 2015).

O elevado número de mortes por câncer de mama não está relacionada com o tumor primário, mas justamente com a reincidência e altas chances de metástase em estágios avançados do tumor, principalmente para os pulmões, cérebro, ossos e fígado (HUGHES *et al.*, 2015; SCHIAVON *et al.*, 2015; WEIGELT; PETERSE; VEER, 2005). As estratégias clínicas atuais são insuficientes na identificação precisa de pacientes com câncer de mama com alto risco de recorrência da doença e no tratamento da doença metastática (WEIGELT; PETERSE; VEER, 2005). Diante desses fatos, fica clara a necessidade de se estudar novas terapias oncológicas direcionadas às metástases de pacientes com câncer de mama em estágios avançados, de forma a prevenir ou reduzir a colonização das células tumorais em outros tecidos e órgãos e aumentar a sobrevida desses pacientes.

As pesquisas nas últimas décadas e os avanços na área da genética levaram à identificação de genes cujas mutações estão associadas a um risco aumentado de ocorrência de câncer de mama. Os mais conhecidos são os genes supressores de tumor BRCA1 e BRCA2; entretanto, sabe-se que muitos outros genes que participam de vias de sinalização que regulam o crescimento e morte celular podem estar envolvidos no processo de carcinogênese (KAMIŃSKA *et al.*, 2015; PAUL; PAUL, 2014; ROJAS; STUCKEY, 2016). Entre eles, têm-se os genes que expressam proteínas das vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*). A ativação excessiva do efeito de transdução de sinal Ras por mutações em oncogenes, por exemplo, pode ativar em sequência vias MAPK, como a via de proteínas quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2, do inglês *extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*), aumentando a proliferação e sobrevivências das células tumorais do câncer de mama (SAMADI *et al.*, 2018). As mutações em diversos genes resultam na desestabilização do genoma, comprometimento do controle da sinalização celular e interferem na interação normal das células nos tecidos.

2.3 Via de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK)

As vias de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK, do inglês *mitogen-activated protein kinase*) são responsáveis por converter os estímulos extracelulares como, por exemplo, fatores de crescimento, citocinas e estresses ambientais, em várias respostas celulares, por meio da fosforilação de diferentes substratos (KIM; CHOI, 2015). Existem múltiplas vias de sinalização de MAPKs nas células de mamíferos, evolutivamente conservadas em eucariotos, as quais respondem a diversos estímulos e desempenham papéis-chave em diversos processos celulares como diferenciação, proliferação, motilidade, sobrevivência e apoptose (CARGNELLO; ROUX, 2011; KOUL; PAL; KOUL, 2013; PLOTNIKOV *et al.*, 2011). Em células de mamíferos, três subfamílias de vias MAPKs já foram bem caracterizadas: cascata de proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), cascata de proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK) e cascata de proteínas p38 quinases (p38) (FIGURA 4) (ZHANG; LIU, 2002).

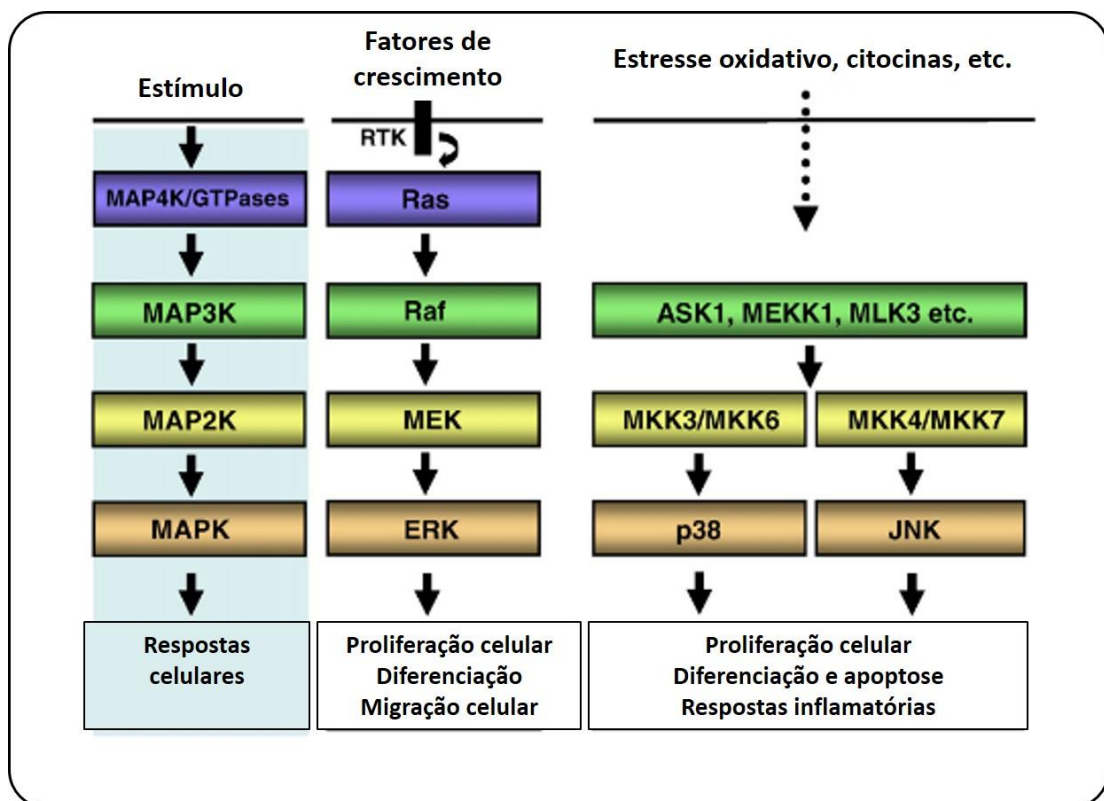


Figura 4. Esquema ilustrativo das vias de sinalização MAPKs. O esquema mostra as três subfamílias de MAPK: cascata de proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), cascata de proteína quinase c-Jun N-terminal (JNK) e cascata de proteínas p38 quinases (p38). As vias se iniciam com um estímulo externo que leva a fosforilação e ativação em sequência de diferentes proteínas quinases. Por último, ocorre a fosforilação de diversos substratos que levam à diferentes respostas celulares. Fonte: adaptado de KIM; CHOI, 2010.

As proteínas quinases que fazem parte das vias MAPKs são enzimas que fosforilam outras proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato do co-substrato ATP para os aminoácidos treonina, serina ou tirosina do substrato (SILVA *et al.*, 2009). O sinal nas vias MAPKs é transmitido pela fosforilação e ativação em sequência de três proteínas quinases denominadas quinase quinase MAPK (MAPKKK), quinase MAPK (MAPKK) e MAPK, sendo essa última a responsável pela fosforilação dos substratos que podem ser alvos citoplasmáticos ou nucleares (FIGURA 4) (KIM; CHOI, 2010). As mudanças induzidas pela fosforilação dos substratos pelas MAPKs são muito rápidas e permitem uma resposta celular imediata ao estímulo externo (KYRIAKIS; AVRUCH, 2012). A fosforilação e ativação de, por exemplo, fatores de transcrição pelas MAPKs, levam a regulação da expressão de outros genes e diferentes respostas biológicas (KAMINSKA, 2005).

As vias MAPKs são uma extensa rede regulatória de diferentes processos celulares. Devido a isso, mutações em algum componente dessas vias que modificam a funcionalidade e progressão da cascata acabam afetando o metabolismo celular e desequilibrando os sinais de crescimento celular (BRAICU *et al.*, 2019; KIM; CHOI, 2015). Diversas alterações em proteínas quinases já foram relatadas no câncer, assim como terapias alvo direcionadas a proteínas MAPK vêm sendo desenvolvidas (BRAICU *et al.*, 2019; MARTÍNEZ-LIMÓN *et al.*, 2020).

2.3.1 p38 MAPK

A via de sinalização de p38 MAPK é ativada por citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interleucina-1 β (IL-1 β), ou em resposta a estresses celulares como estresse oxidativo, osmóticos e hipóxico (CUADRADO; NEBRED, 2010; CUENDA; ROUSSEAU, 2007). O estímulo externo é transmitido para o meio intracelular por meio da ativação e fosforilação de proteínas MAPKKKs e em sequência MAPKKs que fosforilam e ativam p38 MAPK (FIGURA 5). A ativação de p38 depende da fosforilação dupla dos resíduos de treonina e tirosina no motivo Thr-Gly-Tyr (treonina-glicina-tirosina) da enzima, na região do *loop* de ativação, pelas proteínas MKK3 ou MKK6 (CARGNELLO; ROUX, 2011; CUADRADO; NEBRED, 2010). MKK4 também ativa p38, entretanto essa quinase não é exclusivamente um ativador de p38, pois também ativa a via de JNK (BRANCHO *et al.*, 2003).

Quatro isoformas de p38 MAPK já foram caracterizadas: p38 α (gene *MAPK14*), p38 β (gene *MAPK11*), p38 δ (gene *SAPK4*, proteína quinase ativada pelo estresse, ou *MAPK13*) e p38 γ (gene *SAPK3* ou *MAPK12*) (CUADRADO; NEBRED, 2010; CUENDA; SANZ-EZQUERRO, 2017). Cada uma delas é codificada por um gene, com diferenças nos substratos que fosforilam e nos tecidos em que estão presentes (KOUL; PAL; KOUL, 2013). Baseado na sequência de aminoácidos, diferentes padrões de expressão e sensibilidade a compostos inibidores, as isoformas de p38 podem ser separadas em dois subgrupos: p38 α e p38 β representem um subgrupo com 75% de similaridade entre suas sequências, enquanto p38 γ e p38 δ representam o outro subgrupo (com 62% e 61% de similaridade com p38 α , respectivamente) (KONDOH *et al.*, 2016; YURTSEVER *et al.*, 2015). A isoforma p38 α é abundantemente expressa em todos tecidos, enquanto p38 β é expressa em níveis menores comparados com p38 α e parece ter função redundante com p38 α (DEL BARCO BARRANTES *et al.*, 2011). Já as isoformas p38 γ e p38 δ possuem um padrão de expressão em tecidos específicos, como, por exemplo, p38 γ no músculo esquelético e p38 δ nas glândulas endócrinas (CORRE; PARIS; HUOT, 2017; CUADRADO; NEBRED, 2010; CUENDA; ROUSSEAU, 2007; RISCO; CUENDA, 2012).

A p38 quando ativada fosforila diferentes substratos presentes no núcleo ou no citoplasma, entre eles proteínas quinases, proteínas do citoesqueleto e fatores envolvidos na transcrição gênica, tradução e translação de proteínas (CORRE; PARIS; HUOT, 2017; CUADRADO; NEBRED, 2010; PLOTNIKOV *et al.*, 2011). Embora existam substratos comuns entre a família de p38, cada isoforma pode ter substratos específicos. As proteínas quinases ativadas MAPK 2 e 3 (MK2 e MK3) exemplificam substratos que são preferencialmente fosforilados por p38 α e p38 β , enquanto a proteína associada a microtúbulos Tau é um melhor substrato de p38 γ e p38 δ (CUENDA; ROUSSEAU, 2007; GOEDERT *et al.*, 1997a, 1997b). Os substratos específicos e os diferentes padrões de expressão sugerem que cada isoforma pode ter funções celulares específicas.

Devido ao envolvimento das p38 MAPKs em processos relacionados com a carcinogênese, como proliferação, resposta à inflamação, apoptose, angiogênese, invasão de

tecidos e metástases, elas vêm sendo estudadas como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos para terapias antineoplásicas (CHEN *et al.*, 2009; CORRE; PARIS; HUOT, 2017; CUENDA; ROUSSEAU, 2007; MARTÍNEZ-LIMÓN *et al.*, 2020; ZHANG; LIU, 2002). A p38 α é a isoforma mais bem caracterizada e foi por muito tempo o foco de pesquisas com a proposta de desenvolver pequenas moléculas inibidoras de p38 α . Entretanto, o silenciamento de p38 α *in vivo* resultou em mortes dos ratos na fase embrionária devido a defeitos morfológicos da placenta, enquanto o silenciamento de p38 β , p38 γ ou p38 δ resultou em ratos viáveis e sem defeitos de desenvolvimento (ADAMS *et al.*, 2000; ESCÓS *et al.*, 2016; MUDGETT *et al.*, 2000; REMY *et al.*, 2010; SUMARA *et al.*, 2009).

Visto que p38 γ e p38 δ possuem padrões de expressão específicos nos tecidos, funções celulares específicas e a ausência delas aparentemente não é fatal, essas duas isoformas se tornaram alvos mais viáveis de compostos inibidores. Entretanto, ainda não foram caracterizados inibidores específicos de p38 δ ou p38 γ e atualmente existe uma carência por esse tipo de molécula.

2.3.2 A isoforma p38 δ MAPK

Em resposta a estresses celulares e citocinas inflamatórias, a p38 δ é ativada por meio da dupla fosforilação dos resíduos treonina (Thr180) e tirosina (Tyr182) pelas quinases MKK6 e MKK3 (ALONSO *et al.*, 2000; CUENDA; ROUSSEAU, 2007; WANG *et al.*, 1997). Ao contrário da p38 α , p38 δ tem diferentes padrões de expressão de acordo com o tecido e, conseqüentemente, tem efeitos biológicos específicos. Níveis variáveis da expressão de p38 δ foram detectados nos tecidos glandulares endócrinos, pâncreas, esôfago, estômago, cólon, intestino delgado, pele, pulmão, mama e testículo (ESCÓS *et al.*, 2016; GOEDERT *et al.*, 1997a; O'CALLAGHAN; FANNING; BARRY, 2014; WANG *et al.*, 1997).

A isoforma p38 δ apresenta papéis importantes na regulação de processos celulares, entre eles resposta ao estresse, produção de citocinas, proliferação, migração e diferenciação (ALEVY *et al.*, 2012; CUENDA; SANZ-EZQUERRO, 2017; ESCÓS *et al.*, 2016; RISCO *et al.*, 2012). Já foi relatado que p38 δ desempenha papéis-chave em algumas doenças humanas, entre elas doenças neurodegenerativas como o Alzheimer (FEIJOO *et al.*, 2005), diabetes (SUMARA *et al.*, 2009), doenças inflamatórias (ALEVY *et al.*, 2012; CRIADO *et al.*, 2014; JOHANSEN *et al.*, 2005; RISCO *et al.*, 2012) e câncer (DEL REINO *et al.*, 2014;

JUNTILA *et al.*, 2007; KISS *et al.*, 2019; SAHU *et al.*, 2019; TAN *et al.*, 2010; WADA *et al.*, 2017). Devido a esses papéis, p38 δ emergiu como um potencial alvo de drogas para o tratamento das doenças nas quais exerce atividade.

A p38 δ também desempenha papéis-chave em eventos biológicos relacionados com o câncer, como proliferação celular, apoptose, migração e invasão de células tumorais (CUENDA; SANZ-EZQUERRO, 2017; RISCO; CUENDA, 2012). Entretanto, assim como a p38 α , p38 δ apresenta papéis antagonistas nas células que variam conforme o câncer e tipo celular em que se encontra (O'CALLAGHAN; FANNING; BARRY, 2014). Em carcinoma de células escamosas do esôfago (OESCC, do inglês *oesophageal squamous cell carcinoma*), por exemplo, possui função de supressor de tumor, pois a perda de expressão de p38 δ promove a proliferação, migração e crescimento das células tumorais (FIGURA 6) (O'CALLAGHAN *et al.*, 2013; O'CALLAGHAN; FANNING; BARRY, 2015). Além disso, células de OESCC que expressam p38 δ são mais sensíveis a uma combinação de quimioterapia do que células deficientes em p38 δ (O'CALLAGHAN; FANNING; BARRY, 2015). O papel de supressor de tumor de p38 δ já foi evidenciado também no melanoma (GAO *et al.*, 2013) e glioma (LIU *et al.*, 2015).

No entanto, p38 δ pode atuar também como promotor de tumor, pois o aumento da expressão e ativação de p38 δ foi relatado em células de vários tipos de câncer, incluindo o câncer de células escamosas de cabeça e pescoço (JUNTILA *et al.*, 2007; SAHU *et al.*, 2019), câncer de pele (KISS *et al.*, 2019; SCHINDLER *et al.*, 2009; ZUR *et al.*, 2015), mesotelioma pleural maligno (ZHONG *et al.*, 2011), câncer de cólon (DEL REINO *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2010), células-tronco de câncer ginecológico (YASUDA *et al.*, 2016), câncer de mama (WADA *et al.*, 2017) e hepatocarcinoma (YU *et al.*, 2019). Nesses casos, p38 δ pode promover a proliferação celular, a migração e invasão das células tumorais; induzir a expressão de metaloproteinases, as quais estão associadas com aumento da agressividade do tumor; promover a formação de metástases e ativar vias de sinalização de condições inflamatórias crônicas (FIGURA 6) (DEL REINO *et al.*, 2014; JUNTILA *et al.*, 2007; TAN *et al.*, 2010; WADA *et al.*, 2017; ZHONG *et al.*, 2011).

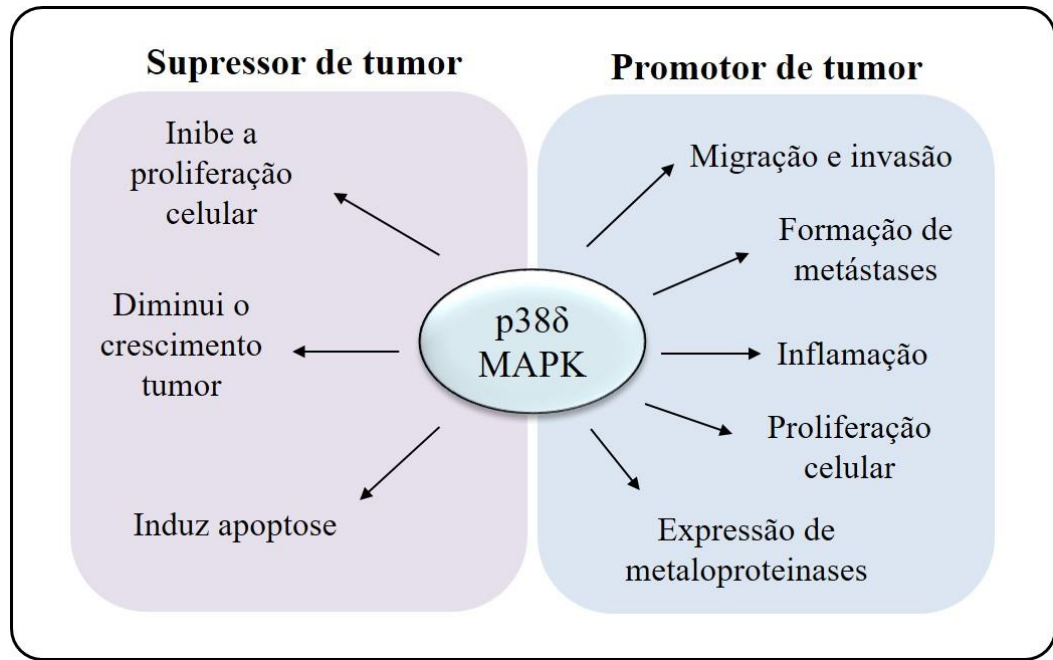


Figura 6. Papéis antagonistas da isoforma p38δ nas células tumorais. Fonte: da autora, 2020.

A p38δ parece estar relacionada também com a progressão, invasão e metástase do câncer de mama. A expressão recombinante dessa proteína em células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 aumentou a produção de interleucina-6, uma citocina que já foi associada com crescimento do tumor e metástase (DETHLEFSEN; HØJFELDT; HOJMAN, 2013; KITATANI *et al.*, 2009). Já a deleção de p38δ *in vivo* resultou na inibição do crescimento do tumor da mama e diminuiu o número de lesões metastáticas no pulmão, enquanto que a deleção de p38δ nas células das linhagens de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB-231 resultou, em ambas as linhagens, diminuição da proliferação celular (WADA *et al.*, 2017).

A Figura 7 mostra o padrão da expressão proteica de p38δ em diversos tipos de câncer, entre eles o câncer de mama. Todos os pacientes com câncer de mama analisados apresentavam expressão de p38δ. Além disso, os dados na base de dados *The Cancer Genome Atlas* mostram que não existem diferenças do RNAm de p38α entre tecidos normais e os de câncer de mama, enquanto que o RNAm de p38δ é significativamente aumentado em todos os tipos de câncer de mama listados na base de dados, em comparação com tecidos de mama normal (WADA *et al.*, 2017). Análises de RNAm de 37 amostras de câncer de mama humano também mostraram alta expressão de p38α e p38δ, assim como nas linhagens de células de câncer de mama analisadas (CHEN *et al.*, 2009).

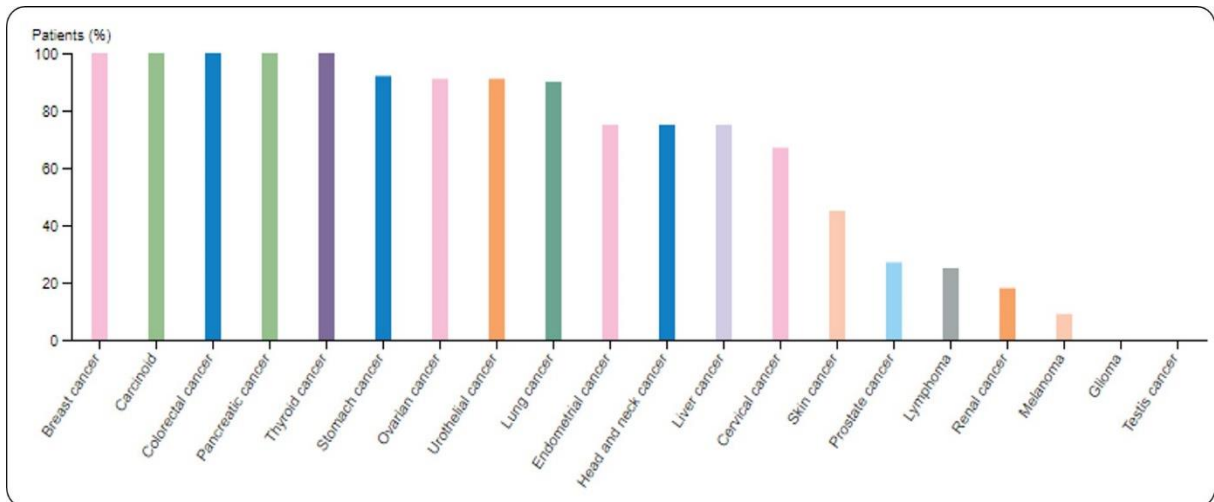


Figura 7. Expressão da proteína p38δ nos diferentes tipos de câncer. Em todos pacientes avaliados com câncer de mama existia expressão de p38δ. Fonte: *The Human Protein Atlas v18.1*, disponível em proteineatlas.org.

Dada a importância do papel da proteína p38δ no ambiente tumoral, na progressão tumoral e formação de metástases, e visto seu padrão de expressão restrito a alguns tecidos, novas estratégias visando à sua inibição oferecem avanços para o tratamento do câncer de mama. Inibindo a atividade de p38δ no câncer de mama pode-se esperar uma inibição da progressão tumoral e do número de lesões metastáticas. Dessa forma, terapias direcionadas a p38δ com o uso de pequenas moléculas inibidoras de p38δ são propostas para o tratamento do câncer de mama metastático.

2.4 Tratamentos para o câncer de mama

O tratamento para o câncer de mama varia conforme o estágio em que a doença se apresenta, as características do tumor e condições do paciente. O objetivo, principalmente em estágios mais avançados quando há possibilidade de metástases, é aumentar o tempo de vida e melhorar a qualidade de vida do paciente. A quimioterapia e terapia hormonal, tratamentos considerados sistêmicos, são utilizados geralmente em estágios iniciais da doença ou após um tratamento local para reduzir as chances de recorrência. A cirurgia e radioterapia, por sua vez, são consideradas terapias locais que geralmente são realizadas quando o tumor ainda não sofreu metástase (HARLES; HAPIRO, 2001; MAUGHAN; LUTTERBIE; HAM, 2010). O tratamento pode também ser realizado com a associação de terapias locais e sistêmicas para maximizar os benefícios e minimizar os riscos de recorrência.

O tratamento mais comum para estágios iniciais do câncer de mama (estágio I ou II) é a cirurgia conservadora da mama com radioterapia adjuvante (49%), seguido da mastectomia (34%) (DESANTIS *et al.*, 2019; MILLER *et al.*, 2019). Pacientes em estágio III da doença geralmente passam por mastectomia (68%) e a maioria ainda recebe quimioterapia adjuvante (MILLER *et al.*, 2019). As mulheres diagnosticadas com o câncer de mama metastático (estágio IV) recebem frequentemente o tratamento com a intenção paliativa, como radiação e quimioterapia sozinhas, ou não recebem nenhum tratamento, visto que nesse estágio avançado da doença as chances de cura são baixas (DESANTIS *et al.*, 2019). Os medicamentos usados na quimioterapia do câncer de mama metastático incluem antraciclinas, taxanos e 5-fluorouracil como primeira, segunda e terceira linhas de terapia, respectivamente (NICOLINI *et al.*, 2006; SCULLY *et al.*, 2012).

O problema dos tratamentos existentes é que eles podem apresentar diversos efeitos colaterais devido a sua agressividade ao organismo. Por exemplo, os fármacos utilizados no tratamento hormonal, entre eles Tamoxifeno, Toremifeno e Fulvestranto, são antiestrógenos que estão associados a uma série de reações indesejáveis, entre elas eventos tromboembólicos, sangramento vaginal e alterações na parede do útero, com aumento da incidência de tumor endometrial, além da resistência após muito tempo de uso (ARIAZI; CRAIG JORDAN, 2008). Já a quimioterapia, possui diversas limitações e toxicidade alta. Os medicamentos quimioterápicos afetam, por diferentes mecanismos de ação, a proliferação das células. Devido à grande semelhança entre células normais e tumorais, a terapia acaba atuando de forma não-específica, podendo ser tóxica também para as células normais do indivíduo (DE ALMEIDA *et al.*, 2005; PALMER *et al.*, 1980). Isso explica a necessidade de se encontrar alvos de ação seletivos para os tratamentos, com os quais apenas células tumorais sejam danificadas. Entre os possíveis alvos farmacológicos para o tratamento do câncer de mama, tem-se a p38 δ MAPK, a qual poderia não só impedir o crescimento do tumor primário, mas também impedir a progressão da doença para um estágio avançado.

2.5 Estrutura das proteínas p38 MAPKs

Para o desenvolvimento de novos fármacos direcionados à p38 δ é necessário conhecer a estrutura da enzima, bem como o seu sítio ativo. A estrutura proteica de todas as isoformas de p38, assim como de todas as proteínas quinases, é dividida em dois subdomínios: o N-terminal

(N-*lobe*), que possui cinco fitas de folhas β e uma longa hélice α (α C-helix) e o C-terminal (C-*lobe*), que é composto de seis α -hélices (MODI; DUNBRACK, 2019; UNG; SCHLESSINGER, 2015). Entre esses dois subdomínios forma-se o domínio catalítico, uma fenda na qual está presente o sítio de ligação do ATP (UNG; SCHLESSINGER, 2015). Além disso, os dois subdomínios são conectados por uma região flexível chamada de *hinge*, a qual permite o movimento do N- e C-terminal, facilitando a ligação do ATP (MODI; DUNBRACK, 2019; THURMOND *et al.*, 2001; TONG; SEELIGER, 2015).

Outro domínio importante da estrutura de p38 é o loop de ativação, no qual estão presentes os aminoácidos treonina e tirosina (motivo TGY) (REMY *et al.*, 2010). Quando ocorre a fosforilação desses dois resíduos nas estruturas de p38 pelas MKKs, o loop de ativação é estabilizado em uma conformação aberta e a enzima é ativada (CARGNELLO; ROUX, 2011; HUSE; KURIYAN, 2002). A dupla fosforilação também reorienta os domínios C- e N-terminal para que aumente a afinidade pelo ATP (SCHINDLER *et al.*, 2000; TONG; SEELIGER, 2015).

No C-terminal está presente o motivo conservado Asp168-Phe169-Gly170 (motivo DFG) que faz parte do sítio de ligação do ATP (KUMAR *et al.*, 2018; UNG; SCHLESSINGER, 2015). De acordo com a posição do motivo DFG, as proteínas quinases, inclusive p38 δ , podem assumir duas conformações bem características: DFG-in e DFG-out, as quais determinam o estado ativo ou inativo da enzima, respectivamente (UNG; SCHLESSINGER, 2015). As proteínas quinases na sua forma ativa, ou DFG-in, assumem uma conformação na qual o resíduo de fenilalanina (Phe) do motivo DFG está dentro de um sítio hidrofóbico entre os dois subdomínios da enzima, o que forma uma fenda na qual o substrato consegue se ligar (MODI; DUNBRACK, 2019; ZUCCOTTO *et al.*, 2010). Já o resíduo aspartato (Asp), do motivo DFG, na conformação ativa está presente no início do loop de ativação, de onde ele consegue coordenar a ligação do íon magnésio que interage com o átomo de oxigênio do fosfato β do ATP, facilitando a ligação do ATP (MODI; DUNBRACK, 2019; TONG; SEELIGER, 2015).

Na forma inativa das proteínas quinases, ou DFG-out, o resíduo Asp do motivo DFG sofre um giro e o resíduo Phe não está no sítio hidrofóbico no qual estava na conformação ativa (UNG; SCHLESSINGER, 2015). Esses movimentos dos resíduos do motivo DFG induzem mudanças conformacionais do loop de ativação, obstruindo parte do sítio de ligação e expondo o sítio hidrofóbico no qual o Phe se localizava (PARGELLIS *et al.*, 2002; YU *et*

al., 2019). Dessa forma, o sítio antes ocupado pelo motivo DFG, torna-se acessível para ser explorado por moléculas inibidoras da enzima (UNG; SCHLESSINGER, 2015). A posição do motivo DFG nessa conformação é geralmente incompatível com a ligação do ATP e, portanto, é conhecida como uma conformação inativa (PARGELLIS *et al.*, 2002). Na Figura 8, a diferença da posição do resíduo Phe do motivo DFG entre as estruturas de p38 δ DFG-in e DFG-out está mostrada.

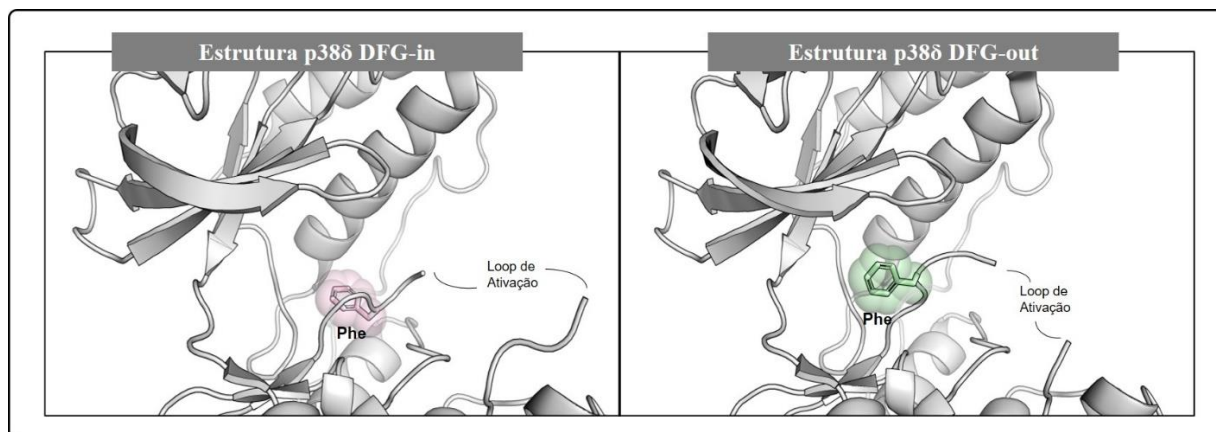


Figura 8. Representação das conformações que o motivo DFG pode adotar na proteína p38 δ : DFG-in e DFG-out. p38 δ DFG-in (PDB ID 4EYM); p38 δ DFG-out (PDB ID 4EYJ). Fonte: da autora, 2020.

Um elemento estrutural importante das proteínas quinases que acaba contribuindo na seletividade de inibidores é o resíduo *gatekeeper*. Esse resíduo está presente no sítio de ligação do ATP, em uma região que não é ocupada pelo ATP, e pode ser explorada por compostos inibidores (ROMANO; DE BEER; SCHWEDE, 2017). O tamanho e a forma dessa região são controlados pelo tamanho da cadeia lateral do resíduo *gatekeeper*, pois resíduos de cadeia lateral pequena aumentam a região a ser explorada, enquanto resíduos de cadeia lateral longa ocupam mais espaço e tornam essa região inacessível a ligantes (ZUCCOTTO *et al.*, 2010). As isoformas p38 α e p38 β possuem uma treonina (Thr) no resíduo *gatekeeper* (cadeia lateral pequena). Já as isoformas p38 γ e p38 δ possuem uma metionina (Met) como resíduo *gatekeeper* (cadeia lateral longa), a qual diminui a região que pode ser explorada por ligantes (ZUCCOTTO *et al.*, 2010). Já foi demonstrado que mutações pontuais no resíduo *gatekeeper* de p38 α , substituindo Thr por Met, influenciam diretamente na seletividade do composto SB203580, conhecido por inibir somente p38 α e p38 β (KONDOH *et al.*, 2016). Apenas a substituição do resíduo *gatekeeper* de p38 α por um aminoácido de cadeia longa torna essa isoforma insensível ao composto SB203580 (KONDOH *et al.*, 2016).

Em relação à estrutura cristalográfica específica da proteína p38 δ , foi demonstrado que tanto na forma ativa, quanto na forma inativa, essa isoforma apresenta a estrutura conservada de todas as proteínas quinases (FIGURA 9) (YURTSEVER *et al.*, 2015). Estudos mostraram também que existem algumas diferenças entre p38 δ e p38 α na região de ligação do ATP (na região *hinge*), relacionadas à ativação da proteína. Na p38 α ativa, ocorre um rearranjo conformacional para permitir a ligação do ATP, enquanto que na p38 δ não ocorre grandes alterações na cadeia entre a forma ativa e inativa (YURTSEVER *et al.*, 2015, 2016).

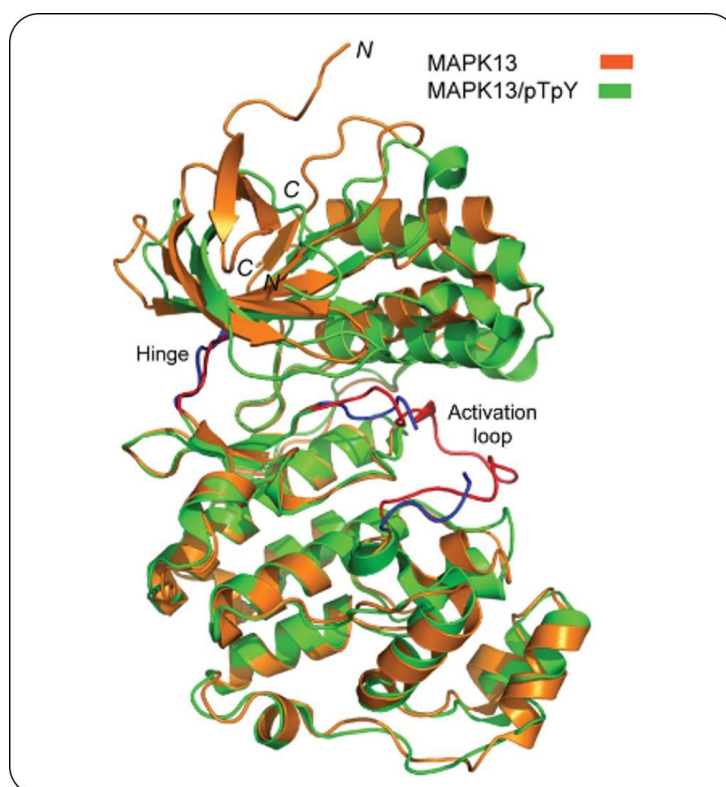


Figura 9. Estrutura da proteína p38 δ (MAPK13) e comparação com a sua estrutura na forma ativada (MAPK13/pTpY). Superposição de MAPK13/pTpY (verde com o loop de ativação e região hinge em vermelho) e MAPK13 (laranja com o loop de ativação e região hinge em azul). Fonte: adaptado de YURTSEVER *et al.*, 2015.

2.6 Pequenas moléculas inibidoras de p38 MAPK

Desde o surgimento do câncer se tem investido muito em estratégias que levem o paciente à cura. Novas terapias vêm sendo desenvolvidas com o uso de moléculas, estas possuem ação direcionada sobre proteínas específicas que controlam processos celulares envolvidos com a carcinogênese, tais como pequenas moléculas inibidoras que atuam modulando enzimas específicas e receptores do fator de crescimento (GFRs) (BAUDINO, 2015). A maioria das moléculas contém compostos grandes com peso molecular maior que

500 Da, o que dificulta a potência *in vivo*, sendo necessárias doses elevadas para atingir concentrações plasmáticas eficazes (KOEBERLE *et al.*, 2012). Dessa forma, as pequenas moléculas possuem maior potencial de uso no tratamento oncológico, pois podem ser altamente seletivas para uma proteína específica em pequenas doses e, consequentemente, podem também diminuir os efeitos colaterais dos tratamentos.

Pequenas moléculas inibidoras específicas de proteínas quinases vêm sendo estudadas para o tratamento do câncer (LEE; DOMINGUEZ, 2005; MURPHY; ZHENG, 2015; WU; NIELSEN; CLAUSEN, 2015). Da mesma forma, pequenas moléculas inibidoras de p38 MAPKs mostraram potencial para o tratamento do câncer de mama (AMIN *et al.*, 2017; KARCHER; LAUFER, 2009; SHAHLAEI; DOOSTI, 2016; YURTSEVER *et al.*, 2016). O planejamento de fármacos inibidores de p38 MAPK está focado principalmente em pequenas moléculas que competem pelo sítio catalítico do ATP (BREEN; SOELLNER, 2015; SILVA *et al.*, 2009; ZHANG; SHEN; LIN, 2007).

Existem três principais tipos de inibidores de quinases classificados de acordo com seu modo de ligação: tipo I, tipo II e tipo III. Os inibidores tipo I, a primeira geração de pequenas moléculas inibidoras, são compostos que ocupam a mesma região de ligação do ATP na conformação DFG-in e, portanto, são ATP-competitivos (THURMOND *et al.*, 2001). Os inibidores tipo II são capazes de se ligar na estrutura inativa da enzima e ocupam, além do sítio de ligação do ATP, a região alostérica hidrofóbica acessível devido à rotação do motivo DFG (DFG-out) (FIGURA 10) (ZUCCOTTO *et al.*, 2010). Já os inibidores tipo III, ocupam exclusivamente o sítio alostérico e não são ATP-competitivos (COX; SHOMIN; GHOSH, 2011).

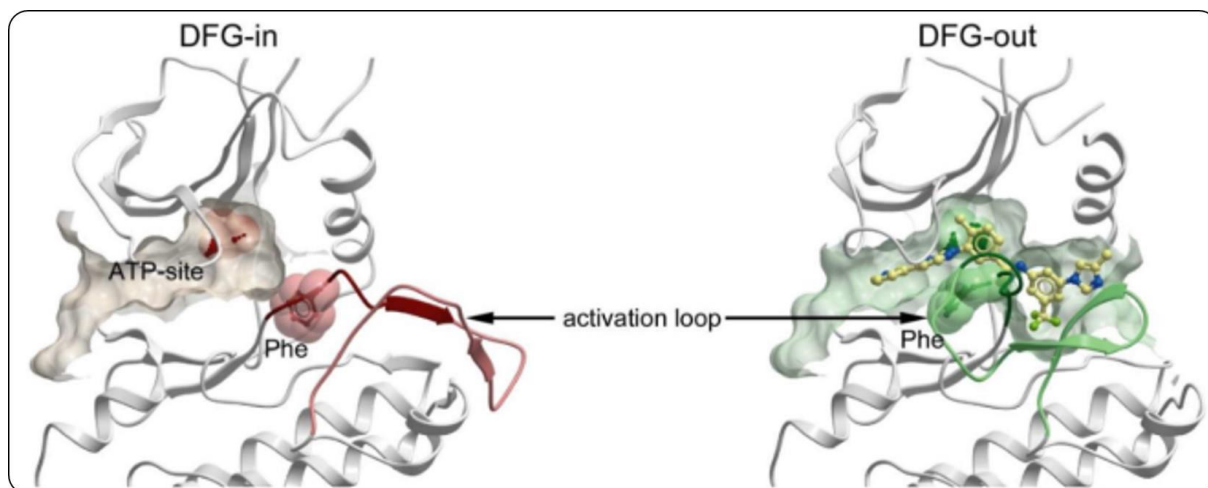


Figure 10. Representação das duas conformações que o motivo DFG pode adotar. Inibidores tipo II estabilizam a conformação DFG-out e exploram, além do sítio de ligação do ATP, a região antes ocupada pelo motivo DFG. Fonte: adaptado de KUFAREVA; ABAGYAN, 2009.

Apesar de ter sido relatado que inibidores que se ligam na conformação DFG-out podem ser mais seletivos por explorarem o sítio alostérico da enzima e competirem indiretamente com o ATP (PARGELLIS *et al.*, 2002), já foi demonstrado que os inibidores de p38 podem se ligar igualmente bem em ambos estados da enzima, com diferenças na seletividade e potência dos inibidores. Os compostos SB203580 e Skepinona-L são exemplos de potentes inibidores que ligam em p38 α no modo DFG-in (KOEBERLE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 1998), enquanto que o composto BIRB796 inibe p38 no modo DFG-out e compete indiretamente com o sítio de ligação do ATP (PARGELLIS *et al.*, 2002). Entretanto, todas essas moléculas estão focadas na inibição da isoforma p38 α e p38 β . O BIRB796, em altas concentrações, inibe as isoformas p38 γ e p38 δ , porém ao mesmo tempo inibe p38 α e p38 β (KUMA *et al.*, 2005). Dessa maneira, atualmente existe uma carência por inibidores específicos de p38 δ , o que dificulta o estudo e aplicação dessa isoforma como alvo farmacológico.

2.7 Screening virtual de pequenas moléculas para identificação de inibidores específicos de p38 δ

A abordagem computacional tem sido cada vez mais aplicada na busca por novas moléculas, pois o uso de diferentes ferramentas computacionais permite a identificação de novos compostos. Uma das abordagens computacionais utilizadas é o *screening* virtual, na qual se faz uma busca *in silico* em vastas bibliotecas de pequenas moléculas para a seleção de maneira rápida, barata e eficaz de novos candidatos a fármacos (LAVECCHIA; DI GIOVANNI, 2013; PARK, 2017). Os candidatos a inibidores que advêm desta busca podem ser avaliados em estudos *in vitro* quanto ao seu caráter inibitório, possibilitando estudos da relação entre estrutura-atividade e predição de toxicidade e potencial antitumoral.

Uma das ferramentas computacionais utilizadas no *screening* virtual é o *docking* molecular. Conceitualmente, o *docking* molecular pode ser definido como um procedimento computacional utilizado para tentar prever a posição, orientação e conformação nativa de uma pequena molécula associada dentro do sítio ativo de uma macromolécula alvo (ALONSO; BLIZNYUK; GREASY, 2006). Essa ferramenta permite explorar o vasto espaço conformacional de ligantes, assumido no interior do sítio da proteína alvo, em um curto espaço de tempo. A pontuação associada ao *docking* permite avaliar as ligações entre a

proteína alvo e pequenas moléculas, classificando o complexo formado pela energia de ligação associada (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Esta técnica pode ser superficialmente descrita como uma combinação de um algoritmo de busca, o qual explora as diferentes poses possíveis do ligante no sítio ativo da proteína, resultando em várias orientações e conformações do ligante no sítio; e uma função *score* que é responsável por analisar a interação de cada uma destas poses geradas e ranqueá-las a partir da energia de ligação, objetivando a identificação do verdadeiro modo de ligação da molécula (ALONSO; BLIZNYUK; GREARY, 2006; FERREIRA *et al.*, 2015).

O *screening* virtual, por ser uma metodologia rápida e econômica, foi utilizado nesse estudo na busca por inibidores específicos de p38 δ . Visto que no câncer de mama a isoforma p38 δ está mais expressa e relacionada com progressão do tumor e metástase para o pulmão (WADA *et al.*, 2017), este estudo propôs identificar pequenas moléculas que possuíam alta afinidade com o sítio ativo dessa enzima. Apesar de os métodos *in silico* possuírem suas vantagens, eles ainda precisam da validação dos resultados *in vitro*. Assim, nesse estudo também foram realizados ensaios com a linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, a fim de avaliar a citotoxicidade da molécula selecionada *in silico*. Com o intuito de propor um novo composto com potencial para ser utilizado no tratamento direcionado a proteínas específicas mutadas no câncer de mama, ensaios *in vitro* também foram realizados com a molécula PIT97.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 *Screening* virtual para identificação de pequenas moléculas inibidoras de p38δ

Para encontrar uma pequena molécula potencial inibidora de p38δ foi utilizado o *screening* virtual baseado na estrutura (do inglês, *Structure-based drug design* - SBDD), o qual envolve o *docking* molecular de cada ligante dentro de um sítio ativo conhecido da estrutura da proteína alvo (FERREIRA *et al.*, 2015; LEELANANDA; LINDERT, 2016). Visto que já existiam estruturas da proteína alvo p38δ resolvidas e depositadas no Banco de Dados de Proteínas (*Protein Data Bank* – PDB, disponível em <http://www.pdb.org>) (BERMAN *et al.*, 2000; BERNSTEIN *et al.*, 1977), foram selecionadas desse banco de dados duas estruturas de p38δ, uma na forma ativa da enzima (DFG-in; PDB ID 4EYM) e outra na forma inativa (DFG-out; PDB ID 4EYJ). Cada uma dessas estruturas havia sido resolvida na presença de um ligante e depositada no banco de dados PDB.

Após a escolha das estruturas de p38δ, foi realizado o *redocking*, processo no qual retira-se o ligante associado à proteína resolvida experimentalmente e tenta-se reproduzir a mesma pose de menor energia com o ligante associado. Esse processo é necessário para validar o protocolo (parâmetros) que será utilizado nos experimentos de *docking* molecular. O resultado do *redocking* são valores de RMSD e energia, sendo que para validarmos um protocolo é necessário que a conformação de menor valor de RMSD seja a de menor energia também. Portanto, os compostos que estavam associados às estruturas de p38δ foram retirados para verificar se com os parâmetros escolhidos o programa de *docking* molecular conseguiria encontrar a mesma posição inicial. Para cada uma das estruturas de p38δ o *redocking* apresentou RMSD menor que 2Å, ou seja, o protocolo empregado no programa de *docking* molecular foi capaz de encontrar a mesma posição do ligante observado na estrutura experimental. Assim, o protocolo do *docking* para o *screening* das moléculas foi validado.

As pequenas moléculas (ligantes) foram selecionadas a partir de uma revisão na literatura. Na busca, o foco foram moléculas já conhecidas como inibidores de outras proteínas quinases, moléculas com potencial para serem utilizadas no reposicionamento de fármacos e moléculas já disponíveis no laboratório de pesquisa. No final, 14 pequenas moléculas candidatas foram selecionadas, as quais estão descritas na Figura 11. As estruturas das moléculas que foram utilizadas no *docking* molecular foram retiradas do banco de dados PubChem (KIM *et al.*, 2019).

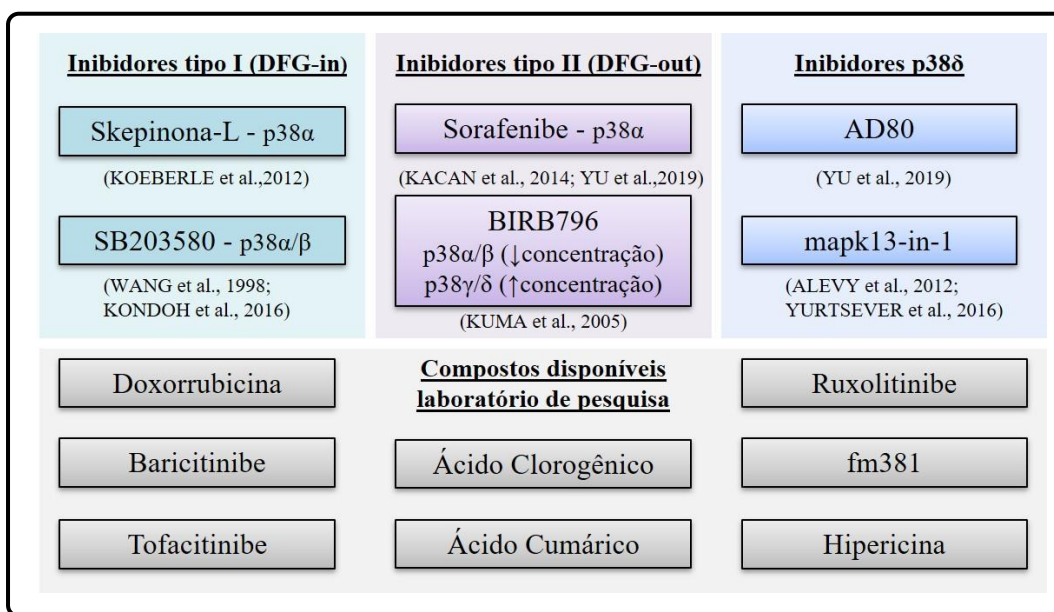


Figura 11. Ligantes selecionados para o *screening* virtual. Fonte: da autora, 2020.

Após a seleção das estruturas de p38δ, da validação do protocolo e seleção das pequenas moléculas do banco de dados, foi realizado o *screening* virtual, por meio da abordagem de *docking* molecular, de cada uma dessas pequenas moléculas selecionadas com as duas estruturas de p38δ (DFG-in e DFG-out), a fim de determinar a posição destes nos sítios ativos da p38δ, assim como estimar as suas energias de interação. O *docking* foi realizado com o *software* AutoDock 4.2 (MORRIS *et al.*, 2009). O algoritmo de busca usado foi o Algoritmo Genético Lamarkiano (MORRIS *et al.*, 1998) e a função de pontuação que o *software* utiliza é o campo de força AMBER.

Cada complexo proteína-ligante formado foi classificado pela sua energia de ligação, sendo que o complexo com menor energia de ligação indicou o ligante com maior afinidade pela p38δ. O programa PyMOL (PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LCC) foi utilizado para manipulação das estruturas, visualização e análises de resultados, assim como

para geração de imagens. O PDBsum (LASKOWSKI *et al.*, 1997, 2018) foi utilizado para analisar as interações entre os ligantes e p38 δ . O resumo dessa primeira etapa do *screening* virtual, assim como das demais etapas deste estudo, está demonstrado na Figura 12.

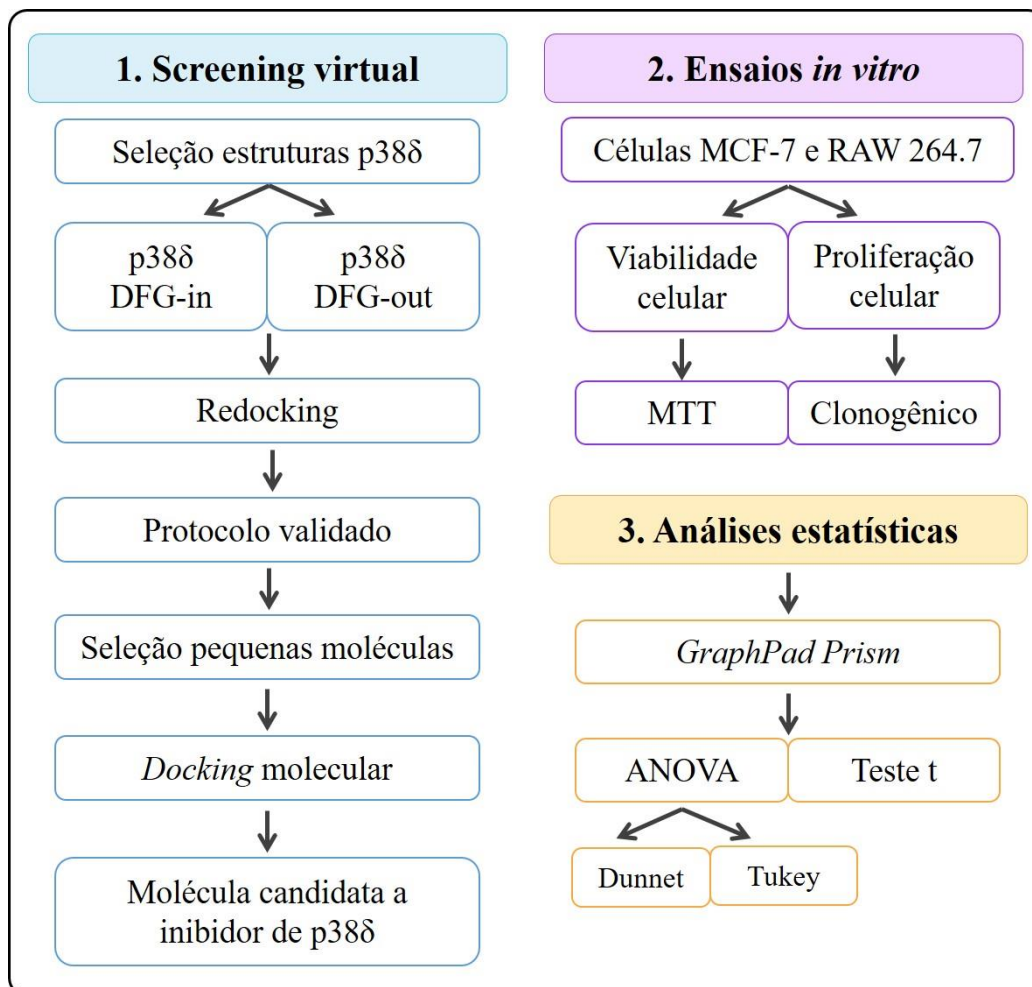


Figura 12. Esquema resumo da metodologia utilizada. Fonte: da autora, 2020.

3.2 Compostos e Reagentes

O meio de cultivo DMEM com baixos níveis de glicose (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose*), o dimetilsulfóxido (DMSO) e o reagente MTT foram adquiridos da Sigma – Aldrich (Taufkirchen, Alemanha). O soro bovino fetal (SBF) e a solução de tripsina-EDTA foram adquiridos do Cultilab (São Paulo, Brasil). A Hipericina foi comprada da Cayman e o PIT97 foi doado pelo Prof. Dr. Pierre Koch, do Laboratório de Química Medicinal da Universidade de Regensburg, na Alemanha. Ambos os compostos, Hipericina e PIT97, foram pesados e diluídos em DMSO a fim de se obter uma solução

estoque a 10 mM, as quais foram armazenadas no -80°C. Todas concentrações dos compostos utilizadas nos ensaios *in vitro* partiram dessas soluções estoques.

3.3 Linhagem celular e cultura de células

Os ensaios *in vitro* foram realizados com a linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 e a linhagem de macrófagos murino RAW 264.7. A linhagem MCF-7, estabelecida a partir de um derrame pleural de uma paciente com câncer de mama metastático, apresenta diversas características do epitélio mamário diferenciado, sendo uma linhagem que expressa os receptores de estrogênio (ER+) e progesterona (PR+) (SOULE *et al.*, 1973). A linhagem MCF-7 foi adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro e a linhagem RAW 264.7 doada pelo Prof. Dr. Jarbas de Oliveira da PUCRS. Ambas as linhagens foram cultivadas em meio DMEM com baixos níveis de glicose (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium low glucose*), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) estéril e 1% de solução de penicilina/estreptomicina. Para o repique celular, as células MCF-7 foram dissociadas da placa com tripsina -EDTA, repicadas em uma proporção de 1:3 e cultivadas em placas com área de crescimento de 25 cm². As células RAW 264.7 foram dissociadas da placa por meio da raspagem, utilizando um *scraper*. As células foram mantidas em atmosfera de 5% de CO₂, 90 % de umidade e à temperatura constante de 37°C.

3.4 Análise de viabilidade celular – Ensaio MTT

Os efeitos citotóxicos das moléculas Hipericina e PIT97 na viabilidade de células MCF-7 e RAW 264.7 foram determinados através do ensaio colorimétrico MTT, o qual se baseia na conversão dos sais de tetrazólio (MTT) no produto formazana por mitocôndrias ativas (MOSMANN, 1983). Para o ensaio de MTT com a Hipericina, 5x10³ células MCF-7 por poço foram plaqueadas em 200 µL de meio apropriado contendo 10% de SBF, em placas de 96-poços. Após 24 horas, foram adicionados os tratamentos com Hipericina nas concentrações de 10 µM, 5 µM e 2,5 µM por um período de 24 e 48 horas. Além disso, foram realizados tratamentos com Hipericina a 10 µM associada as concentrações de 5 mM, 1,25 mM e 0,625 mM do antioxidante N-Acetilcisteína, seguido de incubação por 72 horas. Para o ensaio de MTT com o composto PIT97, 5x10³ células MCF-7 e RAW 264.7 por poço foram plaqueadas em 200 µL de meio apropriado contendo 10% de SBF, em placas de 96-poços.

Após 24 horas, ambas as linhagens receberam os tratamentos com PIT97 a 10 μ M, 1 μ M, 0,1 μ M e 0,01 μ M e foram incubadas por 48 e 72 horas.

Após os períodos dos tratamentos com as diferentes concentrações de Hipericina e PIT97, os sobrenadantes foram substituídos por 200 μ L do corante MTT (5 mg/mL), diluído em meio de cultura DMEM *low glucose* (10% de MTT). Após, as células foram incubadas por 3 horas na estufa a 37° C. Posteriormente, o meio foi retirado e 200 μ L de DMSO foi adicionado em cada poço para solubilização dos cristais de formazana. As absorbâncias das amostras foram mensuradas por espectrometria em leitor de microplacas (SpectraMaxi3®) no comprimento de onda de 570 nm. Como controle positivo de morte celular em todos ensaios foi utilizado Peróxido de Hidrogênio a 0,5 mM. Os ensaios de MTT foram realizados em triplicadas independentes. Para os cálculos de viabilidade, a absorbância do grupo controle foi considerada como 100% de viabilidade e os outros grupos tiveram sua viabilidade calculada de forma proporcional.

3.5 Análise de proliferação celular – Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico foi realizado a fim de avaliar o efeito citotóxico das moléculas Hipericina e PIT97 a longo prazo em células MCF-7. Esse ensaio permite avaliar a capacidade das células formarem colônias em placas de cultivo, a partir da detecção das células que mantêm a capacidade de gerar um número considerável de células filhas após tratamento com um composto (FRANKEN *et al.*, 2006). Para esse ensaio, 2000 células MCF-7 por poço foram plaqueadas em placas de 6 poços e posteriormente incubadas por 24 horas para adesão celular. Após esse período, foi realizado os tratamentos com Hipericina a 20 μ M, 10 μ M e 5 μ M e com o PIT97 a 0,1 μ M e 0,05 μ M. Após 72 horas, os tratamentos foram retirados, as células foram lavadas com solução fisiológica e o meio DMEM *low glucose* suplementado com 10% de soro bovino fetal foi adicionado. As células então permaneceram incubas por 10 dias na estufa, sem troca de meio durante esse período. Após os 10 dias, o meio de cultura foi retirado e os poços lavados com solução fisiológica fria. As colônias foram fixadas adicionando-se a cada poço 2 mL de solução contendo 0,2% de cristal violeta, 2% de etanol e água MilliQ e as placas foram incubadas por 30 minutos a 37°C. Após, a solução fixadora foi removida e os poços lavados cuidadosamente com água. As colônias foram contadas visualmente no *software* ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012). Os ensaios de clonogênico foram realizados em triplicatas independentes.

3.6 Análises estatísticas

Os dados obtidos foram analisados por meio do teste estatístico de Análise de Variância (ANOVA) com 1 critério, seguido do teste de comparação de Dunnet, quando os dados dos tratamentos foram comparados somente com o controle, ou seguido pelo teste de Tukey, quando foi necessário fazer também a comparação de resultados entre os tratamentos. Para comparação de duas médias foi utilizado o teste t de Student. As análises estatísticas foram todas realizadas no *software GraphPad Prism v.5*, com $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Composto com potencial ação inibitória da p38 δ

Para identificar potenciais inibidores de p38 δ , um *screening* virtual foi realizado com pequenas moléculas escolhidas a partir de uma revisão na literatura. O modo de ligação dos 14 compostos selecionados foi avaliado nas conformações ativa (DFG-in) e inativa (DFG-out) da p38 δ , utilizando o sítio de ligação do ATP como alvo. Os resultados da estimativa da energia de ligação de cada complexo estão listados na Tabela 1 e 2.

A molécula que apresentou a menor energia de ligação e, consequentemente, maior afinidade pela p38 δ inativa foi o Sorafenibe (-10,56 kcal/mol) (TABELA 1). Os três compostos (Sorafenibe, Mapk-13-in-1 e BIRB796) que apresentaram maior afinidade pela p38 δ DFG-out já foram descritos como compostos que se ligam no modo DFG-out em p38, corroborando com os resultados encontrados para p38 δ (ALEVY *et al.*, 2012; KACAN *et al.*, 2014; KUMA *et al.*, 2005; YU *et al.*, 2019; YURTSEVER *et al.*, 2016). Entretanto, sabe-se que o Sorafenibe é também um inibidor de p38 α e, assim, não seria específico para a isoforma p38 δ (KACAN *et al.*, 2014; YU *et al.*, 2019).

Tabela 1 – Estimativa da energia de ligação de cada ligante associado a proteína p38 δ DFG-out.

Proteína	Ligante	Energia (kcal/mol)
p38 δ DFG-out	Sorafenibe	-10,56
	Mapk13-in-1	-10,54
	BIRB796	-10,47
	FM381	-9,88
	SB203580	-9,06
	Baricitinibe	-8,04
	Ruxolitinibe	-7,88
	AD80	-7,87
	Tofacitinibe	-7,64
	Skepinona-L	-7,13
	Ácido Cumárico	-7,06
	Ácido Clorogênico	-6,32
	Doxorrubicina	-4,37
	Hipericina	2,08

Fonte: da autora, 2020.

Já na forma ativa da p38 δ (conformação DFG-in), a molécula que apresentou a maior afinidade pela enzima foi a Hipericina (-9,93 kcal/mol) (TABELA 2). A Hipericina se associa no sítio de ligação do ATP e, além das interações hidrofóbicas, faz uma ligação de hidrogênio com o resíduo de glicina (Gly170) (FIGURA 13 e 14). Essa mesma molécula também foi a que apresentou a mais baixa afinidade pela p38 δ DFG-out (2,08 kcal/mol) (TABELA 1), indicando que tem maior afinidade somente pela forma ativa de p38 δ .

Tabela 2 - Estimativa da energia de ligação de cada ligante associado a proteína p38 δ DFG-in.

Proteína	Ligante	Energia (kcal/mol)
p38 δ DFG-in	Hipericina	-9,93
	Sorafenibe	-9,73
	FM381	-9,42
	BIRB796	-8,81
	Mapk13-in-1	-8,72
	AD80	-8,70
	SB203580	-8,64
	Skepinona-L	-8,42
	Doxorrubicina	-8,20
	Baricitinibe	-7,61
	Ruxolitinibe	-7,33
	Tofacitinibe	-7,06
	Ácido Clorogênico	-6,21
	Ácido Cumárico	-6,19

Fonte: da autora, 2020.

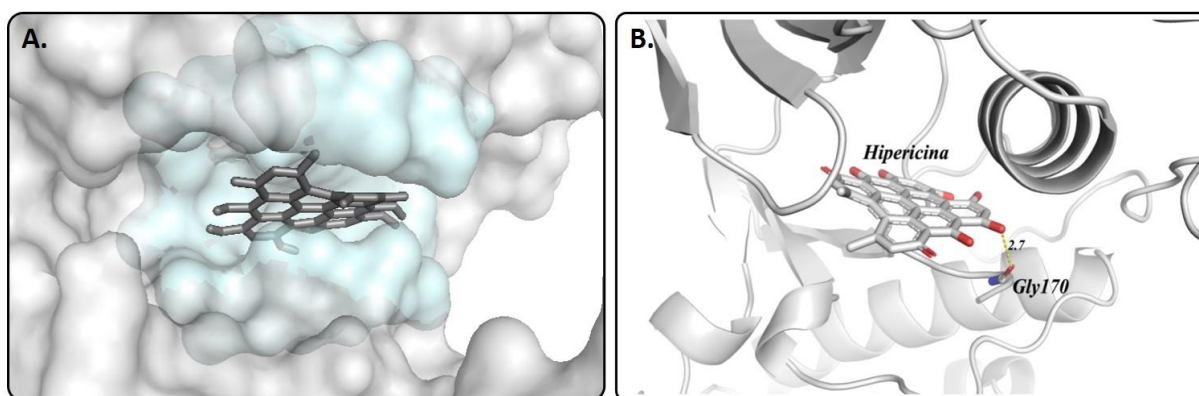


Figura 13. Resultado do *docking* molecular da molécula Hipericina com a p38 δ na conformação DFG-in. **A.** Estrutura de superfície da Hipericina associada na p38 δ . **B.** Estrutura da Hipericina associada na p38 δ ; O resíduo que faz uma ligação de hidrogênio está mostrado na figura. A ligação de hidrogênio está representada por uma linha pontilhada amarela e sua correspondente distância em preto. Fonte: da autora, 2020.

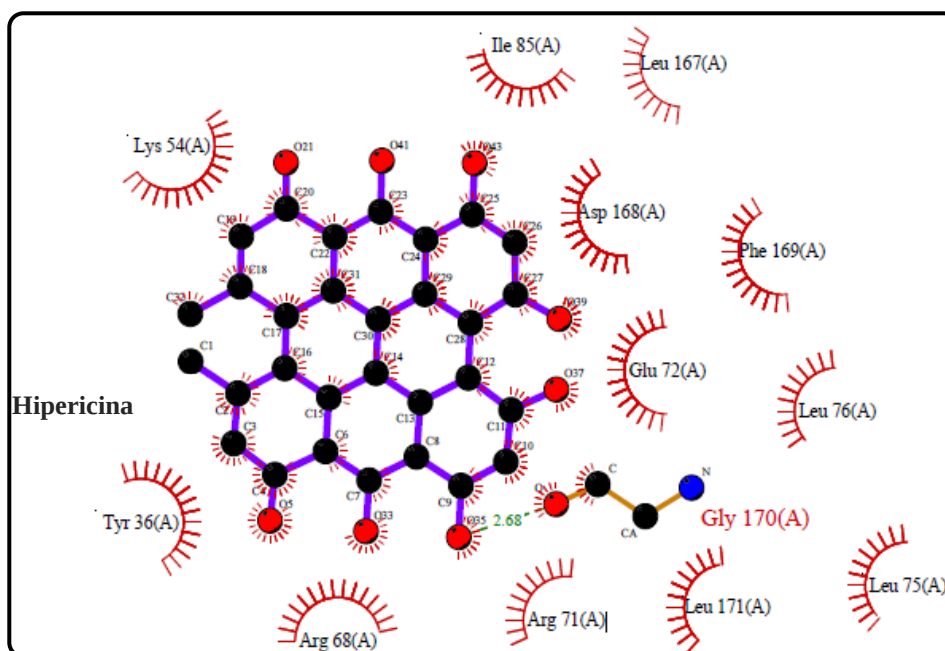


Figura 14. Representação 2D das interações entre a molécula Hipericina e p38 δ (DFG-in). A ligação de hidrogênio está representada por uma linha verde entre dois átomos e resíduos envolvidos em interações hidrofóbicas estão representados por um arco vermelho com pequenas linhas apontando em direção ao ligante. Representação feita com o PDBsum online. Fonte: da autora, 2020.

O resultado do *screening* virtual, que indica a Hipericina como um potencial inibidor de p38 δ , está de acordo com os resultados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa no ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), realizado para avaliar a capacidade da Hipericina inibir a atividade enzimática *in vitro* de p38 δ . Nesse ensaio foi utilizado o fator de ativação de transcrição 2 (ATF-2) como substrato para p38 δ e um anticorpo específico para captar o substrato fosforilado, sendo que quanto menor a quantidade de ATF-2 fosforilado, maior a inibição da atividade de p38 δ . Os resultados obtidos mostraram que a Hipericina na concentração de 1 μ M inibe aproximadamente 60,66% da atividade de p38 δ , enquanto que na concentração de 10 μ M inibe aproximadamente 95,96% da atividade de p38 δ (dados não publicados) (FIGURA 15). Assim, de acordo com esses resultados e os dados presentes na literatura, indicando que a Hipericina poderia ser um potencial inibidor de p38 δ (BLANK *et al.*, 2001, 2004; WADA *et al.*, 2017), essa molécula foi escolhida para ser testada *in vitro* nas células de câncer de mama.

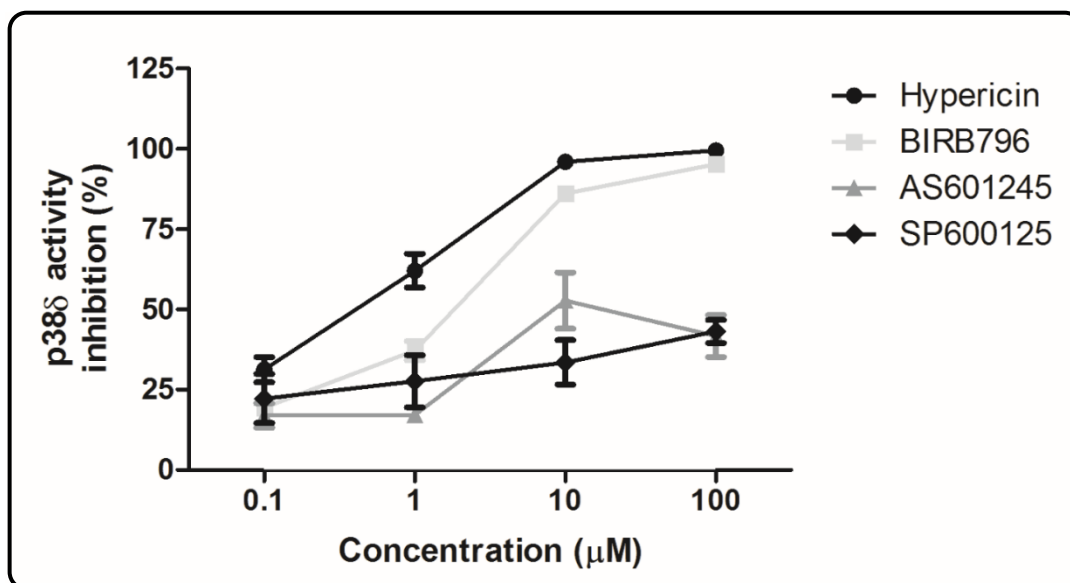


Figura 15. Inibição da atividade enzimática de p38δ pela Hipericina e por três inibidores conhecidos de outras proteínas quinases. O BIRB796 é conhecido por inibir as quatro isoformas de p38, enquanto o AS601245 e SP600125 são inibidores conhecidos de JNK. Os valores das médias $\pm$ SEM de quatro experimentos independentes são mostrados. Fonte: da autora, 2020.

4.2 Efeitos da Hipericina na viabilidade e proliferação da linhagem de adenocarcinoma de mama humano MCF-7

Para avaliar os efeitos da Hipericina na viabilidade e proliferação celular, a linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano MCF-7 foi tratada com diferentes concentrações da molécula. Um estudo demonstrou que células MCF-7 com perda de expressão de p38δ pela tecnologia de pequenos RNA de interferência (siRNA) apresentaram diminuição da proliferação celular comparado com células controle (WADA *et al.*, 2017). Essa mesma linhagem de células MCF-7 quando tratadas com 0,5 μg/mL de Hipericina, por 48 horas, apresentaram perda de aproximadamente 50% da viabilidade celular (MIRMALEK *et al.*, 2016). Dessa maneira, para verificar se existia alguma relação entre o mecanismo de ação da Hipericina e a inibição de p38δ, essa mesma linhagem celular de câncer de mama foi escolhida para os testes de citotoxicidade *in vitro*.

A viabilidade de células MCF-7 tratadas com Hipericina por 24 e 48 horas foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os resultados obtidos mostraram que nenhuma das concentrações de Hipericina (10 μM; 5 μM e 2,5 μM) diminuiu significativamente a viabilidade celular comparado com células controle após ambos períodos de tratamentos (FIGURA 16).

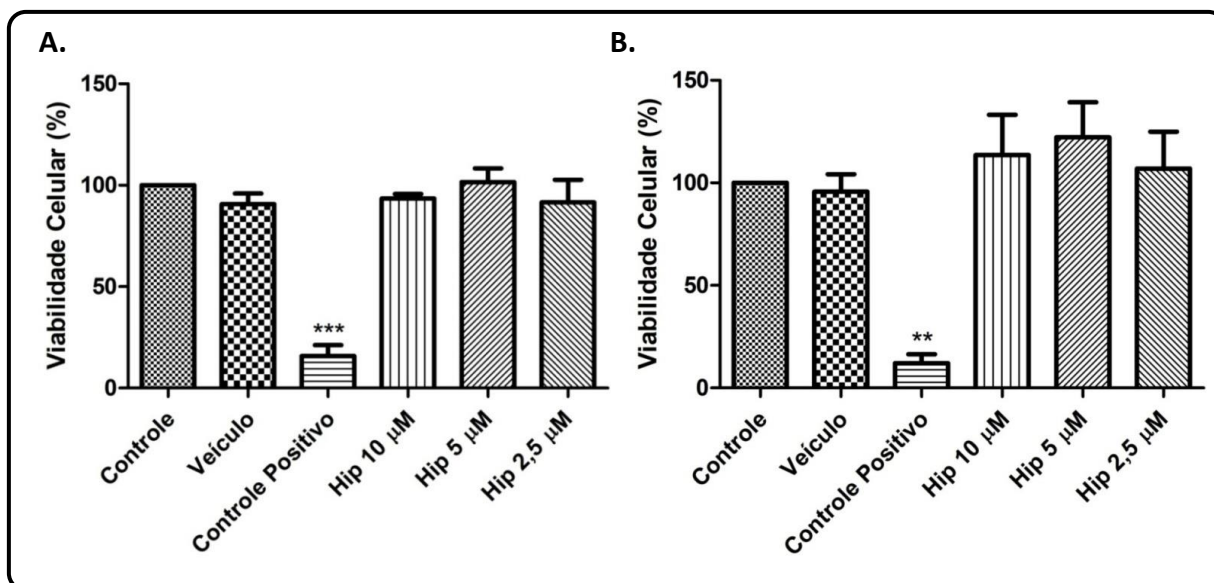


Figura 16. Avaliação do potencial citotóxico da Hipericina em células MCF-7. **A.** Tratamentos por 24h **B.** Tratamentos por 48h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os valores das médias $\pm$ DP de três experimentos independentes são mostrados. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ comparado com controle. Veículo (DMSO); Controle Positivo (Peróxido de hidrogênio); Hip (Hipericina). Fonte: da autora, 2020.

Foi relatado que a atividade antitumoral da Hipericina no escuro (quando não fotoativada) pode estar relacionada primeiramente com efeitos citostáticos, ou seja, essa molécula atuaria no ciclo celular, inibindo a síntese do DNA (BLANK *et al.*, 2001, 2003). Portanto, os efeitos da Hipericina na proliferação celular foram avaliados pelo ensaio clonogênico, pois esse ensaio permite verificar a longo prazo a capacidade das células de formarem colônias filhas após um tratamento que induz morte associada à divisão celular (FRANKEN *et al.*, 2006). Em um primeiro ensaio, foi possível observar perda significativa do número de colônias filhas após o tratamento com Hipericina a 10 μ M ($t=5,047$; $p < 0,05$). (FIGURA 17). Entretanto, em um segundo ensaio clonogênico, no qual foram utilizadas diferentes concentrações de Hipericina, a perda de proliferação celular não foi observada, mesmo em uma concentração maior da molécula (FIGURA 18).

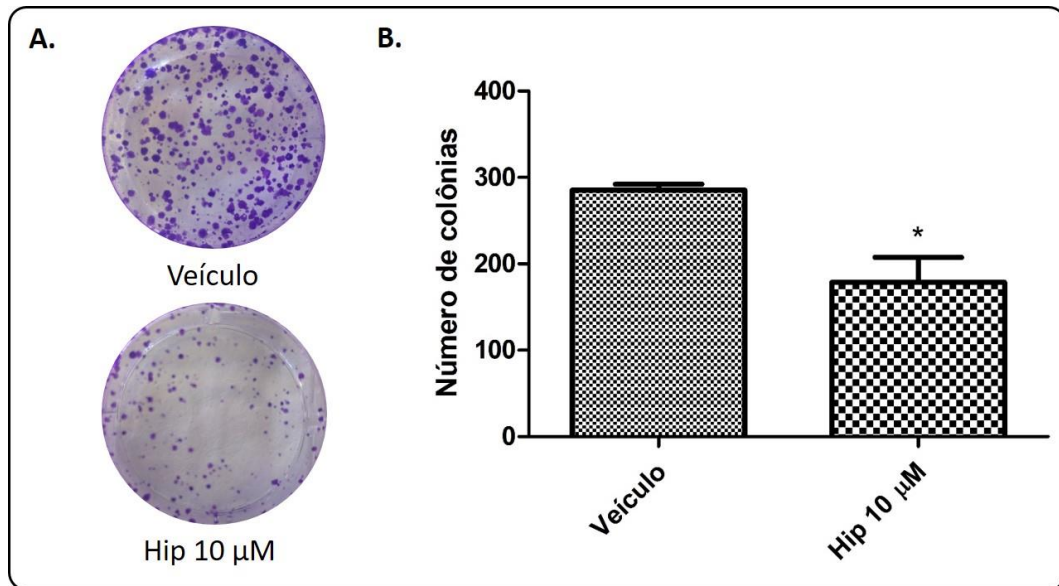


Figura 17. Avaliação da proliferação celular das células MCF-7 tratadas com Hipericina por 72 horas. **A.** Imagens das células ao final do ensaio clonogênico. **B.** Número de colônias filhas contadas após 10 dias. O tratamento com Hipericina a 10 µM reduziu aproximadamente 32% o número de colônias formadas após 10 dias ($t=5,047$; $p<0,05$). Os valores das médias $\pm$ DP de dois experimentos independentes são mostrados. Veículo (DMSO); Hip (Hipericina). Fonte: da autora, 2020.

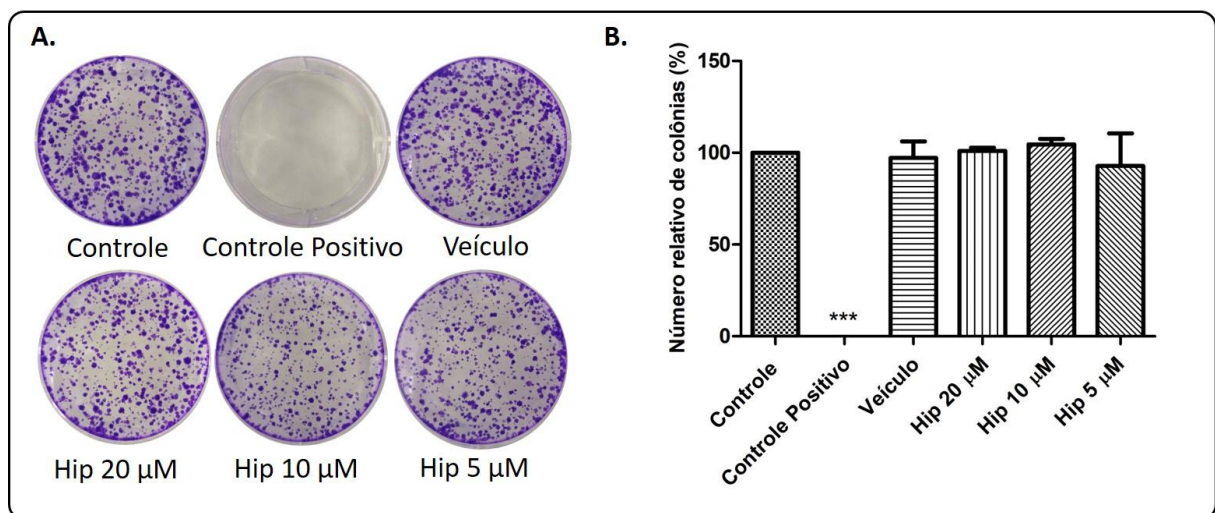


Figura 18. Avaliação da proliferação celular das células MCF-7 tratadas com Hipericina por 72 horas. **A.** Imagens das células ao final do ensaio clonogênico. **B.** Número relativo de colônias filhas contadas após 10 dias em relação ao número de colônias do controle. Os valores das médias $\pm$ DP de três experimentos independentes são mostrados. *** $p<0,001$ comparado com controle. Veículo (DMSO); Controle Positivo (Peróxido de Hidrogênio); Hip (Hipericina). Fonte: da autora, 2020.

4.3 Avaliação da viabilidade de células MCF-7 tratadas com o antioxidante N-Acetilcisteína (NAC) e Hipericina

Para avaliar se a Hipericina estaria perdendo sua atividade *in vitro* devido a oxidação da molécula, as células MCF-7 foram tratadas com diferentes concentrações do antioxidante N-acetilcisteína (NAC), com Hipericina a 10 μ M sozinha e em associação com diferentes concentrações do antioxidante NAC por 72 horas. Para fazer as associações, as células foram incubadas por 1 hora com o antioxidante NAC e após esse período foi adicionado a dose de 10 μ M de Hipericina. Esperava-se que se a molécula de Hipericina estivesse sofrendo oxidação, o antioxidante estabilizaria a molécula, aumentando sua atividade. Porém, não foram encontradas diferenças significativas de citotoxicidade entre o tratamento somente com Hipericina ou em associação com o antioxidante (FIGURA 19).

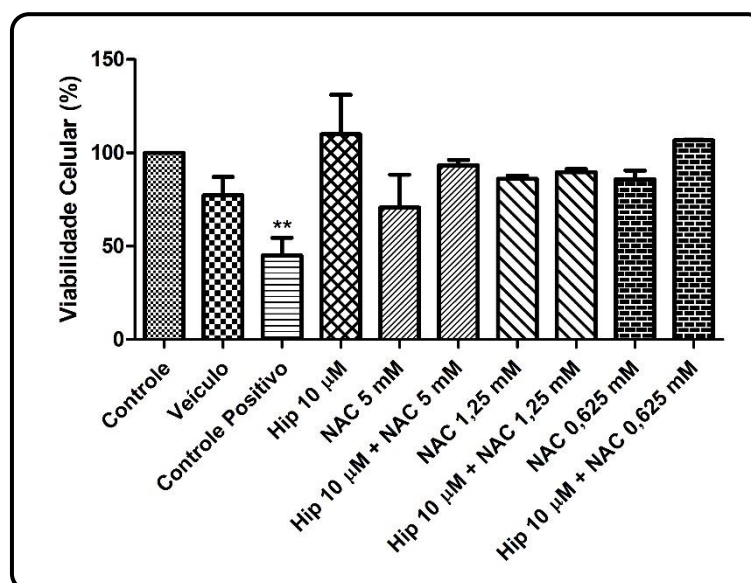


Figura 19. Avaliação do potencial citotóxico da Hipericina em associação com o antioxidante N-Acetilcisteína em 72 horas de tratamento. Diferentes concentrações do NAC também foram testadas para verificar sua toxicidade. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os valores das médias $\pm$ DP de dois experimentos independentes são mostrados. As médias de viabilidade foram comparadas com o teste estatístico ANOVA, seguido do teste de comparação de Tukey. ** $p < 0,01$ comparado com controle. Veículo (DMSO); Controle Positivo (Peróxido de hidrogênio); Hip (Hipericina), NAC (N-Acetilcisteína). Fonte: da autora, 2020.

4.4 Composto com atividade antitumoral na linhagem MCF-7 e seu potencial de uso para o tratamento seletivo do câncer de mama

Embora diversos estudos relatem que a Hipericina possui atividades antitumorais, inclusive nas células de câncer de mama (BLANK *et al.*, 2001, 2003; MARTÍNEZ-

POVEDA; QUESADA; MEDINA, 2005; MIRMALEK *et al.*, 2016), neste estudo não foi possível identificar nenhum efeito citotóxico dessa molécula na linhagem MCF-7. Desta forma, com o intuito de identificar uma pequena molécula para o tratamento seletivo do câncer de mama, foi selecionado o composto PIT97 (5- (2- (Ciclopropanocarboxamido) piridin4-il) -4-ciclopropil-1H-imidazol-2-carboxamida). (FIGURA 20). Este composto foi recentemente identificado como um inibidor da proteína quinase glicose sintase 3 β (GSK3 β) em células neuronais da linhagem SH-SY5Y (HEIDER *et al.*, 2019). Além disso, para a inibição de GSK3 β o PIT97 possui IC₅₀ de 3nM, enquanto que para inibição de p38 α MAPK ele possui IC₅₀ maior que 10 μ M (HEIDER *et al.*, 2019). Nosso grupo de pesquisa, em parceria com o Laboratório de Química Medicinal da Universidade de Regensburg, na Alemanha, identificou também que esse composto tem potencial para ser utilizado no tratamento do câncer de mama, visto que em baixas concentrações reduz a viabilidade de células da linhagem MCF-7 (HEIDER *et al.*, 2019).

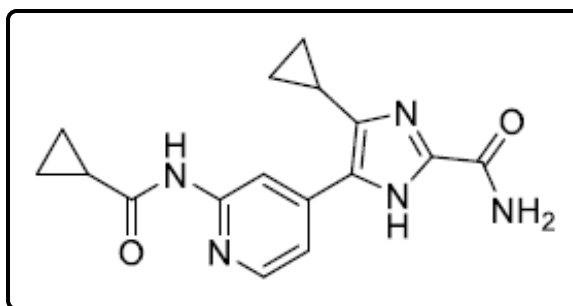


Figura 20. Estrutura química da molécula PIT97. Fonte: adaptado de HEIDER *et al.*, 2019.

Os resultados encontrados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que células MCF-7 ao serem tratadas com diferentes concentrações do PIT97 reduzem a viabilidade após 48 horas comparado com células controle (FIGURA 21A) (HEIDER *et al.*, 2019). Além disso, nas concentrações mais baixas (0,1 μ M e 0,01 μ M) o PIT97 não é tóxico para as células da linhagem de macrófagos murino RAW 264.7 (FIGURA 21B) (HEIDER *et al.*, 2019). Dessa forma, é viável de se pensar em um tratamento oncológico para o câncer de mama com o PIT97, visto que a molécula tem como alvo somente as células tumorais.

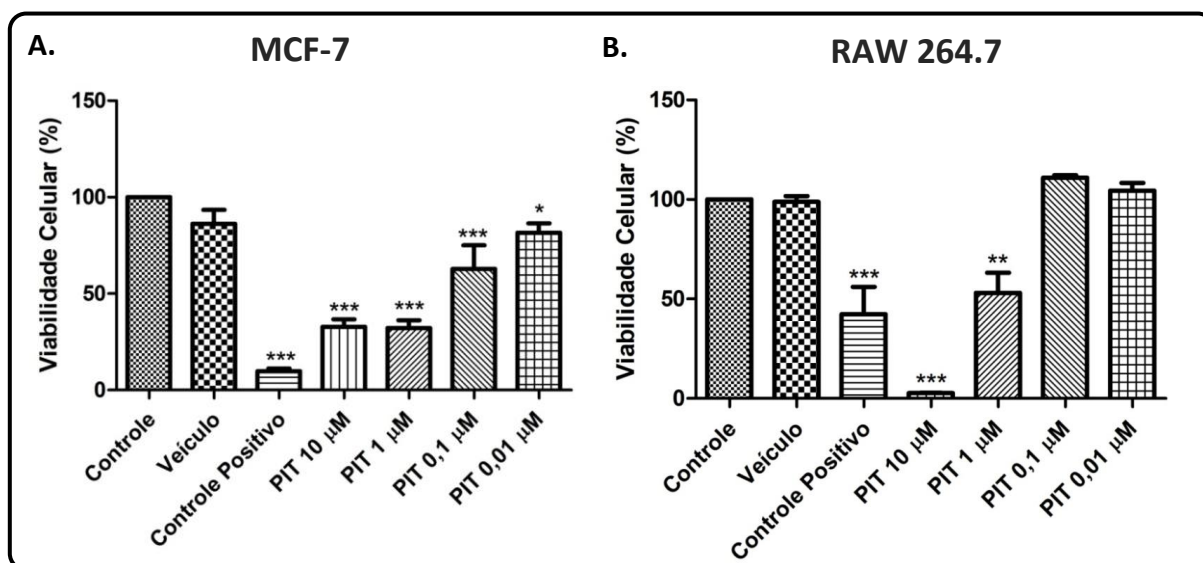


Figura 21. Avaliação do potencial citotóxico do PIT97 em 48 horas. **A.** Células da linhagem MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de PIT97. Todas as concentrações da molécula reduziram a viabilidade das células após 48h. **B.** Células da linhagem RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações do PIT97. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os valores das médias $\pm$ DP de três experimentos independentes são mostrados. *** $p < 0,001$ ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$ comparado com controle. Veículo (DMSO); Controle Positivo (Peróxido de hidrogênio); PIT (PIT97). Fonte: adaptado de HEIDER et al., 2019.

Os efeitos citotóxicos do PIT97 em 72 horas de tratamento também foram avaliados pelo ensaio MTT. Novamente o composto em diferentes concentrações (10 μ M; 1 μ M e 0,1 μ M) reduziu significativa a viabilidade das células comparado com células controle, com um IC_{50} de aproximadamente 0,1 μ M (FIGURA 22A). Na linhagem RAW 264.7, as duas concentrações mais baixas do PIT97 (0,1 μ M e 0,01 μ M) continuaram não sendo tóxicas (FIGURA 22B). Visto que na concentração de 0,1 μ M o PIT97 inibe aproximadamente 50% da viabilidade das células MCF-7 e, ao mesmo tempo, não é tóxico para as células RAW 264.7, essa concentração foi escolhida para avaliar o seu efeito a longo prazo.

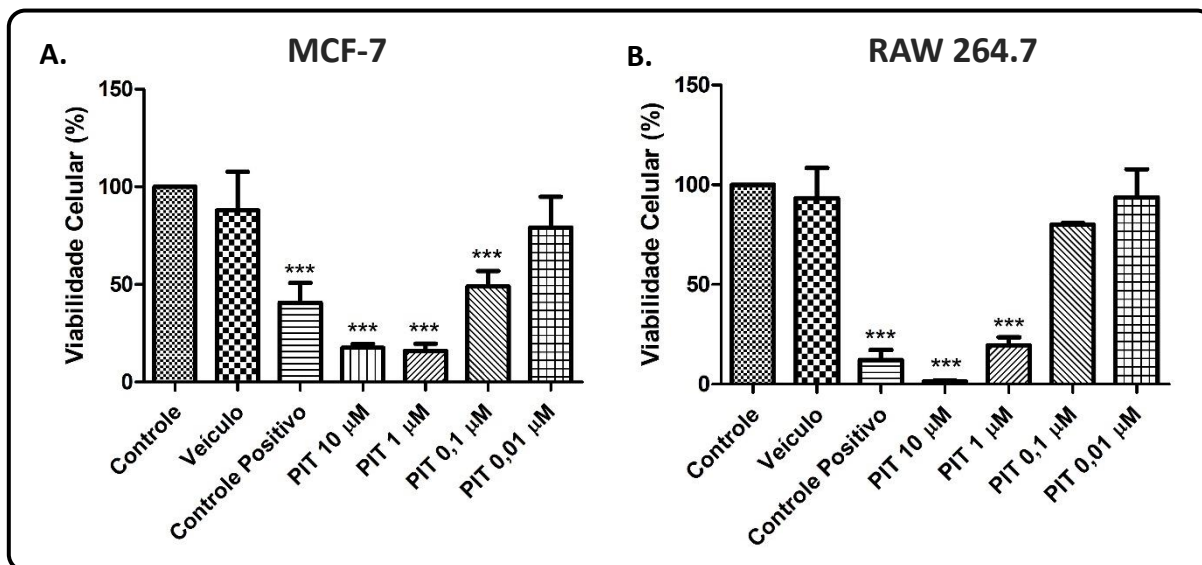


Figura 22. Avaliação do potencial citotóxico do PIT97 em 72 horas. **A.** Células da linhagem MCF-7 tratadas com diferentes concentrações de PIT97. **B.** Células da linhagem RAW 264.7 tratadas com diferentes concentrações de PIT97. As duas concentrações mais baixas da molécula testadas não são tóxicas nessa linhagem de células. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT. Os valores das médias $\pm$ DP de três experimentos independentes são mostrados. *** $p < 0,001$ comparado com controle. Veículo (DMSO); Controle Positivo (Peróxido de hidrogênio); PIT (PIT97). Fonte: da autora, 2020.

Para avaliar os efeitos do PIT97 na proliferação celular a longo prazo foi realizado o ensaio de clonogênico. O tratamento por 72 horas com 0,1 µM do PIT97, seguido de um período de 10 dias sem tratamento, diminuiu para aproximadamente 30% o número de colônias filhas comparado com o controle ($p < 0,001$) (FIGURA 23). Dessa forma, pode-se concluir que o PIT97 tem atividade antitumoral tanto a curto prazo, quanto a longo prazo, e, portanto, é um candidato para uso terapêutico no câncer de mama.

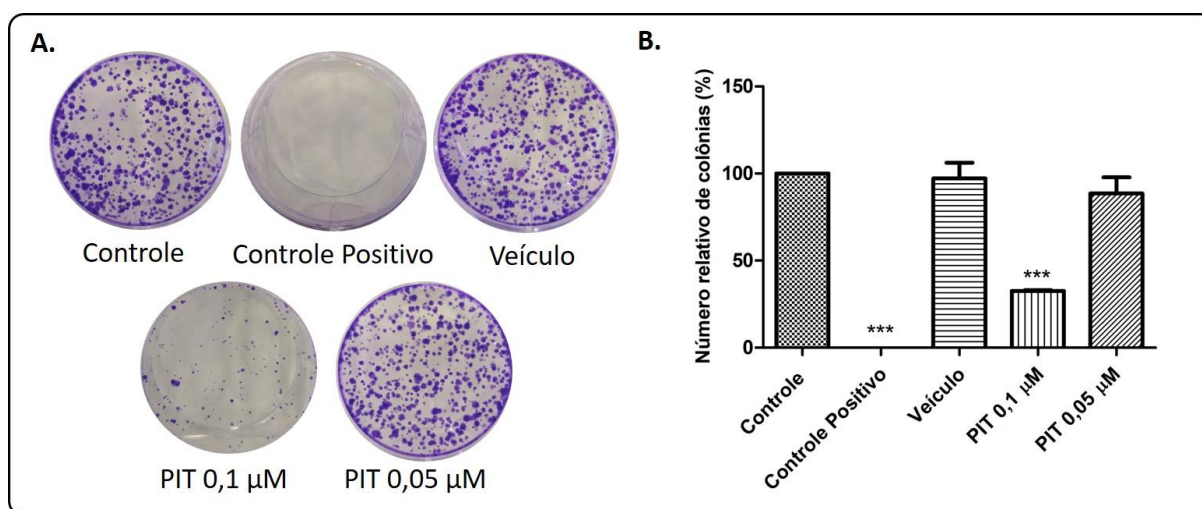


Figura 23. Avaliação da proliferação celular das células MCF-7 tratadas com PIT97 por 72 horas. **A.** Imagens das células ao final do ensaio clonogênico. **B.** Número relativo de colônias filhas contadas após 10 dias em comparação com o controle. Os valores das médias $\pm$ DP de três experimentos independentes são mostrados. *** $p < 0,001$ comparado com controle. Veículo (DMSO); Controle Positivo (Peróxido de Hidrogênio); PIT (PIT97). Fonte: da autora, 2020.

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais inscidente entre as mulheres e também a primeira causa de morte por câncer nas mulheres do mundo todo (BRAY *et al.*, 2018). Os efeitos colaterais das terapias atualmente empregadas e a falta de tratamentos eficazes para os estágios avançados da doença, quando existem altas chances de metástases, torna necessária a busca por novos fármacos que tenham o mecanismo de ação direcionado à proteínas específicas que estão desreguladas no câncer de mama.

A alta expressão e ativação da proteína p38 δ no câncer de mama, assim como seu papel na invasão e metástase desse tipo de câncer (WADA *et al.*, 2017), despertaram o interesse nessa isoforma de p38 MAPK como um possível alvo de novas moléculas antitumorais contra o câncer de mama metastático. Além disso, os padrões de expressão de p38 δ restritos a alguns tecidos oferecem vantagens na busca por um tratamento oncológico mais seletivo. Visto que até o momento não foi descrita nenhuma molécula com potencial de inibir especificamente a isoforma p38 δ , um *screening* virtual com 14 pequenas moléculas foi realizado, a fim de identificar um potencial inibidor dessa enzima.

A Hipericina foi a molécula que *in silico* apresentou o maior potencial de inibir a p38 δ na sua forma ativa (TABELA 2). Essa molécula, ao se ligar no sítio de ligação do ATP, impediria a ligação deste substrato e, consequentemente, a atividade de p38 δ . Essa inibição da atividade enzimática de p38 δ pela Hipericina foi comprovada *in vitro* pelo ensaio imunoenzimático ELISA, visto que, na concentração de 10 μ M, a Hipericina inibe aproximadamente 95,96% da atividade de p38 δ (FIGURA 15). Inibindo a atividade de p38 δ no câncer de mama, espera-se inibir também suas respostas biológicas que ocasionam proliferação celular, progressão tumoral e formação de metástases (WADA *et al.*, 2017). Portanto, a Hipericina é um candidato para o tratamento do câncer de mama metastático.

A Hipericina é um composto que pode ser extraído ou quimicamente sintetizado da planta *Hypericum perforatum* L., utilizada historicamente para fins medicinais (KUBIN *et al.*, 2005). Esse composto, por ser um potente fotossensibilizante, passou a ser estudado anos atrás para uso na terapia fotodinâmica de alguns tipos de tumores. A Hipericina fotoativada induz a morte das células tumorais por vários mecanismos, incluindo apoptose, necrose e morte celular relacionada à autofagia; e demonstrou-se eficaz para tratar o melanoma, um tipo agressivo de câncer de pele que possui altas chances de formação de metástases (DAVIDS *et al.*, 2008; KLEEMANN *et al.*, 2014). No entanto, a terapia fotodinâmica pode apresentar efeitos colaterais, como queimação na pele, sensação de ardência, desconforto e dor, e o grau do dano celular depende de vários fatores, incluindo permeabilidade celular, localização subcelular do fotossensibilizante, dose de luz e tipos de espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas (JENDŽELOVSKÁ *et al.*, 2016).

Apesar de muito estudada na sua forma fotoativada, já foi descrito que a Hipericina também possui atividade antitumoral no escuro, ou seja, na ausência de fotoativação (BLANK *et al.*, 2001, 2004; JENDŽELOVSKÁ *et al.*, 2016; MARTÍNEZ-POVEDA; QUESADA; MEDINA, 2005; MIRMALEK *et al.*, 2016). Na linhagem MCF-7, a Hipericina no escuro apresentou maior efeito citotóxico do que a Cisplatina, um fármaco muito utilizado na quimioterapia contra diversos tipos de câncer (DASARI; TCHOUNWOU, 2014; MIRMALEK *et al.*, 2016). Da mesma forma, células de adenocarcinoma de mama murino altamente metastáticas DA3 tratadas com Hipericina no escuro tiveram perda significativa de viabilidade celular comparado com as células controle, apresentando um IC₅₀ de aproximadamente 2 µM (BLANK *et al.*, 2001).

Além das atividades antitumorais, a Hipericina no escuro demonstrou ter atividades antiangiogênese e antimetástase (BLANK *et al.*, 2004; MARTÍNEZ-POVEDA; QUESADA; MEDINA, 2005). A angiogênese, formação de vasos sanguíneos, é descrita como uma das características comuns do câncer, a qual é importante para o crescimento do tumor, invasão e formação de metástases (HANAHAHAN; WEINBERG, 2000). A Hipericina quando testada *in vitro* e no escuro, possui a capacidade de inibir etapas importantes da angiogênese, como a proliferação das células endoteliais, formação tubular e degradação da matriz extracelular por uroquinases (MARTÍNEZ-POVEDA; QUESADA; MEDINA, 2005). Em um estudo *in vivo* com ratos, também foi demonstrado que a Hipericina no escuro consegue diminuir a formação de metástases do câncer de mama (BLANK *et al.*, 2004). Ratos que tiveram os tumores primários derivados de células de adenocarcinoma de mama murino altamente metastática

DA3 excisados cirurgicamente (quando já existiam micrometástases) e tratados com 6 doses de Hipericina com intervalos de 5 dias, apresentaram um aumento significativo da sobrevivência a longo prazo, além de destruição de várias lesões metastáticas pulmonares (BLANK *et al.*, 2004).

Embora nenhum desses estudos relacione as atividades antitumorais, antiangiogênicas e antimetástases da Hipericina no escuro com a inibição de p38 δ , este seria um possível mecanismo de ação dessa molécula no câncer de mama. Foi observado que no modelo de camundongos de câncer de mama, MMTV-PyMT (PyMT), existe um aumento de p38 δ no tumor da mama e nas metástases do tecido pulmonar, quando comparados com camundongos controle (WADA *et al.*, 2017). Além disso, o *knockout* de p38 δ no mesmo modelo PyMT, após 14 semanas, resulta em 90% de diminuição do número de lesões metastáticas pulmonares (WADA *et al.*, 2017). Portanto, se a Hipericina *in vivo* reduz o número de metástases no pulmão e o *knockout* de p38 δ *in vivo* também, a atividade antimetástase da Hipericina no escuro no câncer de mama poderia estar relacionada com sua ligação no sítio do ATP da p38 δ e, conseqüentemente, com a inibição da atividade enzimática da proteína.

Para verificar os efeitos citotóxicos da Hipericina no escuro no câncer de mama, células da linhagem MCF-7 foram tratadas com diferentes concentrações da molécula por 24 e 48 horas. Porém, em nenhum tratamento foi observado perda de viabilidade significativa (FIGURA 16). No entanto, um estudo com células DA3 mostrou que é necessário pelo menos 72 horas de tratamento com Hipericina no escuro para que possa ser observado perda de viabilidade celular, enquanto que a molécula fotoativada possui efeitos citotóxicos em períodos menores (BLANK *et al.*, 2001). Além disso, foi sugerido que a Hipericina induz a catástrofe mitótica, a qual leva ao acúmulo de células na fase G2-M, ao aumento do volume celular e multinucleação, a partir de 48 horas de tratamento, atingindo o pico em 72 horas (BLANK *et al.*, 2003). Portanto, as células tratadas com Hipericina poderiam estar temporariamente viáveis durante esse período e explicaria o fato de não ter sido notada perda de viabilidade após os tratamentos com Hipericina por 24 e 48 horas.

Pensando nos efeitos a longo prazo da Hipericina, as células MCF-7 foram tratadas com diferentes concentrações desse composto e o número de colônias filhas foi avaliado após 10 dias. Porém, nos ensaios de clonogênico foram encontradas algumas divergências. No primeiro ensaio foi verificado uma redução da proliferação celular quando as células foram tratadas com 10 μ M de Hipericina (FIGURA 17), enquanto que no outro ensaio não houve redução significativa do número de colônias com nenhuma das doses do composto (FIGURA

18). Isso levantou a hipótese de que a molécula de Hipericina poderia estar sendo oxidada e perdendo sua atividade. Sabe-se que devido a fotossensibilidade da Hipericina, essa molécula pode sofrer oxidação rapidamente, se tornar instável e perder sua atividade (ZHANG *et al.*, 2020). Entretanto, ao ser associada com o antioxidante N-Acetilcisteína, a Hipericina não teve sua atividade citotóxica aumentada em células MCF-7 (FIGURA 19).

Visto que nesse estudo a Hipericina não apresentou os efeitos citotóxicos descritos na literatura, uma nova pequena molécula, PIT97, foi selecionada para seguir na busca por um novo tratamento mais seletivo e eficaz para o câncer de mama. O PIT97, em baixas concentrações, possui efeitos citotóxicos nas células MCF-7, como foi observado com o ensaio de MTT (FIGURA 21 e 22) e clonogênico (FIGURA 23). Na concentração de 0,1 μ M, o PIT97 tem potencial não só de inibir a proliferação a curto prazo, mas continua tendo efeito a longo prazo, impedindo que as colônias de células tumorais cresçam mesmo 10 dias após o tratamento (FIGURA 23). Além disso, nessa mesma concentração de 0,1 μ M, o PIT97 não é tóxico para as células de macrófagos murino RAW 264.7. Esses resultados demonstram que o PIT97 tem potencial para ser utilizado como tratamento farmacológico para o câncer de mama, visto que teria efeito somente nas células tumorais.

O composto PIT97 foi desenhado com a proposta de inibir a proteína quinase glicose sintase 3 β (GSK3 β), tendo em vista um possível tratamento para o Alzheimer (HEIDER *et al.*, 2019). Entretanto, o aumento da expressão de GSK3 β já foi relatado em alguns tipos de câncer, como câncer de mama e ovário, e estaria relacionado com a proliferação, imortalidade e invasão das células tumorais (GAO *et al.*, 2019). Além disso, pacientes com câncer de mama com aumento da expressão de GSK3 β já foram correlacionados com pior prognóstico, como aumento do risco da recorrência da doença metastática após ressecção e aumento do risco de morte (QUINTAYO *et al.*, 2012; WALZ *et al.*, 2017). Já foi demonstrado também que GSK3 β ativa consegue inativar a proteína MEKK4, uma quinase conhecida por fosforilar e ativar as vias de p38 e JNK (ABELL; GRANGER; JOHNSON, 2007). Como consequência dessa inativação de MEKK4 por GSK3 β , tem-se também redução da atividade de JNK e p38 (ABELL; GRANGER; JOHNSON, 2007). De acordo com esse mecanismo, poderia se pensar também em um tratamento com o composto PIT97 associado a um composto inibidor de p38, de forma a potencializar o seu efeito.

Embora o PIT97 tenha sido desenhado visando a inibição de GSK3 β , o mecanismo de ação dele em células MCF-7 ainda não foi elucidado. Porém, não se descarta a hipótese de que seu mecanismo de ação esteja relacionado com as rotas de sinalização p38 MAPK. Sabe-

se por um ensaio bioquímico *in vitro* que o PIT97 a 0,5 μM inibe aproximadamente 36% da atividade de p38 δ e, nessa mesma concentração, não inibe a atividade de p38 α (HEIDER *et al.*, 2019). Visto que já foi determinado que o IC_{50} desse composto para inibir GSK3 β é 3 nM (HEIDER *et al.*, 2019), enquanto que na MCF-7 o IC_{50} é 0,1 μM , o mecanismo de ação do PIT97 nessa linhagem pode envolver outras proteínas quinases. Portanto, a atividade antitumoral do PIT97 no câncer de mama pode estar relacionada com a inibição de p38 δ ou outras isoformas de p38. Atuando como um inibidor de uma via de sinalização a qual está desregulada no câncer de mama, o PIT97 pode ser um candidato à fármaco mais seletivo para o tratamento dessa doença. No entanto, mais estudos com o PIT97 são necessários para que se possa elucidar o mecanismo de ação dele no câncer de mama.

6 CONCLUSÃO

A p38 δ recentemente emergiu como um alvo de drogas para o tratamento de alguns tipos de câncer devido ao seu envolvimento na regulação de diversos processos celulares. Embora apresente papéis antagonistas nas células tumorais, no câncer de mama a p38 δ foi descrita como uma proteína com papel-chave no crescimento do tumor primário e na formação de metástases. Tendo em vista esses papéis, a p38 δ foi proposta como um alvo em potencial para ser explorado no tratamento do câncer de mama metastático. Na busca *in silico* por pequenas moléculas inibidoras específicas de p38 δ , esse estudo propôs a Hipericina como uma molécula com potencial de inibir a atividade da enzima p38 δ .

Apesar de todas evidências das atividades antitumorais da Hipericina *in vitro* e *in vivo*, nesse estudo essa molécula não apresentou os efeitos citotóxicos esperados nas células da linhagem de câncer de mama humano MCF-7. Porém, não se descarta a hipótese de que ela seja um possível inibidor de p38 δ , já que os resultados *in silico* e os resultados do ensaio imunoenzimático *in vitro* apontam para isso. Existem outras linhagens de câncer de mama as quais poderiam ser testadas quanto à expressão da proteína p38 δ e atividade da molécula Hipericina, a fim de confirmar essa hipótese. Além disso, visto que outros cânceres, entre eles o de cabeça e pescoço, de pele, cólon e fígado, e inclusive outras doenças como Diabetes, Alzheimer e doenças inflamatórias, têm relação com a atividade de p38 δ , a Hipericina pode ser também estudada como tratamento farmacológico de outras doenças com alta expressão e ativação de p38 δ .

Como alternativa terapêutica mais seletiva para o câncer de mama, foi proposto o composto PIT97, o qual apresenta atividade antitumoral nas células do câncer de mama e consegue inibir a proliferação de células tumorais a longo prazo. As perspectivas desse estudo são elucidar o mecanismo de ação do PIT97 nas células da linhagem de câncer de mama, avaliar a relação do seu mecanismo de ação com a inibição de p38 δ e se essa molécula possui

atividade antimetástase, cujos resultados poderão indicar de forma mais detalhada se o PIT97 tem potencial para ser utilizado como fármaco no tratamento do câncer de mama, bem como do câncer de mama metastático. Visto que os tratamentos hoje existentes para o câncer de mama possuem efeitos colaterais e em estágios avançados da doença são oferecidos mais com a intenção paliativa, é de extrema importância o investimento em pesquisas que visem a caracterização de novos fármacos mais seletivos para serem utilizados no tratamento do câncer de mama.

7 REFERÊNCIAS

- ABDELHAFEZ, Omaima M. *et al.* Design and molecular modeling of novel P38 α MAPK inhibitors targeting breast cancer, synthesized from oxygen heterocyclic natural compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1308–1319, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.02.027>
- ABELL, Amy N.; GRANGER, Deborah A.; JOHNSON, Gary L. MEKK4 stimulation of p38 and JNK activity is negatively regulated by GSK3 β . **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30476–30484, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M705783200>
- ADAMS, Ralf H. *et al.* Essential role of p38 α MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. **Molecular Cell**, v. 6, n. 1, p. 109–116, 2000. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(05\)00014-6](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(05)00014-6)
- AKRAM, Muhammad *et al.* Awareness and current knowledge of breast cancer. **Biological Research**, v. 50, n. 33, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40659-017-0140-9>
- ALEVY, Yael G. *et al.* IL-13-induced airway mucus production is attenuated by MAPK13 inhibition. **Journal of Clinical Investigation**, v. 122, n. 12, p. 4555–4568, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1172/JCI64896>
- ALONSO, Gema *et al.* Differential activation of p38 mitogen-activated protein kinase isoforms depending on signal strength. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 51, p. 40641–40648, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M007835200>
- ALONSO, Hernán; BLIZNYUK, Andrey A.; GREASY, Jill E. **Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design**, v. 26, p. 531-568, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/med.20067>
- AMERICAN CANCER SOCIETY. **Breast Cancer Facts & Figures 2019-2020**. Atlanta: American Cancer Society, Inc., 2019. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2019.11.009>
- AMIN, Kamelia M. *et al.* Synthesis and molecular docking studies of new furochromone derivatives as p38 α MAPK inhibitors targeting human breast cancer MCF-7 cells. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 8, p. 2423–2436, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2017.02.065>
- ARIAZI, Eric A.; CRAIG JORDAN, V. Estrogen receptors as therapeutic targets in breast cancer. In: **Nuclear Receptors as Drug Targets**. Wiley Blackwell, 2008. v. 39, p. 127–199. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/9783527623297.ch5>

BAUDINO, Troy A. Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 12, p. 3–20, 2015

BERMAN, Helen M. *et al.* **The Protein Data Bank Nucleic Acids Research**, v. 28, 2000

BERNSTEIN, Frances C. *et al.* The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 112, p. 535–542, 1977. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1977.tb11885.x>

BERTRAM, John S. The molecular biology of cancer. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 21, p. 167–223, 2001

BLANK, Michael *et al.* Anti-cancer Activities of Hypericin in the Dark. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 2, p. 120–125, 2001

BLANK, Michael *et al.* Enhanced Ubiquitinylation of Heat Shock Protein 90 as a Potential Mechanism for Mitotic Cell Death in Cancer Cells Induced with Hypericin. **Cancer Research**, v. 63, p. 8241–8247, 2003

BLANK, Michael *et al.* Antimetastatic activity of the photodynamic agent hypericin in the dark. **International Journal of Cancer**, v. 111, n. 4, p. 596–603, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.20285>

BRAICU, Cornelia *et al.* A comprehensive review on MAPK: A promising therapeutic target in cancer. **Cancers**, v. 11, n. 10, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>

BRANCHO, Deborah *et al.* Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. **Genes and Development**, v. 17, n. 16, p. 1969–1978, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1101/gad.1107303>

BRANZEI, Dana; FOIANI, Marco. Regulation of DNA repair throughout the cell cycle. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 4, p. 297–308, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrm2351>

BRAY, Freddie *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, p. 394–424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

BREEN, Meghan E.; SOELLNER, Matthew B. **Small molecule substrate phosphorylation site inhibitors of protein kinases: Approaches and challenges**. American Chemical Society, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cb5008376>

CARGNELLO, Marie.; ROUX, Philippe P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 50–83, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mmbr.00031-10>

CHAFFER, Christine L.; WEINBERG, Robert A. A perspective on cancer cell metastasis. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1559–1564, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1203543>

CHEN, Lu *et al.* Inhibition of the p38 kinase suppresses the proliferation of human ER-negative breast cancer cells. **Cancer Research**, v. 69, n. 23, p. 8853–8861, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1636>

CORRE, Isabelle; PARIS, François; HUOT, Jacques. The p38 pathway, a major pleiotropic cascade that transduces stress and metastatic signals in endothelial cells. **Oncotarget**, v. 8, n.

33, p. 55684-55714, 2017.

COX, Kurt J.; SHOMIN, Carolyn D.; GHOSH, Indraneel. Tinkering outside the kinase ATP box: Allosteric (type IV) and bivalent (type V) inhibitors of protein kinases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 29-43, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.4155/fmc.10.272>

CRIADO, Gabriel *et al.* Alternative p38 MAPKs are essential for collagen-induced arthritis. **Arthritis and Rheumatology**, v. 66, n. 5, p. 1208–1217, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/art.38327>

CUADRADO, Ana; NEBREDÁ, Angel R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 403–417, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>

CUENDA, Ana; ROUSSEAU, Simon. p38 MAP-Kinases pathway regulation, function and role in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1773, p. 1358-1375, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.03.010>

CUENDA, Ana; SANZ-EZQUERRO, Juan José. p38 γ and p38 δ : From Spectators to Key Physiological Players. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, p. 431-442, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.008>

DASARI, Shaloom; TCHOUNWOU, Paul B.. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 740, p. 364-378, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.07.025>

DAVIDS, Lester M. *et al.* Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 91, n. 2–3, p. 67–76, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.01.011>

DE ALMEIDA, Vera Lúcia *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0100-40422005000100021>

DEL BARCO BARRANTES, Ivan *et al.* Genetic analysis of specific and redundant roles for p38 α and p38 β MAPKs during mouse development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 31, p. 12764–12769, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1015013108>

DEL REINO, Paloma *et al.* Pro-oncogenic role of alternative p38 mitogen-activated protein kinases p38 γ and p38 δ , linking inflammation and cancer in colitis-associated colon cancer. **Cancer Research**, v. 74, n. 21, p. 6150–6160, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-0870>

DESANTIS, Carol E. *et al.* Breast cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 6, p. 438–451, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21583>

DETHLEFSEN, Christine; HØJFELDT, Grith; HOJMAN, Pernille. The role of intratumoral and systemic IL-6 in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 138, p. 657-664, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2488-z>

DIXON, Kathleen; KOPRAS, Elizabeth. Genetic alterations and DNA repair in human carcinogenesis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, n. 6, p. 441–448, 2004.

ESCÓs, Alejandra *et al.* p38 γ and p38 δ Mitogen Activated Protein Kinases (MAPKs), New Stars in the MAPK Galaxy. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 4, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcell.2016.00031>

FEIJOO, Carmen *et al.* Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38 δ at Thr50 promotes microtubule assembly. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 2, p. 397–408, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jcs.01655>

FERLAY, Jacques *et al.* **Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow**. Lyon, France: 2018. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/tomorrow>.

FERREIRA, Leonardo G. *et al.* Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 13384–13421, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules200713384>

FOSTER, Irene. Cancer: A cell cycle defect. **Radiography**, v. 14, p. 144–149, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.radi.2006.12.001>

FRANKEN, Nicolaas A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.339>

FREITAS-JUNIOR, Ruffo *et al.* Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics**, v. 67, n. 7, p. 731–737, 2012.

GAO, Chunyi *et al.* Regulation of AKT phosphorylation by GSK3 β and PTEN to control chemoresistance in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 176, n. 2, p. 291–301, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-019-05239-3>

GAO, Linda *et al.* Genome-wide promoter methylation analysis identifies epigenetic silencing of MAPK13 in primary cutaneous melanoma. **Pigment Cell and Melanoma Research**, v. 26, n. 4, p. 542–554, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/pcmr.12096>

GOEDERT, Michel *et al.* Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. **The EMBO Journal**, v. 16, n. 12, p. 3563–3571, 1997a

GOEDERT, Michel *et al.* Phosphorylation of microtubule-associated protein tau by stress-activated protein kinases. **FEBS Letters**, v. 409, n. 1, p. 57–62, 1997 b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)00483-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)00483-3)

GRISHAM, Joe W.; KAUFMANN, William K.; KAUFMAN, David G. The Cell Cycle and Chemical Carcinogenesis. **Pathology and Immunopathology Research**, v. 1, p. 49–66, 1983. Disponível em: <https://doi.org/10.1159/000154949>

GUPTA, Gaorav P.; MASSAGUÉ, Joan. Cancer Metastasis: Building a Framework. **Cell**, v. 127, n. 4, p. 679–695, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.11.001>

HA, Ngoc Han; FARAJI, Farhoud; HUNTER, Kent W. Mechanisms of metastasis. **Breast Cancer Research**, v. 10, n. 1, p. S2, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7876-8-17>

HALLER, Vanessa *et al.* An updated patent review of p38 MAP kinase inhibitors (2014–2019). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 30, n. 6, p. 453–466, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1749263>

HANAHAAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. The Hallmarks of Cancer. **Cell**, v. 100, p. 57-70, 2000

HANAHAAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

HARLES, C.; HAPIRO, L. S. Side effects of a adjuvant treatment of breast cancer. **N Engl J Med**, v. 344, p. 1997-2008, 2001.

HEIDER, Fabian *et al.* Pyridinylimidazoles as GSK3 β Inhibitors: The Impact of Tautomerism on Compound Activity via Water Networks. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 10, n. 10, p. 1407–1414, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/acsmmedchemlett.9b00177>

HUGHES, Russell *et al.* Perivascular M2 macrophages stimulate tumor relapse after chemotherapy. **Cancer Research**, v. 75, n. 17, p. 3479–3491, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3587>

HUSE, Morgan; KURIYAN, John. The Conformational Plasticity of Protein Kinases. **Cell**, v. 109, p. 275–282, 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER; JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). A interpretação das novas diretrizes para a detecção precoce do câncer de mama no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 32, n. 8, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00111516>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil. **Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva**. ed. Rio de Janeiro, RJ: 2019

JENDŽELOVSKÁ, Zuzana *et al.* Hypericin in the light and in the dark: Two sides of the same coin. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, n. 560, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00560>

JOHANSEN, Claus *et al.* The mitogen-activated protein kinases p38 and ERK1/2 are increased in lesional psoriatic skin. **British Journal of Dermatology**, v. 152, n. 1, p. 37–42, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2004.06304.x>

JUNTILA, M. R. *et al.* p38 α and p38 δ mitogen-activated protein kinase isoforms regulate invasion and growth of head and neck squamous carcinoma cells. **Oncogene**, v. 26, n. 36, p. 5267–5279, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210332>

KACAN, Turgut *et al.* Investigation of antitumor effects of sorafenib and lapatinib alone and in combination on MCF-7 breast cancer cells. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 15, n. 7, p. 3185–3189, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.7.3185>

KAMINSKA, Bozena. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy - From molecular mechanisms to therapeutic benefits. In: 2005, **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1754, p. 253–262. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2005.08.017>

KAMIŃSKA, Marzena *et al.* Breast cancer risk factors. **Przegląd Menopauzalny**, v. 14, n. 3, p. 196–202, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.5114/pm.2015.54346>

KARCHER, Solveigh; LAUFER, Stefan. Successful Structure-Based Design of Recent p38 MAP Kinase Inhibitors. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 7, p. 655–676,

2009. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156802609789007363>

KIM, Eun Kyung; CHOI, Eui Ju. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1802, p. 396-405, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2009.12.009>

KIM, Eun Kyung; CHOI, Eui Ju. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 867-882, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1472-2>

KIM, Sunghwan *et al.* PubChem 2019 update: Improved access to chemical data. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D1102–D1109, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/nar/gky1033>

KIMBUNG, Siker; LOMAN, Niklas; HEDENFALK, Ingrid. Clinical and molecular complexity of breast cancer metastases. **Seminars in Cancer Biology**, v. 35, p. 85–95, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2015.08.009>

KISS, Alexi *et al.* Cell type-specific p38 δ targeting reveals a context-, stage-, and sex-dependent regulation of skin carcinogenesis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20071532>

KITATANI, Kazuyuki *et al.* Acid β -Glucosidase 1 Counteracts p38 δ -dependent Induction of Interleukin-6: possible role for ceramide as an anti-inflammatory lipid. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 19, p. 12979–12988, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M809500200>

KLEEMANN, Britta *et al.* St John's Wort (*Hypericum perforatum* L.) photomedicine: Hypericin-photodynamic therapy induces metastatic melanoma cell death. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103762>

KOEBERLE, Solveigh C. *et al.* Skepinone-L is a selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor. **Nature Chemical Biology**, v. 8, p. 141–143, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nchembio.761>

KONDOH, Yasumitsu *et al.* Comparative chemical array screening for p38 π/σ MAPK inhibitors using a single gatekeeper residue difference between p38 α/β and p38 π/σ . **Scientific Reports**, v. 6, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep29881>

KOUL, Hari K.; PAL, Mantu; KOUL, Sweaty. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. **Genes and Cancer**, v. 4, p. 342-359, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1947601913507951>

KUBIN, A. *et al.* Hypericin - The Facts About a Controversial Agent. **Current Pharmaceutical Design**, v. 11, p. 233–253, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1381612053382287>

KUFAREVA, Irina; ABAGYAN, Ruben. Type-II kinase inhibitor docking, screening, and profiling using modified structures of active kinase states. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, p. 7921-7932, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm8010299>

KUMA, Yvonne *et al.* BIRB796 inhibits all p38 MAPK isoforms in vitro and in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19472–19479, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1074/jbc.M414221200>

KUMAR, Ganesan S. *et al.* Dynamic activation and regulation of the mitogen-activated

- protein kinase p38. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 18, p. 4655–4660, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1721441115>
- KYRIAKIS, John M.; AVRUCH, Joseph. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: A 10-year update. **Physiological Reviews**, v. 92, n. 2, p. 689–737, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1152/physrev.00028.2011>
- LAMBERT, Arthur W.; PATTABIRAMAN, Diwakar R.; WEINBERG, Robert A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell Press**, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.037>
- LASKOWSKI, Roman A. *et al.* PDBsum: A Web-based database of summaries and analyses of all PDB structures. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 12, p. 488–490, 1997. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01140-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01140-7)
- LASKOWSKI, Roman A. *et al.* PDBsum: Structural summaries of PDB entries. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 129–134, 2018
- LAVECCHIA, A.; DI GIOVANNI, C. Virtual Screening Strategies in Drug Discovery: A Critical Review. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 2839–2860, 2013
- LEE, Eva Y. H. P.; MULLER, William J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, p. a003236, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/978160805016111201010064>
- LEE, Matthew R.; DOMINGUEZ, Celia. MAP kinase p38 inhibitors: clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. **Curr Med Chem**, v. 12, n. 25, p. 2979–2994, 2005.
- LEELANANDA, Sumudu P.; LINDERT, Steffen. Computational methods in drug discovery. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 12, p. 2694–2718, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3762/bjoc.12.267>
- LIU, Qiang *et al.* MiR-155 regulates glioma cells invasion and chemosensitivity by p38 isoforms in vitro. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 116, n. 7, p. 1213–1221, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcb.25073>
- MARTÍNEZ-LIMÓN, Adrián *et al.* The p38 pathway: From biology to cancer therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms21061913>
- MARTÍNEZ-POVEDA, Beatriz; QUESADA, Ana R.; MEDINA, Miguel Ángel. Hypericin in the dark inhibits key steps of angiogenesis in vitro. **European Journal of Pharmacology**, v. 516, n. 2, p. 97–103, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2005.03.047>
- MAUGHAN, Karen L.; LUTTERBIE, Mark A.; HAM, Peter S. Treatment of Breast Cancer. **Am Fam Physician**, v. 81, p. 1339–1346, 2010
- MENG, Li; HUANG, Zhijun. In silico-in vitro discovery of untargeted kinase–inhibitor interactions from kinase-targeted therapies: A case study on the cancer MAPK signaling pathway. **Computational Biology and Chemistry**, v. 75, p. 196–204, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2018.05.012>
- MILLER, Kimberly D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.3322/caac.21565>

MIRMALEK, Seyed Abbas *et al.* Cytotoxic and apoptogenic effect of hypericin, the bioactive component of *Hypericum perforatum* on the MCF-7 human breast cancer cell line. **Cancer Cell International**, v. 16, n. 3, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12935-016-0279-4>

MODI, Vivek; DUNBRACK, Roland L. Defining a new nomenclature for the structures of active and inactive kinases. **PNAS**, v. 116, n. 14, p. 6818–6827, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5281/zenodo.2580462>

MORRIS, GARRETT M. *et al.* Automated Docking Using a Lamarckian Genetic Algorithm and an Empirical Binding Free Energy Function GARRETT. **Journal of Computational Chemistry**, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998. Disponível em: <https://doi.org/10.1037/h0077195>

MORRIS, GARRETT M. *et al.* AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. **Journal of Computational Chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc>

MOSMANN, Tim. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUDGETT, John S. *et al.* Essential role for p38 α mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 19, p. 10454–10459, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.180316397>

MURPHY, Adrian G.; ZHENG, Lei. Small molecule drugs with immunomodulatory effects in cancer. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 11, n. 10, p. 2463–2468, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1057363>

NICOLINI, A. *et al.* Metastatic breast cancer: an updating. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 60, n. 9, p. 548–556, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2006.07.086>

O'CALLAGHAN, Carol *et al.* Loss of p38 δ expression promotes oesophageal squamous cell carcinoma proliferation, migration and anchorage-independent growth. **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 2, p. 405–415, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.1968>

O'CALLAGHAN, Carol; FANNING, Liam J.; BARRY, Orla P. P38 δ MAPK: Emerging Roles of a Neglected Isoform. **International Journal of Cell Biology**, v. 14, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/272689>

O'CALLAGHAN, Carol; FANNING, Liam J.; BARRY, Orla P. p38 δ MAPK phenotype: An indicator of chemotherapeutic response in oesophageal squamous cell carcinoma. **Anti-Cancer Drugs**, v. 26, n. 1, p. 46–55, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000156>

O'SHAUGHNESSY, Joyce. Extending Survival with Chemotherapy in Metastatic Breast Cancer. **The Oncologist**, v. 10, n. S3, p. 20–29, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1634/theoncologist.10-90003-20>

OLIVEIRA, Paula A. *et al.* Chemical carcinogenesis. **Anais da Academia Brasileira de**

Ciencias, v. 79, n. 4, p. 593–916, 2007

OMRAN, Abdel R. The Epidemiologic Transition: A Theory of the Epidemiology of Population Change. **The Milbank Quarterly**, v. 83, n. 4, p. 731–757, 2005

PALMER, B. V. *et al.* Adjuvant chemotherapy for breast cancer: side effects and quality of life. **Br Med J**, v. 281, n. 6255, p. 1594–1597, 1980

PARGELLIS, Christopher *et al.* Inhibition of p38 MAP kinase by utilizing a novel allosteric binding site. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 4, p. 268–272, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nsb770>

PARK, Jae B. In silico screening and in vitro activity measurement of javamide analogues as potential p38 MAPK inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms18122704>

PAUL, Arindam; PAUL, Soumen. The breast cancer susceptibility genes (BRCA) in breast and ovarian cancers. **Front Biosci**, v. 19, n. 4, p. 605–618, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2741/4230>

PLOTNIKOV, Alexander *et al.* The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 1619–1633, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.12.012>

QUINTAYO, Mary Anne *et al.* GSK3 β and cyclin D1 expression predicts outcome in early breast cancer patients. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 136, n. 1, p. 161–168, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10549-012-2229-8>

REDIG, Amanda J.; MCALLISTER, Sandra S. Breast cancer as a systemic disease: a view of metastasis. **J Intern Med**, v. 274, n. 2, p. 113–126, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181a15ae8>.Screening

REMY, Gaëlle *et al.* Differential activation of p38MAPK isoforms by MKK6 and MKK3. **Cellular Signalling**, v. 22, n. 4, p. 660–667, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.11.020>

RISCO, A. *et al.* p38 γ and p38 δ kinases regulate the Toll-like receptor 4 (TLR4)-induced cytokine production by controlling ERK1/2 protein kinase pathway activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 28, p. 11200–11205, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.1207290109>

RISCO, Ana; CUENDA, Ana. New Insights into the p38 γ and p38 δ MAPK Pathways . **Journal of Signal Transduction**, v. 2012, p. 1–8, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2012/520289>

ROJAS, Kristin; STUCKEY, Ashley. Breast Cancer Epidemiology and Risk Factors. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 59, n. 4, p. 651–672, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/GRF.0000000000000239>

ROMANO, Valentina; DE BEER, Tjaart A. P.; SCHWEDE, Torsten. A computational protocol to evaluate the effects of protein mutants in the kinase gatekeeper position on the binding of ATP substrate analogues. **BMC Research Notes**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13104-017-2428-9>

ROY, P.; SAIKIA, B. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian J Cancer**, v. 53, p. 441–442, 2016.

SAHU, Vishal *et al.* Diagnostic Significance of p38 Isoforms (p38 α , p38 β , p38 γ , p38 δ) in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Comparative serum level evaluation and design of novel peptide inhibitor targeting the same. **Cancer Research and Treatment**, v. 51, n. 1, p. 313–325, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4143/crt.2018.105>

SAMADI, Pouria *et al.* Emerging ways to treat breast cancer: will promises be met? **Cellular Oncology**, v. 41, p. 605–621, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s13402-018-0409-1>

SANCAR, Aziz *et al.* Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 39–85, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723>

SANTARPIA, Libero; LIPPMAN, Scott M.; EL-NAGGAR, Adel K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 16, n. 1, p. 103–119, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.645805>

SANTELLA, Regina M. *et al.* DNA adducts, DNA repair genotype/phenotype and cancer risk. **Mutation Research**, v. 592, p. 29–35, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2005.06.001>

SCHIAVON, Gaia *et al.* Analysis of ESR1 mutation in circulating tumor DNA demonstrates evolution during therapy for metastatic breast cancer. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 313, p. 313–182, 2015

SCHINDLER, Eva M. *et al.* p38 δ mitogen-activated protein kinase is essential for skin tumor development in mice. **Cancer Research**, v. 69, n. 11, p. 4648–4655, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4455>

SCHINDLER, Thomas *et al.* Structural Mechanism for STI-571 Inhibition of Abelson Tyrosine Kinase. **Science**, v. 289, p. 1938–1942, 2000

SCHNEIDER, Caroline A.; RASBAND, Wayne S.; ELICEIRI, Kevin W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671–675, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>

SCULLY, OLIVIA JANE *et al.* Breast Cancer Metastasis. **Cancer Genomics & Proteomics**, v. 9, p. 311–320, 2012.

SHAHLAEI, Mohsen; DOOSTI, Elham. Virtual screening based on pharmacophore model followed by docking simulation studies in search of potential inhibitors for p38 map kinase. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 80, p. 352–372, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.041>

SHAMSI, Mahdiyeh; PIRAYESH ISLAMIAN, Jalil. Breast cancer: early diagnosis and effective treatment by drug delivery tracing. **Nuclear Medicine Review**, v. 20, n. 1, p. 45–48, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.5603/nmr.2017.0002>

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2016. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 66, p. 7–30, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21551>

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

STEEG, Patricia S.; THEODORESCU, Dan. Metastasis: A therapeutic target for cancer.

Nature Clinical Practice Oncology, v. 5, p. 206-219, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/ncponc1066>

SOULE, H. D. *et al.* A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 51, p. 1409-1416, 1973

SUMARA, Grzegorz *et al.* Regulation of PKD by the MAPK p38 δ in Insulin Secretion and Glucose Homeostasis. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 235–248, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.11.018>

TAN, Felicia Li Sher *et al.* p38delta/MAPK13 as a diagnostic marker for cholangiocarcinoma and its involvement in cell motility and invasion. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 10, p. 2353–2361, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/ijc.24944>

THURMOND, Robin L. *et al.* Kinetics of small molecule inhibitor binding to p38 kinase. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 22, p. 5747–5754, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02512.x>

TONG, Michael; SEELIGER, Markus A. Targeting conformational plasticity of protein kinases. **ACS Chemical Biology**, v. 10, p. 190-200, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cb500870a>

UNG, Peter Man Un; SCHLESSINGER, Avner. DFGmodel: Predicting protein kinase structures in inactive states for structure-based discovery of type-II inhibitors. **ACS Chemical Biology**, v. 10, n. 1, p. 269–278, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/cb500696t>

VERMEULEN, Katrien; VAN BOCKSTAELE, Dirk R.; BERNEMAN, Zwi N. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. **Cell Prolif**, v. 36, p. 131-149, 2003

VINCENT, Thomas L.; GATENBY, R. A. An evolutionary model for initiation, promotion and progression in carcinogenesis. **International Journal of Oncology**, v. 32, n. 4, p. 729–737, 2008

WADA, M. *et al.* P38 delta MAPK promotes breast cancer progression and lung metastasis by enhancing cell proliferation and cell detachment. **Oncogene**, v. 36, p. 6649–6657, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/onc.2017.274>

WALZ, Amy *et al.* Molecular pathways: Revisiting glycogen synthase kinase-3 β as a target for the treatment of cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 23, n. 8, p. 1891–1897, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2240>

WAN, Liling; PANTEL, Klaus; KANG, Yibin. Tumor metastasis: Moving new biological insights into the clinic. **Nature Medicine**, v. 19, n. 11, p. 1450–1464, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nm.3391>

WANG, Lulu. Early diagnosis of breast cancer. **Sensors**, v. 17, n. 7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/s17071572>

WANG, Xuhong Sunny *et al.* **Molecular Cloning and Characterization of a Novel p38 Mitogen-activated Protein Kinase**. The Journal of Biological Chemistry, v. 272, n. 38, p. 23668-23674, 1997

WANG, Zhulun *et al.* Structural basis of inhibitor selectivity in MAP kinases. **Structure**, v. 6, n. 9, p. 1117–1128, 1998

WEIGELT, Britta; PETERSE, Johannes L.; VEER, Laura J. van't. Breast cancer metastasis:

Markers and models. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 8, p. 591-602, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrc1670>

WEINBERG, Robert A. Oncogenes and tumor suppressor genes. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 44, p. 160–170, 1994

WHO. Global Cancer - Facts & Figures. Geneva: **World Health Organization**, 4th Edition, 2018

WHO. WHO report on cancer: setting priorities, investing wisely and providing care for all. Geneva: **World Health Organization**, 2020

WILLIAMS, Gary M. Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment. **Toxicology**, v. 166, n. 1–2, p. 3–10, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(01\)00442-5](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(01)00442-5)

WU, Peng; NIELSEN, Thomas E.; CLAUSEN, Mads H. FDA-approved small-molecule kinase inhibitors. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 7, p. 422-439, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2015.04.005>

YASUDA, Kazuyo *et al.* MAPK13 is preferentially expressed in gynecological cancer stem cells and has a role in the tumor-initiation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 472, n. 4, p. 643–647, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.03.004>

YU, Jia Xin *et al.* Phenotype-based screens with conformation-specific inhibitors reveal p38 gamma and delta as targets for HCC polypharmacology. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 18, n. 9, p. 1506–1519, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-18-0571>

YURTSEVER, Zeynep *et al.* The crystal structure of phosphorylated MAPK13 reveals common structural features and differences in p38 MAPK family activation. **Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography**, v. 71, n. 4, p. 790–799, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1107/s1399004715001212>

YURTSEVER, Zeynep *et al.* First comprehensive structural and biophysical analysis of MAPK13 inhibitors targeting DFG-in and DFG-out binding modes. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1860, n. 11, p. 2335–2344, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.06.023>

ZHANG, Jie *et al.* Hypericin: Source, Determination, Separation, and Properties. **Separation and Purification Reviews**, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/15422119.2020.1797792>

ZHANG, Jiyan; SHEN, Beifen; LIN, Anning. Novel strategies for inhibition of the p38 MAPK pathway. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 6, p. 286-295, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.04.008>

ZHANG, Wei; LIU, Hui Tu. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9–18, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>

ZHONG, Jun *et al.* Rat mesothelioma cell proliferation requires p38 δ mitogen activated protein kinase and C/EBP- α . **Lung Cancer**, v. 73, n. 2, p. 166–170, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2010.12.003>

ZUCCOTTO, Fabio *et al.* Through the “gatekeeper door”: Exploiting the active kinase conformation. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 2681-2694, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm901443h>

ZUR, Rafal *et al.* Combined deletion of p38 γ and p38 δ reduces skin inflammation and protects from carcinogenesis. **Oncotarget**, v. 6, n. 15, p. 12920–12935, 2015.